



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**“Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων συστατικών
διατροφικών προϊόντων”**

Ιωάννης Β. Σίμος

Κλινικός Διαιτολόγος-Διατροφολόγος, MSc (Med.Sci)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

«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. Σίμου Ιωάννη: 27-5-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 512^α/23-9-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητή Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία

Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας, Λέκτορας Φυσιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 25-11-2003

«Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων συστατικών διατροφικών προϊόντων»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 677^α/9-2-2010

1. Ανωγειανάκης Γεώργιος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου ΑΠΘ
2. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος Καθηγητής Χημείας, Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Στεφάνου Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητή Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία, 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 «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-9-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



Αφιερώσεις

Στους γονείς μου, Βασίλη και Δήμητρα,
για την αμέριστη υποστήριξη στη διάρκεια των σπουδών μου

«Res, non verba»

«Πράξεις, όχι λόγια»

Πρόλογος

Οι φλαβανόλες είναι αντιοξειδωτικά που ανήκουν στα φλαβονοειδή τα οποία είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες. Καλές πηγές κατεχινών είναι το τσάι, το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, τα μούρα και τα μήλα. Η ιατρική έρευνα έχει αποκαλύψει στοιχεία που αποδεικνύουν ότι κατεχίνες είναι ευεργετικές για τη διατήρηση της καλής υγείας των ανθρώπων, καθώς και των φυτών. Σε εργαστηριακές δοκιμές, οι κατεχίνες που υπάρχουν στο τσάι έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Εκτός από αυτό, είναι σε θέση να εμποδίσουν τη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών, μόρια που προκαλούν κυτταρική βλάβη που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα των ερευνών που σχετίζονται με μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν ξεκάθαρη σημασία. Μερικές μελέτες δείχνουν ότι τα άτομα που έχουν αυξημένη κατανάλωση τσαγιού έχουν μειωμένο κίνδυνο ορισμένων τύπων καρκίνου, αλλά υπάρχουν και άλλες μελέτες από τις οποίες δεν έχουν προκύψει ενδείξεις ότι η κατανάλωση του τσαγιού έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία.

Τα τελευταία χρόνια τα τρόφιμα με αυξημένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχουν χαρακτηριστεί ως λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) ή τροφοφάρμακα (nutraceuticals), τρόφιμα δηλαδή των οποίων η κατανάλωση έχει άμεση σχέση με τη βελτίωση της υγείας και την αντιμετώπιση ασθενειών. Στο πλαίσιο αυτό η βιομηχανία τροφίμων επικαλείται αυτές τις ιδιότητες και τονίζει την ανωτερότητα των προϊόντων με ετικέτες που συνοδεύουν τα τρόφιμα.

Το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων έχει να επιδείξει σημαντικό ερευνητικό έργο στο τομέα βιολογικών δράσεων αντιοξειδωτικών ενώσεων, κυρίως του ασκορβικού οξέος και της α-τοκοφερόλης, καθώς επίσης και φυτικών εκχυλισμάτων που επιδεικνύουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η μελέτη των βιολειτουργικών ιδιοτήτων των ενώσεων καθώς και η διευκρίνιση του ακριβή ρόλου τους στη προώθηση και διατήρηση της καλής υγείας και στην πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών καθώς και η πιθανή χρήση τους ως φαρμακευτικά σκευάσματα αποτέλεσε στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Με αυτό το σκεπτικό και με γνώμονα τη σύνδεση της Επιστήμης της Διατροφής με τη Φυσιολογία και τις «ιατρογενείς» ιδιότητες των φυσικών τροφών ξεκίνησε το νέο αυτό ταξίδι. Στο τέλος του δε μου απομένει πια να κοιτάξω πίσω και να ευχαριστήσω όλους όσους ταξίδεψαν μαζί μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή μου κ. Άγγελο Ευαγγέλου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, για τη άριστη συνεργασία μας, την επίβλεψη και τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές, τη βοήθεια στη συγγραφή και ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής καθώς και εμπιστοσύνη και την συμπαράσταση που μου έδειξε.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα για τις χρήσιμες υποδείξεις του και την παροχή γνώσεων στο σχεδιασμό και υλοποίηση της διατριβής..

Ευχαριστώ τον Ιατρό-Βιοπαθολόγο κ. Χριστόδουλο Σιούτη για τη πολύτιμη βοήθεια του καθώς επίσης και τον Υπ. Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Παν/μιου Ιωαννίνων κ. Ιωάννη Ζιώρη για τις τεχνικές συμβουλές και την καθοδήγηση στην ανάλυση των δειγμάτων.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στο Βιολόγο-Βιοτεχνολόγο Ιωάννη Βεργινάδη για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια καθώς επίσης για την αμέριστη συμπαράσταση του και βοήθεια. Ευχαριστώ επίσης τον Βιολόγο Αποστόλη Μέτσιο, τον Μοριακό Βιολόγο Ηλία Καραγκούνη και τη Βιοτεχνολόγο Αναστασία Βελαλοπούλου για το όμορφο και

ζεστό κλίμα εργασίας που δημιούργησαν στο χώρο εργασίας μας καθώς επίσης και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ευχαριστώ επίσης 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 μας.

Από τα βάθη της καρδιά μου ευχαριστώ τους γονείς μου που στάθηκαν δίπλα μου με αγάπη και κατανόηση όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	3
1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	3
1.1.1 Ορισμός.....	3
1.1.2 Το όξον ως παράγοντας πρόκλησης οξειδωτικού στρες.....	5
1.1.3 Συνέπειες οξειδωτικού στρες σε κυτταρικό επίπεδο.....	9
1.1.4 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες.....	13
1.1.5 Οξειδωτικό στρες ως παράγοντας κινδύνου και πρόκλησης ασθενειών.....	19
1.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ: ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	27
1.2.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	31
1.2.2 Μέταλλα και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους.....	41
1.2.3 Βιταμίνη C και E.....	43
1.2.4 Καροτενοειδή.....	48
1.2.5 Φαινόλες.....	50
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	55
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	59
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
3.1 IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ	63
3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια.....	63
3.1.2 Κυτταρική καλλιέργεια	64
3.1.3 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση χρωστικής Trypan Blue Exclusive Assay	64
3.1.4 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT assay.....	65
3.1.5 Κυτταρομετρία ροής.....	66
3.1.6 Αντιοξειδωτική Ικανότητα.....	67
3.1.7 Στατιστική ανάλυση.....	67
3.2 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ	68
3.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια.....	68
3.2.2 Σχεδιασμός πειράματος.....	68
3.2.3 Πειραματικό πρωτόκολλο.....	69
3.2.4 Συλλογή και Διαχείριση δειγμάτων αίματος	74
3.2.5 Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	76
3.2.6 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.....	77
3.2.7 Μέτρηση οξείδωσης λιπιδίων.....	78
3.2.8 Επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου στο πλάσμα και τα ούρα	80
3.2.9 Δείκτες φλεγμονής.....	80
3.2.10 Στατιστική ανάλυση.....	81

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
4.1 <i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	83
4.1.1 Έλεγχος βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας.....	83
4.1.2 Έλεγχος κυτταρικής πολλαπλασιαστικότητας.....	88
4.1.3 Κυτταρομετρία ροής.....	100
4.1.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα	104
4.2 <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	105
4.2.1 Φάση I. Πρόκληση οξειδωτικού στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε διάφορες δόσεις	105
4.2.2 Φάση II. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή μίγματος κατεχινών σε νεαρούς επίμνες Wistar	107
4.2.3 Φάση III. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμνες Wistar.....	116
4.2.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων Φάσης II και III	125
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	141
7. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	143
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	155
9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	171

Εισαγωγή

1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1 Οξειδωτικό στρες

1.1.1 Ορισμός

Στους υγιείς αερόβιους οργανισμούς, η παραγωγή των ενεργών ριζών (Reactive Species-RS) είναι περίπου ισοδύναμη με την ικανότητα απομάκρυνσης τους από τα αντιοξειδωτικά συστήματα. Ωστόσο, η ισορροπία αυτή δεν είναι τέλεια με αποτέλεσμα λόγω των ενεργών ριζών κάποιες βλάβες να συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο ή επίπεδο ιστών. Ουσιαστικά, η αντιοξειδωτική άμυνα ενός οργανισμού ελέγχει τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και δεν τα εξαλείφει οριστικά. Αυτό συμβαίνει γιατί η διατήρηση της αντιοξειδωτικής άμυνας σε αρκετά υψηλό επίπεδο έχει ένα ενεργειακό κόστος -που πιθανόν η επισκευή ή η αντικατάσταση των κατεστραμμένων βιομορίων να είναι ενεργειακά φθηνότερη. Επίσης είναι πιθανό τα αντιοξειδωτικά να μην έχουν την ικανότητα να αναχαιτίσουν κάποιες από τις ελεύθερες ρίζες. Ένα ακόμα λόγος είναι ότι οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο *in vivo*. Π.χ. η ρύθμιση των κυτταρικών διαδικασιών γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης και απόφωσφορυλίωσης ενζύμων και μεταγραφικών παραγόντων αλλά και μέσω οξείδωσης και αναγωγής (redox regulation). Επομένως το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα πρέπει να ελαχιστοποιήσει τα επίπεδα των περισσότερων ελευθέρων ριζών και ωστόσο να επιτρέπει την παραμονή αρκετών από αυτών για να επιτελέσουν το σημαντικό ρόλο τους (Halliwell and Gutteridge 2007).

Η αυξημένη αναλογία ελευθέρων ριζών σε σχέση με τα διαθέσιμα αντιοξειδωτικά συχνά αποκαλείται οξειδωτικό στρες. Ωστόσο αν και ο όρος χρησιμοποιείται πολύ συχνά

στη βιβλιογραφία των ελευθέρων ριζών δεν είναι τόσο ξεκάθαρος. Σύμφωνα με τον Sies, ο οποίος εισάγαγε αρχικά τον όρο το 1985, οξειδωτικό στρες είναι «μια διαταραχή στη προοξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ του πρώτου, που οδηγεί σε πιθανές βλάβες» (Sies 1991). Αυτή η βλάβη συχνά αποκαλείται οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με τους Halliwell and Whiteman, «οξειδωτικό στρες είναι η βιομοριακή βλάβη που προκαλείται από την επίθεση ελευθέρων ριζών εναντίων συστατικών των ζώντων οργανισμών» (Halliwell and Whiteman 2004). Οι βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες δεν είναι όλες οξειδωτικές βλάβες. Αυξημένη οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκύψει όχι μόνο από αυξημένο οξειδωτικό στρες, αλλά επίσης από αποτυχία επισκευής ή αντικατάστασης των αντιοξειδωτικών συστημάτων.

Κατά κανόνα, το οξειδωτικό στρες προέρχεται από:

1. μειωμένη ποσότητα αντιοξειδωτικών, π.χ. μεταλλαγές που μειώνουν τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως της γλουταθειόνης (GSH) και της MnSOD. Η εξάντληση των διαιτητικών αντιοξειδωτικών και άλλων σημαντικών διαιτητικών συστατικών (π.χ. χαλκού, σιδήρου, ψευδάργυρου, μαγνήσιο) μπορεί επίσης να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες.

και/η

2. αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, π.χ. έκθεση σε υπερβολική ποσότητα O₂, η παρουσία τοξινών που παράγουν ελεύθερες ρίζες, ή η υπερβολική ενεργοποίηση των «φυσιολογικών» συστημάτων για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, π.χ. αναίτια ενεργοποίηση των φαγοκυτταρικών κυττάρων σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις.

1.1.2 Το όζον ως παράγοντας πρόκλησης οξειδωτικού στρες

Το όζον (τριατομικό οξυγόνο) που συντίθεται στην στρατόσφαιρα και προστατεύει τη γη από την υπερβολική υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί με τη χρήση μιας ιατρικής γεννήτριας και να χρησιμοποιηθεί από επαγγελματίες ως θεραπευτική αγωγή. Το όζον είναι ένα από τα πιο ισχυρά οξειδωτικά, και είναι απαραίτητο να διευκρινιστεί η δράση του ως θεραπευτικός παράγοντας από την τοξική του δράση.

Το όζον διαλύεται στο νερό του πλάσματος (το υγρό στοιχείο του αίματος) ή στα εξωκυτταρικά υγρά, ή στο λεπτό στρώμα νερού που καλύπτει το δέρμα και συγκεκριμένα τους βλενογόννους του αναπνευστικού σωλήνα, εντέρου κτλ. Σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και ατμοσφαιρικής πίεσης, λόγω της υψηλής διαλυτότητας του και ανάλογα με τη σχετική του πίεση, ένα μέρος του όζοντος διαλύεται στο νερό αλλά, σε αντίθεση με το οξυγόνο, δεν εξισορροπείται με το όζον που βρίσκεται στην αέρια φάση. Αυτό συμβαίνει γιατί, το όζον ως ισχυρό οξειδωτικό, αντιδρά άμεσα με ένα αριθμό μορίων που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά, όπως αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και κατά προτίμηση πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs).

Η αντίδραση του όζοντος με τόσα πολλά μόρια υπονοεί την ύπαρξη δύο θεμελιωδών διαδικασιών:

1. Η αρχική αντίδραση του όζοντος, όπου ένα μέρος της δόσης όζοντος αναπόφευκτα καταναλώνεται κατά την οξείδωση του ασκορβικού και ουρικού οξέος, σουλφυδρικών ομάδων (-SH) των πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών. Αν και η αλβουμίνη, ασκορβικό οξύ και ουρικά οξέα «αναχαιτίζουν» την κυρία δραστηριότητα του όζοντος (Halliwell 1996), επιτρέπουν την πρώτη αυτή αντίδραση που είναι σημαντική γιατί παράγει ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen

Species-ROS), που ενεργοποιούν ορισμένα βιοχημικές διεργασίες στο αίμα *ex vivo*.

Τα ROS απενεργοποιούνται μέσα σε 0.5-1 λεπτό από το αντιοξειδωτικό σύστημα.

2. Η επόμενη αντίδραση είναι γνωστή ως υπεροξειδωση των λιπιδίων (Pryor *et al.* 1995). Στο υδρόφιλο περιβάλλον του πλάσματος, ένα γραμμομόριο ολεφίνης (ειδικότερα αραχιδονικού οξέος που βρίσκεται στα τριγλυκερίδια και χυλομικρά του πλάσματος) και ένα γραμμομόριο όζοντος οδηγούν στη δημιουργία δύο γραμμομορίων αλδεϊδών και ενός γραμμομόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Αυτές οι δύο αντιδράσεις, πραγματοποιούνται εντός δευτερολέπτων, καταναλώνουν όλη τη ποσότητα του όζοντος και παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου, ένα οξειδωτικό μόριο αλλά όχι ρίζα (συχνά συμπεριλαμβάνεται στην οικογένεια των ROS) και μία ποικιλία αλδεϊδών γνωστών ως Προϊόντα Οξειδωσης Λιπιδίων (Lipid Oxidation Products-LOPs).

Από εδώ και στο εξής, όχι το όζον αλλά μόνο τα ROS (κυρίως το H_2O_2) και τα LOPs ευθύνονται για τις συνεχείς και πολλαπλές βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στα διάφορα κύτταρα σε όλο το σώμα.

Μόλις το όζον διαλυθεί στο νερό του πλάσματος αντιδρά με τα PUFAs, η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνεται ακαριαία και στη συνέχεια μειώνεται γιατί αυτό το μη ιονισμένο μόριο διαχέεται γρήγορα στα ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια όπου ενεργοποιεί διάφορες βιοχημικές διεργασίες. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του H_2O_2 σε καμία περίπτωση δεν γίνεται τοξική. Και αυτό γιατί ανάγεται μέσα στο νερό τόσο του πλάσματος όσο και το ενδοκυτταρικό από πανίσχυρα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως οι καταλάσες, οι GPx και η GSH (Bocci 2005).

Υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με τη κυτταροτοξικότητα των LOPs. Αυτές οι ενώσεις όταν εξετάστηκαν σε καλλιέργειες ιστών ή στο περιεχόμενο του ευαίσθητου αναπνευστικού συστήματος, είναι τοξικές ακόμα και σε συγκεντρώσεις του 1 micromolar.

Συγκεντρώσεις, μικρότερες από 1 micromolar (0.5-1 micromolar) που δοκιμάστηκαν σε διάφορες κυτταρικές σειρές ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό και είναι χρήσιμες για βιοχημικές δραστηριότητες. Αυτό δείχνει ότι η τοξικότητα των LOPs εξαρτάται από την τελική τους συγκέντρωση και την ιστική εστίαση, ώστε να μπορούν να δράσουν είτε ως επιβλαβείς είτε ως χρήσιμοι παράγοντες (Larini and Bocci 2005; Bosch-Morell *et al.* 1999).

Συνοπτικά, η *in vivo* τοξικότητα των LOPs, σε δόσεις όζοντος εντός θεραπευτικών ορίων, θεωρείται αμελητέα για τους εξής λόγους:

1. Η διάλυση (150-200 φορές) αυτών των ενώσεων που γίνεται στο αίμα και στα υγρά του αίματος γρήγορα μειώνει την αρχική τους συγκέντρωση σε φαρμακολογικά αλλά όχι τοξικά επίπεδα.
2. Παρατηρείται ουδετεροποίηση των LOPs λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υγρών του σώματος και κυττάρων.
3. Συμβαίνει αποτοξίνωση των LOPs λόγω της αλληλεπίδρασης με δισεκατομμύρια κύτταρα που περιέχουν αποτοξινωτικά ένζυμα όπως δεϋδρογενάσες της αλδεϋδης και της αλκοόλης, ή αλδόζη και διάφορες GSH τρανσφεράσες (GSH-T).
4. Παρατηρείται αποβολή των LOPs στα ούρα και τη χολή μετά από ηπατική αποτοξίνωση και νεφρική απέκκριση.
5. Υφίσταται βίο-δραστηκότητα χωρίς τοξικότητα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί μικρομοριακές συγκεντρώσεις LOPs μπορούν να δράσουν ως φυσιολογικοί αγγελιοφόροι ικανοί να ενεργοποιήσουν ένα βιολογικό σύστημα που δεν λειτουργεί σωστά.

Συνοψίζοντας, όταν το ανθρώπινο αίμα εκτίθεται σε θεραπευτική δόση μίγματος οξυγόνου-όζοντος λαμβάνουν χώρα οι εξής διεργασίες:

Και τα δύο αέρια διαλύονται στο νερό του πλάσματος ανάλογα με τη διαλυτότητα τους, την μερική πίεση και την θερμοκρασία. Ενώ το οξυγόνο γρήγορα έρχεται σε ισορροπία μεταξύ της αέριας φάσης και της διαλυμένης στο αίμα φάσης, το 10-φορές πιο ευδιάλυτο όζον δεν μπορεί να έρθει σε ισορροπία γιατί αντιδρά με βιομόρια (PUFA, αντιοξειδωτικά) που βρίσκονται στο πλάσμα. Η αντίδραση παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (καθώς και άλλα πιθανά ROS) και LOPs. Η ραγδαία αύξηση στο πλάσμα της συγκέντρωσης του H₂O₂ δημιουργεί ένα δυναμικό, το οποίο προκαλεί τη γρήγορη μεταφορά του μέσα στα ερυθρά κύτταρα, όπου μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα ενεργοποιεί αρκετές βιοχημικές διεργασίες και ταυτόχρονα ανάγεται σε νερό από το αποδοτικό ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό σύστημα (GSH, καταλάση, GSH-Px). Αυτό οδηγεί σε ένα ελεγχόμενο, έντονο και προοδευτικό οξειδωτικό στρες απαραίτητο για τη βιολογική ενεργοποίηση, χωρίς ταυτόχρονη τοξικότητα, όσο βέβαια η δόση του όζοντος είναι συμβατή με το αντιοξειδωτικό δυναμικό του αίματος. Ενώ τα ROS είναι υπεύθυνα για τα άμεσες βιολογικές δράσεις, τα LOPs είναι σημαντικά για τις μετέπειτα βιολογικές δράσεις.

Πρέπει να τονιστεί ότι όταν το αίμα εκτίθεται στο όζον ακολουθεί μια μεταβατική περίοδος οξειδωτικού στρες απαραίτητη για να ενεργοποιήσει βιολογικές λειτουργίες με επιζήμια αποτελέσματα. Το στρες πρέπει να είναι επαρκές για να ενεργοποιήσει φυσιολογικούς μηχανισμούς, αλλά όχι υπερβολικό για να καταβάλλει το ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό σύστημα και προκαλέσει βλάβες. Από την άλλη πλευρά πολύ χαμηλές δόσεις όζοντος (κάτω του ορίου) ουδετεροποιούνται άμεσα από το πλήθος των αντιοξειδωτικών του πλάσματος και μπορεί να προκληθεί μόνο ένα εικονικό αποτέλεσμα (placebo effect) (Bocci 2005).

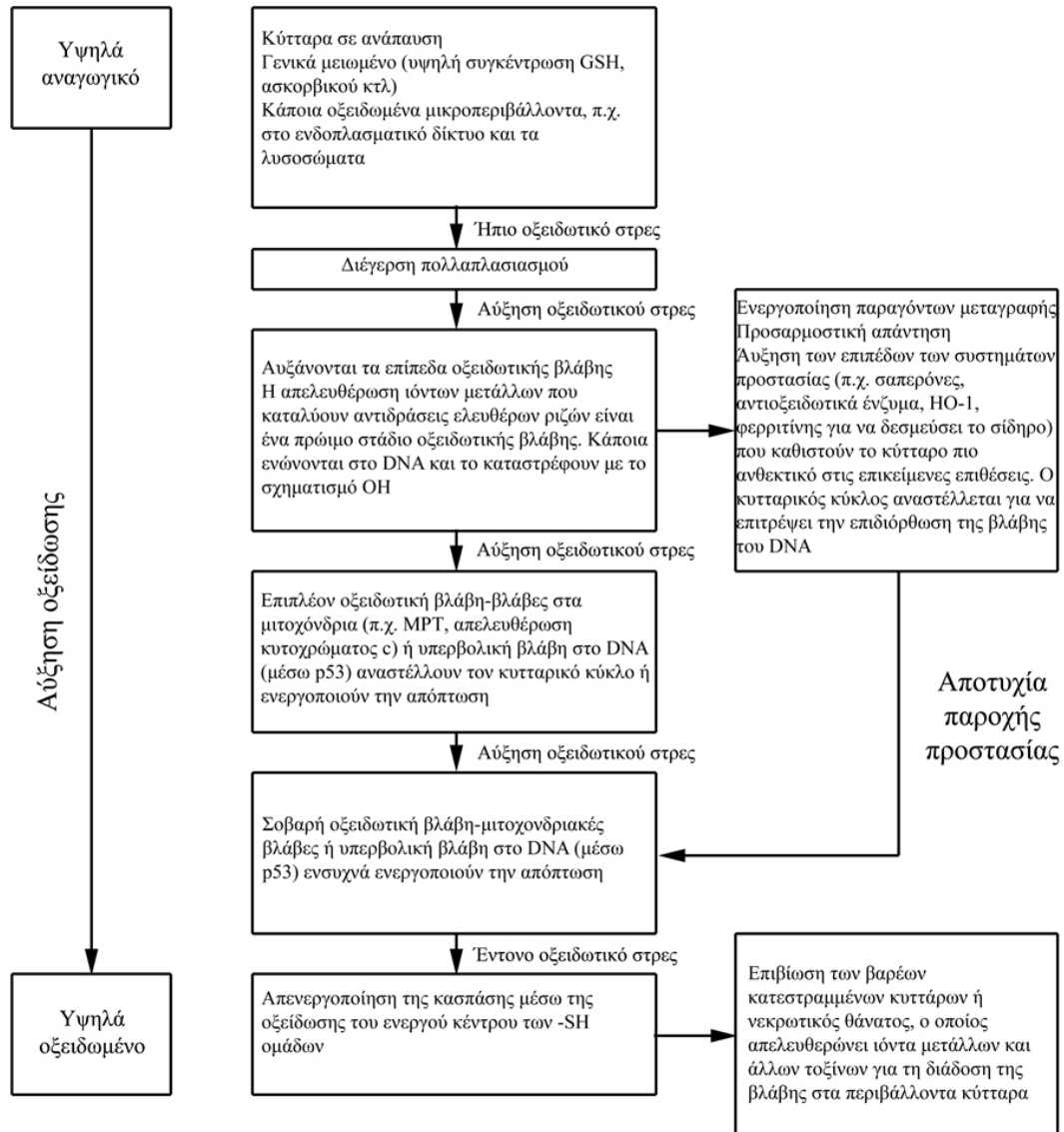
1.1.3 Συνέπειες οξειδωτικού στρες σε κυτταρικό επίπεδο

Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες συμπεριλαμβάνουν τα παρακάτω ή και ακόμα συνδυασμούς των παρακάτω, σε ένα βαθμό που εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και τη δριμύτητα του οξειδωτικού στρες (Σχήμα 1) (Halliwell and Gutteridge 2007).

1. Αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Πολλά κύτταρα αντιδρούν στο ήπιο οξειδωτικό στρες με πολλαπλασιασμό.
2. Προσαρμογή του κυτταρικού οργανισμού με ρύθμιση των αμυντικών συστημάτων, τα οποία μπορεί: α) να παρέχουν πλήρη προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, β) να παρέχουν μερική προστασία αλλά όχι πλήρη, ή γ) να παρέχουν «υπερπροστασία»-τα κύτταρα τότε γίνονται πιο ανθεκτικά σε υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες.
3. Κυτταρικός τραυματισμός. Περιλαμβάνει βλάβη σε όλους ή κάποιους μοριακούς στόχους: λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, κτλ.
4. Διαδικασία γήρατος. Τα κύτταρα επιβιώνουν αλλά έχουν χάσει την ικανότητα διαίρεσης.
5. Κυτταρικός θάνατος. Μετά τον τραυματισμό το κύτταρο μπορεί: α) να επανέλθει από την οξειδωτική βλάβη με την επιδιόρθωση ή αντικατάσταση των ελαττωματικών μορίων, η β) μπορεί να επιβιώσει με παρούσες βλάβες από το οξειδωτικό στρες, ή γ) η οξειδωτική βλάβη, ειδικά στο DNA, μπορεί να ενεργοποιήσει το θάνατο μέσω απόπτωσης, νέκρωσης, ή με ενδιάμεσους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου των δύο αυτών οδών.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι πολύ επιζήμια, διότι οδηγεί σε αλλαγές στις βιολογικές ιδιότητες της μεμβράνης, όπως στο βαθμό ρευστότητας, και μπορεί να οδηγήσει σε αδρανοποίηση των

υποδοχέων των μεμβρανών ή των ενζύμων, που με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και να αυξήσουν τη διαπερατότητα των ιστών (Danne-Dolle *et al.* 2006).



Σχήμα 1. Πως αντιδρούν τα κύτταρα στο οξειδωτικό στρες. Από: Halliwell and Gutteridge, 2007.

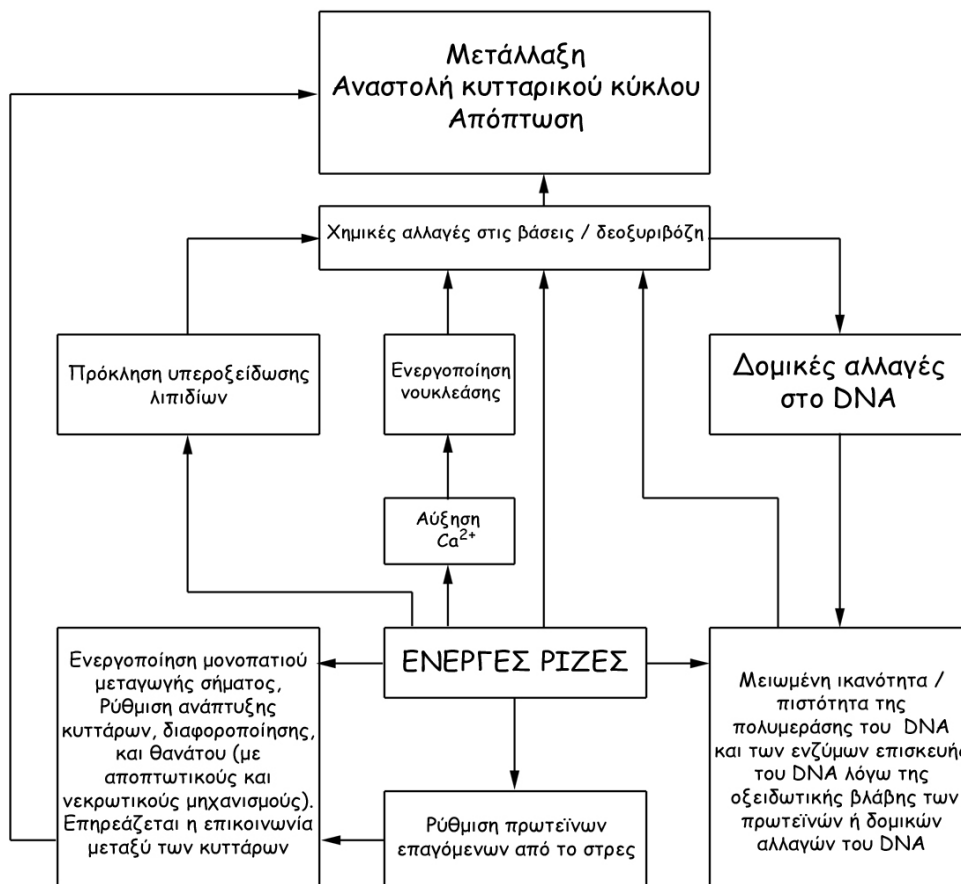
Επιπλέον, η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να συνεισφέρει και να επεκτείνει τις κυτταρικές βλάβες μέσω της παραγωγής των οξειδωμένων προϊόντων, μερικά από τα

οποία είναι χημικά αντιδραστήρια και τροποποιούν ομοιοπολικά κρίσιμα μακρομόρια. Τα προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, συνεπώς, χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες/βλάβης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων παράγει μια ποικιλία από σχετικά σταθερά τελικά προϊόντα αποσύνθεσης, όπως α,β-ακόρεστες αλδεΐδες, όπως μαλονική διαλδεΐδη (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), και 2-propenal (ακρολεΐνη) (Carini *et al.* 2004), και ισοπροστάνες (Montuschi *et al.* 2004), τα οποία μπορεί στη συνέχεια να μετρηθούν στο πλάσμα και στα ούρα ως έμμεσοι δείκτες του οξειδωτικού στρες. Σε σύγκριση με τις ελεύθερες ρίζες, οι αλδεΐδες είναι σχετικά σταθερές και μπορούν να διοχετευτούν στο εσωτερικό ή ακόμα και ξεφύγουν από το κύτταρο και να επιτεθούν σε στόχους μακριά από το τόπο του αρχικού συμβάντος. Ως εκ τούτου, δεν είναι μόνο τελικά προϊόντα και υπολείμματα των διαδικασιών υπεροξειδωσής των λιπιδίων, αλλά ενεργούν επίσης ως «δευτερογενείς αγγελιαφόροι κυτταροτοξικότητας» από την πρωτογενή αντίδραση (Uchida 2003). Ορισμένες από αυτές τις αλδεΐδες έχει αποδειχθεί ότι αντιδρούν με διάφορα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων πρωτεϊνών, του DNA, καθώς και φωσφολιπιδίων, δημιουργώντας σταθερά προϊόντα στο τέλος μιας σειράς αντιδράσεων που θεωρείται ότι συμβάλλουν στην παθογένεση πολλών ασθενειών.

Οι πρωτεΐνες είναι οι κύριοι στόχοι των ROS/RNS, λόγω της αφθονίας τους στα βιολογικά συστήματα και επειδή είναι κυρίως υπεύθυνες για τις περισσότερες λειτουργικές διεργασίες στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες μπορεί να δεσμεύσουν το μεγαλύτερο μέρος (50% -75%) των ROS/RNS που παράγονται (Davies *et al.* 1999). Η έκθεση των πρωτεϊνών στα ROS/RNS μπορεί να μεταβάλει κάθε επίπεδο της δομής τους - από τη πρωτοταγή ως τη τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Οι οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες μπορούν να προκληθούν είτε άμεσα από τα ROS/RNS ή έμμεσα τα παραπροϊόντα το οξειδωτικού στρες και μέσω διαφόρων μηχανισμών, που οδηγούν σε διάσπαση των πεπτιδίων του κορμού, ή/και τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας σε κάθε

σχεδόν αμινοξύ (Davies 2005). Οι περισσότερες βλάβες στις πρωτεΐνες είναι ανεπανόρθωτες, και οι αλλαγές αυτές έχουν άμεση επίπτωση στη λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως στην αναστολή της ενζυματικής και δεσμευτικής δραστηριότητας τους, στην αυξημένη ευαισθησία, στη συσσώρευση και στην πρωτεόλυση, στην αυξημένη ή μειωμένη απορρόφηση από τα κύτταρα καθώς και στη τροποποιημένη ανοσογονικότητα (Stadtman *et al.* 2003). Η οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες είναι σημαντική *in vivo* όχι μόνο στις ίδιες τις πρωτεΐνες (που επηρεάζει, για παράδειγμα, τις λειτουργίες των υποδοχέων, ενζύμων, πρωτεϊνών-μεταφορέων), αλλά και επειδή η βλάβη αυτή μπορεί να συμβάλλει και σε δευτερογενείς βλάβες σε άλλα βιομόρια όπως για παράδειγμα, στην αδρανοποίηση των ενζύμων επισκευής του DNA και στην απώλεια πιστότητας των κατεστραμμένων πολυμερασών του DNA καθώς και στην αντιγραφή του DNA (Halliwell and Gutteridge 2007). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες καταβολίζονται αλλά ορισμένες λειτουργικά ανενεργείς πρωτεΐνες συσσωρεύονται μέσα στα κύτταρα ή το εξωκυττάριο περιβάλλον (Crune *et al.* 2003). Η συσσώρευση αυτών των πρωτεϊνών αυξάνει κατά τη διάρκεια της κανονικής διαδικασίας της γήρανσης και μπορεί να συμβάλλει στην πρόκληση μιας σειράς ασθενειών στον άνθρωπο επειδή δρα ως αναστολέας του πρωτεασώματος (Crune *et al.* 2004).

Συνοπτικά, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες με διάφορους τρόπους που αλληλεπικαλύπτονται και αλληλεπιδρούν με σύνθετους τρόπους. Για παράδειγμα, το DNA μπορεί να υποστεί άμεση οξειδωτική βλάβη από OH[·], έμμεση βλάβη με την πρόσδεση των τελικών προϊόντων της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων όπως 4-hydroxynonenal (HNE) και MDA, αποτυχία επιδιόρθωσης λόγω οξειδωτικής βλάβης στις πολυμεράσες και τα ένζυμα επιδιόρθωσης, ανακριβή αντιγραφή από κατεστραμμένες πολυμεράσες και δυσλειτουργία των νουκλεάσων που ενεργοποιήθηκαν από την αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων Ca²⁺ (Σχήμα 2).

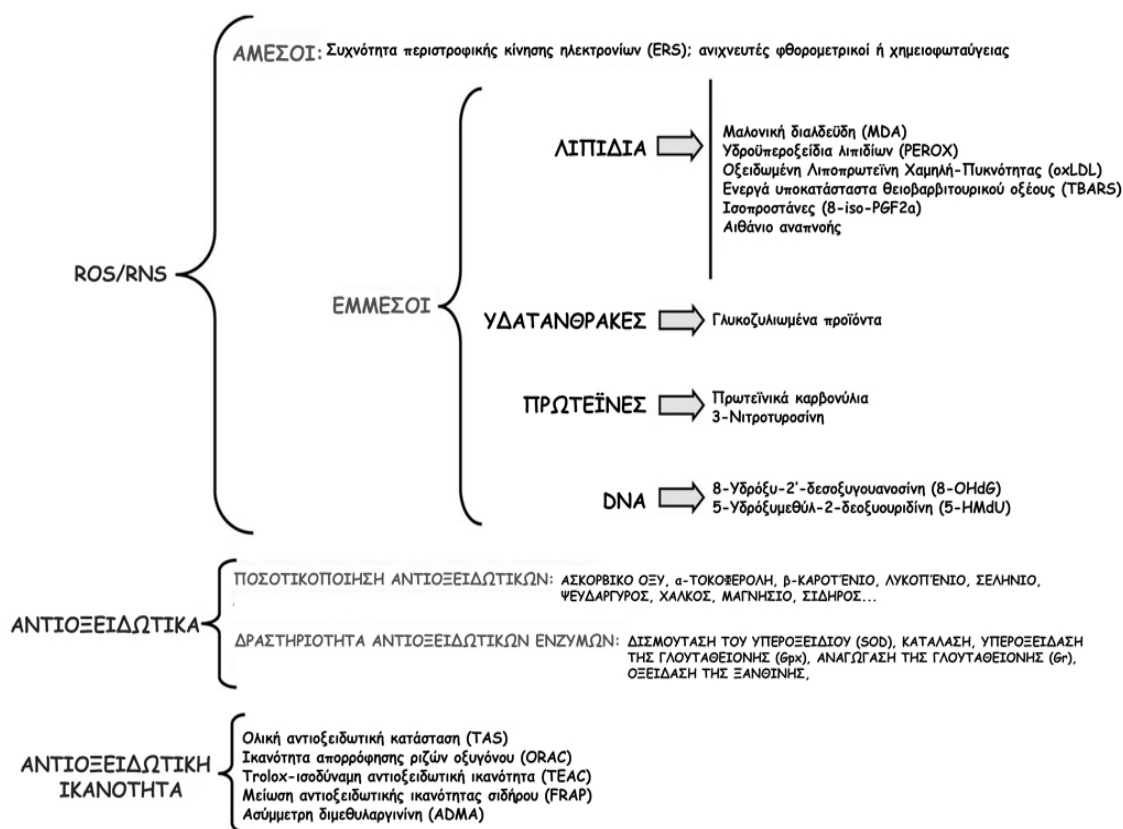


Σχήμα 2. Μερικοί από τους μηχανισμούς με τους οποίους το οξειδωτικό στρες επηρεάζει το DNA. Από Halliwell and Gutteridge, 2007.

1.1.4 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες

Οι βιοδείκτες αποτελούν χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν αντικειμενικά να μετρηθούν και να αξιολογηθούν ως δείκτες φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθολογικών διαδικασιών, ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση (Katz 2004). Οι κατάλληλοι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για

εξετάσεις διαπίστωσης της υγείας, για την διάγνωση μιας παθολογικής διεργασίας σε αρχικό στάδιο, στην εκτίμηση της απόκρισης στη θεραπεία και πρόγνωση, στην ασφάλεια και στην αποτελεσματική ανάπτυξη ενός φαρμάκου, καθώς και στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας φαρμάκων, τροφίμων, ποτών και συμπληρωμάτων. Οι βιοδείκτες επίσης χρησιμοποιούνται για την ακριβή μέτρηση του οξειδωτικού στρες *in vivo* και η μη παρεμβατική μέτρηση των επιπέδων ενός βιοδείκτη στη κυκλοφορία μπορεί να βελτιώσει τον κίνδυνο της αξιολόγησης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Βιοδείκτες. Από Danne-Dolle *et al.* 2006.

Οι βιοδείκτες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα τρία προοδευτικά επίπεδα της έκβασης της νόσου: (α) ως μετρήσιμο τελικό σημείο βλάβης σε βιομόρια όπως λιπίδια και πρωτεΐνες; (β) ως λειτουργικοί δείκτες, για παράδειγμα, στη γνωστική λειτουργία; και (γ)

ως τελικά σημεία που σχετίζονται με συγκεκριμένη ασθένεια. Αν και τα κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι τα ίδια τελικά σημεία, δεν είναι κατάλληλα σε πολλές περιπτώσεις για την έγκαιρη διάγνωση και, ως εκ τούτου, για την πρόληψη των ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες. Θα πρέπει να επιλεγθεί μια σειρά βιολογικών δεικτών, οι οποίοι θα αξιολογούνται σε αλληλουχία (Danne-Dolle *et al.* 2006).

