







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μελέτη της εξωκυττάριας άμυνας στο οξειδωτικό  
στρες - Συμβολή νέας μεθόδου μέτρησης  
αντιοξειδωτικής ικανότητας και οξειδωτικής  
κατάστασης βιολογικών υγρών  
ex vivo**

**Πάυλος Σ. Χαραλαμπίδης**  
Γενικός - Οικογενειακός Ιατρός

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**





«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 ( νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Χαραλαμπίδη Παύλου:** 27-9-2002

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 484<sup>α</sup>/15-10-2002

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

**Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** αριθμ. συνεδρ. 631<sup>α</sup>/18-3-2008

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Βελτσίστας Παναγιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 7-11-2002

*«Μελέτη της εξωκυττάριας άμυνας στο οξειδωτικό στρες. Συμβολή νέας μεθόδου μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας-οξειδωτικής κατάστασης βιολογικών υγρών, ex vivo.»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 697<sup>α</sup>/7-12-2010

1. Ανωγειανάκης Γεώργιος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου ΑΠΘ
2. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Βελτσίστας Παναγιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Βεζυράκη Πατρώνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων



7. Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 4-4-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Γουδέβενος Ιωάννης**

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ





*Αφιερώνεται στους γονείς μου Σοφοκλή και Αργυρώ,  
σε αυτούς οφείλω τα πάντα...*





## **Πρόλογος**

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί τα τελευταία χρόνια πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος εξαιτίας του κομβικού ρόλου που διαδραματίζει στην κυτταρική γήρανση αλλά και στην εμφάνιση και εξέλιξη μιας πληθώρας ασθενειών. Η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου με τα ποικίλα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού, αλλά και τα εξωγενή ( κυρίως διατροφικά προσλαμβανόμενα ) αντιοξειδωτικά μόρια είναι αντικείμενο ζωνής ερευνητικής δραστηριότητας. Βιβλιογραφικά διαπιστώνεται ιδιαίτερη έμφαση στην διερεύνηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε ενδοκυττάριο επίπεδο, ενώ το εξωκυττάριο περιβάλλον αποτελεί δευτερεύον ερευνητικό πεδίο, πιθανώς λόγω της πολυπλοκότητας του και των ποικίλων και μεταβαλλόμενων συνθηκών του.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του όλου φαινομένου αποκτά επομένως προφανή σημασία. Για τον σκοπό αυτό, αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία, όλα αυτά τα χρόνια, ποικίλες μέθοδοι, άλλοτε απλές και άλλοτε περίπλοκες τεχνικά. Σταδιακά εντοπίζονται οι υπάρχουσες τεχνικές αδυναμίες και περιορισμοί των μεθόδων αυτών. Σημειώνεται έντονος προβληματισμός σχετικά με την αδυναμία των υπαρχόντων μεθόδων να ανιχνεύσουν και πόσο μάλλον να ποσοτικοποιήσουν την αντιοξειδωτική δράση πληθώρας λιποδιαλυτών ουσιών του εξωκυτταρίου περιβάλλοντος, μια και οι μέθοδοι αυτές μετρούν ως επί το πλείστον υδατοδιαλυτές ουσίες.

Στο σημείο αυτό ξεκίνησε η προσπάθειά μας για την εισαγωγή μιας νέας μεθόδου μέτρησης της αντιοξειδωτικής προστασίας, ποιοτικά και ποσοτικά, η οποία να επιτρέπει την μέτρηση του συνόλου της αντιοξειδωτικής δράσης των υδατοδιαλυτών και των λιποδιαλυτών ουσιών του εξωκυτταρίου περιβάλλοντος. Στόχος της διατριβής αυτής, πέρα

από την εισαγωγή αυτού του μετρητικού εργαλείου, είναι και η εφαρμογή του σε συνδυασμό με υπάρχουσες μεθοδολογίες στην μελέτη της συμβολής του εξωκυττάριου περιβάλλοντος στην προστασία του οργανισμού από βλαπτικές επιδράσεις, ιδιαίτερα αναφορικά με τις ελεύθερες ρίζες στα πλαίσια του οξειδωτικού στρες.

Το ταξίδι ήταν μακρύ και επίπονο, με πολλές δυσκολίες. Οι Κύκλωπες και οι Λαιστρυγόνες καρακοδοκούσαν σε κάθε ερευνητικό στάδιο. Δίχως την αμέριστη συμπαράσταση και αρωγή της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής αυτή η μικρή «Οδύσσεια» δεν θα έπιανε ασφαλές λιμάνι. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Φυσιολογίας κο Άγγελο Ευαγγέλου για την εμπιστοσύνη που με περιέβαλε αρχικά ώστε να μου αναθέσει την εκπόνηση διαδακτορικής διατριβής, για την αμέριστη επιστημονική και ηθική υποστήριξη του κατά την διάρκειά της, αλλά και για την προτροπή του να παρουσιάσω σε διεθνές επίπεδο τα ερευνητικά αποτελέσματά μου, στα πλαίσια του 10<sup>ου</sup> Διεθνούς Συμποσίου Μεταλλικών Ιόντων στην Βιολογία και την Ιατρική ( 19 - 22 /5/08 ) στην Κορσική, Γαλλία.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κο Παναγιώτη Βελτσίστα, επίσης πνευματικό γονέα της καινοτόμου μεθοδολογίας που διαπραγματεύεται η παρούσα διατριβή, για τις ατελείωτες ώρες που μου αφιέρωσε στο εργαστήριο του και την καθοριστική συμβολή του στην περάτωση του πονήματος αυτού.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας κο Δημήτριο Γαλάρη για την καθοδήγηση και την εποικοδομητική κριτική του κατά την πορεία της ερευνητικής προσπάθειας, αλλά και για την ευγενική πρόσκλησή του να παρουσιάσω για πρώτη φορά τα ερευνητικά αποτελέσματά μου στα πλαίσια του 5<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Ελευθέρων Ριζών & Οξειδωτικού Stress ( 28/9 – 1/10 / 06 ) που διοργάνωσε με επιτυχία στην Καρδαμύλη Μεσσηνίας.

Ευχαριστώ του διδάκτορες πλέον της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κυρίους Ιωάννη Σίμο και Ιωάννη Βεργινάδη για την άριστη συνεργασία αλλά και για την φιλία με την οποία με τιμούν.

Ευχαριστώ επίσης τον επίσης διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιστήθιο φίλο κο Χρήστο Κασσίδη, για την μεγάλη ηθική συμπαράσταση αλλά και για την μύησή μου από τα φοιτητικά μου χρόνια στους καημούς και τις χαρές της ερευνητικής διαδικασίας.

Ευχαριστώ τον κο Γιώργο Τατσιο, φαρμακοποιό, φίλο και εξάίρετο βιοστατιστικό για την πολύτιμη βοήθειά του.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας, Καθηγητές, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, τις γραμματείς και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. για την άριστη συνεργασία και το χαμόγελό τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια που η αγαθή τύχη μου έδωσε, δίχως την συμπαράσταση της οποίας, υλική και ηθική, δεν θα βρισκόμουν σήμερα στην ευχάριστη αυτή θέση να συντάσσω τον πρόλογο αυτόν.



## Πίνακας περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	3
Α) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	3
i) Το παράδοξο του οξυγόνου .....	3
ii) Ελεύθερες ρίζες.....	5
iii) Δραστικές οξυγονούχες ενώσεις .....	9
iv) Οξειδωτικό στρες – αίτια & βιολογική σημασία .....	11
v) Ενδοκυττάρια & εξωκυττάρια άμυνα στο οξειδωτικό στρες.....	16
v. 1) Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη - C).....	22
v. 2) Βιταμίνη – E.....	24
Β) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΟΖΟΝ.....	26
Γ) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ .....	31
Δ) ΦΑΙΝΟΛΕΣ - ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ .....	36
i) Γενικά .....	36
ii) Κατεχίνες .....	40
i) Γενικά .....	44
ii) Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	49
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	55
<b>ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	55
Α) ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΑΝΟΥ ΤΟΥ CrO <sub>5</sub> ® .....	55
i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός .....	55
ii) Αρχή της μεθόδου <sup>249</sup> .....	56
iii) Συνθήκες & προετοιμασία δειγμάτων .....	58
iv) Μεθοδολογική ανάλυση .....	60
Β) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΕΣ.....	71
i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός .....	71
ii) Πρωτόκολλο μετρήσεων .....	72
Γ) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ Wistar .....	73
i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός .....	74
ii) Συνθήκες & προετοιμασία δειγμάτων .....	75
iii) Πρωτόκολλο πειράματος.....	75
iv) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) των ερυθροκυττάρων.....	76
v) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) των ερυθροκυττάρων.....	78
vi) Μέτρηση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης στα ούρα.....	80
vii) Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος, ερυθροκυττάρων και ούρων.....	81
viii) Στατιστική ανάλυση .....	81
Α) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΕΣ.....	83
Β) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ Wistar.....	85
i) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) των ερυθροκυττάρων.....	85
ii) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) των ερυθροκυττάρων.....	86

iii) Μέτρηση λιπιδιακής υπεροξειδωσης στα ούρα 24ωρου .....	88
iv) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος, ερυθροκυττάρων και ούρων .....	91
v) Συγκριτικές μετρήσεις.....	96
vi) Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων .....	102
vii) Μέτρηση μεταβολικών και διατροφικών παραμέτρων.....	104
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	109
<b>ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΥΣΙΤΕΧΝΙΑΣ</b> .....	119
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ</b> .....	121
A) ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	121
B) ΑΓΓΛΙΚΗ.....	124
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	129
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b> .....	155
<b>ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</b> .....	157
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b> .....	159

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### A) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

##### i) Το παράδοξο του οξυγόνου

Κατά την εξελικτική διαδικασία, με την σταδιακή αύξηση του ατμοσφαιρικού  $O_2$  και την μετατροπή των συνθηκών ζωής από αναερόβιες σε αερόβιες, οι οργανισμοί άρχισαν να προσαρμόζονται στην χρήση του για μεταβολικούς σκοπούς και παραγωγή ενέργειας, αλλά ταυτόχρονα προώθησαν την δημιουργία μιας σειράς ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών για την προστασία τους από την τοξικότητα του. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν αερόβιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούν το οξυγόνο, αλλά παράλληλα προστατεύονται σε μεγάλο βαθμό από τις τοξικές δράσεις του. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί το **παράδοξο του οξυγόνου**<sup>1</sup>. Η λεπτή αυτή ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών μηχανισμών και μεταβολικής χρήσης του οξυγόνου με συνθήκες χαμηλής τοξικότητας επέτρεψε την εξέλιξη σύνθετων πολυκύτταρων μορφών ζωής αλλά συνέβαλε και στην μακροβιότητα του ανθρώπου και άλλων ζώων<sup>2</sup>. Ωστόσο, η προοδευτική φθορά των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, σε συνδυασμό με την βλαπτική δράση των ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην σταδιακή επισυσσώρευση βλαβών στα διάφορα βιομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια κ.α) και τελικά γήρανση του οργανισμού.

Την δεκαετία του '50 η R. Gensham («Η τοξικότητα του οξυγόνου», 1954) και ο D. Harman πρότεινε την μεγάλη σημασία των ελευθέρων ριζών στην φυσιολογική

λειτουργία των βιολογικών συστημάτων αλλά και στην γήρανση των έμβιων όντων<sup>3,4</sup>. Η υπόθεση αυτή πήρε νέα διάσταση το 1969 με την ανακάλυψη του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot -}$ ) και του ενζυμικού ρόλου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (superoxide dismutase – SOD) στα έμβια όντα<sup>5</sup>. Ακολούθησε μια πληθώρα ανακαλύψεων αναφορικά με τον κεντρικό ρόλο των ελευθέρων ριζών και των οξειδωτικών οξυγονούχων ενώσεων στην φυσιολογία και στις ποικίλες μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου. Διαπιστώθηκε ότι συμμετέχουν ενεργά σε διάφορες ενζυμικές και μη διεργασίες καθώς και στην μεταγωγή σημάτων στο ενδοκυττάριο και στο εξωκυττάριο περιβάλλον μέσω οξειδοαναγωγικής χημείας (redox signaling). Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν την μέθοδο αυτή για την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών έναντι οξειδωτικών βλαβών και την διατήρηση σε ισορροπία της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης όταν εκτίθενται σε ROS / RNS, τόσο ενδογενούς όσο και εξωγενούς προέλευσης<sup>6</sup>. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, η θεωρία των «ελευθέρων ριζών» για την ερμηνεία της κυτταρικής γήρανσης και των νοσημάτων φθοράς των βιολογικών οργανισμών έχει βρει πολλούς θιασώτες στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, και υποστηρίζεται από μεγάλο όγκο επιδημιολογικών, κλινικών και πειραματικών δεδομένων<sup>7-12</sup>.

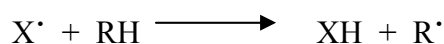
Ήδη από την δεκαετία του '60, διατυπώθηκαν υποθέσεις για την τοξικότητα του  $O_2$  στους αερόβιους οργανισμούς. Αρχικά, υπήρχε η άποψη, με βάση πειραματικά δεδομένα, ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλούσαν αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας στα κύτταρα<sup>13</sup>. Ωστόσο η υπόθεση αυτή δεν ήταν αρκετά στέρεη, μια και δεν ερμήνευε μια πληθώρα πειραματικών δεδομένων, με αποτέλεσμα από τις αρχές της δεκαετίας του '80 να διατυπωθεί η άποψη ότι σημαντικό ρόλο στην τοξική επίδραση στα έμβια όντα διαδραματίζουν όχι καθεαυτό το  $O_2$ , αλλά οι **ελεύθερες ρίζες οξυγόνου** (oxygen free radicals) και **αζώτου**, καθώς και οι **δραστικές οξειδωτικές οξυγονούχες**



(reactive oxygen species-ROS) και **αζωτούχες ενώσεις** (reactive nitrogen species-RNS)<sup>14-17</sup>.

## ii) Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο **ελεύθερες ρίζες** αποκαλούμε μόρια ή στοιχεία που φέρουν ένα μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τροχιακή στιβάδα τους. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δραστικές ενώσεις που τείνουν να αποσπών ένα άτομο με ηλεκτρόνιο για την δημιουργία ζεύγους ( $\downarrow\uparrow$ ). Με την βελτίωση των φασματοσκοπικών μεθόδων και ιδιαίτερα του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) κατέστη δυνατή η δομική μελέτη τους και η καταγραφή τους φάσματος τους<sup>18</sup>. Επειδή ο χρόνος ζωής της πλειοψηφίας τους είναι της τάξεως των  $10^{-6}$  με  $10^{-9}$  sec αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές δέσμευσής τους ή ανάλυσης των τελικών χημικών προϊόντων τους σε συνθήκες *in vivo* και *in vitro*. Ιδιαίτερα στα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική δέσμευσης ριζών με ειδικά νιτροξειδία και νιτρόνες (spin trapping)<sup>19</sup>. Αντιδρούν με χημικά μόρια αποσπώντας ένα τμήμα τους, συνήθως άτομα υδρογόνου. Ιδιαίτερη βιολογική σημασία έχει η απόσπαση αυτή από οργανικές ενώσεις (RH):



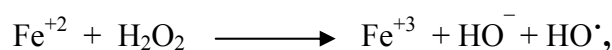
Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε περαιτέρω αλυσιδωτές αντιδράσεις, οι οποίες σε βιολογικά συστήματα μπορεί να προκαλέσουν τοξικές αλλοιώσεις ή θραύσεις σε βιομόρια, όπως ρήγματα σε κλώνους νουκλεϊκών οξέων, υπεροξειδωση λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών<sup>20</sup>.

Οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες που συναντώνται στις διάφορες βιολογικές διεργασίες φέρουν το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε άτομο οξυγόνου του μορίου τους. Οι κυριότερες είναι<sup>21</sup>:

- ρίζα υδροξυλίου (hydroxyl radical, HO<sup>•</sup>)
- ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου (superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)
- ρίζα υδροϋπεροξυλίου (hydroperoxyl radical, HOO<sup>•</sup>)
- ρίζα υπεροξυλίου (peroxyl radical, ROO<sup>•</sup>)
- ρίζα αλκοξυλίου (alkoxyl radical, RO<sup>•</sup>)
- ρίζα θειυλο- (thiyl radical, RS<sup>•</sup>)
- ρίζα μεθυλίου (methyl radical, <sup>•</sup>CH<sub>3</sub>)
- ρίζα τριτοταγούς αλκυλο-ομάδας [ (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C<sup>•</sup> ]
- ρίζα φαινοξυλίου (phenoxyl radical, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> - O<sup>•</sup>)
- ρίζα διαλκυαμινυλο-ομάδας (dialkylaminyl radical, R<sub>2</sub>N<sup>•</sup>)

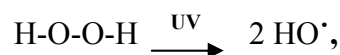
Η ρίζα υδροξυλίου είναι η πλέον σημαντική για την πρόκληση βλαβών σε βιολογικά συστήματα. Παράγεται σε βιολογικά υγρά, από μια ποικίλες αντιδράσεις όπως:

**1) η αντίδραση τύπου Fenton**



η οποία καταλύεται και από άλλα μεταπτώτικα μέταλλα εκτός του σιδήρου (πχ χαλκός, μαγγάνιο) λόγω της ικανότητας τους να αλλάζουν τους βαθμούς οξειδωσής τους κατά μια μονάδα και να δέχονται ή να αποδίδουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο εμφανίζοντας παραμαγνητικές ιδιότητες,

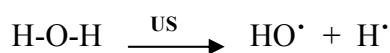
**2) η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την υπεριώδη ακτινοβολία**



**3) από το υποχλωριώδες οξύ παρουσία του ανιόντος σουπεροξειδίου**



**4) από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας ή υπερήχων στο νερό**



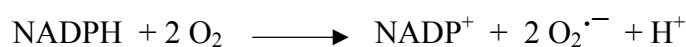
5) από το όζον σε υδατικά διαλύματα  $O_3 \longrightarrow HO^\bullet$ , κ.α.<sup>22,23</sup>. Η βιολογική σημασία της έγκειται στον κομβικό της ρόλο στην πρόκληση καρκινογένεσης από ορισμένους ξеноβιοτικούς ρύπους και την εμφάνιση συγκεκριμένων κακοήθων νεοπλασιών (ίνες αμιάντου, καπνός τσιγάρου και καρκίνος πνεύμονα κ.α.)<sup>24</sup>. Επιπλέον, η παρεμβολή στην δράση της από αντιοξειδωτικά συστήματα (πχ βιταμίνες, αλβουμίνη κ.α.) με μείωση των προκαλούμενων βλαβών σε βιομόρια εξηγεί τις αντικαρκινικές ιδιότητες διαφόρων ουσιών και φαρμάκων<sup>25</sup>.

Το υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^{\bullet-}$ ) είναι πολύ λιγότερο δραστικό από την ρίζα υδροξυλίου. Εργαστηριακά, μπορεί να παραχθεί ηλεκτροχημικά, από διάφορα υπεροξειδικά άλατα μετάλλων, με ακτινοβολία, από ένζυμα και με φωτοχημικές αντιδράσεις. In vino παράγεται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα και από αρκετά ένζυμα με την αναγωγή του  $O_2$  κατά την αντίδραση με ηλεκτρόνια ( $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet-}$ ). Πλήθος ενζύμων συμμετέχει στην παραγωγή του, όπως η οικογένεια ενζύμων NOX (I-V), οι οξειδάσες, οι υπεροξειδάσες, η ξανθινο-οξειδάση, η διοξυγενάση της τρυπτοφάνης, αλδεϋδική οξειδάση, οξειδάση της γαλακτόζης κ.α.<sup>21</sup>. Βιομόρια, όπως η γλυκεραλδεϋδη, η L-DOPA, η αδρεναλίνη, η κυστεΐνη, οι ανηγμένη μορφή του FAD κ.α., μέσω αντιδράσεων αυτο-οξειδωσης, προκαλούν την αναγωγή του  $O_2$  σε  $O_2^{\bullet-}$ , παρουσία μεταλλικών ιόντων ως καταλυτών (σίδηρος, χαλκός)<sup>26</sup>. Υπεροξειδικό ανιόν μπορεί επίσης να παραχθεί κατά την δέσμευση του  $O_2$  από την αίμη στο μόριο της αιμοσφαιρίνης:



Κατά την διαδικασία αυτή παρατηρείται απεντόπιση ηλεκτρονίων και συχνά διασπάται ένα μόριο οξυ-αιμοσφαιρίνης με ταυτόχρονη απελευθέρωση  $O_2^{\bullet-}$ <sup>27</sup>. Ωστόσο, η πιο σημαντική in vivo πηγή παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος είναι βιοχημικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων των αερόβιων οργανισμών, στο εσωτερικό βακτηριακών

μεμβρανών και μιτοχονδρίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 1-3% του  $O_2$  που ανάγεται στα μιτοχόνδρια ανάγεται προς  $O_2^{\bullet-}$ , ενώ τυχόν μιτοχονδριακές βλάβες αυξάνουν την διαρροή ηλεκτρονίων και την παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$  <sup>28,29</sup>. Το ενδοπλασματικό δίκτυο, παρουσία NAD, αποτελεί επίσης σημείο παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος. Η διεργασία επιτυγχάνεται μέσω της αναγωγής ενός ηλεκτρονίου υπό την καταλυτική επίδραση της NADPH – οξειδάσης, και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης  $O_2$ , όπως φαίνεται στην κάτωθι αντίδραση:



Το σχηματιζόμενο  $O_2^{\bullet-}$  μετατρέπεται περαιτέρω σε άλλες δραστικές οξυγονούχες ενώσεις και ρίζες (πχ  $HO^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ ) <sup>30</sup>.

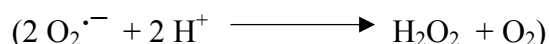
Ακόμη, ελεύθερες ρίζες με μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αλλά φερόμενο σε άτομο αζώτου είναι τα οξειδία του αζώτου ( $NO^{\bullet}$  και  $NO_2^{\bullet}$ ), τα οποία διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό βιολογικό ρόλο με τις οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες. Το μονοξείδιο του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) είναι ένα άχρωμο αέριο, μετρίως διαλυτό στο νερό αλλά εύκολα διαχυόμενο στα κύτταρα. Κατά την έκθεσή του σε οξυγόνο παράγεται διοξείδιο του αζώτου ( $NO_2^{\bullet}$ ) που είναι αρκετά πιο δραστική ρίζα. Το  $NO^{\bullet}$  συνενώνεται εύκολα με ιόντα μεταπτώτικων μετάλλων. Σε συνθήκες *in vivo* παράγεται από μια ομάδα ενζύμων, τις συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου, με την μετατροπή του αμινοξέος L-αργινίνη. Η δραστηριότητα των συνθετασών αυτών ρυθμίζεται προσεκτικά στα φυσιολογικά κύτταρα. Εντοπίζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά και στα νευρικά κύτταρα. Το παραγόμενο από το αγγειακό ενδοθήλιο  $NO^{\bullet}$ , αποτελώντας τον EDRF (endothelium derived relaxing factor), είναι ο κύριος ρυθμιστής της χαλάρωσης του λείου μυϊκού χιτώνα των αιμοφόρων αγγείων <sup>31,32</sup>. Στο νευρικό σύστημα, ο ρόλος του  $NO$  περιλαμβάνει την νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο, ενώ παράλληλα εμφανίζει νευρορυθμιστικές δράσεις σχετικές με την πλαστικότητα και ισχυροποίηση των νευρωνικών συνάψεων και την μνήμη <sup>33,34</sup>.

### iii) Δραστικές οξυγονούχες ενώσεις

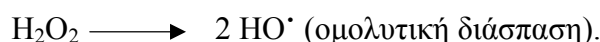
Με τον όρο **δραστικές οξυγονούχες ενώσεις** ονομάζουμε ενώσεις οι οποίες αν και δεν φέρουν μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, ωστόσο κάτω από ορισμένες συνθήκες (επίδραση μεταλλικών στοιχείων) συμμετέχουν σε μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι κυριότερες είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (peroxynitrite, O=N-O-O<sup>-</sup>), το μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) και το όζον (O<sub>3</sub>).

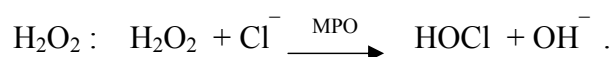
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό φυσιολογικό και παθοφυσιολογικό ρόλο. Διαλύεται εύκολα στο νερό. Παράγεται in vivo από διάφορα ένζυμα, με την συνένωση δύο μορίων υπεροξειδικού ανιόντος παρουσία κατιόντων υδρογόνου



Σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ελαφρά οξειδωτική ένωση με μικρή δραστικότητα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικό, ιδιαίτερα σε βακτήρια, και χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό. Ορισμένα ένζυμα απενεργοποιούνται παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, λόγω οξείδωσης των σουλφυδρικών (-SH) ομάδων τους <sup>35</sup>. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διαχέεται ταχύτατα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και παρουσία ιόντων μεταπτώτικων μετάλλων (κυρίως σιδήρου και χαλκού) παράγει την ρίζα υδροξυλίου (HO<sup>•</sup>) μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton, όπως προαναφέρθηκε, προκαλώντας μεταξύ άλλων οξειδωτικές βλάβες στο κυτταρικό DNA <sup>36</sup>. Ακόμη, παρουσία UV ακτινοβολίας διασπάται προς ρίζες υδροξυλίου:



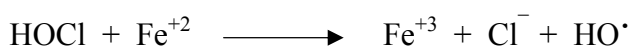
Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές οξύ, παραγόμενο από το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO, myeloperoxidase) σε ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα παρουσία



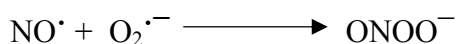
Σε βιολογικούς οργανισμούς προσβάλλει μεγάλο αριθμό μορίων – στόχων. Προκαλεί οξείδωση των σουλφυδρικών ομάδων, του ασκορβικού, του NADPH <sup>37</sup>. Χλωριώνει τις βάσεις του DNA και τις ομάδες τυροσίνης των πρωτεϊνών, ενώ απελευθερώνει μέταλλα από πρωτεΐνες όπως ψευδάργυρο από την μεταλλοθειονίνη <sup>38</sup>. Παρουσία του υπεροξειδικού ανιόντος σχηματίζει ρίζα υδροξυλίου:



καθώς και με την παρουσία δισθενούς σιδήρου (αντίδραση τύπου Fenton):



Το υπεροξυνιτρόδες ανιόν αποτελεί μόριο με μεγάλη βιολογική σημασία στον άνθρωπο, καθώς φαίνεται να διαδραματίζει βασικό ρόλο σε μια σειρά νευρο-εκφυλιστικών ασθενειών και νοσημάτων φθοράς <sup>39,40</sup>. Παράγεται από το μονοξειδίο του αζώτου παρουσία υπεροξειδικού ανιόντος:



Η πρωτονιομένη μορφή του ONOOH είναι ισχυρό οξειδωτικό σώμα με κυτταροτοξικές ιδιότητες. Το υπεροξυνιτρόδες ανιόν προκαλεί *in vivo* την οξείδωση σουλφυδρικών ομάδων, την οξείδωση λιπιδίων, την θραύση αλυσίδων του DNA, την νίτρωση και απαμίνωση των βάσεων του DNA, καθώς και την νίτρωση των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών <sup>41,42</sup>. Ειδικότερα η νίτρωση της τυροσίνης σε 3-νιτροτυροσίνη οδηγεί σε απενεργοποίηση ενζυμικών συστημάτων προκαλεί παρεμβολή στην μεταγωγή σήματος, λόγω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης των τυροσινο-κινασών <sup>43</sup>.

Το μονήρες οξυγόνο (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) παράγεται από το μοριακό οξυγόνο με την εισαγωγή ενέργειας. Το μοριακό οξυγόνο είναι διατομικό μόριο το οποίο διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε δύο διαφορετικά π τροχιακά. Αυτή είναι η πιο σταθερή κατάσταση του μορίου. Με την εισαγωγή ενέργειας παράγονται δύο δραστικότερες μορφές, η <sup>1</sup>ΔgO<sub>2</sub> και η <sup>1</sup>ΣgO<sub>2</sub>, γνωστές ως μονήρη οξυγόνα. Η <sup>1</sup>ΣgO<sub>2</sub> αποτελεί ελεύθερη ρίζα και διασπάται

ταχύτητα στην  $^1\Delta gO_2$  μορφή, η οποία δεν είναι ελεύθερη ρίζα μια και δεν διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το μονήρες οξυγόνο παράγεται στο εργαστήριο με φωτοχημικές αντιδράσεις, ενώ *in vivo* διάφορα βιομόρια είναι σε θέση να το παράγουν (π.χ. ριβοφλαβίνη και παράγωγά της). Σε ορισμένες παθήσεις, επίσης, μπορεί να παραχθεί μονήρες οξυγόνο, όπως στις διάφορες πορφυρίες <sup>44</sup>.

#### **iv) Οξειδωτικό στρες – αίτια & βιολογική σημασία**

Το οξυγόνο και οι δραστικές ενώσεις του είναι βασικά μόρια για την βιωσιμότητα των αερόβιων βιολογικών συστημάτων μέσα από την συμμετοχή τους σε πληθώρα μεταβολικών διεργασιών και την παραγωγή ενέργειας για την διατήρηση των λειτουργιών σε επίπεδο κυττάρου, ιστού και οργανισμού. Ωστόσο, αυτή αποτελεί την μία όψη του νομίσματος. Το οξυγόνο και οι ενώσεις του είναι παράλληλα υπεύθυνες για την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών σε βασικά βιομόρια και την αλλοίωση ή απενεργοποίησή τους <sup>45</sup>. Το σύνολο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων συνθηκών που οδηγούν στην χημική και μεταβολική παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) ονομάζεται **οξειδωτικό στρες** <sup>46</sup>.

Οι πηγές δραστικών ενώσεων οξυγόνου και αζώτου στο κύτταρο διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τις ενδοκυττάριας – ενδογενείς και τις εξωκυττάριας – εξωγενείς.

Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες που παράγονται από:

- την μικροσωμιακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων
- την μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

- την οξειδωτική δράση ενζύμων (πχ οικογένεια ενζύμων NOX, ξανθινο-οξειδάση, οξειδάση της γαλακτόζης, κυκλοξυγενάση, λιποξυγενάση, μονοαμινο-οξειδάση κ.α.)
- την φαγοκυτταρική δραστηριότητα λευκοκυττάρων και μακροφάγων
- αυθόρμητες αντιδράσεις αυτο-οξειδωσης, κ.α.

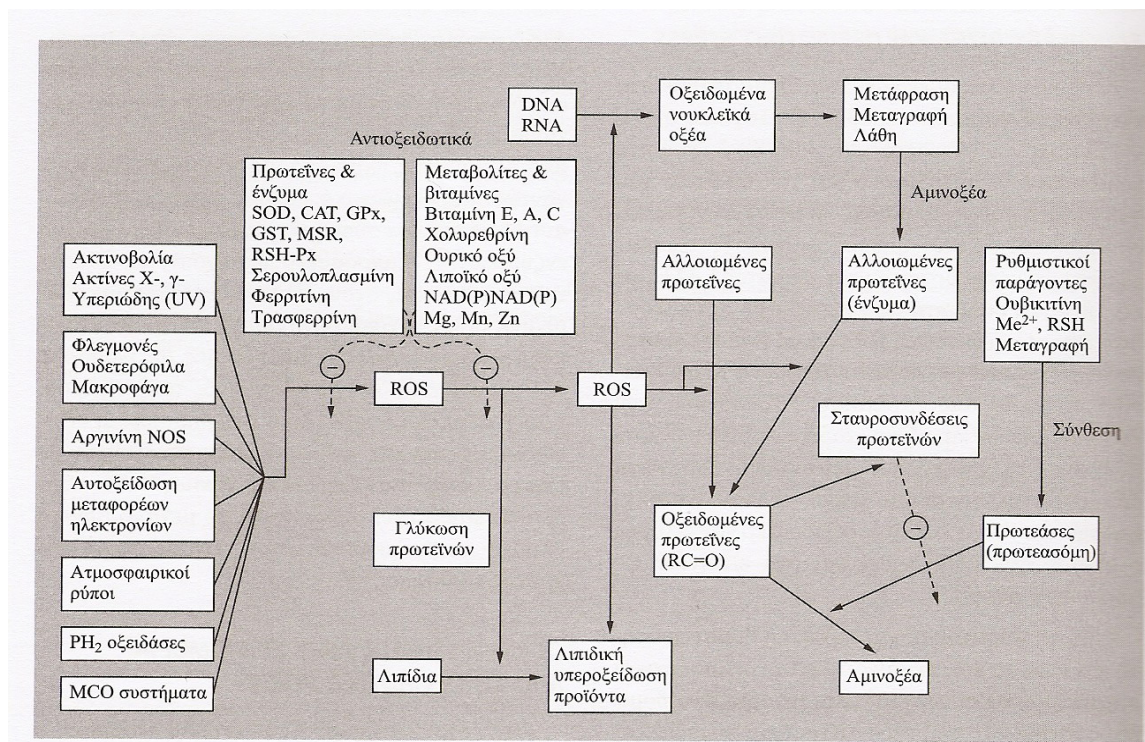
Στην δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες που παράγονται από:

- ουσίες που παράγουν οξειδο-αναγωγικές ανακυκλώσεις (πχ παρακουάτ, αλλοθάνη, δοξορουβική κ.α.)
- οξειδώσεις φαρμακευτικών ουσιών (πχ παρακεταμόλη)
- ο καπνός του τσιγάρου (με σταθερές ελεύθερες ρίζες στην πίσσα και ασταθείς στην αέρια φάση)
- ιοντίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες-χ, ακτίνες-γ, κοσμική ακτινοβολία, πυρηνική μόλυνση κ.α.)
- ηλιακή ακτινοβολία (κυρίως UV-A και UV-B)
- θερμικό shock
- καρκινογόνες χημικές ενώσεις (πχ τετραχλωράνθρακας, βενζόλιο, αμιάντος, πυριτικές ίνες, βαρέα μέταλλα, διοξίνες, διφαινόλες, νιτρο- και αζω – ενώσεις κ.α.)
- οξειδωτικά αέρια της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, οξείδια αζώτου, αιωρούμενα εισπνεόμενα μικροσωματίδια καυσαερίων κ.α.)<sup>47</sup>
- παρασιτικές ασθένειες, λοιμώξεις και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις κ.α.



Η βιολογική σημασία του όλου φαινομένου είναι τεράστια. Κατά την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού σημειώνεται συνεχής βομβαρδισμός του από ενδογενώς και εξωγενώς παραγόμενες ελεύθερες ρίζες. Σε νεαρές και μέσες ηλικίες αναπτύσσονται επιτυχώς ποικίλοι αμυντικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Η συνισταμένη του οξειδωτικού αυτού βομβαρδισμού και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών αποτελεί και το μέτρο της τελικού οξειδωτικού στρες που υφίσταται ο οργανισμός. Σε μεγαλύτερες ηλικίες όμως οι αμυντικοί αυτοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί παύουν να λειτουργούν ικανοποιητικά με τελικό αποτέλεσμα την επισυσσώρευση οξειδωτικών βλαβών και την σταδιακή έκπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού και την μεταλλαξιογένεση <sup>48 - 51</sup>. Το όλο φαινόμενο κατέχει κομβική θέση στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης καθώς και σε ένα πλήθος παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών όπως νεοπλασίες, αθηροσκλήρυνση, σακχαρώδης διαβήτης, νόσος Alzheimer's, οφθαλμικός καταρράκτης, και ο κατάλογος συνεχώς μεγαλώνει <sup>52 - 54</sup>.

Οι κυριότερες προκαλούμενες βλάβες σε βιομόρια αφορούν την λιπιδιακή υπεροξείδωση σε κυτταρικές μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες, την αλλοίωση των πρωτεϊνικών δομών (γλύκωση, νίτρωση, διάσπαση πεπτιδικών δεσμών, ενδιάμεσες συνδέσεις πρωτεϊνικών αλύσεων κ.α.), την αλλοίωση της δομής των νουκλεϊκών οξέων (θραύσεις αλυσίδων, χημικές αλλοιώσεις βάσεων κ.α.) και υδατανθράκων. Η αλλοίωση που προκαλείται στην δομή των μορίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργικότητας, την πρόιμη καταστροφή, την κυτταρική απόπτωση και στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων την αλλοίωση της κωδικοποιημένης πληροφορίας που περιέχουν και συνεπώς την μεταλλαξιογένεση. Σχηματική απεικόνιση του συνόλου αυτού οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών δράσεων αποτελεί το κάτωθι **[σχήμα 1 ]:**



**[Σχήμα 1]** Οξειδωτικό στρες και βλάβες σε βασικά βιομόρια (MSH=methionine sulfoxide reductase, GPx=glutathione peroxidase, CAT=catalase, SOD=superoxide dismutase, RSH-Px= thiol-specific peroxidase, NOS=nitric oxide synthetase, NA=nucleic acid, GST=glutathione transferase, MCO=metal-catalyzed oxidation, RSH=thiols). A.Βαλαβανίδης – Ελεύθερες ρίζες & ο ρόλος τους στα βιολογικά συστήματα, Εκδόσεις Βήτα 2006;68.

Η λιπιδιακή υπεροξειδωση αποτελεί σημαντικό παθοφυσιολογικό παράγοντα για την εμφάνιση αθηρωματικών και αρτηριοσκληρυντικών αλλοιώσεων στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, με τελικό απότοκο την εμφάνιση καρδιαγγειακών και άλλων νοσημάτων<sup>55,56</sup>. Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν αρχικά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών με την δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών. Ακολούθως, μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων, μετατρέπονται σε λιπιδιακά υπεροξειδία και υδροϋπεροξειδία. Τα τελικά προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης περιλαμβάνουν αλδεΐδες, αλκενάλες και αλκάνια, τα οποία με την κυτταροτοξική δράση τους στο ενδοθήλιο, και όχι μόνο, οδηγούν στην αθηρογένεση και την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Ωστόσο, η προκαλούμενη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία δεν είναι μόνο απότοκος της δηλητηριώδους δράσης των προϊόντων αυτών, αλλά στο όλο σύστημα υπεισέρχονται

και άλλοι παράγοντες. Η έρευνα έχει προσεγγίσει πλέον τον ρόλο των ROS στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση σημάτων και στην πρόκληση δομικών αλλοιώσεων στο ενδοθηλιακό κύτταρο, εξασκώντας με τον τρόπο αυτό και έμμεση βλαπτική επίδραση<sup>57-59</sup>.

Οι οξειδωτικές βλάβες στα πρωτεϊνικά μόρια επιφέρουν απώλεια της λειτουργικής τους αξίας σε κρίσιμα για την κυτταρική επιβίωση ενζυμικά συστήματα, ενώ παράλληλα τις καθιστά επιβλαβείς για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, οδηγώντας στην προοδευτική γήρανση και την εμφάνιση νόσων<sup>60,61</sup>. Οι οξειδωτικές δράσεις ξεκινούν συνήθως με την ρίζα υδροξυλίου να αφαιρεί ένα υδρογόνο από τον πολυπετιδικό σκελετό δημιουργώντας σε ένα αμινοξύ ανθρακική ρίζα. Ένα μόριο οξυγόνου αντιδρά ταχύτατα με την ανθρακική ρίζα σχηματίζοντας αλκυλοϋπεροξυλο – ρίζα, η οποία αποσπά με την σειρά της ένα μόριο υδρογόνου σχηματίζοντας αλκυλοϋπεροξειδίο, και το όλο φαινόμενο συνεχίζεται αλυσιδωτά. Τελικά μπορεί να δημιουργηθούν ενδιάμεσες γέφυρες μεταξύ πρωτεϊνών<sup>62</sup>, σχάση των πεπτιδικών δεσμών, οξείδωση των αμινοξέων των πεπτιδικών αλύσεων, οξείδωση των αμινοξέων των πεπτιδικών αλύσεων, με κομβικό τον ρόλο των μετάλλων μετάπτωσης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλων οξειδωτικών<sup>63</sup>. Εκτός από τις ROS, και οι δραστικές ενώσεις του αζώτου (NOS) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, ιδιαίτερα το υπεροξυνιτρώδες ανιόν. Δρα κυρίως ως παράγοντας πρωτεϊνικής οξείδωσης και νίτρωσης. Η μεθειονίνη και η κυστεΐνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην οξείδωση, ενώ η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη στην νίτρωση. Ειδικότερα η τελευταία επιδρά αρνητικά σε μηχανισμούς κυτταρικού μεταβολισμού με βαρύτατες συνέπειες για την εύρυθμη κυτταρική λειτουργία<sup>64</sup>. Ακόμη, οι πρωτεΐνες που περιέχουν λυσίνη, αργινίνη, προλίνη και θρεονίνη μπορούν να σχηματίσουν καρβονυλικά παράγωγα, τα οποία έχουν συσχετισθεί με την γήρανση και αρκετές νευροεκφυλιστικές παθήσεις<sup>65</sup>. Η συσσώρευση των πρωτεϊνικών βλαβών, ιδιαίτερα σε πρωτεολυτικά

ενζυμικά συστήματα επιφέρουν μείωση της πρωτεολυτικής ικανότητας του κυττάρου, η οποία σχετίζεται άμεσα με την ζωτικότητα του, και οδηγεί νομοτελειακά σε κυτταρικό <sup>66</sup>.

Οι οξειδωτικές βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα αποτελούν αντικείμενο επισταμένης έρευνας από το 1967, καθώς έχουν συσχετισθεί άμεσα με την γήρανση, τις νεοπλασίες και πλήθος άλλων παθολογικών καταστάσεων <sup>67,68</sup>. Κατά την καθημερινή λειτουργία τους, οι οργανισμοί δέχονται, ανάλογα με την μεταβολική τους δραστηριότητα, έναν ανηλεή οξειδωτικό βομβαρδισμό στο κυτταρικό DNA τους. Οι προκαλούμενες βλάβες αφορούν μονοκλωνικές θραύσεις, αποκοπή ολόκληρων μονοκλωνικών τμημάτων DNA, οξείδωση νουκλεϊκών βάσεων (σχηματισμός 8-υδροξυ-2'- δεοξυγουανωσίνης κ.α.) μεθυλίωση νουκλεϊκών βάσεων, σχηματισμός ενδιάμεσων δεσμών σε βάσεις, σχηματισμός 7-μεθυλογουανίνης κ.α <sup>69,70</sup>. Οι βλάβες αυτές αθροίζονται με την γήρανση, αλλά και λόγω αναποτελεσματικότητας των επιδιορθωτικών ενζυμικών μηχανισμών εκκαθάρισης του αλλοιωμένου DNA, οδηγώντας σε απώλεια πιστότητας της βιολογικής πληροφορίας που περιέχεται σε αυτό για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών κρίσιμων για την κυτταρική επιβίωση <sup>71,72</sup>.

#### **ν) Ενδοκυττάρια & εξωκυττάρια άμυνα στο οξειδωτικό στρες**

Η αντιοξειδωτική προστασία των βιολογικών συστημάτων στο ενδοκυττάριο περιβάλλον είναι ύψιστης σημασίας για την φυσιολογική λειτουργία και την επιβίωση του οργανισμού. Αναπτύχθηκε τα τελευταία δύο δεκατομμύρια χρόνια ως μια βασική μορφή άμυνας των βιολογικών συστημάτων έναντι των τοξικών δράσεων του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Επιτυγχάνεται με την κινητοποίηση ποικίλων ενζυμικών και μη συστημάτων και τις μεταξύ τους συνεργικές δράσεις. Ο τρόπος λειτουργίας αυτών των αντιοξειδωτικών παραγόντων ποικίλει αρκετά και είναι σε πολλές περιπτώσεις εξειδικευμένος, γεγονός που

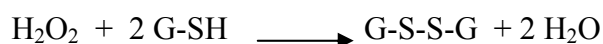
επιτείνει την δυσκολία εύρεσης ενός γενικού ορισμού που θα αγκαλιάζει την πληθώρα αυτή βιομορίων. Οι Halliwell και Gutteridge, στην 4<sup>η</sup> έκδοση του βιβλίου τους “Free Radicals in Biology and Medicine” προτείνουν τον ορισμό ως **αντιοξειδωτικού** οιασδήποτε ουσίας η οποία όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκρινόμενη με το οξειδούμενο υπόστρωμα, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού <sup>73</sup>. Κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα υδρόφιλα και τα λιποδιαλυτά. Κατά βάση, τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά αλληλεπιδρούν με οξειδωτικούς παράγοντες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και στην υδατική φάση των διαφόρων βιολογικών υγρών (πχ πλάσμα αίματος, σίελος, δάκρυα, αρθρικό υγρό, εκκρίσεις επιθηλίων κ.α.), ενώ τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά έχουν ως πρωταρχικό τους καθήκον την προστασία των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών από την υπεροξειδωση <sup>74,75</sup>. Οι ενώσεις αυτές, είτε αποτελούν προϊόν de novo σύνθεσης από τον οργανισμό (ενδογενή αντιοξειδωτικά), είτε ο οργανισμός αδυνατεί να τα συνθέσει και προσλαμβάνονται διαιτητικά από την διατροφή (εξωγενή αντιοξειδωτικά) <sup>76,77</sup>. Είναι παρούσες σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και κατανομών, με κάποια ενζυμικής φύσεως αντιοξειδωτικά να κατανέμονται κυρίως ενδοκυτταρίως ενώ άλλα (πχ ουρικό οξύ) να εμφανίζουν ομοιόμορφη κατανομή εντός και εκτός των κυττάρων.