Ο επιθυμητός στόχος για ένα βιοδείκτη είναι να βοηθήσει στη διάγνωση συμπτωματικών και προσυμπτωματικών νόσων και την παροχή υποκατάστατων τελικών σημείων, για να αποδειχθεί η κλινική αποτελεσματικότητα νέων θεραπειών. Η χρησιμότητα του ιδανικού βιοδείκτη οξειδωτικής βλάβης έγκειται στην ικανότητά του να παρέχει πρώιμες ενδείξεις της νόσου ή/και της εξέλιξής της. Ένας έγκυρος βιοδείκτης του οξειδωτικού στρες θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: (α) να είναι ένα σταθερό προϊόν, και να μην επιδέχεται δομική επαγωγή, οξείδωση, ή απώλεια κατά τη διαχείριση των δειγμάτων, επεξεργασία, ανάλυση και αποθήκευση; (β) να είναι ένα μείζον προϊόν οξειδωτικής/nitrosative βλάβης που μπορεί να εμπλέκεται άμεσα στην εμφάνιση ή/και στην εξέλιξη της νόσου; (γ) να είναι προσιτός σε ένα ιστό-στόχο ή ένα έγκυρο υποκατάστατο που ποσοτικά αντικατοπτρίζει την οξειδωτική τροποποίηση του ιστού-στόχου; (δ) να είναι παρών σε συγκεντρώσεις ώστε να αποτελεί ένα σημαντικό προϊόν; (ε) να είναι εξειδικευμένος για τα συγκεκριμένα ενεργά είδη καθώς και απαλλαγμένος από παράγοντες σύγχυσης που προέρχονται από τη διαιτητική πρόσληψη; (στ) να είναι μη παρεμβατικός; (ζ) να είναι μετρήσιμος με μια ανάλυση που είναι συγκεκριμένη, ευαίσθητη και αναπαραγώγιμη; (η) να είναι εύκολος να ανιχνευθεί και μετρήσιμος στο πληθυσμό; (θ) να είναι παρών σε συγκεντρώσεις οι οποίες δεν διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στα ίδια πρόσωπα, στις ίδιες συνθήκες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές; (ι) να είναι μετρήσιμος σε σχετικά μικρές τιμές εντός της διακύμανσης της ανάλυσης σε σύγκριση με τις μεταξύ των προσώπων διακυμάνσεις (Danne-Dolle *et al.* 2006).

Μεταξύ των βιολογικών μορίων τα λιπίδια είναι τα περισσότερο επιδεκτικά στην επίθεση των ROS/RNS (Niki *et al.* 2005). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων επάγει μεταβολές στις ιδιότητες των βιολογικών μεμβρανών όπως διαταραχή της ακριβής δομής, απώλεια της λειτουργικότητας και της διαπερατότητας των βιομεμβρανών. Επίσης παράγει δυνητικά τοξικά προϊόντα τα οποία είναι χημικά ενεργά με ομοιοπολικές τροποποιήσεις σημαντικών μακρομορίων όπως πρωτεΐνες (Uchida 2003), βάσεων DNA (Marnett 2002) και πρωτεΐνες LDL σε προαθηρογόνες μορφές (Steinberg 2008). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων επίσης εμπλέκεται στην εκφύλιση των νεύρων (Misoek *et al.* 2007). Τα επίπεδα υπεροξειδωσης των λιπιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτης για τη μέτρηση του επιπέδου του οξειδωτικού στρες *in vivo*.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν άμεσο στόχο για τα ROS/RNS λόγω των υψηλών συγκεντρώσεών τους. Η οξειδωση τους μπορεί να οδηγήσει σε απαμίνωση, αποκαρβοξυλίωση, τροποποίηση του αρωματικού δακτυλίου, σπάσιμο των πεπτιδίων, και την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας, που οδηγούν τελικά στην αδρανοποίηση της δραστηριότητας των ενζύμων και τη συσσώρευση στο εσωτερικό των κυττάρων και εξωκυτταρικό περιβάλλον (Davies 2005). Αυτοί οι μεταβολίτες πρωτεϊνών είναι επίσης δυνητικοί βιοδείκτες. Οι βάσεις του DNA, επίσης, οξειδώνονται με αποτέλεσμα τη διάσπαση των δεσμών μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα να δώσουν πολλά είδη τροποποιημένων προϊόντων (Dizdaroglu *et al.* 2002), εκ των οποίων η 8-οξογουανοσίνη (8-oxoG) είναι ένας από τους πιο γνωστούς βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες (Kasai and Nishimura 1984). Επιπλέον, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών, ο λόγος ανηγμένων μορφών τους ως προς την οξειδωμένη μορφή, τα οξειδωμένα αντιοξειδωτικά, και αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι δυνατόν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (Kemp *et al.* 2008).

Πίνακας 1. Νόσοι του ανθρώπου που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες, βάσει των βιολογικών δεικτών του οξειδωτικού στρες (Danne-Dolle *et al.* 2006)

MDA: Νόσος Alzheimer's (AD), Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS), Άσθμα, Αθηροσκλήρωση, Δερματική λειψμανίαση, Σακχαρώδης διαβήτης, Προεκλαμψία

HNE: Νόσος Alzheimer's (AD), Αθηροσκλήρωση, Καρδιαγγειακή Νόσος, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), Ήπια γνωστική δυσλειτουργία, Νόσος Parkinson's (PD)

F₂-IsoPs: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), Οξεία και χρόνια αλκοολική ηπατική νόσος, Οξύ σύνδρομο στήθους δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, Νόσος Alzheimer's (AD), Άσθμα, Αθηροσκλήρωση, Καρδιοπνευμονική παράκαμψη, Καρδιαγγειακή Νόσος, Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), Στεφανιαία νόσος, Σύνδρομο Creutzfeldt-Jakob, Νόσος Crohn, Κυστική ίνωση, Διαβήτης (τύπου 1 και 2), Σύνδρομο Down, Καρδιακή ανεπάρκεια, Ηπατική κίρρωση, Νόσος Huntington, Υπερχοληστερολαιμία, Υπέρομοκυστεϊναιμία, Βλάβες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, Διάμεση πνευμονοπάθεια, Πολλαπλή σκλήρυνση, Έμφραγμα του μυοκαρδίου, Παχυσαρκία, Οστεοαρθρίτιδα, Οστεοπόρωση, Παγκρεατίτιδα, Πρωταρχική κίρρωση της χολής, Αρθρική ψωρίαση, Πνευμονική υπέρταση, Αντιδραστική αρθρίτιδα, Ρευματοειδής αρθρίτιδα, Δρεπανοκυτταρική αναιμία, Συστηματικός ερυθματώδης λύκος, Συστηματική σκλήρυνση, Ασταθής στηθάγχη, Σύνδρομο Zellweger

Μείωση συγκέντρωσης GSH και/ή λόγου GSH:GSSG: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), Αλκοολική ηπατοπάθεια, Νόσος Alzheimer's (AD), Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS), Αμάντωση, Άσθμα, Αταξία, Καρκίνος, Καρδιαγγειακή Νόσος, Καταρράκτης, Σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 1 και 2), HIV-θετικοί ασθενείς, Ιδιοπαθής

πνευμονική ίνωση, Ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, Νόσος Parkinson's (PD), Προεκλαμψία, Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS), Ρευματοειδής αρθρίτιδα, Σύνδρομο Werner

S-γλουταθειωμένες πρωτεΐνες: Καταρράκτης, Σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 1 και 2), Αταξία Friedreich, HIV, Υπερλιπιδαιμία, Καρκίνωμα από νεφρικά κύτταρα, Σφαιροκύτωση, Ουραιμία που σχετίζεται με αιμοδιάλυση ή περιτοναϊκή διάλυση, Κυστική ίνωση, Ρευματοειδής αρθρίτιδα

NO₂-Tyr: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS), Νόσος Alzheimer's (AD), Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS), Άσθμα, Αθηροσκλήρωση, Καρδιαγγειακή Νόσος, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), Στεφανιαία νόσος, Νόσος Crohn, Κυστική ίνωση, Σακχαρώδης διαβήτης (τύπου 1 και 2), Υπερχοληστερολαιμία, Καρκίνος πνεύμονα, Πολλαπλή σκλήρυνση, Φλεγμονές του μυοκαρδίου, Οστεοαρθρίτιδα, Προεκλαμψία, Ρευματοειδής αρθρίτιδα, Σοβαρή βρογχοπνευμονική δυσπλασία σε νεογνά

Cl-Tyr: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS), Άσθμα, Αθηροσκλήρωση, Καρδιαγγειακή Νόσος, Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, Στεφανιαία νόσος, Κυστική ίνωση, Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Di-Tyr: Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (ARDS), Αθηροσκλήρωση, Κυστική ίνωση, Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου

Καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες: Ασερουλοπλασμιναιμία, Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), Οξεία αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, Οξεία παγκρεατίτιδα, Νόσος Alzheimer's (AD), Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS), Άσθμα, Βρογχοπνευμονική δυσπλασία, Καταρράκτης, Σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, Χρόνια ηπατίτιδα C, Χρόνια νεφρική νόσος, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, Νόσος Crohn, Κυστική ίνωση, Διαβήτης (τύπου 1 και 2), Ελικοβακτηρίδιο, Ιδιοπαθής πνευμονική

ίνωση, Νεανική χρόνια αρθρίτιδα, Καρκίνος πνεύμονα, Μηνιγγίτιδα, Νόσος Parkinson's (PD), Προεκλαμψία, Ψωρίαση, Ρευματοειδής αρθρίτιδα, Σαρκοείδωση, Σήψη, Συστηματική αμυλοείδωση, Ουραιμία, Σύνδρομο Werner

Η χρήση των βιοδεικτών παρέχει μια λογική επιστημονική βάση για σημαντικές παρεμβάσεις με μελέτες αντιοξειδωτικών. Τέτοιες μελέτες θα μπορούσαν, με τη σειρά τους, τελικά να επικυρώσουν ή διαψεύσουν την έννοια των βιοδεικτών. Οποιαδήποτε δοκιμαστική παρέμβαση θα πρέπει να συνοδεύεται από μετρήσεις ενός ή περισσότερων σχετικών βιοδεικτών ανά τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Αν το τελικό σημείο της δοκιμής είναι η εμφάνιση της νόσου ή της θνησιμότητας, οι μελέτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν να επικυρώσουν ή διαψεύσουν την έννοια των βιοδεικτών.

1.1.5 Οξειδωτικό στρες ως παράγοντας κινδύνου και πρόκλησης ασθενειών

Μερικές από τις πιο σημαντικές φυσιολογικές καταστάσεις ή ασθένειες που συνδέονται με την αυξημένο κυτταρικό οξειδωτικό στρες και με σημαντικές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία είναι η γήρανση, η παχυσαρκία, η υπέρταση, η αρτηριοσκλήρυνση, οι αγγειακές αλλοιώσεις, το μεταβολικό σύνδρομο, η φλεγμονή, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το άσθμα, διάφορες νευρολογικές διαταραχές όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, η Πάρκινσον και η Σχιζοφρένεια, το AIDS, η αποφρακτική άπνοια ύπνου, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, οι ασθένειες του ήπατος, οι χρόνιες νεφρικές νόσοι (XNN), η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο καταρράκτης, οι νεοπλασίες (π.χ. καρκίνος μαστού) και ο διαβήτης (Valko *et al.* 2007; Furukawa *et al.* 2004).

Οι ασθένειες αυτές εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες:

1. η πρώτη Ομάδα περιλαμβάνει ασθένειες που χαρακτηρίζονται από προ-οξειδωτικά που μετατοπίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του συστήματος θειόλης/διθειούχου διαταράσσοντας την ανοχή στη γλυκόζη -οι λεγόμενες καταστάσεις «μιτοχονδριακού οξειδωτικού στρες» (καρκίνος και ο σακχαρώδης διαβήτης)
2. η δεύτερη Ομάδα περιλαμβάνει ασθένειες που χαρακτηρίζονται από «φλεγμονώδης οξειδωτικές συνθήκες» και αυξημένη δραστηριότητα είτε της οξειδάσης του NAD(P)H (που οδηγεί σε αθηροσκλήρωση και χρόνια φλεγμονή) ή της οξειδάσης της ξανθίνης που προκαλείται από το σχηματισμό των ROS (εμπλέκονται στην ισχαιμία και στο τραυματισμό επαναιμάτωσης). Η διαδικασία της γήρανσης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην καταστρεπτική δράση των ελεύθερων ριζών (υπεροξείδωση των λιπιδίων, βλάβη του DNA, οξείδωση των πρωτεϊνών) (Harman 1956).

Καρκίνος

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί κυτταρική οξειδοαναγωγική ανισορροπία ένα φαινόμενο το οποίο είναι παρόν σε διάφορα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η οξειδοαναγωγική ανισορροπία είναι δυνατόν να σχετίζεται με ογκογονική διέγερση. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού από γεγονότα «οξειδωτικής βλάβης» αντιπροσωπεύει το πρώτο βήμα που εμπλέκεται στη μεταλλαξιογένεση, στη καρκινογένεση, και στη γήρανση. Η μετάλλαξη του DNA είναι ένα κριτικής σημασίας βήμα στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Αυξημένα επίπεδα των οξειδωτικών βλαβών στο DNA έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους όγκους, συνδέοντας ισχυρά αυτού τους είδους τις βλάβες με την αιτιολογία του καρκίνου. Μέχρι σήμερα,

έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 100 οξειδωμένα προϊόντα του DNA. Τα ROS προκαλούν βλάβες στις αλυσίδες του DNA, τροποποιήσεις στην πουρίνη, στην πυριμιδίνη και στη δεσοξυριβόζη, καθώς και τους δεσμούς των βάσεων του DNA. Η βλάβη στο DNA μπορεί να οδηγήσει είτε στην αναστολή/παύση της μεταγραφής, είτε στην επαγωγή των οδών μεταγωγής σήματος, σε σφάλματα αναπαραγωγής, και σε γενετική αστάθεια, συμπτώματα που συνδέονται με καρκινογένεση (Marnett 2000; Valko *et al.* 2006). Η πιο καλά μελετημένη βλάβη του DNA είναι ο σχηματισμός της 8-OH-G. Αυτή η βλάβη είναι σημαντική, γιατί σχηματίζεται σχετικά εύκολα, είναι μεταλλαξιόγόνος και συνεπώς είναι ένα δυνητικός βιοδείκτης καρκινογένεσης. Οι βλάβες στο DNA, οι μεταλλάξεις, και οι αλλοιώσεις της γονιδιακής έκφρασης, είναι συνεπώς βασικοί συντελεστές στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η συμμετοχή των οξειδωτικών φαίνεται να είναι ο κοινός παρονομαστής σε όλες αυτές τις εκδηλώσεις (Valko *et al.* 2006).

Καρδιαγγειακές παθήσεις

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τα ROS στα καρδιακά και αγγειακά μυϊκά κύτταρα έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακή βλάβη των ιστών (Dhalla *et al.* 2000). Ανεξάρτητα από τις άμεσες αποδείξεις για τη σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των καρδιαγγειακών νόσων, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τα ROS διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες καρδιαγγειακές νόσους όπως στην αθηροσκλήρωση, στην ισχαιμική καρδιοπάθεια, στην υπέρταση, στις μυοκαρδιοπάθειες, στην καρδιακή υπερτροφία και στη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (Kukreja and Hess 1992). Ο κυριότερες πηγές οξειδωτικού στρες στο καρδιαγγειακό σύστημα περιλαμβάνουν: τα ένζυμα οξειδοαναγωγή της ξανθίνης, (ii) οξειδάση του NAD(P)H, (iii) τα NOS, (iv) τα μιτοχονδριακά κυτοχρώματα και (v) την αιμοσφαιρίνη (Berry and Hare 2004; Hare and Stamler 2005).

Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με αυξημένο σχηματισμό ROS που τροποποιούν φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες οδηγώντας σε υπεροξειδωση και οξείδωση των θειολικών ομάδων (Molavi and Mehta 2004). Οι επιθέσεις των ROS οδηγούν σε αλλαγές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, στη διάρρηξη του διπολικού στρώματος λιπιδίων και σε λειτουργικές τροποποιήσεις διαφόρων κυτταρικών πρωτεϊνών. Εκτός από τις βλάβες στις κυτταρικές πρωτεΐνες και στα λιπίδια, οι διαταραχές στη λειτουργία των μυοκυττάρων εξαιτίας αυξημένου οξειδωτικού στρες θεωρείται ότι σχετίζονται με τις δράσεις των ROS και στα υποκυτταρικά οργανίδια (Kaneko *et al.* 1989; Stoyanovsky *et al.* 1997).

Ισχαιμία/επαναιμάτωση

Η βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση είναι ένα κλινικό πρόβλημα που εμφανίζεται ως βλάβη στο μυοκάρδιο με την αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος μετά από έμφραγμα των στεφανιαίων αγγείων. Παρά το χαμηλό επίπεδο οξυγόνου κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, παρατηρείται μερική παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια (Becker 2004; Lombardi *et al.* 1998). Η μαζική παραγωγή ROS κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση οδηγεί σε βλάβες των ιστών προκαλώντας έτσι σοβαρές επιπλοκές σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης οργάνων, σε εγκεφαλικά επεισόδια και σε έμφραγμα του μυοκαρδίου (Kasparova *et al.* 2005).

Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια αυτοάνοση ασθένεια που προκαλεί χρόνια φλεγμονή των αρθρώσεων και των ιστών γύρω από τις αρθρώσεις με διήθηση από μακροφάγα και από τα ενεργά T λεμφοκύτταρα (Bauerova and Bezek 1999). Η παθογένεση αυτής της ασθένειας συσχετίζεται κυρίως με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών

στη θέση της φλεγμονής. Η οξειδωτική βλάβη και η φλεγμονώδης κατάσταση στα διάφορα ρευματοειδή νοσήματα επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα επίπεδα των προσταγλαδινών και των ισοπροστανών τόσο στον ορό όσο και στο αρθρικό υγρό σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Οι οξειδωτικές συνθήκες στο αρθρικό ιστό συνδέονται επίσης με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του p53 γονιδίου (Firestein *et al.* 1997). Τα T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα εμφανίζουν στοιχεία μειωμένης ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, διαταραγμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης προσαρμογέα για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων καθώς και στο «κυρίαρχο» φαινότυπο CD45RO (Maurice *et al.* 1997).

Διαβήτης

Ένα σχετικά μικρό ποσοστό (10%) των ασθενών που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη είναι τύπου 1, ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης (Niedowicz and Daleke 2005). Ωστόσο, η πλειοψηφία των διαβητικών ασθενών είναι μη-ινσουλινοεξαρτώμενοι και ικανοί, τουλάχιστον αρχικά να παράγουν ινσουλίνη, αλλά η κυτταρική τους απόκριση είναι ανεπαρκής. Αυτός ο τύπος διαβήτη είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και είναι η πιο κοινή μορφή διαβήτη. Μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης στους μύες και στο λιπώδη ιστό οδηγεί σε χρόνια εξωκυττάρια υπεργλυκαιμία που οδηγεί στην καταστροφή των ιστών και σε παθοφυσιολογικές επιπλοκές, όπως καρδιακές παθήσεις, αρτηριοσκλήρυνση, καταρράκτη, περιφερική νευρική βλάβη, αμφιβληστροειδοπάθεια και άλλες (Brownlee and Cerami 1981). Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει προταθεί ως ένα από τα σημαντικότερα αίτια της υπεργλυκαιμίας - που προκαλεί την ενεργοποίηση των διαβητικών επιπλοκών. Η υπεργλυκαιμία σε έναν οργανισμό διεγείρει το σχηματισμό ROS από διάφορες πηγές. Οι πηγές αυτές περιλαμβάνουν οξειδωτική φωσφορυλίωση, αυτοοξειδωση της γλυκόζης, ενεργοποίηση της οξειδάσης του NAD(P)H, της

λιποξυγενάσης, του κυτοχρώματος P450, και της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS).

Νευρολογικές διαταραχές

Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη λόγω της υψηλής χρησιμοποίησης οξυγόνου, της υψηλής περιεκτικότητας του σε οξειδώσιμα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και λόγω της παρουσίας οξειδοαναγωγικών-ενεργών μετάλλων (Cu, Fe). Το οξειδωτικό στρες αυξάνει με την ηλικία και ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας αρκετών νευροεκφυλιστικών νόσων, κυρίως για τους ηλικιωμένους. Νευρολογικές διαταραχές που σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σχιζοφρένεια.

Γήρανση

Η διαδικασία της γήρανσης μπορεί να οριστεί ως η προοδευτική μείωση των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού μετά την αναπαραγωγική φάση της ζωής τους. Η θεωρία των ελεύθερων ριζών και της γήρανσης παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1956 από τον Denham Harman ο οποίος πρότεινε το ρόλο των ελεύθερων ριζών στη διαδικασία της γήρανσης (Harman 1956). Η δουλειά του έδωσε το έναυσμα για τη σταδιακή έντονη έρευνα στο πεδίο του ρόλου των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα.

Υπάρχουν δύο βασικές θεωρίες που περιγράφουν τη διαδικασία της γήρανσης: οι θεωρίες βλάβης-συσσώρευσης και οι θεωρίες γενετικής (Fossel 2003; Hayflick 1998). Οι θεωρίες βλάβης-συσσώρευσης εμπλέκουν τη «θεωρία των ελευθέρων ριζών», τη «θεωρία γλυκοζυλίωσης», τη «θεωρία λάθους και καταστροφής», τη «θεωρία της μεμβράνης», τη «θεωρία της εντροπίας» και άλλες μεταξύ των οποίων η «θεωρία των ελευθέρων ριζών» είναι ίσως η πιο περίπλοκη προσέγγιση για την εξήγηση της διαδικασίας της γήρανσης. Η

«θεωρία των ελευθέρων ριζών» βασίζεται στο γεγονός ότι τα τυχαία βλαβερά αποτελέσματα των ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά τη διάρκεια του αερόβιου μεταβολισμού προκαλούν βλάβες στο DNA, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες και συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου.

Η αρχή της γήρανσης ξεκινά με το οξυγόνο, το οποίο καταλαμβάνει την τελική θέση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Valko *et al.* 2004). Ακόμα και σε ιδανικές συνθήκες, ορισμένα ηλεκτρόνια «διαρρέουν» από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτά τα ηλεκτρόνια που διαρρέουν αλληλεπιδρούν με το οξυγόνο και παράγουν ρίζες του υπεροξειδίου, έτσι ώστε κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, περίπου 1-3% των μορίων οξυγόνου στα μιτοχόνδρια μετατρέπονται σε υπεροξειδία. Η αρχική τοποθεσία που προκαλούν βλάβες τα υπεροξειδία είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) (Cadenas and Davies 2000). Το κύτταρο επισκευάζει το μεγαλύτερο μέρος των ζημιών που προκαλούνται στο πυρηνικό DNA (nDNA), αλλά mtDNA δεν μπορεί να επισκευαστεί γρήγορα. Ως εκ τούτου, οι εκτεταμένες βλάβες στο mtDNA συσσωρεύονται με τον καιρό οδηγώντας τα κύτταρα στο θάνατο και τον οργανισμό στη γήρανση. Οι Halliwell & Gutteridge, 1999 διατύπωσαν μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης οξυγόνου και της γήρανσης: (i) η μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου εξηγεί γιατί οι βασίλισσες μέλισσες ζουν 50 φορές περισσότερο από τις ενεργές εργάτριες μέλισσες (ii) οι οικιακές μύγες που τους αφαιρούνται τα φτερά και δεν τους επιτρέπεται η πτήση έζησαν πολύ περισσότερο χρόνο από αυτές που πετούσαν, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης οξυγόνου (iii) τα μεγαλύτερα ζώα που καταναλώνουν λιγότερο οξυγόνο ανά μονάδα μάζας σώματος από μικρότερα ζουν περισσότερο (iv) διαφορετικοί ρυθμοί παραγωγής ROS επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των ζώων. Για παράδειγμα, ο επίμυς και το περιστέρι έχουν παρόμοιους μεταβολικούς ρυθμούς, ωστόσο διαφορετική διάρκεια ζωής (σε επίμυες: 3 έτη, περιστέρι: 30 έτη). Το γεγονός αυτό εξηγείται πειραματικά *in vitro* με τα στοιχεία να

δείχνουν ότι οι ιστοί στο περιστερι παράγουν ROS πιο αργά από ότι τα μιτοχόνδρια των επίμυων (v) ο περιορισμός των θερμίδων στα τροφικά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης και συνδέεται με αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA, μειωμένη παραγωγή υπεροξειδίων, καθώς και μειωμένα επίπεδα κατεστραμμένου DNA, λιπιδίων και πρωτεϊνών (vi) τα ζώα που ζουν περισσότερα χρόνια έχουν αποτελεσματικότερους αντιοξειδωτικούς προστατευτικούς μηχανισμούς σε σχέση με τα ζώα που ζουν λιγότερα χρόνια. Αυτό ισχύει κυρίως για τα επίπεδα της SOD, τα καροτενοειδή, GSH, την γλουταθειόνη υπεροξειδάση, και την βιταμίνη E σε ζώα.

1.2 Αντιοξειδωτική άμυνα: Ενδογενής και από τη διατροφή

Το αντιοξειδωτικό σύστημα έχει αναπτυχθεί τα τελευταία δύο δισεκατομμύρια χρόνια ως μια βασική μορφή άμυνας απέναντι στο οξυγόνο: αποτελείται από συστατικά-δεσμευτές ριζών, όπως αλβουμίνες, βιταμίνες C και E, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη, κυστεΐνη, ουβικινόλη, α-λιποϊκό οξύ και ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά όπως GSH, θειορεδοξίνη και ένζυμα (SOD, GSH-Px, GSH-Rd, GSH-T, καταλάσες κτλ) και πρωτεΐνες όπως η τρανσφερίνη και η σερουπλασμίνη ικανές να χηλώσουν ελεύθερα ιόντα σιδήρου και χαλκού τα οποία ευνοούν το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου.

Ένα μόριο χαρακτηρίζεται ως αντιοξειδωτικό όταν έχει την ικανότητα να επιβραδύνει ή να προλαμβάνει την οξείδωση άλλων μορίων. Η οξείδωση είναι μια χημική αντίδραση που μεταφέρει ηλεκτρόνια από μια ουσία σε έναν φορέα οξείδωσης. Οι αντιδράσεις οξείδωσης μπορεί να παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες εκκινούν αλυσιδωτές αντιδράσεις και προκαλούν βλάβες στα κύτταρα. Τα αντιοξειδωτικά διακόπτουν αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις με την απομάκρυνση των ενδιάμεσων προϊόντων των ελευθέρων ριζών, και αναστέλλουν άλλες αντιδράσεις οξείδωσης με την οξείδωση των ίδιων των μορίων τους. Σαν αποτέλεσμα, τα αντιοξειδωτικά είναι συχνά αναγωγικοί παράγοντες όπως είναι οι θειόλες, το ασκορβικό οξύ ή οι πολυφαινόλες (Sies 1997).

Τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με το αν είναι υδρόφιλα ή υδρόφοβα. Σε γενικές γραμμές, τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά αντιδρούν με οξειδωτικούς παράγοντες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και του πλάσματος του αίματος, ενώ τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά προστατεύουν τις μεμβράνες των κυττάρων από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Sies 1997). Οι ενώσεις αυτές μπορεί

να συντεθούν στο σώμα ή να προσληφθούν από τη διατροφή (Vertuani *et al.* 2004). Τα διάφορα αντιοξειδωτικά είναι παρόντα σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων στα υγρά του σώματος και σε ιστούς, με κάποια όπως η γλουταθειόνη ή ουβικινόνη να βρίσκονται κυρίως εντός των κυττάρων, ενώ άλλα, όπως το ουρικό οξύ είναι πιο ομοιόμορφα καταναμημένα εντός και εκτός των κυττάρων.

Η σχετική σημασία των διαφορετικών αντιοξειδωτικών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών είναι ένα πολύ σύνθετο διαδικασία, με τους διάφορους μεταβολίτες και τα ενζυμικά συστήματα να έχουν συνεργιστικές αλλά και αλληλοεξαρτώμενες δράσεις το ένα στο άλλο (Sies 1993). Η δράση ενός αντιοξειδωτικού μπορεί, επομένως να εξαρτάται από την καλή λειτουργία των άλλων μελών του αντιοξειδωτικού συστήματος (Vertuani *et al.* 2004). Το μέγεθος προστασίας που παρέχεται από κάθε αντιοξειδωτικό θα εξαρτηθεί επίσης από την συγκέντρωσή του, την δραστικότητα του προς τα συγκεκριμένες ενεργές ρίζες οξυγόνου που εξετάζονται, καθώς επίσης και από την κατάσταση των αντιοξειδωτικών με τα οποία αλληλεπιδρά (Vertuani *et al.* 2004).

Μερικές ενώσεις συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική άμυνα χηλώνοντας μεταβατικά μέταλλα και εμποδίζοντας τα να δράσουν ως καταλύτες για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών στο κύτταρο. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ικανότητα να απομονώνουν το σίδηρο, που είναι σημαντικός στη λειτουργία των σίδηρο-δεσμευτικών πρωτεϊνών, όπως της τρανσφερίνης και της φερριτίνης (Imlay 2003). Το σελήνιο και ο ψευδάργυρος συνήθως αναφέρονται ως αντιοξειδωτικές θρεπτικές ουσίες, αν και τα χημικά αυτά στοιχεία δεν έχουν αντιοξειδωτική δράση αλλά απαιτούνται για τη δραστηριότητα ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως αναλύεται παρακάτω

Τα κύτταρα επίσης προστατεύονται από το οξειδωτικό στρες από ένα δίκτυο αλληλεπιδρώντων αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sies 1997). Εδώ, το υπεροξείδιο που απελευθερώνεται από διεργασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση μετατρέπεται πρώτα

σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και στη συνέχεια ανάγεται περαιτέρω, για να δώσει τελικά νερό. Αυτό το μονοπάτι αποτοξίνωσης είναι το αποτέλεσμα δράσης πολλών ενζύμων, με τις SODs να καταλύουν το πρώτο βήμα και στη συνέχεια οι καταλάσες και GPxs να απομακρύνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Όπως και με τους αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες, η συνεισφορά των ενζύμων στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είναι δύσκολο να διαχωριστεί μεταξύ τους.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (τέσσερις γραμμές άμυνας) με βάση τη λειτουργία τους (Noguchi *et al.* 2000):

1. Πρώτη γραμμή άμυνας είναι τα προληπτικά αντιοξειδωτικά, τα οποία καταστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ένζυμα: γλουταθειόνης υπεροξειδάσης, καταλάση, τρανσφερίνης, φερριτίνη, λακτοφερρίνη, καρτενοειδή, κλπ.).
2. Δεύτερη γραμμή άμυνας είναι τα αντιοξειδωτικά που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες καταστέλλοντας την έναρξη της αλυσιδωτής ή/και σταματώντας πολλαπλασιαστικές αλυσιδωτές αντιδράσεις: αντιοξειδωτικά δέσμευσης ελευθέρων ριζών.
3. Τρίτη κατηγορία: αντιοξειδωτικά επισκευής και de novo αντιοξειδωτικά (κάποια πρωτεολυτικά ένζυμα, ένζυμα επισκευής του DNA κτλ)
4. Μια τέταρτη γραμμή άμυνας είναι προσαρμοστική, όπου το σήμα για την παραγωγή και τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προκαλεί το σχηματισμό και τη μεταφορά των κατάλληλων αντιοξειδωτικών στη σωστή τοποθεσία.

Τόσα τα ενζυματικά όσο και τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν στο ενδοκυττάριο και στο εξωκυττάριο περιβάλλον για να απομακρύνουν/αποτοξινώνουν από τα ROS. Για να παρέχουν τη μέγιστη ενδοκυτταρική προστασία οι αντιοξειδωτικοί αυτοί μηχανισμοί είναι στρατηγικά τοποθετημένοι στο κύτταρο (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Τα πιο σημαντικά ενζυματικά και μη ενζυματικά φυσιολογικά αντιοξειδωτικά

Ενζυματικά Αντιοξειδωτικά	Τοποθεσία	Ιδιότητες
Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)	Μιτοχόνδρια, κυτταρόπλασμα	Ρίζες δισμουτάσης του υπεροξειδίου
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH)	Μιτοχόνδρια, κυτταρόπλασμα	Απομακρύνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οργανικά υδροπεροξειδία
Καταλάση (CAT)	Μιτοχόνδρια, κυτταρόπλασμα	Απομακρύνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου
Μη Ενζυματικά Αντιοξειδωτικά	Τοποθεσία	Ιδιότητες
Βιταμίνη C	Υδαρείς φάσεις του κυττάρου	Δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες και ανακυκλώνει τη βιταμίνη E
Βιταμίνη E	Κυτταρική μεμβράνη	Κύριο αντιοξειδωτικό κυτταρικών μεμβρανών
Ουρικό οξύ	Προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών	Δεσμεύει ρίζες OH
Γλουταθειόνη	Μη πρωτεϊνική θειόλη των κυττάρων	Υπηρετεί πολλαπλούς ρόλους της κυτταρικής αντιοξειδωτικής άμυνας
α-λιποϊκό οξύ	Ενδογενείς θειόλες	Αποτελεσματικό στην ανακύκλωση της βιταμίνης C, μπορεί επίσης να είναι αποτελεσματικό ως υποκατάστατο της γλουταθειόνης
Καροτενοειδή	Λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που εντοπίζεται στον ιστό των μεμβρανών	Δεσμεύει ενεργές ρίζες οξυγόνου
Χολερυθρίνη	Προϊόν του μεταβολισμού της αίμης του αίματος	Εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό
Ουβικινόνες	Μιτοχόνδρια	Οι αναγωγικές μορφές είναι αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά
Δεσμευτές ιόντων μετάλλων: τρανσφερίνη, φερρετίνη, λακτοφερρίνη		Χηλωτές μεταλλικών ιόντων, υπεύθυνα για τις αντιδράσεις Fenton
Νιτρικό οξύδιο		Δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, αναστολέας υπεροξειδίων λιπιδίων

Από: Noguchi *et al.* 2000

1.2.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase-SOD)

Υπάρχουν τρεις μεγάλες οικογένειες SOD, ανάλογα με το συνδεδεμένο μέταλλο: Cu/Zn (η οποία δεσμεύει τόσο το μέταλλο χαλκού όσο και του ψευδαργύρου), Fe και Mn (που δεσμεύουν είτε σίδηρο είτε μαγγάνιο), και τέλος Ni, η οποία δεσμεύει το νικέλιο.

- CuZnSOD - συνήθως χρησιμοποιούνται από ευκαρυωτικά κύτταρα. Το κυτταρόπλασμα του συνόλου σχεδόν των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχουν ένα ένζυμο SOD με χαλκό και ψευδάργυρο (Cu-Zn-SOD).
- Fe ή Mn - που χρησιμοποιούνται κυρίως από τα προκαρυωτικά κύτταρα και τα πρωτεύοντα
 - Fe - η E. coli και πολλά άλλα βακτήρια περιέχουν επίσης μια μορφή του ενζύμου με το σίδηρο (Fe-SOD); ορισμένα βακτήρια περιέχουν Fe-SOD, άλλα Mn-SOD, ενώ ορισμένα περιέχουν και τα δύο.
 - Μαγγάνιο -τα μιτοχόνδρια του συκωτιού των κοτόπουλων, και πολλά βακτήρια (όπως η E. coli) έχουν Mn-SOD.
- Ni - στα προκαρυωτικά κύτταρα.

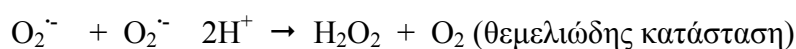
Οι άνθρωποι (όπως και όλα τα θηλαστικά), έχουν τρεις μορφές του ενζύμου SOD. Την SOD1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, την SOD2 στα μιτοχόνδρια και την SOD3 στον εξωκυττάριο χώρο. Η SOD1 είναι ένα διμερές (αποτελείται από δύο μονάδες), ενώ οι SOD2 και SOD3 είναι τετραμερή (τέσσερις υπομονάδες). Οι SOD1 και SOD3 περιέχουν χαλκό και ψευδάργυρο, ενώ το SOD2 έχει μαγγάνιο στο ενεργό κέντρο του.

Το ένζυμο CuZnSOD

Πρώτοι οι Mann και Kellin απομόνωσαν το 1938 από το αίμα βοοειδών, μια μπλε-πράσινη πρωτεΐνη που περιείχε χαλκό (haemocuprein). Μια παρόμοια πρωτεΐνη απομονώθηκε το 1953 από το ήπαρ αλόγου και ονομάστηκε ηπατοκουπρεΐνη (hepatocuprein). Το 1970 ανακαλύφθηκε ότι η πρωτεΐνη των αιμοσφαιρίων (erythrocyte proteins) περιέχει ψευδάργυρο και χαλκό. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις δεν αποδόθηκαν ενζυματικές ιδιότητες στις πρωτεΐνες και χαρακτηρίστηκαν ως αποθήκες μετάλλων. Ωστόσο το 1969 οι McCord και Fridovich ανέφεραν ότι η πρωτεΐνη των αιμοσφαιρίων μπορεί να απομακρύνει καταλυτικά O_2^- και έχει δράση σαν ένζυμο υπεροξειδάσης της δισμουτάσης που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZnSOD) (Halliwell and Gutteridge 2007).

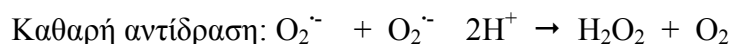
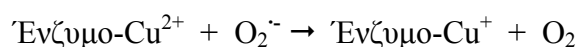
Τα ένζυμα CuZnSOD είναι παρόντα σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά ένζυμα. Στα κύτταρα των ζώων, εντοπίζονται κυρίως στο κυτόπλασμα, υπάρχουν όμως και στα λυσοσώματα, το πυρήνα και στο χώρο ανάμεσα από την έσω και έξω μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Έχουν μοριακό βάρος περίπου 32000 και αποτελούνται από δύο υπομονάδες πρωτεϊνών, κάθε μία εκ των οποίων περιέχει ένα ιόν χαλκού και ένα ιόν ψευδαργύρου (Fridovich 1995). Τα ένζυμα CuZnSOD που βρίσκονται στα βακτήρια είναι συνήθως διμερή με ένα μόριο χαλκού σε κάθε υπομονάδα, αν και μερικά, όπως τα ένζυμα της E.Coli, είναι μονομερή (Desideri and Falconi 2003).

Η λειτουργία των CuZnSOD ενζύμων είναι η επιτάχυνση της αυτοξειδοαναγωγής του O_2^- :



Όταν η αντίδραση καταλύεται από την CuZnSOD των ερυθρών κυττάρων των βοοειδών είναι σχεδόν ανεξάρτητη από το pH στο εύρος 5.3 ως 9.5, και ο ρυθμός μετατροπής του O_2^- στο ενεργό κέντρο είναι περίπου δηλαδή τρεις φορές υψηλότερος από

το ρυθμό μη καταλυτικής μετατροπής αυτοξειδοαναγωγής του $O_2^{\cdot-}$. Τα ιόντα χαλκού των CuZnSOD ενζύμων καταλύουν την αυτοξειδοαναγωγή μέσω οξείδωσης και αναγωγής,

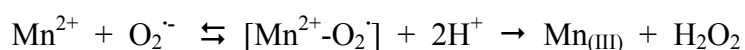
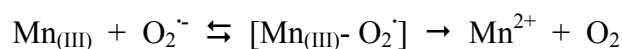


Ο ψευδάργυρος (Zn^{2+}) δε συμμετέχει στη κατάλυση της αντίδρασης αλλά βοηθάει στη σταθεροποίηση του ενζύμου. Ιόντα άλλων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου και του σιδήρου και μαγνησίου, δε μπορούν να αντικαταστήσουν το χαλκό στο ένζυμο CuZnSOD ώστε να προκύψει ένα λειτουργικό ένζυμο, αλλά το κοβάλτιο, ο υδράργυρος και το κάδμιο μπορούν να αντικαταστήσουν τον Zn^{2+} και να αυξήσουν την σταθερότητα του ενζύμου (Fridovich 1995).

Το ένζυμο MnSOD

Σε αντίθεση με την CuZnSOD, η MnSOD έχει χρώμα ροζ, έχει μοριακή μάζα 40000 και όχι 32000, καταστρέφεται κατά την επεξεργασία με χλωροφόρμιο και αιθανόλη (και συνεπώς δεν επιβιώνει τις τυπικές μεθόδους καθαρισμού της CuZnSOD), και περιέχει μαγγάνιο στο ενεργό κέντρο. Όλα τα MnSOD ένζυμα είναι πιο ασταθή και μπορούν να μετουσιωθούν από τη θέρμανση, οργανικά διαλύματα και απορρυπαντικά σε αντίθεση με τα CuZnSOD ένζυμα.

Παρά τις διαφορές, τα MnSOD ένζυμα καταλύουν την ίδια αντίδραση με τα CuZnSOD ένζυμα.



⇕

[Mn-X-SOD]

Το ενδιάμεσο της δεύτερης αντίδρασης είναι ισοδύναμο με μια λιγότερη ενεργή μορφή του ενζύμου (Mn-X-SOD), στο οποίο το $O_2^{\cdot-}$ είναι συνδεδεμένο με ένα μη παραγωγικό τρόπο (Davis *et al.* 2004). Σε pH 7 ο ρυθμός αυτοξειδοαναγωγής του $O_2^{\cdot-}$ είναι παρόμοιος και για τα δύο ένζυμα (CuZnSOD και MnSOD) αλλά αντίθετα από ότι συμβαίνει με τα περισσότερα ένζυμα CuZnSOD ο ρυθμός της MnSOD μειώνεται σε αλκαλικό pH.

Τα ένζυμα MnSOD βρίσκονται στα βακτήρια, τα φυτά και τα ζώα. Στους περισσότερους ιστούς των ζώων και στις ζύμες, τα ένζυμα MnSOD βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια (Fridovich 1995).

Πίνακας 3. Αντιπροσωπευτικά δεδομένα των επιπέδων SOD στους ανθρώπινους ιστούς

Ιστός	CuZnSOD ($\mu\text{g}/\text{mg}$ πρωτεΐνης)	Δραστηριότητα CuZnSOD (units/g wet wt)	Δραστηριότητα MnSOD (units/g wet wt)
Φαία ουσία	3.70	ΔΕ	ΔΕ
Ήπαρ	4.71	106900	2260
Ερυθροκύτταρα	0.52	-	0
Νεφρικός φλοιός	1.93	24800	1510
Εσωτερικό νεφρών	1.31	(συνολικό νεφρών)	(συνολικό νεφρών)
Θυρεοειδής	0.38	10700	276
Όρχεις	2.16	ΔΑ	ΔΑ
Καρδιακός μυς	1.82	ΔΕ	ΔΕ
Γαστρικός βλεννογόνο	0.94	Έντερο 10000	358
Υπόφυση	0.99		
Πάγκρεας	0.39	8630	778
Πνεύμονες	0.47	7500	86
Θωρακική αορτή	-	7040	86

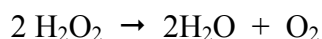
ΔΑ: ανιχνεύτηκαν.

Από: Halliwell and Gutteridge, 2007

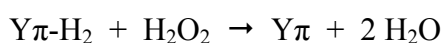
Η ποσότητα MnSOD και CuZnSOD στα ζώα διαφέρει ανάλογα με το είδος του ιστού (Πίνακας 3). Μεταξύ των ιστών η περιεκτικότητα σε αυτά τα ένζυμα εξαρτάται και από το αριθμό των μιτοχονδρίων που περιέχουν. Τα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών δεν περιέχουν μιτοχόνδρια άρα και MnSOD αλλά στο ήπαρ των επίμυων περιέχει το 10% της ολικής SOD. Στα βακτήρια, στις ζύμες και πιθανόν στα πράσινα φυτά η ποσότητα των MnSOD ενζύμων εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης. Η διατροφή επίσης μπορεί επίσης να επηρεάσει τα επίπεδα των ενζύμων π.χ. μια δίαιτα φτωχή σε Mn μπορεί να οδηγήσει σε πτώση των επιπέδων MnSOD.

Καταλάσες (Catalase)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να απομακρυνθεί με δύο τύπους ενζύμων: Τις καταλάσες που καταλύουν απευθείας την αποσύνθεση του H_2O_2 σε O_2 θεμελιώδους κατάστασης



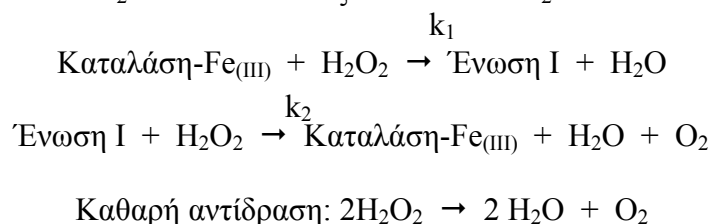
Και τα ένζυμα υπεροξειδωσης που απομακρύνουν το H_2O_2 χρησιμοποιώντας το για την οξείδωση άλλων υποστρωμάτων (αναφέρονται ως Υπ- H_2 στην παρακάτω αντίδραση)



Οι περισσότεροι αερόβιοι οργανισμοί περιέχουν καταλάση, εκτός από ορισμένους όπως ο *Bacillus popilliae*, το *Mycoplasma pneumoniae*, το πράσινο φύκι *Euglena* κλπ. Επίσης ορισμένα αναερόβια βακτήρια όπως το *Propionibacterium shermanii*, περιέχουν καταλάση αλλά τα περισσότερα όχι. Στα ζώα, η καταλάση είναι παρούσα σε όλα τα όργανα βρίσκεται κυρίως όμως στο ήπαρ. Η καταλάση στα ερυθροκύτταρα βοηθάει στην προστασία τους από το H_2O_2 που παράγεται από την αυτοοξειδοαναγωγή του O_2^- από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης. Από τη στιγμή που το H_2O_2 διαπερνάει τις

μεμβράνες, τα ερυθροκύτταρα μπορούν επίσης να προστατέψουν και άλλους ιστούς από το εξωκυτταρικό H₂O₂, με την απορρόφηση και καταστροφή τους (Winterbourn and Stern 1987). Ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι σκελετικοί μύες έχουν χαμηλότερα επίπεδα καταλάσης αν και η δραστηριότητα της μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος των κυττάρων.

Η καταλάση, όπως και η SOD, καταλύει μια αντίδραση αυτοξειδοαναγωγής. Ένα μόριο H₂O₂ ανάγεται σε H₂O και το άλλο οξειδώνεται σε O₂.



Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για την καταλάση του ήπατος του ποντικιού, οι σταθερές k₁ και k₂ έχουν τιμές 1.7x10⁷M⁻¹s⁻¹ και 2.6x10⁷M⁻¹s⁻¹, αντίστοιχα. Ο σχηματισμός της Ένωσης I οδηγεί σε αλλαγή του φάσματος απορρόφησης της καταλάσης, και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ρυθμού παραγωγής H₂O₂ σε διάφορα όργανα. Στην Ένωση I, ο σίδηρος έχει οξειδωθεί από Fe_(III) σε Fe_(IV). Συγκεκριμένα, σχηματίζεται μια ρίζα κατιόντος-οξοπορφυρίνης (αίμης⁺) Fe_(IV)O, δηλαδή ο σίδηρος Fe_(IV) και η επιπλέον οξειδωτική ικανότητα από ένα ηλεκτρόνιο οξείδωσης της αίμης.

Μπορεί επίσης να σχηματιστεί και μία δεύτερη Ένωση (Ένωση II) με την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου της Ένωσης I και είναι ένα ανενεργό είδος Fe_(IV), καταλάση-(αίμη) Fe_(IV)O χωρίς την πορφυρινική ρίζα. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μπορεί να συμβεί μέσα στην ίδια την Ένωση I, παράγοντας μια ρίζα τυροσίνης στη πρωτεΐνη, ή από εξωτερική δωρεά ηλεκτρονίων όπως από κυανιούχο σίδηρο ή O₂⁻. Ένας ρόλος του προσδεμένου NADPH ίσως είναι να βοηθάει στη διατήρηση της δραστηριότητας δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων στην Ένωση I αν η παροχή H₂O₂ είναι περιορισμένη, εμποδίζοντας το σχηματισμό ριζών αμινοξέων. Το NADPH επίσης μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό καταλάσης από την Ένωση II (Kirkman *et al.* 1999).

Η ικανότητα της καταλάσης να καταστρέφει το H_2O_2 είναι τεράστια. Ωστόσο, οι παραπάνω εξισώσεις δείχνουν ότι για την πλήρη απομάκρυνση του H_2O_2 απαιτείται η σύγκρουση δύο μορίων H_2O_2 σε ένα ενεργό κέντρο της καταλάσης, μια πιθανότητα που μειώνεται καθώς πέφτουν τα επίπεδα H_2O_2 . Η ποσότητα της Ένωσης I στο μίγμα της καταλάσης και του H_2O_2 εξαρτάται από τη σχετική συγκέντρωσή τους και από τις σταθερές k_1 και k_2 . Συνεπώς, ο ρυθμός απομάκρυνσης του H_2O_2 είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της καταλάσης και επομένως θα είναι μεγαλύτερος στο ήπαρ από ότι στον εγκέφαλο ή τη καρδιά.

Υποκυτταρική τοποθεσία της καταλάσης

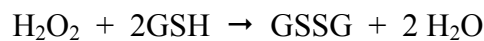
Η δράση της καταλάσης στα ζώα (εκτός από τα ερυθροκύτταρα) και στα φυτά εστιάζεται σχεδόν αποκλειστικά σε υποκυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από μια απλή μεμβράνη, τα υπεροξεισώματα (Chance *et al.* 1979). Τα υπεροξεισώματα περιέχουν πολλά ένζυμα που παράγουν H_2O_2 , όπως γλυκολική οξειδάση, ουρική οξειδάση και τις φλαβοπρωτεϊνικές αφυδρογονάσες που συμμετέχουν στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, ένα μεταβολικό μονοπάτι που λειτουργεί και στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξεισώματα. Στα μιτοχόνδρια, αυτές οι πρωτεΐνες είναι δότες ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλά στα υπεροξεισώματα αντιδρούν με O_2 και παράγουν H_2O_2 . Αν για κάποιους λόγους υπάρχει έλλειμμα καταλάσης στα υπεροξεισώματα (π.χ. λόγω μεταλλάξεων στο μόριο της καταλάσης), το H_2O_2 που παράγεται προκαλεί βλάβες στα υπεροξεισώματα και τα λιπαρά οξέα δεν διασπώνται φυσιολογικά (Kawada *et al.* 2004). Στα υπεροξεισώματα συναντάμε επίσης και μικρές ποσότητες CuZnSOD.

Τα μιτοχόνδρια (στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ), οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχουν ελάχιστες ως σχεδόν μηδαμινές ποσότητες καταλάσης (Kawada *et al.* 2004). Έτσι, οποιαδήποτε ποσότητα H_2O_2 παράγεται από αυτά τα

οργανίδια *in vivo* δεν μπορεί να απομακρυνθεί από τη καταλάση, εκτός και αν το H₂O₂ διαχυθεί έξω από αυτά τα οργανίδια και εισέλθει στα υπεροξεισώματα. Επειδή τα υπεροξεισώματα είναι ευαίσθητα οργανίδια κατά την ομογενοποίηση ιστών ζώων ή φυτών προκαλείται διάχυση της καταλάσης.

Οικογένεια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx family)

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx) απομακρύνουν H₂O₂ μέσω αναγωγής του σε H₂O με οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ενός τριπεπτιδίου που περιέχει θειόλη.



Το πρώτο GPx ένζυμο ανακαλύφθηκε σε ιστούς ζώων το 1957. Πιο σπάνια απαντάται σε φυτά ή βακτήρια. Ωστόσο, η GSH είναι παρούσα στα ζώα, στα φυτά και σε πολλά αερόβια βακτήρια (π.χ. E.Coli) σε ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις συχνά σε επίπεδο mM και σπανιότερα σε αναερόβια βακτήρια.

Τα ένζυμα GPx βρίσκονται ευρέως στους ιστούς των ζώων και εξειδικεύονται κυρίως στην GSH ως δότη υδρογόνων. Καταλύουν επίσης την GSH-εξαρτώμενη αναγωγή των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων. Η Ομάδα του υπεροξειδίου ανάγεται σε μια αλκοόλη



Οι περισσότερες GPx δεν μπορούν να δράσουν σε υπεροξειδία λιπαρών οξέων που είναι εστεροποιημένα σε λιπίδια στις λιποπρωτεΐνες στις μεμβράνες. Τα λιπαρά οξέα πρέπει προηγουμένως να απελευθερωθούν από τις λιπάσες.

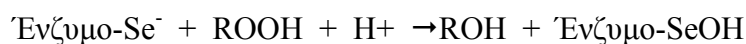
Οικογένεια ενζύμων

Υπάρχουν τουλάχιστον 4 είδη GPx. Το πιο κλασσικό ένζυμο, ονομάζεται κυτοσολική GPx, cGPx ή GPx1. Το πλάσμα το θηλαστικών περιέχει μικρές ποσότητες μια διαφορετικής μορφής, της PGPx (ή GPx3), μιας γλυκοπρωτεΐνης. Τη συναντάμε και σε άλλα εξωκυτταρικά υγρά όπως στο γάλα, στο σπέρμα, στο αμνιακό υγρό κτλ και προέρχεται κυρίως από τα νεφρά. Ένα άλλο είδος GPx που βρίσκεται στο γαστρεντερικό σωλήνα (GI-GPx, ή GPx2) χρησιμοποιείται για το μεταβολισμό των υπεροξειδίων των λιπιδίων της προσλαμβανόμενης τροφής, καθώς και όσων δημιουργούνται κατά τη διάρκεια υπεροξειδωσής των λιπιδίων στο ίδιο το εντερικό σωλήνα. Το ανθρώπινο ήπαρ περιέχει GPx2, καθώς και GPx1 και GPx4. Η PHGPx ή GPx4 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) έχει τη μοναδική ικανότητα να ανάγει όχι μόνο το H_2O_2 και συνθετικά οργανικά υπεροξειδία αλλά και υδροξυπεροξειδία λιπαρών οξέων και χοληστερόλης που είναι ακόμα εστεροποιημένα. Αντίθετα, η GPx1 και GPx2 δεν δρουν σε υπεροξειδία χοληστερόλης, και η GPx3 τα υδρολύει πολύ αργά. Δηλαδή η GPx4 μπορεί και δρα σε υπεροξειδωμένα κατάλοιπα λιπαρών οξέων στις μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες, και τις ανάγει σε αλκοόλες. Έχει μικρότερη εξειδίκευση στην GSH από τις άλλες GPx και ανάγει το υδροξυπεροξειδίο της θυμίνης που παράγεται κατά την επίθεση ελευθέρων ριζών στη θυμίνη του DNA (Bao *et al.* 1997). Γενικά, η δραστηριότητα της GPx4 στους ιστούς είναι μικρότερη της GPx1. Εξαιρέση αποτελούν οι όρχεις. Η GPx4 παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του σπέρματος με την κατάλυση της οξειδωσής πρωτεϊνών με θειολικές ομάδες στην κεφαλή του σπέρματος.

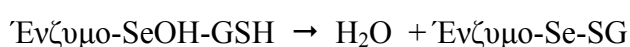
Ο ρόλος του σεληνίου

Τα GPx1, 2 και 3 ένζυμα περιέχουν τέσσερις πρωτεϊνικές υποομάδες, κάθε μια από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου (Se) στο ενεργό της κέντρο. Το ένζυμο GPx4

αποτελεί εξαίρεση αφού είναι μονομερές με μοριακό βάρος 19000 και ένα μόριο σεληνίου. Το σελήνιο είναι παρόν στο ενεργό κέντρο με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης, δηλαδή μιας κυστεΐνης όπου το άτομο θείου (R-SH) έχει αντικατασταθεί από σελήνιο (R-SeH). Κατά την κατάλυση από τη GPx, το ένζυμο του σεληνίου (selenol, ένζυμο-Se⁻) αντιδρά με το υπεροξείδιο για το σχηματισμό οξέος του σεληνίου (ένζυμο-SeOH).



Ακολουθεί η πρόσδεση της γλουταθειόνης



Ακολουθεί και η πρόσδεση του δεύτερου μορίου γλουταθειόνης



Την σεληνίου είναι απαραίτητα στη διατροφή των ζώων, με κύριο ρόλο την παροχή σεληνοκυστεΐνης για την Ομάδα ενζύμων GPx. Μελέτες δείχνουν ότι όταν τρωκτικά στερηθούν το σελήνιο από τη διατροφή τους, η δραστηριότητα της GPx μειώνεται, η GPx1 πιο ραγδαία, ενώ η δραστηριότητα της GPx2 και 4 διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, που υποδηλώνει ότι είναι πιο σημαντικές *in vivo* (Maiorino *et al.* 2005).

Βέβαια το σελήνιο παίζει σημαντικό στο μεταβολισμό. Είναι σημαντικό συστατικό των ενζύμων που συνθέτουν τις ορμόνες του θυρεοειδή αδένος. Επίσης είναι συστατικό των σεληνοπρωτεϊνών, όπως οι σεληνοπρωτεΐνες P που δρουν ως μεταφορείς σεληνίου στους ιστούς αλλά και πιθανόν να έχουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και οι ενδοκυτταρικές σεληνοπρωτεΐνες W, που υπάρχουν σε πολλούς ιστούς και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Όταν τα ζώα στερηθούν το σελήνιο, ο εγκέφαλος είναι ένας από τους τελευταίους ιστούς που αδειάζουν, που δείχνει τη σημασία αυτού του στοιχείου στη λειτουργία του εγκεφάλου.

Αναγωγή της γλουταθειόνης

Ο λόγος ανηγμένη προς οξειδωμένη γλουταθειόνη στα φυσιολογικά κύτταρα είναι υψηλός. Η μετατροπή της GSSG σε GSH είναι εφικτή μέσω των ενζύμων της αναγωγής της γλουταθειόνης, που καταλύουν την αντίδραση



Η αναγωγή της γλουταθειόνης περιέχει δύο υποομάδες, η κάθε μια εκ των οποίων περιέχει FAD στο ενεργό κέντρο (Romero-Ramos *et al.* 2003). Το NADPH ανάγει το FAD, του οποίου στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται σε μια δισουλφιδική γέφυρα στο ενεργό κέντρο. Σχηματίζονται οι δύο ομάδες -SH που αντιδρούν με τη GSSG και την ανάγουν σε 2GSH, ανασχηματίζοντας το δισουλφίδιο των πρωτεϊνών. Η δράση της αναγωγής της γλουταθειόνης μπορεί να ανασταλεί *in vitro* και *in vivo* από την BCNU [N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea], χωρίς ωστόσο αυτό το μόριο να παρουσιάζει εξειδικευμένη δράση.

1.2.2 Μέταλλα και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους

Υπάρχουν αρκετά μικρά μόρια τα οποία θεωρούνται ως σημαντικά αντιοξειδωτικά. Κάποια από αυτά συντίθενται *in vivo* ενώ για άλλα είναι απαραίτητη η πρόσληψη τους μέσω της διατροφής.

Η χολερυθρίνη παράγεται κυρίως από το καταβολισμό της αιμοσφαιρίνης των γερασμένων ερυθρών κυττάρων από ενδοθηλιακά κύτταρα της σπλήνας, του ήπατος και του μυελού των οστών (Maine 1998) και από άλλες αιμοπρωτεΐνες όπως τη μυοσφαιρίνη, καταλάση και τα κυτοχρώματα. Σε ένα ενήλικα παράγονται περίπου 270mg χολερυθρίνης ημερησίως.

Η χολερυθρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό σε φυσιολογικό pH και προσδένεται στην αλβουμίνη σε αναλογία 1:1. Με την ένωση αυτή εμποδίζεται η πρόσληψη από έξωπατικούς ιστούς, ιδίως από όργανο με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος όπως ο εγκέφαλος, και οδηγεί τη χολερυθρίνη στο ήπαρ. Εκεί, το σύμπλεγμα αλβουμίνης-χολερυθρίνης αποδομείται, η χολερυθρίνη εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα μέσω μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα και προσδένεται σε κυτοσολικές πρωτεΐνες.

Η χολερυθρίνη *in vitro* δεσμεύει ONOOH, RO₂[·], RO[·] και μονήρες O₂. Η χολερυθρίνη οξειδώνεται από ορισμένες ROS σε χολοπρασίνη (biliverdin), η οποία ανακυκλώνεται από την αναγωγή της χολοπρασίνης (biliverdin reductase). Η πρόσδεση της χολερυθρίνης στην αλβουμίνη προστατεύει την πρωτεΐνη και η πρόσδεση της αλβουμίνης σε λιπαρά οξέα από την βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Πειραματικά δεδομένα σε ζώα δείχνουν ότι η χορήγηση χολερυθρίνης μειώνει την οξειδωτική βλάβη και τον τραυματισμό των ιστών σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (Liu *et al.* 2003). Η ουρική απέκκριση οξειδωμένων προϊόντων χολερυθρίνης είναι αυξημένη σε ασθενείς με σήψη, πράγμα που υποδηλώνει τον αντιοξειδωτικό της ρόλο (Otani *et al.* 2001).

Ωστόσο η χολερυθρίνη παρουσία φωτός οδηγεί στη παραγωγή μονήρων O₂ (Lin *et al.* 2005) ενώ η οξειδωτική αποδόμηση της χολερυθρίνης μπορεί να παράγει επικίνδυνα τοξικά προϊόντα με αγγειοσυσταλτικές ιδιότητες (Pyne-Geithman *et al.* 2005). Για τους λόγους αυτούς δεν έχει αποδειχθεί πλήρως αν η χολερυθρίνη είναι ένας κύριος, μικρός ή ασήμαντος αντιοξειδωτικός μηχανισμός *in vivo*.

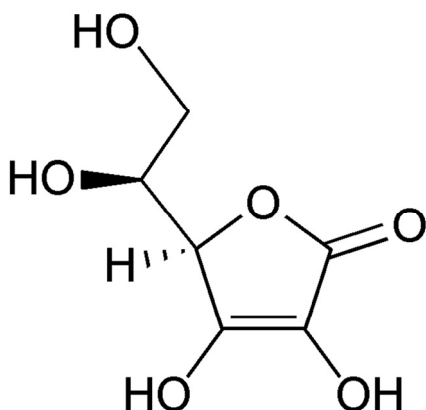
Ένα ακόμα μόριο που θεωρείται ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι το συνένζυμο Q. Το συνένζυμο Q είναι απαραίτητο στη μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων, όπου οξειδώνεται και ανάγεται μέσω της ubiquinone (CoQH₂). Απαντάται ακόμα και σε μεμβράνες άλλων κυττάρων και στις λιποπρωτεΐνες. *In vitro*,

δεσμεύει RO_2 και αναστέλλει την οξειδωση των λιπιδίων. Ο ρυθμός δέσμευσης των RO_2 είναι υποδεκαπλάσιος του ρυθμού δέσμευσης της α-τοκοφερόλης (Halliwell and Gutteridge 2007).

Η συνεισφορά της ουβικινόλη (ubiquinol) στην αντιοξειδωτική άμυνα *in vivo* είναι αβέβαιη. Πιθανόν είναι πολύ σημαντική στα μιτοχόνδρια, όπου η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί εύκολα να οξειδώσει/ανάγει την $CoQH$. Βέβαια έχει προταθεί επίσης ότι η $CoQH$ μπορεί να είναι η πηγή O_2 ριζών μόνο όμως όταν εκτεθεί σε μια πηγή πρωτονίων, πχ. σε μια διαταραχή της μεμβράνης (Halliwell and Gutteridge 2007). Τα δεδομένα από τις μελέτες είναι αντιφατικά .

1.2.3 Βιταμίνη C και E

Το ασκορβικό οξύ είναι μια λευκή, κρυσταλλική σκόνη με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από επινεφρίδια, λάχανα, λεμόνια και πορτοκάλια σαν ένα σαν ένας «όξινος υδατάνθρακας» από τον Szent-Gyorgyi το 1928. Το ασκορβικό οξύ έχει δύο ιονιζόμενες ομάδες $-OH$ (Σχήμα 4). Τα φυτά και τα περισσότερα ζώα μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό από γλυκόζη, αλλά οι άνθρωποι, άλλα πρωτεύοντα, τα ινδικά χοιρίδια, ορισμένα ψάρια και ορισμένες φρουτόμυγες έχουν χάσει το ένζυμο που απαιτείται για το τελικό στάδιο (οξειδάση της γουλονολακτόνης-gulonolactone oxidase) και για αυτό χρειάζονται να προσλαμβάνουν ασκορβικό από τη διαίτά τους.



Σχήμα 4. Χημική δομή ασκορβικού οξέος

Το ασκορβικό οξύ στα ζώα δρα ως συμπάρογτος για τουλάχιστον 8 ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση του κολλαγόνου και ένζυμα που δρουν ως αισθητήρες των επιπέδων οξυγόνου. Επίσης το ασκορβικό είναι απαραίτητο για το ένζυμο dopamine-β-hydroxylase, το οποίο μετατρέπει την ντοπαμίνη σε νοραδρεναλίνη καθώς και για δύο ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της καρνιτίνης. Έλλειψη ασκορβικού οξέος στη διαίτα των ανθρώπων προκαλεί σκορβούτο, μια ασθένεια που τα κύρια συμπτώματα της είναι τα αδύναμα πρησμένα άκρα και αιμορραγία από τα ούλα.

Το ασκορβικό οξύ έχει αποδειχτεί ότι είναι ένα ισχυρό *in vitro* αντιοξειδωτικό (Halliwell and Gutteridge 2007). Η πιο χαρακτηριστική χημική του ιδιότητα είναι ότι δρα σαν αναγωγικός παράγοντας π.χ. έχει την ικανότητα να ανάγει τον $Fe_{(III)}$ σε Fe^{2+} και να διατηρεί τη δραστηριότητα των λυσουλ-, ασπαραγινυλ-, και προπύλ- υδροξυλασών γιατί ο σίδηρος πρέπει να είναι στη μορφή Fe^{2+} στο ενεργό κέντρο ώστε να μπορεί να γίνει υδροξυλίωση. Η προσφορά ενός ηλεκτρονίου από το ασκορβικό παράγει ασκορβύλιο, μια ελεύθερη ρίζα η οποία οξειδώνεται ακόμα περισσότερο σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Το ασκορβύλιο δεν είναι πολύ ενεργή ρίζα με αποτέλεσμα δύσκολα να οξειδώνεται ή να ανάγεται και αυτό αποτελεί την ουσία στις αντιοξειδωτικές ικανότητες του ασκορβικού

οξέος. Καθώς μια ελεύθερη ρίζα αντιδρά με το ασκορβικό οξύ μια πολύ λιγότερη ενεργή ρίζα (ασκορβύλιο) παράγεται (Halliwell and Gutteridge 2007).

Τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος στο πλάσμα κυμαίνονται από 30-90μM ενώ είναι υψηλότερα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στον οφθαλμό, στο σπέρμα, στο γαστρικό υγρό και στους πνεύμονες. Οι ποσότητες αυτές είναι επαρκείς για να ασκήσουν αντιοξειδωτική προστασία. Μια ανασκόπηση από το Ινστιτούτο Linus Pauling (McCall and Frei 1999) μελετών με τη χρήση συμπληρωμάτων βιταμίνης C, βιταμίνης E και β-καροτενίου έδειξε ότι τα τρέχοντα στοιχεία είναι ανεπαρκή για να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών βιταμινών μειώνουν σημαντικά την οξειδωτική βλάβη στους ανθρώπους. Είναι πιθανόν τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος σε υγιείς εθελοντές να είναι επαρκή ώστε να παρέχουν τη μέγιστη δυνατή αντιοξειδωτική προστασία, έτσι ώστε το συμπλήρωμα να μην αποτελεί επιπλέον όφελος.

Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την τοξικότητα υψηλών δόσεων (σε γραμμάρια) ασκορβικού οξέος σε υγιείς ανθρώπους και οι επιπλέον ποσότητες αποβάλλονται (Levine *et al.* 1996). Ωστόσο οι άνθρωποι που καπνίζουν πολύ χρειάζονται περισσότερη βιταμίνη C από ότι οι μη καπνίζοντες (Burri and Jacob 1997) και μάλιστα η συγκέντρωση της βιταμίνης C στους καπνιστές είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη κατανάλωση καπνού (Lykkesfeldt *et al.* 1997). Επίσης οι γυναίκες κατά την εγκυμοσύνη έχουν αυξημένες ανάγκες από βιταμίνη C λόγω της ενεργής μεταφοράς βιταμίνης C μέσω του πλακούντα (η βιταμίνη C είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις στο έμβryo και το μητρικό γάλα) (Burri and Jacob 1997). Τέλος και οι ηλικιωμένοι απαιτείται να προσλαμβάνουν περισσότερη βιταμίνη C από ότι οι υγιείς ενήλικες πιθανόν λόγω των διατροφικών τους συνθηκών αλλά και λόγω της γήρανσης που συνδέεται άμεσα με το οξειδωτικό στρες (Weber *et al.* 1996).

Όνομασία	Δομή
α -ΤΟΗ	
β -ΤΟΗ	
γ -ΤΟΗ	
δ -ΤΟΗ	
α -tocotrienol	
β -tocotrienol	
γ -tocotrienol	
δ -tocotrienol	

Σχήμα 5. Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενών

Η βιταμίνη Ε χαρακτηρίζεται συχνά ως ο πιο σημαντικός αναστολέας της οξειδωσης των λιπιδίων *in vivo*. Η βιταμίνη Ε δεν είναι μια συγκεκριμένη χημική ένωση. Είναι ένας διατροφικός όρος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1922 και αναφέρεται σε ένα λιποδιαλυτό παράγοντα απαραίτητο στη διαίτα των ποντικών για τη φυσιολογική αναπαραγωγή τους (Clarke *et al.* 2008). Στις διατροφικές πηγές της βιταμίνης Ε περιλαμβάνονται τα φυτικά έλαια, οι μαργαρίνες, οι ξηροί καρποί, τα σιτηρά και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Η φυσική βιταμίνη Ε αποτελείται από 4 τοκοφερόλες (α -, β -, γ - και δ - ΤΟΗ) και 4 τοκοτριενόλες (α , β , γ , δ) (Σχήμα 5). Η πιο μελετημένη ένωση είναι η

α-ΤΟΗ. Η δομή τους παρουσιάζεται στο Σχήμα 1 (Clarke *et al.* 2008). Ο πιο διαδεδομένος ρόλος της α-ΤΟΗ είναι ως λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που απαιτείται για τη διατήρηση των μεμβρανών, όπου αντιδρά γρήγορα με τις ρίζες υπεροξειδίου και διατηρεί τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Young and Woodside 2001). Η έλλειψη βιταμίνης Ε προκαλεί σύνδρομο δυσαπορρόφησης των λιπαρών (όπως κυστική ίνωση και χρόνια ηπατοπάθεια) καθώς και αιμορραγικές διαταραχές (Roberts DCK 1990). Παρατεταμένη έλλειψη βιταμίνης Ε οδηγεί σε νευρολογικές ανωμαλίες όπως αταξία, τύφλωση καθώς και άνοια (Aparicio *et al.* 2001).

Η βιταμίνη Ε δεσμεύει τις ρίζες υδροξυλίου χωρίς να συμμετέχει σε περαιτέρω αλυσιδωτές αντιδράσεις. Οι ημερήσιες ανάγκες σε βιταμίνη Ε συχνά συνδέονται με την πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τη δίαιτα (Bieri *et al.* 1983). Τα δεδομένα δεν είναι σαφή και υπάρχουν διαφωνίες σχετικά με την ημερήσια συνιστώμενη πρόσληψη α-ΤΟΗ στους ανθρώπους ενώ δεν έχει συμπεριληφθεί ακόμα η γ-ΤΟΗ (Bieri JG 2002). Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις της α-ΤΟΗ και γ-ΤΟΗ σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος.

Πίνακας 4. Σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων α-ΤΟΗ και γ-ΤΟΗ σε διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς

	γ-ΤΟΗ	α-ΤΟΗ
Πλάσμα (μmol/l)	2-7	15-20
Ήπαρ (nmol/g)	-	20*
Λιπώδης ιστός (nmol/g)	176±80	440±279
Μυϊκός ιστός (nmol/g)	107	155±163
Δέρμα (nmol/g)	180±89	127±74

Από: Clarke *et al.* 2008

1.2.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια Ομάδα χρωστικών (συνήθως κίτρινων, κόκκινων ή πορτοκαλί) τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στους ιστούς των φυτών. Υπάρχουν ακόμη και σε ορισμένα ζώα (π.χ. σαλιγκάρια, χρυσόψαρα, σολομούς, φτερά πουλιών, αστακούς), ορισμένα βακτήρια και μύκητες. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 700 καροτενοειδή. Το μεγαλύτερο μέρος των καροτενοειδών στους ανθρώπους βρίσκεται στον λιπώδη ιστό (80-85% της συνολικής ποσότητας τους σώματος) και στο ήπαρ (8-12%) αλλά η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη στο ωχρό σωματίο και στα επινεφρίδια. Επίσης οι όρχεις είναι πλούσιοι σε λουτεΐνη. Τα επίπεδα των καροτενοειδών στο πλάσμα και τους ιστούς εξαρτώνται από τη διατροφή (Krinsky 1993).

Τα καροτενοειδή δεν απορροφούνται πλήρως στο ανθρώπινο σώμα και η απορρόφηση τους εξαρτάται από το μίγμα των τροφίμων που καταναλώνονται και τον τρόπο επεξεργασίας των τροφίμων. Για παράδειγμα, οι ωμές τομάτες είναι πλούσιες σε λυκοπένιο, αλλά πολύ λίγο απορροφάται. Περισσότερο απορροφάται από τις μαγειρεμένες τομάτες ή τη σάλτσα τομάτας αν και το λυκοπένιο υφίσταται cis-trans ισομερισμό κατά την επεξεργασία. Πρέπει να ληφθεί υπόψη επίσης ότι η απορρόφηση διαφέρει ακόμη και από άτομο σε άτομο (Halliwell and Gutteridge 2007).

Τα καροτενοειδή έχουν μακριές αλυσίδες με εναλλασσόμενους διπλούς και απλούς δεσμούς. Αυτό επιτρέπει την εκτεταμένη μεταφορά ηλεκτρονίων επιτρέποντας στα καροτενοειδή να απορροφούν στη περιοχή του ορατού και να παράγουν όμορφα χρώματα. Ο βασικός σκελετός των καροτενοειδών έχει 40 άτομα άνθρακα και μπορεί να τροποποιηθεί με κυκλοποίηση στο ένα ή και τα δύο άκρα, μειώνοντας κάποιους διπλούς δεσμούς ή προσθέτοντας ενεργές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο. Τα καροτενοειδή που περιέχουν ένα ή περισσότερα οξυγόνα είναι γνωστά ως ξανθοφύλλες.

Ο κύριος ρόλος των καροτενοειδών στον άνθρωπο και τα άλλα ζώα είναι ότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της λιποδιαλυτής βιταμίνης Α, γνωστής επίσης και ως ρετινόλης (Krisinsky 1993). Η βιταμίνη Α είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και για την όραση. Η έλλειψη βιταμίνης Α είναι η κύρια αιτία τύφλωσης ανάμεσα στα παιδιά παγκοσμίως. Πάνω από 50 καροτενοειδή (εκτός του λυκοπενίου) μπορούν να παράγουν βιταμίνη Α, αλλά το κυριότερο είναι το β-καροτένιο. Ένα ποσοστό καροτενοειδών της διατροφής απορροφάται κυρίως από το δωδεκαδάκτυλο. Κάποια από αυτά διασπώνται σε ρετινόλη από το ένζυμο δυοξυγενάση του β-καροτενίου στα κύτταρα του βλεννογόνου του δωδεκαδάκτυλου και μετά η ρετινόλη μετατρέπεται σε ρετινόλη. Τα επίπεδα του ενζύμου μειώνονται όταν το σώμα είναι πλήρες από ρετινόλη, έτσι ώστε υψηλές δόσεις β-καροτενίου να μην προκαλούν υπερβολική πρόσληψη βιταμίνης Α. Όσα καροτενοειδή δεν μεταβολιστούν εισέρχονται στο σώμα μέσω των χυλομικρών και από εκεί κατανέμονται στους ιστούς με το ίδιο σύστημα κατανομής των τοκοφερολών δηλαδή μέσω των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών (VLDL, HDL και LDL). Το ήπαρ επίσης μπορεί να μετατρέπει το β-καροτένιο σε ρετινόλη.

Οι μεμβράνες των ζώων περιέχουν κυρίως α-τοκοφερόλη και ουβικινόλη και όχι τόσο καροτενοειδή οπότε είναι μικρή η συνεισφορά τους ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών. Έχει προταθεί ότι λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις της α-τοκοφερόλης με καροτενοειδή αλλά αντί τα καροτενοειδή να μετατρέπουν ρίζες α-τοκοφερόλης σε α-τοκοφερόλη η αντίστροφη αντίδραση φαίνεται να είναι η προτιμητέα.



Συνολικά, τα στοιχεία που δείχνουν ένα αντιοξειδωτικό ρόλο των καροτενοειδών στα ζώα είναι αδύναμα. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι δεν είναι σημαντικά. Μπορούν να ασκούν την ευεργετική τους δράση ρυθμίζοντας την επικοινωνία των κυττάρων ή τη

έκφραση των γονιδίων (Bertram 2004). Και πάλι όμως τα στοιχεία προέρχονται από *in vitro* μελέτες και η εφαρμογή τους σε *in vivo* μοντέλα είναι αβέβαιη.

1.2.5 Φαινόλες

Ως φαινόλη ορίζεται οποιαδήποτε ένωση περιέχει μια Ομάδα -OH ενωμένη με ένα βενζολικό δακτύλιο. Οι μονοφαινόλες έχουν μια αρωματική Ομάδα (Ομάδα -OH), οι διφαινόλες δύο και οι πολυφαινόλες περισσότερες από δύο. Τα φυτά περιέχουν πλήθος φαινολών, συμπεριλαμβανομένου και των τοκοφερόλων και τοκοτριενόλων (μονοφαινόλες). Οι περισσότερες φαινόλες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση σε *in vitro* πειράματα, αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Επιπλέον, οι φαινόλες συχνά δεσμεύουν άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως OH[•], NO₂[•], N₂O₃, ONOOH και HOCl. Κάποιες από αυτές αντιδρούν με O₂^{-•}, κυρίως οι διφαινόλες και οι πολυφαινόλες. Οι φαινόλες με δύο ομάδες -OH, ή άλλες δομές χήλωσης, μπορούν να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων (κυρίως σιδήρου και χαλκού) (Halliwell and Gutteridge 2007).

Η ανθρώπινη διατροφή περιέχει μία μεγάλη ποικιλία φαινολών. Π.χ. τα φασόλια σόγιας περιέχουν τοκοφερόλες, ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη και δαϊδζεΐνη) και καφεϊκό οξύ. Τα φιστίκια περιέχουν ταξιφολίνη. Το κρασί περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης, που παράγεται στα σταφύλια ως αμυντικός μηχανισμός στη τοξικότητα των μυκήτων. Το σησαμέλαιο περιέχει σησαμόλη, και το πράσινο τσάι είναι πλούσιο σε κατεχίνες που παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα *in vitro*. Η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη συμβάλλουν σημαντικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κόκκινου κρασιού (Manach and Donovan 2004).