Η δράση τους μπορεί να ταξινομηθεί αδρά στις κάτωθι κατηγορίες: **α)** καταλυτική απομάκρυνση ελευθέρων ριζών και ROS (πχ ένζυμα όπως υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάσες, υπεροξειδάσες κ.α.), **β)** πρωτεϊνικά μόρια δέσμευσης ιόντων μεταπτωσηικών μετάλλων (κυρίως σιδήρου και χαλκού) για τον περιορισμό κατάλυσης αντιδράσεων παραγωγής ελευθέρων ριζών (πχ τρανσφερίνες, φεριτίνη, σερουλοπλασμίνη, μεταλλοθειονίνες κ.α.), **γ)** εκκαθάριση (scavenging) ελευθέρων ριζών σχηματιζόμενων στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και μείωση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης των διαφόρων βιομορίων, **δ)** αποσύνθεση υπεροξειδίων και άλλων δραστικών

μορίων (ένζυμα επισκευής του DNA κ.α.), καθώς και έλεγχο της μεταφοράς οξυγόνου <sup>78,79</sup>.

Ειδικότερα, στο ενδοκυττάριο περιβάλλον εξασκούν κυρίως αντιοξειδωτική δράση οι κάτωθι μηχανισμοί <sup>80,81</sup>:

- τα ένζυμα υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), τα οποία απομακρύνουν καταλυτικά το *in vivo* σχηματιζόμενο υπεροξειδικό ανιόν, εμποδίζοντας την καθεαυτό οξειδωτική δράση του αλλά και την δευτερευόντως παραγωγή από αυτό ελευθέρων ριζών και ROS (ρίζα υδροξυλίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου και υπεροξυνιτρώδες ανιόν) <sup>82</sup>
- η ενζυμική ομάδα των καταλασών, υπεύθυνη για την καταλυτική αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς ύδωρ και οξυγόνο <sup>83,84</sup>
- η ενζυμική ομάδα των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης (GPx), η οποία εμπεριέχει σελήνιο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και απομακρύνει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συνδυάζοντας την αναγωγή του σε ύδωρ με την οξείδωση της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (G-SH):



Η σχέση μεταξύ ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) παραμένει υψηλή μέσω ενός ενζυμικού μηχανισμού ανακύκλωσης της οξειδωμένης μορφής προς GSH (αναγωγάσες γλουταθειόνης) παρουσία NADPH <sup>85 - 87</sup>. Η ανηγμένη γλουταθειόνη προφυλάσσει επίσης τις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών από οξειδωτική επίθεση και αποτρέπει την δημιουργία διασταυρούμενων συνδέσεων, ενώ σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με τον χαλκό εμποδίζοντας την κατάλυση αντιδράσεων παραγωγής ελευθέρων ριζών <sup>88</sup>.

- η ενζυμική ομάδα των θειολο-δισουλφιδο-οξειδοαναγωγασών, η οποία περιλαμβάνει ένζυμα επιδιόρθωσης οξειδωμένων πρωτεϊνών, με κυριότερους εκπροσώπους την θειορεδοξίνη<sup>89</sup> και τις πρωτεϊνικές δισουλφιδικές ισομεράσες<sup>90</sup>.
- η συμπλοκοποίηση (sequestration) ιόντων μεταπτωσηκών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου κ.α.) εμποδίζοντας την κατάλυση από μέρους τους αντιδράσεων παραγωγής τοξικών ελευθέρων ριζών. Ειδικότερα, ο σίδηρος είναι το μεταλλικό ιόν σε μεγαλύτερη αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό και για την μεταφορά, αποθήκευση και χρήση του επιστρατεύεται μια σειρά πρωτεϊνών όπως η τρανσφερίνη, η φεριτίνη, η λακτοφερίνη και η αιμοσφαιρίνη<sup>91 - 94</sup>. Ο χαλκός αποθηκεύεται σε πρωτεϊνικά μόρια όπως η αλβουμίνη και η σερουλοπλασμίνη<sup>95,96</sup>. Ακόμη, οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια με την ικανότητα να δεσμεύουν στο μόριό τους ιόντα μετάλλων όπως χαλκός, ψευδάργυρος, άργυρος, κάδμιο (μέσω της θειολικής ομάδας της κυστεΐνης) και να ρυθμίζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό χαλκού και ψευδαργύρου<sup>97 - 99</sup>.

Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, σκοπός των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι η παροχή προστασίας στις επιφάνειες των λιπιδιακών μεμβρανών των κυττάρων αλλά και στις δύο φάσεις (λιπόφιλη και υδρόφιλη) των βιολογικών υγρών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως αντιοξειδωτικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και σε μικρό ποσοστό ένζυμα<sup>100</sup>. Μέρος των ουσιών αυτών παράγονται *in vivo*, ενώ σημαντικό ποσοστό είναι προϊόν διατροφικής πρόσληψης<sup>101 - 103</sup>. Ειδικότερα, στο εξωκυττάριο περιβάλλον δραστηριοποιούνται κυρίως τα κάτωθι αντιοξειδωτικά:

- οι εξωκυτταρικές δισμουτάσες CuZn-SOD και Mn-SOD, με σχετικά υψηλότερο μοριακό βάρος από τις αντίστοιχες ενδοκυτταριες, για τον περιορισμό του σχηματισμού υπεροξυ-νιτρόδους ανιόντος ( $\text{ONOO}^-$ ) από την αντίδραση υπεροξειδικού ανιόντος με μονοξείδιο του αζώτου<sup>104</sup>

- οι αλβουμίνες, οι οποίες δεσμεύουν τον χαλκό και λιγότερο τον σίδηρο παρεμποδίζοντας την δημιουργία ριζών υδροξυλίου, εξουδετερώνουν το HOCl και το ONOOH, σχηματίζουν σύμπλοκα με την αίμη και μεταφέρουν την χολερυθρίνη του αίματος<sup>105</sup>
- η χολερυθρίνη, η οποία είναι ισχυρός εκκαθαριστής υπεροξυλο – ριζών και μονήρους οξυγόνου ( $^1O_2$ ), ενώ σε σύμπλοκο με τον μεταφορέα της αλβουμίνη προστατεύει πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα από ελεύθερες ρίζες<sup>106</sup>
- η γλυκόζη, η οποία δρα ως εκκαθαριστής ριζών υδροξυλίου, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσω της μη-ενζυματικής γλυκοζυλίωσης πρωτεϊνών εμφανίζει οξειδωτική δράση<sup>107</sup>
- το ουρικό οξύ, το ποίο δρα ως εκκαθαριστής ROS και RNS, εμφανίζει ικανότητα συμπλοκοποίησης ιόντων σιδήρου και χαλκού, αναστέλλει την οξείδωση του ασκορβικού και περιορίζει την λιπιδιακή υπεροξειδωση των κυτταρικών μεμβρανών<sup>108,109</sup>
- η σερουλοπλασμίνη καταλύει την οξείδωση του  $Fe^{+2}$  σε  $Fe^{+3}$  χωρίς την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, είναι εκκαθαριστής του υπεροξειδικού ανιόντος ενώ παράλληλα εμποδίζει την λιπιδιακή υπεροξειδωση από ιόντα χαλκού και σιδήρου
- η λακτοφερίνη, δρα ως συμπλοκοποιητής του σιδήρου
- η τρανσφερίνη, δρα ως μεταφορέας και συμπλοκοποιητής του σιδήρου
- οι απτογλοβίνες και η αιμοπηξίνη, οι οποίες δεσμεύουν την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και αίμη αντίστοιχα, εμποδίζουν την απελευθέρωση του σιδήρου που περιέχουν και την περαιτέρω τοξική δράση του, ενώ παράλληλα παρέχουν προστασία από την λιπιδιακή υπεροξειδωση<sup>110,111</sup>



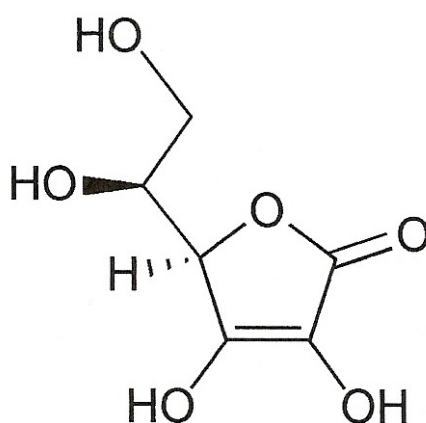
- το α-λιποϊκό οξύ, δρα δεσμευτικά για σίδηρο και χαλκό σε δομές με μικρή καταλυτική δράση για την παραγωγή ελευθέρων ριζών <sup>112</sup>
- η μελατονίνη και η σεροτονίνη παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, με ασθενέστερη αυτή της μελατονίνης <sup>113,114</sup>
- η ουβικινόνη ή συνένζυμο Q αποτελεί σημαντικό προστατευτικό παράγοντα έναντι της λιπιδιακής υπεροξειδωσης κυτταρικών μεμβρανών <sup>115,116</sup>
- το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη – C),
- οι τοκοφερόλες / τοκοτριενόλες (βιταμίνη – E), με σημαντικότερο εκπρόσωπο την α-τοκοφερόλη.

Το πλάσμα του αίματος αλλά και τα άλλα βιολογικά υγρά βρίθουν από αντιοξειδωτικά μόρια. Στην όλη στρατηγική διατήρησης της οξειδο-αναγωγικής ισορροπίας έναντι είτε οξειδωτικών καταστάσεων, είτε πτωχής διαιτητικής πρόσληψης αντιοξειδωτικών ουσιών, το αίμα διαδραματίζει κεντρικό ρόλο εξαιτίας της μεταφοράς και διασποράς σε όλο το σώμα, με την αιματική κυκλοφορία, των αντιοξειδωτικών ουσιών. Επομένως, η οξειδωτική κατάσταση του πλάσματος του αίματος αποτελεί καθρέφτη της συνολικής οξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού, και αντικείμενο εκτενούς μελέτης από διάφορους ερευνητές <sup>117</sup>. Η αντιοξειδωτική προστασία του πλάσματος διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: **α)** τα αντιοξειδωτικά πρώτης γραμμής, τα οποία περιλαμβάνουν πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη, τρανσφερίνη, σερουλοπλασμίνη κ.α.) που δεσμεύουν ιόντα μεταπτωσητικών μετάλλων όπως Cu ή Fe, και **β)** τα αντιοξειδωτικά δεύτερης γραμμής, όπως α-τοκοφερόλη, που δρα ως εκκαθαριστής – αδρανοποιητής των σχηματιζόμενων ελευθέρων ριζών. Βέβαια, η πλειοψηφία των αντιοξειδωτικών ουσιών εμφανίζει πολυεπίπεδη δράση, είτε σε επίπεδο δέσμευσης των ιόντων μετάλλων προτού αυτά

καταλύσουν αντιδράσεις τύπου Fenton και δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες, είτε σε επίπεδο απευθείας αδρανοποίησης των ελευθέρων ριζών <sup>118</sup>.

### v. 1) Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη - C)

Το ασκορβικό οξύ [σχήμα 2] είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη, ευδιάλυτη στο νερό. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Szent – Gyorgyi το 1928 από λάχανα, λεμόνια και πορτοκάλια ως «όξινο υδατάνθρακας». Τα φυτά και τα περισσότερα ζώα είναι σε θέση να συνθέσουν ασκορβικό από γλυκόζη, ενώ ο άνθρωπος, τα πρωτεύοντα, ορισμένα είδη ψαριών και φρουτόμυγας έχουν απωλέσει, κατά την εξελικτική διαδικασία, την ικανότητα de novo σύνθεσής του με αποτέλεσμα να εξαρτώνται από την διατροφική πρόσληψή του. Αποτελεί συμπράγοντα για τουλάχιστον 8 ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην σύνθεση του κολλαγόνου. Είναι απαραίτητο για την μετατροπή της ντοπαμίνης σε νοραδρεναλίνη καθώς και για την βιοσύνθεση της καρνιτίνης. Η διατροφική έλλειψή του προκαλεί μια πάθηση γνωστή ως σκορβούτο που χαρακτηρίζεται από εκσεσημασμένη ουλορραγία, γενικευμένη μυϊκή αδυναμία και οίδημα των άκρων.



[Σχήμα 2] Χημική δομή ασκορβικού οξέος

Το ασκορβικό οξύ εμφανίζει αμφίπλευρη δράση ως αντιοξειδωτικό αλλά και ενίοτε ως προαγωγός της οξειδωσης. Η προσφορά ενός ηλεκτρονίου από το ασκορβικό παράγει ασκορβύλιο, μια ελεύθερη ρίζα, το οποίο οξειδώνεται περαιτέρω προς δεϋδροασκορβικό. Το ασκορβύλιο δεν είναι ιδιαίτερος ενεργή ρίζα και δύσκολα συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, πράγμα που αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ασκορβικού, καθώς μια ενεργός ρίζα αντιδρά με ασκορβικό παράγεται το πολύ λιγότερο δραστικό ασκορβύλιο <sup>119</sup>. Η αντιοξειδωτική δράση του έχει μελετηθεί επισταμένα *in vitro* και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης από την αναγωγή των τοκοφερυλο-ριζών της σε κυτταρικές μεμβράνες, την εκκαθάριση του μονήρους οξυγόνου, του υπεροξειδικού ανιόντος, του υπεροξυ-νιτρώδους ανιόντος, των ριζών υδροξυλίου, του όζοντος, του διοξειδίου του αζώτου και του υποχλωριώδους οξέος, την προστασία από την λιπιδιακή υπεροξείδωση λόγω φλεγμονής, καπνίσματος τσιγάρου και απελευθέρωσης καταλυτικά ενεργού σιδήρου από το μόριο της αίμης κ.α. <sup>120 - 122</sup>

Τα επίπεδα ασκορβικού στο πλάσμα του αίματος κυμαίνονται από 30-90  $\mu\text{M}$ , ενώ είναι υψηλότερα στον οφθαλμό, στο σπέρμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο γαστρικό υγρό και στις εκκρίσεις του αναπνευστικού επιθηλίου. Τα επίπεδα αυτά είναι επαρκή για την άσκηση αποτελεσματικής αντιοξειδωτικής δράσης <sup>123</sup>. Αυξημένες απαιτήσεις σε ασκορβικό εμφανίζουν οι χρόνιοι καπνιστές σε σχέση με τους μη – καπνίζοντες <sup>124</sup>. Επίσης, αυξημένες ανάγκες σε ασκορβικό εμφανίζουν οι γυναίκες κατά την εγκυμοσύνη λόγω της ενεργής μεταφοράς του μέσω του πλακούντα προς το κύημα, καθώς και οι ηλικιωμένοι, οι οποίοι εμφανίζουν συνήθως ένδεια βιταμινών λόγω δυσμενών διατροφικών συνηθειών και παραμέλησης <sup>125,126</sup>.

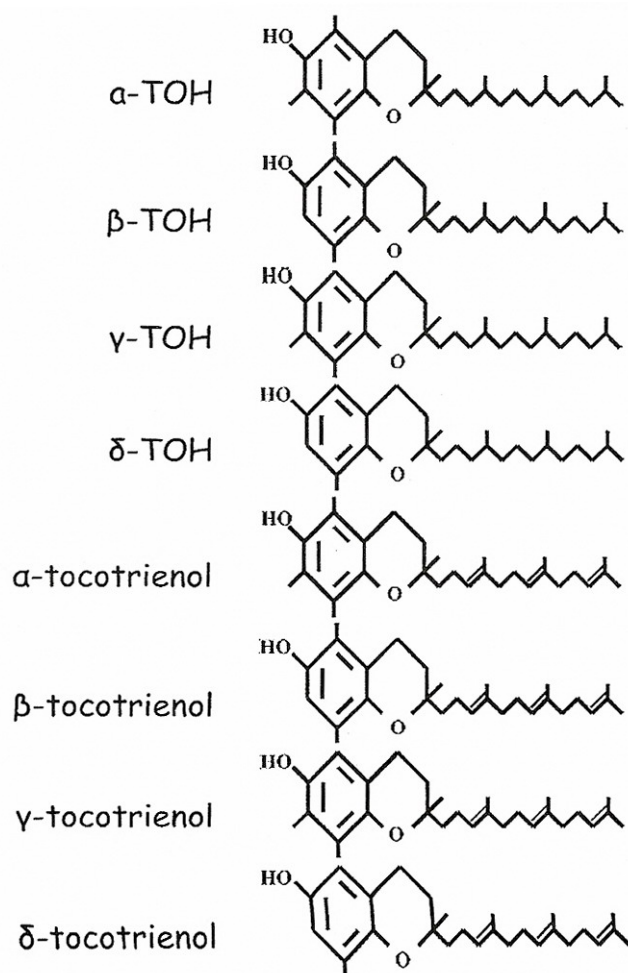
## v. 2) Βιταμίνη – E

Η βιταμίνη – E αποτελεί τον σημαντικότερο αναστολέα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης in vivo. Δεν αποτελεί συγκεκριμένη χημική ένωση αλλά διατροφικό όρο που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1922 και αναφέρθηκε σε ένα λιποδιαλυτό παράγοντα απαραίτητο στην διατροφή των ποντικών για την εξασφάλιση της φυσιολογικής αναπαραγωγής τους<sup>127</sup>. Περαιτέρω μελέτες ανέδειξαν την σπουδαιότητα της βιταμίνης E στην διατροφή και άλλων ζωικών ειδών, ενώ η ένδειά της επέφερε διαταραχές της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού όπως στειρότητα, μυϊκή ατροφία, αιμόλυση, παρεγκεφαλιδική ατροφία κ.α.<sup>128</sup> Στον άνθρωπο η χρόνια έλλειψη βιταμίνης – E επιφέρει σύνδρομα δυσαπορρόφησης των λιπαρών οξέων (πχ κυστική ίνωση, χρόνιες ηπατοπάθειες κ.α.) αιμορραγική διάθεση, τύφλωση και νευρολογικές ανωμαλίες όπως αταξία, άνοια<sup>129</sup>. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν είναι σε θέση να συνθέσει βιταμίνη E και εξαρτάται αποκλειστικά από την διατροφική πρόσληψή της. Οι διατροφικές πηγές της βιταμίνης E περιλαμβάνουν σιτηρά, φυτικής προέλευσης έλαια και τροφές που τα περιέχουν (πχ φυτικές μαργαρίνες), ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα τα αμύγδαλα και τα φουντούκια) και πράσινα φυλλώδη λαχανικά<sup>130</sup>.

Μια ομάδα φυσικών 4 τοκοφερολών (d-α, d-β, d-γ, d-δ ΤΟΗ) και 4 τοκοτριενολών (d-α, d-β, d-γ, d-δ) εμφανίζει δράση βιταμίνης – E, με κυριότερη ένωση την α – τοκοφερόλη [σχήμα 3].

Κυριότερος ρόλος της είναι η προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από την λιπιδιακή υπεροξειδωση μέσω της ταχείας εκκαθάρισης των σχηματιζόμενων λιπιδιακών υπεροξυλ - ρίζων προτού αυτές προλάβουν να αντιδράσουν με τις αλύσους των παρακείμενων λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών των μεμβρανών<sup>131,132</sup>. Ακόμη, οι τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες αυτές αδρανοποιούν το μονήρες οξυγόνο και

παρεμποδίζουν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών δεσμεύοντας τις ρίζες υδροξυλίου<sup>133,134</sup>.



**[Σχήμα 3]** Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών

Οι ημερήσιες διατροφικές ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί με ακρίβεια καθώς αποτελούν σημείο διαφωνίας μεταξύ των ειδικών. Τα δεδομένα είναι ασαφή, ενώ οι ημερήσιες ανάγκες σε βιταμίνη – E συχνά συνδέονται αναλογικά με την πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων<sup>135</sup>.

## **B) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΟΖΟΝ**

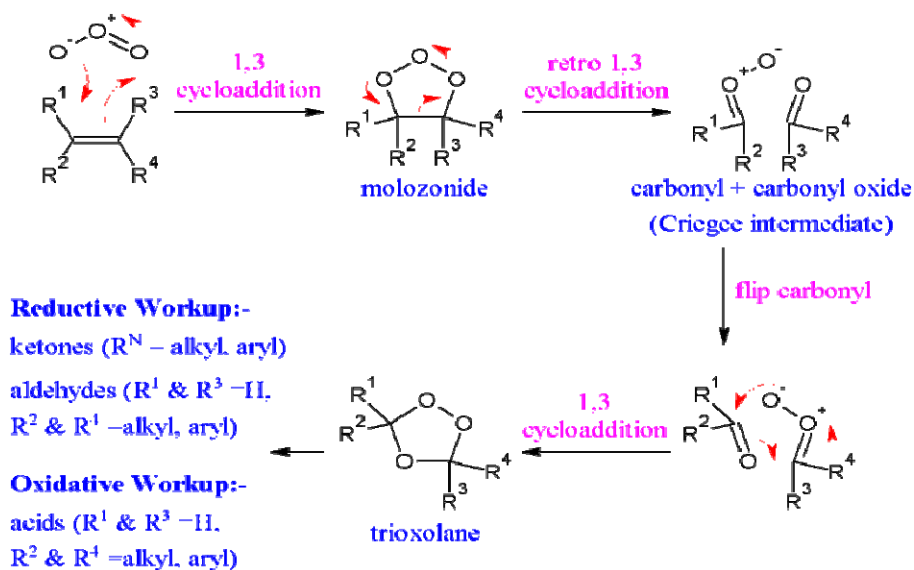
Το όζον ( $O_3$ ) ή τριατομικό οξυγόνο είναι ένα ερεθιστικό ισχυρά οξειδωτικό αέριο, ελάχιστα διαλυτό στο νερό, με χαρακτηριστική στυφή οσμή από την οποία προέρχεται ετυμολογικά και το όνομά του (από το αρχαιοελληνικό ὄζειν). Οι δύο δεσμοί μεταξύ των ατόμων οξυγόνου του μορίου του είναι ίσης ισχύος και ενδιάμεσης κατάστασης μεταξύ μονού και διπλού ομοιοπολικού δεσμού<sup>136</sup>. Ανακαλύφθηκε το 1834 από τον Schoenbein ο οποίος του απέδωσε ιδιότητες οξειδωτικού σώματος αλλά και απολυμαντικού μέσου. Κατά την διάρκεια του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία της γάγγραινας και σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως για την απολύμανση του νερού<sup>137</sup>.

Το όζον απαντάται στην φύση στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας (στην περιοχή της στρατόσφαιρας σε ύψος 15-50 χιλιομέτρων) όπου σχηματίζει μια λεπτή στιβάδα η οποία δρα προστατευτικά για τα έμβια συστήματα του πλανήτη μας απορροφώντας την βλαβερή για αυτά υπεριώδη ακτινοβολία (UV-B). Παράγεται φυσικά στα ανώτερα ατμοσφαιρικά στρώματα από την φωτοδιάσπαση του μοριακού  $O_2$  σε άτομα οξυγόνου τα οποία στην συνέχεια αντιδρούν με μόρια οξυγόνου σχηματίζοντας όζον. Τα τελευταία χρόνια, η μείωση του φυσικού αυτού προστατευτικού μανδύα έχει προκαλέσει παγκόσμια ανησυχία για τις επιπτώσεις της στην ζωή στον πλανήτη μας.

Ωστόσο, όταν σχηματίζεται στα κατώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας (λόγω φωτοχημικών αντιδράσεων ανάμεσα σε οξειδία του αζώτου και υδατάνθρακες) εμφανίζει βλαπτική δράση στα έμβια συστήματα εξαιτίας της οξειδωτικής του δράσης. Το όζον διαλύεται στο νερό του πλάσματος, στα εξωκυττάρια υγρά ή στο λεπτό στρώμα νερού που καλύπτει το δέρμα και τους διάφορους βλεννογόνους. Σε φυσιολογικές συνθήκες

ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας, λόγω της υψηλής διαλυτότητάς του, ένα μέρος του όζοντος διαλύεται στο νερό αλλά δίχως να εξισορροπείται από το όζον της αέριας φάσης. Αυτό συμβαίνει διότι το όζον ως ισχυρά οξειδωτικό σώμα αντιδρά άμεσα με ένα αριθμό βιολογικών μορίων, όπως αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα (κατά προτίμηση πολυακόρεστα). Στο αναπνευστικό σύστημα προάγει την φλεγμονή και κινητοποιεί τα πνευμονικά καθηλωμένα μακροφάγα αλλά και τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα αυξάνοντας δραματικά την ιστική βλάβη λόγω επιπλέον έμμεσης παραγωγής ελευθέρων ριζών ενώ εξαντλώντας τα πνευμονικά μακροφάγα μειώνει την αντίσταση του οργανισμού σε λοιμώξεις <sup>136,138</sup>. Είναι ερεθιστικό για τα μάτια και προκαλεί οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών των δακρύων <sup>139</sup>. Η βλαπτική του δράση επεκτείνεται στο δέρμα και στα φυτά <sup>140,141</sup>.

Το όζον είναι ισχυρό οξειδωτικό σώμα. Συνδέεται άμεσα σε διπλούς δεσμούς στα λιπίδια σχηματίζοντας οζονίδια τα οποία στην συνέχεια διασπώνται σε κυτταροτοξικές αλδεϋδες, ενώ παράγεται και  $H_2O_2$  πολλαπλασιάζοντας περαιτέρω την οξειδωτική βλάβη **[σχήμα 4 ]**. Επίσης, προκαλεί οξείδωση των πρωτεϊνών επιτιθέμενο σε σουλφυδρικές ομάδες (-SH) καθώς σε αμινοξικές υπομονάδες όπως τυροσίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη κ.α. <sup>142</sup> Σε υδατικά διαλύματα, το όζον διασπάται μερικώς προς υδροξυλική ρίζα ( $OH^\bullet$ ) αλλά η όλη διαδικασία είναι αργή σε φυσιολογικό pH, ενώ είναι ταχύτερη σε αλκαλικό pH. Ωστόσο, μελέτες της αρωματικής υδροξυλίωσης έδειξαν ότι ανιχνεύεται περισσότερο  $OH^\bullet$  σε πειραματόζωα ή ανθρώπους που ανέπνεαν όζον <sup>143</sup>. Ακόμη, η αντίδραση του όζοντος με μια σειρά βιομορίων όπως NADH, NADPH, GSSG, κυστεΐνη, αλβουμίνη, μεθειονίνη, ουρικό οξύ οδηγεί στην παραγωγή μεταξύ άλλων και μονήρους οξυγόνου ( $^1O_2$ ) το οποίο με την σειρά του επεκτείνει την οξειδωτική βλάβη <sup>144</sup>.



[Σχήμα 4] Χημικές αλληλεπιδράσεις του όζοντος με λιπαρά οξέα.

Η ποικιλία αυτή των αντιδράσεων του όζοντος με διάφορα βιομόρια διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες: **1)** τις αρχικές αντιδράσεις του όζοντος, όπου ένα μέρος του καταναλώνεται κατά την οξείδωση του ασκορβικού, ουρικού οξέος και των σουλφυδρικών ομάδων των πρωτεϊνών, παράγοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες ενεργοποιούν βιοχημικές διεργασίες στο αίμα *ex vivo* και αδρανοποιούνται στην συνέχεια από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού <sup>102</sup>, **2)** την λιπιδιακή υπεροξειδωση, όπου το όζον αντιδρά με λιπαρά οξέα προς σχηματισμό αλδευδών και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ενός ισχυρά οξειδωτικού μορίου. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι το όζον δεν προκαλεί άμεσα την έναρξη της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, αλλά οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από την αλληλεπίδρασή του με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Από εδώ και πέρα, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τα αλδευδικά παράγωγα (γνωστά και ως προϊόντα λιπιδιακής οξείδωσης, LOPs) είναι κυρίως υπεύθυνα για τις πολλαπλές βιοχημικές αντιδράσεις που επακολουθούν και την περαιτέρω επέκταση της οξειδωτικής βλάβης <sup>145</sup>. Με την διάλυσή του στη υδατική φάση των βιολογικών διαλυμάτων, το όζον έρχεται σε επαφή με τα υδρόφοβα συμπλέγματα των λιπαρών οξέων, ξεκινά ο



καταρράκτης των αντιδράσεων λιπιδιακής υπεροξειδωσης και η συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνεται ακαριαία. Στην συνέχεια αυτή μειώνεται ταχύτατα μια και το υπεροξείδιο του υδρογόνου διαχέεται άμεσα στα γειτονικά κύτταρα όπου ενεργοποιεί πληθώρα βιοχημικών διεργασιών ενώ η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του δεν φτάνει ποτέ σε τοξικά επίπεδα εξαιτίας της δράσης ισχυρών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως οι καταλάσες και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης <sup>146</sup>.

Η κυτταροτοξικότητα των προϊόντων λιπιδιακής οξειδωσης έχει μελετηθεί εκτεταμένα, όπως διαφαίνεται από την εκτενή διεθνή βιβλιογραφία. Σε ιστικές καλλιέργειες ή στους αεραγωγούς του αναπνευστικού συστήματος είναι τοξικά σε συγκεντρώσεις του 1  $\mu\text{M}$ . Σε συγκεντρώσεις κάτω του 1  $\mu\text{M}$  ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δρουν ως μεσάζοντες (ενδιάμεσοι αγγελιαφόροι) σε πληθώρα βιοχημικών διεργασιών. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο η τοξικότητα όσο και η επωφελής δράση τους εξαρτάται από την τελική συγκέντρωσή τους στους ιστούς αλλά και από την ιστική εντόπισή τους <sup>147,148</sup>. Τα διάφορα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού που ενεργοποιούνται, ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, περιλαμβάνουν ένζυμα όπως δεϋδρογονάσες αλδεϋδών και αλκοολών, GSH - τρανσφεράσες, με αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση των προϊόντων αυτών. Στην όλη προστατευτική προσπάθεια του οργανισμού συμμετέχουν το ήπαρ και οι νεφροί απεκκρίνοντας τα LOPs στα ούρα και την χολή.

Ιδιαίτερα πρέπει να τονίσουμε τους αμυντικούς μηχανισμούς του αναπνευστικού επιθηλίου των αεραγωγών, μια και το αναπνευστικό σύστημα αποτελεί την κύρια πύλη εισόδου του όζοντος στον οργανισμό. Η επίστρωση του επιθηλίου αυτού περιλαμβάνει υψηλές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος, ασκορβικού, ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), α-τοκοφερόλης,  $\beta$ -καροτένιου και αλβουμίνης δρώντας ως εκκαθαριστές - αδρανοποιητές του όζοντος <sup>149,150</sup>. Επανεπιλημμένη έκθεση σε όζον οδηγεί προσαρμοστικά στην εμφάνιση

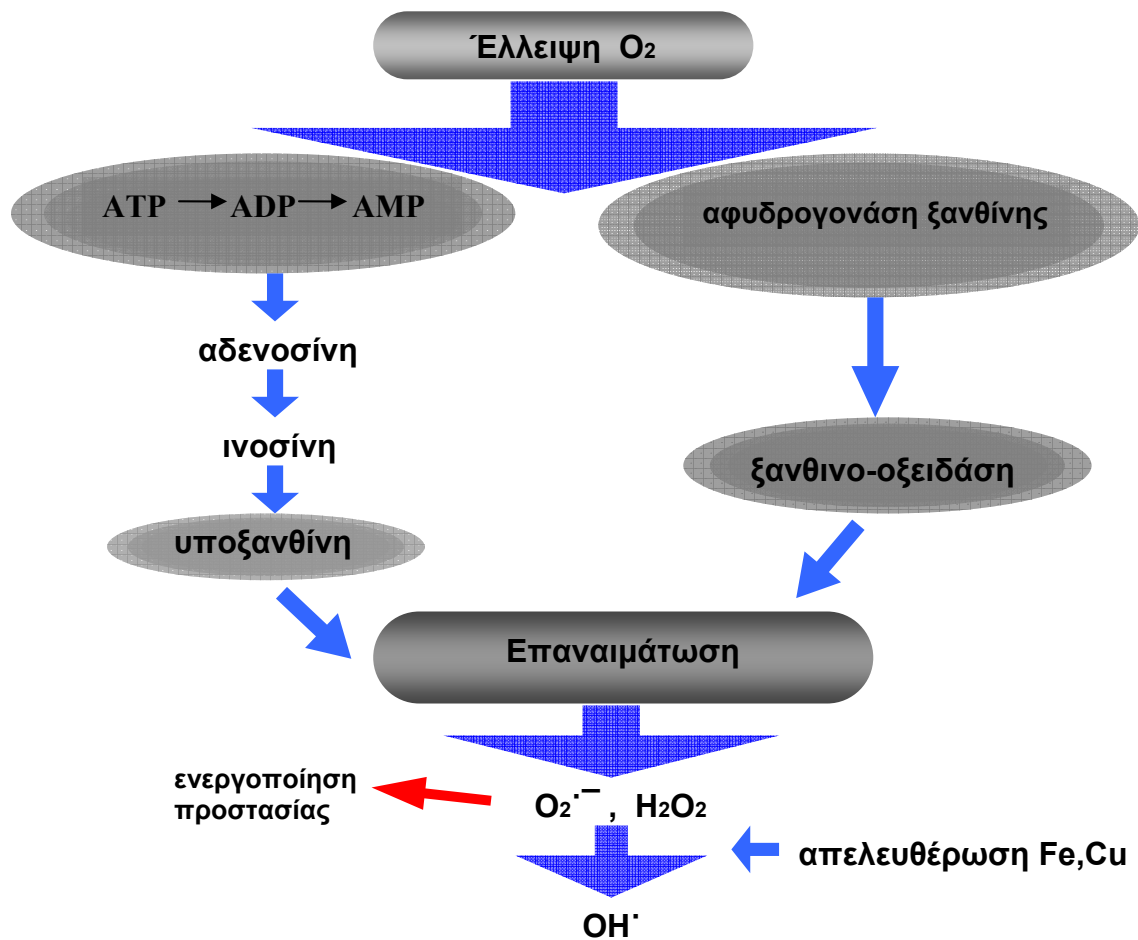
του φαινομένου της ανοχής (preconditioning), όπου περαιτέρω έκθεση σε O<sub>3</sub> προκαλεί μικρότερη πνευμονική βλάβη. Στα πλαίσια της προσαρμογής αυτής διαπιστώθηκε σε πειραματικά δεδομένα από επίμυες αύξηση των επιπέδων ασκορβικού στις επιθηλιακές εκκρίσεις της αναπνευστικής οδού, καθώς και αύξηση της δραστηριότητας ενζύμων όπως καταλάση, SOD, GPx και G6PDH <sup>151</sup>. Η προσαρμογή αυτή των επίμυων σε υψηλά επίπεδα όζοντος, τους καθιστά περισσότερο ανθεκτικούς και σε συνθήκες υπεροξυγόνωσης <sup>152</sup>.

## Γ) ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Η καρδιακή βλάβη οφειλόμενη στην στέρηση του μυοκαρδιακού ιστού από οξυγόνο αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Η ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας του αγγειακού τοιχώματος των στεφανιαίων αγγείων ακολουθούμενη από σχηματισμό θρόμβου και διακοπή της αιματικής ροής είναι συνήθως η αιτία. Η αιφνίδια διακοπή της αιματικής άρδευσης τμήματος του μυοκαρδίου αποτελεί το έμφραγμα μυοκαρδίου. Η διακοπή της αιματικής ροής προς το πάσχον μυοκάρδιο διακόπτει με την σειρά της την μεταφορά θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Κατά μέσο όρο, το υγιές μυοκάρδιο απαιτεί 8 – 15 ml O<sub>2</sub> ανά 100 gr ιστού σε συνθήκες ηρεμίας, ενώ σε συνθήκες άσκησης οι απαιτήσεις μπορεί να αυξηθούν μέχρι τα 70ml O<sub>2</sub>. Αν η χρονική διάρκεια της ανοξικής περιόδου είναι μικρή, τότε η προκαλούμενη ιστική βλάβη είναι αναστρέψιμη και η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου επιτυγχάνει την επαναφορά του σε σχεδόν φυσιολογικά λειτουργικά επίπεδα. Ωστόσο, την δεκαετία του '80 διαπιστώθηκε ότι η επαναιμάτωση του ανοξικού ιστού επιφέρει επιπλέον βλάβη, η οποία εν μέρει οφείλεται σε εκρηκτική αύξηση της παραγωγής ROS<sup>153,154</sup>. Σε περίπτωση που η χρονική διάρκεια της ανοξικής περιόδου είναι μεγάλη, τότε η προκαλούμενη βλάβη είναι μη-αναστρέψιμη και η εκ νέου αποκατάσταση της αιματικής κυκλοφορίας στο νεκρωθέν ή ετοιμοθάνατο μυοκάρδιο δεν επιφέρει λειτουργικό όφελος, ενώ παράλληλα απελευθερώνει στην κυκλοφορία τοξικά μεταβολικά προϊόντα<sup>155,156</sup>.

Το μυοκάρδιο αποκρίνεται στην έλλειψη οξυγόνου με ποικίλους τρόπους<sup>157,158</sup>. Σε πρώιμη φάση, αυξάνεται η διάσπαση του γλυκογόνου και η γλυκόλυση με τελικό αποτέλεσμα την συσσώρευση γαλακτικού οξέος και την οξέωση. Τα επίπεδα του ATP

εξαντλούνται και διαταράσσεται η φυσιολογική ενδοκυττάρια κατανομή των ιόντων σιδήρου. Το σχηματιζόμενο AMP διασπάται περαιτέρω προς αδενοσίνη, η οποία με την σειρά της αθροιζόμενη μετατρέπεται από το ένζυμο απαμινάση της αδενοσίνης (adenosine deaminase) σε ινοσίνη και τελικά υποξανθίνη [ *σχήμα 5* ].



[*Σχήμα 5*]. Μηχανισμός πρόκλησης ιστικής βλάβης από επαναιμάτωση μετά από ισχαιμία (τροποποίηση από J.M. McCord, *Fed Proc* 1987;46:2402).

Εξαιτίας της πρόκλησης ιστικής βλάβης, μια ποσότητα της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης μετατρέπεται σε ξανθινο-οξειδάση μέσω οξείδωσης σουλφυδρικών ομάδων της ή μέσω τμηματικής πρωτεόλυσης από ενεργοποίηση  $\text{Ca}^{+2}$  – εξαρτώμενων πρωτεϊνών λόγω της αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου. Κατά την επαναιμάτωση του ισχαιμούντος ιστού, η αθροισθείσα υποξανθίνη οξειδώνεται από την ξανθινο-οξειδάση οδηγώντας στην ταχεία παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα απελευθερωθέντα λόγω των ανοξικών συνθηκών ιόντα μεταπτωσηικών μετάλλων (κυρίως σιδήρου και δευτερευόντως χαλκού) αλληλεπιδρούν με τις παραπάνω ελεύθερες ρίζες καταλύοντας μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton την παραγωγή ριζών υδροξυλίου <sup>159</sup>. Ακόμη και η δεϋδρογονάση της ξανθίνης που δεν έχει υποστεί μετατροπή, απελευθερώνεται από τον ισχαιμικό ιστό και μετατρέπεται ταχύτατα σε ξανθινο-οξειδάση στο πλάσμα του αίματος. Στην συνέχεια αντιδρά με γλυκοζαμινο-γλυκάνες του αγγειακού τοιχώματος και παράγονται τοξικά για το ενδοθήλιο ROS επιτείνοντας περαιτέρω την οξειδωτική βλάβη <sup>160</sup>.

Ωστόσο, πέρα από την «έκρηξη» παραγωγής ROS με την αποκατάσταση της αιμάτωσης, μια πληθώρα ερευνητικών δεδομένων υποδηλώνει ότι μια μικρής έκτασης παραγωγή ROS σημειώνεται και κατά την περίοδο ισχαιμίας του ιστού <sup>161</sup>. Το φαινομενικά παράδοξο αυτό γεγονός οφείλεται στο ότι παρά την ισχαιμία στο μυοκάρδιο διατηρούνται μικρές ποσότητες μοριακού οξυγόνου, ανεπαρκείς για να καλύψουν τις μεταβολικές ανάγκες του, αλλά παρ' όλα αυτά παρούσες. Πλήρης ανοξία είναι κλινικώς σπάνιο να παρατηρηθεί. Με την εγκατεστημένη ισχαιμία, τα αναπνευστικά κυτοχρώματα των μιτοχονδρίων ανάγονται ισχυρά ευνοώντας την απευθείας μεταφορά (διαρροή) ηλεκτρονίων προς το  $\text{O}_2$  προάγοντας την παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) <sup>162</sup>. Πειραματικά δεδομένα από καρδιακά μυοκύτταρα με την χρήση ειδικών μιτοχονδριακών αναστολέων υποδηλώνουν ότι τα μιτοχόνδρια και ειδικότερα τα ένζυμα της

αναπνευστικής αλυσίδας είναι το κατεξοχήν σημείο παραγωγής αυτών των ROS <sup>163</sup>. Επίσης, διαφαίνεται ότι τα παραγόμενα κατά την ισχαιμία ROS είναι διαφορετικά από τα παραγόμενα κατά την φάση της επαναιμάτωσης ROS, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικό μηχανισμό παραγωγής τους <sup>164</sup>. Πιθανόν οι μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου κατά την μετάβασή του από την ισχαιμία στην επαναοξυγόνωση να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σκοτεινό αυτό σημείο, αλλά απαιτείται περαιτέρω ερευνητική εργασία για την διακρίβωση του όλου φαινομένου.

Η παραγωγή αυτή ROS κατά την φάση της ισχαιμίας, εκτός από την συμμετοχή στην προκαλούμενη ιστική οξειδωτική βλάβη, φαίνεται να διαδραματίζει παράλληλα και προστατευτικό ρόλο, μέσω της μεταγωγής μεταβολικών σημάτων, στην ενεργοποίηση του ισχαιμικού preconditioning προετοιμάζοντας το κύτταρο για την επερχόμενη οξειδωτική επίθεση <sup>165,166</sup>. Η σημασία της προστατευτικής αυτής δράσης αυτής των ROS διαφαίνεται από μια σειρά πειραματικών δεδομένων όπου η χορήγηση αντιοξειδωτικών αναστέλλει την παραγωγή αυτή των ROS και κατ' επέκταση το preconditioning κατά την φάση της ισχαιμίας και οδηγεί σε αυξημένα κατά πολύ (σχεδόν τριπλάσια) ποσοστά κυτταρικού θανάτου κατά την φάση της επαναιμάτωσης <sup>167</sup>. Η οδός μεταγωγής σήματος που συνδέει τα παραγόμενα κατά την ισχαιμία ROS με την ενεργοποίηση του προστατευτικού αυτού μηχανισμού αποτελεί ένα ζωντανό ενδιαφέροντος ερευνητικό πεδίο. Από τα πειραματικά δεδομένα διαγράφεται ο κεντρικός ρόλος των ATP- εξαρτώμενων διαύλων καλίου των μιτοχονδρίων, το άνοιγμα των οποίων φαίνεται πως δρα καρδιοπροστατευτικά κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου <sup>168</sup>. Ακόμη, σε απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα διαπιστώθηκε ότι με το άνοιγμα των διαύλων αυτών ακολουθεί η παραγωγή των ROS και NO, η οποία με την σειρά της προάγει την προστατευτική προσαρμογή των μυοκαρδιακών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες της επαναιμάτωσης <sup>169</sup>.

Μολονότι η διερεύνηση του όλου φαινομένου έχει αποδώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο μελέτης, σε επίπεδο ολόκληρου οργάνου ή οργανισμού δεν έχει καταστεί δυνατή η σύμπτωση και η επαναληψιμότητα των πειραματικών μετρήσεων. Ιδιαίτερα έντονη είναι η αντίφαση των δεδομένων αναφορικά με την συσχέτιση της εκκαθάρισης των ROS και το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής<sup>170</sup>. Στον πυρήνα του όλου προβλήματος βρίσκεται η αδυναμία να ερμηνεύσουμε κατά πόσο ο κυτταρικός θάνατος οφείλεται σε βλάβες προκληθείσες κατά την φάση της επαναιμάτωσης ή αποτελεί καθυστερημένη εκδήλωση μη – αναστρέψιμων βλαβών κατά τη φάση της ισχαιμίας. Πειραματικά δεδομένα από την μελέτη επίδρασης της υποθερμίας στο φαινόμενο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον εν μέρει η ιστική βλάβη κατά την ισχαιμία είναι αναστρέψιμη, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της πρόκλησης βλάβης κατά την επαναιμάτωση<sup>171</sup>. Ωστόσο, η ατέλειες των πειραματικών μοντέλων σε συνδυασμό με την δυσκολία ποσοτικοποίησης του προκαλούμενου οξειδωτικού στρες και μελέτης των συνεργικών δράσεων των διαφόρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών δεν μας επιτρέπουν να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Το όλο φαινόμενο αποδεικνύεται ιδιαίτερα πολύπλοκο και απαιτεί στοχευμένες παρεμβάσεις σε ενδοκυττάριο επίπεδο (πχ μιτοχόνδρια, λυσοσωμάτια κ.α.) και σε κατάλληλα χρονικά περιθώρια προκειμένου να επιτευχθεί καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα.