Πίνακας 5. Διατροφικές πηγές φλαβονοειδών

Ένωση	Πηγές
Φλαβανόλες	Πράσινο τσάι
Επικατεχίνη, Κατεχίνη, Epigallocatechin, Epicatechin gallate, EGCG	Κόκκινο κρασί Κακάο, Σοκολάτα
Φλαβανόνες	
Ναριγγένινη, Ταξιφολίνη	Κίτρο
Φλαβονόλες	
Καμφερόλη	Μπρόκολα, ραδίκια, μαύρο τσάι, γκρέιπ φρουτ
Κουσερετίνη	Κρεμμύδια, μπρόκολο, βατόμουρα, μήλα, μούρα, ελιές, τσάι, κόκκινο κρασί
Μυρικετίνη	Βατόμουρα, σταφύλια, κόκκινο κρασί
Φλαβόνες	
Χρυσίνη	Φλούδες φρούτων
Απιγενίνη	Σέλινο, μαϊντανό
Ανθοκυανίδες	
Μαλβιδίνη	Κόκκινα σταφύλια, κόκκινο κρασί
Κυανιδίνη	Κεράσια, φράουλες, σταφύλια
Απιγενιδίνη	Χρωματιστά φρούτα και φλούδες
Hydrocinnamic acid derivatives	
Καφεϊκό οξύ	Άσπρα σταφύλια, λευκό κρασί, ελιές, ελαιόλαδο, σπανάκι
Π-κουμαρικό οξύ	Άσπρα σταφύλια, λευκό κρασί, τομάτες, σπανάκι, λάχανο
Χλωρογενικό οξύ	Μήλα, αχλάδια, κεράσια, ροδάκινα, βερίκοκα, τομάτες, καφές

Από: Rice-Evans *et al.* 1996

Τα βότανα και τα καρυκεύματα χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στη διατήρηση των τροφίμων. Είναι πολύ καλές πηγές αντιοξειδωτικών. Εκχυλίσματα από φασκόμηλο, δεντρολίβανο, κόκκινες πιπεριές, τζίντζερ, ρίγανη και θυμάρι αναστέλλουν την οξείδωση λιπιδίων *in vitro*, κυρίως λόγω των φαινολών που περιέχουν (Πίνακας 5). Επίσης πολλές φορές οι φαινόλες στα φυτά είναι ενωμένες με σάκχαρα και σχηματίζουν γλυκοζίτες

(glucosides). Τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι γλυκοζυλιωμένα στα φυτά, με εξαίρεση τις κατεχίνες.

Οι πολυφαινόλες δεν απορροφούνται πλήρως και το ποσό που απορροφάται ποικίλει ανάμεσα στα είδη και τα άτομα και εξαρτάται από την ένωση. Για παράδειγμα, στους ανθρώπους οι ανθοκυανίδες δεν απορροφούνται τόσο καλά όσο η κουεσερτίνη ή οι κατεχίνες. Τα γλυκοσίδια (glucosides) συνήθως υδρολύονται από εντερικά ένζυμα γλυκοζυλίωσης και οι φαινόλες που σχηματίζονται απορροφούνται. Οι φαινόλες που δεν απορροφούνται εισέρχονται στο κόλον, όπου οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται εκτεταμένα σε μονοφαινόλες και άλλα προϊόντα από την χλωρίδα του εντέρου. Αυτές που απορροφούνται μεταβολίζονται γρήγορα με μεθυλίωση και γλουκορινίωση των -OH ομάδων, στο έντερο και στο ήπαρ. Το ήπαρ επίσης καταλύει την σούλφωση των φαινολών. Το μεγαλύτερο μέρος των πολυφαινολών βρίσκεται με τη μορφή γλουκορονιδίων και μερικά ως σουλφίδια (Yang *et al.* 2008).

Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η ημερήσια κατανάλωση φλαβονοειδών στην ΗΠΑ και Δανία υπολογίζεται στα 20-25mg/ημέρα ενώ η ολική πρόσληψη πολυφαινολών μπορεί να υπερβεί τα 100mg/ημέρα σε άτομα που καταναλώνουν δίαιτες πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά (Manach *et al.* 2004).

Η ανακάλυψη ότι οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την *in vitro* οξειδωση της LDL οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορούν και ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση αναστέλλοντας την οξειδωση της LDL *in vivo*. Αυτό προτάθηκε για να εξηγήσει τα χαμηλά επίπεδα εμφάνισης καρδιακών ασθενειών σε ορισμένες περιοχές της Γαλλίας (το «Γαλλικό Παράδοξο») παρά την παρουσία παραγόντων υψηλού κινδύνου, όπως το κάπνισμα και η υψηλή πρόσληψη λίπους (Renaud and De Lorgeril 1992). Το αλκοόλ από μόνο του παρουσιάζει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες και ακόμη γίνεται συζήτηση για τον αν το κρασί έχει επιπλέον οφέλη από την παρουσία των φλαβονοειδών.

Μια επιδημιολογική μελέτη στην Ολλανδία (Zutphen Study) πρότεινε μια αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα εμφάνισης αγγειακών παθήσεων και αποπληξίας και διαιτητικής πρόσληψης φλαβονοειδών (ειδικά κουεσερτίνης) που προέρχονται κυρίως από το τσάι, φρούτα (π.χ. μήλα) και λαχανικών (π.χ. κρεμμύδια) (Keli *et al.* 1996). Όπως και στις ΗΠΑ και τη Δανία η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών στην Ολλανδία υπολογίστηκε στα 23mg/ημερησίως εκ των οποίων τα 16mg/ημέρα είναι κουεσερτίνη, πολύ περισσότερα από την μέση ημερήσια πρόσληψη α-τοκοφερόλης (7-10mg).

Προτάθηκε ότι τα προφανή ευεργετικά αποτελέσματα οφείλονται στην αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών. Έχουν γίνει πολλές μελέτες με τη χρήση βιοδεικτών οξειδωτικού στρες όπως F₂-IPs και 8OHdG, για να διαπιστωθεί αν τα φλαβονοειδή ασκούν αντιοξειδωτική δράση *in vivo*. Ορισμένες μελέτες για το πράσινο τσάι, τη σόγια, τη σοκολάτα, το κρασί χωρίς αλκοόλ, τα εκχυλίσματα σκόρδου και ο χυμός σταφυλιού καθώς και μελέτες σε απομονωμένες μελέτες έχουν επιφέρει θετικά αποτελέσματα. Βεβαίως, η προστατευτική δράση των τροφίμων και ποτών πλούσιων σε φλαβονοειδή δεν πρέπει απαραίτητα να αποδίδεται στα φλαβονοειδή. Αντιστοίχως υπάρχουν πολλές μελέτες που η παροχή καθαρών φαινολών ή τροφίμων πλούσιων σε φλαβονοειδή έχει αποτύχει να επιφέρει αλλαγές σε παραμέτρους του οξειδωτικού στρες (Halliwell *et al.* 2005). Από τη στιγμή που η συγκέντρωση των μη συζευγμένων πολυφαινολών στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλή και συνήθως βρίσκονται με τη μορφή των μεταβολιτών τους που τείνουν να έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (λόγω του αποκλεισμού των -OH ομάδων από τη μεθυλίωση, σουλφωση ή γλουκουρονίωση) είναι δύσκολο να φανταστούμε ότι ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vivo*. Βεβαίως, στο στομάχι, λεπτό έντερο και κόλον τα επίπεδα των φαινολών είναι υψηλά και πιθανόν να ασκούν εκεί την αντιοξειδωτική και προστατευτική τους δράση (Halliwell *et al.* 2005).

Υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση των флаβονοειδών και των παραγώγων τους για θεραπευτική χρήση, όπως ως αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά, αντι-ισχαιμικά και αντιθρομβωτικά στοιχεία. Η χρήση εκχυλισμάτων από βότανα, που είναι πλούσια σε φαινόλες, ως θεραπευτικά μέσα είναι ευρέως διαδεδομένη στην Ιαπωνία και την Κίνα. Ωστόσο, δεν πρέπει να υποθέτουμε ότι τα φυσικά προϊόντα είναι ασφαλή στη κατανάλωση μόνο και μόνο επειδή είναι φυσικά. Παραδείγματα επιβλαβών παραγόντων που παράγονται από τα φυτά είναι το κυανίδιο και οι αφλατοξίνες. Πολλά φυτικά παράγωγα που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν ως συντηρητικά τροφίμων ή και για άλλες χρήσεις έχουν απομακρυνθεί λόγω των τοξικών ή καρκινικών τους δράσεων. Απαιτείται πολύ προσοχή στην επιλογή των флаβονοειδών από φυτά που πολλές φορές αν και έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτές συνοδεύονται από επιβλαβείς δράσεις.

1.3 Αντιοξειδωτικά μόρια στην πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ερευνών που υποδεικνύουν ότι δίαιτες πλούσιες σε φυτικές τροφές παρέχουν προστασία έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, πολλών κοινών τύπων καρκίνου και άλλων χρόνιων παθήσεων (Stanner *et al.* 2004). Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι καλές πηγές αντιοξειδωτικών και έχει προταθεί ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να εμποδίσουν ορισμένους τύπους ασθενειών. Η ιδέα αυτή έχει δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές και δεν φαίνεται να είναι αληθής, αφού τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών δεν έχουν σαφή επίπτωση στον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών όπως του καρκίνου και των καρδιοπαθειών (Shenkin 2006). Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα οφέλη για την υγεία είτε προέρχονται από άλλες ουσίες στα φρούτα και τα λαχανικά (ενδεχομένως φλαβονοειδών), ή προέρχονται από ένα περίπλοκο μείγμα ουσιών (Lotito and Frei 2006).

Η οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών στο αίμα συμβάλλει στην πρόκληση καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι αρχικές μελέτες παρατήρησης διαπίστωσαν ότι άτομα που λάμβαναν συμπληρώματα βιταμίνης E, είχαν χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιακής νόσου (Rimm *et al.* 1999). Σε ένα μεγάλο αριθμό κλινικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκε για να ελέγξουν την επίδραση των συμπληρωμάτων βιταμίνης E, σε δόσεις που κυμαίνονται από 50 έως 600 mg ανά ημέρα, δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση της βιταμίνης E στον συνολικό αριθμό των θανάτων ή των θανάτων που οφείλονται σε καρδιακή νόσο (Vivekananthan *et al.* 2003; Lee *et al.* 2005; Sesso *et al.* 2008). Δεν είναι σαφές εάν οι δόσεις που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ή στα περισσότερα συμπληρώματα διατροφής είναι δυνατόν να προκαλέσουν οποιαδήποτε σημαντική μείωση στο οξειδωτικό στρες (Roberts 2007). Παρά το σαφή ρόλο του οξειδωτικού στρες στα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι μελέτες που χρησιμοποιούν

αντιοξειδωτικές βιταμίνες δεν έχουν εντοπίσει μείωση, είτε τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής ασθένειας, ή στο ρυθμό εξέλιξης υφιστάμενης νόσου (Bleys *et al.* 2006; Cook *et al.* 2007).

Η μελέτη SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants) μελέτησε την επίδραση των συμπληρωμάτων σε δόσεις συγκρίσιμες με αυτές σε μία υγιεινή διατροφή (Hercberg *et al.* 2004). Στη μελέτη συμμετείχαν 12500 εθελοντές (άνδρες και γυναίκες) οι οποίοι λάμβαναν είτε μια χαμηλή δόση αντιοξειδωτικών (120 mg ασκορβικού οξέος, 30 mg βιταμίνης E, 6 mg β-καροτίνης, 100 μg του σεληνίου και 20 mg ψευδαργύρου) ή εικονικό φάρμακο (placebo) για περίπου 7.5 χρόνια. Οι ερευνητές βρήκαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική επίδραση των αντιοξειδωτικών για την συνολική επιβίωση, τον καρκίνο ή καρδιοπάθειες. Μια post-hoc ανάλυση βρήκε 31% μείωση του κινδύνου καρκίνου στους άνδρες, αλλά όχι στις γυναίκες.

Ως «τροφοφάρμακο» ορίζεται κάθε συστατικό που μπορεί να θεωρηθεί τρόφιμο ή μέρος των τροφίμων και προβλέπει ιατρικά και τα οφέλη για την υγεία (Villasenor *et al.* 2002). Πιο συγκεκριμένα, τα «τροφοφάρμακο» είναι φυσικά συστατικά των τροφίμων ή άλλες εύπεπτες μορφές που έχει αποδειχτεί ότι έχουν ευεργετική δράση στη πρόληψη ή στη θεραπεία μιας ή περισσότερων ασθενειών ή τη βελτίωση της φυσιολογικής απόδοσης. Δυνατόν επίσης να ονομάζονται και λειτουργικά τρόφιμα (functional foods), ιατρικά τρόφιμα, φαρμακευτικά τρόφιμα, και τα τρόφιμα για καθορισμένη χρήση για την υγεία.

Πολλές εταιρείες «τροφοφαρμάκων» και υγιεινής διατροφής διαθέτουν σκευάσματα αντιοξειδωτικών ως συμπληρώματα διατροφής τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανικές χώρες (Radimer *et al.* 2004). Τα συμπληρώματα μπορεί να περιλαμβάνουν συγκεκριμένα χημικά αντιοξειδωτικά, όπως την πολυφαινόλη ρεσβερατρόλη (Latruffe *et al.* 2002), συνδυασμούς αντιοξειδωτικών (προϊόντα που περιέχουν β-καροτένιο, βιταμίνη C, βιταμίνη E και το σελήνιο) ή αρωματικών φυτών που

περιέχουν αντιοξειδωτικά - όπως το πράσινο τσάι. Υπάρχουν σημαντικές αμφιβολίες για το κατά πόσον τα αυτά συμπληρώματα είναι ωφέλιμα ή επιζήμια, και αν είναι πράγματι επωφελή, ποιο αντιοξειδωτικό/ά είναι απαραίτητο και σε ποια ποσότητα (Shenkin 1997).

Σύμφωνα με τις επιδημιολογικές μελέτες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας η κατάλληλη διατροφή θα μπορούσε να εμποδίζει το 35% περίπου των θανάτων από καρκίνο, και μέχρι και το 90% ορισμένων μορφών καρκίνου θα μπορούσαν να αποφευχθούν με διατροφική ενίσχυση. Αντιοξειδωτικά με αντικαρκινική δράση περιέχονται σε πολλά λαχανικά, όσπρια, εσπεριδοειδή, βότανα και μπαχαρικά. Ο τρόπος δράσης τους είναι μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου της απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών και την τροποποίηση ενζυμικών συστημάτων που μπορούν να αποτοξινώσουν ή να μεταβολίζουν καρκινογόνες ουσίες σε λιγότερο τοξικά είδη (Hardy *et al.* 2003).

Ειδικό μέρος

2. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετά τη δράση επιλεγμένων φλαβονολών (επικατεχίνη, κατεχίνη και EGCG) ως αντικαρκινικών παραγόντων σε κυτταρικά *in vitro* μοντέλα αλλά και ως παραγόντων αναστολής του οξειδωτικού στρες σε ένα *in vivo* μοντέλο οξείας τοξικότητας από όζον σε επίμυες Wistar. Αναλυτικά:

In vitro

Μελετήθηκε η δράση των προαναφερθέντων φλαβονολών στην ανάπτυξη και στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών σειρών σε σύγκριση με άλλα πολυφαινολικά μόρια. Επίσης πραγματοποιήθηκε και κυτταρομετρία ροής για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης τους (απόπτωση ή νέκρωση).

Επιλέχθηκαν τα παρακάτω φλαβονοειδή: γενιστεΐνη, απιγενίνη, γαλλικό οξύ, επικατεχίνη, κατεχίνη και EGCG (Σχήμα 6). Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές: LMS (leiomyosarcomatic cell line-λαιομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar), MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line-Ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού) και MRC5 (Normal Human Fetal Lung Fibroblast-Φυσιολογικοί ινοβλάστες από πνεύμονα εμβρύου).

In vivo

Μελετήθηκε η δράση της χορήγησης όζοντος και των φυσικών αντιοξειδωτικών μορίων της Ομάδας των φλαβονολών [επικατεχίνη, κατεχίνη και EGCG] στο ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας επίμυων Wistar Rats, σε δείκτες οξειδωτικού στρες, σε

δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας και καθώς και στις συγκεντρώσεις μετάλλων με αντιοξειδωτικές δράσεις. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

Φάση I.

Πρόκληση οξειδωτικού στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε διάφορες δόσεις.

- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση φυσιολογικού ορού σε Ομάδα ενήλικων επίμυων Wistar Rats που χρησιμοποιήθηκε ως Ομάδα ελέγχου. Μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης στα ούρα.
- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε Ομάδα ενήλικων επίμυων Wistar Rats σε συγκέντρωση 1000μg/lit (6.1μg/κιλό σωματικού βάρους). Μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης στα ούρα.
- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε Ομάδα ενήλικων επίμυων Wistar Rats σε συγκέντρωση 2000μg/lit (12.2μg/κιλό σωματικού βάρους). Μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης στα ούρα.

Φάση II.

Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή μίγματος κατεχινών σε νεαρούς επίμυες Wistar.

- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση φυσιολογικού ορού σε Ομάδα επίμυων Wistar Rats που χρησιμοποιήθηκε ως Ομάδα ελέγχου. Μετρήθηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων, μετρήθηκαν τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης στα ούρα, ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνης και ο

αιματοκρίτης, καθώς επίσης προσδιορίστηκαν και διάφοροι διατροφικοί δείκτες και δείκτες μεταβολισμού.

- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων όζοντος σε επίμυες Wistar Rats. Μετρήθηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων, μετρήθηκαν τα επίπεδα μαλονικής διαλδεϋδης στα ούρα, ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνης και ο αιματοκρίτης, καθώς επίσης προσδιορίστηκαν και διάφοροι διατροφικοί δείκτες και δείκτες μεταβολισμού.
- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων μίγματος 1:1 κατεχίνης/επικατεχίνης σε επίμυες Wistar Rats. Μετρήθηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων, μετρήθηκαν τα επίπεδα μαλονικής διαλδεϋδης στα ούρα, ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνης και ο αιματοκρίτης, καθώς επίσης προσδιορίστηκαν και διάφοροι διατροφικοί δείκτες και δείκτες μεταβολισμού.

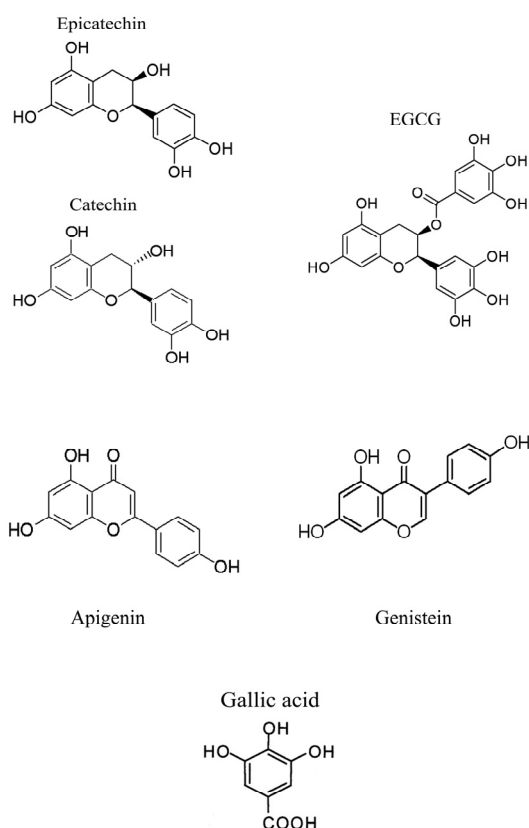
Φάση III.

Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar.

- Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων όζοντος σε επίμυες Wistar Rats για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και η «θεραπεία» για αντίστοιχο χρονικό διάστημα με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχίνης/επικατεχίνης/EGCG (0.35:0.35:0.3). Έγινε ανάλυση δεικτών οξειδωτικού στρες (μαλονική διαλδεϋδη), ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος αίματος, ερυθρών αιμοσφαιρίων και

ούρων, προσδιορίστηκε η δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων, μετρήθηκαν διάφοροι αιματολογικοί δείκτες, καθώς και διατροφικοί δείκτες και δείκτες μεταβολισμού.

- Έγινε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχίνης/επικατεχίνης/EGCG (0.35:0.35:0.3) σε επίμυες Wistar Rats (πρόληψη) για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια προκλήθηκε οξειδωτικό στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων όζοντος. Προσδιορίστηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες (μαλονική διαλδεϋδη), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ούρων, προσδιορίστηκε η δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων, μετρήθηκαν διάφοροι αιματολογικοί δείκτες, καθώς επίσης προσδιορίστηκαν διατροφικοί δείκτες και δείκτες μεταβολισμού.



Σχήμα 6. Χημική δομή των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 In vitro μελέτη

3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/lt), PAA
2. Phosphate Buffer Saline (PBS), P4417, Sigma
3. Trypsin-EDTA, 0.05%/0.02% in D-PBS, L11-004, PAA
4. Penicillin-Streptomycin, P11-010, PAA
5. L-glutamine, 200mM, M11-004, PAA
6. Fetal bovine serum (FBS), A15-101, PAA
7. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, approx. 97.5% TLC), M5655, SIGMA
8. Trypan blue, powder, cell culture tested T6146, Sigma
9. Dimethylsulfoxid, 60153, Riedel-de Haen
10. Annexin V-FITV, 556420, BD Pharmingen TM
11. Propidium Iodide solution, P4864, Sigma
12. (-) Epicatechin, $\geq 90\%$ (HPLC) E1753, Sigma
13. (+) Catechin, $\geq 98\%$ (TLC), powder, C1251, Sigma
14. Genistein, $\geq 98\%$ (HPLC), powder, G6649, Sigma
15. Apigenin, $\geq 95\%$ (HPLC), A3145, Sigma
16. Gallic acid, G7384, Sigma
17. L-ascorbic acid, A5960, Sigma
18. 3-methylbutanol, 59100, Fluka Analytical
19. Ammonium dichromate 99%, ReagentPlus 224812, Sigma-Aldrich

20. (\pm) α -tocopherol approx. 95% HPLC, T3251, Sigma
21. Hydrogen peroxide solution 35% by weight, 18304, Riedel-de Haen
22. Πολυεστερικές κυβέτες 10mm του οίκου Sarsterdt Co

3.1.2 Κυτταρική καλλιέργεια

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμους Wistar (LMS cells-leiomyosarcomatic cells), ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7) και φυσιολογικοί ινοβλάστες από πνεύμονα εμβρύου (MRC-5). Τα LMS και MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1gr/lit), με την προσθήκη 10% εμβρυϊκού βοδινού ορού (Fetal Bovine Serum), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης και 0.5% L-γλουταμίνης, ενώ για τους φυσιολογικούς ινοβλάστες προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

3.1.3 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση χρωστικής Trypan Blue Exclusive Assay

Ο έλεγχος βιωσιμότητας των LMS κυττάρων στα φλαβονοειδή πραγματοποιήθηκε σε πολυτριβλία των 24 φρεατίων. Από ένα αρχικό τριβλίο που διατηρούνται τα κύτταρα, αναρροφάται το θρεπτικό και προστίθεται 10ml PBS για πλύση των κυττάρων. Στη συνέχεια αναρροφάται το PBS και προστίθεται 1ml θρυψίνη για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Για να επιταχυνθεί η αποκόλληση τοποθετείται το τριβλίο για περίπου τρία λεπτά στον επωαστή. Προστίθενται 10ml DMEM, γίνεται ανάδευση των κυττάρων και

τοποθέτηση τους σε falcon 15ml. Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και 11μl τοποθετούνται σε πλάκα NeuBauer και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων καθώς και της ποσότητας που απαιτείται για την προσθήκη 20000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό στο 1ml. Το πολυτριβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη των φλαβονοειδών. Από ένα αρχικό διάλυμα υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση σε τελικό όγκο 1ml. Το πολυτριβλίο τοποθετείται στον επωαστή και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα (48 ώρες).

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με την τεχνική χρώσης Trypan Blue. Αφού γίνει αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS τα κύτταρα αποκολλούνται με προσθήκη 0.25ml θρυψίνης. Έπειτα, προστίθενται 0.25ml PBS και 0.5ml Trypan Blue και τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με χρήση πλάκας NeuBauer. Τα κύτταρα που επιβίωσαν από τη κυτταροτοξική δράση των φλαβονοειδών είναι αρνητικά στη χρώση. Το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων στα φρεάτια δοκιμής της ουσίας εκφράζεται σε εκατοστιαίες μονάδες συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων των φρεατίων ελέγχου.

3.1.4 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση MTT assay

Πραγματοποιείται σπορά 5000 κυττάρων σε ένα πολυτριβλίο 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂

πραγματοποιείται η προσθήκη φλαβονοειδών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 48 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη 50μl MTT (3mg/ml) και νέα επώαση για 3 ώρες. Με προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και η διάλυση των κρυστάλλων που σχηματιστήκαν στο ταπήτιο του πολυτριβλίου γίνεται με την προσθήκη 200μl DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέττας. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιείται στα 540nm (η απορρόφηση υποβάθρου- background absorbance μετρήθηκε στα 690 nm) με τη χρήση ενός φασφατοφωτόμετρου (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.1.5 Κυτταρομετρία ροής

Πραγματοποιείται σπορά 60.000 κυττάρων σε πολυτριβλίο έξι φρεατίων. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Με την πάροδο 24 ωρών, πραγματοποιείται η προσθήκη φλαβονοειδών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Μετά από 48 ώρες το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από το κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου σε σωλήνες falcon 15ml. Γίνεται πλύση με 2ml PBS το οποίο και συλλέγεται στα αντίστοιχα falcon. Προστίθενται 0.3ml Trypsin σε κάθε φρεάτιο και τα πολυτριβλία επωάζονται στους 37°C για περίπου 5 λεπτά μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Προστίθενται 2ml PBS και τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με τη χρήση πιπέττας. Αφού αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα συλλέγονται στα αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με χρήση πλάκας NeuBauer. Τα falcon φυγοκεντρώνονται στις 3.500 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναιωρούνται τα κυτταρικά ιζήματα σε δ/μα Calcium Buffer 1x και με τους

κατάλληλους υπολογισμούς λαμβάνονται και τοποθετούνται σε erpendorf 100.000 κύτταρα σε 100μL Calcium Buffer 1x.

Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σκοτεινό θάλαμο όπου σε κάθε erpendorf προστίθενται 5μl Annexin και 4μl Propidium Iodide . Όλα τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών προστίθενται επιπλέον 1ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1.1ml). Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow[®]ML, Partec, Munster, Germany) όπου πραγματοποιείται ανάλυση και προσδιορισμός % του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

3.1.6 Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Για την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης των φλαβονοειδών και του L-ασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κυανού του CrO₅ (Charalampidis *et al.* 2009, Κεφ. 3.2.6 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα).

3.1.7 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm σταθερή απόκλιση. Η ανάλυση και η απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογιστικό πακέτο Excel 2003 (Microsoft[®] Office 2003, Microsoft Corporation, USA).

3.2 In vivo μελέτη

3.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια

1. (-) Epicatechin, $\geq 90\%$ (HPLC) E1753, Sigma
2. (+) Catechin, $\geq 98\%$ (TLC), powder, C1251, Sigma
3. Epigallo-catechin-galate (EGCG), $\geq 95\%$ from green tea, E4143, Sigma
4. Superoxide Dismutase Assay Kit, 19160, Sigma-Biochemica
5. Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit, CGP1, Sigma
6. 2-thiobarbituric acid (TBA), $\geq 98\%$, T5500, Sigma-Aldrich
7. 1,1,3,3-tetraethoxypropane, 86750, Fluka
8. ortho-Phosphoric acid 85%, 79606, Fluka Analytical
9. 3-methylbutanol, 59100, Fluka Analytical
10. Ammonium dichromate 99%, ReagentPlus 224812, Sigma-Aldrich
11. (\pm) α -tocopherol approx. 95% HPLC, T3251, Sigma
12. Hydrogen peroxide solution 35% by weight, 18304, Riedel-de Haen
13. Rat TNF- α /TNFSF1A Immunoassay, Quantikine, RTA00, R&D Systems
14. Πολυεστερικές κυβέτες 10mm του οίκου Sarstedt Co
15. Histopaque®1077, 10771, Sigma-Aldrich

3.2.2 Σχεδιασμός πειράματος

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 84 λευκοί θηλυκοί επίμυες ίδια ηλικίας και παραπλήσιου βάρους (*Rattus norvegicus*) του στελέχους Wistar/Mol/Af/Han/Kuo/Ιο οι οποίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες πειραματόζωων. Τα ζώα

τοποθετήθηκαν σε μεταβολικούς κλωβούς, ένα πειραματόζωο σε κάθε κλωβό, σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου (25°C), και σε ρυθμισμένες συνθήκες φωτισμού ώστε να υπάρχει σταθερός κύκλος φως:σκοτάδι 12:12 ώρες. Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε καθορισμένης σύστασης τροφής (Viozois S.A., Animal Feed Company of Epirus, Greece) και σε πόσιμο νερό.

Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και την Οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη φροντίδα και χρήση πειραματόζωων (Προεδρικό Διάταγμα 160/3-5-1991 άρθρα 13 και 19, Οδηγία 86/609/Ευρωπαϊκού Συμβουλίου).

Η μελέτη χωρίστηκε σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση (Φάση I) στην οποία συμμετείχαν 3 ομάδες πειραματόζωων (8 πειραματόζωα η κάθε Ομάδα) χορηγήθηκε όζον σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ενώ τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σε σχέση με την Ομάδα ελέγχου. Στη δεύτερη φάση τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 12 πειραματόζωων (Φάση II) ενώ στη τρίτη φάση συμμετείχαν 2 ομάδες πειραματόζωων (24 πειραματόζωα) (Φάση III).

3.2.3 Πειραματικό πρωτόκολλο

3.2.3.1 Φάση I. Πρόκληση οξειδωτικού στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε διάφορες δόσεις

Στη φάση αυτή συμμετείχαν 24 πειραματόζωα ηλικίας 24 εβδομάδων και βάρους 206±19gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 επιμέρους ομάδες: την Ομάδα Ελέγχου, την Ομάδα Όζοντος 1 και την Ομάδα Όζοντος 2. Καθημερινά πραγματοποιούνταν μέτρηση της κατανάλωσης τροφής, πρόσληψης νερού, βάρους κοπράνων και όγκου ούρων. Το

βάρος των επίμυων μετρήθηκε την ημέρα 0, 11 και 22 και τις αντίστοιχες ημέρες έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος και ούρων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους -76°C μέχρι να γίνουν οι μετρήσεις. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν για 5 ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος στους μεταβολικούς κλωβούς ώστε να εγκλιματιστούν. Ο ολικός χρόνος του πειράματος ορίστηκε στις 22 ημέρες.

Ομάδα ελέγχου (CG): Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στους μεταβολικούς κλωβούς όπου και λάμβαναν καθημερινά ενδοπεριτοναϊκά 1.2cm^3 φυσιολογικού ορού (Ημέρα 1 ως 10). Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Ομάδα όζοντος 1 (GO1): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την πρώτη ημέρα 2cm^3 και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm^3 . Η συγκέντρωση όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν $1000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($6.1\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους). Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Ομάδα όζοντος 2 (GO2): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την πρώτη ημέρα 2cm^3 και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm^3 . Η συγκέντρωση όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν $2000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($12.2\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους). Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Όλα τα δείγματα αρχειοθετήθηκαν (κωδικοποιήθηκαν) και τοποθετήθηκαν στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

3.2.3.2 Φάση II. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή μίγματος κατεχινών σε νεαρούς επίμυες Wistar

Στη φάση αυτή συμμετείχαν 36 πειραματόζωα ηλικίας 12 εβδομάδων και βάρους 191 ± 14 gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 επιμέρους ομάδες: την Ομάδα ελέγχου, την Ομάδα όζοντος και την Ομάδα αντιοξειδωτικών. Καθημερινά πραγματοποιούνταν μέτρηση της κατανάλωσης τροφής, της πρόσληψης νερού, του βάρους κοπράνων και του όγκου ούρων. Το βάρος των επίμυων μετρήθηκε την ημέρα 0, 11 και 22 και τις αντίστοιχες ημέρες έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος και ούρων. Επιπλέον μετρήθηκε η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η θερμοκρασία των μεταβολικών κλωβών, η υγρασία και η εξάτμιση νερού. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν για 5 ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος στους μεταβολικούς κλωβούς ώστε να εγκλιματιστούν. Ο ολικός χρόνος του πειράματος ορίστηκε στις 22 ημέρες.

Ομάδα ελέγχου (CG): Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στους μεταβολικούς κλωβούς όπου και λάμβαναν καθημερινά ενδοπεριτοναϊκά 1cm^3 φυσιολογικού ορού (Ημέρα 1 ως 10). Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Ομάδα όζοντος (OG): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την πρώτη ημέρα 2cm^3 και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1cm^3 . Η συγκέντρωση όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν $1000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($5.8\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους). Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Ομάδα κατεχινών (CtG): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά για 10 συνεχόμενες ημέρες από 1cm³ μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης. Την 11^η ημέρα γινόταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες.

Το μίγμα κατεχινών αποτελούνταν από 2.25mg κατεχίνη και 2.25mg επικατεχίνη διαλυμένα σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό με τελική αναλογία στη ημερήσια δόση 50% κατεχίνης και 50% επικατεχίνης. Η συνολική δόση αντιστοιχούσε σε 4.5mg κατεχινών/πειραματόζωο, το οποίο αντιστοιχεί σε 23.5mg κατεχινών ανά κιλό σωματικού βάρους.

Όλες οι ενέσεις (όζον και κατεχίνες) πραγματοποιήθηκαν σε καθορισμένη χρονική στιγμή κάθε ημέρα (11.00-12.00 π.μ.). Όλα τα ζώα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για παρακολούθηση για 10 επιπλέον ημέρες (ημέρα 12 ως 21). Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά.

Όλα τα δείγματα αρχειοθετήθηκαν (κωδικοποιήθηκαν) και τοποθετήθηκαν στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

3.2.3.3 Φάση III. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar

Στη φάση αυτή συμμετείχαν 24 πειραματόζωα ηλικίας 24 εβδομάδων και βάρους 218±12gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 2 επιμέρους ομάδες (12 ζώα σε κάθε Ομάδα): την Ομάδα θεραπείας και την Ομάδα πρόληψης. Καθημερινά πραγματοποιούνταν μέτρηση της κατανάλωσης τροφής, της πρόσληψης νερού, του βάρους κοπράνων και του όγκου ούρων. Το βάρος των επίμυων μετρήθηκε την ημέρα 0, 11, 22 και 33 και τις αντίστοιχες ημέρες έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος και ούρων. Επιπλέον μετρήθηκε η

θερμοκρασία περιβάλλοντος, η θερμοκρασία των μεταβολικών κλωβών, η υγρασία και η εξάτμιση νερού. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν για 5 ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος στους μεταβολικούς κλωβούς ώστε να εγκλιματιστούν. Ο ολικός χρόνος του πειράματος ορίστηκε στις 33 ημέρες.

Ομάδα θεραπείας (Ομάδα I): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την πρώτη ημέρα 2cm³ όζοντος σε συγκέντρωση 1000μg/l (5.9μg/κίλο σωματικού βάρους) και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm³. Την 11^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Για τις επόμενες 10 ημέρες (12-21) στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1.25cm³ μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης-επιγαλοκατεχίνης σε συγκέντρωση 20mg/κίλο σωματικού βάρους. Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία.

Ομάδα πρόληψης (Ομάδα II): Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά για 10 συνεχόμενες ημέρες 1.25cm³ μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης-επιγαλοκατεχίνης (Ημέρα 1 ως 10). Την 11^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Την δωδέκατη ημέρα χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 2cm³ όζοντος σε συγκέντρωση 1000μg/l (5.9μg/κίλο σωματικού βάρους) και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm³. Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία.

Το μίγμα κατεχίνων αποτελούνταν από 1.55mg κατεχίνη, 1.55mg επικατεχίνη και 1.4mg επιγαλλοκατεχίνη, διαλυμένα σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό με τελική αναλογία στη ημερήσια δόση 35% κατεχίνης, 35% επικατεχίνης και 30% επιγαλλοκατεχίνης. Η συνολική δόση αντιστοιχούσε σε 4.5mg κατεχινών/πειραματόζωο, το οποίο αντιστοιχεί σε 20mg κατεχινών ανά κίλο σωματικού βάρους.

Όλες οι ενέσεις (όζον και κατεχίνες) πραγματοποιήθηκαν σε καθορισμένη χρονική στιγμή κάθε ημέρα (11.00-12.00 π.μ.). Όλα τα ζώα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για παρακολούθηση για 10 επιπλέον ημέρες (Ημέρα 23 ως 32). Την 33^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά.

Όλα τα δείγματα αρχειοθετήθηκαν (κωδικοποιήθηκαν) και τοποθετήθηκαν στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

3.2.4 Συλλογή και Διαχείριση δειγμάτων αίματος

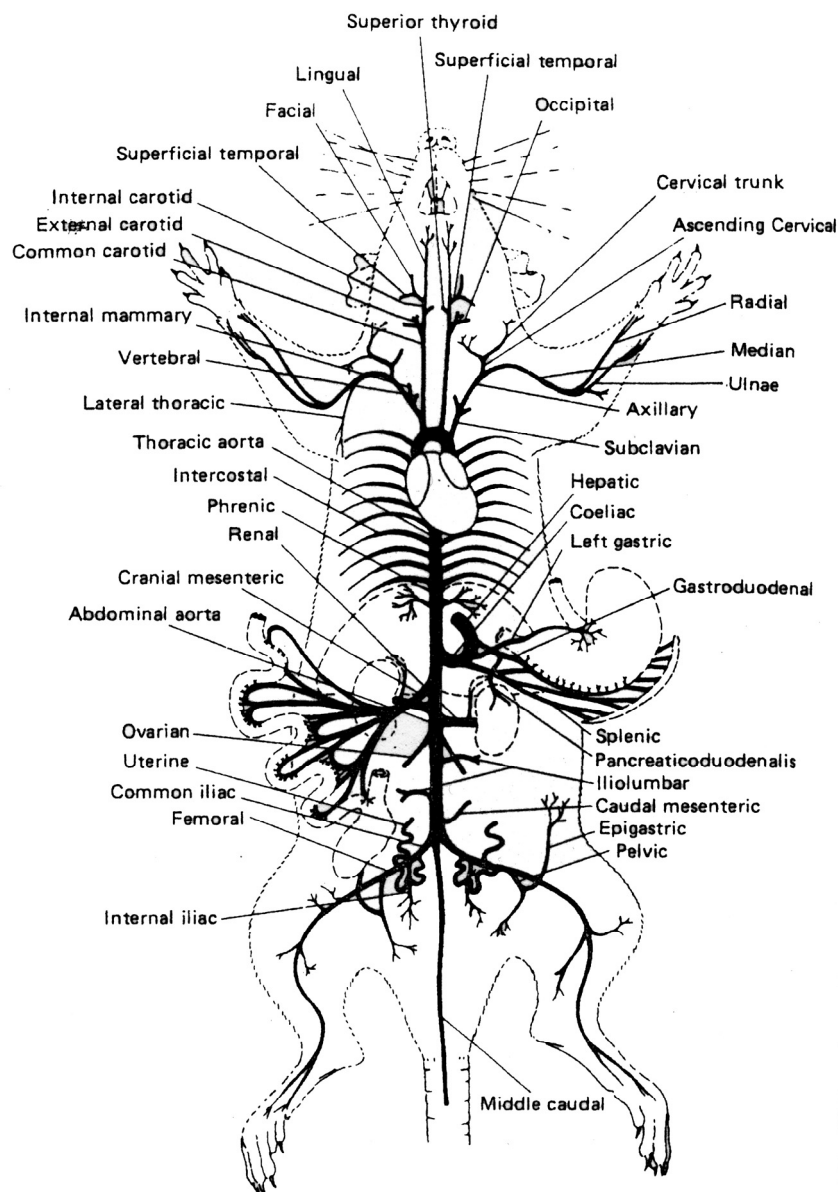
3.2.4.1 Φάση I. Πρόκληση οξειδωτικού στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε διάφορες δόσεις

Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε από την σφαγίτιδα (Σχήμα 7). Το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένους σωλήνες. Ο όγκος αίματος της κάθε αιμοληψίας καθορίστηκε στα 2ml/πειραματόζωο. Πραγματοποιήθηκαν 3 αιμοληψίες τις ημέρες 0, 11 και 22. Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 3500 στροφές για να γίνει πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ύστερα τοποθετήθηκαν (πλάσμα και ερυθρά) στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

3.2.4.2 Φάση II. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή μίγματος κατεχινών σε νεαρούς επίμυες Wistar

Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε από την σφαγίτιδα. Το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένους σωλήνες. Ο όγκος αίματος της κάθε αιμοληψίας καθορίστηκε στα 2ml/πειραματόζωο. Πραγματοποιήθηκαν 3 αιμοληψίες τις ημέρες 0, 11 και 22. Αμέσως μετρήθηκε ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη χρήση πλάκας Neubauer και ο

αιματοκρίτης με τη χρήση μίας φυγοκέντρου αιματοκρίτη (Micro Haematocrit Centrifuge, Hawksley-England). Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 3500 στροφές για να γίνει πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ύστερα προστέθηκε διάλυμα Histopaque ώστε να διαχωριστούν πλήρως τα ερυθρά από τα λευκά αιμοσφαίρια. Τοποθετήθηκαν (πλάσμα και ερυθρά) στους -76°C μέχρι να αναλυθούν..



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων αρτηριών του θηλυκού επίμυα.

3.2.4.3 Φάση III. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar

Η συλλογή αίματος πραγματοποιήθηκε από την σφαγίτιδα. Το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένους σωλήνες. Ο όγκος αίματος της κάθε αιμοληψίας καθορίστηκε στα 2ml/πειραματόζωο. Πραγματοποιήθηκαν 4 αιμοληψίες τις ημέρες 0, 11, 22 και 33. Στα δείγματα αίματος έγινε αιματολογική ανάλυση σε μικροβιολογικό εργαστήριο όπου λαμβάνονταν οι εξής τιμές: μέτρηση αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, μέτρηση αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων, μέτρηση αιμοσφαιρίνης, όγκος αιματοκρίτη και αριθμός αιμοπεταλίων. Τα δείγματα ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 3500 στροφές για να γίνει πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τοποθετήθηκαν (πλάσμα και ερυθρά) στους -76°C μέχρι να αναλυθούν.

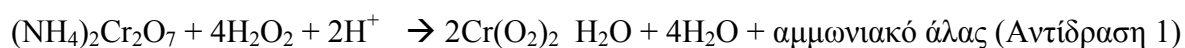
3.2.5 Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων

Για την μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης δισμουτάσης χρησιμοποιήθηκε kit της Sigma-Biochemica με κωδικό 19160. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της οξειδάσης της ξανθίνης και σε ένα καινοτόμο χρωματικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα πολύ υδατοδιαλυτό τετραζολικό άλας (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) το οποίο παράγει μια υδατοδιαλυτή χρώση καθώς ανάγεται από ένα ανιόν υπεροξειδίου. Ο ρυθμός μείωσης του οξειδίου είναι γραμμικός με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και η οποία αναστέλλεται από την υπεροξειδάση της δισμουτάσης. Συνεπώς, η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της δισμουτάσης μπορεί να μετρηθεί μέσω χρωματομετρικής μεθόδου.

Για την μέτρηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε kit της Sigma με κωδικό CGP1. Η μέθοδος βασίζεται στη οξείδωση της γλουταθειόνης σε οξειδωμένη γλουταθειόνη, αντίδραση η οποία καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και η οποία οξειδωμένη γλουταθειόνη ανάγεται πάλι σε γλουταθειόνη μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και τη χρήση NADPH. Η μείωση του NADPH σε NADP^+ είναι ενδεικτική της δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αφού το ένζυμο ορίζει το ρυθμό των αντιδράσεων.

3.2.6 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

Για την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα, στα ερυθρά και στα ούρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κυανού του CrO_5 (Charalampidis *et al.* 2009). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση ενός ισχυρού οξειδωτικού, του υπεροξειδίου του χρωμίου ($\text{Cr}(\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ή εν συντομία CrO_5). Η ουσία αυτή είναι προϊόν της αντίδρασης :



Το υπεροξείδιο του χρωμίου είναι ένα βαθυκύανο προϊόν σχετικά σταθερό σε πολικούς οργανικούς διαλύτες με μέγιστο μήκος κύματος φωτομετρικής απορρόφησης $\lambda = 569 \text{ nm}$ σε ισοαμυλική αλκοόλη, και $\lambda = 566 \text{ nm}$ σε ανθρακικό προπυλεστέρα. Για το όξινο περιβάλλον της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν οξέα όπως το θειικό οξύ (H_2SO_4) και το υπερχλωρικό οξύ (HClO_4). Όταν τα προϊόντα της αντίδρασης 1 αναμιχθούν με οργανικό διαλύτη, π.χ ισοαμυλική αλκοόλη, το σχηματιζόμενο CrO_5 μεταφέρεται στην οργανική φάση του διφασικού διαλύματος (διάλυμα 1). Τα αντιοξειδωτικά μόρια οποιασδήποτε ουσίας ή βιολογικού δείγματος, εάν προστεθούν στο ως άνω διάλυμα 1, καταστέλλουν το βαθυκύανο χρώμα του CrO_5 . Ο βαθμός καταστολής του χρώματος του διαλύματος 1,

ελεγχόμενος φωτομετρικά, αντιστοιχεί στην Αντιοξειδωτική Ικανότητα (ή την οξειδωτική κατάσταση) του υπό εξέταση δείγματος. Με βάση τα παραπάνω η μέθοδος βαθμονομήθηκε όσον αφορά την Αντιοξειδωτική Ικανότητα (διάλυμα 1) σε αντιστοιχία με συγκέντρωση α-τοκοφερόλης, ως πρότυπου αντιοξειδωτικού σώματος.

Αναλυτικά, 240μL οργανικού διαλύτη (3-methylbutanol), 80μL δ/τος διχρωμικού αμμωνίου 0.02M, 80μL δ/τος σουλφουρικού οξέος 0.025M και 4μL δείγματος προστίθενται σε πλαστική κυβέτα του 1ml. Η κυβέτα επωάζεται στο φασματοφωτόμετρο για 3 λεπτά και η ένδειξη μηδενίζεται. Η κυβέτα αφαιρείται από το μηχάνημα και προστίθενται 4μL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 1.6M. Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση της κυβέτας και τοποθέτηση της στο φασματοφωτόμετρο για επώαση 3 λεπτών. Μετά την πάροδο των 3 λεπτών καταγράφεται η ένδειξη της απορρόφησης. Για κάθε δείγμα γίνεται τριπλή επαλήθευση. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για το blank και το standard δ/μα με τη διαφορά ότι προστίθενται 4μL οργανικού διαλύτη και 4μL δ/τος α-τοκοφερόλης 0.1M αντίστοιχα αντί για δείγμα. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στους 37°C και το μήκος κύματος έχει ορισθεί στα 569nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος συγκρίνεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του διαλύματος 0.1M α-τοκοφερόλης, και οι μονάδες μέτρησης moles/lit α-tocopherol υπολογίζονται από τον τύπο:

$$TAC_{\text{sample}} = [\alpha\text{-tocopherol}] \times [(\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{standard}}]$$

3.2.7 Μέτρηση οξείδωσης λιπιδίων

3.2.7.1 Φάση I και Φάση II

Η παραγωγή των προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε στα ούρα με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA, thiobarbituric acid). Η βαθμονόμηση

της οξειδωσης έγινε με τη χρήση μαλονικής διαλδεύδης (malondialdehyde, MDA). Εκατό μικρόλιτρα (100μl) ούρων αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1 και ύστερα προστέθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με 900μl διαλύματος TBA. Το διάλυμα TBA παρασκευάστηκε με τη διάλυση 0.375gr TBA και 15gr TCA σε 100ml διαλύματος HCl 0.25N. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για μια ώρα. Η αντίδραση διακόπηκε αμέσως με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για 5 λεπτά. Η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 532nm με τη χρήση φασφατοφωτόμετρου.

3.2.7.2 Φάση III. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar

Τα επίπεδα μαλονικής διαλδεύδης προσδιορίστηκαν στα ούρα των πειραματόζωων με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας-φασματογράφου Μάζας (LC-MS) βασισμένη στη μεθοδολογία που προτείνουν οι Hong *et al.* 2002 με ορισμένες τροποποιήσεις. Εν συντομία, η συγκέντρωση της MDA μετρήθηκε ως σύμπλοκο που παράγεται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA, Sigma-Aldrich T5500, διάλυμα 23mmol/l σε νερό) με τη χρήση LC-MS. Παρασκευάστηκε ένα stock διάλυμα 10mmol/l MDA με τη διάλυση 247μL 1,1,3,3-tetraethoxypropane σε 100ml υδατικής αιθανόλης (40% αιθανόλη κατ' όγκο). Το σύμπλοκο TBA-MDA παρασκευάστηκε σε γυάλινους σωλήνες με πολυεστερικό πώμα. Σε κάθε σωλήνα, προστέθηκε 300μL φωσφορικού οξέος (0.5M) και αναμίχθηκε με 50μL ούρων και 150μL TBA. Οι σωλήνες θερμάνθηκαν στους 95°C για μία ώρα. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά. Προστέθηκαν 500μL μεθανόλης και οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 5000×g για 5 λεπτά. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια και 20μL αναλύθηκαν σε τη χρήση LC-MS.

3.2.8 Επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου στο πλάσμα και τα ούρα

Τα επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου στο πλάσμα του αίματος και στα ούρα προσδιορίστηκαν με τη χρήση φασφατοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης (Perkin Elmer spectrometer, model 560). Τα δείγματα αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1+4 για τις μετρήσεις του ψευδαργύρου και 1+2 για τις για τις μετρήσεις του χαλκού. Η ευαισθησία ορίστηκε στα 0.018μg/ml για το ψευδάργυρο και στα 0.09μg/ml για το χαλκό για κάθε 1% απορρόφηση.

3.2.9 Δείκτες φλεγμονής

Σαν δείκτης φλεγμονής ελήφθη ο παράγων νέκρωσης των όγκων TNF-α. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του παράγοντα TNF-α χρησιμοποιήθηκε kit της R&D Systems. Το kit αυτό βασίζεται στη τεχνική ποσοτικοποίησης που ονομάζεται ενζυμικό ανοσολογικό σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για τον παράγοντα TNF-α βρίσκεται στο ταπήτιο του πολυτριβλίου. Τα δείγματα (ελέγχου, πρότυπα και πλάσμα αίματος) τοποθετούνται στο πολυτριβλίο και ο παράγοντας TNF-α προσδένεται από το αντίσωμα. Αφού ξεπλυθούν τα φρεάτια από τις υπόλοιπες ουσίες που δεν προσδέονται, προστίθεται ένα ενζυμικό-πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για τον TNF-α. Επακολουθεί νέα πλύση των φρεατίων για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών και προστίθεται ένα υπόστρωμα το οποίο παράγει μαζί με το ενζυμικό-πολυκλωνικό αντίσωμα ένα μπλε παράγωγο το οποίο μετατρέπεται σε κίτρινο όταν προστεθεί το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης. Η ένταση του χρώματος μετρείται στα 450nm και είναι ανάλογη της ποσότητας του παράγοντα TNF-α που βρίσκεται στο φρεάτιο. Με βάση τα πρότυπα διαλύματα σχηματίζεται η καμπύλη αναφοράς και γίνεται αναγωγή των τιμών των δειγμάτων σε pg/ml TNF-α.

3.2.10 Στατιστική ανάλυση

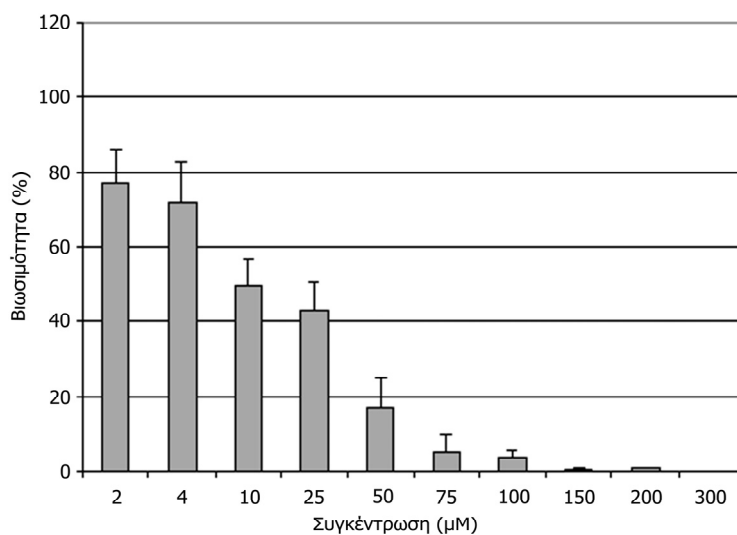
Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm σταθερή απόκλιση. Για το προσδιορισμό στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των μέσων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test και η ανάλυση two-way analysis of variance (ANOVA) για τη ανίχνευση στατιστικών σημαντικά διαφορών ανάμεσα στις ομάδες στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

4. Αποτελέσματα

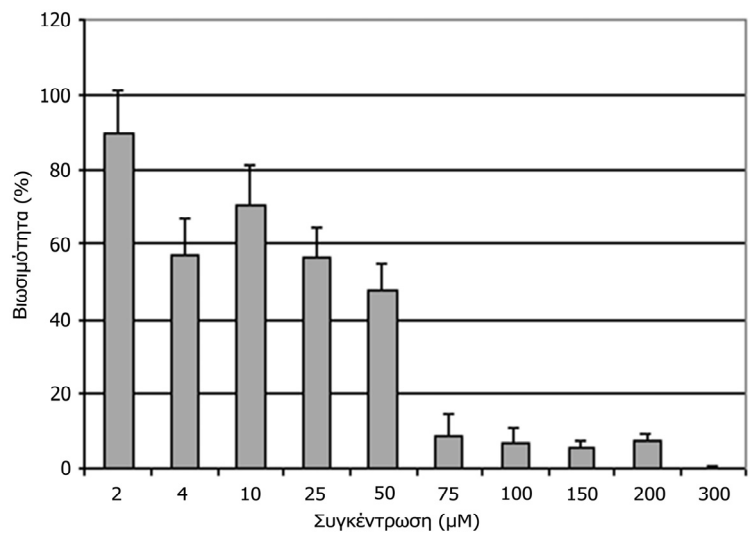
4.1 *In vitro* πειράματα

4.1.1 Έλεγχος βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας

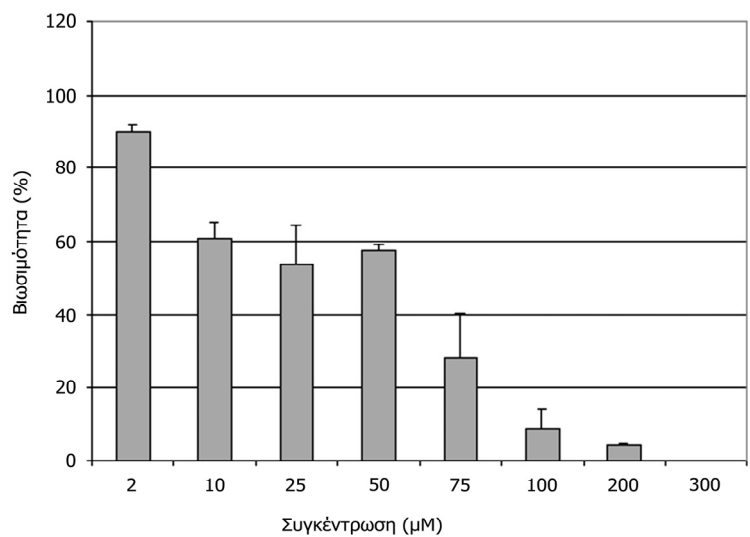
Η απιγενίνη εμφανίζει την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση από όλα τα φλαβονοειδή που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, το Γράφημα 1 απεικονίζει τη κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κύτταρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης (2-300 μ M). Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε στα 13.7 \pm 5.5 μ M για 48ώρη επώαση στις διάφορες συγκεντρώσεις απιγενίνης ενώ η LD ήταν κάτω από 300 μ M.



Γράφημα 1. Βιωσιμότητα λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 2. Βιωσιμότητα λειμοσαρκοωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

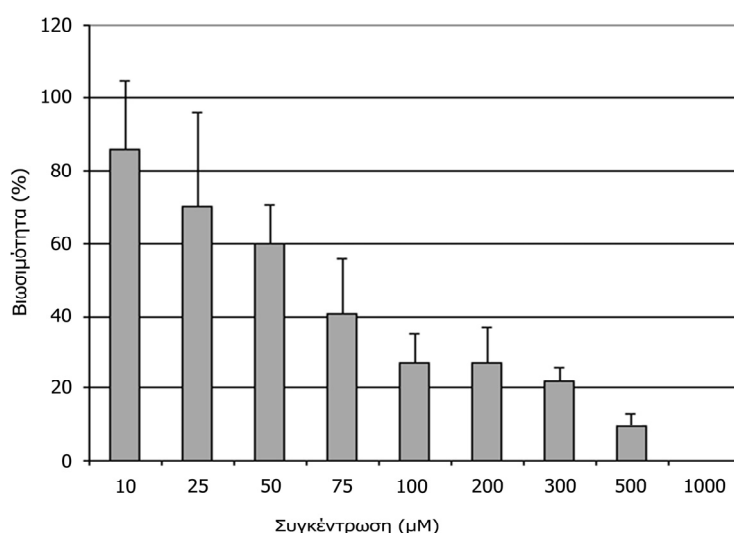


Γράφημα 3. Βιωσιμότητα λειμοσαρκοωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Η γενιστεΐνη είναι ισομερής ένωση της απιγενίνης ωστόσο η κυτταρική βιωσιμότητα των LMS κυττάρων είναι μεγαλύτερη. Η IC_{50} τιμή βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν $27.1 \pm 8.8 \mu M$, δηλαδή διπλάσια από την τιμή IC_{50} της απιγενίνης. Ωστόσο, και για την γενιστεΐνη η LD είναι μικρότερη από $300 \mu M$ αν και είναι εμφανές ότι στις υψηλές δόσεις (100, 150 και $200 \mu M$) η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι υψηλότερη από ότι με επώαση με απιγενίνη (Γράφημα 2).

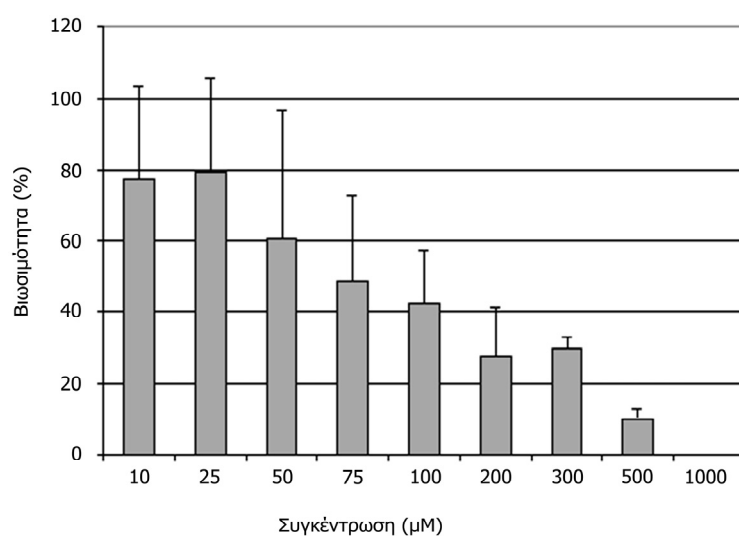
Το γαλλικό οξύ θεωρείται ισχυρή αντιοξειδωτική ένωση. Παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη δράση ενώ η IC_{50} τιμή βιωσιμότητας των LMS κυττάρων υπολογίστηκε στα $34.7 \pm 6.8 \mu M$. Και για το γαλλικό οξύ η LD είναι μικρότερη από $300 \mu M$ (Γράφημα 3).

Σε αντίθεση με τις τρία προηγούμενα φαινολικά μόρια, η επικατεχίνη εμφανίζει πιο ήπια δράση στα LMS κύτταρα (Γράφημα 4). Ενδεικτικές είναι οι τιμές IC_{50} και LD. Η τιμή IC_{50} της επικατεχίνης ήταν $78.6 \pm 33.6 \mu M$ ενώ η LD υπολογίστηκε μεταξύ 500 και $1000 \mu M$. Ένα άλλο χαρακτηριστικό ήταν η πολύ μεγάλες διακυμάνσεις (τυπικές αποκλίσεις) των μετρήσεων.

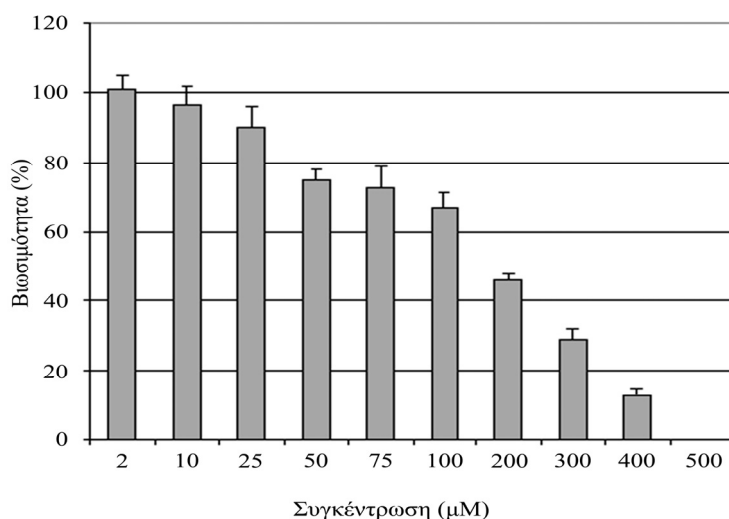


Γράφημα 4. Βιωσιμότητα λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επικατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Παρόμοια εικόνα με την επικατεχίνη παρουσιάζει και η κατεχίνη (Γράφημα 5). Η τιμή IC_{50} βιωσιμότητας των LMS κυττάρων ήταν $103.1 \pm 35.9 \mu M$ (περίπου 31% υψηλότερη από την επικατεχίνη) ενώ η LD υπολογίστηκε, όπως και για την επικατεχίνη, μεταξύ 500 και $1000 \mu M$. Επίσης, όπως και για την κατεχίνη οι διακυμάνσεις των μετρήσεων για τις διάφορες συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν αρκετά έντονες.



Γράφημα 5. Βιωσιμότητα λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 6. Βιωσιμότητα λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις EGCG. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

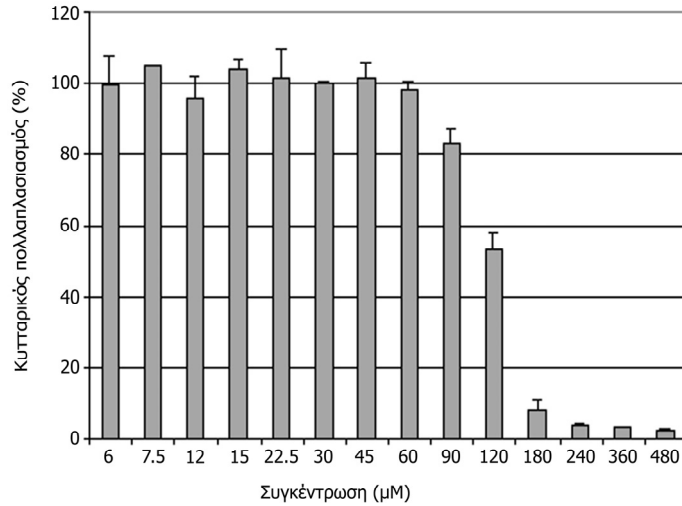
Ο Πίνακας 6 παρουσιάζει τις IC₅₀ τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας των LMS κυττάρων μετά από 48ώρη επώαση με τα φλαβονοειδή με τη μέθοδο Trypan Blue Exclusion Assay. Οι τιμές παρουσιάζονται κατά αυξάνουσα σειρά. Η απιγενίνη εμφάνισε την ισχυρότερη δράση ενώ η EGCG την ασθενέστερη.

Πίνακας 6. Τιμές IC₅₀ σε LMS κύτταρα των φλαβονοειδών με τη μέθοδο Trypan Blue Exclusion Assay

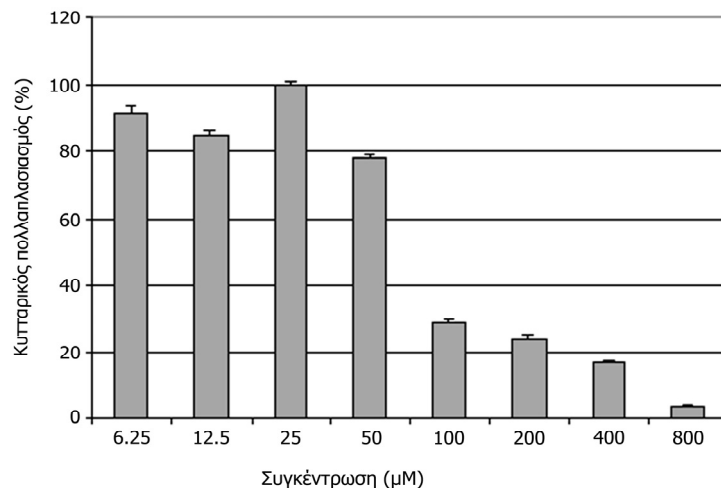
Apigenin	13.7±5.5μM
Genistein	27.1±8.8μM
Gallic acid	34.7±6.8μM
(-) Epicatechin	78.6±33.5μM
(+) Catechin	103.1±35.9μM
EGCG	153.3±12.35μM

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

4.1.2 Έλεγχος κυτταρικής πολλαπλασιαστικότητας



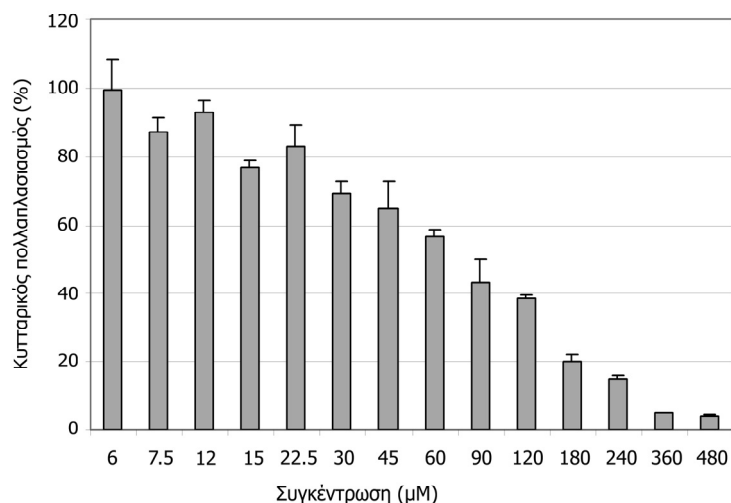
Γράφημα 7. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



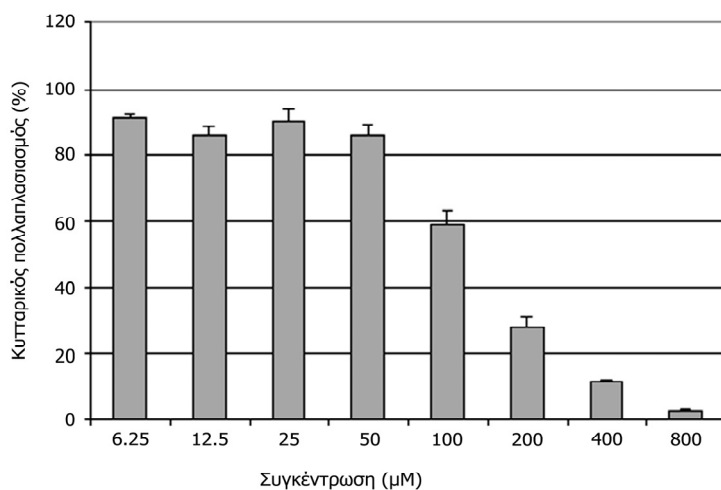
Γράφημα 8. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Η απιγενίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των LMS κυττάρων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 60μΜ ενώ των MCF7 κυττάρων σε συγκεντρώσεις

μεγαλύτερες από 25 μ M όπως φαίνεται από τα Γραφήματα 7 και 8. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σημείωσε έντονη πτώση μετά τα 120 μ M στα LMS κύτταρα και μετά τα 50 μ M για τα MCF7 κύτταρα. Η τιμή IC₅₀ με τη μέθοδο MTT ήταν για τα LMS κύτταρα 95.2 \pm 5.0 μ M ενώ για τα MCF7 κύτταρα 117.8 \pm 6.7 μ M.

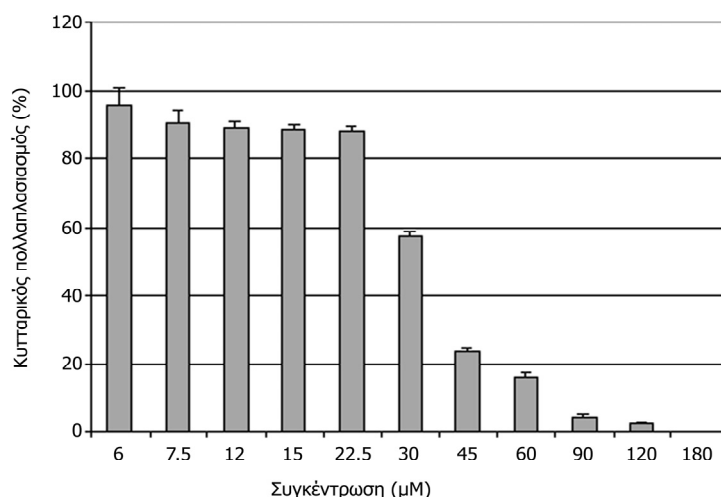


Γράφημα 9. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 10. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

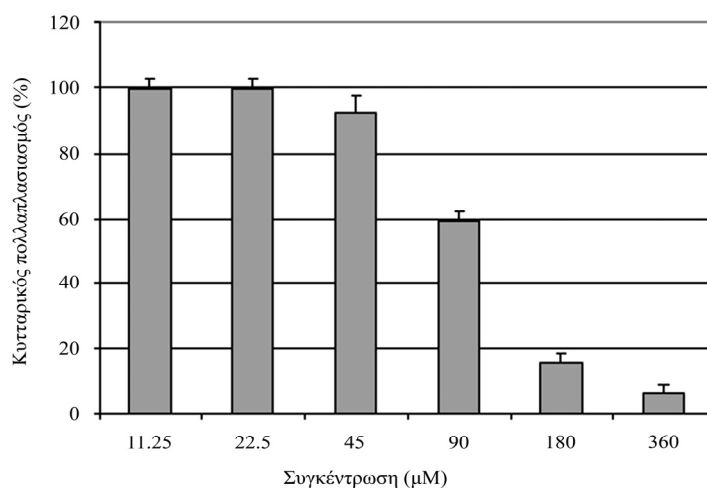
Η γενιστεΐνη εμφάνισε έντονα δοσοεξαρτώμενη δράση τόσο στα LMS κύτταρα όσο και στα MCF7 (Γραφήματα 9 και 10). Στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν η δράση της ξεκινούσε από τα 6 μ M και σταδιακά αυξανόταν, μειώνοντας το κυτταρικό πολλαπλασιασμό ως τα 480 μ M στα LMS κύτταρα και τα 800 μ M για τα MCF7 κύτταρα. Η τιμή IC₅₀ με τη μέθοδο MTT ήταν για τα LMS κύτταρα 81.6 \pm 11.6 μ M ενώ για τα MCF7 κύτταρα 131.2 \pm 14.9 μ M και ήταν ανάλογες των IC₅₀ τιμών της απιγενίνης.



Γράφημα 11. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

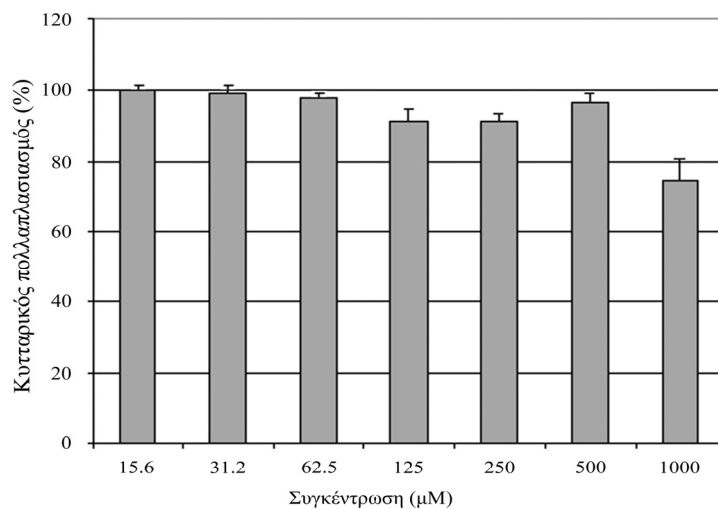
Το γαλλικό οξύ εμφάνισε ήπια δράση από τα 6 μ M έως τα 22.5 μ M στα LMS κύτταρα και από τα 11.25 μ M έως τα 45 μ M στα MCF7 κύτταρα (Γραφήματα 11 και 12). Άρχισε να εμφανίζει έντονη δραστηριότητα από τα 22.5 μ M στα LMS κύτταρα και από τα 45 μ M στα MCF7 με τις IC₅₀ τιμές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού να είναι 30.2 \pm 0.6 μ M και 98.2 \pm 4.1 μ M αντίστοιχα. Σε αντίθεση με την απιγενίνη και την γενιστεΐνη όπου η IC₅₀

στα MCF7 κύτταρα σε σχέση με τα LMS κύτταρα ήταν 1.2 και 1.6 φορές υψηλότερη, για το γαλλικό οξύ η τιμή αυτή ήταν 3.2 φορές υψηλότερη.

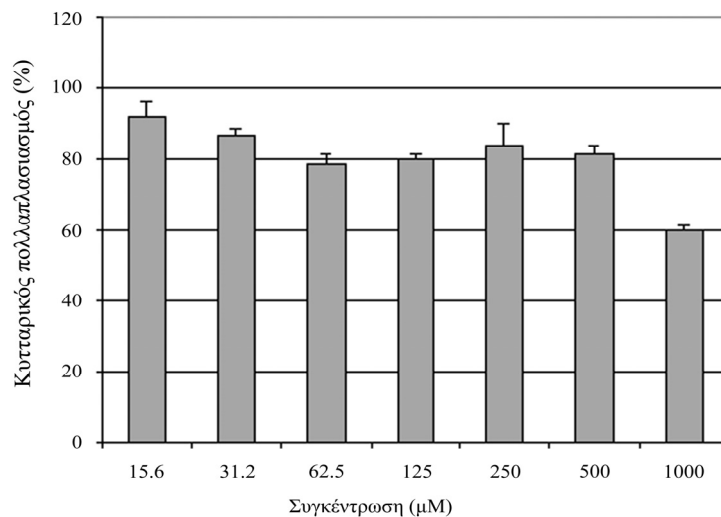


Γράφημα 12. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

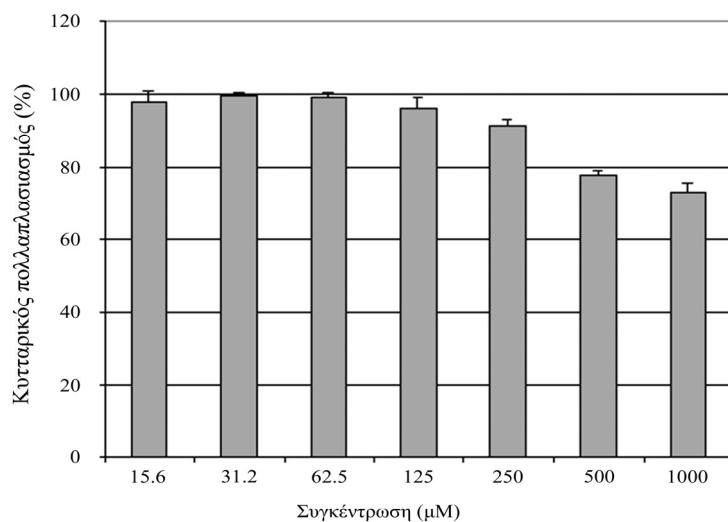
Τόσο η επικατεχίνη όσο και η κατεχίνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές δεν έδειξαν καμία σημαντική δράση από την αρχική συγκέντρωση των 15.6μΜ έως την τελική των 1000μΜ (Γραφήματα 13, 14, 15 και 16). Σε σχέση με τα άλλα φλαβονοειδή οι τιμές IC_{50} κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στα LMS κύτταρα και στα MCF7 κύτταρα και τις δύο ενώσεις ήταν αρκετά υψηλότερες από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή και υπολογίστηκαν στα LMS κύτταρα στα $1486 \pm 158 \mu M$ και $1396 \pm 134 \mu M$ και στα MCF7 στα 1709 ± 120 και 2280 ± 301 για την επικατεχίνη και την κατεχίνη αντίστοιχα.