## Δ) ΦΑΙΝΟΛΕΣ - ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

### ι) Γενικά

Ως φαινόλη ορίζουμε οποιαδήποτε χημική ένωση διαθέτει μια υδροξυλική ομάδα (OH-) συνδεδεμένη με ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι μονοφαινόλες διαθέτουν ένα τέτοιο αρωματικό σύμπλοκο OH-, οι διφαινόλες δύο και οι πολυφαινόλες περισσότερα από δύο. Τα φυτά περιέχουν μια τεράστια ποικιλία φαινολών, συμπεριλαμβανομένων των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών <sup>172,173</sup>. Οι περισσότερες φαινόλες εμφανίζουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση *in vitro* αναστέλλοντας την λιπιδιακή υπεροξειδωση μέσω εκκαθάρισης (scavenging) της ρίζας υπεροξυλίου (ROO<sup>•</sup>). Ακόμη, δρουν ως εκκαθαριστές μιας σειράς ελευθέρων ριζών όπως HO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, HOCl και ONOO<sup>-</sup>. Ορισμένες αντιδρούν με το ανιόν σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), κυρίως οι δι- και πολυ-φαινόλες <sup>174</sup>. Οι φαινόλες με δύο παρακείμενες υδροξυλικές ομάδες μπορούν να δεσμεύσουν ιόντα μεταπτώτικων μετάλλων (κυρίως σιδήρου και χαλκού) σε σύμπλοκα με ασθενή δράση κατάλυσης αντιδράσεων σχηματισμού ελευθέρων ριζών.

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε μια ομάδα φαινολών, τα φλαβονοειδή, τα οποία εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα κρεμμύδια, στο κρασί, στο τσάι και σε άλλα φυτικά προϊόντα. Περιλαμβάνουν στο μόριό τους τρεις εξαμελείς ανθρακικούς δακτυλίους (A, B, C) και ανάλογα με τις παραλλαγές στον δακτύλιο C και τις ομάδες υποκατάστασης διακρίνονται σε φλαβόνες (πχ απιγενίνη, χρυσίνη), φλαβονόλες (πχ κουερσετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη), φλαβανόλες (πχ κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλική επιγαλοκατεχίνη), ανθοκυανιδίνες (πχ μαλβιδίνη, κυανιδίνη, απιγετινίνη), ισοφλαβόνες (πχ γενιστεΐνη, δαΐζδεΐνη) και φλαβανόνες (πχ ναριγγίνη, ταξιφολίνη). Ο αριθμός των



υδροξυλικών ομάδων και η σχετική θέση τους στο μόριο αποτελούν τους κύριους παράγοντες καθορισμού της αντιοξειδωτικής τους δράσης <sup>175</sup>.

Η ανθρώπινη διατροφή περιέχει μια μεγάλη ποικιλία φαινολών, όπως οι καρποί σόγιας (τοκοφερόλες, ισοφλαβόνες και καφεϊκό οξύ), τα φυστίκια (ταξιφολίνη), το κρασί (ρεσβερατρόλη), το σησαμέλαιο (σησαμόλη), το πράσινο τσαϊ (κατεχίνες) κ.α. **[σχήμα 6]** Επίσης, πολλές φορές οι φυτικές φαινόλες είναι ενωμένες με σάκχαρα σχηματίζοντας γλυκοσίδια, ενώ τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι γλυκοζυλιωμένα στα φυτά με εξαίρεση τις κατεχίνες. Η απορρόφηση των πολυφαινολών της διατροφής δεν είναι πλήρης και το ποσό που απορροφάται εξαρτάται από την χημική δομή τους και ποικίλλει από άτομο σε άτομο. Στον ανθρώπινο οργανισμό, για παράδειγμα, οι ανθοκυανιδίνες δεν απορροφούνται τόσο καλά όσο οι κατεχίνες και η κουερσετίνη. Τα γλυκοσίδια υδρολύονται συνήθως από τις γλυκοσιδάσες του εντερικού βλεννογόνου και στην συνέχεια οι προκύπτουσες καθαρές φαινόλες απορροφούνται. Οι μη-απορροφηθείσες πολυφαινόλες εισέρχονται στο παχύ έντερο όπου μεταβολίζονται εκτεταμένα σε μονοφαινόλες και άλλα προϊόντα από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Μετά την απορρόφησή τους, υφίστανται μεθυλίωση και γλυκουρονίδωση των υδροξυλικών ομάδων τους στο έμτερο και το ήπαρ. Στο ήπαρ επίσης καταλύεται η προσκόλλησηθειικών ομάδων στις φαινόλες. Τα επίπεδα στο πλάσμα των μη – συζευγμένων πολυφαινολών σπάνια υπερβαίνουν την τάξη του 1μΜ, ακόμη και σε άτομα με υψηλή διατροφική πρόσληψη φαινολών <sup>176</sup>.

<i>Κατηγορία φαινολών</i>	<i>Διατροφική πηγή</i>
<i>φλαβανόλες</i> (κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλική επιγαλοκατεχίνη κ.α.)	πράσινο τσάι, κόκκινο κρασί, κακάο, σοκολάτα
<i>φλαβανόνες</i> (ταξιφολίνη, ναριγγίνη)	κίτρο
<i>φλαβονόλες</i> (κουερσετίνη, μυρισετίνη)	αντίδια, πράσσα, μπρόκολα, ραπανάκια, μαύρο τσάι, κρεμμύδι, μαρούλι, ελιά, κόκκινο κρασί, σταφύλια
<i>φλαβόνες</i> (απιγενίνη, χρυσίνη)	σέλινο, μαϊντανός
<i>ανθοκυανιδίνες</i> (μαλβιδίνη, κυανιδίνη)	κόκκινο κρασί και σταφύλια, φράουλες, κεράσια, βατόμουρα
<i>καφεϊκό οξύ</i>	άσπρο κρασί, λευκά σταφύλια, ελιές, ελαιόλαδο, σπανάκι

**[Σχήμα 6]** Διατροφικές πηγές φαινολών (προσαρμογή από Rice-Evans C et al, *Free Rad Biol Med* 1996;20:933).

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των πολυφαινολών *in vitro* έχουν θεμελιωθεί εδώ και αρκετά χρόνια με πλήθος μελετών και ερευνητικών εργασιών. Ωστόσο παρέμενε το ερώτημα κατά πόσο ασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις και σε *in vivo* συνθήκες. Μεγάλος αριθμός μελετών εστίασαν την προσοχή τους στο πεδίο αυτό. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι οι φαινόλες του κόκκινου κρασιού αναστέλλουν την οξείδωση των LDL - λιποπρωτεϊνών *in vitro* και προτάθηκε ότι ασκούσαν και καρδιοπροστατευτική δράση περιορίζοντας την οξείδωση της LDL σε *in vivo* συνθήκες. Η παρατήρηση αυτή προτάθηκε ως εξήγηση της χαμηλής επίπτωσης καρδιαγγειακών παθήσεων σε ορισμένες περιοχές της Γαλλίας παρά

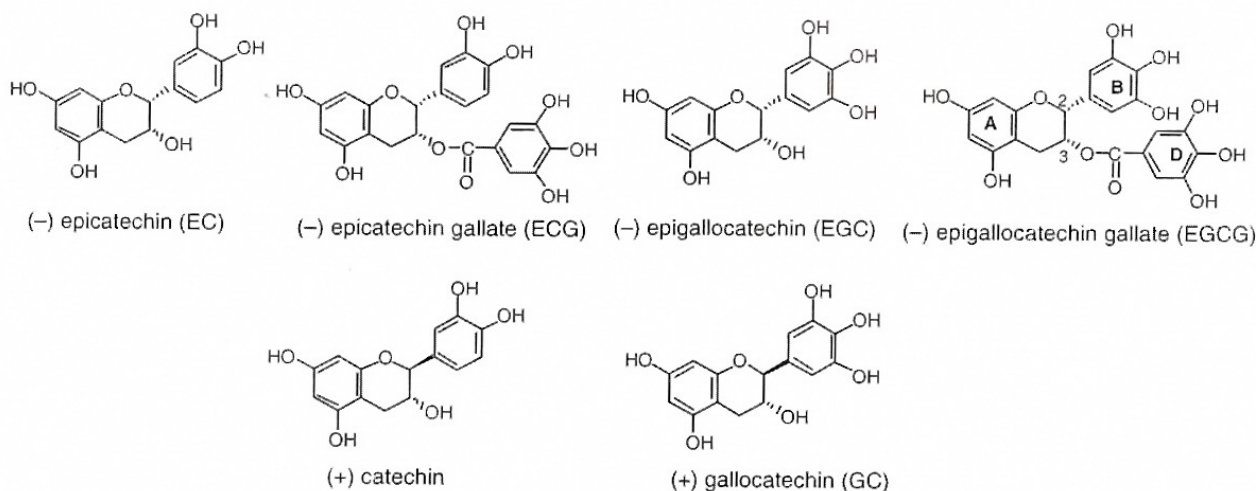
τον υψηλό επιπολασμό στις περιοχές αυτές παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο όπως κάπνισμα και υψηλή κατανάλωση trans λιπαρών ( το « Γαλλικό παράδοξο ») <sup>177,178</sup>. Επιπλέον, μια επιδημιολογική μελέτη στην Ολλανδία (Zutphen study) η οποία εντόπισε μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση στεφανιαίας νόσου και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων με την διατροφική πρόσληψη φλαβονοειδών (ιδίως κουερσετίνης), κυρίως από το τσάι, φρούτα (πχ μήλα) και λαχανικά (πχ κρεμμύδια) από τον υπό μελέτη πληθυσμό <sup>179</sup>. Έκτοτε, μια πλειάδα επιδημιολογικών μελετών σε παγκόσμιο επίπεδο κατέληξε σε ανάλογα συμπεράσματα. Κοινή πεποίθηση των ερευνητών ήταν ότι ευεργετικά αποτελέσματα των μελετών αυτών οφείλονταν στις αντιοξειδωτικές δράσεις των φλαβονοειδών των τροφών. Πολλές ερευνητικές εργασίες χρησιμοποίησαν δείκτες οξειδωτικής βλάβης (πχ F<sub>2</sub>-ισοπροστάνια, 8-OH dGuanine) για να διαπιστώσουν κατά πόσο τα φλαβονοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό in vivo, με αρκετά θετικά αποτελέσματα.

Ωστόσο η προστατευτική δράση τροφίμων και ποτών πλούσιων σε φλαβονοειδή δεν θα πρέπει να αποδίδεται αποκλειστικά σε αυτά. Υπάρχει επαρκής αριθμός μελετών όπου η παροχή καθαρών εκχυλισμάτων φαινολών ή τροφίμων πλούσιων σε φλαβονοειδή δεν επέφερε μεταβολές σε παραμέτρους του οξειδωτικού στρες <sup>180</sup>. Είναι δύσκολο να γίνει κατανοητή μια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση in vivo των φαινολών όταν, ακόμη και σε άτομα με υψηλή διατροφική πρόσληψη, τα επίπεδά των μη – συζευγμένων στο πλάσμα σπάνια υπερβαίνουν την τάξη του 1μM, ενώ παράλληλα η αντιοξειδωτική τους ισχύς είναι μειωμένη εξαιτίας του αποκλεισμού των υδροξυλικών ομάδων τους λόγω μεθυλίωσης, γλυκουρονίδωσης ή σουλφωσης. Βέβαια, υψηλά επίπεδα φαινολών εντοπίζονται κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα όπου πιθανώς ασκούν αντιοξειδωτικές και λοιπές προστατευτικές δράσεις, ενώ ορισμένες φαινόλες είναι σε θέση να ανακυκλώσουν την ατοκοφερυλ ρίζα <sup>181,182</sup>.

Ακόμη, οι πολυφαινόλες δεν είναι μόνο αντιοξειδωτικά σώματα. Σε συνθήκες *in vitro* εξασκούν και μια πληθώρα άλλων δράσεων, όπως αναστολή των τελομερασών, της κυκλοξυγενάσης COX-1 και COX-2, της ξανθινο-οξειδάσης, λιποξυγενασών και κυτταροπλασματικών μεταλλοπρωτεασών, της γλυκοζυλίωσης πρωτεϊνών κ.α.<sup>183</sup> Τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να τροποποιούν τα ενδοκυττάρια κυκλώματα μεταγωγής σήματος συμπεριλαμβανομένων MAP-κινασών, PDGF - υποδοχών, AP-1 και NF-kB<sup>184</sup>. Ωστόσο δεν γνωρίζουμε αν τα επίπεδα στο πλάσμα των φλαβονοειδών είναι επαρκή για την εμφάνιση των δράσεων αυτών, αν και τα επίπεδά τους στον πεπτικό σωλήνα είναι επαρκή όπως διαπιστώνεται από την μερική αναστολή της κυκλοξυγενάσης στο πρωκτικό επιθήλιο μετά από κατανάλωση πράσινου τσαγιού<sup>185</sup>.

## ii) Κατεχίνες

Οι κατεχίνες ανήκουν σύμφωνα με την χημική τους δομή στις φλαβανόλες. Κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η γαλλική επικατεχίνη, η επιγαλοκατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη και η γαλλική επιγαλοκατεχίνη [σχήμα 7].



[Σχήμα 7] Χημική δομή των κυριότερων κατεχινών.

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις τους οφείλονται στην παρουσία των φαινολικών – υδροξυλ ομάδων στον Β – δακτύλιο των μη γαλλικών κατεχινών καθώς και στους Β- και D- δακτυλίους των γαλλικών κατεχινών <sup>186,187</sup>. Οι αντιοξειδωτικές τους δράσεις περιλαμβάνουν όχι μόνο την εκκαθάριση ελευθέρων ριζών αλλά και την συμπλοκοποίηση ιόντων μεταπτωσητικών μετάλλων <sup>188</sup>. Σειρά μελετών ανέδειξε την διαταραχή ρύθμισης του μεταβολισμού του σιδήρου ως κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό στη νόσο του Πάρκινσον καθώς και την ιδιότητα της γαλλικής επιγαλοκατεχίνης να συμπλοκοποιεί τον σίδηρο ως υπεύθυνη για τις προστατευτικές της δράσεις στις νευροεκφυλιστικές νόσους <sup>189</sup>. Ακόμη, οι κατεχίνες ασκούν δράσεις σε μια σειρά κυτταρικών και μοριακών στόχων στα κυκλώματα μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση. Οι δράσεις τους αυτές εντοπίστηκαν τόσο σε νευρικά κύτταρα όσο και σε επιθηλιακές – ενδοθηλιακές κυτταρικές σειρές <sup>190,191</sup>. Ωστόσο δεν είναι ακόμη κατανοητό αν οι δράσεις αυτές οφείλονται εμμέσως στην επίδραση των κατεχινών στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου ή σε άμεση δράση τους στα μόρια-στόχους ασχέτως των αντιοξειδωτικών δράσεών τους.

Οι κατεχίνες ασκούν επίσης προστατευτικές δράσεις έναντι του καρκίνου. Πειραματικά δεδομένα αποδίδουν τις δράσεις αυτές στην αναστολή πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και των μοριακών κυκλωμάτων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση και την ιστική επέκταση <sup>192,193</sup>. Η χορήγηση γαλλικής επιγαλοκατεχίνης οδηγεί στην αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη φάση G1, αναστολή των κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες και προαγωγή των αναστολέων των κινασών αυτών p21 και p27 σε καρκινικά κύτταρα στον προστάτη και στον μαστό <sup>194,195</sup>. Ακόμη αναστέλλει την γονιδιακή ενεργοποίηση μέσω των NF-kB και AP-1 <sup>196</sup>. Το γεγονός αυτό αποτελεί το σημείο σύγκλισης των αντιοξειδωτικών δράσεων και εξειδικευμένων μοριακών δράσεων των κατεχινών. Ο παράγοντας NF-kB, υπό την

επίδραση των ελευθέρων ριζών, ενεργοποιεί την μεταγραφή πολλών προ-φλεγμονωδών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων<sup>197</sup>. Η εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών από τις κατεχίνες, επομένως, οδηγεί σε αναστολή ενεργοποίησης του NF-kB και των προ-φλεγμονωδών και αντι-αποπτωτικών αυτών γονιδίων. Επίσης άμεση ανασταλτική δράση στην πρωτεασομική δραστηριότητα ασκείται από την γαλλική επιγαλοκατεχίνη, επιφέροντας την συσσώρευση της ανασταλτικής του NF-kB πρωτεΐνης I-kB και άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών<sup>198</sup>. Η ανασταλτική δράση των κατεχινών έναντι της καρκινικής επέκτασης και της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται μέσω αναστολής μεταλλοπρωτεϊνών και της έκφρασης και μετάδοσης σήματος του υποδοχέα του VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) σε καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα αντίστοιχα 199 – 201.

Στα νευρικά κύτταρα οι κατεχίνες ασκούν προστατευτικές δράσεις που ενισχύουν την επιβιωσιμότητα τους σε δόσεις πολύ χαμηλότερες από τις απαιτούμενες για τις αντικαρκινικές τους δράσεις. Αν και οι δράσεις αυτές μπορεί εν μέρει να οφείλονται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και στην ικανότητα συμπλοκοποίησης μεταλλικών ιόντων, πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι κατεχίνες επιδρούν παράλληλα και σε κυτταρικά κυκλώματα μεταγωγής σημάτων<sup>202,203</sup>. Η γαλλική επιγαλοκατεχίνη, σε δόσεις 1- 10  $\mu\text{M}$  επέδειξε προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης νευρικών κυττάρων προκαλούμενης από  $\beta$ -αμυλοειδές και 6-υδροξυ-ντοπαμίνη μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ακόμη, μειώνει την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων *bax*, *bad*, *p21* και *κασπασών* σε νευρικά κύτταρα υποδηλώνοντας μια σαφή νευροπροστατευτική δράση<sup>204</sup>. Επιπλέον προάγει την επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και παράλληλα αναστέλλει τις μεταβολικές οδούς που οδηγούν στον σχηματισμό των ινιδίων  $\beta$ -αμυλοειδούς<sup>205</sup>.

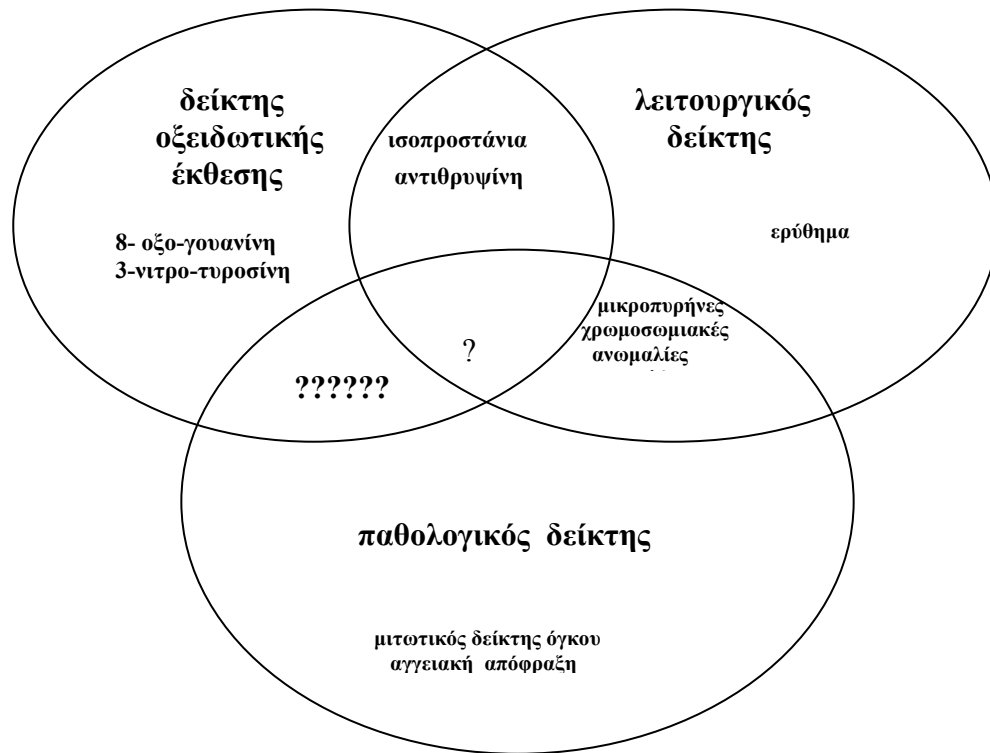
Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι οι κυτταρικές δράσεις των κατεχινών είναι δοσο-εξαρτώμενες αλλά και κυτταρο-εξαρτώμενες. Αφορούν όχι μόνο τις αντιοξειδωτικές δράσεις και την ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών αλλά και την επέμβαση σε ενδοκυττάρια ρυθμιστικά κυκλώματα. Ωστόσο πολλά ακόμη σημεία παραμένουν σκοτεινά και απαιτείται μεγαλύτερος όγκος πειραματικών δεδομένων για να διασαφηνιστεί η πολύπλευρη δράση τους.

## Ε) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

### ι) Γενικά

Η ποσοτικοποίηση του όλου φαινομένου του οξειδωτικού στρες αποκτά εξέχουσα σημασία. Κατά καιρούς έχουν αξιολογηθεί διάφοροι βιολογικοί δείκτες οξειδωσης όπως τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης (MDA), F2-ισοπροστάνες NO<sub>2</sub>-Tyr, Cl-Tyr κ.α. Με τον όρο **βιολογικός δείκτης** περιγράφουμε μια μοριακή μεταβολή σε ένα βιομόριο συνεπεία προσβολής του από ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου<sup>206</sup>. Εφαρμόζεται εξίσου σε προϊόντα οξειδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων καθώς και από κατανάλωση αντιοξειδωτικών. Οι βιολογικοί δείκτες έχουν κατά κόρον χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση αντιοξειδωτικών ουσιών *in vivo*, *in vitro* και *ex vivo* με ποικίλα και ενίοτε αντικρουόμενα αποτελέσματα<sup>207 - 210</sup>. Η ποικιλία αυτή των αποτελεσμάτων οφείλεται εν μέρει στις προσδοκίες μας σχετικά με τις πληροφορίες που αυτοί είναι σε θέση να μας προσφέρουν για την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων. Οι βιολογικοί δείκτες μπορούν να χρησιμεύσουν ως: **α)** μετρήσιμα καταληκτικά σημεία οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων, **β)** λειτουργικοί δείκτες διαφόρων λειτουργιών (πχ αιμοπεταλιακή συσσώρευση), και **γ)** ως καταληκτικά σημεία αναφορικά με μια συγκεκριμένη πάθηση [*σχήμα 8α*]. Μολονότι τα συμπτώματα μιας νόσου είναι καταληκτικά σημεία *per se*, δεν είναι χρήσιμα εργαλεία για την πρόληψη διάγνωση και κατ' επέκταση πρόληψη της νόσου. Για τον σκοπό αυτό είναι προτιμητέα η χρήση βιολογικών δεικτών<sup>211</sup>.





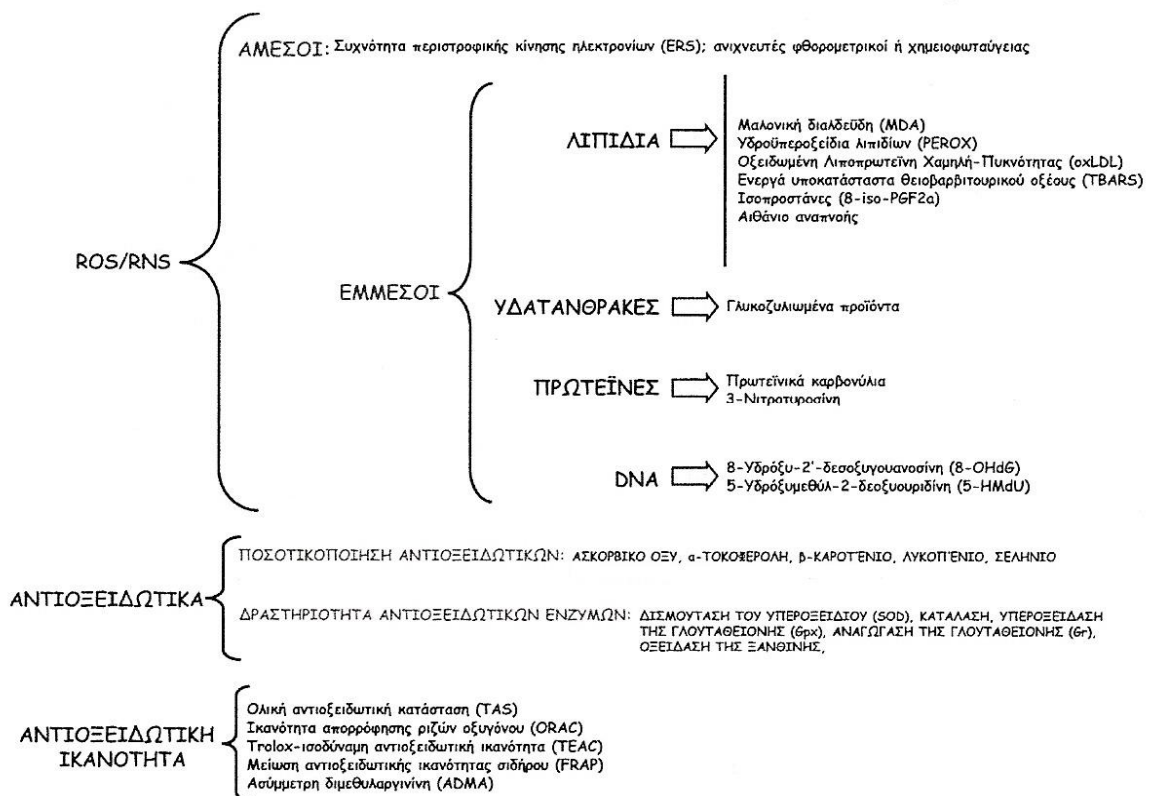
[Σχήμα 8α]. Η έννοια των βιολογικών δεικτών (προσαρμογή από HR Griffiths et al.

*Molecular Aspects of Medicine* 2002;(23):101–208 ).

Ωστόσο παραμένει ένα χάσμα μεταξύ της έκθεσης σε κάποιον οξειδωτικό παράγοντα και καταληκτικού σημείου (παθολογικό εύρημα της νόσου), αν και οι ολοένα αυξανόμενες γνώσεις μας σχετικά με τις λειτουργικές συνέπειες της οξείδωσης βιομορίων μειώνουν συνεχώς αυτό το χάσμα. Μέχρι να γεφυρωθεί το κενό αυτό, οι σύγχρονοι βιολογικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άντληση πληροφοριών σχετικά με την φύση της οξειδωτικής βλάβης και της αντιοξειδωτικής άμυνας *in vivo* [σχήμα 8β].

Προκειμένου να θεωρηθεί έγκυρος ένας βιολογικός δείκτης θα πρέπει να είναι:

- μείζον προϊόν οξειδωτικής βλάβης σε άμεση συσχέτιση με την εμφάνιση κάποιας ασθένειας
- χημικά σταθερός δίχως να είναι επιρρεπής σε αποδόμηση είτε περαιτέρω επαγωγή της σύνθεσής του σε συνθήκες επεξεργασίας, ανάλυσης και αποθήκευσης



[Σχήμα 8β]. Κατηγορίες βιολογικών δεικτών (Danne-Dolle I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006;52(4):601-623, προσαρμογή από Ι.Σίμο – Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων συστατικών διατροφικών προϊόντων – Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα, 2010).

- αντιπροσωπευτικός της ισορροπίας ανάμεσα στην οξειδωτική βλάβη και στους αντιοξειδωτικούς επανορθωτικούς μηχανισμούς
- μετρήσιμος με μια μέθοδο υψηλής ευαισθησίας, ειδικότητας, επαναληψιμότητας και σταθερότητας
- ανεξάρτητος από συγχυτικούς παράγοντες προερχόμενους από την διατροφή
- εύκολα εντοπίσιμος στον ιστό – στόχο είτε σε έγκυρο υποκατάστατο που αντικατοπτρίζει ποσοτικά την οξειδωτική τροποποίηση του ιστού – στόχου
- μετρήσιμος εντός των ορίων ανίχνευσης των υπάρχουσών αναλυτικών μεθόδων. Κύρια σημεία εγκυρότητας της μετρητικής μεθόδου ενός βιολογικού δείκτη – προϊόντος οξείδωσης αφορούν την εκλεκτικότητα, την γραμμικότητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια,

την επαναληψιμότητα και την καταλληλότητα των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Ακόμη, περαιτέρω ολοκλήρωση των μετρητικών μεθόδων περιλαμβάνει την καθιέρωση ορίων φυσιολογικών τιμών στις διάφορες ηλικιακές ομάδες και των δύο φύλων υπό διάφορες καταστάσεις του οργανισμού, παθολογικές και μη.

Ως δείκτες της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί: **α)** η μέτρηση των παραγόμενων καρβονυλίων (ως προϊόντων οξείδωσης των πλαγίων αλύσων των αμινοξέων από αλκοξυ- και υπεροξειδικές ρίζες) <sup>63</sup> με μεθόδους όπως αναλυτική HPLC <sup>212</sup>, ανοσοαποτύπωση κατά Western <sup>213</sup>, και ανοσοφθορισμό με ELISA <sup>214</sup>, **β)** η μέτρηση των σχηματιζόμενων λόγω οξείδωσης θειολικών ομάδων σε αμινοξέα όπως η κυστεΐνη κυρίως αλλά και η μεθειονίνη, η ιστιδίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη <sup>215</sup>, με χρωμομετρικές μεθόδους <sup>216</sup>, με μεθόδους φθορισμού με HPLC <sup>217</sup>, με μέτρηση νιτροζοθειολών με αντιδραστήριο Griess και εν συνεχεία HPLC <sup>218</sup> και με μέτρηση απώλειας σουλφυδρικών ομάδων με ιστοχημικές μεθόδους <sup>219</sup>. Ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί **γ)** η μέτρηση του παραγόμενου υδροξειδίου από την επίδραση •OH, παρουσία O<sub>2</sub>, στις πλάγιες αλύσους αλειφατικών αμινοξέων όπως η βαλίνη και η λευκίνη <sup>220</sup>, με χρήση της HPLC (γενικά, τα αρωματικά αμινοξέα αποτελούν τα πλέον ευαίσθητα κατάλοιπα οξείδωσης), **δ)** η ανίχνευση της οξείδωσης της τρυπτοφάνης με διάσπαση του δακτυλίου της, με την χρήση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και φθορισμού <sup>221</sup>, και **ε)** η ανίχνευση της οξείδωσης και διμερισμού της τυροσίνης με HPLC <sup>222</sup>.

Όσον αφορά την οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, περισσότερο επιρρεπή είναι τα τριγλυκερίδια των LDL και τα φωσφολιπίδια των διαφόρων μεμβρανών. Τα τελικά προϊόντα της οξειδωτικής αυτής επίθεσης των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν αλδεύδες, αέριους υδρογονάνθρακες, trans - συζευγμένα διένια, ισοπροστάνια και οξειδία χοληστερόλης. Η σχηματιζόμενη μαλονική διαλδεύδη αντιδρά και δημιουργεί δεσμούς με πρωτεΐνες και το DNA επιφέροντας αλλοίωση της λειτουργικότητάς τους. Μετράται με την

μέθοδο TBARS σε συνδυασμό με HPLC για βελτίωση της ακρίβειας<sup>223</sup>. Η μέτρηση των συζευγμένων διενίων πραγματοποιείται με φασματοφωτομετρική μέθοδο στο UV φάσμα ( $\lambda=230-235$  nm) σε συνδυασμό με χρωματογραφία HPLC<sup>224</sup>. Ακόμη, κατά την λιπιδιακή υπεροξειδωση σχηματίζονται αέριοι υδρογονάνθρακες, πεντάνιο και αιθάνιο κυρίως<sup>225</sup>. Η μέτρησή τους μπορεί να γίνει με χρωματογραφία αερίων<sup>226</sup>. Τα ισοπροστάνια σχηματίζονται λόγω οξειδωσης του αραχιδονικού οξέος. Τα F2-ισοπροστάνια μπορούν να προσδιοριστούν με χρήση χρωματογραφίας αερίων και HPLC<sup>227</sup>.

Στην περίπτωση του DNA, η οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών προκαλεί ρήγματα στις αλυσούς και αλλοίωση των βάσεων. Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί ο σχηματισμός 8-δεοξυ-γουανωσίνης, ο οποίος αν δεν επιδιορθωθεί από τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες πριν την αντιγραφή του DNA οδηγεί σε μετατροπή από Guanine – Cytosine προς Thymine – Adenine, και επομένως την πρόκληση μετάλλαξης<sup>228</sup>. Για την εκτίμηση του μεγέθους της οξειδωτικής βλάβης στο DNA έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μεθοδολογίες. Με ηλεκτροφόρηση πηκτής στην μέθοδο Comet assay είμαστε σε θέση να ανιχνεύσουμε ρήγματα στις αλυσούς του DNA<sup>229</sup>, είτε οξειδωμένες βάσεις με χρήση βακτηριακών ενδονουκλεασών<sup>230</sup>. Οι οξειδωμένες βάσεις του DNA μπορούν ακόμη να ανιχνευθούν με χρήση χρωματογραφίας HPLC<sup>231</sup>, με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας<sup>232</sup>, με υγρή χρωματογραφία και διπλή φασματομετρία μάζας<sup>233</sup>. Πιο ειδικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανίχνευση των οξειδωμένων βάσεων του DNA με ανοσοχημικές μεθόδους χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα κατά των βάσεων αυτών, όπως της 8-δεοξυ-γουανωσίνης<sup>234</sup>, είτε την σήμανση με ενζυμικές μεθόδους των αρωματικών παραγώγων της οξειδωτικής βλάβης του DNA και στην συνέχεια εφαρμογή HPLC<sup>235</sup>.

## ii) Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Από την παραπάνω παράθεση των κυριότερων μεθόδων ανίχνευσης της οξειδωτικής βλάβης που επιφέρει η δράση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου στα βασικά κυτταρικά συστατικά διαφαίνεται και το μέγεθος του μεθοδολογικού προβλήματος που αντιμετωπίζουμε στην ποσοτικοποίηση του όλου φαινομένου. Οι υπάρχουσες μέθοδοι αδυνατούν να προσεγγίσουν την πολυπλοκότητα του όλου φαινομένου της διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του οργανισμού καθώς ανιχνεύουν μόνο τμήματα αυτής της δραστηριότητας. Η ολοκληρωμένη απεικόνιση των διαφόρων αμυντικών μηχανισμών και των μεταξύ τους αναπτυσσόμενων συνεργικών δράσεων παραμένει έξω από τις δυνατότητές τους. Επίσης, πολλές από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους εμφανίζουν αποκλίσεις μεταξύ εργαστηρίων, ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και τις συνθήκες πειράματος. Τα βιολογικά δείγματα εμφανίζουν αλλοιώσεις μετά από παρατεταμένη αποθήκευση, ακόμη και κάτω από τις πιο ελεγχόμενες συνθήκες. Ποικίλοι αστάθμητοι παράγοντες και ενδιάμεσα παραπροϊόντα των χημικών αντιδράσεων ενδεχομένως να επηρεάζουν το μετρούμενο αποτέλεσμα, ενώ η τεχνική πολυπλοκότητα και ο εξειδικευμένος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται περιορίζουν ακόμη περισσότερο την ευρεία εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε κλινικό επίπεδο, πέρα από τα όποια μεθοδολογικά προβλήματα.

Προκειμένου να υπερκεραστεί το ακανθώδες πρόβλημα ποσοτικοποίησης ενός μεμονωμένου αντιοξειδωτικού μέσου, σε συνδυασμό με την ανάγκη ανίχνευσης των συνεργικών δράσεων μεταξύ των διαφόρων υποσυστημάτων της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, καταβλήθηκαν προσπάθειες να προσδιοριστεί η **ολική αντιοξειδωτική ικανότητα** (total antioxidant capacity – TAC) ενός βιολογικού δείγματος. Συγκεκριμένα, ένα πρότυπο αντιοξειδωτικό σώμα συγκρίνεται, ως προς τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες

του, με το εξεταζόμενο δείγμα δίνοντας έτσι ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητάς του. Αυτή είναι σε γενικές γραμμές η αρχή των υπαρχόντων μεθόδων<sup>236 - 238</sup>. Οι μέθοδοι αυτές διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: **1)** στις *μεθόδους αναστολής*, όπου μετράται η φάση υστέρησης ή η καταστολή μια αντίδρασης οξείδωσης υπό την παρουσία ενός αντιοξειδωτικού, και **2)** στις *αναγωγικές μεθόδους*, οι οποίες βασίζονται στις αναγωγικές ιδιότητες των αντιοξειδωτικών, όπου η ικανότητα ενός εξεταζόμενου δείγματος να επιφέρει την αναγωγή ενός μορίου – δείκτη αποτελεί μέτρο της περιεκτικότητας του σε αντιοξειδωτικά.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει: **α)** την αναστολή οξείδωσης του συμπλόκου ABTS, γνωστή ως TAC – assay<sup>239</sup>, **β)** την TRAP-assay η οποία βασίζεται στην μέτρηση του χρόνου κατανάλωσης οξυγόνου του πλάσματος αίματος διαλελυμένου σε λινολεϊκό οξύ<sup>240,241</sup>, και **γ)** την ORAC-assay, η οποία μετρά τον παραγόμενο φθορισμό από το σύμπλοκο AAPH και την μη-γραμμική αποικοδόμησή του<sup>242,243</sup>.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει: **α)** την FRAP-assay, η οποία μετρά την αναγωγή ενός έγχρωμου συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου<sup>244,245</sup>, και **β)** την μέθοδο αποχρωματισμού ABTS+ (Improved TEAC), όπου δρα ως ένα αναχθέν υπόστρωμα<sup>238</sup>. Τελευταία γίνονται προσπάθειες για την αξιολόγηση της ολικής αναγωγικής ικανότητας διαφόρων δειγμάτων μέσω εμβαπτισμένων ηλεκτροδίων και διατάξεων κυκλικής βολταμετρίας<sup>246,247</sup>.

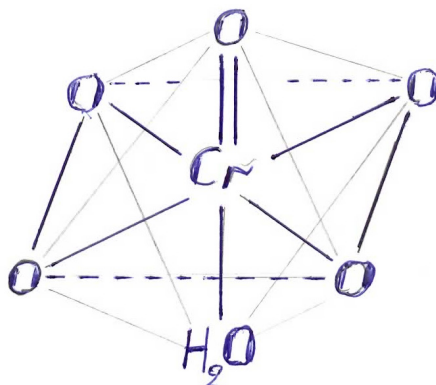
Το κύριο μειονέκτημα των προαναφερθέντων μεθόδων είναι η μειωμένη ειδικότητα τους, εξαιτίας των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών και μπορούν να επηρεάσουν τις μετρήσεις, αλλά και εξαιτίας των διαφορών ταχύτητας των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα, και ενίοτε υπερβαίνουν τον χρόνο μέτρησης που προτείνει η εκάστοτε μέθοδος. Τα χρησιμοποιούμενα αντιπηκτικά κατά την συλλογή του

αίματος, οι συνθήκες και ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων επιδρούν δραστικά στην μετρούμενη TAC, ακόμη και για αποθήκευση διάρκειας λίγων ημερών σε ορισμένες μεθόδους<sup>248</sup>. Τέλος, οι υπάρχουσες μέθοδοι αφορούν κυρίως υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, ενώ λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως βιταμίνη-A, α-τοκοφερόλη κλπ, δεν ανιχνεύονται. Όμως τα βιολογικά δείγματα είναι συνήθως διφασικά διαλύματα με ένα εκτεταμένο υδρόφιλο τμήμα που περιβάλλει ένα λιπόφιλο πυρήνα. Μεταξύ των δύο φάσεων λαμβάνουν χώρα πολλαπλές αντιδράσεις, ενώ διάφορα μόρια όπως η α-τοκοφερόλη με είναι ενεργά και στις δύο φάσεις. Προς την κατεύθυνση αυτή έγιναν προσπάθειες για την μέτρηση λιπόφιλων συμπλόκων με την χρησιμοποίηση νέων διαλυτών, στην μέθοδο Improved – TEAC. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απομονώνει τις δύο φάσεις, ενώ *in vivo* συνυπάρχουν και εμφανίζουν συνέργεια ως προς την αντιοξειδωτική άμυνα που προσφέρουν. Επομένως η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των διάφορων βιολογικών δειγμάτων παραμένει ένας στόχος που δεν έχει επιτευχθεί.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να κατανοήσει καλύτερα την λειτουργία της εξωκυττάριας άμυνας στο οξειδωτικό στρες και τις μεταβολές της σε ποικίλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ευμενή και δυσμενή, καθώς και να συμβάλλει στην προσπάθεια για καλύτερη αξιολόγηση της οξειδο-αναγωγικής κατάστασης και της οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιολογικών δειγμάτων, με την εισαγωγή μιας νέας και σχετικά απλής φασματοφωτομετρικής μεθόδου του «κυανού του υπεροξειδίου του χρωμίου( $\text{CrO}_5$ )».

Το υπεροξείδιο του χρωμίου [ *σχήμα 9* ] είναι ένα βαθύ κυανού χρώματος ισχυρό οξειδωτικό σώμα. Παράγεται μέσα σε υδατική φάση από την αλληλεπίδραση



[*Σχήμα 9*] Η χημική δομή του υπεροξειδίου του χρωμίου.

ενός ανόργανου χρωμικού άλατος με υπεροξείδιο του υδρογόνου σε όξινο περιβάλλον. Επειδή είναι κυρίως διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες, μετά τον σχηματισμό του μετακινείται διαμέσου της υδατικής φάσης προς την οργανική – λιπόφιλη φάση ενός διφασικού διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό εξασκεί την οξειδωτική δράση του και στις δύο φάσεις του διαλύματος, ενώ υπόκειται στην αντιοξειδωτική δράση ποικίλων αντιοξειδωτικών, υδρόφιλων και λιπόφιλων. Πρόκειται επομένως για ένα πολλά



υποσχόμενο μόριο – δείκτη για την ανάπτυξη μεθόδων μέτρησης τόσο της οξειδωτικής όσο και της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων δειγμάτων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως πεδίο εφαρμογής της παραπάνω καινοτόμου μεθοδολογίας τόσο το φαινόμενο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε εμφραγματίες ασθενείς, όσο και οι επιδράσεις στην οξειδωτική κατάσταση επίμυων Wistar μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών (κατεχίνες) και οξειδωτικών σωμάτων (όζον). Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος αίματος εμφραγματιών ασθενών σε ποικίλα χρονικά σημεία μετά την εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου, τόσο με την παραπάνω μέθοδο όσο και με την καταξιωμένη μέθοδο Improved TEAC. Στην δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος αίματος, αιμολυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και ούρων επίμυων Wistar πριν και μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πότε συγκεκριμένης σύστασης και ποσότητας μείγματος κατεχινών και πότε όζοντος με μετρήσεις διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης) και βιολογικών δεικτών οξείδωσης στα ούρα (μαλονική διαλδεϋδη).



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### ***ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ***

#### **A) ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΑΝΟΥ ΤΟΥ $\text{CrO}_5$ ®**

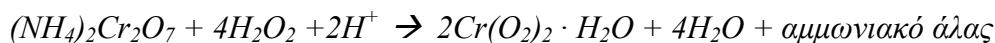
##### **i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός**

Κατά τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν ισοαμυλική αλκοόλη (W205702- Sigma – Aldrich Co), ανθρακικός προπυλεστέρας (3890021- Sigma – Aldrich Co), διχρωμικό αμμώνιο (402826- Sigma – Aldrich Co),  $\alpha$ -τοκοφερόλη (258024- Sigma – Aldrich Co), και υπεροξειδίο του υδρογόνου υψηλής καθαρότητας (95299- Sigma – Aldrich Co), θειικό οξύ (339741-Sigma – Aldrich Co) και υπερχλωρικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας (311421 - Sigma – Aldrich Co). Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ, ενώ για την παρασκευή οργανικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν ισοαμυλική αλκοόλη και ανθρακικός προπυλεστέρας.

Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο Shimadzu 1601 UV-VIS συνδεδεμένο με υδατόλουτρο Julabo, και την χρησιμοποίηση μιας χρήσεως τετράγωνων κυβελίδων πολυστυρενίου με 10mm οπτική δίοδο της εταιρείας Sarstedt Co των 4ml (κωδικός 67.741) και των 1,6ml (κωδικός 67.742). Τα φάσματα EPR μετρήθηκαν με συσκευή Bruker ER200D-SRC.