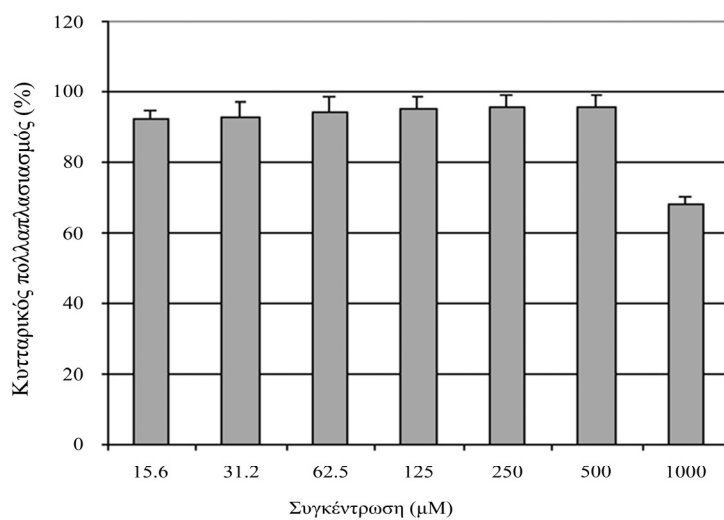
Γράφημα 13. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειμυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επικατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



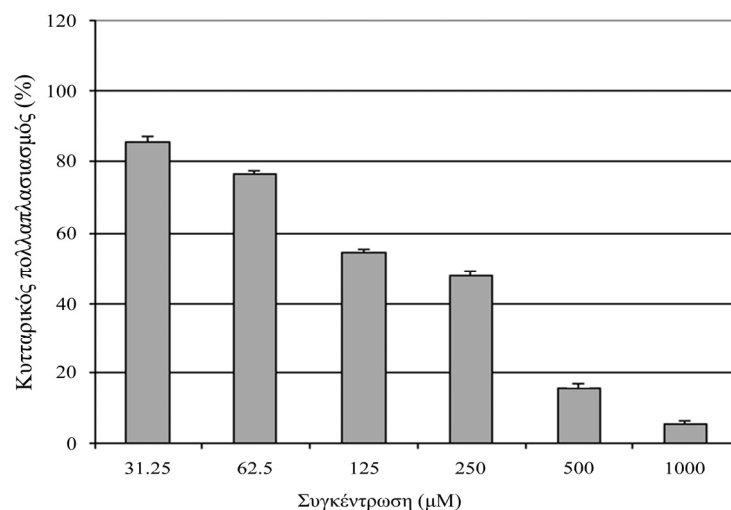
Γράφημα 14. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επικατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



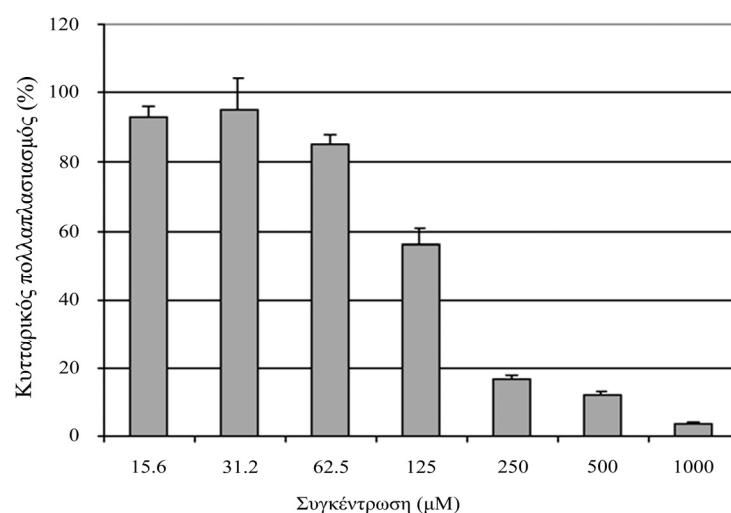
Γράφημα 15. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 16. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατεχίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



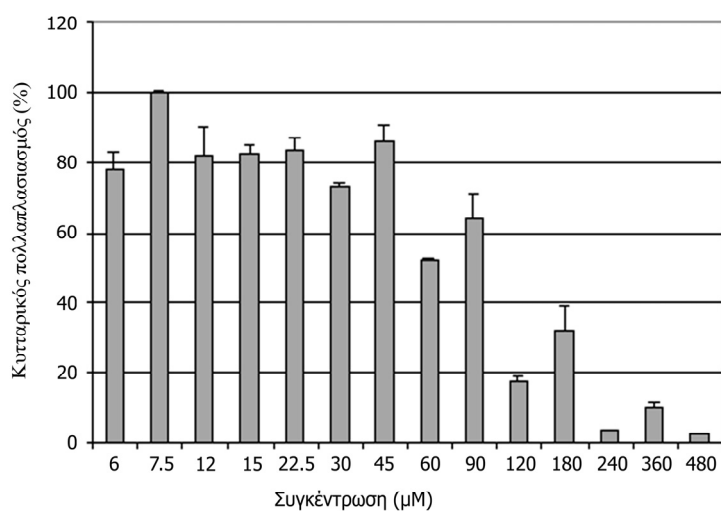
Γράφημα 17. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις EGCG. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



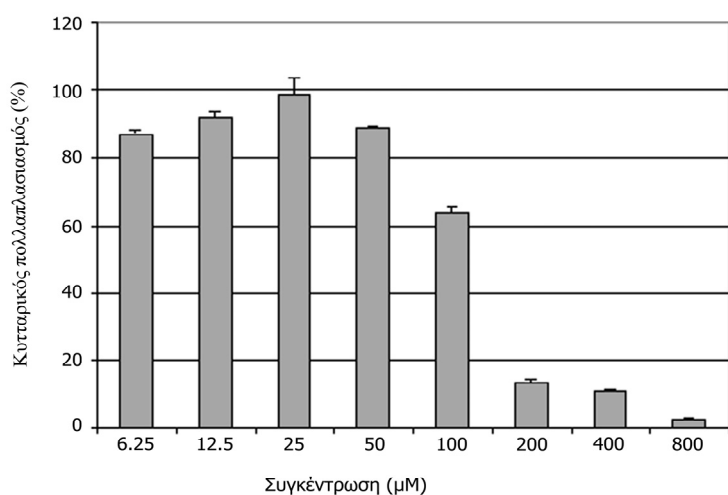
Γράφημα 18. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις EGCG. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Η EGCG σε αντίθεση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις των οποίων η δράση ήταν πιο έντονη στα LMS κύτταρα, εμφάνισε ισχυρότερη δράση στα MCF7 κύτταρα (Γραφήματα 17 και 18). Η τιμή IC_{50} κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα LMS κύτταρα είναι $185.3 \pm 5.6 \mu\text{M}$ και στα MCF7 κύτταρα $155.3 \pm 15.7 \mu\text{M}$, δηλαδή 0.84 μικρότερη από ότι στα

LMS κύτταρα. Η δράση της ήταν ήπια και ξεκινούσε από χαμηλά (από τα 15.6μM στα LMS κύτταρα και από τα 31.2μM στα MCF7 κύτταρα) φτάνοντας ως και τα 1000μM, όπου ένα μικρός αριθμός κυττάρων συνέχιζε να επιβιώνει (περίπου 5-10% και στις δύο κυτταρικές σειρές).

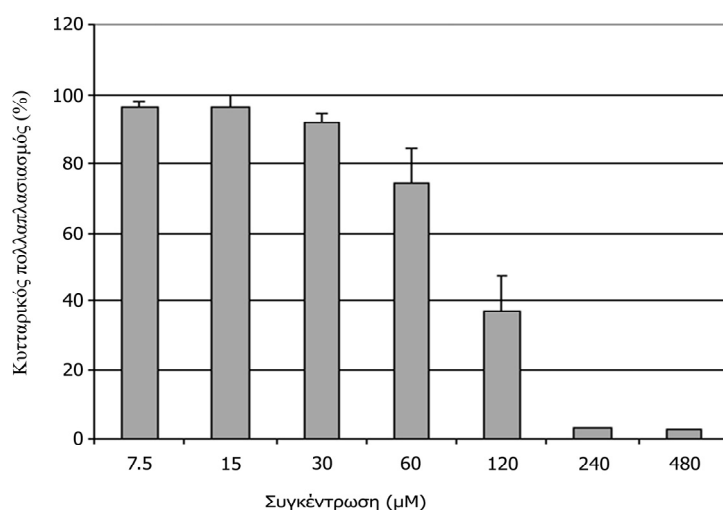


Γράφημα 19. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης και γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

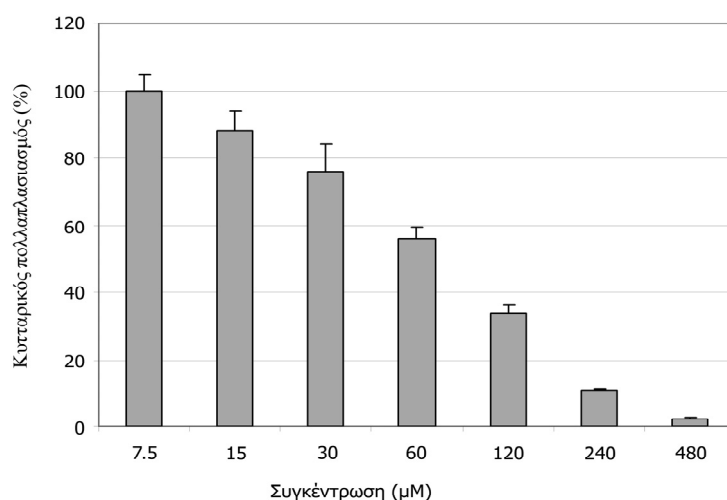


Γράφημα 20. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7-cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης και γενιστεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Στα Γραφήματα 19 και 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού LMS και MCF7 κυττάρων σε ανάλογες δόσεις μίγματος απιγενίνης-γενιστεΐνης. Γνωρίζουμε ότι η IC_{50} τιμή της απιγενίνης και της γενιστεΐνης είναι για τα LMS $95.3 \pm 5.0 \mu M$ και $81.6 \pm 11.6 \mu M$ αντίστοιχα, ενώ για τα MCF7 κύτταρα $117.8 \pm 6.7 \mu M$ και $131.2 \pm 14.9 \mu M$. Η 48ώρη επώαση με ισόποσες συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων οδήγησε στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σε τιμές IC_{50} οι οποίες ήταν $83.3 \pm 11.5 \mu M$ για τα LMS κύτταρα και $123.8 \pm 5.0 \mu M$ για τα MCF7 κύτταρα. Διαπιστώνουμε ότι παρόλο που εκθέσαμε τα κύτταρα σε υψηλές αντίστοιχες συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων (π.χ. $100 \mu M$ απιγενίνης και $100 \mu M$ γενιστεΐνης) η τιμή IC_{50} δε παρουσίασε ουσιαστική μεταβολή και για τις δύο κυτταρικές σειρές.



Γράφημα 21. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκωματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης. Σε κάθε συγκέντρωση απιγενίνης έχει προστεθεί συγκέντρωση γενιστεΐνης που αντιστοιχεί στην IC_{50} της ουσίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 22. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός λειομυοσαρκοματικών κυττάρων (LMS cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης. Σε κάθε συγκέντρωση γενιστεΐνης έχει προστεθεί συγκέντρωση απιγενίνης που αντιστοιχεί στην IC_{50} της ουσίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Επιβεβαίωση της διαπίστωσης αυτής είναι και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Γραφήματα 21 και 22. Στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις ουσίας είχε προστεθεί και η IC_{50} συγκέντρωση της ένωσης, είτε πρόκυτε για απιγενίνη είτε για γενιστεΐνη. Ο υπολογισμός της IC_{50} έδωσε τιμές $83.1 \pm 18.2 \mu\text{M}$ σε LMS κύτταρα που επωάζονται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης προστεθεί η IC_{50} της γενιστεΐνης και $79.3 \pm 7.0 \mu\text{M}$ σε LMS κύτταρα που επωάζονται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης προστεθεί η IC_{50} της απιγενίνης. Γνωρίζοντας ότι η IC_{50} της απιγενίνης και της γενιστεΐνης ήταν $95.3 \pm 5.0 \mu\text{M}$ και $81.6 \pm 11.6 \mu\text{M}$ αντίστοιχα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υφίσταται συνέργεια μεταξύ των δύο αυτών ενώσεων για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στο Πίνακα 7 παρουσιάζονται όλες οι τιμές IC_{50} των φλαβονοειδών που δοκιμάστηκαν στις δύο κυτταρικές σειρές. Ισχυρότερη δράση εμφανίζει το γαλλικό οξύ τόσο στα LMS κύτταρα όσο και στα MCF7. Από τις φλαβανόλες η επικατεχίνη και η

κατεχίνη δεν δείχνουν σημαντική δράση με τις υψηλότερες τιμές IC₅₀ τόσο στα LMS όσο και στα MCF7 κύτταρα σε αντίθεση με την EGCG η οποία εμφανίζει σημαντική δράση με την IC₅₀ όμως στα LMS κύτταρα να είναι τουλάχιστον διπλάσια από ότι της απιγενίνης (1.94 φορές) και της γενιστεΐνης (2.27 φορές) και βπλάσια από ότι του γαλλικού οξέος. Ωστόσο η EGCG εμφανίζει μικρότερη IC₅₀ στα MCF7 κύτταρα με αποτέλεσμα να είναι μόλις 1.3 φορές υψηλότερη από την απιγενίνη, 1.18 φορές από τη γενιστεΐνη και 1.6 φορές από το γαλλικό οξύ.

Πίνακας 7. Τιμές IC₅₀ των επιλεγμένων ενώσεων με τη μέθοδο MTT

	IC ₅₀	
	LMS cells	MCF-7 cells
Apigenin	95.3±5.0μM	117.8±6.7μM
Genistein	81.6±11.6μM	131.2±14.9μM
Gallic acid	30.2±0.6μM	98.2±4.1μM
(-) Epicatechin	1486±158μM	1709±120μM
(+) Catechin	1396±134μM	2280±301μM
EGCG	185.3±5.6μM	155.3±15.7μM

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ της απιγενίνης, γενιστεΐνης και των μιγμάτων των δύο ενώσεων. Είναι εμφανές ότι δε μεταβάλλεται σημαντικά η τιμή IC₅₀ και για τις δύο ουσίες όταν επωάζονται ταυτόχρονα με LMS και MCF7 κύτταρα.

Όταν επώαστηκαν φυσιολογικοί ινοβλάστες ανθρώπου (MRC5) με τις IC₅₀ συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών που υπολογίστηκαν για τα LMS και για τα MCF7 κύτταρα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (Πίνακας 9). Τα κύτταρα

συνεχίζουν να πολλαπλασιαζονται φυσιολογικά χωρίς να επέρχεται καμία σημαντική μεταβολή.

Πίνακας 8. Τιμές IC₅₀ των επιλεγμένων ενώσεων με τη μέθοδο MTT

	IC ₅₀	
	LMS cells	MCF-7 cells
Apigenin	95.3±5.0μM	117.8±6.7μM
Genistein	81.6±11.6μM	131.2±14.9μM
Apigenin and Genistein	83.3±11.5μM	123.8±5.0μM
Apigenin + IC ₅₀ Genistein	83.1±18.2μM	123.5±7.9μM
Genistein + IC ₅₀ Apigenin	79.3±7.0μM	117.8±9.2μM

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Πίνακας 9. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός εμβρυϊκών φυσιολογικών ινοβλαστών (MRC-5 cells) μετά από 48ώρη επώαση σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις IC₅₀ των φλαβονοειδών για τα LMS και MCF7 κύτταρα

	IC ₅₀	
	LMS cells	MCF7 cells
Apigenin	106.4±3.75	96.9±2.55
Genistein	102.7±1.80	96.6±1.45
Gallic acid	119.5±5.1	72.2±3.1
(-) Epicatechin	250.2±15.8 (1000μM)	
(+) Catechin	171.8±12.1 (1000μM)	
EGCG	88.9±4.2	95.5±3.8

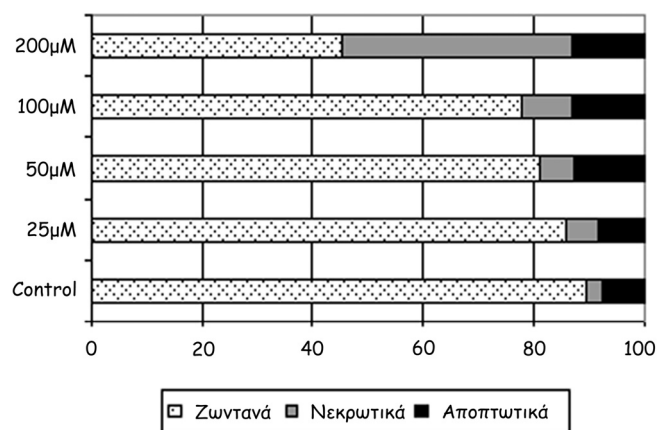
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

4.1.3 Κυτταρομετρία ροής

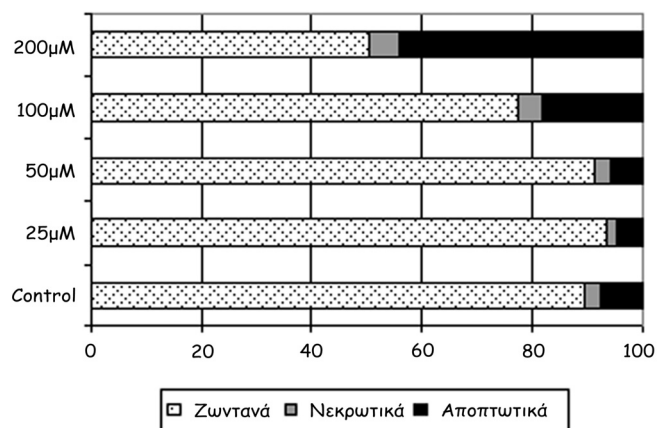
Στα γραφήματα της κυτταρομετρίας ροής είναι εμφανές ότι η δράση της γενιστεΐνης, του γαλλικού οξέος και της EGCG αυξάνει την αποπτωτική λειτουργία των LMS κυττάρων. Από την άλλη πλευρά η απιγενίνη είναι η μονή ένωση που εμφανίζει νεκρωτική δράση. Τέλος, τόσο η επικατεχίνη όσο και η κατεχίνη εμφανίζουν αποπτωτική δράση, στα κύτταρα αλλά σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Αναλυτικά:

Σύμφωνα με τις μετρήσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη χρώση MTT η IC_{50} της EGCG στα LMS κύτταρα ήταν περίπου 185 μ M. Στο Γράφημα 28 η αποπτωτική δράση της EGCG ξεκινάει από τα 62.5 μ M (+3% σε σχέση με το control), ενώ μεταξύ των 125 μ M και 250 μ M όπου βρίσκεται και η IC_{50} της ουσίας η απόπτωση αυξάνει κατά 56% (από 22% στα 125 μ M σε 78% στα 250 μ M). Ακόμα μια χαρακτηριστική εικόνα αποπτωτικής δράσης παρουσίασε το γαλλικό οξύ (Γράφημα 25). Το ποσοστό νέκρωσης παρέμεινε σταθερό και στις μετρήσεις των 25 μ M, 50 μ M και 100 μ M. Ωστόσο το ποσοστό της απόπτωσης αυξάνει διαδοχικά από 39%, σε 48% και τέλος σε 58% αντίστοιχα. Η IC_{50} του γαλλικού οξέος για τα LMS κύτταρα ήταν περίπου 30 μ M. Αντιθέτως με την εικόνα που παρουσίασαν οι δύο αυτές ενώσεις η γενιστεΐνη εμφάνισε μικρή αύξηση της απόπτωσης σε σχέση με το control (από 8% σε 18%) στα 100 μ M όπου ήταν περίπου η IC_{50} της ουσίας (για την ακρίβεια 82 μ M) ενώ στα 200 μ M το ποσοστό της απόπτωσης έφτασε το 44% (Γράφημα 24). Η απιγενίνη αν και εμφάνισε IC_{50} ανάλογη της γενιστεΐνης (95 μ M) στα 100 μ M έδειξε μια αύξηση 3% και 5% των νεκρωτικών και αποπτωτικών κυττάρων αντίστοιχα αλλά στα 200 μ M το ποσοστό νέκρωσης των κυττάρων έφτασε στο 42% ενώ το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων παραμένει αμετάβλητο στο 13% (Γράφημα 23). Τέλος τόσο η επικατεχίνη όσο και η κατεχίνη εμφάνισαν αποπτωτική δράση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2000 μ M, αποτέλεσμα το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς

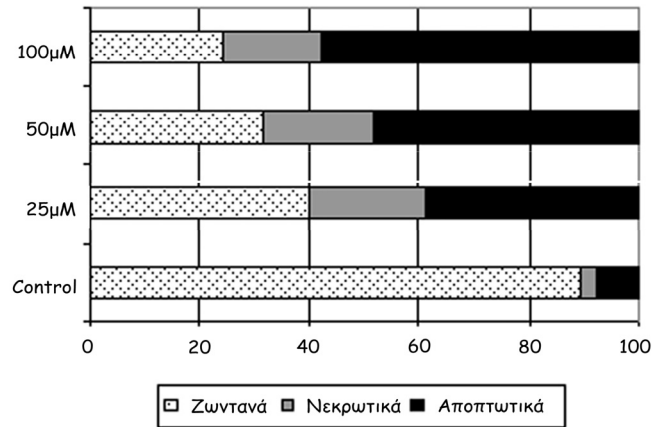
στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης είχε υπολογιστεί και η IC_{50} των δύο ενώσεων (Γράφημα 26 και 27).



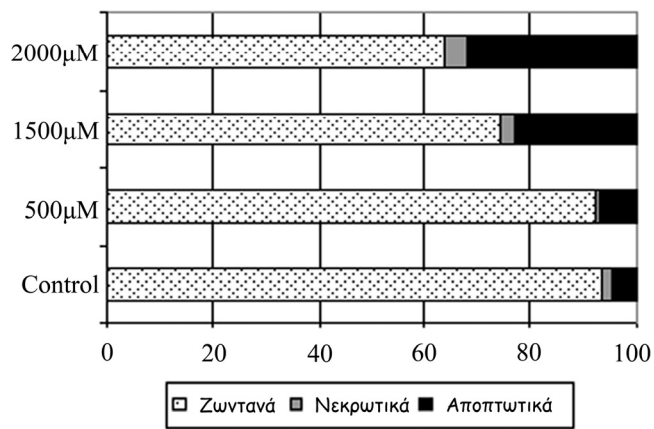
Γράφημα 23. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις απιγενίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



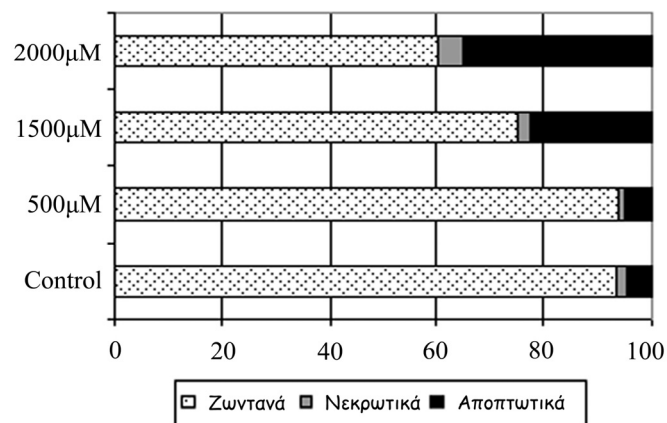
Γράφημα 24. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



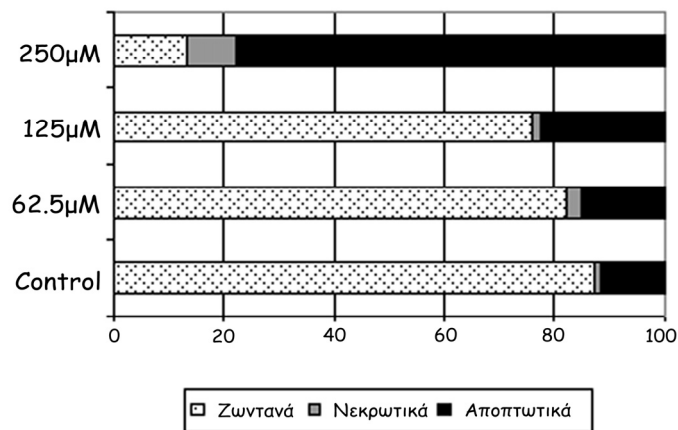
Γράφημα 25. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



Γράφημα 26. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις επικατεχίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



Γράφημα 27. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κατεχίνης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.



Γράφημα 28. Κυτταρομέτρια ροής με χρώση των LMS κυττάρων με Annexin V-FITC και PI για την ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων μετά την 48ώρη επώαση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις EGCG. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.

4.1.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών καθώς και του L-ασκορβικού οξέος. Την ισχυρότερη δράση είχε η EGCG η οποία είναι αντίστοιχη της α-τοκοφερόλης. Ακολουθεί το γαλλικό οξύ, η επικατεχίνη με τη κατεχίνη με παρόμοια δράση. Τόσο η απιγενίνη όσο και η γενιστεΐνη παρουσίασαν αντίστοιχα πολύ χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Τέλος το ασκορβικό οξύ είχε ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και από την απιγενίνη και την γενιστεΐνη (2.1 και 1.7 φορές αντίστοιχα) αλλά πολύ μικρότερη από ότι η EGCG (3.7 φορές) και από την επικατεχίνη (1.9 φορές) και την κατεχίνη (1.8 φορές).

Πίνακας 10. Αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων σε σύγκριση με το L-ασκορβικό οξύ

	10⁻¹M
L-ascorbic acid	27±8.4
EGCG	101±3.7
Gallic acid	79±11.4
(-) Epicatechin	52±1.9
(+) Catechin	50±1.8
Genistein	16±2.1
Apigenin	13±1.4

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mmol/L α-tocopherol. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

4.2 *In vivo* πειράματα

4.2.1 Φάση I. Πρόκληση οξειδωτικού στρες με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε διάφορες δόσεις

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου τα επίπεδα στα ούρα της μαλονικής διαλδεϋδης (MDA) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος στα πειραματόζωα της Ομάδας ελέγχου (CG) παρέμειναν σταθερά. Η TAC του πλάσματος ήταν σημαντικά μειωμένη την Ημέρα 11 μετά την ολοκλήρωση της χορήγησης του όζοντος και στις δύο ομάδες και παρέμεινε σε χαμηλό επίπεδο μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου (Ημέρα 22). Τα επίπεδα της MDA ήταν αυξημένα κατά τη λήξη της πειραματικής περιόδου (Ημέρα 22) και στις δύο ομάδες του όζοντος (147% στη GO1 και 164% στη GO2) και ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά από την Ημέρα 0 και από την Ομάδα CG ($p < 0.05$) και στις δύο ομάδες.

Πίνακας 11. Συγκέντρωση MDA ούρων και TAC πλάσματος μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δύο δόσεων όζοντος διαφορετικής συγκέντρωσης.

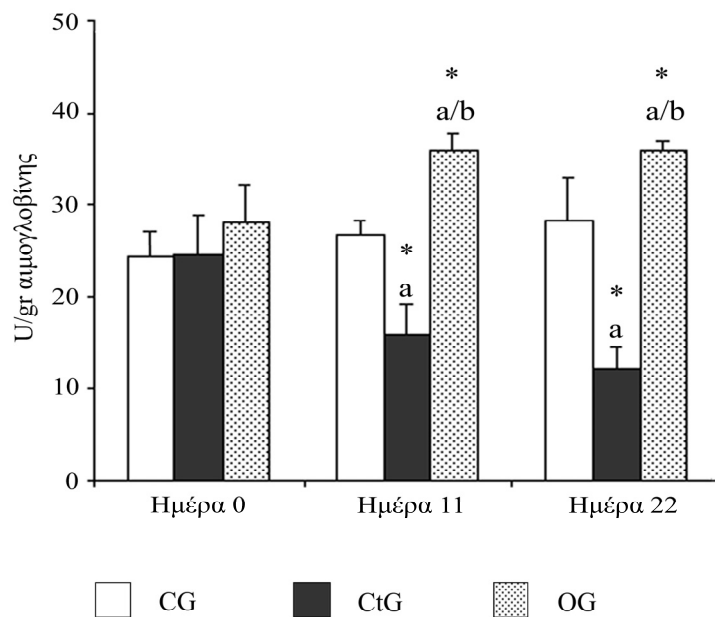
MDA (μM)	Day 0	Day 11	Day 22
CG	44.4 \pm 11.6	42.1 \pm 9.2	40.5 \pm 12.3
GO1	41.2 \pm 9.7	49.1 \pm 9.4	60.4 \pm 14.1 ^{*,a}
GO2	39.7 \pm 8.8	53.1 \pm 9.7	63.5 \pm 10.8 ^{*,a}
TAC (mM a-toc)	Day 0	Day 11	Day 22
CG	29.7 \pm 3.8	33.5 \pm 3.1	33.7 \pm 2.5
GO1	30.1 \pm 4.0	20.3 \pm 2.2 ^{*,a}	19.6 \pm 2.6 ^{*,a}
GO2	32.4 \pm 3.2	19.6 \pm 3.0 ^{*,a}	18.5 \pm 3.1 ^{*,a}

*Στατιστικά διαφορετική από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣτατιστικά διαφορετική από την Ομάδα ελέγχου (CG), $p < 0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Ακόμη και αν τα πειραματόζωα στην GO2 έλαβαν δύο φορές υψηλότερες δόση όζοντος από ό, τι στην GO1 δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της MDA ή της TAC του πλάσματος μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων (Πίνακας 11).

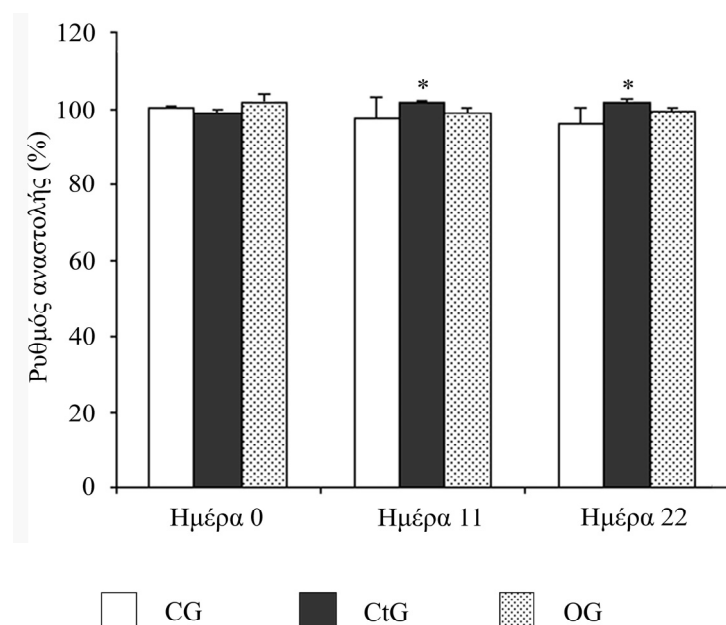
4.2.2 Φάση II. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή μίγματος κατεχινών σε νεαρούς επίμυες Wistar

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 29 η δραστηριότητα της GPx σημειώνει σημαντική πτώση στην Ομάδα Κατεχινών (CtG) η οποία έφτασε το 35% την Ημέρα 11 του πειράματος ($p < 0.05$) ενώ την τελευταία ημέρα του πειράματος (Ημέρα 22) η πτώση ανήλθε στο 51% ($p < 0.05$) σε σχέση με την Ημέρα 0. Σε αντίθεση με τις άλλες δύο ομάδες, η χορήγηση όζοντος οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων GPx στην Ομάδα Όζοντος (PS-OG) η οποία ανήλθε σε 29% την Ημέρα 11 ($p < 0.05$) και σε 28% την Ημέρα 22 ($p < 0.05$).



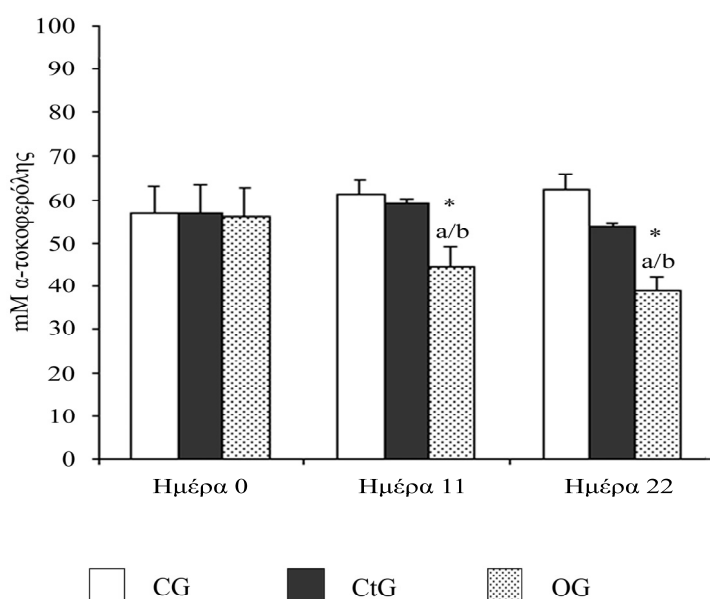
Γράφημα 29. Η δραστηριότητα της GPx στις τρεις Ομάδες. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη GPx εκφράζεται ως U/gr αιμοσφαιρίνης. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα ελέγχου την ίδια ημέρα, $p < 0.05$, ^bΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα κατεχινών την ίδια ημέρα, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Η SOD στην Ομάδα Όζοντος (Γράφημα 30) παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές από την Ημέρα 0. Ωστόσο, η SOD στην Ομάδα Κατεχινών σημείωσε την Ημέρα 11 μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση 3% ($p<0.05$) και η οποία διατηρήθηκε ως την τελική ημέρα του πειράματος (3%, $p<0.05$). Όπως ήταν αναμενόμενο η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx και SOD παρέμεινε σταθερή στην Ομάδα Ελέγχου (CG) κατά τη διάρκεια του πειράματος.

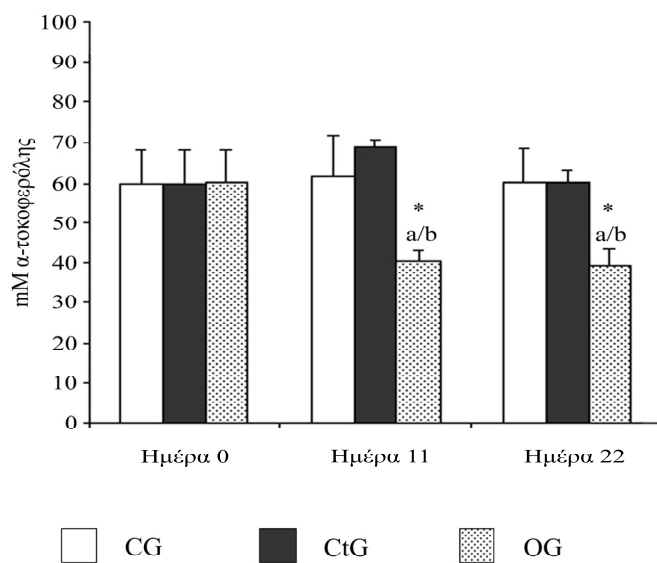


Γράφημα 30. Η δραστηριότητα της SOD και στις τρεις Ομάδες. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη SOD ως % ρυθμού αναστολής. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p<0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα ελέγχου την ίδια ημέρα, $p<0.05$, ^bΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα κατεχινών την ίδια ημέρα, $p<0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

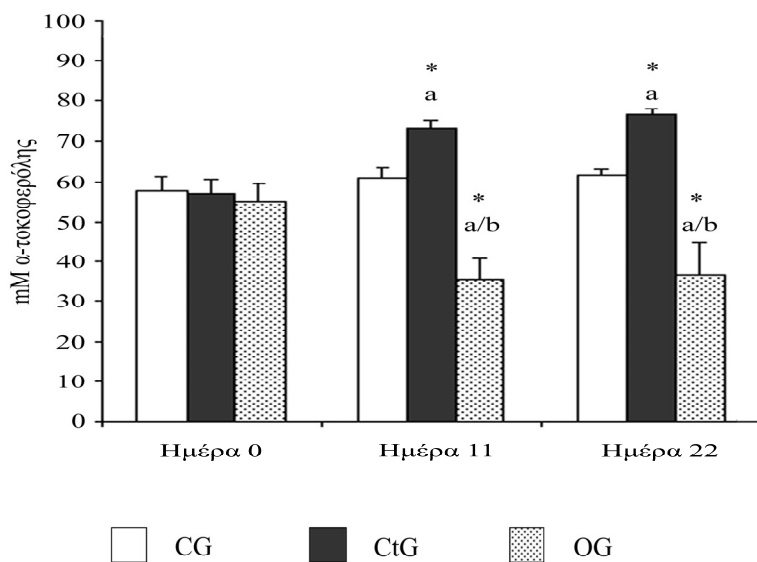
Η TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώθηκε σημαντικά μετά την χορήγηση όζοντος στην Ομάδα όζοντος σε αντίθεση με την Ομάδα κατεχινών όπου παρατηρήθηκε αρχικά την Ημέρα 11 μια αύξηση (15%) αλλά όχι στατιστικά σημαντική, ενώ τα επίπεδα επέστρεψαν στα φυσιολογικά την τελευταία ημέρα (Γράφημα 31). Αμέσως μετά τη περίοδο χορήγησης όζοντος η TAC μειώθηκε κατά 33%, μια μείωση που διατηρήθηκε έως και την Ημέρα 22 (35%) και ήταν στατιστικά σημαντική και στις δύο περιπτώσεις ($p < 0.05$). Στο πλάσμα η TAC στην Ομάδα κατεχινών δε παρουσίασε σημαντικές μεταβολές ενώ στην Ομάδα όζοντος εμφάνισε την ίδια εικόνα όπως και στα ερυθρά αιμοσφαίρια: σημαντική πτώση την Ημέρα 11, που έφτασε το 21% ($p < 0.05$) και διατήρηση των χαμηλών αυτών επιπέδων έως την τελευταία ημέρα του πειράματος (Ημέρα 22, πτώση 31%, $p < 0.05$) (Γράφημα 32).



Γράφημα 31. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα των RBC. Η Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο Blue CrO5 assay όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$.^aΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα ελέγχου την ίδια ημέρα, $p < 0.05$,^bΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα κατεχινών την ίδια ημέρα, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

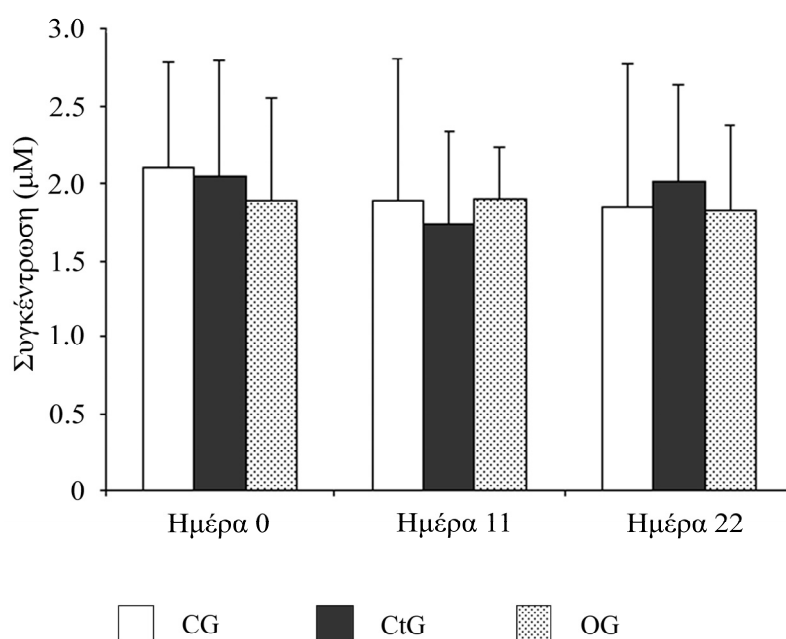


Γράφημα 32. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα του πλάσματος. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OZ: Ομάδα όζοντος. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα ελέγχου την ίδια ημέρα, $p < 0.05$, ^bΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα κατεχινών την ίδια ημέρα, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 33. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στα ούρα των επίμυων. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα ελέγχου την ίδια ημέρα, $p < 0.05$, ^bΣημαντικά διαφορετικό από την Ομάδα κατεχινών την ίδια ημέρα, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Τέλος στα ούρα η TAC της Ομάδας κατεχινών σημείωσε κατακόρυφη αύξηση την Ημέρα 11 η οποία διατηρήθηκε ως και την Ημέρα 22, και η οποία ήταν 28% ($p<0.05$) και 35% ($p<0.05$) μεγαλύτερη από την Ημέρα 0 (Γράφημα 33). Στην Ομάδα όζοντος παρατηρήθηκε πτώση η οποία ανέρχεται σε 35% ($p<0.05$) και 34% ($p<0.05$) την Ημέρα 11 και Ημέρα 22, αντίστοιχα. Τόσο στα ερυθρά αιμοσφαίρια, όσο και στο πλάσμα και τα ούρα η TAC στην Ομάδα Ελέγχου παρέμεινε σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.



Γράφημα 34. Συγκέντρωση MDA στα ούρα. Τα επίπεδα της MDA μετρήθηκαν με τη χρήση φωτομετρικής μεθόδου του προϊόντος που παράγεται με τη χρήση αντιδραστηρίου TBA. CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p<0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p<0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Μόνο στην Ομάδα κατεχινών παρατηρήθηκε την Ημέρα 11 πτώση των επιπέδων MDA κατά 15% η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Γράφημα 34). Τα επίπεδα επανήλθαν στα αρχικά την Ημέρα 22. Τόσο στην Ομάδα ελέγχου όσο και στην Ομάδα όζοντος τα επίπεδα της MDA στα ούρα παρέμειναν σταθερά από την αρχή έως το τέλος του πειράματος χωρίς να παρατηρηθεί κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή.

Πίνακας 11. Μεταβολή βάρους επίμυων κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου

Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22
CG	199±12	193±15	196±10
CtG	195±12	198±9	199±11
OG	179±7	182±6	187±7

CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Ο Πίνακας 11 παρουσιάζει τη μεταβολή βάρους των πειραματόζωων και των τριών ομάδων κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Τα βάρους τους παρέμεινε σταθερό χωρίς καμία σημαντική στατιστική μεταβολή τόσο μετά τη χορήγηση όζοντος ή κατεχινών αλλά και στο τέλος του πειράματος.