## ii) Αρχή της μεθόδου <sup>249</sup>

Το υπεροξειδίο του χρωμίου ( $\text{Cr}(\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ή εν συντομία  $\text{CrO}_5$ ) είναι ένα ισχυρότατο οξειδωτικό σώμα. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί προϊόν της κάτωθι αντίδρασης:

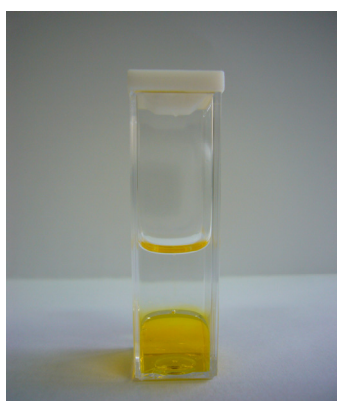


### (αντίδραση 1)

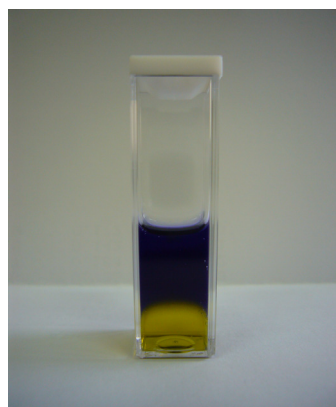
Το υπεροξειδίο του χρωμίου είναι βαθύ κυανού χρώματος προϊόν, σχετικά σταθερό σε πολικούς οργανικούς διαλύτες και μπορεί εύκολα να μετρηθεί μέσω φασματοφωτομετρίας <sup>250</sup>. Το όξινο περιβάλλον για την πραγματοποίηση της αντίδρασης παρέχεται από οξέα όπως  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και  $\text{HClO}_4$  (σχηματίζοντας θειικό και υπερχλωρικό αμμώνιο αντίστοιχα). Όταν τα προϊόντα της αντίδρασης 1 αναμειγνύονται με έναν οργανικό διαλύτη (πχ. ισοαμυλική αλκοόλη, ανθρακικός προπυλεστέρας), τότε το σχηματιζόμενο  $\text{CrO}_5$  μετακινείται από την υδατική φάση και διαλύεται στην οργανική φάση (**διάλυμα 1**) του διφασικού διαλύματος, με την υδατική φάση του διαλύματος να περιέχει τα αντιδρώντα σώματα [**Εικόνες 1α-δ**]. Τα αντιοξειδωτικά μιας συγκεκριμένης ουσίας ή ενός βιολογικού δείγματος, προστιθέμενα στον παραπάνω διάλυμα 1, αναστέλλουν τον σχηματισμό του βαθυκύανου  $\text{CrO}_5$ . Το μέγεθος της αναστολής του σχηματισμού κυανού χρώματος στο διάλυμα 1, μετρούμενο με φασματοφωτομετρία, αντιστοιχεί στην **αντιοξειδωτική ικανότητα** (ή την οξειδωτική κατάσταση) του εξεταζόμενου δείγματος.

Αρχικά, εάν το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) δεν προστεθεί στο διάλυμα 1, δεν σχηματίζεται το υπεροξειδίο του χρωμίου (δες αντίδραση 1) και η οργανική φάση δεν χρωματίζεται με βαθύ κυανό χρώμα (**διάλυμα 2**). Αν στο άχρωμο αυτό διάλυμα 2 προστεθεί μία ουσία ή ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου ή

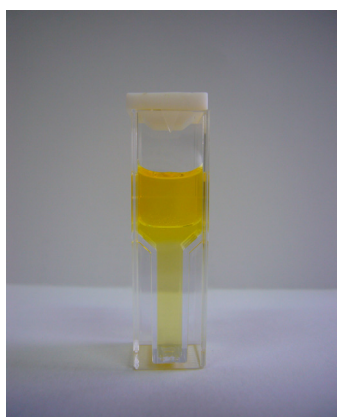
άλλα υπεροξειδία, τότε αποκτά βαθύ κυανό χρώμα, εξαιτίας του σχηματισμού υπεροξειδίου του χρωμίου μέσα από την αντίδραση του διχρωμικού αμμωνίου με τα υπεροξειδία του δείγματος, παρουσία του  $H_2SO_4$  (δεξ αντίδραση 1). Η ένταση του σχηματιζόμενου κυανού χρώματος, μετρούμενη μέσω φασματοφωτομετρίας, αντανακλά την περιεκτικότητα του συγκεκριμένου δείγματος σε υπεροξειδικά σώματα και την οξειδωτική ικανότητά του.



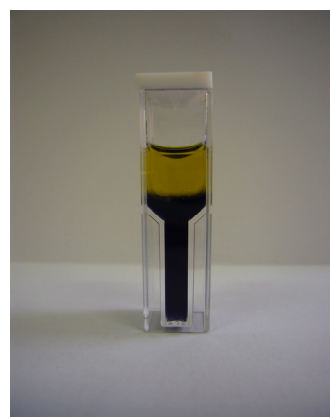
(1α)



(1β)



(1γ)



(1δ)

**[Εικόνα 1].** (α) Η άχρωμη οργανική φάση πάνω (ισοαμυλική αλκοόλη) και η κίτρινη υδατική φάση κάτω (εξαιτίας του διχρωμικού αμμωνίου) πριν την προσθήκη  $H_2O_2$ . (β) Η κυανή οργανική φάση πάνω (σχηματισμός υπεροξειδίου του χρωμίου) και η κίτρινη υδατική φάση κάτω (εξαιτίας του διχρωμικού αμμωνίου) μετά την προσθήκη  $H_2O_2$ . (γ) Η κίτρινη υδατική φάση πάνω (εξαιτίας του διχρωμικού αμμωνίου) και η άχρωμη οργανική φάση

κάτω (ανθρακικός προπυλεστέρας) πριν την προσθήκη  $H_2O_2$ . (δ) Η κίτρινη υδατική φάση πάνω (εξαιτίας του διχρωμικού αμμωνίου) και η κυανή οργανική φάση πάνω (σχηματισμός υπεροξειδίου του χρωμίου) μετά την προσθήκη  $H_2O_2$ .

### iii) Συνθήκες & προετοιμασία δειγμάτων

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία κυψελίδας  $37^\circ C$  μέσω σύνδεσης της καταπακτής μέτρησης του φωτομέτρου με υδατόλουτρο με κατάλληλα ρυθμισμένο θερμοστάτη [Εικόνα 2] ενώ το μήκος κύματος μέτρησης των απορροφήσεων ορίστηκε στα  $\lambda=569\text{nm}$  (για μετρήσεις με ισοαμυλική αλκοόλη) και στα  $\lambda=566\text{nm}$  (για μετρήσεις με ανθρακικό προπυλεστέρα). Ο μηδενισμός του φωτομέτρου έγινε στον αέρα.



[Εικόνα 2] Η μετρητική διάταξη των πειραμάτων (φωτόμετρο Shimadzu συνδεδεμένο με υδατόλουτρο Julabo με ρυθμιζόμενο θερμοστάτη).

Σε πωματιζόμενη κυψελίδα πολυστυρενίου, όγκου 4 mL, οπτικής διόδου 1cm, προστέθηκαν 1200  $\mu\text{L}$  οργανικού διαλύτη, 400  $\mu\text{L}$  διχρωμικού αμμωνίου 0,02M, 400  $\mu\text{L}$

διαλύματος θειικού οξέος 0,025M (είτε 400μL διαλύματος υπερχλωρικού οξέος 0,05M) και 20 μL του εξεταζόμενου δείγματος. Η κυβελίδα εισήχθη στο φασματοφωτόμετρο και ακολούθησε χρόνος επώασης 3 min. Ακολούθως έγινε η πρώτη μέτρηση της απορρόφησης. Στην συνέχεια η κυβελίδα απομακρύνθηκε από το φωτόμετρο και προστέθηκαν σε αυτήν 20 μL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 1,6M. Μετά από ήπια ανάδευση, η κυβελίδα εισήχθη εκ νέου στο φωτόμετρο και μετρήθηκε η απορρόφηση μετά από χρόνο 3 min. Υπολογίστηκε η αύξηση της απορρόφησης ( $\Delta A$ ). Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα πραγματοποιήθηκε τριπλή μέτρηση και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τις μετρήσεις του τυφλού, αλλά αντί χρησιμοποίησης 20 μL δείγματος, προστέθηκαν 20 μL του οργανικού διαλύτη. Στις μετρήσεις του πρότυπου αντιοξειδωτικού χρησιμοποιήθηκαν 20 μL διαλύματος α-τοκοφερόλης 0,1M διαλελυμένης στον οργανικό διαλύτη των μετρήσεών μας, αντί για 20 μL δείγματος. Ο υπολογισμός της μεταβολής απορρόφησης  $\Delta A$  για τα διαλύματα του τυφλού και του πρότυπου αντιοξειδωτικού γινόταν πριν από κάθε ομάδα μετρήσεων προκειμένου να αποφευχθούν ημερήσιες διακυμάνσεις του αποθέματος των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων.

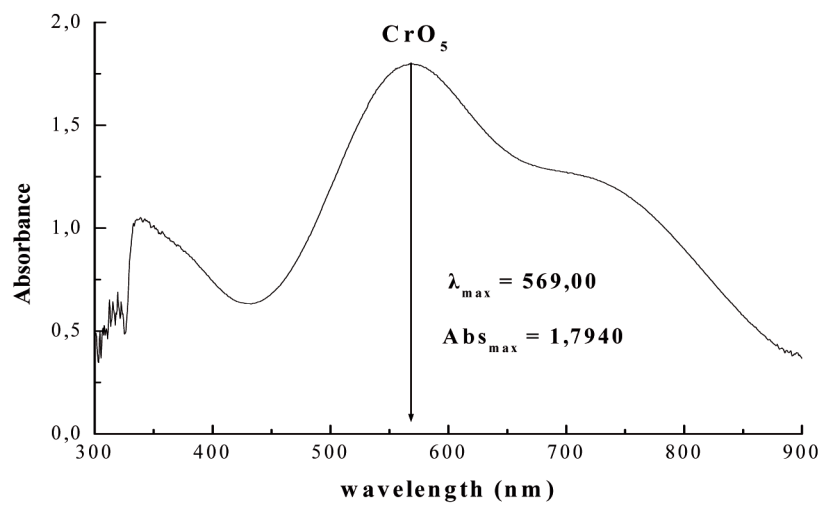
Το υπολογιζόμενο κλάσμα:

$$[\alpha\text{-τοκοφερόλη}] \quad X \quad \frac{\Delta A_{\text{τυφλο}} - \Delta A_{\text{δειγμα}}}{\Delta A_{\text{τυφλο}} - \Delta A_{\text{προτυπο}}}$$

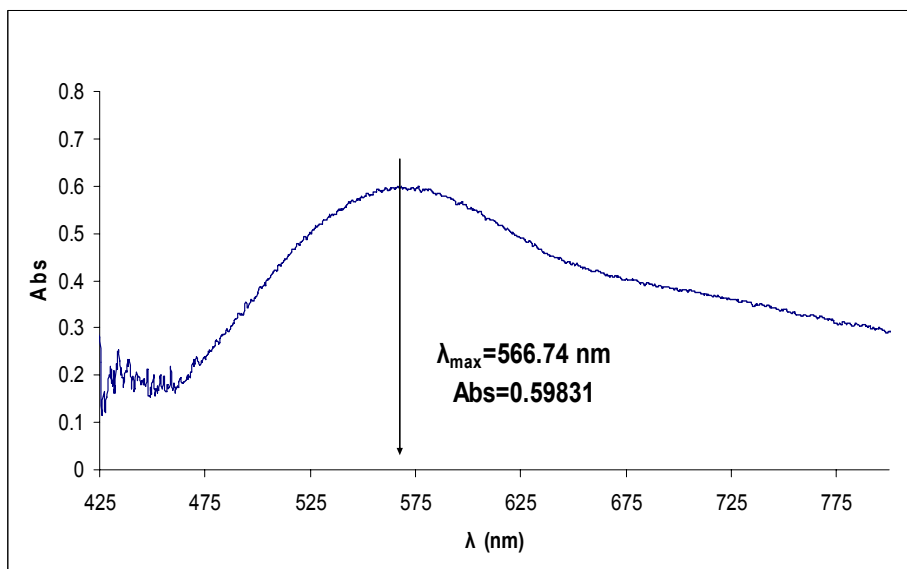
αποτελεί μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εξεταζόμενου δείγματος συγκρινόμενη με αυτή διαλύματος α-τοκοφερόλης 0,1M, και μετράται σε mol/l α-τοκοφερόλης

#### iv) Μεθοδολογική ανάλυση

Το υπεροξείδιο του χρωμίου είναι ένα βαθυκόανο προϊόν εύκολα διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες, με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda=569\text{nm}$  για την ισοαμυλική αλκοόλη [Σχήμα 10α] και σε  $\lambda=566\text{nm}$  για τον ανθρακικό προπυλεστέρα [Σχήμα 10β].



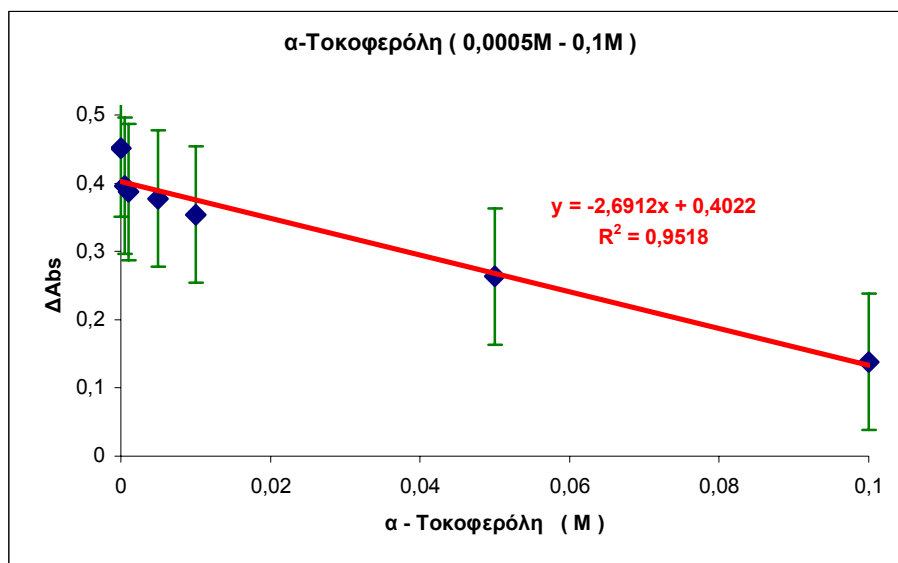
[Σχήμα 10α] Φάσμα απορρόφησης του CrO<sub>5</sub> σε ισοαμυλική αλκοόλη (37<sup>0</sup> C)



[Σχήμα 10β] Φάσμα απορρόφησης του CrO<sub>5</sub> σε ανθρακικό προπυλεστέρα (37<sup>0</sup> C)

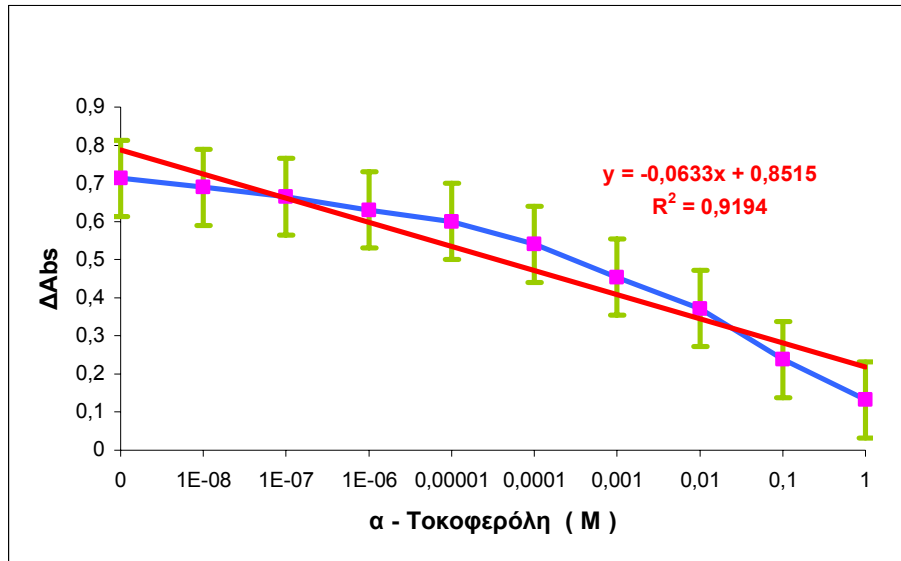


Η μέθοδος βαθμονομήθηκε χρησιμοποιώντας δείγματα των 20  $\mu\text{L}$  διαλυμάτων  $\alpha$ -τοκοφερόλης ποικίλων συγκεντρώσεων σε ισοαμυλική αλκοόλη, η οποία ήταν και ο κύριος οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις μας.



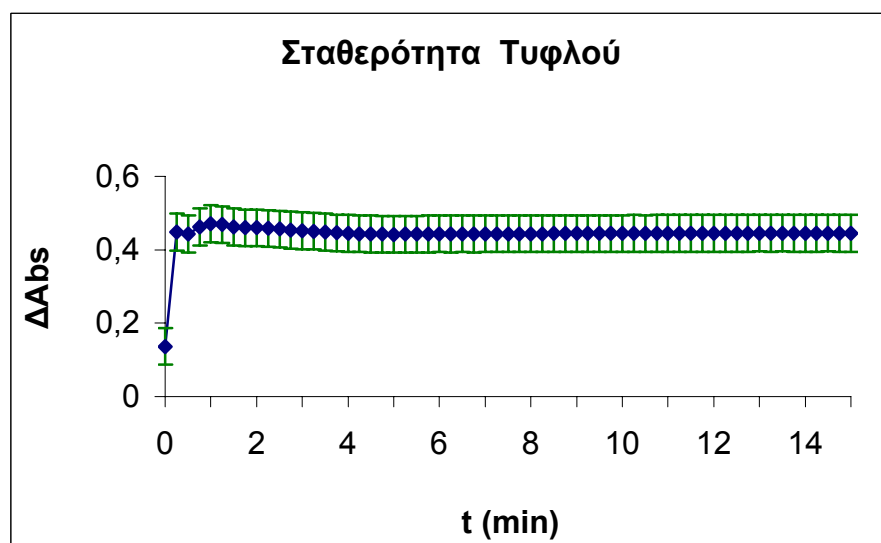
[Σχήμα 11] Περιοχή ενδιάμεσων συγκεντρώσεων (0,0005M – 0,1M)  $\alpha$ -τοκοφερόλης σε ισοαμυλική αλκοόλη ( $37^{\circ}\text{C}$ ), με χρήση  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Η μέθοδος εμφάνισε αξιοσημείωτη γραμμικότητα στην περιοχή των ενδιάμεσων συγκεντρώσεων  $\alpha$ -τοκοφερόλης, η οποία ήταν και η περιοχή όπου κυμάνθηκαν οι τιμές απορρόφησης των εξετασθέντων δειγμάτων, συμβάλλοντας έτσι στην ακρίβεια της μεθόδου [ Σχήμα 11]. Ακόμη, η μέθοδος βαθμονομήθηκε χρησιμοποιώντας ως οργανικό διαλύτη ανθρακικό προπυλεστέρα, παρουσιάζοντας παρόμοια γραμμικότητα [ Σχήμα 12]

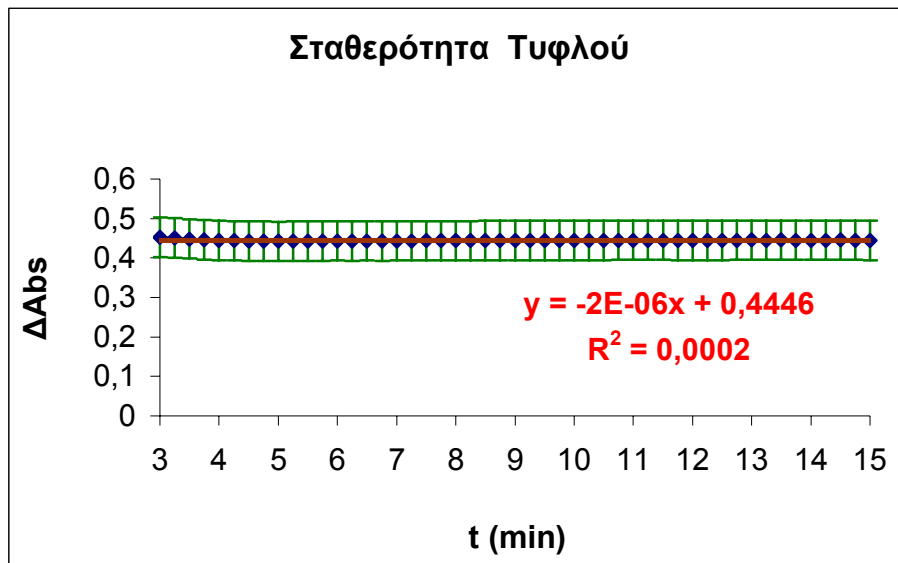


[Σχήμα 12] Βαθμονόμηση της μεθόδου με ποικίλες συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης σε ανθρακικό προπυλεστέρα (37<sup>0</sup> C)

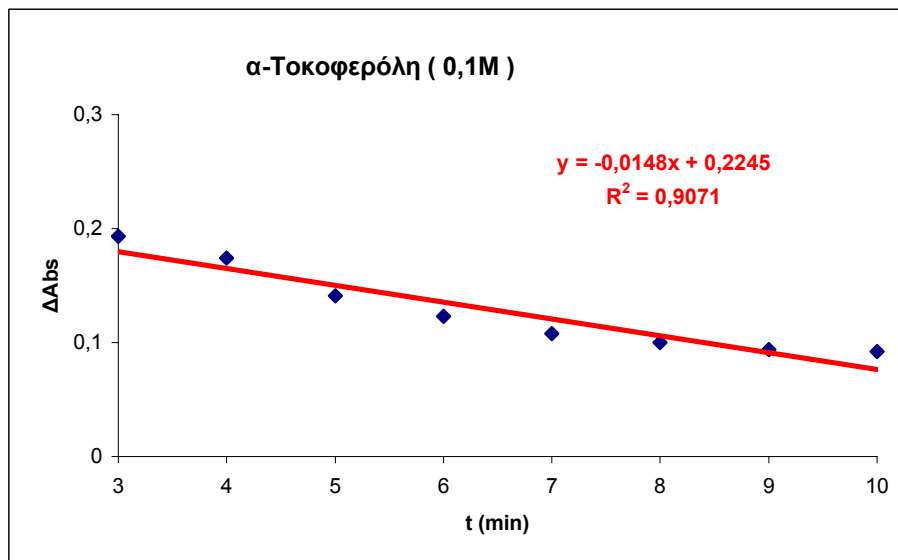
Η μέθοδος παρουσίασε σταθερότητα στις μετρήσεις απορρόφησης κατά την διάρκεια περιόδου επάσης αρκετών λεπτών, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές μετά την χρονική περίοδο των 3 λεπτών που εφαρμόσαμε κατά τις μετρήσεις μας, τόσο στο τυφλό [Σχήμα 13α & 13β] όσο και στο διάλυμα του πρότυπου αντιοξειδωτικού [Σχήμα 14].



[Σχήμα 13α] Σταθερότητα της μεθόδου με την χρήση του διαλύματος τυφλού

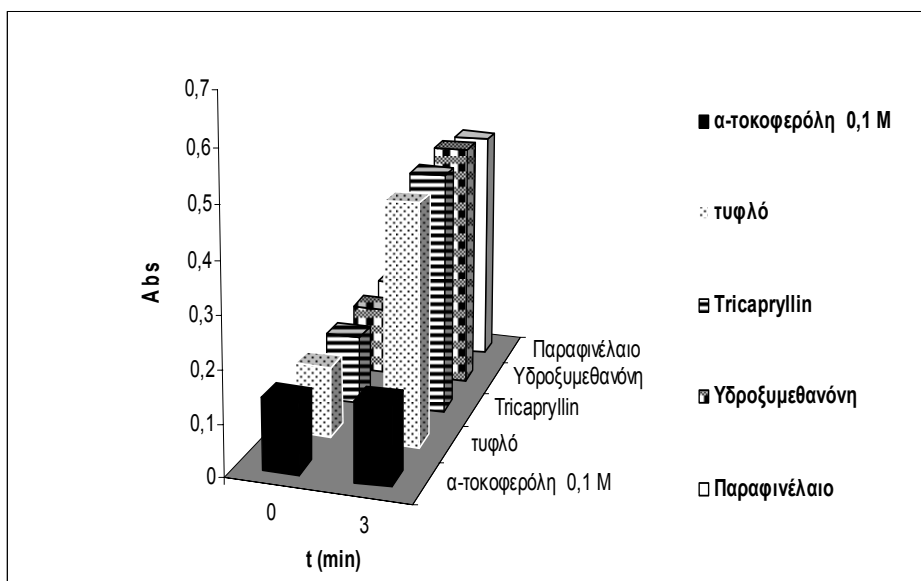


[Σχήμα 13β] Σταθερότητα της μεθόδου με την χρήση του διαλύματος τυφλού μετά τα 3 λεπτά



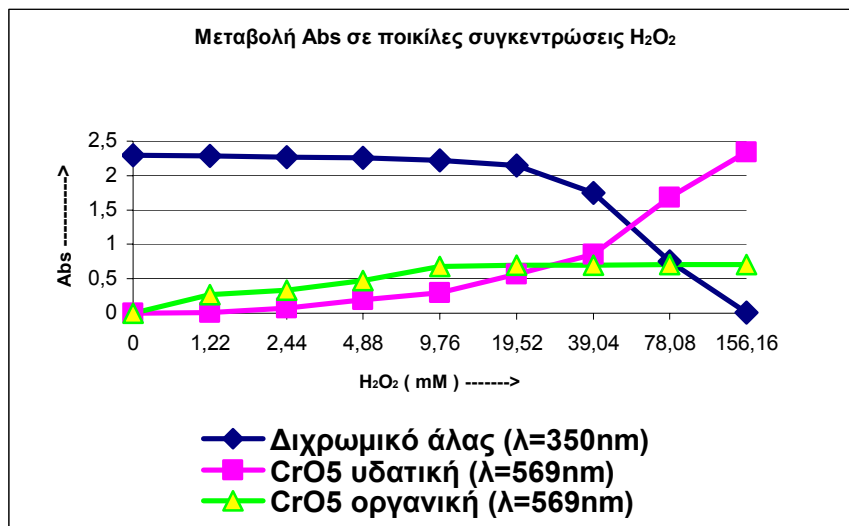
[Σχήμα 14] Σταθερότητα της μεθόδου με χρήση του πρότυπου διαλύματος α- τοκοφερόλης 0,1M, μετά από  $t=3min$ .

Επίσης, διερευνήθηκε η ειδικότητα της μεθόδου, όπου δεν παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο παραγόμενο υπεροξείδιο του χρωμίου και στους διάφορους πολικούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν [Σχήμα 15].



[Σχήμα 15] Απουσία αλληλοεπιδράσεων ανάμεσα σε  $CrO_5$  και ποικιλίας πολικών οργανικών διαλυτών.

Η παραγωγή του κυανού υπεροξειδίου του χρωμίου παρουσίασε συσχέτιση με την συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος  $H_2O_2$ , με την υδατική φάση του διφασικού διαλύματος να παραλαμβάνει την περίσσεια του  $CrO_5$  μετά τον κορεσμό της οργανικής φάσης [Σχήμα 16].

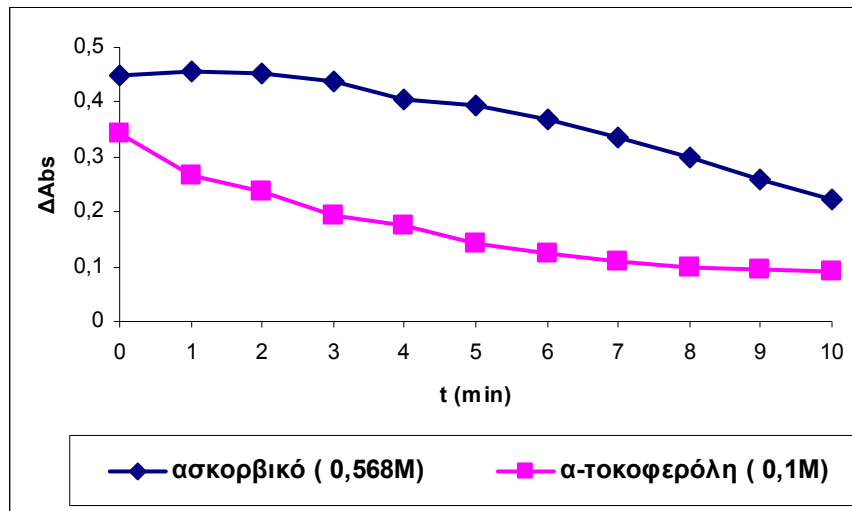


*[Σχήμα 16] Συσχέτιση συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και σχηματισμού CrO<sub>5</sub> (απορρόφηση στα t=10s με διάφορες συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ισοαμλική αλκοόλη ως οργανικός διαλύτης). Σημειώστε την υδατική φάση του διφασικού διαλύματος να παραλαμβάνει την περίσσεια του CrO<sub>5</sub> μετά τον κορεσμό της οργανικής φάσης.*

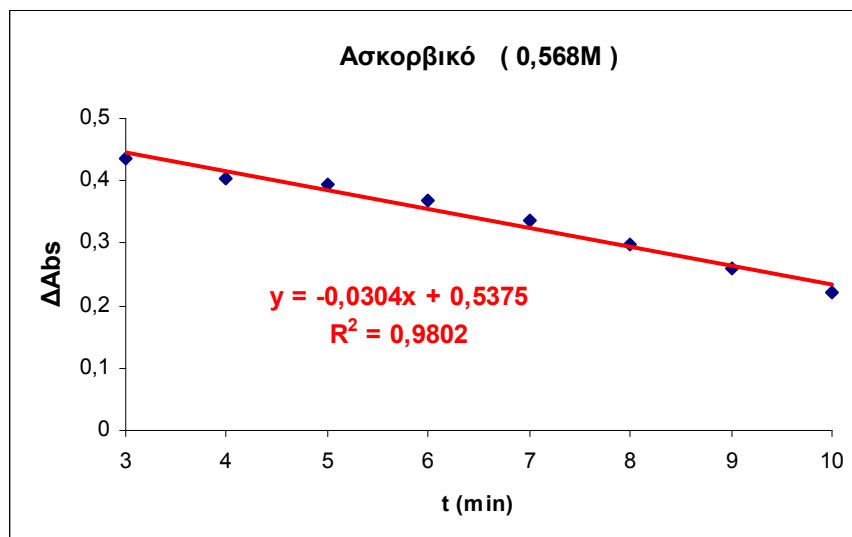
Στις μετρήσεις μας, τα χρησιμοποιηθέντα οξέα βρίσκονταν σε ήπια περίσσεια έναντι του άλατος αμμωνίου, προκειμένου να μετατοπισθεί η χημική ισορροπία της *αντίδρασης 1* προς τα δεξιά και να παραχθεί περισσότερο κυανό CrO<sub>5</sub> αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Όπως παρατηρούμε στο [Σχήμα 11] και στο [Σχήμα 12], η μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύσει α-τοκοφερόλη σε τελικές συγκεντρώσεις των 10 nM (συνολική ευαισθησία).

Το χημικό μας σύστημα εξετάστηκε με την χρήση ασκορβικού οξέος (ενός κύριου υδατοδιαλυτού αντιοξειδωτικού) ως πιθανό πρότυπο αντιοξειδωτικό σώμα, με τα αποτελέσματα να απεικονίζονται στα *Σχήματα 17α* και *17β*. Συγκρίναμε τις κινητικές απορρόφησης των δύο αντιοξειδωτικών (ασκορβικού και α-τοκοφερόλης), όπως παρατηρούμε στα *Σχήματα 14* και *17β* αντίστοιχα.

Η σταθερότητα των μετρήσεων απορρόφησης με  $\alpha$ -τοκοφερόλη μετά από χρόνο 3 λεπτών είναι προφανής, ενώ με το ασκορβικό η απορρόφηση συνεχίζει να μειώνεται ταχύτατα και μετά την πάροδο των 3 λεπτών, καθιστώντας το ακατάλληλο ως πρότυπο αντιοξειδωτικό για την συγκεκριμένη μέθοδο.

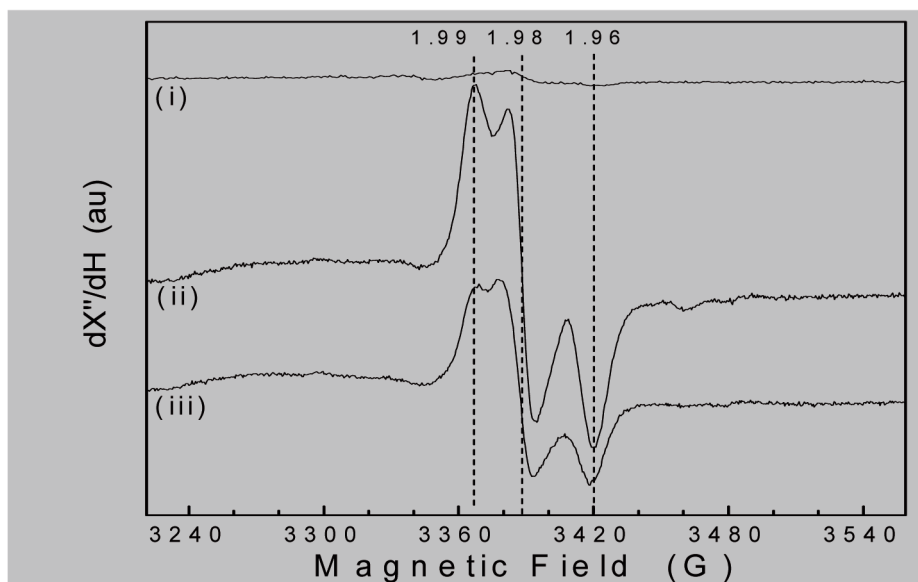


[Σχήμα 17α] Κινητική απορρόφησης της μεθόδου χρησιμοποιώντας διαλύματα ασκορβικού 0,568M και α-τοκοφερόλης 0,1M



[Σχήμα 17β] Κινητική απορρόφησης της μεθόδου χρησιμοποιώντας διάλυμα ασκορβικού 0,568M, μετά από  $t = 3\text{min}$

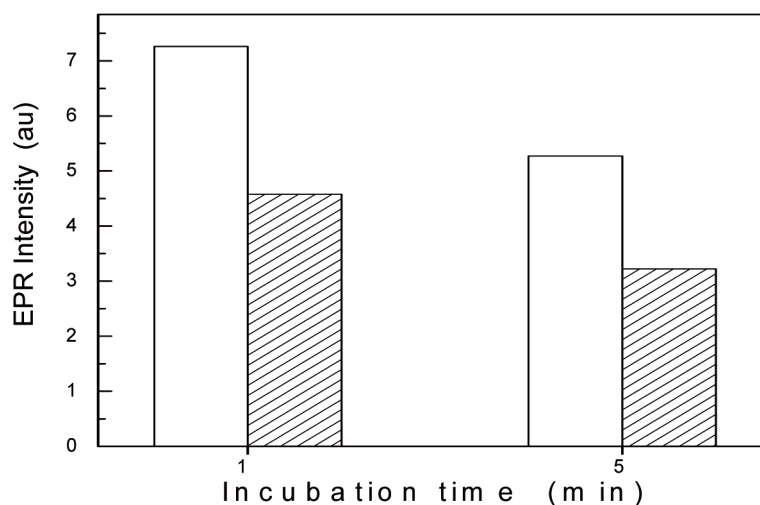
Φάσματα EPR του εν λόγω χημικού συστήματος με οργανικό διαλύτη την ισοαμυλική αλκοόλη καταγράφηκαν στα σχήματα **18α** και **18β**.



[Σχήμα 18α] Φάσματα EPR του χημικού συστήματος της μεθόδου ( $T = 77^0K$ ,  $freq = 100KHz$ ,  $ampl = 5G$ ,  $microwave\ power = 10dB$ ).

Στο [Σχήμα 18α] παρατηρούμε στην μέτρηση (i) την απουσία σήματος πριν την προσθήκη  $H_2O_2$  και τον σχηματισμό οξειδωτικής παραμαγνητικής ρίζας. Στην μέτρηση (ii), μετά την προσθήκη  $H_2O_2$ , παρατηρούμε την χαρακτηριστική διπλή αιχμή του σχηματισμού μιας παραμαγνητικής χρωμικής ρίζας. Στην μέτρηση (iii) η αιχμή αυτή αμβλύνεται από την αντιοξειδωτική δράση της  $\alpha$ -τοκοφερόλης.

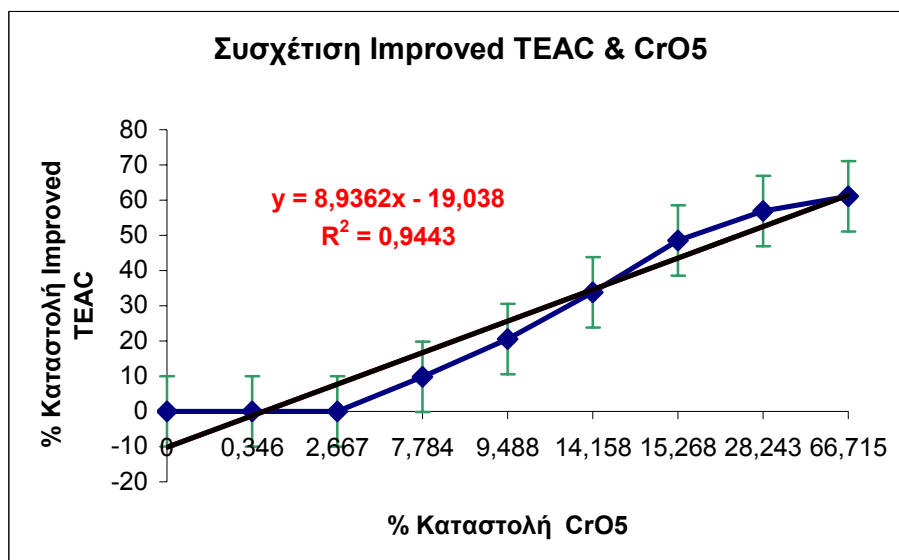
Η επίδραση του χρόνου επώασης στην ένταση σήματος του EPR, με την παρουσία όσο και την απουσία  $\alpha$ -τοκοφερόλης, απεικονίζεται στο [Σχήμα 18β], όπου είναι εμφανής η σταδιακή ελάττωση του σήματος.



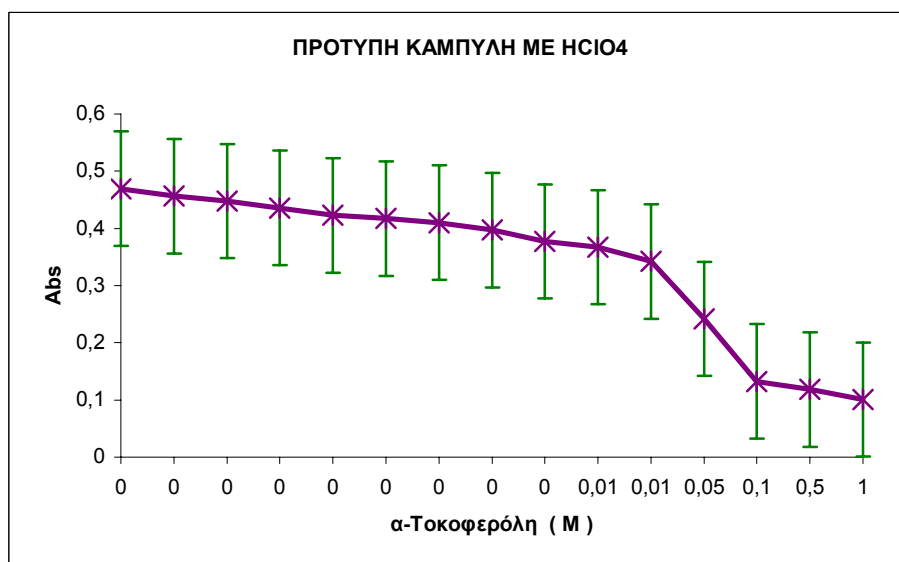
**[Σχήμα 18β]** Επίδραση του χρόνου επώασης στην ένταση σήματος του EPR (σε g1.98) δίχως α-τοκοφερόλη (κενές στήλες), και με α-τοκοφερόλη (γραμμοσκιασμένες στήλες)

Ακόμη, συγκρίναμε την μέθοδό μας με μια άλλη καθιερωμένη φασματοφωτομετρική μέθοδο για τον καθορισμό της οξειδωτικής κατάστασης, την Improved TEAC. Μετρήθηκαν τα ίδια διαλύματα, διαφόρων συγκεντρώσεων σε α-τοκοφερόλη, και με τις δύο μεθόδους. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν ως % αναστολή της απορρόφησης, όπως παρατηρούμε στο [Σχήμα 19]. Η μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου μας (Κυανού του CrO<sub>5</sub>) έναντι της μεθόδου Improved TEAC στην ανίχνευση ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης είναι εμφανής παρατηρώντας το τμήμα εκείνο της καμπύλης του γραφήματος κοντά στην συμβολή των δύο αξόνων χ και y. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης, η μέθοδος μας ανιχνεύει μείωση της απορρόφησης, ενώ με την μέθοδο Improved TEAC δεν παρατηρείται μείωση της απορρόφησης (η καμπύλη της γραφικής παράστασης βρίσκεται πάνω στον άξονα χ και κάθετα στον άξονα y στο σχήμα 10).



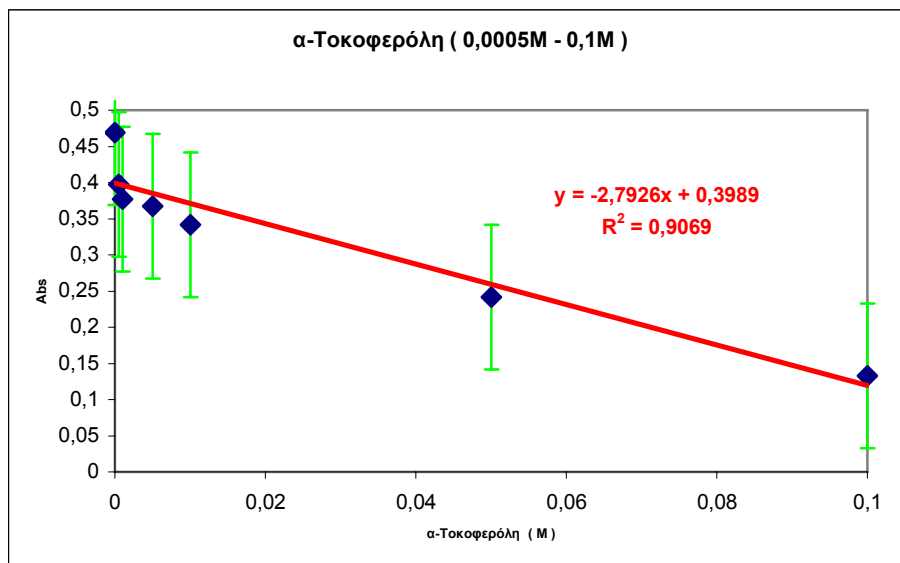


*[Σχήμα 19] Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων διαλυμάτων α-τοκοφερόλης με τις Improved TEAC & Κιανού του CrO<sub>5</sub> (εκφραζόμενη ως % αναστολή απορρόφησης). Σημειώστε την ικανότητα της μεθόδου CrO<sub>5</sub> να ανιχνεύει μικρότερες συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης από την Improved TEAC.*



*[Σχήμα 20] Βαθμονόμηση της μεθόδου, με χρήση HClO<sub>4</sub>, σε ποικίλες συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης. Διαλύτης ισοαμλική αλκοόλη (37<sup>0</sup> C).*

Επίσης, πραγματοποιήθηκε παραλλαγή της μεθόδου με χρησιμοποίηση ως πρωτονιακού δότη αντί για το θειϊκό οξύ το υπερχλωρικό οξύ ( $\text{HClO}_4$ ). Όπως παρατηρούμε στο κάτωθι [Σχήμα 20] η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου εμφανίζει μεγαλύτερη κλίση στην περιοχή των ενδιάμεσων συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης (0,0005M – 0,1M), όπου και εντοπίζεται η πλειονότητα των εξεταζόμενων βιολογικών δειγμάτων.



[Σχήμα 21] Περιοχή ενδιάμεσων συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης σε ισοαμυλική αλκοόλη ( $37^{\circ}\text{C}$ ), με χρήση  $\text{HClO}_4$ .

Η περιοχή αυτή της καμπύλης, όπως απεικονίζεται στο [Σχήμα 21], συγκρινόμενη με την καμπύλη του σχήματος 2 εμφανίζει μεν μεγαλύτερη κλίση, είναι όμως λιγότερο γραμμική, οπότε και λιγότερο κατάλληλη για την ακριβή μέτρηση βιολογικών δειγμάτων.

## **B) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΕΣ**

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της αντιοξειδωτικής κατάστασης του πλάσματος αίματος ασθενών με έμφραγμα μυοκαρδίου (ένα κλασσικό μοντέλο της οξειδωτικής βλάβη ισχαιμίας - επαναιμάτωσης). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα χρονικά σημεία 30 λεπτά, 2 ώρες, 4 ώρες και 12 ώρες μετά την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Πραγματοποιήθηκε λήψη φλεβικού αίματος στα προαναφερθέντα χρονικά σημεία, σε σωληνάρια των 15mL δίχως αντιπηκτικό και φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο Heraeus στα 400g για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο πλάσμα του αίματος συλλέχθηκε, μεταφέρθηκε σε σωληνάρια Eppendorf των 1,5mL και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία  $T = -70^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική μέτρηση. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κυανού του υπεροξειδίου του χρωμίου ( $\text{CrO}_5$ )<sup>®</sup>, όπως περιγράφεται παραπάνω, και η μέθοδος Improved TEAC.

### **i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός**

Εκτός των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο Κυανού του  $\text{CrO}_5$ <sup>®</sup>, και έχουν ήδη αναφερθεί, για την μέθοδο Improved TEAC χρησιμοποιήθηκαν Trolox (Hoffman – La Roche) ως πρότυπο αντιοξειδωτικό σώμα σε συγκέντρωση 2,5mM σε διάλυμα PBS 5 mM (pH=7,4), ABTS, αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας και υπερθειικό κάλιο της Sigma-Aldrich. Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ.

Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο Shimadzu 1601 UV-VIS συνδεδεμένο με υδατόλουτρο Julabo, και την χρησιμοποίηση μιας χρήσεως

τετράγωνων κυψελίδων πολυστυρενίου με 10 mm οπτική δίοδο της εταιρείας Sarstedt Co των 4 ml (κωδικός 67.741) και των 1,6 ml (κωδικός 67.742).

## ii) Πρωτόκολλο μετρήσεων

Εκτός από την μέθοδο Κυανού του  $\text{CrO}_5^{\text{®}}$ , η οποία έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος Improved TEAC, κατά την οποία αρχικά το ABTS διαλύθηκε σε δις απεσταγμένο ύδωρ σε συγκέντρωση 7mM. Η ενεργή ρίζα  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  παράγεται από την αντίδραση του αρχικού υδατικού διαλύματος του ABTS με διάλυμα υπερθειϊκού καλίου 2,45mM (τελική συγκέντρωση) και παραμονή στο σκοτάδι για τουλάχιστον 12-16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα παρέμενε σταθερό στην μορφή αυτή για πάνω από δύο ημέρες. Στην περίπτωση των μετρήσεών μας για αντιοξειδωτικά στο πλάσμα αίματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS (pH 7,4) ως διαλύτης του αρχικού διαλύματος  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  μέχρι την επίτευξη τιμής απορρόφησης 0,700 ( $\pm 0,02$ ) σε  $\lambda=734\text{nm}$  και θερμοκρασία 30°C. Μετά την προσθήκη σε 1mL τελικού διαλύματος  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  10μL δείγματος πλάσματος είτε πρότυπου διαλύματος Trolox σε PBS (τελική συγκέντρωση 0-15μM), μετρήθηκαν οι τιμές απορρόφησης ακριβώς στο 1 λεπτό και στα 6 λεπτά μετά από την αρχική ανάμειξη. Ανάλογα τυφλά διαλύματα μετρήθηκαν σε κάθε ημέρα μετρήσεων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση. Το ποσοστό καταστολής της απορρόφησης στα 734nm αποτελεί συνάρτηση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ουσιών του δείγματος συγκρινόμενων με το Trolox.

## Γ) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR

Φυτοχημικά σύμπλοκα όπως τα φλαβονοειδή (πχ κατεχίνες) εμφανίζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες δρώντας είτε ως αδρανοποιητές των ενεργών ριζών οξυγόνου είτε ως αναστολείς σχετιζόμενων με αυτά ενζυμικών συστημάτων<sup>251</sup>. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων βιβλιογραφικά μελετώνται είτε σε *in vitro* συνθήκες, είτε ως *per os* χορηγούμενα σε διάφορα πειραματικά ζωικά μοντέλα. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν ποικίλα προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας και μεταβολισμού των συμπλόκων αυτών, δεδομένου ότι πολλά διατροφικά φλαβονοειδή εμφανίζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, υφίστανται εκτεταμένη χημική μετατροπή και οι πιθανές δράσεις των μεταβολιτών τους απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση<sup>252</sup>. Προκειμένου να παρακαμφθεί ο σκόπελος αυτός αλλά και να μελετηθεί ακέραια η αντιοξειδωτική δράση των συμπλόκων αυτών χωρίς να υφίστανται τις μεταβολικές διεργασίες της γαστρεντερικής οδού, προσανατολιζόμαστε προς εναλλακτικές οδούς χορήγησής τους, όπως η ενδοφλέβια και η ενδοπεριτοναϊκή.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της άμεσης χορήγησης ενδοπεριτοναϊκά μίγματος φλαβονοειδών στα διάφορα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα άμυνας αλλά και στην εν γένει αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού, σε αντιδιαστολή με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος όζοντος, ενός μορίου γνωστού για την ικανότητα του να οδηγεί στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ερχόμενο σε επαφή με ζωντανούς ιστούς<sup>253</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 36 επίμυες Wistar, ηλικίας 3,5 μηνών με μέσο σωματικό βάρος 189gr ±14gr. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ενεργότητας των ενζύμων υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) και δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) στα ερυθρά αιμοσφαίρια τους, των επιπέδων λιπιδιακής

υπεροξειδωσης στα ούρα με την μέθοδο TBARS, και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων.

### **i) Χημικά αντιδραστήρια – εξοπλισμός**

Χρησιμοποιήθηκαν (-)- επικατεχίνη, (+)- κατεχίνη, γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG),  $\alpha$ -τοκοφερόλη, 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), σετ μέτρησης υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (CGP1 kit) και δισμουτάσης σουπεροξειδίου (Sigma-Biochemica 19160 kit) της Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), υπεροξείδιο υδρογόνου υψηλής καθαρότητας της Fluka (St Louis, MO, USA) και κυψελίδες πολυστυρενίου μιας χρήσεως, 10mm οπτικής διόδου, της Sarsterdt Co των 4ml (κωδικός 67.741) και των 1,6ml (κωδικός 67.742). Για τις αιματολογικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε αναλυτής Biocode Hycel Celly 70 και φυγόκεντρος Heraeus, ενώ για τις μετρήσεις GPx, MDA, SOD και TAC χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Multiscan Spectrum (Thermo Scientific). Η παραγωγή του όζοντος πραγματοποιήθηκε με συσκευή Medozons BM (Arzamas Instrument Plant). Για τις μετρήσεις TAC χρησιμοποιήθηκαν ισοαμυλική αλκοόλη (W205702- Sigma – Aldrich Co), ανθρακικός προπυλεστέρας (3890021- Sigma – Aldrich Co), διχρωμικό αμμώνιο (402826- Sigma – Aldrich Co),  $\alpha$ -τοκοφερόλη (258024- Sigma – Aldrich Co), και υπεροξείδιο του υδρογόνου υψηλής καθαρότητας (95299- Sigma – Aldrich Co), θειικό οξύ (339741-Sigma – Aldrich Co) και υπερχλωρικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας (311421 - Sigma – Aldrich Co). Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ, ενώ για την παρασκευή οργανικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν ισοαμυλική αλκοόλη και ανθρακικός προπυλεστέρας.

## ii) Συνθήκες & προετοιμασία δειγμάτων

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, οι επίμυες διαβιούσαν μονήρεις, σε μεταβολικούς κλωβούς, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι. Τρέφονταν ελεύθερα με ξηρή τροφή (Viozois SA, Animal Feed Company of Epirus) και νερό. Τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τους ανθρωπιστικούς κανόνες του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και του Προεδρικού Διατάγματος 160/1991 σε εφαρμογή της αντίστοιχης Ευρωπαϊκής νομοθεσίας (Directive 86/609/EEC).

## iii) Πρωτόκολλο πειράματος

Οι επίμυες διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 12 μελών η καθεμία: **α)** την ομάδα ελέγχου (control), **β)** την ομάδα όζοντος, και **γ)** την ομάδα αντιοξειδωτικών. Οι πειραματικές μετρήσεις διάρκεσαν συνολικά 20 συνεχείς ημέρες ενώ οι επίμυες αφέθηκαν για εγκλιματισμό 5 ημέρες στους μεταβολικούς κλωβούς προτού αρχίσουν οι μετρήσεις. Τις πρώτες 10 ημέρες πραγματοποιήθηκε η χορήγηση ουσιών, την ίδια πάντοτε χρονική στιγμή της ημέρας (11 με 12 π.μ.), ακολουθούμενη από 10 ημέρες παρατήρησης. Καθημερινά καταγράφονταν το σωματικό βάρος, η κατανάλωση ύδατος και τροφής, το βάρος των κοπράνων και των ούρων, η θερμοκρασία των μεταβολικών κλωβών και του περιβάλλοντος, η υγρασία και η εξάτμιση ύδατος. Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν την 1<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ενώ δείγματα αίματος ελήφθησαν την 1<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup> και 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος (προς αποφυγή πρόκλησης τεχνητής αναιμίας στους επίμυες και αλλοίωσης των αποτελεσμάτων). Η λήψη 2ml αίματος γινόταν κάθε φορά από την σφαγίτιδα φλέβα σε ηπαρινισμένα σωληνάρια και ακολουθούσε άμεσα η μέτρηση

αιματοκρίτη (Ht) και του αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC). Ακολούθως, διαχωριζόταν το πλάσμα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια με φυγοκέντρηση (στις 3500rpm για 30 λεπτά). Τα βιολογικά δείγματα καταψύχονταν στους  $-76^{\circ}$  C μέχρι την στιγμή της μέτρησής τους.

Στην **ομάδα ελέγχου** χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1ml διαλύματος 0,09% NaCl καθημερινά, σε μία δόση, κατά τις ημέρες 1 - 10 του πειράματος.

Στην **ομάδα όζοντος** χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την ημέρα 1 του πειράματος 2 ml διαλύματος όζοντος συγκέντρωσης 1000μg / lt (6.1 μg / kg σωματικού βάρους), και για τις επόμενες 9 ημέρες χορηγήθηκε καθημερινά 1ml όζοντος ίδιας συγκέντρωσης.

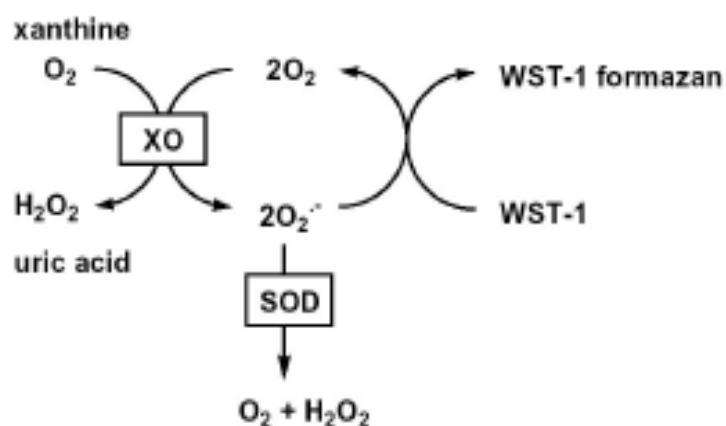
Στην **ομάδα αντιοξειδωτικών** χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1,25ml μείγματος κατεχίνης, επικατεχίνης και γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης σε συγκέντρωση 20 mg / Kgr σωματικού βάρους, καθημερινά, κατά τις ημέρες 1 - 10 του πειράματος. Η σύνθεση του χορηγούμενου μείγματος κατεχινών περιελάμβανε 1,55 mg κατεχίνης, 1,55 mg επικατεχίνης, και 1,4 mg επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) διαλελυμένων σε δις απεσταγμένο ύδωρ, σε αναλογία 35% κατεχίνη - 35% επικατεχίνη - 30% επιγαλλοκατεχίνη. Η συνολική δόση κατεχινών υπολογίστηκε σε 4,5mg / πειραματόζωο που μεταφράζεται σε 20mg κατεχινών / kg σωματικού βάρους.

#### **iv) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) των ερυθροκυττάρων**

Σε 500μL απομονωθέντων με φυγοκέντρηση ερυθρών αιμοσφαιρίων προστέθηκε 1ml οσμωτικά υπότονο διάλυμα NaCl 0,45% σε δις απεσταγμένο ύδωρ. Το νέο διάλυμα τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα δύο φορές για διάστημα 1min και φυγοκεντρήθηκε στις 3500rpm για 30min προκειμένου να επέλθει ρήξη των ερυθροκυττάρων και

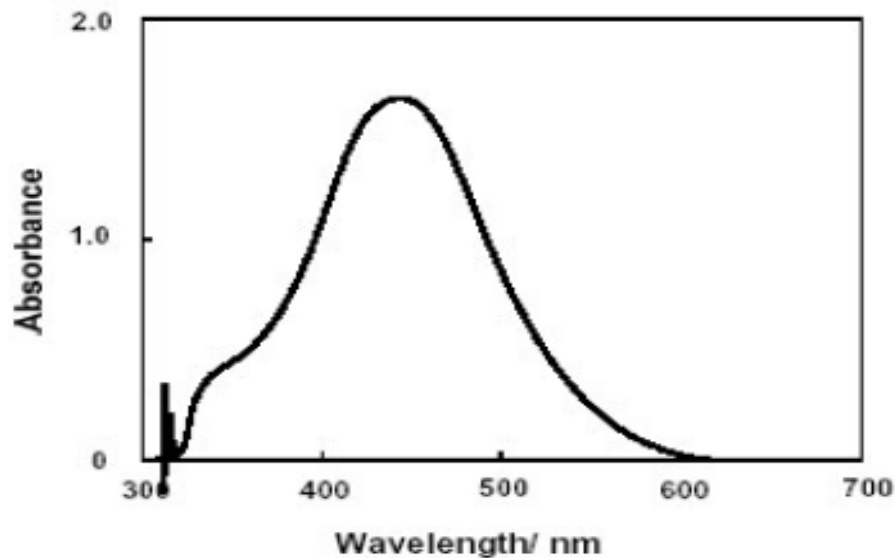


ομογενοποίηση του διαλύματος. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε σωληνάρια Eppendorf και αραιώθηκε 1:10 με δις απεσταγμένο ύδωρ. Η ενεργότητα της δισμουτάσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μια φασματοφωτομετρική μέθοδο βασισμένη στην ξανθινο-οξειδάση και ένα νέο υδατοδιαλυτό χρωμογόνο αντιδραστήριο (WST-1 formazan). Το χρωμογόνο παράγεται από την οξείδωση του άλατος τετραζολικού μονονατρίου του Dojindo παρουσία ανιόντων σουπεροξειδίου, η οποία καταλύεται από την ξανθινο-οξειδάση και αναστέλλεται από την SOD [Σχήμα 22].



[Σχήμα 22] Σχηματισμός χρωμογόνου παρουσία υπεροξειδικού ανιόντος.

Ο βαθμός αναστολής του σχηματιζόμενου χρωμογόνου, μετρούμενος φωτομετρικά σε μήκος κύματος  $\lambda=440$  nm αποτελεί μέτρο της ενεργότητας της δισμουτάσης [Σχήμα 23]. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % αναστολή της απορρόφησης του χρωμογόνου συγκρινόμενης με το διάλυμα ελέγχου (blank).



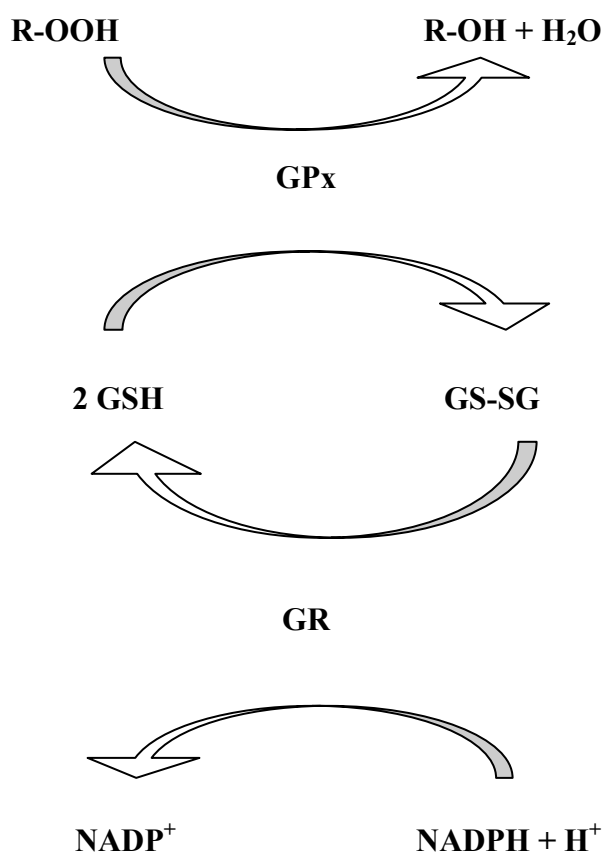
[Σχήμα 23] Φάσμα απορρόφησης του χρωμογόνου WST-1 formazan.

#### ν) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) των ερυθροκυττάρων

Σε 500μL απομονωθέντων με φυγοκέντρηση ερυθρών αιμοσφαιρίων προστέθηκε 1ml οσμωτικά υπότονο διάλυμα NaCl 0,45% σε δις απεσταγμένο ύδωρ. Το νέο διάλυμα τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα δύο φορές για διάστημα 1min και φυγοκεντρήθηκε στις 3500rpm για 30min προκειμένου να επέλθει ρήξη των ερυθροκυττάρων και ομογενοποίηση του διαλύματος. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε σωληνάρια Eppendorf. Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης μετρήθηκε έμμεσα, χρησιμοποιώντας μια φασματοφωτομετρική μέθοδο η οποία βασίζεται στην οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH), παρουσία οργανικών υπεροξειδίων (R-OOH), σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) καταλύομενη από την υπεροξειδάση (GPx). Η αντίδραση αυτή είναι συζευγμένη με την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης προς γλουταθειόνη και

NADPH παρουσία της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), όπως φαίνεται στο κάτωθι [Σχήμα 24] :

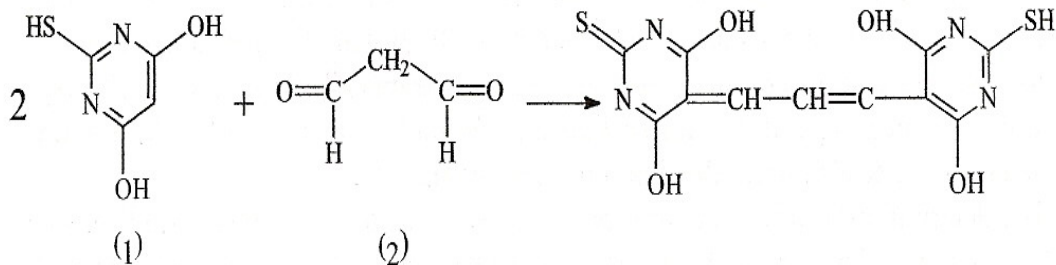
Η μείωση της απορρόφησης του NADPH, μετρημένη στα  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , εξαιτίας της οξείδωσής του προς  $\text{NADP}^+$ , αποτελεί μέτρο της **ενεργότητας** της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης μια και αυτή αποτελεί τον παράγοντα ρύθμισης της ταχύτητας των ανωτέρω συζευγμένων αντιδράσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους  $25^\circ \text{ C}$  και σε  $\text{pH}=8$  και εκκινείται με την προσθήκη του οργανικού υπεροξειδίου. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μονάδες (U) της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης ανά gr αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (U/gr Hb).



[Σχήμα 24] Αντιδράσεις ανακύκλωσης της γλουταθειόνης.

### vi) Μέτρηση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης στα ούρα

Η παραγωγή υπεροξειδίων λιπιδίων στα ούρα μετρήθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), με την χρήση μαλονικής διαλδεύδης (MDA) ως βιολογικού δείκτη της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (Yu and Sinnhuber, 1957). Η μαλονική διαλδεύδη που εμπεριέχεται στα ούρα αντιδρά με το TBA σχηματίζοντας σύμπλοκο TBA – MDA, το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος  $\lambda=532\text{nm}$  [Σχήμα25].



[Σχήμα 25] Αντίδραση του TBA (1) με το MDA (2) προς σχηματισμό του συμπλόκου TBA – MDA.

Το διάλυμα TBA παρασκευάστηκε διαλύοντας 0,375 gr TBA και 15gr TCA σε 100ml HCl 0,25N. Αρχικά, 100μL ούρων διαλελυμένα σε δις απεσταγμένο ύδωρ με αναλογία 1:1, αναμείχθηκαν με 900μL διαλύματος TBA σε κεκαθαμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθησε επώαση στους 95° C για 1 ώρα. Η χημική αντίδραση διακόπηκε με εμβύθιση των σωλήνων σε πάγο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μετρήθηκε φωτομετρικά η απορρόφησή του σε μήκος κύματος  $\lambda=532\text{nm}$  προκειμένου να υπολογιστούν συγκριτικά οι συγκεντρώσεις των λιπιδιακών υπεροξειδίων.

**vii) Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος, ερυθροκυττάρων και ούρων**

Προκειμένου να μετρήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο του κυανού του υπεροξειδίου του χρωμίου ( $\text{CrO}_5$ ), όπως αυτή ανωτέρω περιγράφεται.

**viii) Στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  την τυπική απόκλιση (SD). Η στατιστική σημαντικότητα των δεδομένων υπολογίστηκε με την χρήση του student t-test, ενώ η ANOVA χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση διαφορών μεταξύ των ομάδων σε διάφορα χρονικά διαστήματα (SPSS version 16.0, Chicago, USA). Τιμές του  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

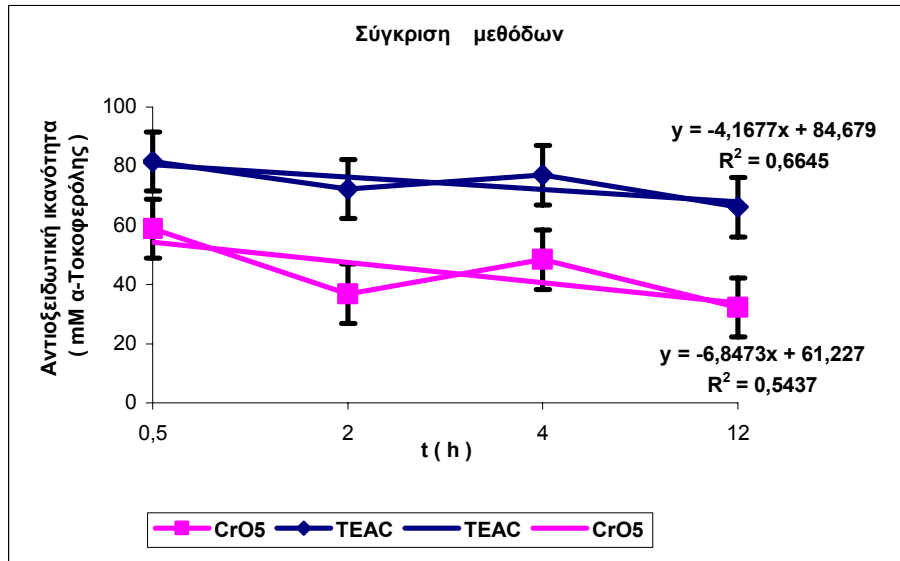


## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Α) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΕΣ

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της αντιοξειδωτικής κατάστασης του πλάσματος αίματος ασθενών με έμφραγμα μυοκαρδίου (ένα κλασσικό μοντέλο της οξειδωτικής βλάβη ισχαιμίας - επαναιμάτωσης) σε μια σειρά χρονικών σημείων μετά την εκδήλωσή του. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων, όπως απεικονίζονται στο [Σχήμα 26], παρουσιάζουν παρόμοια διακύμανση στην μετρούμενη αντιοξειδωτική κατάσταση. Αρχικά, διαπιστώνεται μια μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στις 2 ώρες από το στεφανιαίο επεισόδιο, ακολουθούμενη από μια αύξησή της στις 4 ώρες, χωρίς όμως να επανέρχεται στις αρχικές τιμές (στα 30 λεπτά μετά την εκδήλωση του επεισοδίου). Στις 12 ώρες διαπιστώνεται νέα μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα από αυτά στις 2 ώρες μετεμφραγματικά.

Κατά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, με μη-παραμετρική δοκιμασία (συσχέτιση κατά Spearman), διαπιστώθηκε ότι, μολονότι οι δύο μέθοδοι εμφάνιζαν συσχέτιση στατιστικά σημαντική ( $p=0,0001$ ), η μέθοδος Κυανού του  $\text{CrO}_5$  έχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανίχνευση πρώιμων μεταβολών της αντιοξειδωτικής κατάστασης μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου από την μέθοδο Improved TEAC (η τυπική της απόκλιση είναι 3 φορές μικρότερη στα 30 λεπτά και στις 2 ώρες) όπως φαίνεται στο [Σχήμα 27].



[Σχήμα 26] Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος εμφραγματιών με τις μεθόδους *Improved TEAC* και Κυανού  $CrO_5$  (εκφραζόμενη σε mM διαλύματος α-τοκοφερόλης) σε ποικίλα χρονικά σημεία μετεφραγματικά (στα 30 λεπτά, στις 2, 4, και 12 ώρες).

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
0,5h $CrO_5$	15	59.122	1.344719	57.54	60.65
2h $CrO_5$	15	37.244	3.191571	34.09	41.43
4h $CrO_5$	15	48.452	5.608917	41.74	53.92
12h $CrO_5$	15	33.178	5.336405	25.46	39.96
0,5h $TEAC$	15	80.544	4.344785	75.91	85.53
2h $TEAC$	15	72.222	7.907174	62.18	82.88
4h $TEAC$	15	74.678	5.025984	68.34	81.7
12h $TEAC$	15	64.882	4.169432	57.81	68.11

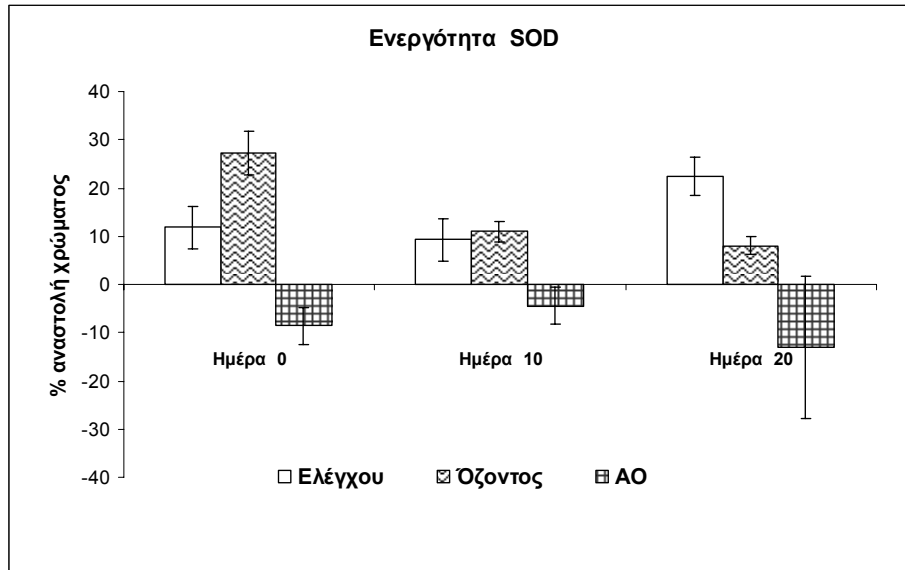
[Σχήμα 27] Συσχέτιση κατά *Spearman* των δύο μεθόδων ( $TEAC$  και  $CrO_5$ ) στα 30 λεπτά, 2,4, και 12 ώρες μετεφραγματικά. Σημειώστε την ακρίβεια της μεθόδου  $CrO_5$  στα 30 λεπτά και στις 2 ώρες.



**B) ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ W1STAR****i) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) των ερυθροκυττάρων**

Η ενεργότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) των ερυθροκυττάρων των επίμυων μετρήθηκε, εκφραζόμενη έμμεσα ως % αναστολή σχηματισμού του χρωμογόνου, συγκρινόμενη με το διάλυμα ελέγχου (blank), και στις τρεις ομάδες του πειράματος.

Όπως παρατηρούμε στο κάτωθι [*Σχήμα 28*] οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την ημέρα έναρξης του πειράματος (ημέρα 0), την 10<sup>η</sup> ημέρα (ημέρα 10), και την 20<sup>η</sup> ημέρα (ημέρα 20). Αρχικά, διαπιστώνουμε στην ομάδα ελέγχου μικρή αύξηση της ενεργότητας της δισμουτάσης μέχρι και την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από μια σταδιακή μείωσή της μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα χορήγησης όζοντος διαπιστώνουμε ότι ενώ αρχικά σημειώνεται μεγάλος βαθμός αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας της SOD (27%), την 10<sup>η</sup> ημέρα η ενεργότητα αυτή έχει μειωθεί στο 11%, και την 20<sup>η</sup> ημέρα ακόμη περισσότερο στο 8% των αρχικών τιμών. Τέλος, στην ομάδα ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης αντιοξειδωτικών διαπιστώνουμε αρνητικές τιμές ενεργότητας της SOD (- 9 % την ημέρα 0), ενώ σταδιακά οι αρνητικές τιμές ενεργότητας πλησιάζουν το 0, οπότε και σημειώνεται συγκριτικά αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου την 10<sup>η</sup> ημέρα (- 4%). Την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος διαπιστώνεται πάλι μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας (- 13%) με μεγάλες αποκλίσεις ανάμεσα στους επίμυες.

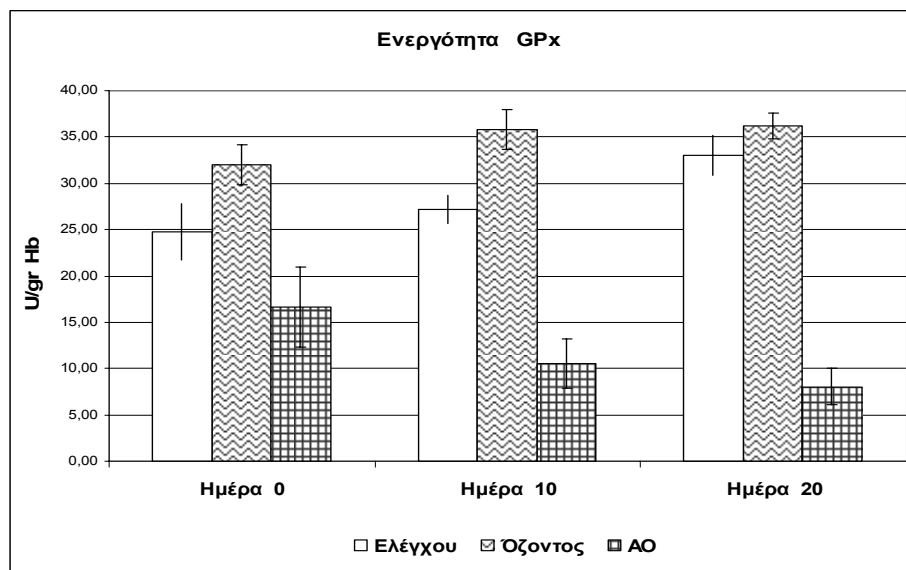


[Σχήμα 28] Μέτρηση ενεργότητας της SOD στις τρεις ομάδες του πειράματος.

## ii) Μέτρηση ενεργότητας της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GPx) των ερυθροκυττάρων

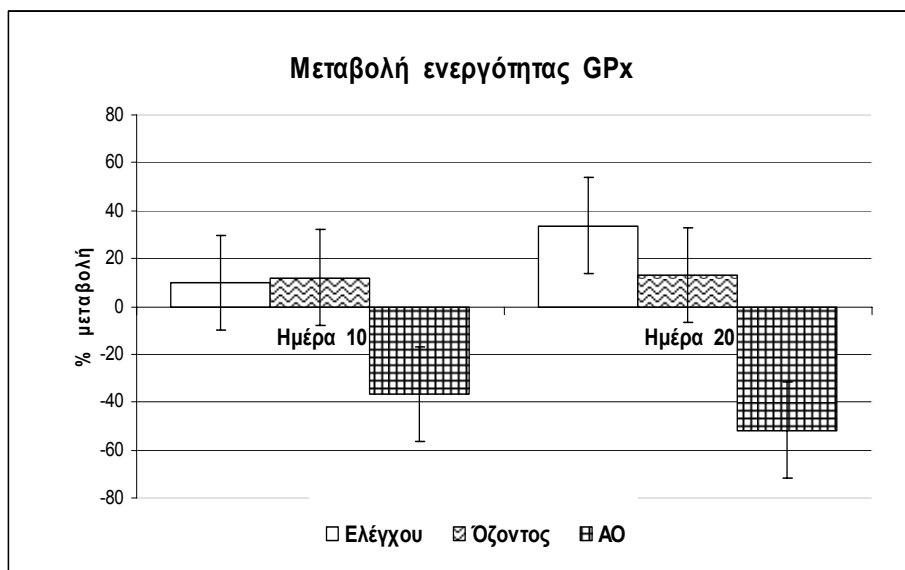
Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης, εκφραζόμενη ως μονάδες (U) της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης ανά gr αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (U/gr Hb), μετρήθηκε και στις τρεις ομάδες του πειραματικού πρωτοκόλλου. Όπως διαπιστώνουμε από το κάτωθι [Σχήμα 29], στην ομάδα ελέγχου σημειώνεται μια σταδιακή αύξηση της ενεργότητας της γλουταθειόνης μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος (από 24,74 U/gr σε 27,18 U/gr), ενώ μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη (33,04 U/gr). Στην ομάδα του όζοντος παρατηρούμε μια σημαντική αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος (από 31,99 U/gr σε 35,81 U/gr), και στην συνέχεια ακολουθεί μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα μια φάση πλατώ με πολύ μικρή αύξηση της ενεργότητας (36,15 U/gr). Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών σημειώνεται σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος

(από 16,64 U/gr σε 10,53 U/gr), ενώ σταδιακά μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα η μείωση αυτή φτάνει στις 8,03 U/gr.



[Σχήμα 29] Μέτρηση ενεργότητας της GPx στις τρεις ομάδες του πειράματος.

Οι μεταβολές αυτές απεικονίζονται ανάγλυφα στο κάτωθι [ Σχήμα 30 ]. Παρατηρούμε ότι στην ομάδα ελέγχου σημειώνεται την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου κατά 9,83% σε σχέση με την ημέρα έναρξης του πειράματος, ενώ την 20<sup>η</sup> ημέρα η αύξηση αυτή έχει φτάσει το 33,53% της αρχικής τιμής. Στην ομάδα του όζοντος σημειώνεται σημαντική αύξηση κατά 11,95% την 10<sup>η</sup> ημέρα πειράματος, ενώ μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα η αύξηση είναι ελάχιστη και αγγίζει το 13,01% της αρχικής τιμής. Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών παρατηρούμε την μεγάλη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου κατά 36,7% την 10<sup>η</sup> ημέρα πειράματος, ενώ στην συνέχεια η μείωση αυτή γίνεται περισσότερο σταδιακή αγγίζοντας το 51,76% μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος.

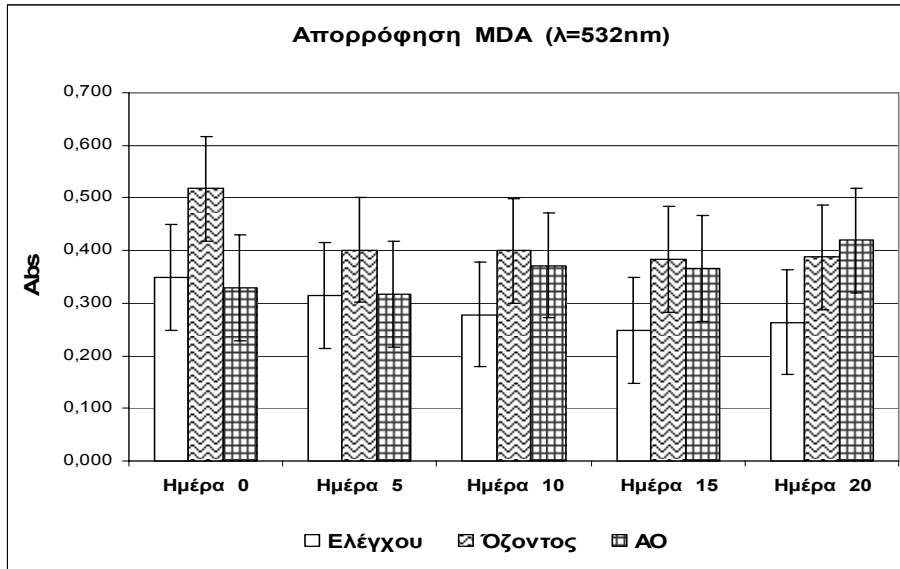


*[Σχήμα 30] Μεταβολές % της ενεργότητας της GPx σε σχέση με την ημέρα 0 του πειράματος, στις τρεις ομάδες.*

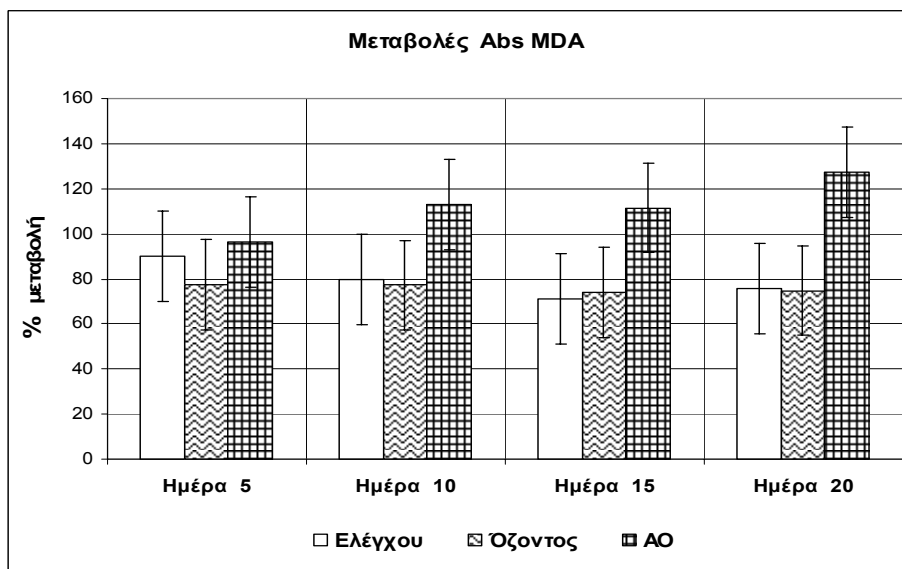
### iii) Μέτρηση λιπιδιακής υπεροξειδωσης στα ούρα 24ωρου

Χρησιμοποιώντας την φωτομετρική μέθοδο TBA μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπιδιακών υπεροξειδίων στα ούρα των επίμυων στις ημέρες 0, 5, 15 και 20 από την έναρξη του πειράματος. Όπως διαπιστώνουμε από το κάτωθι *[Σχήμα 31]* η απορρόφηση της μαλονικής διαλδεύδης (MDA), και κατ' επέκταση των προϊόντων λιπιδιακής οξειδωσης, στην ομάδα ελέγχου, εμφανίζει σταδιακή ελάττωση, κατά την εξέλιξη του πειράματος, μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα, και στην συνέχεια σταθεροποιείται σε χαμηλά επίπεδα μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα όζοντος διαπιστώνουμε μια απότομη μείωση της απορρόφησης μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος και στην συνέχεια σχεδόν σταθεροποίηση των τιμών μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών παρατηρείται μια μικρή μείωση της απορρόφησης μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από μια σχετική αύξηση μέχρι τη 10<sup>η</sup> ημέρα. Μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα οι

τιμές απορρόφησης παραμένουν σταθερές, ενώ σταδιακά αυξάνονται πάλι μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα.



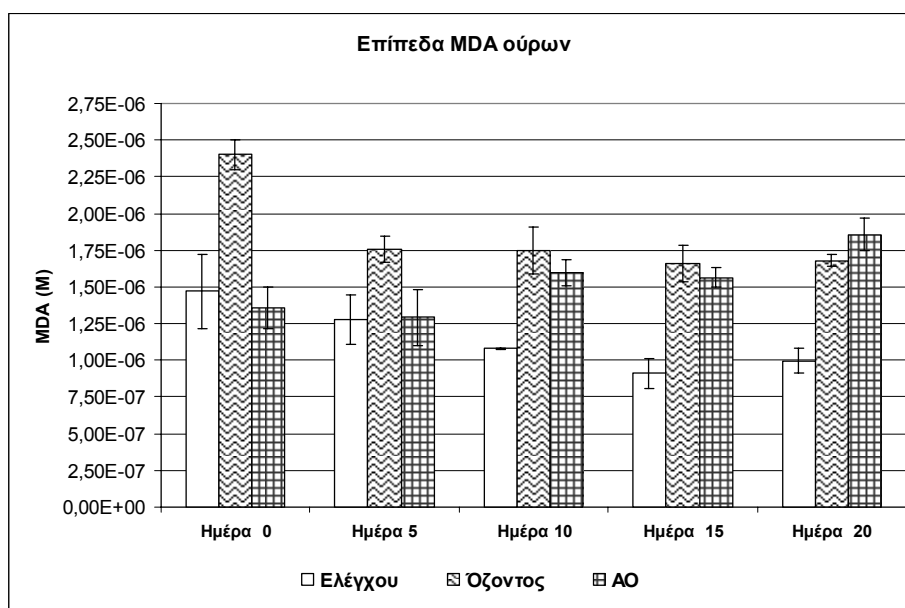
*[Σχήμα 31] Μέτρηση της απορρόφησης μαλονικής διαλδεΰδης (MDA) στα ούρα 24ωρου επίμωων.*



*[Σχήμα 32] Μεταβολές % της απορρόφησης της μαλονικής διαλδεΰδης (MDA) συγκριτικά με την ημέρα έναρξης του πειράματος.*

Οι διακυμάνσεις αυτές, εκφραζόμενες ως % μεταβολές της αρχικής τιμής απορρόφησης την ημέρα έναρξης του πειράματος (ημέρα 0), απεικονίζονται ανάγλυφα στο [Σχήμα 32].

Μεταφράζοντας τις μεταβολές αυτές απορρόφησης σε μεταβολές συγκέντρωσης μαλονικής διαλδεϋδης προκύπτει το κάτωθι [Σχήμα 33] :

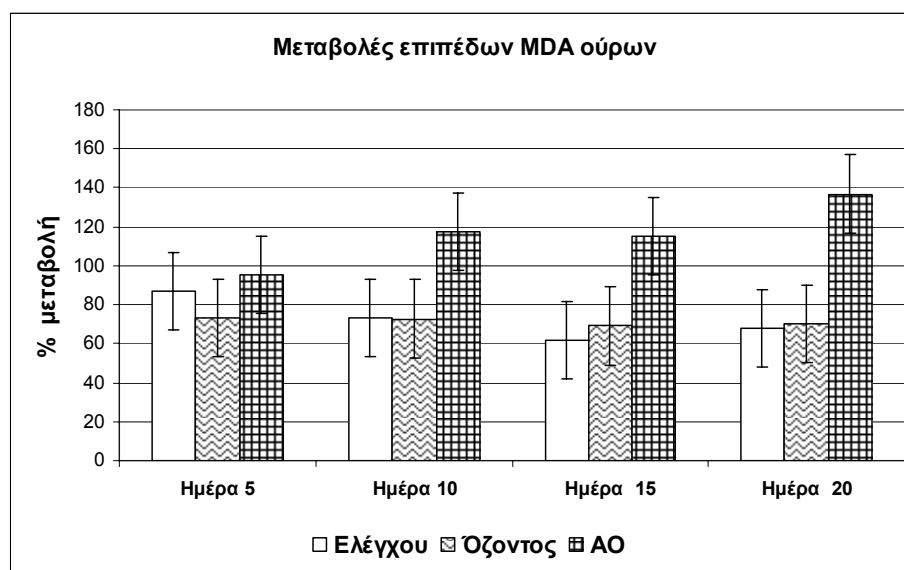


[Σχήμα 33] Μέτρηση της συγκέντρωσης μαλονικής διαλδεϋδης (MDA) στα ούρα 24ωρου επίμυων.

Όπως διαπιστώνουμε, στην ομάδα ελέγχου σημειώνεται σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης MDA ούρων μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από μέτρια αύξηση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα όζοντος σημειώνεται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης MDA ούρων μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από σταθεροποίηση των επιπέδων MDA μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα, ακολουθούμενη από ήπια αύξηση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα αντιοξειδωτικών παρατηρούμε μια ήπια μείωση της συγκέντρωσης MDA μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα, ακολουθούμενη από μια σημαντική αύξησή

της την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται σχετική σταθερότητα των επιπέδων MDA, ενώ νέα σημαντική αύξησή τους σημειώνεται την 20<sup>η</sup> ημέρα.