Στον Πίνακα 12 αποτυπώνονται οι αλλαγές στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τον αιματοκρίτη στην αρχή, τη μέση και στο τέλος της πειραματικής περιόδου. Δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές ούτε μέσα στις ίδιες τις ομάδες ούτε μεταξύ των ομάδων. Όπως και στις αιματολογικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα

ενήλικα ζώα της Φάσης III θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι αυτοί οι δείκτες μπορούν να επηρεαστούν από τη συλλογή του αίματος και κατά συνέπεια τη μείωση του συνολικού όγκου του αίματος.

Πίνακας 12. Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων και τιμές αιματοκρίτη και για τις δύο ομάδες

	Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22
Ερυθρά αιμοσφαίρια (Κ/μL)	CG	6.5±0.5	7.0±0.8	6.0±0.5
	CtG	6.4±0.1	6.5±1.2	6.5±0.9
	OG	6.4±0.1	6.4±0.3	6.2±0.5
Αιματοκρίτης (%)	CG	37.5±1.51	39.6±2.37	35.5±1.31
	CtG	30.4±3.46	34.5±2.56	33.3±1.58
	OG	34.3±2.05	31.0±0.82	32.4±1.13

CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Οι διατροφικές συνήθειες των επίμυων και στις 3 ομάδες δεν μεταβλήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τόσο η κατανάλωση τροφής όσο και η πρόσληψη νερού κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (Ημέρες 0-11) αλλά και το διάστημα που ακολούθησε (Follow up, Ημέρες 12-21) ήταν ίδιες και στις 3 ομάδες χωρίς να σημειωθεί κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή. Συνεπώς, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 13 και η αποβολή ούρων αλλά και το βάρος των κοπράνων δεν επηρεάστηκαν ούτε από τη χορήγηση όζοντος ή κατεχινών.

Στο Πίνακα 14 αποτυπώνονται οι μετρήσεις περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Η θερμοκρασία του μεταβολικού κλωβού ήταν υψηλότερη κατά 1-1.5°C από την θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ ο πιο ευμετάβλητος παράγοντας ήταν το

ποσοστό υγρασίας. Η καταγραφή του ποσοστού υγρασίας πραγματοποιήθηκε από το τη σελίδα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σύμφωνα με Μετεωρολογικό Εργαστήριο του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Πίνακας 13. Διαιτητικοί και μεταβολικοί δείκτες των δύο ομάδων μετά από κάθε παρεμβατική περίοδο

	Ομάδα	Ημέρα 0-10	Ημέρα 12-21
Κατανάλωση τροφής (gr)	CG	11.57±1.29	11.51±0.90
	CtG	12.61±1.22	13.59±0.75
	OG	11.07±1.36	12.38±0.53
Πρόσληψη νερού (ml)	CG	18.38±2.13	22.38±5.04
	CtG	18.25±1.75	19.88±1.64
	OG	20.00±2.20	21.25±2.82
Αποβολή ουρών (ml)	CG	4.48±1.04	9.44±3.92
	CtG	5.81±1.17	5.63±0.70
	OG	6.97±2.24	6.73±2.16
Ισοζύγιο νερού (ml)	CG	14.08±1.87	13.76±1.94
	CtG	13.43±1.36	14.36±1.41
	OG	14.05±1.60	14.52±1.01
Βάρος κοπράνων (gr)	CG	1.97±0.27	2.27±0.47
	CtG	2.86±0.26	3.00±0.23
	OG	2.76±0.30	2.97±0.29

CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p<0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p<0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Πίνακας 14. Μετρήσεις περιβάλλοντος

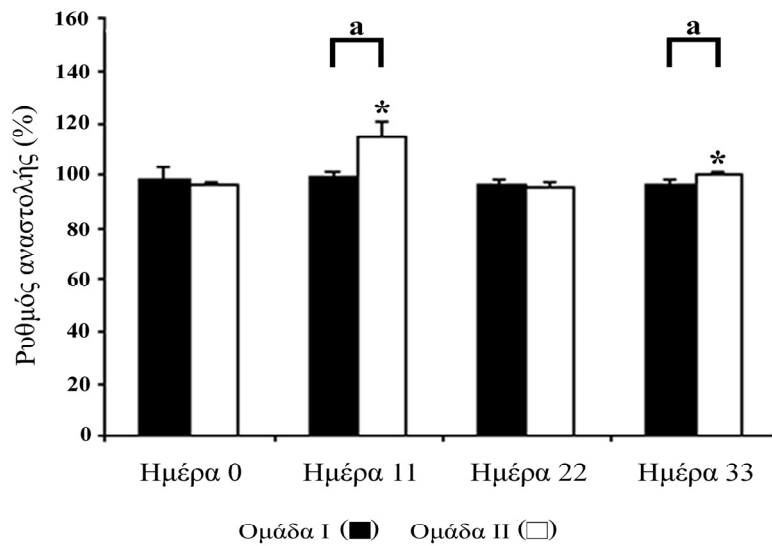
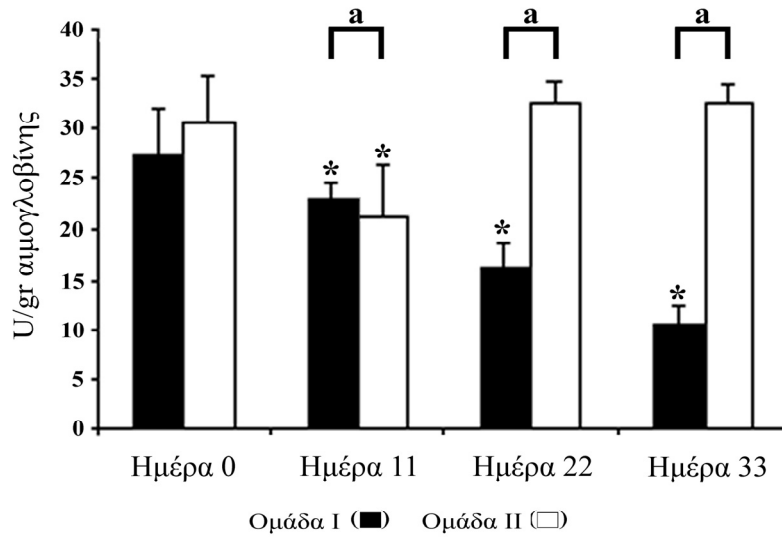
	Ομάδα	Ημέρα 0-10	Ημέρα 12-21
Θερμοκρασία μεταβολικού κλωβού (°C)	CG	27.2±0.80	26.2±0.75
	CtG	23.6±1.40	24.2±0.63
	OG	25.6±1.59	27.6±0.83
Θερμοκρασία περιβάλλοντος (°C)	CG	26.3±0.81	25.3±1.39
	CtG	22.4±1.21	23.0±0.65
	OG	23.9±1.93	26.3±0.84
Υγρασία (%)	CG	69.0±11.88	78.0±9.04
	CtG	81.2±12.61	76.7±10.51
	OG	79.0±14.47	81.8±10.84
Εξάτμιση νερού (ml)	CG	1.3±0.39	1.1±0.16
	CtG	1.0±0.17	1.0±0.10
	OG	1.0±0.04	1.0±0.11

CG: Ομάδα ελέγχου, CtG: Ομάδα κατεχινών, OG: Ομάδα όζοντος.*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p<0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p<0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

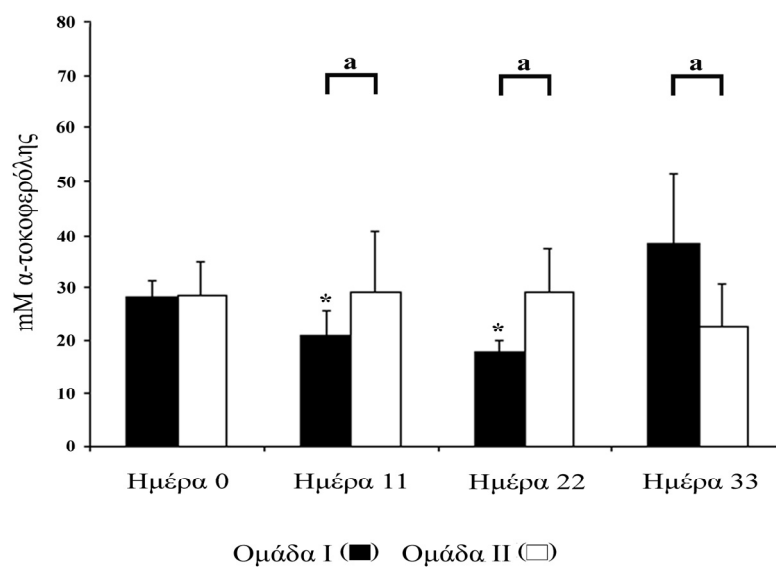
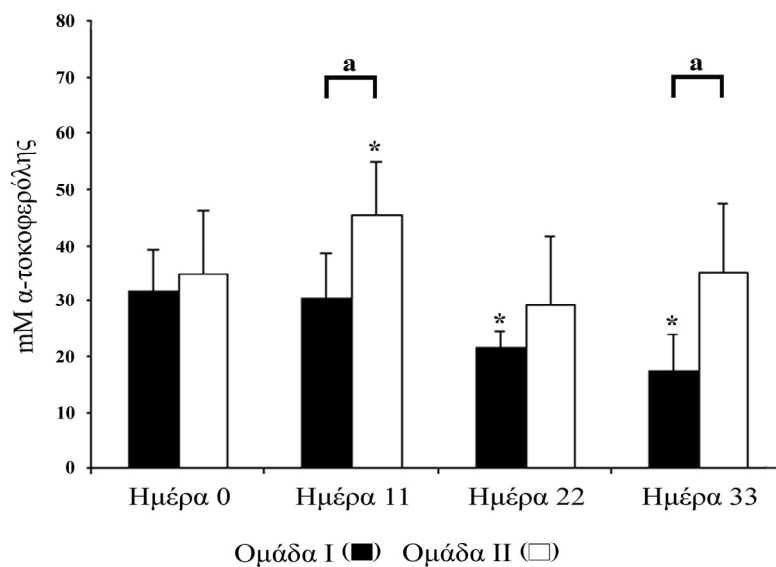
4.2.3 Φάση III. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μίγματος κατεχινών για την πρόληψη ή θεραπεία του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar

Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPX καθορίστηκε στα ερυθρά αιμοσφαίρια ενηλίκων θηλυκών επίμυων. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 35, η χορήγηση του όζοντος ακολουθείται από μια μείωση της δραστηριότητας της GPx της Ομάδας I (16% μείωση), η οποία συνεχίζεται μέχρι το τέλος του πειράματος (ημέρα 33, μείωση 63%), με αυξανόμενο ρυθμό. Η χορήγηση κατεχινών μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα της GPx, αλλά αποκαταστάθηκε πλήρως στα αρχικά επίπεδα και δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση του όζοντος (Ομάδα II). Η χορήγηση του όζοντος δεν είχε καμία επίδραση στην SOD επίπεδα (Ομάδα I), σε αντίθεση με την Ομάδα II, όπου η αρχική χορήγηση κατεχινών αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της SOD (20% αύξηση), η οποία παρέμεινε σε υψηλότερο επίπεδο από αυτό της Ημέρας 0 έως το τέλος του πειραματικού πρωτοκόλλου.

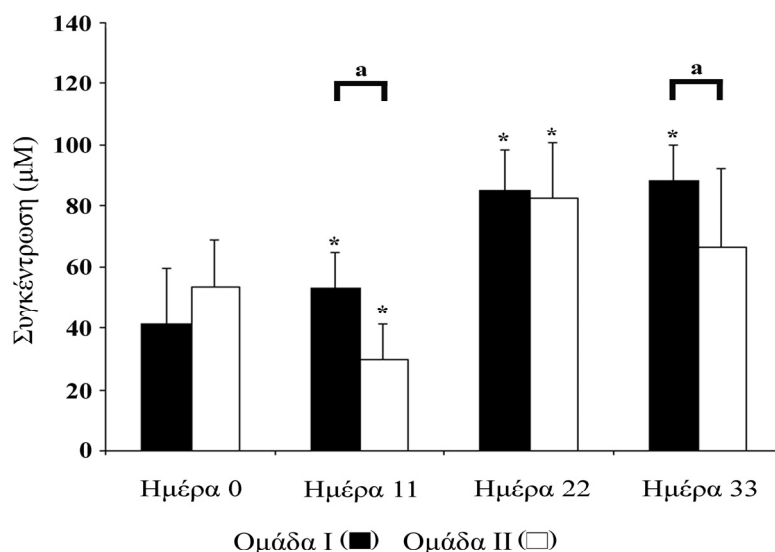
Στην Ομάδα I τα επίπεδα της TAC στα RBC μειώθηκαν σταδιακά κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (κατώτερο επίπεδο την Ημέρα 33) (Γράφημα 36). Τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση των κατεχινών στην Ομάδα II. Η χορήγηση του όζοντος στην Ομάδα I είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της TAC του πλάσματος, η οποία παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, ακόμη και μετά τη χορήγηση των κατεχινών (40% μείωση την Ημέρα 22), και αποκαταστάθηκε σε κανονικά επίπεδα στο τέλος της πειραματικής περιόδου. Στην Ομάδα II τα επίπεδα της TAC του πλάσματος παρέμειναν σταθερά σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.



Γράφημα 35. Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στην Ομάδα I και Ομάδα II. (Α) Δραστηριότητα της GPx. (Β) Δραστηριότητα της SOD. Η ενζυμική δραστηριότητα για τη GPx εκφράζεται ως U/gr hemoglobin και για την SOD ως % ρυθμός αναστολής. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

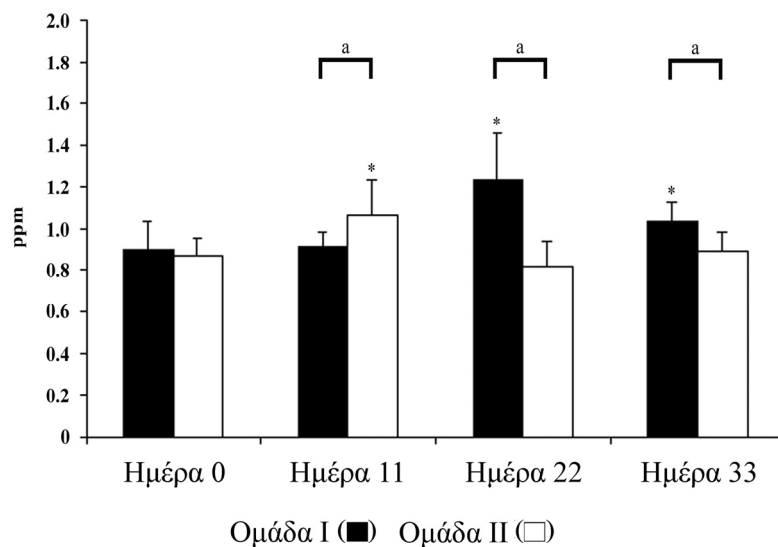


Γράφημα 36. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στην Ομάδα I και Ομάδα II. (A) Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στα ερυθρά αιμοσφαίρια. (B) Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα στο πλάσμα. Η Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο Blue CrO₅ assay όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. * Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

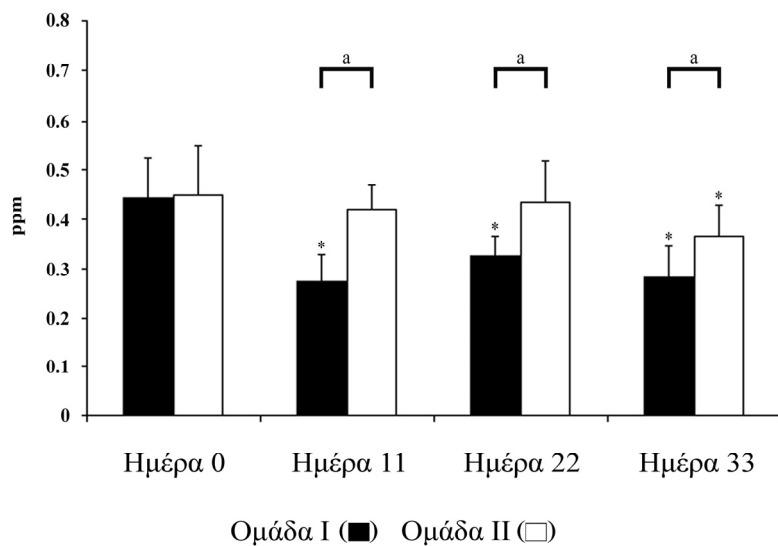


Γράφημα 37. Συγκέντρωση MDA στα ούρα στο Ομάδα I και Ομάδα II. Τα επίπεδα της MDA μετρήθηκαν με τη χρήση LC-MS του προϊόντος που παράγεται με τη χρήση αντιδραστηρίου TBA. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

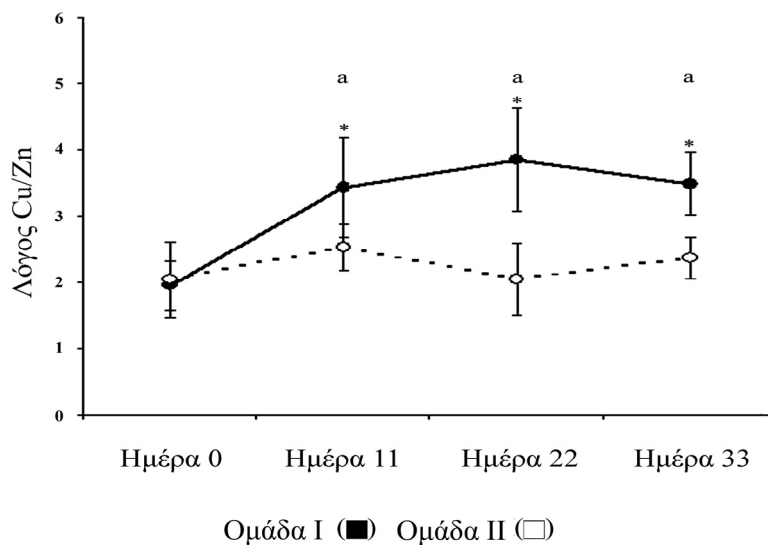
Η συγκέντρωση της MDA ελέγχθηκε στα ούρα των ενηλίκων επίμυων και προσδιορίστηκε με τη χρήση υγρού χρωματογράφου με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 37, η χορήγηση του όζοντος, συνεχώς και βαθμιαία αύξησε τη συγκέντρωση της MDA στα ούρα. Τα ανώτερα επίπεδα MDA, παρατηρήθηκαν την τελευταία ημέρα του πειραματικού πρωτόκολλου (Ομάδα I) και ήταν 2 φορές υψηλότερα από την Ημέρα 0. Η χορήγηση των κατεχινών οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της MDA, αλλά δεν ήταν ικανή να αναστείλει πλήρως την αύξηση της MDA που ακολούθησε τη χορήγηση του όζοντος (Ομάδα II). Την Ημέρα 33 τα επίπεδα της MDA ήταν 25% υψηλότερα από την Ημέρα 0, αλλά σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με την Ομάδα I.



Γράφημα 38. Συγκέντρωση χαλκού στο πλάσμα αίματος στο Ομάδα I και Ομάδα II. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 39. Συγκέντρωση ψευδαργύρου στο πλάσμα αίματος στο Ομάδα I και Ομάδα II. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.



Γράφημα 40. Αναλογία χαλκού/ψευδαργύρου στο πλάσμα. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε δις-απεσταγμένο νερό και μετρήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης. *Σημαντικά διαφορετικό από την Ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των Ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

Και στις δύο ομάδες η χορήγηση κατεχινών αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του χαλκού στο πλάσμα (36% και 22% στην Ομάδα I και II αντίστοιχα, Γράφημα 38) και δεν είχε καμία επίδραση στην συγκέντρωση του ψευδαργύρου. Το όζον από την άλλη πλευρά δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα του χαλκού στο πλάσμα. Η συγκέντρωση ψευδαργύρου στο πλάσμα παρέμεινε σταθερή κατά την πειραματική περίοδο στην Ομάδα II, αλλά μειώθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση του όζοντος στην Ομάδα I και παρέμεινε σε χαμηλές συγκεντρώσεις μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου (37% μείωση) (Γράφημα 39). Η αναλογία χαλκού/ψευδαργύρου ήταν σημαντικά αυξημένη στην Ομάδα I ενώ παρέμεινε σχετικά σταθερή στην Ομάδα II (Γράφημα 40). Αυτό οφείλεται κυρίως στη μείωση των επιπέδων ψευδαργύρου που ακολούθησε τη χορήγηση του όζοντος στην

Ομάδα I και τη μικρή αύξηση των επιπέδων χαλκού που προκαλείται από τη χορήγηση των κατεχινών (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Αναλογία χαλκού/ψευδαργύρου στο πλάσμα

	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22	Ημέρα 33
Ομάδα I	1.94±0.4	2.43±0.7	3.85±0.8	3.49±0.5
Ομάδα II	2.04±0.6	2.53±0.4	2.04±0.5	2.37±0.3

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mmol/L α-tocopherol. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Πίνακας 16. Αντιοξειδωτική ικανότητα της κατεχίνης, επικατεχίνης και EGCG

	(+) Catechin	(-) Epicatechin	EGCG
10⁻¹M	50±1.8	52±1.9	101±3.7
10⁻²M	19±1.0	12±1.1	44±2.0
10⁻³M	2±0.4	6±0.5	29±2.1

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mmol/L α-tocopherol. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Μεταξύ των φλαβονοειδών οι κατεχίνες παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της EGCG είναι 2 φορές ισχυρότερη από την επικατεχίνη ή την κατεχίνη (Heim *et al.* 2002). Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν ισχυρά αυτό το συσχετισμό (Πίνακας 16). Η EGCG έδειξε αξιοσημείωτα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, παρόμοια με α-τοκοφερόλης που χρησιμοποιείται ως πρότυπο στη μέθοδο εκτίμησης της TAC. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός διαλύματος 10⁻¹M EGCG αντιστοιχεί σε 0.100±0.004M α-

τοκοφερόλης, ενώ για τα αντίστοιχα διαλύματα επικατεχίνης και κατεχίνης σε $0.052 \pm 0.002\text{M}$ και $0.050 \pm 0.002\text{M}$ α-τοκοφερόλης.

Πίνακας 17. Αιματολογική ανάλυση στην αρχή και μετά από κάθε παρεμβατική περίοδο και για τις δύο ομάδες

	Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22	Ημέρα 33
Λευκοκύτταρα	I	5.8±1.7	6.0±1.5	7.0±1.7*	7.4±1.7*
(K/μL)	II	3.8±0.5	5.5±1.1*	5.5±1.9*	4.8±0.8*
Ερυθρά αιμοσφαίρια	I	6.5±0.3	6.3±0.5	5.6±0.3*	6.1±0.3*
(K/μL)	II	6.2±0.3	5.8±0.4*	5.9±0.2*	6.2±0.6
Αιμοσφαιρίνη	I	11.2±0.4	10.8±0.5*	10.5±0.3*	10.9±0.4
(gr/dL)	II	10.6±0.4	10.0±0.5*	10.5±0.1	11.0±0.5
Αιματοκρίτης	I	32.9±1.5	32.8±2.1	30.2±1.1*	31.2±3.8
(%)	II	31.9±1.5	29.8±2.0*	31.6±0.6*	32.5±2.1
Αιμοπετάλια	I	506±20	540±65*	555±54*	492±35*
(K/μL)	II	459±34	522±51*	501±46	539±45*

* Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p < 0.05$. ^a Σημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α..

Η χορήγηση κατεχινών οδήγησε σε σημαντική αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 17. Εν τω μεταξύ, το όζον δεν είχε καμία επίδραση ούτε στα λευκά αιμοσφαίρια ούτε σε κάποιον άλλο δείκτη στο αίμα. Επίσης εξετάστηκε η δράση του όζοντος και των κατεχινών, στη πρόκληση δεικτών φλεγμονής με τον προσδιορισμό του TNF-α σε κάθε αιμοληψία. Τα επίπεδα του TNF-α παρέμειναν σταθερά και στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (Πίνακας 18). Κατά την ανάλυση των

δεδομένων στους δείκτες αίματος θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι αυτοί οι δείκτες δυνατόν να επηρεαστούν από τη συλλογή του αίματος και κατά συνέπεια τη μείωση του συνολικού όγκου του αίματος.

Πίνακας 18. Μεταβολή TNF-a επίμυων κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου

Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22	Ημέρα 33
Ομάδα I	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml
Ομάδα II	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml	<12.5pg/ml

Υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού ασκούν δράσεις κατά της παχυσαρκίας και επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων όχι μόνο σε παχύσαρκα άτομα, αλλά και σε μη παχύσαρκα άτομα (Ito *et al.* 2008). Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση χαμηλών δόσεων κατεχινών δεν επηρεάζει τους διατροφικούς δείκτες και τους δείκτες μεταβολισμού. Δεν υπήρξε επίσης επίπτωση στο σωματικό βάρος των επίμυων και στις δύο ομάδες (Πίνακας 19). Τα στοιχεία μας υποδηλώνουν επίσης ότι ούτε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη διαφοροποιεί κάποιον από τους παραπάνω δείκτες (Πίνακας 20).

Πίνακας 19. Μεταβολή βάρους επίμυων κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου

Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 11	Ημέρα 22	Ημέρα 33
Ομάδα I	210±5 gr	205±4 gr	210±8 gr	215±8 gr
Ομάδα II	226±9 gr	221±9 gr	230±8 gr	232±9 gr

*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Πίνακας 20. Διατροφικοί και μεταβολικοί δείκτες των δύο ομάδων μετά από κάθε παρεμβατική περίοδο

	Ομάδα	Ημέρα 0-10	Ημέρα 10-20	Ημέρα 20-30
Κατανάλωση τροφής	I	13.3±2.8	15.8±2.3	16.5±1.5
(gr)	II	12.1±2.1	14.7±1.8	13.5±1.6
Πρόσληψη νερού	I	21.5±4.0	22.0±7.9	22.7±4.7
(ml)	II	21.2±6.8	21.7±5.6	22.4±6.0
Αποβολή ουρών	I	5.8±2.4	7.1±4.1	7.5±2.3
(ml)	II	7.6±4.9	7.6±3.9	8.3±4.1
Ισοζύγιο νερού	I	15.7±3.6	14.9±4.3	15.2±3.5
(ml)	II	13.6±3.1	14.1±4.3	14.0±5.2
Βάρος κοπράνων	I	3.4±1.0	4.2±1.3	4.9±1.6
(gr)	II	2.9±1.3	3.6±1.1	3.6±1.8

*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, $p < 0.05$. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, $p < 0.05$. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι \pm τ.α.

4.2.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων Φάσης II και III

Στο Πίνακα 21 γίνεται μια άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης όζοντος και κατεχινών στις ομάδες πειραματόζωων της Φάσης II και της Φάσης III. Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε παρόμοια δόση όζοντος (5.8μg και 5.9μg / kg σωματικού βάρους). Ωστόσο τα πειραματόζωα της Φάσης II είχαν ηλικία 12 εβδομάδων (νεαροί επίμυες Wistar) ενώ αυτά της Φάσης III είχαν ηλικία 24 εβδομάδων (ενήλικες επίμυες Wistar). Επίσης στα πειραματόζωα της Ομάδας των κατεχινών της Φάσης II χορηγήθηκε μίγμα κατεχινών που αποτελούνταν από 2.25mg κατεχίνης και 2.25mg επικατεχίνης διαλυμένα σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό με

τελική αναλογία στη ημερήσια δόση 50% κατεχίνης και 50% επικατεχίνης ενώ στην Ομάδα κατεχινών της Φάσης III το μίγμα αποτελούνταν από 1.55mg κατεχίνης, 1.55mg επικατεχίνης και 1.4mg επιγαλλοκατεχίνης διαλυμένα σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό με τελική αναλογία στη ημερήσια δόση 35% κατεχίνης, 35% επικατεχίνης και 30% EGCG.

Πίνακας 21. Μεταβολές αντιοξειδωτικών ενζύμων, TAC πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων και επίπεδα MDA ούρων μετά τη ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος ή κατεχινών.

	Όζον		Κατεχίνες	
	Φάση II	Φάση III	Φάση II	Φάση III
GPx	↑ (29%) *, ^a (p<0.05)	↓ (16%) *, ^a (p<0.05)	↓ (35%) *, ^a (p<0.05)	↓ (28%) *, ^a (p<0.05)
SOD	-	-	↑ (3%) *, ^a (p<0.05)	↑ (20%) *, ^a (p<0.05)
TAC πλάσματος	↓ (21%) *, ^a (p<0.05)	↓ (27%) *, ^a (p<0.05)	-	-
TAC ερυθρών αιμοσφαιρίων	↓ (33%) *, ^a (p<0.05)	-	-	↑ (31%) *, ^a (p<0.05)
MDA	-	↑ (28%) *, ^a (p<0.05)	-	↓ (45%) *, ^a (p<0.05)

*Σημαντικά διαφορετικό από την ημέρα 0, p<0.05. ^aΣημαντικά διαφορετικό μεταξύ των ομάδων, p<0.05. Οι τιμές απεικονίζονται ως μέσοι όροι ± τ.α.

Και στις δύο ομάδες η χορήγηση όζοντος οδηγεί σε σημαντική μείωση της TAC του πλάσματος η οποία εμφανίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα ενήλικα ζώα (27% έναντι 21%), αλλά σε αντίθεση με τα νεαρά ζώα δεν επηρεάζεται καθόλου η TAC των ερυθρών

αιμοσφαιρίων (μείωση 33% στα νεαρά ζώα). Ωστόσο η εικόνα που παρουσιάζει η δραστηριότητα της GPx είναι αντίθετη στις δύο ομάδες. Στα νεαρά ζώα παρατηρείται αύξηση 29% στη δραστηριότητα του ενζύμου ενώ στα ενήλικα ζώα παρατηρείται μείωση 16%. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της MDA στα ούρα των ενήλικων ζώων τα οποία παραμένουν αμετάβλητα στα νεαρά ζώα.

Η χορήγηση δύο διαφορετικών μιγμάτων κατεχινών οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της SOD στα νεαρά (3% αύξηση), κυρίως όμως στα ενήλικα ζώα (20% αύξηση). Η δραστηριότητα τις GPx σημειώνει έντονη μείωση όπως φαίνεται και στον Πίνακα 21. Η TAC του πλάσματος δεν μεταβάλλεται και στις δύο ομάδες ζώων αλλά η TAC των ερυθρών αιμοσφαιρίων σημειώνει 31% αύξηση στα ενήλικα ζώα. Στα νεαρά ζώα δε παρατηρείται κάποια αξιόλογη μεταβολή. Τέλος τα ενήλικα ζώα εμφανίζουν σημαντική μείωση των επιπέδων MDA των ούρων, τα οποία παραμένουν σταθερά στα νεαρά ζώα.

5. Συζήτηση

Ένας αποτελεσματικός χημειοπροστατευτικός παράγοντας θα πρέπει κατά προτίμηση να επεμβαίνει σχετικά νωρίς στη διαδικασία της καρκινογένεσης για να εμποδίσει την μετατροπή των προ-κακοηθών κυττάρων σε κακοήθη. Συνεπώς ο παράγοντας αυτός θα πρέπει να έχει την ικανότητα να αναστέλλει ή να επιβραδύνει τη πρόοδο των κακοηθών κυττάρων με την εμπλοκή του παράγοντα αυτού στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή στη διαφοροποίηση (Hail 2005). Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράγοντες που προκαλούν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα (με όσο το δυνατόν στοχοποιημένη παράδοση). Οι παράγοντες που είναι ικανοί να προκαλέσουν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτείται χρόνια έκθεση σε αυτούς και επομένως ο κίνδυνος τοξικότητας και χημειοαντίστασης είναι πολύ μικρός (Sun *et al.* 2004).

Ένας ιδανικός χημειοπροστατευτικός παράγοντας θα πρέπει να είναι επιλεκτικός στα καταστραμμένα ή μεταλλαγμένα κύτταρα, να επιδεικνύει σημαντική βιοδιαθεσιμότητα στη περιοχή του στόχου και να έχει περισσότερους από ένα μηχανισμούς δράσης. Επιπλέον, θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός, να χαρακτηρίζεται από ευκολία χορήγησης και να έχει χαμηλό κόστος. Οι διαιτητικές ενώσεις είναι αρκετά ελκυστικές λόγω της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπου σε αυτές, το σχετικά πολύ μικρό κίνδυνο τοξικότητας, και σημαντικές ενθαρρυντικές ενδείξεις από επιδημιολογικές μελέτες (Hail *et al.* 2008). Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός της πιθανής χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας τους μετά τη χορήγηση (Manach *et al.* 2005).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν σημαντικά στοιχεία για τις προ-αποπτωτικές ιδιότητες των διαιτητικών πολυφαινολών εναντίον αρκετών καρκινικών κυτταρικών σειρών (Taraphdar *et al.* 2005; Ramos 2007). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι όλα τα μόρια

που εξετάστηκαν ασκούν κυτταροτοξική δράση, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλούν αποπτωτικό θάνατο σε δύο τουλάχιστον κυτταρικές σειρές. Βέβαια, τα μόρια αυτά δεν παρουσιάζουν την ίδια δράση μεταξύ τους και οι τιμές IC_{50} διαφέρουν σημαντικά. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των φαινολικών μορίων που οδηγούν σε απόπτωση είναι στη περιοχή των μM . Για παράδειγμα για την κουεσερτίνη έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις από 29 ως $150\mu M$ (Ramos *et al.* 2005) και για τη γενιστεΐνη από $30-200\mu M$ (Xu and Loo 2001). Η κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι η γενιστεΐνη προκαλεί απόπτωση στα LMS κύτταρα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των $100\mu M$ ενώ η απιγενίνη νέκρωση. Το γαλλικό οξύ σε συγκεντρώσεις από $25\mu M$, η EGCG από τα $125\mu M$ ενώ τόσο η επικατεχίνη όσο και η κατεχίνη σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις που αγγίζουν τα όρια των mM (συγκεκριμένα από $500-1000\mu M$) προκαλούν απόπτωση. Γενικά, οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την πρόκληση απόπτωσης είναι υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Έρευνες έχουν δείξει ότι οι αντικαρκινικές και κυτταροτοξικές δράσεις των πολυφαινολών σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από δομικές παραμέτρους, καθώς επίσης και από το αντιοξειδωτικό δυναμικό τους (Passi *et al.* 1987; Moridani *et al.* 2002). Παρά τη στενή ομοιότητα τους, η βιολογική τους δράση ποικίλει σημαντικά μετά από μικρές διαρθρωτικές μεταβολές, αφού αυτές συχνά προκαλούν σημαντικές δομικές αλλαγές (Texeira *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2003). Αυτό αποτελεί μειονέκτημα στη κατανόηση των δράσεων των πολυφαινολών στην υγεία του ανθρώπου όταν κάποιος αναλογιστεί το πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενώσεων (>8000) (Manach *et al.* 2005). Τόσο η γενιστεΐνη όσο και η απιγενίνη (ισομερές της γενιστεΐνης) έδειξαν παρόμοιες ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς επίσης και ανάλογο αντιοξειδωτικό δυναμικό αλλά δρώντας με διαφορετικό τρόπο. Η απιγενίνη προκαλεί νεκρωτικό θάνατο των

κυττάρων ενώ η γενιστεΐνη αποπτωτικό. Αν και η EGCG εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ωστόσο δεν είχε την ισχυρότερη ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και την υψηλότερη κυτταροτοξική δράση. Οι μηχανισμοί που χημειοπροστασίας πολυφαινόλων ποικίλουν και περιλαμβάνουν εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, την ικανότητα πρόσκλησης απόπτωσης, αναστολής του κυτταρικού κύκλου, αναστολής της οδού του υποδοχέα αύξησης GFR, αναστολή της ενεργοποίησης του Nf-κβ, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, αναστολή της αγγειογένεσης, αναστολή πρωτεϊνικών κινασών κτλ (Fresco *et al.* 2006). Είναι γνωστό ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυροί αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ικανοί να προστατεύσουν τους ιστούς από το βλαβερές δράσεις του οξειδωτικού στρες και να προάγουν την απόπτωση στα κατεστραμμένα κύτταρα. Ωστόσο, ελέγχοντας τη διαφορετικές αντιοξειδωτικές και προοξειδωτικές ιδιότητες απέναντι στα φυσιολογικά και προ-καρκινικά κύτταρα, η παραγωγή ROS θεωρείται πλέον ως ένας από τους κύριους μηχανισμούς προαγωγής της απόπτωσης (Hail *et al.* 2008).

Είναι πολύ ενθαρρυντικό το γεγονός ότι απλοί βιοδραστικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα και έμμεσα αρκετούς από τους πάρα πολλούς στόχους που ενεργοποιούν την απόπτωση. Επιπλέον, αρκετές από αυτές τις ενώσεις ακούν συγκεκριμένη δράση σε καρκινικά κύτταρα, και δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα (Lepley *et al.* 1996; Sergedienne *et al.* 1999). Χαρακτηριστικά οι ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσίασαν εξειδικευμένη τοξικότητα έναντι δύο καρκινικών σειρών κυττάρων χωρίς να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών ινοβλαστών με τις οποίες επώαστηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Όπως και με άλλα διατροφικά συστατικά, οι περισσότερες αποδείξεις για τις πολυφαινόλες βασίζονται σε *in vitro* μελέτες και σε μελέτες με πειραματόζωα (Fresco *et al.* 2006). Είναι απαραίτητος πλέον ο σχεδιασμός επιδημιολογικών μελετών μεγάλης

κλίμακας για τη μελέτη των δράσεων των πολυφαινολών στη προστασία της ανθρώπινης υγείας.

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες σε κύτταρα και σε ιστούς με τους οποίους έρχεται σε επαφή, αρχικά με τη δημιουργία ROS (Bocci 2005; Cienciewicki *et al.* 2008) και δευτερευόντως από το σχηματισμό LOPs (Bocci 2005). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση όζοντος σε ενήλικους επίμυες σε χαμηλές δόσεις οδηγεί σε σημαντική αύξηση του βαθμού οξειδωτικού στρες, όπως προκύπτει από τη σημαντική αύξηση του επιπέδου της MDA των ούρων και τη σημαντική μείωση της TAC του πλάσματος. Συνεπώς όχι το όζον, αλλά μόνο τα ROS και LOPs είναι υπεύθυνα για τις διαδοχικές και πολλαπλές βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα κύτταρα σε όλο το σώμα.

Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι οι κατεχίνες στα ενήλικα ζώα (Φάση III) δεν μπορούν να αναστρέψουν (αποτέλεσμα Ομάδα I) ή στην αναστείλουν (αποτέλεσμα Ομάδα II), τη δράση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το όζον αν και προκαλούνται ορισμένες μεταβολές. Και στις δύο Ομάδες τα επίπεδα MDA των ούρων στο τέλος της μελέτης παρέμειναν υψηλά. Μεταβολές έλαβαν χώρα στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ένζυμων SOD και GPx, τα επίπεδα στο πλάσμα του Cu και Zn και στη TAC του πλάσματος και των RBC. Αντιθέτως στη Φάση II όπου συμμετείχαν νεαρά ζώα, τα επίπεδα MDA μετά τη χορήγηση όζοντος παρέμειναν αμετάβλητα όπως την Ημέρα 0 και ανάλογα της Ομάδα ελέγχου υποδηλώνοντας ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα των ζώων διαχειρίστηκε με επιτυχία το οξειδωτικό στρες. Όπως και στη Φάση III παρατηρήθηκαν μεταβολές στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ένζυμων SOD και GPx, και στη TAC του πλάσματος, των RBC και των ούρων.