Οι μεταβολές αυτές, εκφραζόμενες ως % μεταβολές της αρχικής τιμής συγκέντρωσης MDA των ούρων την ημέρα έναρξης του πειράματος (ημέρα 0), απεικονίζονται ανάγλυφα στο κάτωθι [Σχήμα 34]:



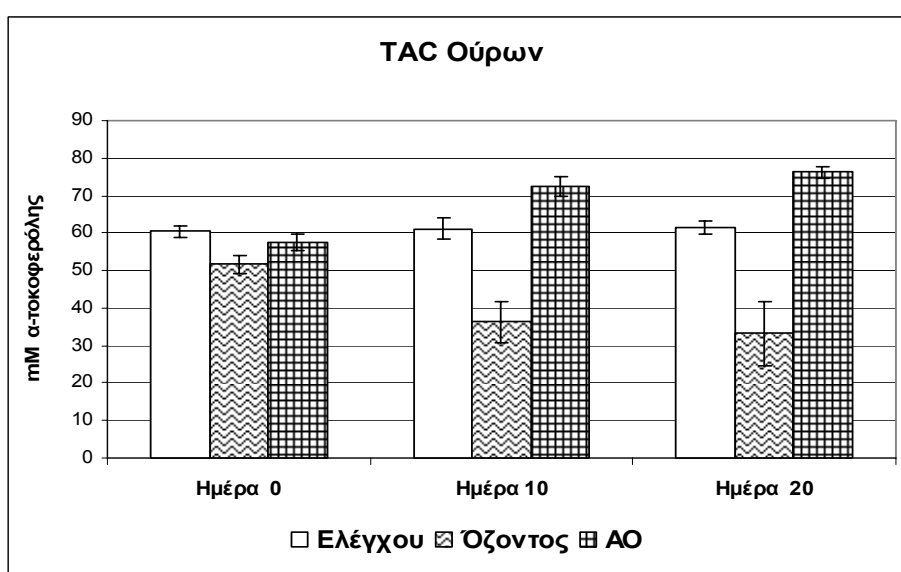
[Σχήμα 34] Μεταβολές % της συγκέντρωσης της μαλονικής διαλδεϋδης (MDA) ούρων 24ωρου συγκριτικά με την ημέρα έναρξης του πειράματος.

#### iv) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος, ερυθροκυττάρων και ούρων

Προκειμένου να μετρήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων των επίμυων και των τριών ομάδων του πειράματος χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο του κυανού του υπεροξειδίου του χρωμίου

(CrO<sub>5</sub>). Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος μετρήθηκε ως mM διαλύματος α-τοκοφερόλης.

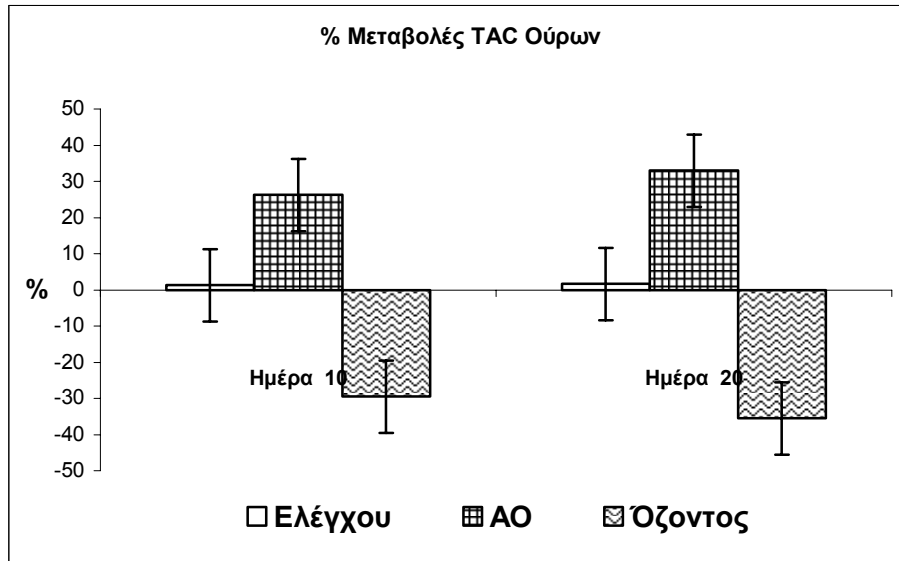
Στις μετρήσεις της TAC στα ούρα των επίμυων, όπως παρατηρούμε στο κάτωθι [Σχήμα 35], διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα ελέγχου η αντιοξειδωτική ικανότητα παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος παρουσιάζοντας ελάχιστες διακυμάνσεις. Στην ομάδα όζοντος σημειώθηκε σημαντική μείωση της



[Σχήμα 35] Μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα ούρα επίμυων.

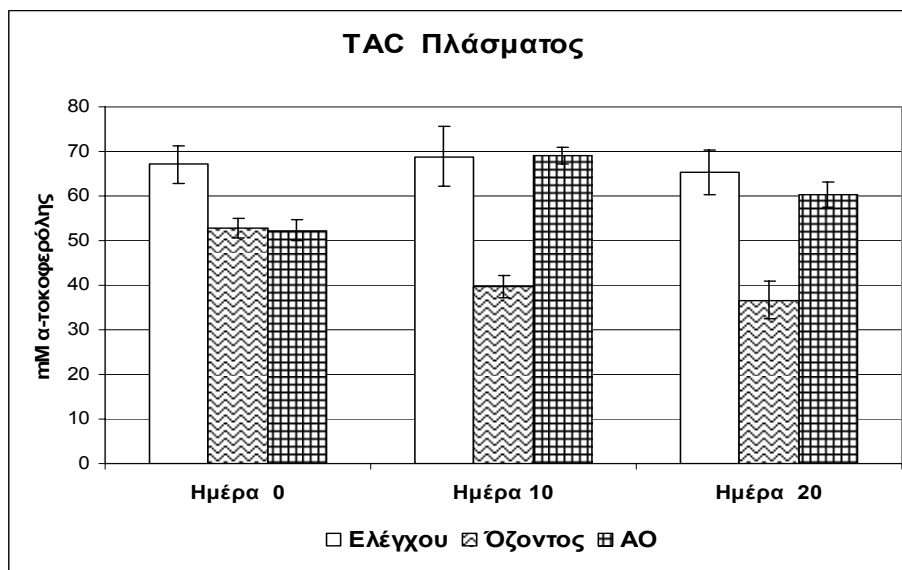
αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα αυτή παρέμεινε σταθερή σε χαμηλά επίπεδα. Την 15<sup>η</sup> ημέρα όμως διαπιστώθηκε σημαντική αύξησή της (σχεδόν στα επίπεδα τιμών κατά την έναρξη των μετρήσεων), για να ακολουθήσει νέα σημαντική μείωσή της κατά την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων. Αντίθετα, στην ομάδα αντιοξειδωτικών σημειώθηκε μια ήπια αλλά σταθερή αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων ακολουθούμενη από μια φάση πλατώ μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα και ήπια αύξηση την 20<sup>η</sup> ημέρα.





[Σχήμα 36] Μεταβολές % των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ούρων συγκριτικά με την ημέρα έναρξης του πειράματος.

Οι μεταβολές αυτές, εκφραζόμενες ως % μεταβολές αρχικής τιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ούρων από την ημέρα έναρξης του πειράματος, απεικονίζονται ανάγλυφα στο άνωθεν [Σχήμα 36].

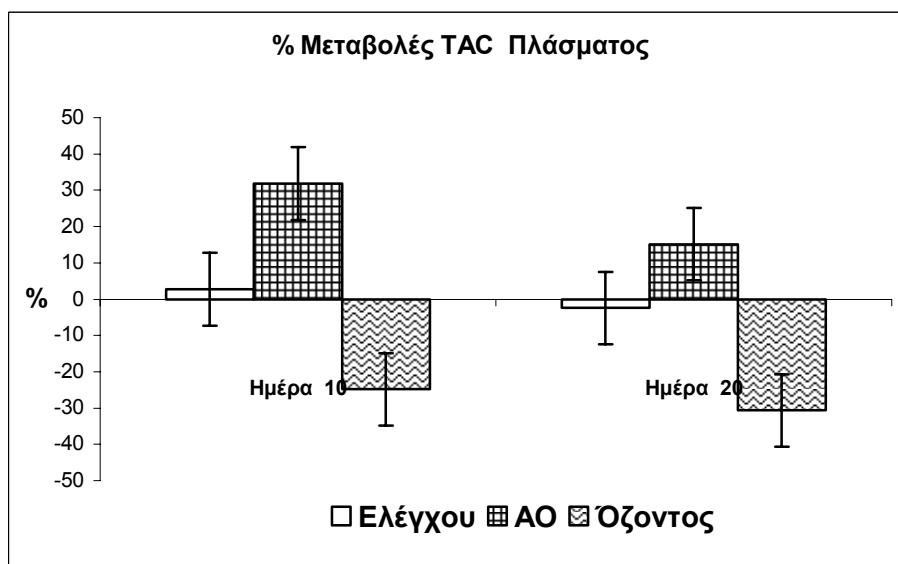


[Σχήμα 37] Μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα αίματος επίμων.

Στις μετρήσεις της TAC στο πλάσμα αίματος των επίμυων, όπως παρατηρούμε στο [Σχήμα 37], διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα ελέγχου σημειώνεται μια ήπια αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος ακολουθούμενη από επάνοδο στις αρχικές τιμές μέχρι 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος.

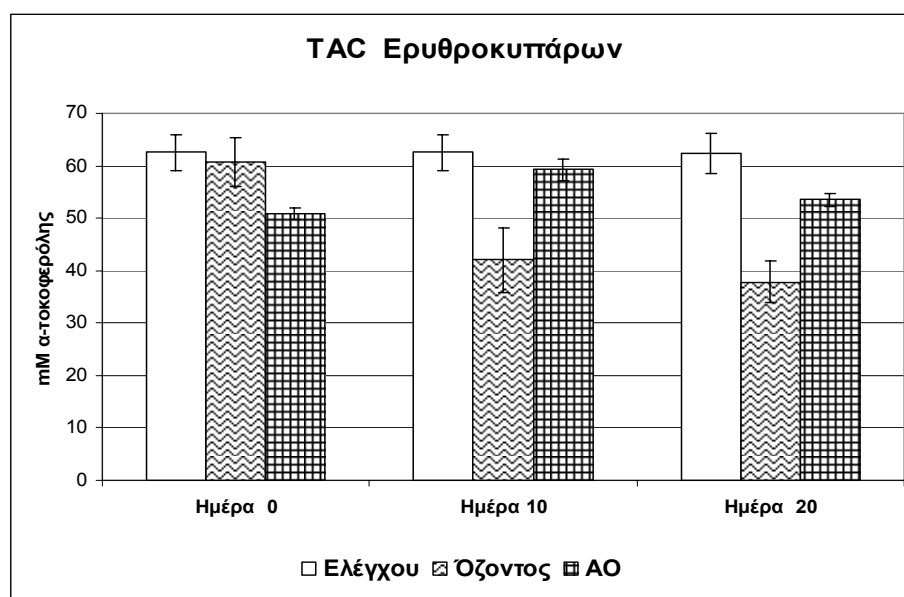
Στην ομάδα του όζοντος διαπιστώνουμε μια σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων, ακολουθούμενη από μια ήπια περαιτέρω μείωση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών σημειώθηκε σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων, ακολουθούμενη από μια ήπια μείωση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα, χωρίς όμως να προσεγγίζει τα επίπεδα κατά την έναρξη του πειράματος.

Οι μεταβολές αυτές, εκφραζόμενες ως % μεταβολές της αρχικής τιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος την ημέρα έναρξης του πειράματος (ημέρα 0), απεικονίζονται ανάγλυφα στο κάτωθι [Σχήμα 38]:



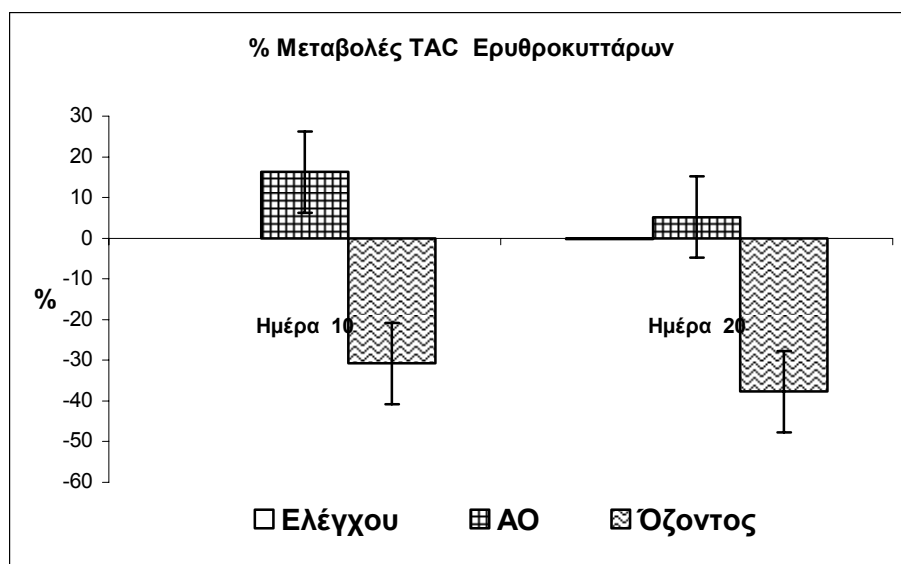
[Σχήμα 38] Μεταβολές % των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος αίματος επίμυων συγκριτικά με την ημέρα έναρξης του πειράματος.

Στις μετρήσεις της TAC στα αιμολυθέντα ερυθροκύτταρα των επίμυων, όπως παρατηρούμε στο κάτωθι [Σχήμα 39], διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα ελέγχου η αντιοξειδωτική ικανότητα παραμένει ουσιαστικά σταθερή καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων παρουσιάζοντας ελάχιστες διακυμάνσεις. Στην ομάδα όζοντος σημειώνεται μια μεγάλη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από περαιτέρω μείωση (μικρότερου βαθμού) μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών σημειώνεται ήπια αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, ακολουθούμενη από αντίστοιχη μείωση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα (δίχως όμως να επανέρχεται στα επίπεδα κατά την έναρξη του πειράματος).



[Σχήμα 39] Μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα ερυθροκύτταρα των τριών ομάδων επίμυων.

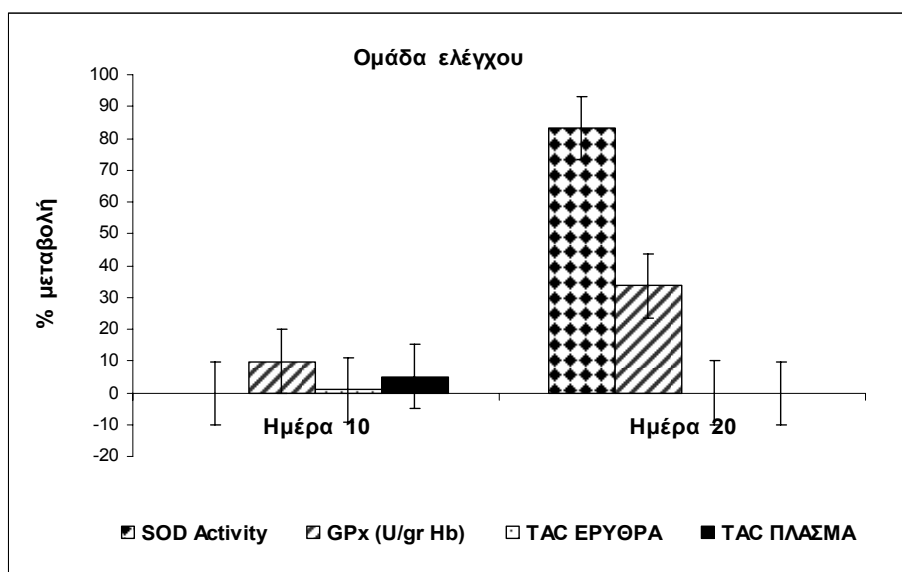
Οι μεταβολές αυτές, εκφραζόμενες ως % μεταβολές της αρχικής τιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ερυθροκυττάρων την ημέρα έναρξης του πειράματος (ημέρα 0), απεικονίζονται ανάγλυφα στο κάτωθι [Σχήμα 40]:



[Σχήμα 40] Μεταβολές % των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ερυθροκυττάρων επίμυων συγκριτικά με την ημέρα έναρξης του πειράματος.

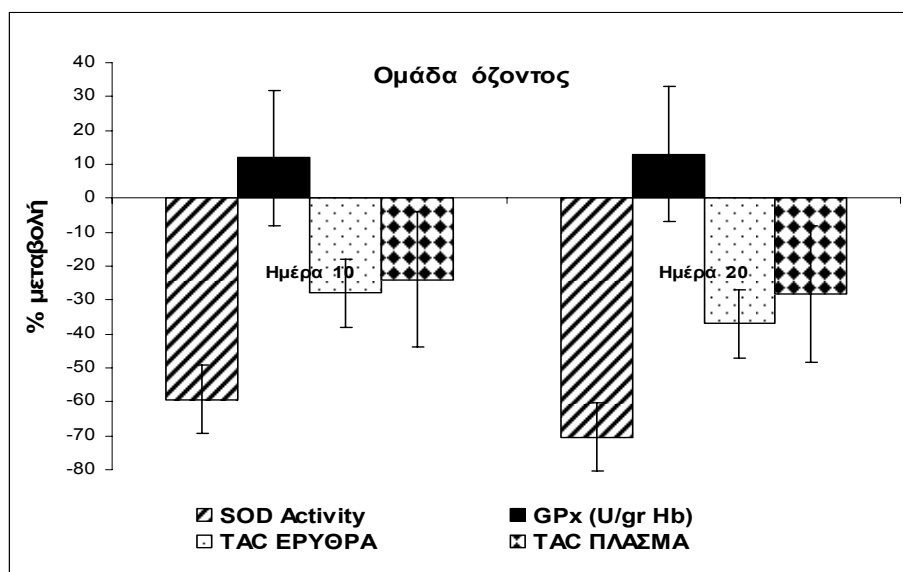
#### ν) Συγκριτικές μετρήσεις

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων της ενεργότητας των ενζύμων SOD και GPx με τις τιμές της MDA ούρων 24ωρου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των αιμολυμένων ερυθρών (ενδοκυττάριο περιβάλλον), του πλάσματος αίματος (εξωκυττάριο περιβάλλον) και των ούρων 24ωρου στις τρεις ομάδες του πειραματικού πρωτοκόλλου προκύπτουν τα κάτωθι Σχήματα 41α – 42γ :



**[Σχήμα 41a]** Μεταβολές % των τιμών ενεργότητας SOD, GPx και αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών και πλάσματος στην ομάδα ελέγχου.

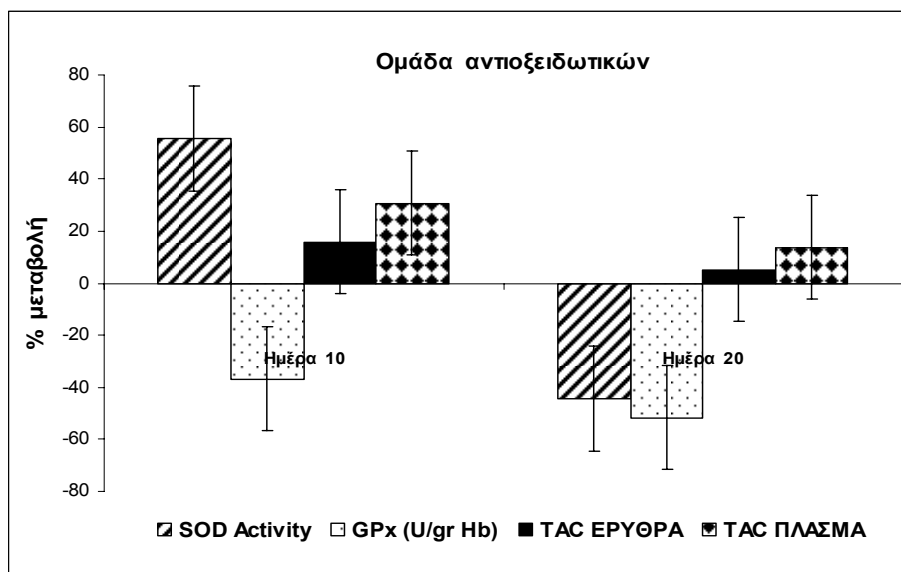
Ειδικότερα, στην ομάδα ελέγχου **[Σχήμα 41a]** διαπιστώνουμε ότι η ενεργότητα της SOD ενώ παραμένει σχεδόν αμετάβλητη μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος εμφανίζει μια ραγδαία αύξηση κατά 83% μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην περίπτωση της ενεργότητας της GPx παρατηρούμε μια ήπια αύξηση 10% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και περαιτέρω αύξηση κατά 33% την 20<sup>η</sup> ημέρα, σε σχέση με τις αρχικές τιμές της κατά την έναρξη του πειράματος. Η TAC των αιμολυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώ εμφανίζει μια ελάχιστη αύξηση της τάξης του 0,9% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων εντούτοις επιστρέφει στα αρχικά επίπεδα μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Η TAC του πλάσματος αίματος σημειώνει αύξηση 5% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, για να επιστρέψει στα αρχικά επίπεδα μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος.



**[Σχήμα 41β]** Μεταβολές % των τιμών ενεργότητας SOD, GPx και αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών και πλάσματος στην ομάδα όζοντος.

Στην ομάδα χορήγησης όζοντος **[Σχήμα 41β]** διαπιστώνουμε ότι η ενεργότητα της SOD εμφανίζεται μειωμένη κατά 60% την 10<sup>η</sup> ημέρα και κατά 70% την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων, ενώ στην περίπτωση της GPx αυτή αυξάνεται κατά 11% την 10<sup>η</sup> ημέρα και κατά 13% την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων. Η TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζει σημαντική πτώση κατά 27% την 10<sup>η</sup> ημέρα και κατά 36% την 20<sup>η</sup> ημέρα, ενώ η TAC του πλάσματος μειώνεται κατά 24% την 10<sup>η</sup> ημέρα και κατά 28% την 20<sup>η</sup> ημέρα.

Στην ομάδα χορήγησης αντιοξειδωτικών **[Σχήμα 41γ]** διαπιστώνουμε ότι η ενεργότητα της SOD εμφανίζεται ενώ αυξάνεται κατά 55% την μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων, στην συνέχεια μειώνεται κατά 44% μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα, σε σχέση με τις αρχικές τιμές της. Στην περίπτωση της GPx σημειώνεται σταδιακή μείωση από

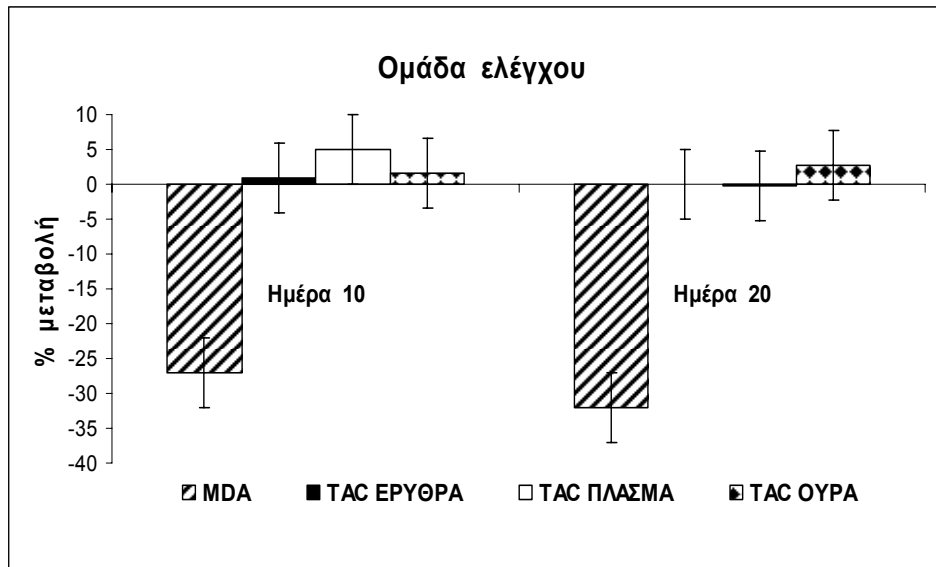


**[Σχήμα 41γ]** Μεταβολές % των τιμών ενεργότητας SOD, GPx και αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών και πλάσματος στην ομάδα αντιοξειδωτικών.

τις αρχικές τιμές κατά 36% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα και κατά 51% μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων. Η TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων σημειώνει αρχικά σημαντική αύξηση κατά 15% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια η αύξηση αυτή περιορίζεται μειώνεται στο 5% των αρχικών τιμών της μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Η TAC του πλάσματος μεταβάλλεται με παρόμοιο τρόπο, αυξανόμενη σημαντικά κατά 30% μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια η αύξηση περιορίζεται στο 13% των αρχικών τιμών της μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος.

Η σύγκριση των μεταβολών των επιπέδων MDA ούρων με αυτές των τιμών TAC των διαφόρων διαμερισμάτων του οργανισμού (ερυθρά αιμοσφαίρια, πλάσμα αίματος και ούρα) στην ομάδα ελέγχου απεικονίζεται στο **[Σχήμα 42α]**. Τα επίπεδα MDA σημειώνουν σημαντική μείωση κατά 27% μέχρι την 10η ημέρα και κατά 32% μέχρι την 20η ημέρα των μετρήσεων. Η TAC των ούρων 24ωρου σημειώνει ελάχιστη αύξηση κατά 1,7% την 10<sup>η</sup>

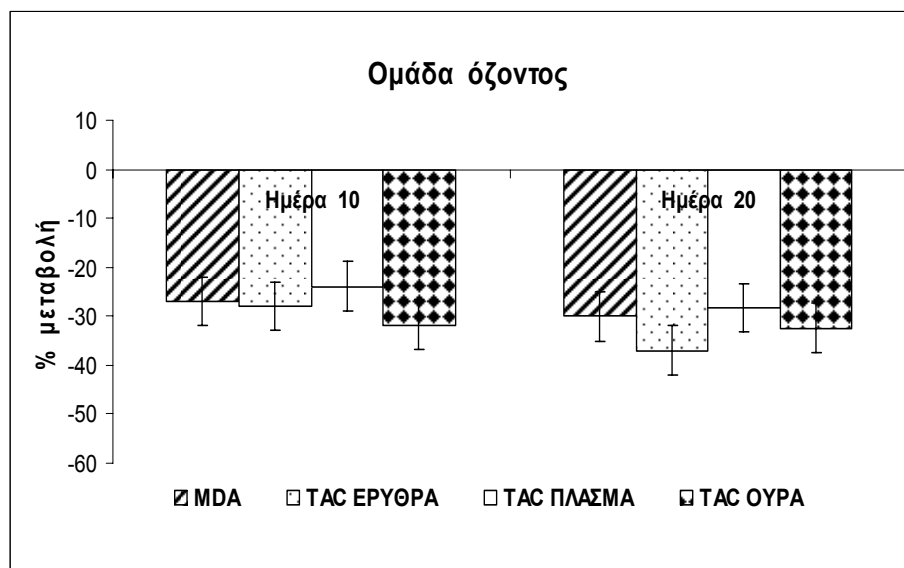
ημέρα και κατά 2,66% την 20<sup>η</sup> ημέρα δίχως να μεταβάλλεται κατά το μοτίβο της TAC του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων που περιγράφηκε παραπάνω.



*[Σχήμα 42α] Μεταβολές % των τιμών MDA ούρων 24ωρου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών, ούρων 24ωρου και πλάσματος στην ομάδα ελέγχου.*

Στην ομάδα χορήγησης του όζοντος *[Σχήμα 42β]* διαπιστώνουμε αρχικά σημαντική μείωση της MDA από τα πολύ υψηλά επίπεδά της κατά 27% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και περαιτέρω μείωση (30% των αρχικών τιμών) την 20<sup>η</sup> ημέρα. Η TAC των ούρων 24ωρου σημειώνει παρόμοια σημαντική μείωση της τάξης του 31,7% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και σταθεροποίηση της μείωσης αυτής (κατά 32,45% των αρχικών τιμών) μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Τόσο η TAC πλάσματος όσο και η TAC ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζουν παρόμοιες σημαντικές μειώσεις όπως ήδη αναφέρθηκε.



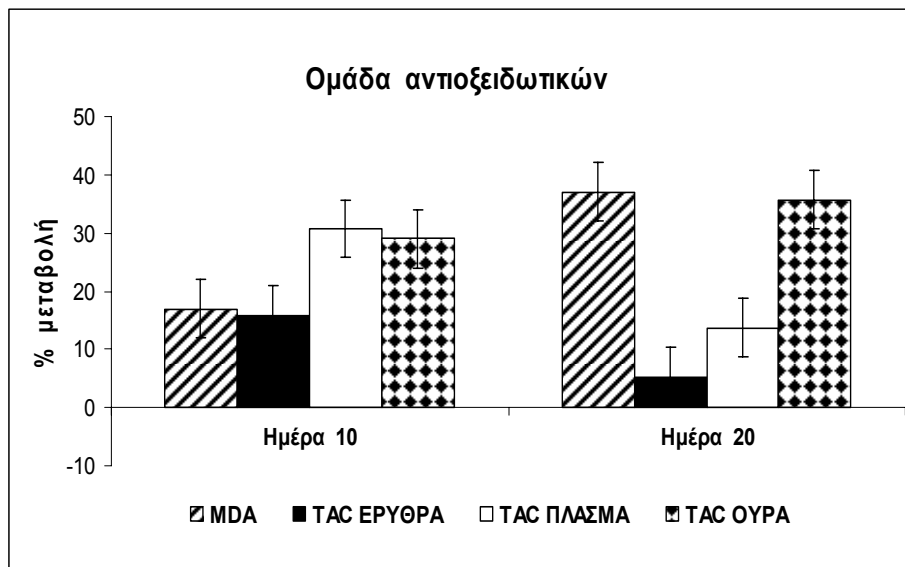


**[Σχήμα 42β]** Μεταβολές % των τιμών MDA ούρων 24ωρου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών, ούρων 24ωρου και πλάσματος στην ομάδα όζοντος.

Στην ομάδα χορήγησης των αντιοξειδωτικών **[Σχήμα 42γ]** διαπιστώνουμε αρχικά αύξηση των τιμών MDA ούρων κατά 17% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και κατά 37% την 20<sup>η</sup> ημέρα. Η TAC των ούρων 24ωρου σημειώνει παρόμοια σημαντική αύξηση της τάξης του 28,9% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και κατά 35,6% των αρχικών τιμών μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Τόσο η TAC πλάσματος όσο και η TAC ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζουν αρχικά σημαντική αύξηση των τιμών τους μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων και στην συνέχεια σταθεροποιούνται σε χαμηλότερες τιμές μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα, όπως έχουμε ήδη αναφέρει.

Στην ομάδα χορήγησης των αντιοξειδωτικών **[Σχήμα 42γ]** διαπιστώνουμε αρχικά αύξηση των τιμών MDA ούρων κατά 17% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και κατά 37% την 20<sup>η</sup> ημέρα. Η TAC των ούρων 24ωρου σημειώνει παρόμοια σημαντική αύξηση της τάξης του 28,9% την 10<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων και κατά 35,6% των αρχικών τιμών μέχρι

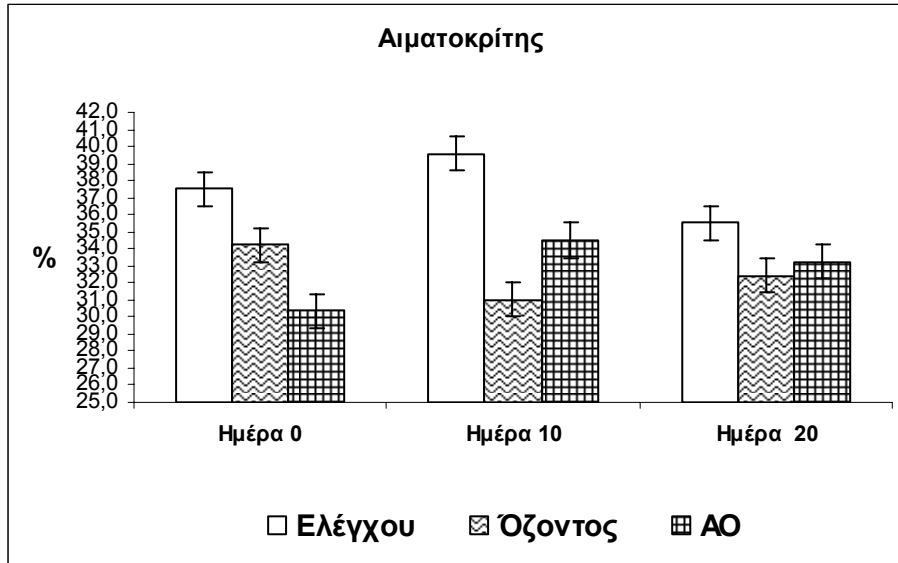
την 20<sup>η</sup> ημέρα. Τόσο η TAC πλάσματος όσο και η TAC ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζουν αρχικά σημαντική αύξηση των τιμών τους μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων και στην συνέχεια σταθεροποιούνται σε χαμηλότερες τιμές μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα, όπως έχουμε ήδη αναφέρει.



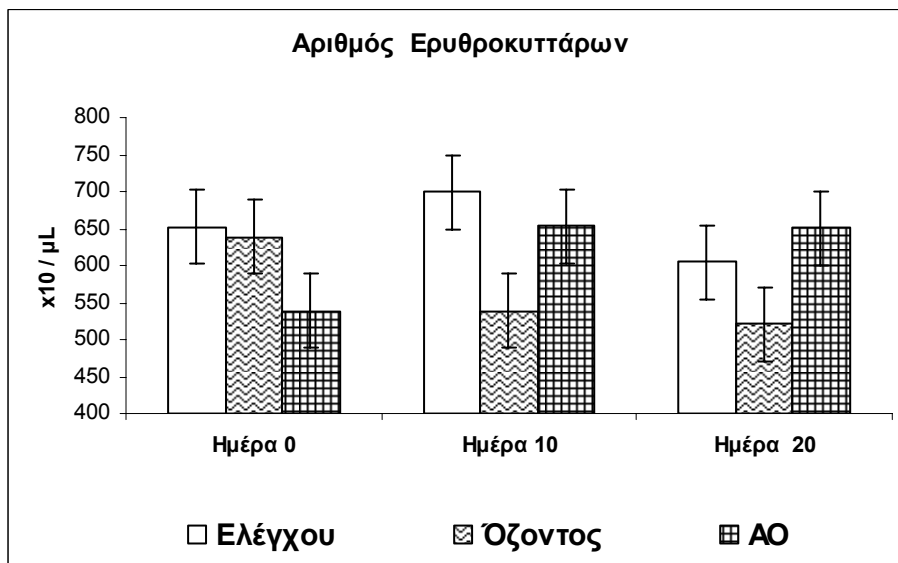
*[Σχήμα 42γ] Μεταβολές % των τιμών MDA ούρων 24ωρου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ερυθρών, ούρων 24ωρου και πλάσματος στην ομάδα αντιοξειδωτικών.*

#### vi) Μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων

Στις τρεις ομάδες των επίμων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του αιματοκρίτη και του αριθμού ερυθροκυττάρων με την έναρξη των μετρήσεων (ημέρα 0), την 10<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων, όπως φαίνεται στο [Σχήμα 43] και [Σχήμα 44] αντίστοιχα:



*[Σχήμα 43] Μέτρηση τιμών αιματοκρίτη των τριών ομάδων επίμων.*



*[Σχήμα 44] Μέτρηση αριθμού ερυθροκυττάρων των τριών ομάδων επίμων.*

Από τα παραπάνω σχήματα διαπιστώνουμε ότι τόσο ο αιματοκρίτης των επίμων της ομάδας ελέγχου, όσο και ο αριθμός ερυθροκυττάρων, σημείωσε μια ήπια αύξηση μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, ακολουθούμενη από μια σημαντική μείωση (σε τιμές χαμηλότερες από αυτές κατά την έναρξη των μετρήσεων) μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Στην ομάδα όζοντος

σημειώθηκε μεγάλη μείωση του αιματοκρίτη μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, ακολουθούμενη από μια ήπια αύξησή του (αλλά σε τιμές χαμηλότερες από αυτές κατά την έναρξη των μετρήσεων) μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα. Όμως, ενώ ο αριθμός ερυθροκυττάρων παρουσίασε παρόμοια μείωση μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, στην 20<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων διαπιστώθηκε νέα περαιτέρω ελαφρά μείωση. Στην ομάδα αντιοξειδωτικών μετρήθηκε μεγάλη αύξηση του αιματοκρίτη και του αριθμού ερυθροκυττάρων μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, ακολουθούμενη από μια ήπια μείωση (αλλά σε τιμές υψηλότερες από αυτές κατά την έναρξη των μετρήσεων) μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα.

#### vii) Μέτρηση μεταβολικών και διατροφικών παραμέτρων

Καθημερινά κατά την διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων και στις τρεις ομάδες επίμυων καταγράφονταν το σωματικό βάρος, η κατανάλωση ύδατος και τροφής, το βάρος των κοπράνων και των ούρων, η θερμοκρασία των μεταβολικών κλωβών και του περιβάλλοντος, η υγρασία και η εξάτμιση ύδατος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών απεικονίζονται στα κάτωθι [Σχήματα 45 - 54]:

<b>Σωματικό Βάρος (gr)</b>	<b>Ημέρα 0</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
<i>Ομάδα ελέγχου</i>	199 ± 12	193 ± 15	196 ± 10
<i>Ομάδα όζοντος</i>	179 ± 7	182 ± 6	187 ± 7
<i>Ομάδα αντιοξειδωτικών</i>	195 ± 12	198 ± 9	199 ± 11

[Σχήμα 45] Μεταβολές σωματικού βάρους των επίμυων (μέσος όρος ± SD).

<b>Κατανάλωση Τροφής (gr)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	8.57 ± 1.29	10.51 ± 0.90
Ομάδα όζοντος	11.07 ± 1.36	12.38 ± 0.53
Ομάδα αντιοξειδωτικών	12.61 ± 1.22	13.59 ± 0.75

[Σχήμα 46] Μεταβολές στην κατανάλωση τροφής των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Κατανάλωση Ύδατος (ml)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	18.38 ± 2.13	22.38 ± 5.04
Ομάδα όζοντος	20.00 ± 2.20	21.25 ± 2.82
Ομάδα αντιοξειδωτικών	18.25 ± 1.75	19.88 ± 1.64

[Σχήμα 47] Μεταβολές στην κατανάλωση ύδατος των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Αποβολή ούρων (gr)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	4.48 ± 1.04	9.44 ± 3.92
Ομάδα όζοντος	6.97 ± 2.24	6.73 ± 2.16
Ομάδα αντιοξειδωτικών	5.81 ± 1.17	5.63 ± 0.70

[Σχήμα 48] Μεταβολές στην αποβολή ούρων των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Αποβολή κοπράνων (gr)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	1.77 ± 0.27	2.27 ± 0.47
Ομάδα όζοντος	2.56 ± 0.30	2.97 ± 0.29
Ομάδα αντιοξειδωτικών	2.66 ± 0.26	3.00 ± 0.23

[Σχήμα 49] Μεταβολές στην αποβολή κοπράνων των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Ισοζύγιο Ύδατος (ml)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	14.08 ± 1.87	12.76 ± 1.94
Ομάδα όζοντος	13.05 ± 1.60	14.52 ± 1.01
Ομάδα αντιοξειδωτικών	12.43 ± 1.36	14.36 ± 1.41

**[Σχήμα 50]** Μεταβολές στο ισοζύγιο ύδατος των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Θερμοκρασία περιβάλλοντος (°C)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	26.3 ± 0.81	25.3 ± 1.39
Ομάδα όζοντος	23.9 ± 1.93	26.3 ± 0.84
Ομάδα αντιοξειδωτικών	22.4 ± 1.21	23.0 ± 0.65

**[Σχήμα 51]** Μεταβολές στην θερμοκρασία περιβάλλοντος των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Θερμοκρασία μεταβολικών κλωβών (°C)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	27.2 ± 0.80	26.2 ± 0.75
Ομάδα όζοντος	25.6 ± 1.59	27.6 ± 0.83
Ομάδα αντιοξειδωτικών	23.6 ± 1.40	24.2 ± 0.63

**[Σχήμα 52]** Μεταβολές στην θερμοκρασία μεταβολικών κλωβών των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<b>Υγρασία περιβάλλοντος (%)</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 20</b>
Ομάδα ελέγχου	49 ± 11.88	58 ± 9.04
Ομάδα όζοντος	79 ± 14.47	81.8 ± 10.84
Ομάδα αντιοξειδωτικών	81.2 ± 12.61	76.7 ± 10.51

**[Σχήμα 53]** Μεταβολές στην υγρασία περιβάλλοντος των επίμνων (μέσος όρος ± SD).

<i>Εξάτμιση Ύδατος (ml)</i>	<i>Ημέρα 10</i>	<i>Ημέρα 20</i>
<i>Ομάδα ελέγχου</i>	$1.3 \pm 0.39$	$1.1 \pm 0.16$
<i>Ομάδα όζοντος</i>	$1.0 \pm 0.04$	$1.0 \pm 0.17$
<i>Ομάδα αντιοξειδωτικών</i>	$1.0 \pm 0.11$	$1.0 \pm 0.03$

*[Σχήμα 54] Μεταβολές στην εξάτμιση ύδατος (μέσος όρος  $\pm$  SD).*





## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Το παρόν πόνημα διαπραγματεύεται την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιολογικών δειγμάτων με την εισαγωγή μιας νέα και σχετικά απλής φασματοφωτομετρικής μεθόδου του «Κυανού του CrO<sub>5</sub><sup>®</sup>». Η μέθοδος βασίζεται στον σχηματισμό CrO<sub>5</sub> από το διχρωμικό αμμώνιο σε όξινο περιβάλλον με την παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*αντίδραση 1*), όπως αυτό ανιχνεύεται σε φάσματα EPR [*Σχήματα 8α&β*]. Το CrO<sub>5</sub>, ένα βαθύ κυανό οξειδωτικό σώμα, ανάγεται παρουσία αντιοξειδωτικών και ανιχνεύεται εύκολα φασματοφωτομετρικά [*Σχήματα 1α&β*].

Οι υπάρχουσες μέθοδοι είναι σε θέση να ανιχνεύσουν ένα συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό κάθε φορά, αλλά είναι ανίκανες να ανιχνεύσουν τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις και την συνέργειά τους. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αποτελεί τη συνολική ποσότητα των ελευθέρων ριζών που μπορούν να αδρανοποιηθούν από ένα συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό σε ένα βιολογικό δείγμα. Ένα πρότυπο αντιοξειδωτικό συγκρίνεται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός υπό εξέταση δείγματος, οπότε και προκύπτει ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του. Αυτή είναι σε γενικές γραμμές η αρχή λειτουργίας των υπαρχόντων μεθόδων. Η μέθοδος «Κυανού του CrO<sub>5</sub>» είναι σε θέση να ανιχνεύει τόσο υδατοδιαλυτά όσο και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως είναι εμφανές από την ανίχνευση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ασκορβικού και της α-τοκοφερόλης. Η ικανότητα αυτή της μεθόδου οφείλεται στον διφασικό χαρακτήρα του χημικού συστήματός της (υδατική και οργανική φάση, **Εικόνα 1α – δ**), το οποίο επιτρέπει στα υδατοδιαλυτά και στα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά να αντιδράσουν με το χρωματοπαραγωγό υπόστρωμα της μεθόδου και επομένως να ανιχνευθούν. Ακόμη, με την

ιδιότητα της αυτή, η μέθοδος μας προσομοιώνει καλύτερα τις *in vivo* συνθήκες, όπου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα συνέργειας.

Οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι σήμερα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: **1)** τις μεθόδους καταστολής, όπου μετράται η φάση καθυστέρησης είτε η καταστολή μιας αντίδρασης οξείδωσης, παρουσία ενός αντιοξειδωτικού, και **2)** τις αναγωγικές μεθόδους, οι οποίες βασίζονται στις αναγωγικές ιδιότητες των αντιοξειδωτικών, και όπου η ικανότητα ενός εξεταζόμενου δείγματος να επιφέρει την αναγωγή ενός μορίου – δείκτη αποτελεί μέτρο της περιεκτικότητας του σε αντιοξειδωτικά. Η μέθοδος μας ανήκει στις αναγωγικές μεθόδους, μια και ανιχνεύει την καταστολή σχηματισμού του  $\text{CrO}_5$  μέσω αναγωγής από αντιοξειδωτικά του εξεταζόμενου δείγματος, όπως παρατηρείται στα φάσματα EPR [**σχήματα 9α και 9β**]. Το κύριο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι το γεγονός ότι βασίζονται στον ανταγωνισμό για το οξειδωτικό σώμα μεταξύ του υποστρώματος - δείκτη και των αντιοξειδωτικών του δείγματος. Το όλο φαινόμενο είναι πολύ πιο πολύπλοκο και δευτερεύουσες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στο ήδη οξειδωμένο υπόστρωμα και στα αντιοξειδωτικά του δείγματος, γεγονός που επίσης αποτελεί μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος, αλλά επηρεάζουν την ολική απορρόφηση και τις τελικές μετρήσεις. Ακόμη, πολλά αναγωγικά σώματα με μεγάλη βιολογική αξία δεν είναι σε θέση να ανάξουν το οξειδούμενο υπόστρωμα της συγκεκριμένης μεθόδου, οπότε και δεν ανιχνεύονται από την μέθοδο αυτή. Αυτή είναι η κύρια αιτία της ανακολουθίας μεταξύ των μετρήσεων με τις διάφορες μεθόδους του ίδιου δείγματος. Τέλος, οι υπάρχουσες μέθοδοι αφορούν κυρίως υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, ενώ λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη-A, η  $\alpha$ -τοκοφερόλη κλπ, παραμένουν μη ανιχνεύσιμα. Προς την κατεύθυνση αυτή έγιναν προσπάθειες, με την εφαρμογή νέων διαλυτών, για να μετρηθούν τα λιποδιαλυτά μόρια με την μέθοδο improved – TEAC. Όμως η μέθοδος αυτή απομονώνει τις δύο φάσεις (οργανική και υδατική) όταν σε *in vivo*

συνθήκες αυτές συνυπάρχουν και αλληλεπιδρούν εμφανίζοντας συνεργιστικά φαινόμενα ως προς το επίπεδο των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών. Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, η διττή φύση της μεθόδου μας φαίνεται να υπερπηδά τα εμπόδια αυτά, αφού επιτρέπει στα αντιοξειδωτικά ενός δείγματος να αντιδράσουν με το υπόστρωμα τόσο στην υδατική όσο και στην οργανική φάση.

Η μέθοδος «Κυανού του CrO<sub>5</sub>» επιδεικνύει σχετική σταθερότητα, με την χημική αντίδραση να ολοκληρώνεται σχεδόν σε χρόνο 3 λεπτών και τις τιμές απορρόφησης να μειώνονται ελάχιστα στην διάρκεια πρόσθετου χρόνου 15 λεπτών, όπως φαίνεται στα σχήματα 4-5. Εμφανίζει ειδικότητα αφού το υπόστρωμά της (κυανό του CrO<sub>5</sub>) δεν αντιδρά με πολικούς οργανικούς διαλύτες, αλλά μόνο με αντιοξειδωτικά όπως η α-τοκοφερόλη. Ακόμη, εμφανίζει επαρκή γραμμικότητα και ευαισθησία, μια και ανιχνεύει την α-τοκοφερόλη σε συγκεντρώσεις των 10nM (όπως παρατηρούμε στα σχήματα 2-3), ενώ έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την μέθοδο Improved TEAC ( $R^2 = 0,8751$ ) αλλά με μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση χαμηλότερων συγκεντρώσεων α-τοκοφερόλης [ **Σχήμα 19**].

Κύριες παρεμβολές στην επαναληψιμότητα και στην ακρίβεια της μεθόδου μας είναι η φωτοευαισθησία του πρότυπου διαλύματος α-τοκοφερόλης και η βαθμιαία διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς ύδωρ όταν αυτό αποθηκεύεται για διάστημα μηνών. Επομένως είναι αναγκαία η παρασκευή, για κάθε σειρά μετρήσεων, νέων διαλυμάτων α-τοκοφερόλης και υπεροξειδίου του υδρογόνου από αρχικά διαλύματα, όχι παλαιότερα του ενός έτους. Ακόμη, βιολογικά δείγματα με μεγάλο πρωτεϊνικό περιεχόμενο τείνουν να σχηματίζουν μια λεπτή στιβάδα μετουσιωμένων πρωτεϊνών ανάμεσα στις δύο φάσεις του διαλύματος μέτρησης, παρακωλύοντας τις μεταξύ τους χημικές αλληλεπιδράσεις. Περαιτέρω φυγοκέντρηση των δειγμάτων αυτών επιλύει το πρόβλημα αυτό στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Δεν συνιστάται η χρήση

επαναχρησιμοποιούμενων γυάλινων κυψελίδων εξαιτίας του σχηματισμού λεπτής στιβάδας μετουσιωμένων πρωτεϊνών των δειγμάτων στα τοιχώματά τους, οπότε μεταβάλλεται η οπτική τους διαύγεια και οι μετρήσεις απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο.

Η υπεροχή της μεθόδου μας, κατά τις μετρήσεις σε εμφραγματίες, στην ανίχνευση πρώιμων μεταβολικών διαταραχών στο ισχαιμούν μυοκάρδιο είναι πολύ ελπιδοφόρα. Όμως, ο μικρός αριθμός του δείγματος των ασθενών δεν επιτρέπει την στέρεη θεμελίωση αυτή της υπεροχής και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Η μέθοδος «Κυανού του CrO<sub>5</sub>» είναι ενδεχομένως κατάλληλη και για την αξιολόγηση της οξειδωτικής ικανότητας ενός δεδομένου δείγματος, αφού το έγχρωμο μόριο-δείκτης CrO<sub>5</sub> σχηματίζεται μόνο παρουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις του. Πρώιμα πειραματικά δεδομένα φαίνεται να επιβεβαιώνουν την ικανότητα αυτή της μεθόδου μας. Στην παρούσα φάση χρησιμοποιείται ευρέως στο εργαστήριο μας για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και οξειδωτικής κατάστασης διαφόρων βιολογικών δειγμάτων με πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα και σειρά επιστημονικών δεδομένων δημοσιευθέντων και υπό δημοσίευση σε διεθνή περιοδικά. Επίσης έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας [**Εικόνα 2**].

Από τα πειραματικά δεδομένα που συλλέξαμε με την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πότε όζοντος και πότε αντιοξειδωτικού μίγματος κατεχινών σε επίμνες Wistar συνδυασμό με μετρήσεις της ενεργότητας προστατευτικών ενδοκυττάρων ενζύμων (SOD και GPx), δεικτών λιπιδιακής υπεροξειδωσης στα ούρα και υπολογισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα διάφορα ιστικά διαμερίσματα (ενδοκυττάριο, εξωκυττάριο και ούρα) προκύπτει μια σειρά συμπερασμάτων. Η ενδοπεριτοναϊκή οδός χορήγησης επιλέχθηκε διότι οι κατεχίνες όταν λαμβάνονται από του στόματος εμφανίζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα στο πλάσμα του αίματος, ενώ παραμένουν ως επί το πλείστον σε

συζευγμένη μορφή. Με την ενδοπεριτοναϊκή οδό επιτυγχάνουμε 100% βιοδιαθεσιμότητα και αποφεύγουμε την πιθανή μεταβολική εξουδετέρωση λόγω παράκαμψης του εντεροηπατικού κύκλου <sup>254,255</sup>.

Κατά τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαπιστώνουμε ότι αυτή παραμένει σχεδόν αμετάβλητη (εκτός ελαχίστων διακυμάνσεων στο πλάσμα και στα ούρα 24ωρου) στην ομάδα ελέγχου, πιθανώς αντικατοπτρίζοντας μεταβολές λόγω στρες των επίμυων κατά την παραμονή τους στους μεταβολικούς κλωβούς καθώς και διατροφικές και κλιματικές επιδράσεις στην γενικότερη κατάσταση τους οργανισμού τους. Στην ομάδα χορήγησης όζοντος διαπιστώνεται μείωση των τιμών TAC σε όλα τα ιστικά διαμερίσματα, αλλά η σημαντικότερη μείωση διαπιστώνεται ενδοκυτταρίως στα ερυθρά αιμοσφαίρια και μετά στο πλάσμα του αίματος, ενώ στα ούρα διαπιστώνεται ηπιότερη μείωση γεγονός που αντανακλά την ισχυρή δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων των νεφρών έναντι των μικρότερων ικανοτήτων των αντίστοιχων συστημάτων των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στην ομάδα χορήγησης μίγματος κατεχινών διαπιστώθηκε τις πρώτες ημέρες μετά μια σημαντική αύξηση της μετρούμενης αντιοξειδωτικής ικανότητας και στα τρία διαμερίσματα, η οποία όμως ακολουθήθηκε από μια μείωση πλησιέστερα προς τις αρχικές τιμές στην περίπτωση του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων αντανακλώντας την δραστηριοποίηση ομοιοστατικών μηχανισμών διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, ενώ στα δείγματα των ούρων όχι μόνο διατηρήθηκαν οι αυξημένες τιμές TAC αλλά σημειώθηκε περαιτέρω αύξηση των τιμών τους. Η απέκκριση της περίσσειας των χορηγούμενων αντιοξειδωτικών ουσιών στα ούρα, μέσα στο γενικότερο ομοιοστατικό πλάνο του οργανισμού αποτελεί μια πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων αυτών.

Στις μετρήσεις της **ενεργότητας** των προστατευτικών ενδοκυττάρων ενζύμων SOD και GPx διαπιστώνουμε ότι στην ομάδα ελέγχου σημειώνεται καθυστερημένη

(την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων) αλλά μεγάλη αύξηση της ενεργότητας της SOD, ενώ σταδιακή και μικρότερης κλίμακας αύξηση σημειώνεται και στην ενεργότητα της GPx. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η SOD εμφανίζει υστέρηση στην απόκρισή της στο οξειδωτικό ερέθισμα έναντι της ταχύτερης δράσης της GPx, ενώ και τα δύο ενζυμικά συστήματα συνεργάζονται άψογα διατηρώντας την TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του πλάσματος σε σταθερά επίπεδα καθόλη την διάρκεια του πειράματος.

Στην ομάδα χορήγησης όζοντος διαπιστώνουμε σημαντική μείωση της ενεργότητας της SOD ακόμη και 10 ημέρες μετά την διακοπή χορήγησής του, ενώ τα επίπεδα της GPx παραμένουν σταθερά ηπίως αυξημένα καθόλη την διάρκεια των μετρήσεων, ευρήματα συμβατά με την βιβλιογραφία <sup>256</sup>. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση της μεγάλης αυτής μείωσης της ενεργότητας της SOD με την γενικότερη μείωση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και των ερυθρών, παρά την αύξηση της ενεργότητας της GPx, γεγονός που αναδεικνύει την σπουδαιότητα της SOD – ενδοκυττάριας και εκκρινόμενης εξωκυττάρια – για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητά τους.

Στην ομάδα χορήγησης κατεχινών, η ενεργότητα του ενζύμου SOD εμφανίζει μεγάλη μείωση ήδη από την πρώτη ημέρα χορήγησης και σταδιακά η μείωση αυτή μετριάζεται την 10<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος για να μειωθεί εκ νέου την 20<sup>η</sup> ημέρα, ενώ παράλληλα η ενεργότητα της GPx σταδιακά μειώνεται από την πρώτη ημέρα χορήγησης και η μείωση αυτή συνεχίζεται και μετά την διακοπή χορήγησης των αντιοξειδωτικών (προφανώς στα πλαίσια ομοιοστατικής διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας) συμπαρασύροντας μαζί της και την αύξηση της TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και του πλάσματος. Οι αυξημένες τιμές TAC ερυθρών και πλάσματος κατά την διάρκεια χορήγησης των κατεχινών οφείλεται πιθανώς στην υψηλή βιοδιαθεσιμότητά τους λόγω

οδού χορήγησης. Με την διακοπή χορήγησής τους και εξαιτίας της προκληθείσας από αυτά μείωσης της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων σημειώνεται μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αν και σε επίπεδα υψηλότερα των αρχικών του πειράματος.

Το εύλογο ερώτημα που ανακύπτει από τις παραπάνω μετρήσεις της ενεργότητας των ενζύμων SOD και GPx είναι γιατί να σημειώνεται αύξηση των τιμών αυτών αφού τα ώριμα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος δεν διαθέτουν πυρήνα και δεν είναι σε θέση να επιτελέσουν πρωτεϊνσύνθεση de novo. Ωστόσο πρέπει να σημειώσουμε ότι οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι δεν μετρούν άμεσα την συγκέντρωση των ενζύμων αυτών **αλλά** την ενεργότητά τους, δηλαδή τον βαθμό της ενζυμικής τους δραστηριότητας, και μάλιστα με έμμεσο τρόπο. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την πιθανή παρουσία κομβικών ρυθμιστικών μηχανισμών στα ερυθροκύτταρα που είναι σε θέση να αυξομειώνουν την δραστηριότητα των ενζύμων αυτών πέρα από τις καθαυτό συγκεντρώσεις τους σε αυτά. Οι ρυθμιστικοί αυτοί μηχανισμοί θα επιδεικνύουν ευαισθησία ως προς την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ερυθροκυττάρου και θα επιτελούν λεπτή ρύθμιση του πολυπληθούς ενζυμικού φορτίου που αυτό φέρει με στόχο την επίτευξη ομοιοστασίας. Το όλο αντικείμενο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Από τις μεταβολές των επιπέδων MDA των ούρων 24ωρου και την σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες μεταβολές των τιμών TAC στην ομάδα ελέγχου των μετρήσεων διαπιστώνουμε ότι η λιπιδιακή υπεροξείδωση σταδιακά μειώνεται και παραμένει μειωμένη καθόλη την διάρκεια των μετρήσεων παράλληλα με την διατήρηση σε σχετικά σταθερά επίπεδα των τιμών αντιοξειδωτικής ικανότητας των ούρων αλλά και των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων διαμερισμάτων.

Στην ομάδα χορήγησης όζοντος σημειώνεται απότομη αύξηση των επιπέδων MDA στα ούρα με την έναρξη της χορήγησης. Σταδιακά τα επίπεδα αυτά μειώνονται

καθόλη την διάρκεια των μετρήσεων και σταθεροποιούνται σε χαμηλότερα επίπεδα την 20<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων, αλλά πάντα σε υψηλότερα επίπεδα συγκρινόμενα με αυτά της ομάδας ελέγχου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ούρων παρακολουθεί παράλληλα αυτές τις διακυμάνσεις των επιπέδων MDA σημειώνοντας παρόμοια μείωση και σταθεροποίηση των τιμών της και μετά την παύση χορήγησης όζοντος, σε αντίθεση με τις τιμές TAC του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων που συνεχίζουν την πτωτική τους πορεία και την 20<sup>η</sup> ημέρα των μετρήσεων. Η λιπιδιακή υπεροξείδωση διαφαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ούρων, μια και αυτά είναι οι κύριοι αποδέκτες των προϊόντων της.

Στην ομάδα χορήγησης κατεχινών διαπιστώνουμε μειωμένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου επίπεδα MDA ούρων κατά τις ημέρες χορήγησης των αντιοξειδωτικών, ακολουθούμενα από μεγάλη αύξηση των επιπέδων τους μετά την διακοπή της χορήγησης των αντιοξειδωτικών και την άρση της προστατευτικής τους δράσης έναντι της λιπιδιακής υπεροξείδωσης. Ωστόσο τα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας των ούρων διατηρούνται σημαντικά αυξημένα και μετά από την διακοπή χορήγησης κατεχινών σημειώνοντας μάλιστα και μικρή αύξηση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος, αναδεικνύοντας την παρεχόμενη από τις κατεχίνες παρατεταμένη προστασία και μετά από την διακοπή λήψης τους, πιθανότατα λόγω σταδιακής απέκκρισης και συγκέντρωσής τους στα ούρα. Αντίθετα, τα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας κυρίως του πλάσματος και δευτερευόντως των ερυθρών αιμοσφαιρίων εμφανίζουν σημαντική αύξηση μόνο για το χρονικό διάστημα χορήγησης των κατεχινών και ακολούθως σημειώνουν σταδιακή πτώση των τιμών τους μετά την διακοπή χορήγησης τους, αν και διατηρώντας επίπεδα υψηλότερα των αρχικών την 20<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος.

Εν κατακλείδι, η μέθοδος «Κυανού του CrO<sub>5</sub>» αποτελεί μια σχετικά απλή, σταθερή, οικονομική μέθοδο με αξιοσημείωτη ειδικότητα, γραμμικότητα και



επαναληψιμότητα. Επιπλέον, υπερτερεί έναντι των υπολοίπων φωτομετρικών μεθόδων λόγω της ικανότητας της να αξιολογεί τόσο υδατοδιαλυτά όσο και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, γεγονός που την καθιστά πολλά υποσχόμενη μελλοντικά. Από την εφαρμογή της μεθόδου τόσο στο κλασσικό μοντέλο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης όσο και στην μελέτη των επιδράσεων οξειδωτικών (όζον) και αντιοξειδωτικών σωμάτων (κατεχίνες) στην οξειδωτική κατάσταση των διαφόρων διαμερισμάτων – ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων – του οργανισμού προκύπτουν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα τα οποία συμβαδίζουν με την διεθνή βιβλιογραφία, δημιουργούν νέους τρόπους ερευνητικής προσπάθειας και προσδίδουν εγκυρότητα στην όλη μεθοδολογική προσέγγιση.





ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ

Αριθμ. **1006458**

Έχοντας υπόψη :

- α) το άρθρο 8 παρ. 11 του νόμου 1733/87 "Μεταφορά τεχνολογίας, εφευρέσεις, τεχνολογική καινοτομία και σύσταση Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας"
- β) την υπ' αρ. 15928/ΕΦΑ/1253 απόφαση του Υπουργού Βιομηχανίας, Ενέργειας και Τεχνολογίας "Κατάθεση αίτησης για χορήγηση Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας ή Πιστοποιητικού Υποδείγματος Χρησιμότητας στον Ο.Β.Ι. και τηρηση βιβλίων"
- γ) την αίτηση που κατέθεσε ο ενδιαφερόμενος στον Ο.Β.Ι. στις **15-4-2008** με αριθμό **20080100258** και την καταβολή στις **15-5-2009** του τέλους χορήγησης.

Απονέμουμε

Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας με θεωρημένα όλα τα κατά νόμον επισυναπτόμενα σχετικά έγγραφα, στους :

1. **ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗ ΠΑΥΛΟ**  
Αίνου 9-11  
621 21 ΣΕΡΡΕΣ
2. **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΓΓΕΛΟ**  
8ης Μεραρχίας 13  
454 45 ΙΩΑΝΝΙΝΑ
3. **ΒΕΛΤΣΙΣΤΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ**  
Διγενή Ακρίτα 30  
122 43 ΑΙΓΑΛΕΩ (ΑΤΤΙΚΗΣ)

ΤΙΤΛΟΣ : "ΝΕΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΑΝΟΥ ΤΟΥ  $CrO_5$ -ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΜΒΙΩΝ ΟΝΤΩΝ "

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ(ΕΣ) : 1. ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ ΠΑΥΛΟΣ 3. ΒΕΛΤΣΙΣΤΑΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ  
2. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΔΙΕΘΝΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ (INT.CL.<sup>8</sup>) : G01N 33/52.

Το Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας αυτό, ισχύει μέχρι : **16-4-2028**

Αθήνα 29/06/2009

Ο Γενικός Διευθυντής



ΣΤΡΑΦΕΙΜ ΣΤΑΣΙΝΟΣ  
Ο.Β.Ι.

ΝΟΜΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΟ ΙΔΙΩΤΙΚΟΥ ΔΙΚΑΙΟΥ ΕΠΟΠΤΕΥΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

[Εικ. 2 ] Δίπλωμα ευρεσιτεχνίας της μεθόδου « Κυανού του  $CrO_5$  »



## ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

### A) ΕΛΛΗΝΙΚΗ

**«Μελέτη της εξωκυττάριας άμυνας στο οξειδωτικό στρες - Συμβολή νέας μεθόδου μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας και οξειδωτικής κατάστασης βιολογικών υγρών ex vivo»**

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον στον τομέα των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου, καθώς και στον φυσιολογικό και παθολογικό ρόλο που αυτές διαδραματίζουν στην κυτταρική λειτουργία και κατ' επέκταση στην λειτουργία του οργανισμού. Οι μέχρι σήμερα γνώσεις μας καταδεικνύουν ότι οι ελεύθερες ρίζες δρουν φυσιολογικά ως ενδιάμεσοι μεταγωγικοί σήματος στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Σε χαμηλή ένταση σήματος προάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η μέτρια ένταση οδηγεί σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, και η υψηλή ένταση οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω ενεργοποίησης της απόπτωσης.

Ο παθολογικός ρόλος των ελευθέρων ριζών παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερο ενδιαφέρον, μια και αυτές έχουν ενοχοποιηθεί για πιθανή συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία του γήρατος αλλά και ποικίλων παθήσεων. Το οξειδωτικό στρες είναι το αποτέλεσμα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων συνθηκών οι οποίες επιφέρουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου(ROS) και αζώτου(RNS). Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούν παραπροϊόντα της εξελικτικής επιλογής του μορίου του οξυγόνου ως τελικού αποδέκτη των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσού κατά την διάρκεια της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Επίσης εξωτερικοί παράγοντες συμβάλλουν στην

παραγωγή τους (δίαιτα, συντηρητικά τροφών, τοξικοί και καρκινογόνοι παράγοντες, ραδιενέργεια, όζον, περιβαλλοντική μόλυνση, κάπνισμα, ψυχολογικό στρες κ.α.).

Το κύτταρο, προκειμένου να προστατευθεί από την χημική αυτή λαίλαπα, έχει αναπτύξει εξελικτικά μια σειρά αμυντικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ποικιλία χημικών μορίων και ενζυμικών συστημάτων. Το κύτταρο είναι πλήρως εξοπλισμένο τόσο με ενδοκυττάρια όσο και με εξωκυττάρια αντιοξειδωτικά συστήματα. Η ενδοκυττάρια άμυνα περιλαμβάνει ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης, δισμουτάση κ.α.)' αλλά και την απομόνωση ιόντων μεταπτώτικων μετάλλων (σίδηρος, χαλκός κλπ) τα οποία μπορούν να καταλύσουν τον σχηματισμό ιδιαίτερος ενεργών ελευθέρων ριζών, κυρίως μέσω δεσμευτικών πρωτεϊνών όπως τρανσφερίνη, φερριτίνη, λακτοφερίνη, σερουλοπλασμίνη και μεταλλοθειονίνες. Η εξωκυττάρια άμυνα είναι εξίσου σημαντική. Περιλαμβάνει κυρίως χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά και λιγότερα ενζυμικά συστήματα από το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Τα ενζυμικά αυτά συστήματα περιλαμβάνουν χαμηλές συγκεντρώσεις ενζύμων και μορίων όπως αλβουμίνη, χολερυθρίνη κ.α.

Η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών στην κυτταρική λειτουργία ασκείται μέσω της προκαλούμενης από αυτά οξείδωσης πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων. Τα μόρια αυτά διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην κατασκευή και εύρυθμη κυτταρική λειτουργία. Τα παραπροϊόντα αυτής της χημικής επίθεσης των ελευθέρων ριζών στα παραπάνω μόρια εμφανίζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον ως άμεσοι δείκτες της προκαλούμενης οξειδωτικής βλάβης στον οργανισμό, αλλά και ως έμμεσοι δείκτες της υπάρχουσας αντιοξειδωτικής προστασίας. Κάποια από αυτά είναι μετρήσιμα με πληθώρα βιοχημικών μεθόδων.

Στόχος της διατριβής αυτής είναι η μελέτη της συμβολής του εξωκυττάριου περιβάλλοντος στην προστασία του οργανισμού από βλαπτικές επιδράσεις, ιδιαίτερα

αναφορικά με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου στα πλαίσια του οξειδωτικού stress.

Από την μελέτη των μέχρι τώρα δεδομένων στο αντικείμενο των μεθόδων ανίχνευσης της αντιοξειδωτικής δράσης (κυρίως ποιοτικών) υπάρχει έντονος προβληματισμός για την τεχνική αδυναμία των υπαρχόντων μεθόδων να ανιχνεύσουν και πόσο μάλλον να ποσοτικοποιήσουν την αντιοξειδωτική δράση πληθώρας λιποδιαλυτών ουσιών του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, μια και οι μέθοδοι αυτές μετρούν μόνο υδατοδιαλυτές ουσίες, ενώ ανιχνεύοντας μεμονωμένα αντιοξειδωτικά σώματα δεν είναι σε θέση να απεικονίσουν τα συνεργικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των διαφόρων επιπέδων αντιοξειδωτικής προστασίας των έμβιων οργανισμών.

Στο σημείο αυτό ξεκίνησε μια προσπάθεια εισαγωγής μιας νέας μεθόδου μέτρησης της αντιοξειδωτικής προστασίας, ποιοτικά και ποσοτικά, η οποία επιτρέπει την μέτρηση του συνόλου της αντιοξειδωτικής δράσης των υδατοδιαλυτών και των λιποδιαλυτών ουσιών του εξωκυττάριου περιβάλλοντος. Η « **μέθοδος του κυανού του CrO<sub>5</sub><sup>®</sup>** » είναι κατοχυρωμένη με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και βασίζεται στην φασματο-φωτομετρική ανίχνευση της παραγωγής μιας ισχυρότατα οξειδωτικής ουσίας, του CrO<sub>5</sub>, και της κατανάλωσής του από τα αντιοξειδωτικά του δείγματος. Η ιδιαιτερότητα της μεθόδου έγκειται στην μεγάλη ευαισθησία της, καθώς και στην ιδιότητα του CrO<sub>5</sub> να σχηματίζεται στην υδατική φάση του διαλύματος και στην συνέχεια να διαλύεται στον οργανικό διαλύτη του διαλύματος, επιτρέποντας έτσι την συμμετοχή των αντιοξειδωτικών ουσιών και των δύο φάσεων του διαλύματος. Επομένως, το μετρούμενο αποτέλεσμα αντικατοπτρίζει πλήρως την συνολική αντιοξειδωτική δράση του δείγματος.

Η καινοτόμος αυτή μεθοδολογία βρήκε εφαρμογή σε ποικίλα κλασσικά μοντέλα οξειδωτικού στρες, όπως σε εμφραγματίες ασθενείς όπου διενεργήθηκαν μετρήσεις σε ποικίλα χρονικά σημεία μετεφραγματικά, αλλά και σε επίμυες Wistar όπου μετρήθηκαν οι

μεταβολές της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε συνδυασμό με ποικίλους δείκτες οξειδωτικής κατάστασης μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είτε όζοντος είτε μίγματος κατεχινών. Διαπιστώθηκε η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει πρώιμες μεταβολές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εμφραγματιών. Τα πειραματικά δεδομένα από τους επίμυες ανέδειξαν την ευελιξία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση μεταβολών της αντιοξειδωτικής κατάστασης στα διάφορα ιστικά διαμερίσματα μετά από ποικίλα χημικά ερεθίσματα (οξειδωτικά και μη), καθώς και την εγκυρότητά της καθώς τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν με την διεθνή βιβλιογραφία.

## **B) ΑΓΓΛΙΚΗ**

**“Study of the extracellular defence against oxidative stress – Contribution of a novel assay of antioxidant capacity and oxidant status in biological samples *ex vivo*”**

**Doctorate thesis – Pavlos S. Charalampidis**

In the last few years there has been fervent scientific interest in the field of free radicals and reactive oxygen and nitrogen species, particularly in their pivotal role in health and disease, in the function of cells and organisms in general. Current scientific data suggest that free radicals act normally as signal transducers in the intracellular environment. In a situation of low signal intensity they promote cellular proliferation, whereas in a situation of medium signal intensity they inhibit cellular proliferation, and high signal intensity leads to cell death through the activation of apoptosis.



In disease, the role of free radicals becomes more interesting, them having been implicated in the pathogenesis of numerable diseases and in senescence. Oxidative stress is the result of extracellular and intracellular conditions promoting the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. These complexes constitute by-products of the evolutionary selection of the oxygen molecule as the final electron receptor in the respiratory chain during the intracellular energy production. External factors also contribute to their formation (diet, food conservatives, toxic and carcinogenic agents, radiation, ozone, environmental pollution, smoking, psychological stress etc).

In order to protect itself from this chemical storm, the cell has developed during the course of evolution a series of antioxidant defences. These defences consist of a variety of molecules and antioxidant enzymes. The cell is fully equipped with intra- and extracellular antioxidant mechanisms. The intracellular defence includes enzymes (catalase, glutathione peroxidase, dismutases etc) and the sequestration of transition metal ions (iron, copper etc), which can catalyse the formation of highly reactive species, mainly via binding proteins such as transferrin, ferritin, lactoferrin, ceruloplasmin and metallothioneins. The extracellular defence is equally important. It consists mainly of low molecular weight antioxidants and has fewer enzymes than the intracellular environment. They include low concentrations of molecules such as superoxide dismutase, albumin, bilirubin etc.

The negative effect of free radicals in the normal cell function is mediated via the oxidation by them of proteins, nucleic acids and lipids. These molecules have pivotal role in the construction and harmonic cell function. The by-products of the free radical attack on these molecules are of great scientific interest as direct biomarkers of oxidative damage and as indirect biomarkers of antioxidant capacity. A significant number of them can be measured by a multitude of assays.

The aim of the present thesis is to investigate the contribution of the extracellular environment to the protection of the whole organism against the deleterious effects of free radicals through oxidative stress induction.

Current scientific data in the field of antioxidant assays (mainly qualitative) emphasise their inability to detect and quantify the antioxidant properties of a number of lipid-soluble substances in the extracellular environment, since these assays can detect only water-soluble antioxidants. By detecting single antioxidants every time, they are incapable of evaluating the synergistic effects that take place between the various components of the antioxidant defence in living organisms.

At this point started an effort to introduce a novel assay for the evaluation, qualitative and quantitative, of the antioxidant capacity of both water- and lipid- soluble antioxidants in the extracellular environment. The “Blue CrO<sub>5</sub><sup>®</sup> Assay” is a patented assay based on the spectrophotometric detection of the production of a potent oxidant, CrO<sub>5</sub>, and its degradation by the antioxidants of the measured sample. The advantage of this assay lies in its great sensitivity and the ability of CrO<sub>5</sub> formation in the aqueous phase and its dilution in the organic phase, thus permitting the interaction of antioxidants in both phases of the measured sample. The result represents the total antioxidant capacity of the sample.

This innovative assay was applied in various classic oxidative stress models, such as patients after myocardial infarction (MI), and Wistar rats after intraperitoneal administration of catechins or ozone. Shifts in the antioxidant capacity (TAC) were correlated with various biomarkers of oxidative status. The assay displayed an ability to detect acute post-MI alterations of the antioxidant capacity. Furthermore, experimental data from Wistar rats displayed the flexibility of the assay in detecting alterations in the antioxidant capacity of various tissue compartments after both oxidative and non-oxidative

chemical stimuli, and its validity since these data coincide with the relative international literature.



## ***BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

1. HearseDJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1980;10: 797-808
2. Streyer L. *Biochemistry* 3rd ed. WH Freeman New York, 1989:420-424
3. Harman D. Aging: a theory based on the free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300
4. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954;174:689-691
5. McCord JM, Fridovich I. Superoxide: an enzymic function for erythrocyte superoxide dismutase (hemocytosol). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95
7. Vesely DL. Signal transduction: activation of the guanylate cyclase-cyclic guanosine-3'-5' monophosphate system by hormones and free radicals. *Am J Med Sci*. 1997 Nov;314(5):311-23
8. Cutler RG. Antioxidants, aging and longevity. *Free Radicals in biology*, vol 6, Academic Press, New York, 1984:371-428
9. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 2008 Jan;93(1):141-7
10. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Jan;31(1):61-74

11. Tyrrell R. Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free Radic Res.* 1999 Oct;31(4):335-40
12. Tyrrell RM. Solar ultraviolet A radiation: an oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Oct;6(5):835-40
13. Haugaard N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev* 1968;48:229-235
14. Gilbert DL. *Oxygen in living processes: an inter-disciplinary approach.* Springer - Verlag, New York, 1981
15. Slater TF. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *Br J Cancer* 1987;55 (Suppl 8):5-10
16. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):75-88
17. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):113-27
18. Weil JA, Bolton JR, Wertz JE. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications.* Wiley, New York, 1994
19. Lai EK, Crossley C, Sridhar R, Misra HP, Janzen EG, McCay PB. In vivo spin trapping of free radicals generated in brain, spleen and liver during  $\gamma$ -radiation in mice. *Arch Biochem Biophys* 1986;244:156-161
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press 3rd ed, Oxford, 1999:27-34
21. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol* 1986;48:657-667
22. Liochev SI, Fridovich I. The role of  $O_2^{\cdot -}$  in the production of  $HO^{\cdot}$  in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994;16:29-33

23. Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 1989;6:53-58
24. Valavanidis A, Balomenou H, Macropoulou I, Zarodimos I. A study of the synergistic interaction of asbestos fibers with cigarette tar extracts for the generation of hydroxyl radicals in aqueous buffer solution. *Free Radic Biol Med* 1996;20:853-858
25. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987;45:1368 – 1377
26. Fridovitch I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:239-257
27. Bradley RE. Mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993;268:6995-6999
28. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10771-10776
29. Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* 1997;277:22-29
30. Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Report* 2001;6:27-36
31. Wennmalm A, Bentin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N et al. Metabolism and excretion of NO in humans. *Circul Res* 1993;73:1121-1128
32. Snyder SH. No endothelial NO. *Nature* 1995;377:196-204
33. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142
34. Lipton SA, Kim WK, Stamler JS. Neuroprotective and neuropathologic effects of nitric oxide. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. *Free radicals in brain physiology and disorders*. Academic Press New York, 1996

35. Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:120-128
36. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313:17-29
37. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH et al. Mechanisms of hypochlorite injury to target cells. *J Clin Invest* 1990;85:554-559
38. Fliss H, Menard M. HOCl-induced mobilization of zinc from metalloproteins. *Arch Biochem Biophys* 1991;287:175-178
39. Smith MA, Richey HPL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1997;17:2653-2659
40. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1250-1258
41. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:431-438
42. Spencer JPE, Wong J, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Halliwell B. Base modifications and strand breakage in isolated calf thymus DNA and DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinolinosyndnonimine. *Chem Res Toxicol* 1995;9:1152-1158
43. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effect of ONOO<sup>-</sup> induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 1996;385:63-69
44. Foote CS (ed). *Active oxygen chemistry*. Blackie, London, 1995



45. Fridovitch I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exper Biol* 1998;201:1203-1209
46. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Ind Ed Engl* 1986;25:1058-1071],[Saltman B.Oxidative stress: a radical view. *Seminars Hematol* 1989;26:249-256
47. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res.* 2005 Dec 30;592(1-2):119-37
48. Galaris D, Mantzaris M, Amorgianiotis C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *HORMONES* 2008; 7(2):114-122
49. Lindsay DG. Diet and ageing: the possible relation to reactive oxygen species. *J Nutr Health Aging.* 1999;3(2):84-91
50. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000 Nov 9;408(6809):239-47
51. Chakravarti B, Chakravarti DN. Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology.* 2007;53(3):128-39
52. Yorek MA. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res.* 2003 May;37(5):471-80
53. Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 2007 Apr 14;145(4):1233-48
54. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-67
55. Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Ariei K, Kumon Y, Hashimoto K. Correlation of plasma oxidized LDL levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004;53:297-302

56. Polidori MC, Mecocci P. Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimer's Dis* 2002;4:517-522
57. Chen K, Thomas SR, Keaney JF. Beyond LDL oxidation:ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2003;35:117-132
58. Stocter R, Keaney JF.Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478
59. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST.The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005;38:153-163
60. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process.*Free Radic Biol Med* 2002;33:37-44
61. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age related diseases. *Annals NY Acad Sci* 2001;928:22-38
62. Stadtman ER.The status of oxidatively modified proteins as a marker for aging. In: Esser K, Martin GM(eds) *Molecular aspects of aging*. John Wiley & Sons, New York 1995:129-142
63. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress.*J Biol Chem* 1997;272:20313-20316
64. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation. *Cell* 1995;80:225-236
65. Beal MF.Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:797-803
66. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals and aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33:29-36

67. Alexander P. The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice. *Symp Soc Exper Biol* 1967;21:29-50
68. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633-19636
69. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 2001;488:65-76
70. Burrows CJ, Muller JG. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem Rev* 1998;98:1109-1151
71. Gilchrest BA, Bohr VA. Aging process, DNA damage and repair. *FASEB J* 1997;11:322-330
72. Galaris D, Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 Apr;42(1):93-103
73. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. eds Oxford University Press 2007;80
74. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82(2):291-295
75. Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Oct 1;430(1):97-103
76. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 2004;10(14):1677-1694
77. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):872-9
78. Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free Radical Damage and its Control*, Elsevier Science, London, 1994;113-130

79. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50
80. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000 Nov 16;153(1-3):83-104
81. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84
82. Fridovitch I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 1997;272:18515-18517
83. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed, Oxford Science Publications, Oxford 1999;138-139
84. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 2000 Feb 11;296(1):295-309
85. Maiorino M, Anmann KD, Brigelius-Flohe R, Doria O et al. Probing the presumed catalytic triad of Se-containing peroxidases by mutational analysis of PHGPx. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376:651-658
86. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual GPx. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951
87. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2003 Jan 15;34(2):145-69
88. Schafer FQ, Buetner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-1212

89. Nordberg J, Arner ESJ. ROS, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287
90. Gruber CW et al. PDI: the structure of oxidative folding. *TIBS* 2006;31:455
91. Hentze MW et al. Balancing acts: molecular control mammalian Fe metabolism. *Cell* 2004;117:285
92. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 Oct;33(10):940-59
93. Chua AC, Graham RM, Trinder D, Olynyk JK. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2007;44(5-6):413-59
94. McKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jun;10(6):997-1030
95. Prohaska JR, Gybina AA. Intracellular Cu transport in mammals. *J Nutr* 2004;134:1003
96. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:439-58
97. Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 1993;14:325-337
98. Tapia L et al. MT is crucial for safe intracellular Cu storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J* 2004;378:617
99. Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp Gerontol*. 2008 May;43(5):363-9
100. Ottaviano FG, Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment. *Circ J*. 2008 Jan;72(1):1-16

101. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280:1
102. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 1996;16:33-50
103. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radic Biol Med. 2002 Jul 15;33(2):154-72
104. Fattman CL et al. Extracellular SOD in biology and medicine. Free Radic Biol Med 2003;35:236
105. Halliwell B. Albumin: an important extracellular antioxidant ? Biochem Pharmacol 1988;37:569-571
106. Baranano DE et al. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:16093
107. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. eds Oxford University Press 2007;151
108. Simic MG, Jovanovic SV. Antioxidation mechanisms of uric acid. J Am Chem Soc 1989;111:5778
109. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. Curr Pharm Des. 2005;11(32):4145-51
110. Kristiansen M et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature 2001;409:198
111. Lim SK et al. Role of haptoglobin in free haemoglobin metabolism. Redox Rep 2001;6:219
112. Smith AR et al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. Curr Med Chem 2004;11:1135

113. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic / reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:10
114. Marshall KA et al. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* 1996;21:307
115. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:195
116. Beyer RE. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 1990;8:545-565
117. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini A, Ferro-Luzzi A. A fluorescence – based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;18(1):29-36
118. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys* 1990;280:1-8
119. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed, Oxford University Press 2007
120. Padyatty SJ et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003;22:18
121. Nishikimi M et al. Recent advances in biochemistry of L-ascorbic acid biosynthesis. *Recent Res Devel Biophys Biochem* 2003;3:531
122. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231
123. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans ? *Free Rad Biol Med* 1999;26:1034-1053

124. Lykkesfeldt J, Loft S, Nielsen JB et al. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *Am J Clin Nutr* 1997;65(4):959-963
125. Burri BJ, Jacob RA. Human metabolism and the requirement for vitamin C. In: Packer L, Fuchs J (eds), *Vitamin C in health and disease*. Marcel Dekker, New York 1997:341-366
126. Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health – a review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vitamin Nutr Res* 1996;66(1):19-30
127. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in Human Health and Disease. *Crit Rev in Clin Lab Sci* 2008;45(5):417-450
128. Dierenfeld ES. Vitamin E deficiency in zoo reptiles, birds and ungulates. *J Zoo Wildlife Med* 1989;20:3
129. Aparicio JM, Belanger-Quintana A, Suarez L. Ataxia with isolated vitamin E deficiency: case report and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:206-210
130. Maguire LS et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 2004;55:171
131. Mukai K et al. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radical and fatty acids. *Lipids* 1993;28:753
132. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54:176-186
133. Yoshida Y et al. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidants: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids* 2003;123:63



134. Kaikonen J et al. Supplementation with vitamin E and not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radic Res* 2001;35:967
135. Bieri JG. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2002;75:781-782
136. Cross CE et al. General biological consequences of inhaled environmental toxicants. *The Lung*, 1997;pp2421, Raven Press, Philadelphia
137. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can either be toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*, 2004;13(1):3-11
138. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:456-68
139. Schmut O, et al. Destruction of human tear proteins by O<sub>3</sub>. *Free Rad Biol Med* 1994;17:165
140. Valacchi G, et al. Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of O<sub>3</sub> in murine skin. *Biophys Res Commun*, 2003;305:741
141. Floyd RA, et al. Increased 8OH-dG content of chloroplast DNA from O<sub>3</sub> – treated plants. *Plant Physiol* 1989;91:644
142. Berlett BS et al. Comparison of the effects of O<sub>3</sub> on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1996;271:4177
143. Frischer T et al. Aromatic hydroxylation in nasal lavage fluid following ambient O<sub>3</sub> exposure. *Free Rad Biol Med* 1997;22:201
144. Kanofsky JR, Sima PD. Singlet oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurements of singlet oxygen yields from O<sub>3</sub> – biomolecule interactions. *Photochem Photobiol* 1993;58:335

145. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Rad Biol Med* 1995;19:935-941
146. Bocci V. How does ozone act ? How can we avoid its toxicity ? In: Bocci V, ed *Ozone:A new medical drug*. Springer Netherlands, 2005;pp22
147. Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Vitro* 2005;19(1);55-61
148. Bosch-Morell F, Flohe L, Marin N et al. 4-hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Free Rd Biol Med* 1999;26:1383-1387
149. Cross CE et al. Combating oxidative stress at respiratory tract biosurfaces. *Free Rad Biol Med* 2006;40:1693
150. Samet JM et al. Effect of antioxidant supplementation on O<sub>3</sub> – induced lung injury in human subjects. *Am J Resp Crit Care Med* 2001;164:819
151. Wiester MJ et al. O<sub>3</sub> adaptation in mice and its association with ascorbic acid in the lung. *Inhal Toxicol* 2000;12:577
152. Jackson RM, Frank L. O<sub>3</sub>- induced tolerance to hyperoxia in rats. *Am Rev Resp Dis* 1984;129:425
153. Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16(11):969 –85
154. Weisfeldt ML, Zweier J, Ambrosio G, Becker LC, Flaherty JT. Evidence that free radicals result in reperfusion injury in heart muscle. *Basic Life Sci* 1988;49:911 –9
155. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993;26:359-370
156. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2006 May 1;70(2):181-90

157. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255
158. Galaris D, Eddy L, Arduini A, Cadenas E, Hochstein P. Mechanisms of reoxygenation injury in myocardial infarction: implications of a myoglobin redox cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160(3):1162-8
159. Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des.* 2006;12(23):2875-90
160. Harrison R. Structure and function of XOR: where are we know ? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774
161. Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(2):H566–74
162. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 2005;390:377
163. Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1999;277:H2240– 6
164. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61:461–470
165. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 2001;6(2):77– 90
166. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273 (29):18092–8

167. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res* 2000;86:534–40
168. Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003 (September 30);1606(1–3):1–2
169. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, VandenHoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003(January);284(1):H299– 308
170. Downey JM, Yellon DM. Do free radicals contribute to myocardial cell death during ischemia-reperfusion? In: Yellon DM, Jennings RB, eds. *Myocardial protection. The pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury*. New York, Raven Press ;1992: 35– 57
171. Miki T, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998 (October);93(5):372– 83
172. Rice-Evans C et al. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996;20:933
173. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004;38:771
174. Taubert D et al. Reaction rate constants of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> scavenging by plant antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1599
175. Heim KE, Tagliafero AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002 ; 13:572-584

176. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:S139-S151
177. Frankel EN et al. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human LDL. *J Agric Food Chem* 1995;43:890
178. Renaud S, deLongeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;20:1523-1526
179. Keli SO et al. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke. The Zutphen study. *Arch Int Med* 1996;154:637
180. McAnulty SR et al. Effect of daily fruit ingestion on ACE activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers. *Free Radic Res* 2005;39:1241
181. Halliwell B et al. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols. Direct or indirect effects ? Antioxidant or not ? *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):268S
182. Mukai K et al. Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1243
183. Smith DM et al. Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins* 2004;54:58
184. Middleton E Jr et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673
185. August DA et al. Ingestion of green tea rapidly decreases prostaglandin E2 levels in rectal mucosa in humans. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:709
186. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arc Biochem Biophys* 1995;322(2):339-346

187. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Rad Biol Med* 1996;21(6):895-902
188. Hider RC, Liu ZD, Khodr HH. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymol* 2001;335:190-203
189. Mandel S, Maor G, Youdim MB. Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Mol Neurosci* 2004;24(3):401-416
190. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of green tea polyphenols (-) epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 2004;88(6):1555-1569
191. Gouni-Berthold I, Sachinidis A. Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharm Des* 2004;10(11):1261-1271
192. Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 2003;133(7 suppl):2417S-2424S
193. Lambert JD, Young CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 2003;133(10):3262S-3267S
194. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)epigallocatechin-3-gallate induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 2004;410(1):177-185
195. Park AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):66-77

196. Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates NF-kB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 2000;376(2):338-346
197. Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the NF-kB activation pathways. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1075-1083
198. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester-bond containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001;276(16):13322-13330
199. Jung YD, Ellis LM. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int J Exper Path* 2001;82(6):309-316
200. Masuda M et al. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol* 2002;2(6):350-359
201. Waleh N et al. Novel D-ring analog of epigallocatechin-3-gallate inhibits tumor growth and VEGF expression in breast cancer carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005;25(1A):397-402
202. Mandel S, Reznichenko L, Amit T, Youdim MB. Green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate protects rat PC12 cells from apoptosis induced by serum withdrawal independent of P13-Akt pathway. *Neurotox Res* 2003;5(6):419-424
203. Weinreb O, Mandel S, Youdim MB. Gene and protein expression profiles of anti- and pro- apoptotic actions of dopamine, R-apomorphine, green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate and melatonin. *Ann NY Acad Sci* 2003;993:351-361
204. Levites Y, Youdim MB, Maor G, Mandel S. Attenuation of 6-hydroxydopamine induced NF-kB activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochem Pharmacol* 2002;63(1):21-29

205. Jeon SY, Bae K, Seong YH, Song KS. Green tea catechins as a beta-secretase inhibitor. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 2003;13(22):3905-3908
206. Offord, E, Poppel G, Tyrrell R. Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease. *Free Radic Res* 2000;33(Suppl): S5–S19
207. Branca F, Hanley AB, Pool-Zobel B, Verhagen H. Biomarkers in disease and health. *Br J Nutr* 2001; 86(Suppl 1): S55–S92
208. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G, Ovesen L, Scotter M, Solfrizzo M, van den BR, Verhagen H, Williamson G, 2001. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr* 2001;86(Suppl 1):S5–35
209. Crews HM, Hanley AB, Verhagen H, Wild C. (Eds). Biomarkers of exposure and effect in relation to quality of life and human risk assessment. *Br J Nutr* 2001;86(Suppl 1)
210. Wild CP, Andersson C, O'Brien NM, Wilson L, Woods JA. A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health. *Br J Nutr* 2001;86(Suppl 1):S37–S53
211. Danne-Dolle I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52(4):601-623
212. Griffiths HR, Bevan R, Lunec J. Measurement of oxidised amino-acids by HPLC. *Handbook of Oxidative Methods*, 1999, Wiley, London
213. Schacter E, Williams JA et al. Determination of carbonyl groups in oxidised proteins. *Free Radicals – A practical approach*, 1996, IRL Press, Oxford, pp 159-170



- 214.** Carty JL, Bevan R et al. The effects of vitamin-C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;273(2):729-735
- 215.** Creed D. The photochemistry and photophysics of the near UV absorbing amino-acids, cystine and its simple derivatives. *Photochem. Photobiol.* 1984;39:577-584
- 216.** Singh et al. An amplified assay for thiols based on reactivation of papain. *Anal. Biochem.* 1993;213(1):49-56
- 217.** Ohmori S et al. HPLC method to analyze picomole levels of glutathione, cysteine and cysteinyl glycine and its application to pre-cancerous rat livers. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;762(1):25-32
- 218.** Akaike T et al. Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by HPLC coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122(2):459-466
- 219.** Pompella A, Paolicchi A et al. Selective co-localization of lipid peroxidation and protein thiol loss in chemically induced hepatic preneoplastic lesions. *Histochem Cell Biol* 1996;106(3):275-282
- 220.** Morin et al. 3-Hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;11(11):1265-1273
- 221.** Giessauf A et al. Formation of N-formyl kynurenine suggests the involvement of apolipo- protein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1996;389(2):136-140
- 222.** Reddy S, Halliwell B et al. The use of phenylalanine to detect hydroxyl radical production in vivo: a cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27(11-12):1465

223. Yu TC, Sinnhuber RO. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. *Food Technology* 1957; 11:104-108
224. Iversen SA et al. A method for the measurement of a diene – conjugated derivative of linoleic acid in serum phospholipids and possible origins. *Ann Clin Biochem* 1985;22(Pt 2):137-140
225. Riely CA, Cohen G, Lieberman M. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 1974;183(121):208-210
226. Andreoni KA et al. Ethane: a marker of lipid peroxidation during cardiopulmonary bypass in humans. *Free Radic Biol Med* 1999;26(3-4):439-445
227. Li H, Lawson JA et al. Quantitative HPLC / tandem mass spectrometry analysis of the four classes of F(2) – isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(23):13381-13386
228. Cheng KC et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992;267(1):166-17
229. McKelvey – Martin et al. The single cell gel electrophoresis (comet assay): a European review. *Mutant Res* 1993;288(1):47-65
230. Collins AR. Measurement of oxidative DNA damage using the comet assay. In: *Measuring in vivo oxidative damage: A practical approach*, 2000, Wiley, New York pp 83-94
231. Wood SG et al. Measurement of 8-oxo-dGuo in lymphocytes, culture cells and tissue samples by HPLC with electrochemical detection. In: Barnett YA, *Methods in Molecular Medicine*, 2000, vol. 38
232. Dizdaroglu M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas - chromatography – mass spectrometry. *Methods Enzymol* 1994;234:3-16

- 233.** Anon M. Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry of the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12(1):80-87
- 234.** Toyokuni S et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy - 2'- deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate – induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 1997;76(3):365-374
- 235.** Carlberg C et al. DNA-adducts in human placenta as biomarkers for environmental pollution, analyzed by the <sup>32</sup>P – HPLC method. *Biomarkers* 2000;5:182-191
- 236.** Griffiths HR et al. *J Molecular Aspects of Medicine*, 2002;23:101-208
- 237.** Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1173-1181
- 238.** Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Rice-Evans C et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231-1237
- 239.** Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Colch.)* 1993;84(4):407–412
- 240.** Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 1985;187(1):33–37
- 241.** Valkonen M, Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res* 1997;38(4):823–833

242. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14(3):303–311
243. Cao G, Verdon CP, Wu AH, Wang H, Prior RL. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem* 1995;41(12 Pt1):1738–1744
244. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70–76
245. Benzie IF, Strain JJ, 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999;299:15–27
246. Chevion S, Roberts MA, Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med*. 2000 Mar 15;28(6):860-70
247. Chevion S, Berry EM, Kitrossky N, Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(3):411-21
248. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C, 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000;29(11):1106–1114
249. Charalampidis PS, Veltsistas P, Karkabounas S, Evangelou A. Blue CrO<sub>5</sub> assay: A novel spectrophotometric for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances. *Eur J Med Chem* 2009; 44:4162–4168
250. Grampp G, Landgraf S, Wesierski T et al. Kinetics of the formation of the blue complex CrO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> formed by dichromate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acid solutions. A stopped-

- flow investigation using rapid-scan UV-VIS detection. *Monatshefte fur Chemie* 2002;133:1363-1372
- 251.** Heim KE, Tagliafero AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002 ; 13:572-584
- 252.** Yang CS, Sang S,Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:S139-S151
- 253.** Ciencewicki J,Trivedi S,Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:456-68
- 254.** Henning SM, Niu Y, Lee NH et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea catechins after consumption of green tea, black tea or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1558-1564
- 255.** Manach C, Williamson G, Morand C et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S-242S
- 256.** Rodriguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG.Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. *Inflamm Res* 2009;58:371-375



## ***ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ***

EGCG: επιγαλλοκατεχίνη

GPx: υπεροξειδάση γλουταθειόνης

GSH: γλουταθειόνη

Hb: αιμοσφαιρίνη

Ht: αιματοκρίτης

LOPs: προϊόντα λιπιδιακής υπεροξείδωσης

MDA: μαλονική διαλδεϋδη

RBC: ερυθρά αιμοσφαίρια

ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου

RNS: ενεργές ρίζες αζώτου

SOD: δισμουτάση σουπεροξειδίου

TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TBARS: δραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος

TCA: τριχλωρο – οξεϊκό οξύ





## ***ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ***

- 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνεδρίο Ελευθέρων Ριζών & Οξειδωτικού Stress

(28/9 – 1/10 / 2006), Καρδαμύλη Μεσσηνίας

«Φωτομετρική μέθοδος του CrO<sub>5</sub>: Μια νέα μέθοδος αξιολόγησης της οξειδωτικής κατάστασης βιολογικών υγρών».

Π.Σ.Χαραλαμπίδης, Α.Ευαγγέλου, Π.Βελτσίστας, Δ.Γαλάρης.

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

- 10<sup>ο</sup> Διεθνές Συμπόσιο Μεταλλικών Ιόντων στην Βιολογία και την Ιατρική

(19 - 22 /5/ 2008), Μπάστια - Κορσική, Γαλλία

“ Blue CrO<sub>5</sub> spectrophotometric method: a novel method for assessing the oxidative status of biological fluids”.

Haralampidis P, Karkabounas S, Veltsistas P, Galaris D, Evangelou A.

10th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine,

Bastia, France





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

## Blue CrO<sub>5</sub> assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances

Pavlos S. Charalampidis<sup>a,\*</sup>, Panos Veltsistas<sup>b</sup>, Spyros Karkabounas<sup>a</sup>, Angelos Evangelou<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina, Ioannina 45110 Greece

<sup>b</sup>Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina 45110 Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 March 2009

Received in revised form

30 April 2009

Accepted 11 May 2009

Available online 21 May 2009

#### Keywords:

Oxidative stress

Antioxidant capacity

Chromium peroxide

Spectrophotometry

α-Tocopherol

Ascorbate

### ABSTRACT

Oxidative stress plays a pivotal role in the ageing process and in the pathogenesis of numerable diseases. The quantification of the phenomenon is of paramount importance. In the present study, we introduce a novel and simple assay, the Blue CrO<sub>5</sub> assay, for the evaluation of the oxidant and antioxidant capacity of various biological samples and known antioxidants. Chromium peroxide (CrO<sub>5</sub>) is produced by ammonium dichromate in an acidic environment in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It is a deep blue potent oxidant compound, miscible and relatively stable in polar organic solvents, that can be easily measured by spectrophotometry. Its reduction by known antioxidants, both water- and lipid-soluble (ascorbate and α-tocopherol, respectively, in this study), detected spectrophotometrically as a decrease in the absorption and depicted in EPR spectra, can act as a measure of the antioxidant capacity of a certain compound. The assay displays significant sensitivity, stability, linearity, specificity and repeatability.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Oxidative stress is the resultant of intracellular and extracellular conditions which in turn lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [1,2]. These compounds constitute a by-product of the evolutionary selection of oxygen molecule as the terminal in the electron transport chain, during the intracellular energy production. Also, there are external factors that contribute to their production (e.g. diet, food additives, toxic and carcinogenic compounds, radiation, ozone, air pollution, smoking, psychological stress, etc.) [3–6]. Their biological role is of paramount importance because under the presence of transition metal ions (e.g. Fe, Cu, Mn and Cr), free radicals are easily generated. For example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through Fenton-type reactions generates hydroxyl radical (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>+2</sup> → Fe<sup>+3</sup> + HO<sup>-</sup> + HO<sup>•</sup>), one of the most reactive radical in damaging biological systems. Their role is pivotal in the ageing process and in the pathogenesis of numerable diseases, such as cancer, atherosclerosis, diabetes mellitus, Alzheimer's disease, cataract and the list is continuously growing [2,7–9].

Of course, the living organisms have developed, in the course of evolution, defence mechanisms against these damaging reactions,

and their interaction constitutes a dynamic balance. These mechanisms include a variety of substances and enzyme systems which we refer to as antioxidants in general [10]. The cell is fully equipped with both intracellular and extracellular antioxidant systems. The intracellular defence systems include enzymes [11–15], and also sequestration of transition metal ions (such as iron, copper, etc.) that can act as catalysts for the production of extremely reactive free radicals, mainly by binding proteins such as transferrin, lactoferrin, ferritin, ceruloplasmin and metallothioneins [16–20].

The extracellular defence against free radical formation is equally important. It consists mainly of low molecular weight antioxidants and fewer enzyme systems than in the intracellular environment. Some are produced *in vivo* and a large number is absorbed from the daily food intake [21]. These defence systems include small concentrations of enzymes and molecules such as albumin, bilirubin, ceruloplasmin, transferrin, lactoferrin, uric acid, haptoglobin, hemopexin, glucose, lipoic acid, ubiquinone, α-tocopherols and ascorbic acid to name but a few [10,22–27].

The quantification of this phenomenon is of paramount importance. A standard antioxidant is compared to the antioxidant properties of the sample under examination, thus producing a measure of its antioxidant capacity. This is, in general, the principle of the existing methods [11,28–30]. These methods are divided in two major categories: (1) the inhibition assays, where the lag phase or the suppression of an oxidation reaction, in the presence of an

\* Corresponding author. Tel.: +30 2651097577; fax: +30 2651097850.  
E-mail address: pcharal@cc.uoi.gr (P.S. Charalampidis).

antioxidant, is being measured, and (2) the reduction assays, which are based on the reductive properties of antioxidants, where the capacity of a certain sample to induce the reduction of marker-molecule is a measure of its content in antioxidants.

The first category includes: (a) the ABTS compound oxidation inhibition, known as TAC-assay kit, (b) the TRAP-assay which is based on the measurement of the oxygen consumption time of blood plasma in dilution with linoleic acid, and (c) the ORAC-assay, which measures the produced fluorescence by the AAPH compound and its non-linear degradation. The second category includes: (a) the FRAP-assay, which measures the reduction of coloured trivalent iron complex, and (b) the ABTS<sup>+</sup> decolorization assay, where it acts as a reduced substrate. Recently, efforts were made to evaluate the total reductive capacity of various samples by means of embedded electrodes and cyclic voltametry [31,32]. The main drawback of these assays is their lack of specificity, because of various factors that affect free radical formation and can alter the readings, and the variety in the speed of chemical reactions that take place in complex biological samples, such as blood, and occasionally exceed the measurement time suggested by the assay.

Finally, the existing methods deal, in majority, with the water-soluble antioxidants, whereas lipid-soluble antioxidants, such as vitamin-A,  $\alpha$ -tocopherol, etc., remain undetected. But biological samples are mainly bi-phasic solutions with a large hydrophilic compartment that surrounds a lipophilic core. Multiple interactions take place between the two compartments, while various substances such as  $\alpha$ -tocopherol with its chroman head group and phytol side chain are active in both compartments. In this direction, efforts have

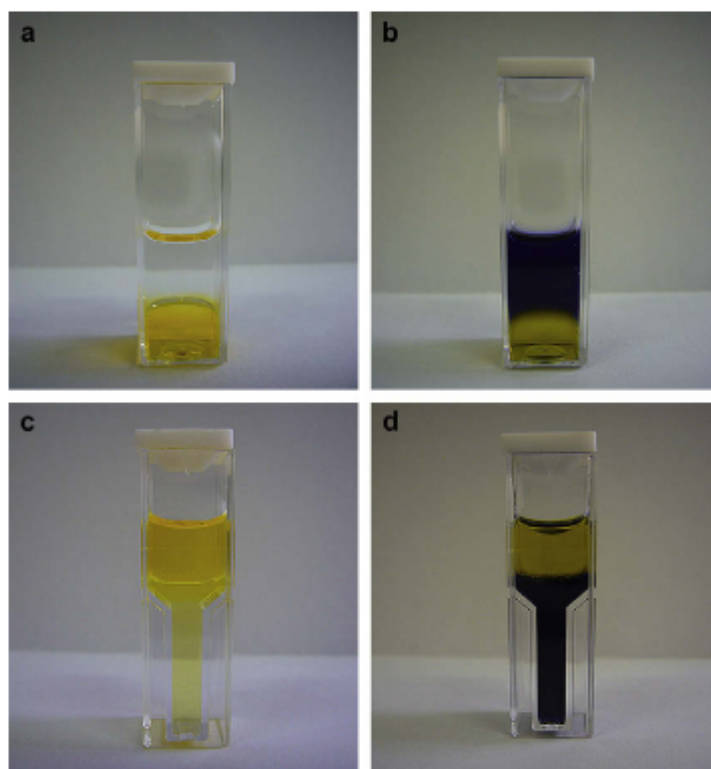
been made, with the introduction of new solvents, to measure lipid-soluble compounds with the Improved TEAC assay. However, the assay isolates the two phases, whereas *in vivo* they co-exist and interact displaying synergistic effects in the level of antioxidant defence systems [11]. Therefore, the measurement of the total antioxidant capacity of various biological samples remains as an elusive target.

This article contributes to this effort for a better evaluation of the redox state and the antioxidant and oxidant capacity of various biological samples by introducing the novel and relatively simple spectrophotometric assay of the blue chromium peroxide (CrO<sub>5</sub>). Chromium peroxide is a deep blue product and a powerful oxidant. It is generated in an aqueous phase by the interaction of an inorganic salt with hydrogen peroxide in an acidic environment. Since it is mainly miscible in organic solvents, after its production it moves through the aqueous phase to the organic phase of a bi-phasic solution. Thus it exerts its oxidative properties in both phases of the solution but also it is liable to the antioxidant action of various antioxidants, both hydrophilic and lipophilic. In this way, it is a very promising marker-molecule for the development of assays measuring both the oxidative and the antioxidant capacity of various samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical reagents and materials

Isoamyl alcohol, propylene carbonate, ammonium dichromate,  $\alpha$ -tocopherol and hydrogen peroxide of high purity were purchased



**Photo 1.** (a) The colourless organic phase above (isoamyl alcohol) and the yellow aqueous phase below (due to ammonium dichromate), before the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (b) The blue organic phase above (due to the formation of chromium peroxide) and the yellow aqueous phase below (due to ammonium dichromate), after the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (c) The yellow aqueous phase above (due to ammonium dichromate) and the colourless organic phase below (due to propylene carbonate), before the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (d) The yellow aqueous phase above (due to ammonium dichromate) and the blue organic phase below (due to formation of chromium peroxide), after the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

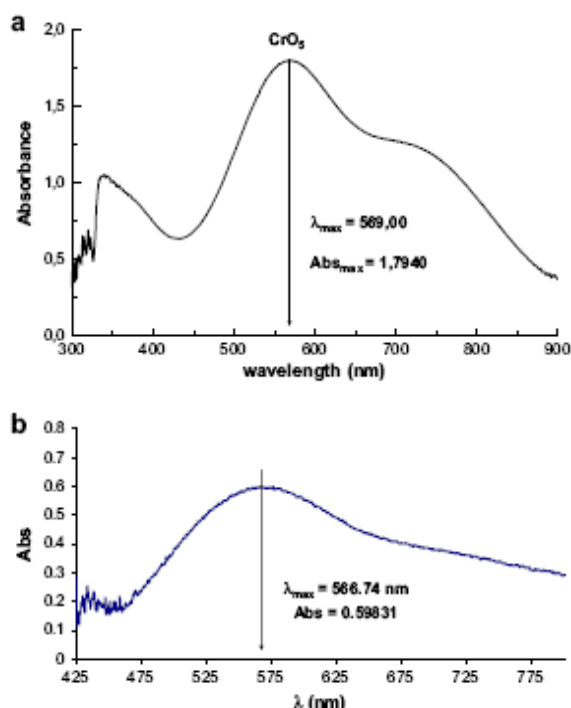
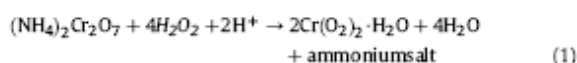


Fig. 1. (a) Absorption spectrum of  $\text{CrO}_5$  in isoamyl alcohol (37 °C); and (b) absorption spectrum of  $\text{CrO}_5$  in propylene carbonate (37 °C).

from Sigma–Aldrich Co. Sulfuric acid and perchloric acid of analytical grade were also purchased from Sigma–Aldrich Co. For the preparation of aqueous solutions double distilled water was used, whereas in organic solutions isoamyl alcohol or propylene carbonate were used. Measurements were made with a Shimadzu 1601 UV–vis spectrophotometer using disposable polystyrene square cuvettes of 10 mm optical pathway purchased from Sartstedt Co. EPR spectra were performed in a Bruker ER200D–SRC.

## 2.2. Assay principle

Chromium peroxide ( $\text{Cr}(\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  or briefly  $\text{CrO}_5$ ) is an extremely potent oxidant. This compound is a product of the following reaction:



Chromium peroxide is a deep blue product, relatively stable in polar organic solvents and can be easily measured via spectrophotometry [33]. The acidic environment for the reaction was provided by acids such as  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and  $\text{HClO}_4$  (forming ammonium sulfate and perchlorate, respectively). When the products of the reaction (1) are mixed with an organic solvent (e.g. isoamyl alcohol and propylene carbonate), the formed  $\text{CrO}_5$  moves and dissolves in the organic phase (solution 1) of the bi-phasic solution, the aqueous phase of the solution containing the reagents (Photo 1a–d). The antioxidant compounds of a certain substance or biological sample, added to the above solution 1, inhibit the formation of the deep blue  $\text{CrO}_5$ . The extent of the inhibition of the colour formation in solution 1, measured by means of a spectrophotometer, represents

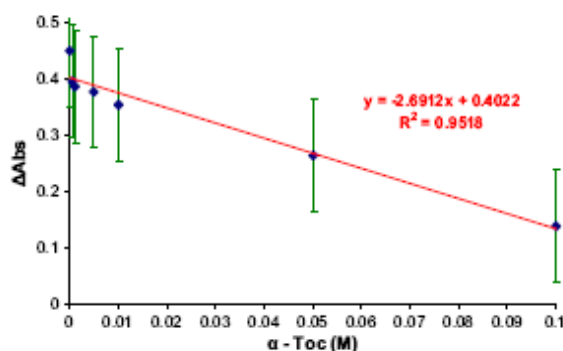


Fig. 2. Area of  $\alpha$ -tocopherol solutions of intermediate concentration, in isoamyl alcohol (37 °C).

the antioxidant capacity (or the oxidative status) of the sample under measurement.

Initially, if hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) is not added to the solution 1, then chromium peroxide is not produced (see reaction (1)) and the organic solution is not coloured deep blue (solution 2). If in this colourless solution 2 is added a substance or a biological sample containing hydrogen peroxide or other peroxides, then it becomes deep blue, due to the formation of chromium peroxide by the reaction of ammonium dichromate with the sample peroxide, in the presence of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (see reaction (1)). The intensity of the formed blue colour, spectrophotometrically measured, reflects the sample content in peroxide compounds and its oxidant capacity.

## 2.3. Sample preparation and conditions

All measurements were taken at a temperature of 37 °C and the spectrophotometer was set at  $\lambda = 569$  nm (for isoamyl alcohol) or  $\lambda = 566$  nm (for propylene carbonate) and calibrated against air. In a 4 mL plastic capped cuvette, 1 cm light path, 1200  $\mu\text{L}$  of organic solvent, 400  $\mu\text{L}$  of 0.02 M ammonium dichromate, 400  $\mu\text{L}$  of 0.025 M sulfuric acid solution and 20  $\mu\text{L}$  of the sample under measurement were pipetted. The cuvette was then inserted into the spectrophotometer and was incubated for a period of 3 min. The first absorbance reading was then taken. The cuvette was then removed from the photometer and 20  $\mu\text{L}$  of 1.6 M hydrogen peroxide solution was pipetted. After a mild stirring the cuvette was inserted again at the photometer and an absorbance reading was taken at 3 min time. The increase in the absorbance was then calculated ( $\Delta\text{A}$ ). For each sample there was a triplet of measurements. Mean value and standard deviation were then calculated.

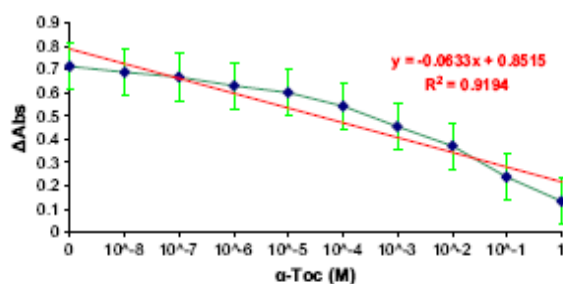


Fig. 3. Grading of the assay using  $\alpha$ -tocopherol solutions of various molarities, in propylene carbonate (37 °C).



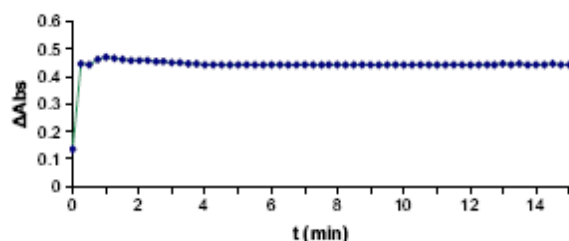


Fig. 4. Stability of the assay using the blank solution.

The same procedure was followed for blank measurements but instead of using 20  $\mu\text{L}$  of a sample we added 20  $\mu\text{L}$  of the organic solvent. For measurements of our standard antioxidant we used 20  $\mu\text{L}$  of 0.1 M  $\alpha$ -tocopherol solution in our organic solvent instead of a sample. The calculation  $\Delta A$  of blank and standard solutions took place before each set of measurements in order to avoid daily fluctuations in the stock solutions used.

The calculated fraction:

$[\alpha\text{-tocopherol}] \times \frac{\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{standard}}}$  is a measure of the antioxidant capacity of this sample as compared to that of 0.1 M  $\alpha$ -tocopherol solution, and is measured in mol/l of  $\alpha$ -tocopherol.

### 3. Results

Chromium peroxide is a deep blue product easily miscible in organic solvents, with a maximum absorption at  $\lambda = 569$  nm for isoamyl alcohol (Fig. 1a) and at  $\lambda = 566$  nm for propylene carbonate (Fig. 1b). The assay was graded using samples of 20  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -tocopherol solutions of various molarities in isoamyl alcohol, which was the main solvent we used in our measurements. The assay displayed exceptional linearity in the area of intermediate  $\alpha$ -tocopherol concentrations, which was the area of the absorbance readings of the samples in our measurements, thus contributing to the accuracy of the assay (Fig. 2). The assay was also graded with propylene carbonate displaying similar linearity (Fig. 3).

The assay displayed stability in the absorbance readings over an incubation period of time of several minutes, with no significant changes taking place after the 3-min time period we used in our measurements, both in the blank solution (Fig. 4) and in the standard solution (Fig. 5).

The specificity of the assay was also examined with no interactions taking place between the produced chromium peroxide and the various polar organic solvents we used. The production of blue chromium peroxide also displayed a  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration

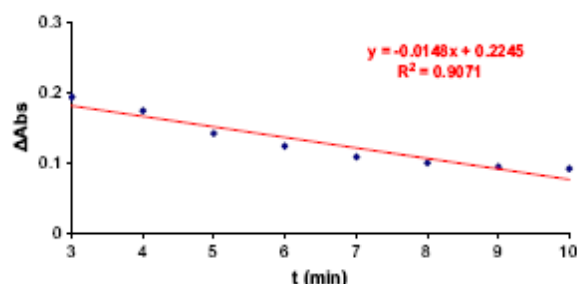


Fig. 5. Stability of the assay using the standard solution of 0.1 M  $\alpha$ -tocopherol after  $t = 3$  min.

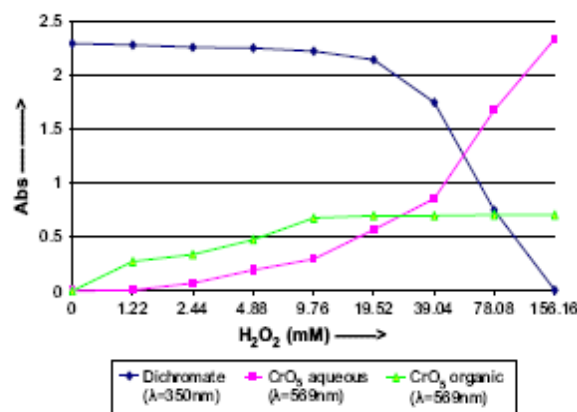


Fig. 6.  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration dependence of  $\text{CrO}_5$  formation (absorption at  $t = 30$  s with various  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations, isoamyl alcohol as organic solvent). Note that the aqueous phase of the bi-phasic solution is receiving the excess of  $\text{CrO}_5$  after the saturation of the organic phase.

dependence, with the aqueous phase of the bi-phasic solution receiving the excess of  $\text{CrO}_5$  after the saturation of the organic phase (Fig. 6).

In our measurements, the acidic environment was in a slight excess to the molarity of the ammonium salt in order to shift the chemical balance of the reaction (1) to the right, thus producing more blue  $\text{CrO}_5$  and increasing the sensitivity of the assay. As shown in Figs. 2 and 3 the assay was capable in detecting  $\alpha$ -tocopherol at final concentrations of 10 nM (overall sensitivity).

We also studied the chemical system using ascorbate (a prominent water-soluble antioxidant) as a potential standard antioxidant

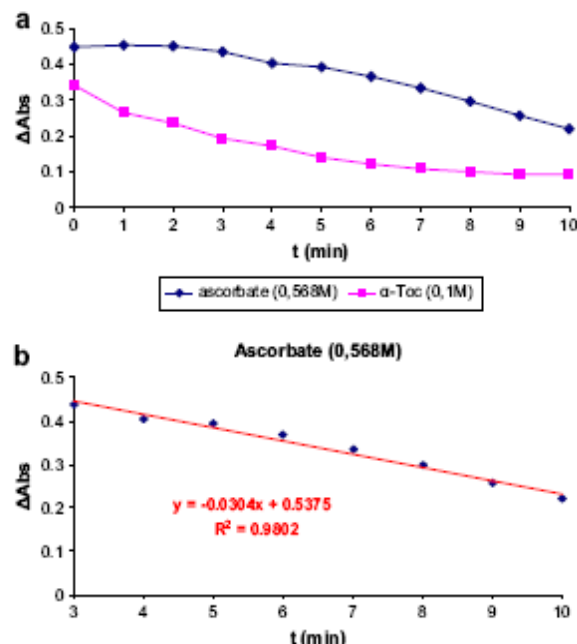


Fig. 7. (a) Absorption kinetics of the assay using 0.568 M ascorbate or 0.1 M  $\alpha$ -tocopherol. (b) Absorption kinetics of the assay using 0.568 M ascorbate after  $t = 3$  min.

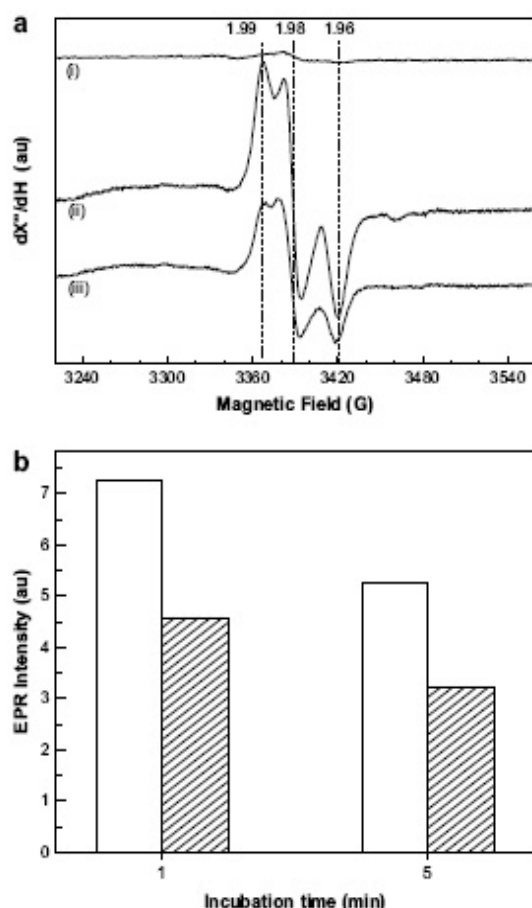


Fig. 8. (a) EPR spectra of the chemical system of the assay in isoamyl alcohol (experimental conditions:  $T = 77$  K, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 5 G, microwave power 10 dB). (i) Absence of signal before the addition of  $H_2O_2$ . (ii) After the addition of  $H_2O_2$  the characteristic double spike of the formation of a radical chromium paramagnetic body. (iii) The spike is diminished by the antioxidant action of  $\alpha$ -tocopherol. (b) Effect of incubation time on the intensity of the EPR signal at g 1.98 in the absence (empty columns) and in the presence (filled columns) of  $\alpha$ -Toc.

with the results shown in Fig. 7a and b. By comparing the absorption kinetics of the two antioxidants (ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol) in Figs. 5 and 7b, respectively, we can see clearly that with  $\alpha$ -tocopherol we have more stable absorption readings after a period of 3 min whereas with ascorbate the absorption continues to decrease rapidly beyond the 3-min time period, making it unsuitable for standard antioxidant in the assay.

EPR spectra of the chemical system of the assay were performed in isoamyl alcohol, as shown in Fig. 8a. There we can see in spectrum (i) the absence of signal before the addition of  $H_2O_2$  and the formation of a radical paramagnetic body. In spectrum (ii), after the addition of  $H_2O_2$ , we can see the characteristic double spike of the formation of a radical chromium paramagnetic body, and in spectrum (iii) the spike is diminished by the antioxidant action of  $\alpha$ -tocopherol. The effect of incubation time in the EPR signal, both in the presence and in the absence of  $\alpha$ -tocopherol is shown in Fig. 8b, where we can see the very gradual diminishing of the signal.

Furthermore, we compared our novel assay with another well-established spectrophotometric assay for the measurement of antioxidant status, the Improved TEAC [30]. We measured the same

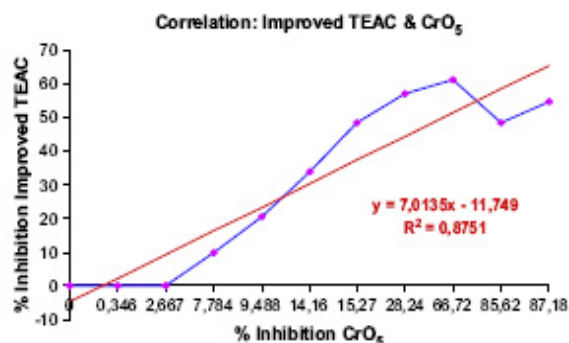


Fig. 9. Measurement of the antioxidant activity of various  $\alpha$ -tocopherol solutions with both Improved TEAC and Blue  $CrO_5$  (expressed in % inhibition of the absorption). Note that Blue  $CrO_5$  assay can detect lower concentrations of  $\alpha$ -tocopherol than Improved TEAC.

solutions of various concentrations of  $\alpha$ -tocopherol with the two assays, the results expressed in % inhibition of the absorption are shown in Fig. 9. The greater sensitivity of the Blue  $CrO_5$  assay over the Improved TEAC in detecting low concentrations of  $\alpha$ -tocopherol is seen in the section of the curve where x and y axis are crossed. At low concentrations of  $\alpha$ -tocopherol, the Blue  $CrO_5$  assay detects an inhibition of the absorption, whereas Improved TEAC displays no inhibition of the absorption (note the section of the curve where x and y axis are crossed in Fig. 9).

Preliminary results from the measurement of blood plasma samples from patients with myocardial infarction (a classic model of ischemia – reperfusion injury) [34,35], using both assays, at 30 min, 2, 4 and 12 h time show similar fluctuations of the antioxidant status (Fig. 10). Blood samples were drawn from patients with myocardial infarction, at the above mentioned time points, in 15 mL tubes without anticoagulant and then centrifuged in a Heraeus bucket centrifuge at  $\times 400g$  for 20 min. The supernatant (blood plasma) was then collected in 1.5 mL Eppendorf tubes and stored at  $T = -70$  °C for future measurement. We used a non-parametric test (Spearman's correlation) for interpreting the results. Both assays correlated significantly ( $p = 0.0001$ ), but the Blue  $CrO_5$  assay is far more accurate in detecting alterations in the antioxidant status early after myocardial infarction than Improved TEAC (its standard deviation is three times smaller at 30 min and at 2 h) (Fig. 11).

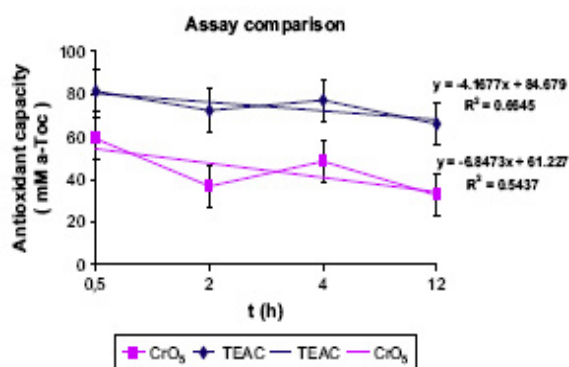


Fig. 10. Measurement of the antioxidant activity of blood plasma samples from patients with myocardial infarction using both Improved TEAC and Blue  $CrO_5$  (expressed in mM of  $\alpha$ -tocopherol solution).

#### 4. Discussion

In the present study, the results of the evaluation of the redox state and the antioxidant capacity of various biological substances by a novel and relatively simple spectrophotometric assay of the blue chromium peroxide ( $\text{CrO}_5$ ) are reported. The assay is based on the formation of  $\text{CrO}_5$  by ammonium dichromate in an acidic environment in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reaction (1)) as shown in the EPR spectra (Fig. 8a and b).  $\text{CrO}_5$  is deep blue oxidative compound, reduced in the presence of antioxidants (Fig. 8a and b), that can be easily detected spectrophotometrically (Fig. 1a and b).

The already existing methods are capable of detecting only a specific antioxidant each time, but are unable of evaluating their various interactions and overall synergy. Total antioxidant capacity refers to the total amount of free radicals that can be scavenged by a certain antioxidant in a biological sample. A standard antioxidant is compared to the antioxidant properties of the sample under examination, thus producing a measure of its antioxidant capacity. This is, in general, the principle of the existing methods [28–30]. The Blue  $\text{CrO}_5$  assay is able to detect both water-soluble and lipid-soluble antioxidants as it is evident from the detection by this assay of the antioxidant capacity of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol. This ability is due to the bi-phasic nature of the chemical system of the assay (aqueous and organic, Photo 1a–d), which enables water- and lipid-soluble antioxidants to react with the substrate of the assay and thus be detected. It also simulates better the *in vivo* conditions where synergistic effects take place.

The methods in use are divided in two major categories: (1) the inhibition assays, where the lag phase or the suppression of an oxidation reaction, in the presence of an antioxidant, is being measured, and (2) the reduction assays, which are based on the reductive properties of antioxidants, and where the capacity of a certain sample to induce the reduction of marker-molecule is a measure of its content in antioxidants. Our assay belongs to the reduction assays, since it detects the inhibition of the formation of  $\text{CrO}_5$  by reduction from the antioxidants of the sample under measurement, as seen in the EPR spectra (Fig. 8a and b). The main drawback of these assays is that they are based upon the competition between the substrate – marker and the antioxidants of the measured sample for the oxidative compound. The whole phenomenon is much more complex and secondary reactions take place between the already oxidized substrate and the sample

antioxidants, which also reflect the antioxidant capacity of the sample, but affect the total absorbance and the final readings. Furthermore, many biologically important reductants are unable to reduce the oxidizable substrate of the individual assay and are thus undetectable by a certain assay. That is the major cause of inconsistency between the various assays. Finally, the existing methods deal, in majority, with the water-soluble antioxidants, whereas lipid-soluble antioxidants, such as vitamin-A,  $\alpha$ -tocopherol, etc., remain undetected. In this direction, efforts have been made, with the introduction of new solvents, to measure lipid-soluble compounds with the Improved TEAC assay but the assay isolates the two phases, whereas *in vivo* they co-exist and interact displaying synergistic effects in the level of antioxidant defence systems. In contrast, the dual nature of our assay seems to overcome these obstacles, since it allows the antioxidants to react with the substrate both in the aqueous and in the organic phase, as mentioned above.

The Blue  $\text{CrO}_5$  assay is relatively stable, since the reaction is mostly completed at a time period of 3 min and absorption readings diminish insignificantly over an additional time of 15 min, as seen in Figs. 4 and 5. The assay also displays specificity as its substrate (blue  $\text{CrO}_5$ ) does not react with polar organic substances but only with antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol. Our assay displays adequate linearity and sensitivity, since it detects  $\alpha$ -tocopherol at concentrations of 10 nM, as seen in Figs. 2 and 3. Furthermore, it significantly correlates with Improved TEAC ( $R^2 = 0.8751$ ) with greater sensitivity in detecting lower concentrations of  $\alpha$ -tocopherol (Fig. 9).

Major interferences in the repeatability and accuracy of the assay are the photosensitivity of the standard  $\alpha$ -tocopherol solution and the gradual hydrolysis of the hydrogen peroxide solution when stored for over a period of several months. This requires that both  $\alpha$ -tocopherol and hydrogen peroxide solutions must be freshly prepared from stock solutions for the measurement of a number of samples and that stock solutions must not be one year older. Moreover, biological samples with rich protein content tend to form a thin layer of denaturated proteins between the two phases of the measurement solution, thus obstructing chemical interactions between them. Further centrifugation of these samples solves this problem in most cases. The use of reusable glass cuvettes is not recommended because denaturated proteins of the samples form a thin film in their walls and alter the absorbance readings in the photometer.

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
0,5h <sub>CrO5</sub>	15	59.122	1.344719	57.54	60.65
2h <sub>CrO5</sub>	15	37.244	3.191571	34.09	41.43
4h <sub>CrO5</sub>	15	48.452	5.608917	41.74	53.92
12h <sub>CrO5</sub>	15	33.178	5.336405	25.46	39.96
0,5h <sub>TEAC</sub>	15	80.544	4.344785	75.91	85.53
2h <sub>TEAC</sub>	15	72.222	7.907174	62.18	82.88
4h <sub>TEAC</sub>	15	74.678	5.025984	68.34	81.7
12h <sub>TEAC</sub>	15	64.882	4.169432	57.81	68.11

Fig. 11. Spearman's correlation of the two assays ( $\text{CrO}_5$  and TEAC) at 0.5, 2, 4 and 12 h after the myocardial infarction. Note the accuracy of  $\text{CrO}_5$  at 0.5 h and 2 h (smaller standard deviation values).



The Blue  $\text{CrO}_5$  assay is probably suitable for the detection of the oxidative capacity of a given sample, since  $\text{CrO}_5$  is produced only in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , even at low concentrations. Preliminary results of our own seem to confirm this ability of the assay. It is currently used in our laboratory for the estimation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological samples with very promising results.

In conclusion, the Blue  $\text{CrO}_5$  is a relatively simple, stable, cost-effective assay with notable specificity, linearity and reproducibility. It also has an advantage over the other existing spectrophotometric methods in estimating both water- and lipid-soluble antioxidants, thus making it very promising.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Professor J. Deligiannakis and Doctorate student K. Christoforidis for their contribution in the EPR spectra of the assay.

#### References

- [1] Oxidative stress: introductory remarks, in: H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985, pp. 1–8.
- [2] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 1989, 416–508.
- [3] D.G. Lindsay, Diet and ageing: the possible relation to reactive oxygen species, *J. Nutr. Health Aging* 3 (2) (1999) 84–91.
- [4] L. Risom, P. Møller, S. Loft, Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution, *Mutat. Res.* 592 (1–2) (2005 Dec 30) 119–137.
- [5] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408 (6809) (2000 Nov 9) 239–247.
- [6] B. Chakravarti, D.N. Chakravarti, Oxidative modification of proteins: age-related changes, *Gerontology* 53 (3) (2007) 128–139.
- [7] M.A. Yorek, The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease, *Free Radic. Res.* 37 (5) (2003 May) 471–480.
- [8] E. Trushina, C.T. McMurray, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases, *Neuroscience* 145 (4) (2007 Apr 14) 1233–1248.
- [9] J.E. Knaunig, L.M. Kamendulis, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004) 239–267.
- [10] J.M. Gutteridge, B. Halliwell, Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2000) 136–147.
- [11] K.J. Yeum, R.M. Russell, N.J. Kirsinsky, G. Aldini, Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma, *Arch. Biochem. Biophys.* 430 (1) (2004 Oct 1) 97–103.
- [12] J.M. Matés, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology* 153 (1–3) (2000 Nov 16) 83–104.
- [13] M. Valko, D. Leibfriz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (1) (2007) 44–84.
- [14] C.D. Putnam, A.S. Arvai, Y. Bourne, J.A. Tainer, Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, *J. Mol. Biol.* 296 (1) (2000 Feb 11) 295–308.
- [15] H. Kühn, A. Borchert, Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2) (2002 Jul 15) 154–172.
- [16] H. Imai, Y. Nakagawa, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2) (2003 Jan 15) 145–169.
- [17] P. Aisen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (10) (2001 Oct) 940–959.
- [18] A.C. Chua, R.M. Graham, D. Trinder, J.K. Olynyk, The regulation of cellular iron metabolism, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44 (5–6) (2007) 413–459.
- [19] E.I. MacKenzie, K. Iwasaki, Y. Tsuji, Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (6) (2008 Jun) 997–1030.
- [20] N.E. Hellman, J.D. Gitlin, Ceruloplasmin metabolism and function, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 439–458.
- [21] W. Maret, Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc, *Exp. Gerontol.* 43 (5) (2008 May) 363–369.
- [22] Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition* 18 (10) (2002 Oct) 872–879.
- [23] C.L. Fattman, L.M. Schaefer, T.D. Oury, Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (3) (2003 Aug 1) 236–256.
- [24] E.G. Ottaviano, D.E. Handy, J. Loscalzo, Redox regulation in the extracellular environment, *Circ. J.* 72 (1) (2008 Jan) 1–16.
- [25] R. Stocker, Antioxidant activities of bile pigments, *Antioxid. Redox Signal.* 6 (5) (2004 Oct) 841–849.
- [26] A.M. James, R.A. Smith, M.P. Murphy, Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q, *Arch. Biochem. Biophys.* 423 (1) (2004 Mar 1) 47–56.
- [27] R.E. Beyer, The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 545–565.
- [28] H.R. Griffiths, et al., *Mol. Aspects Med.* 23 (2002) 101–208.
- [29] R.L. Prior, C. Cao, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1173–1181.
- [30] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, C. Rice-Evans, et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [31] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (6) (2000 Mar 15) 860–870.
- [32] S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (3) (1997) 411–421.
- [33] G. Grampp, S. Landgraf, T. Wesierski, et al., Kinetics of the formation of the blue complex  $\text{Cr}(\text{O})_2$  formed by dichromate and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in acid solutions. A stopped-flow investigation using rapid-scan UV-VIS detection, *Monatsh. Chem.* 133 (2002) 1363–1372.
- [34] K.S. Kilgore, B.R. Lucchesia, Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response, *Clin. Biochem.* 26 (1993) 359–370.
- [35] J.L. Zweier, M.A. Talukder, The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 70 (2) (2006 May 1) 181–190.