Από όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη φορά που εφαρμόζεται αυτό το πειραματικό μοντέλο της ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης κατεχινών σε επίμυες. Οι κατεχίνες

έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro*. Όμως μόνο ένα σχετικά μικρό ποσοστό των κατεχινών είναι παρόν στο πλάσμα μετά από τη λήψη συμπληρωμάτων εκ του στόματος (Henning *et al.* 2004). Τα δεδομένα από *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι το ποσοστό των κατεχινών που σουλφώνεται ή γλυκουρονιώνεται στο πλάσμα εξαρτάται από τη δόση (Yang *et al.* 2008). Συνήθως σημαντικές ποσότητες μη συζευγμένων μορφών EGCG είναι παρούσες στο πλάσμα αλλά όλες οι (+) κατεχίνες και οι (-) επικατεχίνες είναι σε συζευγμένη μορφή (Manach *et al.* 2005). Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είναι ενδεδειγμένη για αυτό το είδος των ενώσεων γιατί προσφέρει 100% βιοδιαθεσιμότητα και παρακάμπτει το φαινόμενο πρώτης διόδου (ήπαρ, λεπτό και παχύ έντερο). Επιπλέον, μας επιτρέπει να έχουμε τον μέγιστο έλεγχο της πραγματικής δόσης της ουσίας που ελήφθη τελικά από τον οργανισμό.

Τόσο στα νεαρά ζώα (Ομάδα CtG, Φάση II) όσο και στα ενήλικα ζώα (Ομάδα II, Φάση III) η χορήγηση των δύο μιγμάτων κατεχινών οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της SOD. Μάλιστα στην Ομάδα II (ενήλικα ζώα) όταν η χορήγηση κατεχινών προηγείται της χορήγησης όζοντος, η δραστηριότητα της SOD αυξάνεται σημαντικά και εξακολουθεί να είναι σχετική υψηλή ακόμη και μετά τη χορήγηση του όζοντος μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή των επιπέδων της SOD μετά τη χορήγηση κατεχινών στην Ομάδα I (Φάση III). Στην Ομάδα κατεχινών (Ομάδα CtG, Φάση II) των νεαρών ζώων παρατηρείται σταθεροποίηση των επιπέδων της SOD σε υψηλότερο επίπεδο από τα αρχικά. Εν τω μεταξύ, η αρχική χορήγηση όζοντος ή κατεχινών οδηγεί σε ισχυρή μείωση της δραστηριότητας της GPx τα επίπεδα της οποίας επανέρχονται στα αρχικά μόνο στη δεύτερη Ομάδα (Ομάδα II, Φάση III). Ο Li και οι συνεργάτες (2007) έδειξαν ότι οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού προάγουν την παραγωγή της SOD και την καταλάσης στις μύγες. Ένας μεγάλος αριθμός *in vitro* μελετών υποστηρίζουν την αυξορύθμιση της SOD σε κύτταρα όταν επωάζονται με κατεχίνες (Chan *et al.* 2002; Ying

et al. 2004). Σε μια μελέτη, οι ασθενείς με πνευμονική φυματίωση που έλαβαν εκχύλισμα κατεχινών παρουσίασαν σημαντική αύξηση της SOD, πιθανώς λόγω της αναστολής παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αντίδρασης αυτοξειδοαναγωγής από τις κατεχίνες (Agarwal *et al.* 2010). Ο Travagli *et al.* 2007 ανέφερε ότι η *ex vivo* βραχυπρόθεσμη έκθεση του ανθρώπινου αίματος σε συγκεντρώσεις όζοντος στο θεραπευτικό φάσμα προκαλεί μια μη σημαντική μείωση του επιπέδου της SOD. Η εμφύσηση υψηλών δόσεων όζοντος στη κάτω δεξιά κοιλιακή χώρα επίμυων μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα της SOD, αλλά δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα της GPx (Rodriguez *et al.* 2009). Παρ'όλα αυτά οι διαφορές στα επίπεδα SOD μεταξύ των δύο ομάδων (Φάση III) στη μελέτη μας θα μπορούσαν να οφείλονται στην εξωκυττάρια εξουδετέρωση των ROS και ενεργών λιποπεροξειδίων (ROO[·]) από τις κατεχίνες και η επικείμενη εξάντληση τους, και ως εκ τούτου, η αδυναμία τους να προάγουν τη δραστηριότητα της SOD, όταν έχει προηγηθεί η χορήγηση του όζοντος. Φαίνεται πως το όζον και σε χαμηλές δόσεις δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της SOD, τόσα στα ενήλικα όσο και στα νεαρά ζώα όπου δε παρατηρείται μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου. Ο σχηματισμός των ROS (ως επί το πλείστον H₂O₂) και LOPs λόγω της χορήγησης όζοντος μπορεί να αλληλεπιδράσει με την GPx, το βασικό ένζυμο καταβολισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου μετά από 10 εφαρμογές του όζοντος (Φάση III). Οι επιπτώσεις της χορήγησης των κατεχινών στα επίπεδα της GPx σε ένα *in vivo* μοντέλο δεν έχουν μελετηθεί ακόμη και ο μηχανισμός δράσης είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Τα επίπεδα της GPx μειώθηκαν σημαντικά (-27%) μετά τη χορήγηση των κατεχινών στην Ομάδα II (Φάση III). Ο Agarwal και συνεργάτες (2010) βρήκαν επίσης σημαντική μείωση των επιπέδων της GPx (-21%) σε ασθενείς με πνευμονική φυματίωση που έλαβαν εκχύλισμα κατεχινών (ένα μήνα μετά), και πρότειναν ότι η μείωση αυτή οφείλεται στη θωράκιση της γλουταθειόνης, που είναι το υπόστρωμα

της GPx, από το εκχύλισμα κατεχινών από τις ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, τα νεαρά ζώα παρουσίασαν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου GPx, η οποία παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα ως το τέλος της πειραματικής περιόδου. Είναι πιθανόν η αύξηση αυτή να οφείλεται στη κινητοποίηση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος των κυττάρων και την αύξηση της δραστηριότητας της GPx ώστε να ανταπεξέρθουν στο οξειδωτικό στρες που προκάλεσε η χορήγηση όζοντος με τη δημιουργία ROS και LOPs. Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα των νεαρών ζώων φαίνεται ότι έχει υψηλότερο όριο διαχείρισης και αντιμετώπισης καταστάσεων που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Αυτό έρχεται να επιβεβαιωθεί από πληθώρα μελετών με ποίκιλα αντιοξειδωτικά μόρια, μελέτες που υποστηρίζουν ότι σε υγιείς πληθυσμούς τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών δεν προσφέρουν επιπλέον προστασία. Τα συμπληρώματα αυτά είναι απαραίτητα σε ομάδες πληθυσμού που εκτίθενται σε κινδύνους ή έχουν ανάγκη ενίσχυσης του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού όπως είναι οι καπνιστές, οι έγκυες, σε ασθενείς με διαβήτη ή με καρδιαγγειακές παθήσεις κτλ (Levine *et al.* 1996; Burri and Jacob 1997; Weber *et al.* 1996).

Οι μεταβολές της TAC στα RBC της Ομάδας I (Φάση III) είναι στενά συνδεδεμένες με τις μεταβολές της δραστηριότητας της GPx ($r = 0.984$, $p < 0.01$) γεγονός που αποδεικνύει ότι το ένζυμο αυτό παίζει βασικό ρόλο στην αποτοξίνωση από τις ελεύθερες ρίζες. Μια σημαντική μείωση της TAC στο πλάσμα παρατηρείται όταν χορηγείται το όζον. Η κατάσταση αυτή αντιστρέφεται 22 ημέρες μετά τη χορήγηση κατεχινών. Από την άλλη μεριά η πρόληψη με κατεχίνες (Ομάδα II, Φάση III) μειώνει τη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών και διατηρεί την TAC στο πλάσμα και τα RBC επίσης. Επιπλέον, στην Ομάδα I (Φάση III) η TAC των RBC παρέμεινε σταθερή μετά τη χορήγηση του όζοντος (Ημέρα 11), αλλά η συνεχής μείωση της TAC στο πλάσμα φαίνεται να έχει αντίκτυπο στην TAC στα RBC η οποία μειώθηκε σημαντικά μετά από 22 ημέρες.

Επιπλέον, αν και τα επίπεδα της TAC του πλάσματος αποκαθίστανται μετά το πέρας της πειραματικής περιόδου, τα επίπεδα της στα RBC παραμένουν σημαντικά χαμηλότερα από ότι στην έναρξη του πειράματος.

Στα νεαρά ζώα, τόσο στο πλάσμα όσο και στα ερυθρά αιμοσφαίρια τα επίπεδα της TAC μετά τη χορήγηση όζοντος (Ομάδα OG, Φάση II) παρουσιάζουν σημαντική πτώση. Αυτή η μείωση, και ειδικά στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων, πιθανόν σηματοδοτεί και την άμεση ενεργοποίηση του μηχανισμού της GPx. Όπως και η δραστηριότητα της GPx παραμένει σε υψηλά επίπεδα ως το τέλος της πειραματικής περιόδου, έτσι και τα επίπεδα TAC του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων παραμένουν χαμηλά. Ωστόσο, τα επίπεδα MDA των ούρων δεν μεταβάλλονται όπως δείχνουν τα οι μετρήσεις μας γεγονός που δείχνει ότι τα νεαρά ζώα έχουν την ικανότητα να διαχειριστούν το οξειδωτικό στρες. Στα ενήλικα όμως ζώα, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του όζοντος οδηγεί σε αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η προ-θεραπεία με κατεχίνες, αν και δεν μπορεί να εμποδίσει την αύξηση της MDA μετά τη χορήγηση του όζοντος, μείωσε την αύξηση των επιπέδων σε κανονικό επίπεδο λίγο μετά. Αυτό είναι σε συμφωνία με πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα αντιοξειδωτικά (Evangelou *et al.* 1997) και οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού (Agarwal *et al.* 2010; Nanjo *et al.* 1993) δυνατόν να μειώσουν την *in vivo* υπεροξειδωση των λιπιδίων στα ούρα και το πλάσμα, αντιστοίχως, καθώς και *in vitro* να αναστείλουν τη δράση των υπεροξειδίων, των ριζών υδροξυλίου, καθώς και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Sabu και Kuttan 2002). Σε αντίθεση, η θεραπεία με κατεχίνες δεν έχει καμία επίδραση καθώς τα επίπεδα της MDA ήταν σημαντικά αυξημένα μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Τα φλαβονοειδή δεσμεύουν ρίζες υπεροξειδίου με αποτέλεσμα το τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης παραγωγής ριζών (Heim *et al.* 2002), και συνεπώς, προσφέρουν προστασία έναντι της καταστροφής των λιπιδίων των μεμβρανών του πλάσματος.

Η χορήγηση κατεχινών στα ενήλικα πειραματόζωα της Φάσης III ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα με την αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων (όλων των τύπων λευκών αιμοσφαιρίων) και του αριθμού των αιμοπεταλίων, επειδή τα κύτταρα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό αμυντικό ρόλο. Η συλλογή αίματος και κατά συνέπεια η μείωση του συνολικού όγκου του αίματος δυνατόν να επηρεάζει τα επίπεδα του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης. Είναι επίσης πιθανό ότι οι κατεχίνες ενώνονται με μόρια σιδήρου (χηλωτές σιδήρου) (Chaston και Richardson 2003), συνεπώς μειώνουν τη διαθεσιμότητα και ως εκ τούτου, επιβραδύνουν τον σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης.

Ούτε η χορήγηση όζοντος, ούτε των κατεχινών επηρεάζει τους μεταβολικούς και διατροφικούς δείκτες στους επίμυες (νεαρούς και ενήλικες). Οι διατροφικές συνήθειες των πειραματόζωων όσον αφορά την κατανάλωση τροφής και την πρόσληψη νερού παρέμειναν σταθερές καθ' όλη την πειραματική περίοδο, καθώς και η παραγωγή ούρων και το βάρος των κοπράνων. Αναπόφευκτα, οι επίμυες διατήρησαν το αρχικό τους βάρος και στις δύο ομάδες. Αυτό υποστηρίζεται και από μελέτες που δείχνουν ότι ούτε η έκθεση των πειραματόζωων στο όζον (Servais *et al.* 2005), ούτε σε EGCG (Klaus *et al.* 2005) ή συμπλήρωμα κατεχινών πράσινου τσαγιού (Choo 2003) επηρεάζουν το σωματικό βάρος ή την πρόσληψη τροφής σε επίμυες. Σε αντίθεση άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι GTC ασκούν δράσεις κατά της παχυσαρκίας και επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων όχι μόνο σε παχύσαρκα άτομα, αλλά και σε μη παχύσαρκα άτομα (Ito *et al.* 2008). Σε μια *in vivo* μελέτη, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υψηλών δόσεων EGCG (4 φορές υψηλότερων από εκείνων που χρησιμοποιούνται στην μελέτη μας) σε επίμυες οδήγησε σε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, ενώ η από το στόμα χορήγηση της EGCG στην ίδια δόση έδειξε το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα και οι επίμυες αύξησαν σημαντικά το σωματικό τους βάρος (Kao *et al.* 2000).

Όχι μόνο η υπερφόρτωση με χαλκό, αλλά και στέρηση χαλκού μπορεί να αυξήσει το οξειδωτικό στρες, το τελευταίο μειώνοντας την SOD και τη δραστηριότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος και αυξάνοντας τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS. Ο ψευδάργυρος μπορεί να ενεργήσει ως αντιοξειδωτικό εκτοπίζοντας ιόντα σιδήρου από τα σημεία σύνδεσής τους και αναστέλλοντας την από το σίδηρο εξαρτώμενη οξειδωτική βλάβη (Halliwell και Gutteridge 2007). Η αναλογία χαλκού/ψευδαργύρου φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για την αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού, πιο σημαντική από το κάθε μέταλλο χωριστά. Όταν το ποσοστό αυτό παραμένει σχετικά σταθερό ο οργανισμός έχει την ικανότητα να αντιμετωπίσει με επιτυχία το οξειδωτικό στρες, ενώ η αυξημένος λόγος Cu/Zn συνδέεται με μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα και αυξημένο οξειδωτικό στρες.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς φαρμάκων φυτικής προέλευσης που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό με τα χημικά-συνθετικά φάρμακα ή αντιβιοτικά (Wagner και Ulrich-Merzenich, 2009). Η θεραπεία πολλαπλών στόχων (MultiTarget Therapy) είναι μια νέα αντίληψη θεραπείας για την αντιμετώπιση νόσων με το συνδυασμό πολλαπλών φαρμάκων με πιο άμεσο τρόπο (Wagner 2006). Ο συνδυασμός μεμονωμένων φυτικών ενώσεων και βοτάνων μπορεί να οδηγήσει σε καινοτόμα «φυτοφάρμακα» για ασθένειες που μέχρι σήμερα αντιμετωπίζονται μόνο με χημειοθεραπευτικά μέσα. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η κατεχίνη διαθέτει ινσουλινομιμητικές δραστηριότητες (Daisy *et al.* 2010) και η EGCG αναστέλλει την αντίσταση στην ινσουλίνη που προκαλείται από την δεξαμεθαζόνη, μέσω της οδού AMPK και PI-3K/Akt (Zhang *et al.* 2010). Στη παρούσα μελέτη δείξαμε ότι οι κατεχίνες και η EGCG μπορούν να λειτουργήσουν ως ρυθμιστές του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του διαβήτη (Niedowicz 2005).

Επομένως ένα φάρμακο φυτικής προέλευσης που μπορεί αν συνδυάσει όλες αυτές τις ιδιότητες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη θεραπεία του διαβήτη καθώς και των επιπλοκών του.

6. Συμπεράσματα

1. Τα φλαβονοειδή ασκούν στοχευμένη-εκλεκτική δράση στα καρκινικά κύτταρα με τη πλειοψηφία αυτών των ενώσεων να δρουν αποπτωτικά
2. Οι ενώσεις αυτές έχουν πολύ μικρή τοξικότητα, χαμηλό κόστος και η ικανότητα τους να προκαλούν αποπτωτικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα συνεπάγεται με σύντομη έκθεση σε αυτούς παράγοντες
3. Το όζον μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες όταν χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά
4. Οι κατεχίνες και η EGCG μπορούν να λειτουργήσουν ως ρυθμιστές της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας
5. Οι κατεχίνες και η EGCG μπορούν να διατηρήσουν της ενδογενή αμυντική δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων
6. Οι κατεχίνες και η EGCG μπορούν να αναστείλουν την ενδογενή οξείδωση των λιπαρών οξέων.
7. Οι κατεχίνες και η EGCG δεν επηρεάζουν το βάρος καθώς και μεταβολικούς δείκτες των επίμυων.
8. Το όζον δεν επηρεάζει το βάρος καθώς και μεταβολικούς δείκτες των επίμυων.
9. Οι κατεχίνες και η EGCG αυξάνουν τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και επομένως το ανοσοποιητικό σύστημα.
10. Όταν ο οργανισμός έχει ανεπαρκή αντιοξειδωτική άμυνα η χορήγηση κατεχινών και EGCG μπορεί να έχει ευεργετική δράση. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είναι σε υψηλά επίπεδα τότε η χορήγηση κατεχινών και EGCG δεν επιφέρει κάποιο αποτέλεσμα καθώς ο οργανισμός μπορεί αποτελεσματικά να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες.

11. Μειονέκτημα αποτελεί η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα τους καθώς και ο βαθμός μετασχηματισμού τους από το πεπτικό σύστημα των ανθρώπων. Ωστόσο, η ενδοπεριτοναϊκή ή η ενδοφλέβια χορήγηση εξαλείφουν αυτό το πρόβλημα.
12. Η ικανότητα των κατεχινών και της EGCG να μεταβάλλουν ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων που συνδέονται με την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού καθώς και με παράγοντες κινδύνου για διάφορες ασθένειες τα καθιστά ενώσεις άμεσου ενδιαφέροντος για την αντιμετώπιση ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες και όχι μόνο.

7. Περιλήψεις

Περίληψη στην Ελληνική

Μελέτη των βιολογικών επιδράσεων συστατικών διατροφικών προϊόντων

Τα φλαβονοειδή είναι μια Ομάδα χημικών μορίων που απαντώνται στα φυτά, και χαρακτηρίζονται από την παρουσία περισσότερων του ενός φαινολικών μονάδων. Κυρίες πηγές των φλαβονοειδών είναι τα μούρα, το τσάι, η μύρα, τα σταφύλια/κρασί, το ελαιόλαδο, η σοκολάτα/κακάο, ο καφές, τα καρύδια, τα φιστίκια, τα ρόδια καθώς και άλλα φρούτα και λαχανικά..

Οι φυτοχημικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή και οι βιταμίνες όπως η βιταμίνη C και E έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές και διατροφικές μελέτες πληθυσμών συσχετίζουν άμεσα την αυξημένη κατανάλωση τροφών πλουσίων στα φυτικά αυτά μόρια με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, καρκίνου καθώς και καλύτερη ποιότητα ζωής. Τα μόρια αυτά ενεργούν ως δεσμευτές των ROS και ως αναστολείς διαφόρων δραστικών ενζύμων. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, τα δεδομένα προέρχονται από *in vitro* πειραματικές μελέτες και από μελέτες μοντέλων νόσων σε ζώα. Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα φλαβονοειδή έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Ακόμη τα φλαβονοειδή της διατροφής υφίστανται διεξοδική βιομετατροπή με αποτέλεσμα η όποια βιολογική τους δράση να έγκειται στη δράση των μεταβολιτών τους. Η χορήγηση αυτών των ουσιών ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοφλέβια αντιμετωπίζει το πρόβλημα βιολογικού μετασχηματισμού στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπλέον, ενδοπεριτοναϊκή ή ενδοφλέβια χορήγηση μπορεί να παράσχει δεδομένα για μελλοντική χρήση των ενώσεων αυτών, όπως π.χ. ως φάρμακα

κατά του οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια εναντίον όλων των χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν:

1. η μελέτη της δράσης επιλεγμένων φλαβονοειδών της Ομάδας των φλαβανολών στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κυτταρική βιωσιμότητα καθώς επίσης και στην ικανότητα πρόκλησης απόπτωσης σε καρκινικές σειρές κυττάρων και φυσιολογικές ινοβλάστες,
2. η μελέτη της δράσης επιλεγμένων φλαβανολών ως *in vivo* αναστολείς του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε από τη χορήγηση όζοντος. Ειδικότερα μελετήθηκε α. η δράση χορήγησης όζοντος σε ενήλικες επίμυες Wistar β. η δράση χορήγησης όζοντος και η δράση χορήγησης μίγματος φλαβανολών ενδοπεριτοναϊκά σε νεαρούς επίμυες Wistar και γ. η δυνατότητα των μορίων αυτών να αναστέλλουν το οξειδωτικό στρες ή να δρουν προληπτικά ενάντια στο οξειδωτικό στρες σε ενήλικες επίμυες Wistar.

Η επώαση διαφόρων συγκεντρώσεων φλαβονοειδών, και συγκεκριμένα απιγενίνης, γενιστεΐνης, γαλλικού οξέος, επικατεχίνης, κατεχίνης και EGCG, με λειομυοσαρκοματικά καρκινικά κύτταρα (LMS) οδηγεί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή αυτή είναι δόσοεξαρτώμενη. Ισχυρότερη δράση παρουσιάζουν οι απιγενίνη, γενιστεΐνη και γαλλικό οξύ. Παράλληλα, η μελέτη δύο ισομερών φλαβονοειδών, της γενιστεΐνης και της απιγενίνης, έδειξε ότι δρουν ανταγωνιστικά για τους ίδιους υποδοχείς καθώς η ταυτόχρονη επώαση κυττάρων σε ταυτόσημες συγκεντρώσεις δεν οδηγεί σε αύξηση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από τις κατεχίνες που εξετάστηκαν η δράση τους είναι εμφανώς πιο ασθενής. Η κατάταξη της δράσης τους σύμφωνα με την ισχύ αναστολής της

κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν: απιγενίνη > γενιστεΐνη > γαλλικό οξύ > EGCG > επικατεχίνη > κατεχίνη.

Η μελέτη της δράσης τους με τη τεχνική χρώσης MTT σε LMS και MCF7 κύτταρα έδειξε ότι το γαλλικό οξύ εμφανίζει την ισχυρότερη δράση αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στις δύο κυτταρικές σειρές ενώ η απιγενινή εμφανίζει ανάλογη δράση με την γενιστεΐνη. Η EGCG εμφανίζει ασθενέστερη δράση από τις τρεις προηγούμενες ενώσεις αλλά είναι η μόνη ένωση από τις αυτές που ελέγχθηκαν της οποίας η ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα MCF7 είναι ισχυρότερη από ότι στα LMS κύτταρα. Η κατάταξη της δράσης τους σύμφωνα με την ισχύ αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα LMS κύτταρα ήταν: γαλλικό οξύ > γενιστεΐνη > απιγενίνη > EGCG > επικατεχίνη > κατεχίνη. Παράλληλα, όταν οι ενώσεις αυτές επώαστηκαν με φυσιολογικούς ινοβλάστες ανθρώπου MRC5 για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν στην IC₅₀ τιμή στα LMS και MCF7 κύτταρα δεν επηρέασαν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Για να διαπιστωθεί ο τρόπος δράσης των ενώσεων στα LMS κύτταρα πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με τη χρώση των κυττάρων με Annexin FITSC και Propidium Iodine. Η γενιστεΐνη, το γαλλικό οξύ, η επικατεχίνη, η κατεχίνη και η EGCG προκαλούν αποπτωτικό θάνατο στα LMS κύτταρα ενώ η απιγενίνη προκαλεί νεκρωτικό θάνατο.

Αν και οι κατεχίνες έδειξαν την ασθενέστερη δράση ως αντικαρκινικά μόρια στην *in vitro* μελέτη σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή υπάρχει πληθώρα δεδομένων για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν. Για να μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε επίμυες Wistar. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τρεις φάσεις:

Στην Πρώτη Φάση (Φάση I) συμμετείχαν 24 πειραματόζωα ηλικίας 24 εβδομάδων και βάρους 206 ± 19 gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 επιμέρους ομάδες: την Ομάδα Ελέγχου, την Ομάδα Όζοντος 1 και την Ομάδα Όζοντος 2. Τα πειραματόζωα της Ομάδα ελέγχου (8 πειραματόζωα) τοποθετήθηκαν στους μεταβολικούς κλωβούς όπου και λάμβαναν καθημερινά ενδοπεριτοναϊκά 1.2cm^3 φυσιολογικού ορού (Ημέρα 1 ως 10). Στα πειραματόζωα της Ομάδα Όζοντος (2 ομάδες των 8 πειραματόζωων) χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά όζον την πρώτη ημέρα 2cm^3 και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm^3 . Η συγκέντρωση όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν στην πρώτη Ομάδα $1000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($6.1\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους) και στη δεύτερη Ομάδα $2000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($12.2\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους). Για όλες τις ομάδες την 11^η ημέρα πραγματοποιούταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10 ημέρες. Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά.

Στην Δεύτερη Φάση (Φάση II) συμμετείχαν 36 πειραματόζωα ηλικίας 12 εβδομάδων και βάρους 191 ± 14 gr. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 επιμέρους ομάδες: την Ομάδα ελέγχου, την Ομάδα όζοντος και την Ομάδα αντιοξειδωτικών. Τα πειραματόζωα της Ομάδα ελέγχου (8 πειραματόζωα) τοποθετήθηκαν στους μεταβολικούς κλωβούς όπου και λάμβαναν καθημερινά ενδοπεριτοναϊκά 1cm^3 φυσιολογικού ορού (Ημέρα 1 ως 10). Στα πειραματόζωα της Ομάδα όζοντος χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά όζον την πρώτη ημέρα 2cm^3 και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1cm^3 . Η συγκέντρωση όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν στην πρώτη Ομάδα $1000\mu\text{g}/\text{lt}$ ($5.8\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους). Στα πειραματόζωα της Ομάδα Κατεχινών χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά για 10 συνεχόμενες ημέρες από 1cm^3 μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης σε συγκέντρωση $23.5\text{mg}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους. Για όλες τις ομάδες την 11^η ημέρα πραγματοποιούταν αιμοληψία και τα πειραματόζωα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για άλλες 10

ημέρες. Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά.

Στην Τρίτη Φάση (Φάση III) συμμετείχαν 24 πειραματόζωα ηλικίας 24 εβδομάδων και βάρους 218 ± 12 gr τα χωρίστηκαν σε 2 επιμέρους ομάδες: την Ομάδα Θεραπείας και την Ομάδα Πρόληψης. Στην Ομάδα Θεραπείας στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά την πρώτη ημέρα 2cm^3 όζοντος σε συγκέντρωση $1000\mu\text{g/l}$ ($5.9\mu\text{g/Kg}$ body weight) και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm^3 . Την 11^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Για τις επόμενες 10 ημέρες (12-21) στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1.25cm^3 μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης-EGCG σε συγκέντρωση 20mg/κίλο σωματικού βάρους. Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία. Στην Ομάδα πρόληψης στα πειραματόζωα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά για 10 συνεχόμενες ημέρες 1.2cm^3 μίγματος κατεχίνης-επικατεχίνης-EGCG (Ημέρα 1 ως 10). Την 11^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Την δωδέκατη ημέρα χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 2cm^3 όζοντος σε συγκέντρωση $1000\mu\text{g/l}$ ($5.9\mu\text{g/Kg}$ σωματικού βάρους) και για 9 συνεχόμενες ημέρες από 1.2cm^3 . Την 22^η ημέρα πραγματοποιήθηκε νέα αιμοληψία. Όλα τα ζώα παρέμειναν στους μεταβολικούς κλωβούς για παρακολούθηση για 10 επιπλέον ημέρες (Ημέρα 23 ως 32). Την 33^η ημέρα πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά.

Μετρήθηκαν οι εξής δείκτες: αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD και GPx, TAC πλάσματος, ερυθροκυττάρων και ούρων, επίπεδα μαλονικής διαλδεΐδης στα ούρα, αιματολογικοί δείκτες, δείκτες διατροφής και μεταβολισμού, επίπεδα TNF- α καθώς και επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου στο πλάσμα αίματος και τα ούρα.

Σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματα η επώαση καρκινικών σειρών κυττάρων με φλαβονοειδή αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η αντικαρκινογόνος δράση των μορίων αυτών ποικίλει μεταξύ των μορίων διαφορετικών ομάδων αλλά και μεταξύ

των ίδιων ομάδων. Τα μόρια αυτά ασκούν κυρίως αποπτωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις δεν εμφανίζουν δράση στις φυσιολογικές ινοβλάστες. Από τις φλαβανόλες ισχυρότερη δράση παρουσιάζει η EGCG ενώ η επικατεχίνη και η κατεχίνη εμφανίζουν παρόμοια αλλά πολύ πιο ασθενή δράση από ότι η EGCG.

Σύμφωνα με τα *in vivo* αποτελέσματα οι δόσεις όζοντος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και η επιλεγμένη οδός χορήγησης προκάλεσαν σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες στους ενήλικες επίμυες, όπως φαίνεται από την αύξηση των επιπέδων MDA στα ούρα και τη σημαντική μείωση της TAC στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύουν ότι οι φλαβανόλες μπορούν να λειτουργήσουν σαν διαμορφωτές της TAC και να διατηρήσουν την δραστηριότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών αμυντικών ενζύμων. Παρ' ότι οι φλαβανόλες δεν μπορούν να θεωρηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες του οξειδωτικού στρες μπορούν να ενισχύσουν την TAC και να προστατέψουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όταν χρησιμοποιούνται προληπτικά κατά του έντονου οξειδωτικού στρες, όπως πριν από ένα χειρουργείο ή τα αρχικά στάδια ασθενειών σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες.

Συνοψίζοντας, οι φλαβανόλες είναι χημικά μόρια που παρουσιάζουν έντονη βιολογική δραστηριότητα με ισχυρά οφέλη υγείας. Ο ρόλος τους και η χρήση τους ως θεραπευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση ή πρόληψη ασθενειών ή παθογενετικών καταστάσεων είναι ελπιδοφόρος ωστόσο απαιτείται περαιτέρω ερευνητική δράση και θεμελίωση των αποτελεσμάτων.

Περίληψη στην Αγγλική

Study of the biological interactions of different food components

Doctorate Thesis-Yannis Simos

Flavonoids are a group of chemical molecules found in plants, characterized by the presence of several phenolic units. The main sources of flavonoids are: berries, tea, beer, grapes/wine, olive oil, chocolate/cocoa, coffee, walnuts, pistachios, pomegranates and other fruits and vegetables.

Phytochemical compounds such as flavonoids and vitamins such as vitamin C and E possess strong antioxidant and anticancer properties. Epidemiological and nutritional studies correlate the increased consumption of plant foods rich in these molecules with a reduced risk of cardiovascular disease, cancer and improved quality of life. These molecules act as scavengers of ROS and as inhibitors of various active enzymes. In most of these cases, data are from *in vitro* studies and experimental studies in animal models of disease. It is known that most flavonoids have low bioavailability. Also, food flavonoids undergo extensive biotransformation resulting in any biological action is to the action of their metabolites. The administration of these substances intraperitoneally or intravenously faces the biological transformation problem in the gastrointestinal tract. Moreover, intraperitoneal or intravenous administration may provide data for future use of these compounds, as drugs against oxidative stress and therefore against all the chronic diseases associated with oxidative stress.

The aims of this research were:

- 1) Study the activity of various flavonoids (members of the flavanols group) on cell proliferation and cell viability in cancer cell lines and normal fibroblasts as well as the ability to induce apoptosis in cancer cells

2) Study the activity of flavanols as *in vivo* inhibitors of oxidative stress caused by ozone administration. Specifically the followings were studied: a. the effects of intraperitoneal ozone administration to adult Wistar rats, b. the effects of intraperitoneal ozone administration or intraperitoneal administration of a mixture of flavanols to young Wistar rats and c. the ability of flavanols to inhibit or to prevent oxidative stress in adult Wistar rats.

Incubation of various concentrations of flavonoids and specifically apigenin, genistein, gallic acid, catechin, epicatechin and EGCG with leiomyosarcomatic cancer cells (LMS cells) lead to decreased cell viability. The inhibition was dose-dependent. Apigenin, genistein acid and gallic acid presented the strongest activity. In addition, the study of the two isomeric phenols genistein and apigenin showed that the two molecules possible antagonize for the same receptors as co-incubation of cells at identical concentrations did not lead to decreased cell viability. Catechin and epicatechin activity was substantially weaker. The classification according to their activity was: apigenin > genistein > gallic acid > EGCG > epicatechin > catechin.

The ability of these molecules to inhibit cell proliferation was studied in LMS and MCF7 cancer cell lines using the MTT staining technique. Gallic acid presented the strongest ability to inhibit cell proliferation in both cell lines, while apigenin and genistein showed similar activity but weaker than gallic acid. EGCG is the only compound which ability to inhibit cell proliferation is higher in MCF7 cells than in LMS cells. The classification according to their activity was: gallic acid > apigenin > genistein > EGCG > epicatechin > catechin. Furthermore, incubation with the inhibitory concentration IC_{50} for the two cancer cell lines of the flavonoids with human fibroblast cells (MRC5) had no affect on the cell proliferation of the normal cells.

According to the flow cytometry results all the compounds triggered apoptotic death in LMS cells except from apigenin which lead cells to necrosis. Apoptosis started at the range of μM for genistein, gallic acid and EGCG and in the range of mM for epicatechin and catechin.

Although flavanols showed the weakest action as anticancer molecules compared with the other polyphenols, there are many data for their potent antioxidant activity. To study the antioxidant activity flavanols were administered intraperitoneally to Wistar rats. The *in vivo* study was divided into three phases:

Phase I was conducted on 24 Wistar rats aged 24 weeks and weighting $206\pm 19\text{gr}$, which were divided into 3 groups: the control group and two ozone groups (1 and 2). Animals of the control group (8 animals) were placed in metabolic cages where they received daily intraperitoneal saline 1.2cm^3 (Day 1 to 10). Animals of the ozone group (2 subgroups, 8 animals/subgroup) were intraperitoneally injected the first day 2cm^3 and for 9 consecutive days 1.2cm^3 . The ozone concentration used was for the first subgroup 1000mg/l (6.1mg/kg body wt) and for the second 2000mg/l (12.2mg/kg body wt). Blood collection was performed on day 11 for all groups and the rats remained in metabolic cages for another 10 days. On the 22nd day there was another blood collection and the animals were placed in cages.

Phase II was conducted on 36 Wistar rats aged 12 weeks and weighting $191\pm 14\text{gr}$, which were divided into 3 groups: the control group, the ozone group and the catechins group. Animals of the control group (8 animals) were placed in metabolic cages where they received daily intraperitoneal saline 1cm^3 (Day 1 to 10). Animals of the ozone group were intraperitoneally injected the first day 2cm^3 and for 9 consecutive days 1cm^3 . The ozone concentration used was 1000mg/l (5.8mg/kg body wt). Blood collection was performed on day 11 for all groups and the rats remained in metabolic cages for another 10

days. On the 22nd day there was another blood collection and the animals were placed in cages. Finally, animals of the antioxidant group were administered intraperitoneally for 10 consecutive days 1cm³ mixture of epicatechin and catechin. Blood collection was performed on day 11 for all groups and the rats remained in metabolic cages for another 10 days. On the 22nd day there was another blood collection and the animals were placed in cages.

Phase III was conducted on 24 Wistar rats aged 24 weeks and weighing 218±12gr and were placed into 2 groups: therapy group and prevention group. In therapy group animals were administered initially (on Day 1) 2cm³ of ozone intra-peritoneally at concentration of 1000mg/l (5.9µg/kg body wt) and for the next nine consecutive days (2-10) 1.2cm³ ozone at the same concentration. Blood collection was performed at Day 11. For the next 10 consecutive days (12-21) animals were administered intra-peritoneally 1.25cm³ mixture of catechin, epicatechin and EGCG at concentration of 20mg/kg body wt. Blood collection was performed at Day 22. In the prevention group animals were given 1.2cm³ mixture of catechin, epicatechin and EGCG at concentration of 20mg/kg body wt from Day 1 to Day 10. Blood collection was performed at Day 11. At Day 12 animals were given initially 2cm³ ozone intra-peritoneal and for nine consecutive days (Day 13 to Day 21) 1.2cm³ ozone at the same concentration (1000mg/l or 5.9µg/kg body wt). Blood collection was performed at Day 22. All injections (ozone and catechins) were given in a single dose daily between hours 11.00 to 12.00. Animals were kept without receiving any treatment for monitoring in the metabolic cages for ten more days after treatment (Day 23-Day 32). On the 33rd day there was another blood collection and the animals were placed in cages.

The following indicators-markers were measured: antioxidant enzymes SOD and GPx, TAC in plasma, erythrocytes and urine, urine malonaldehyde levels, haematological

indices, indicators of nutrition and metabolism, levels of TNF-a and copper and zinc levels in blood plasma and urine.

According to the results *in vitro* incubation of tumor cell lines with various flavonoids inhibited cell proliferation. Anticancer activity varied between molecules of different groups and between molecules of the same group. The majority of these molecules acted apoptotically on cancer cells lines, except from apigenin, and had no effect on normal cells. Among the flavanols tested EGCG exerted the highest anticancer activity while epicatechin and catechin showed similar but weaker activity.

According to the *in vivo* findings the ozone doses used in this study and the chosen route of administration caused a significant increase in oxidative stress in adult Wistar rats, as shown by significantly increased levels of MDA in urine and a significant decrease in plasma TAC. The results of this investigation show that catechins may act as modulators of TAC and maintain the activity of endogenous antioxidant defense enzymes. Although the catechins can not be considered as therapeutic agents of oxidative stress they can enhance TAC and protect the antioxidant enzymes when used in prevention of intense oxidative stress, such as before a surgery or the early stages of diseases associated with oxidative stress .

In summary, flavanols are chemical molecules that have strong biological activity with strong health benefits. Their role and their use as therapeutic agents to treat or prevent diseases or pathogenic situations is promising but requires further research.

8. Βιβλιογραφία

1. Agarwal A, Prasad R, Jaina A. Effect of green tea extract (catechins) in reducing oxidative stress seen in patients of pulmonary tuberculosis on DOTS Cat I regimen. *Phytomedicine* 2010; 17(1): 23-27.
2. 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.
3. Bao Y, Jemth P, Mannervik B et al. Reduction of thymine hydroperoxide by PHGPx and GST. *FEBS Lett* 1997; 410: 210-212.
4. Bauerova K and Bezek S. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18: 15–20.
5. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461–470.
6. Berry CE and Hare JM. Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: Molecular mechanisms and pathophysiologic implications. *J Physiol* 2004; 555: 589–606.
7. Bertram JS. Induction of connexin 43 by caretonoids: functional consequences. *Arc Biochem Biophys* 2004; 430: 120-126.
8. Bieri JG, Gorash L, Hubbard VS. Medical uses of vitamin E. *N Engl J Med* 1983; 308: 1063-1071.
9. Bieri JG. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 781-782.

10. Bleys J, Miller E, Pastor-Barriuso R et al. «Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials». *Am J Clin Nutr* 2006; 84(4): 880–887.
11. Bocci V. How does ozone act? How and why can we avoid ozone toxicity? In: Bocci V, ed. *Ozone: A new medical drug*. Netherlands: Springer, 2005: pp. 22
12. Bosch-Morell F, Flohe L, Marin N et al. 4-hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1383-1387.
13. Brownlee M and Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes-mellitus. *Ann Rev Biochem* 1981; 50: 385–432.
14. Burri BJ and Jacob RA. Human metabolism and the requirement for vitamin C. In: Packer L, Fuchs J, eds. *Vitamin C in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc, 1997:341–366.
15. Cadenas E and Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222–230.
16. Carini M, Aldini G, Facino RM. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins [Review]. *Mass Spectrom Rev* 2004; 23: 281–305
17. Chan P, Cheng JT, Tsai JC et al. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci. Lett* 2002; 328: 281–84.
18. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
19. Charalampidis PS, Veltsistas P, Karkabounas S et al. Blue CrO₅ assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 4162-4168.

20. Chaston TB and Richardson DR. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity and toxicity. *Am J Hematol* 2003; 73: 200-210.
21. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 456-468.
22. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in Human Health and Disease. *Crit Rev in Clin Lab Sci* 2008; 45(5): 417-450.
23. Cook NR, Albert CM, Gaziano JM. «A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study». *Arch Intern Med* 2007; 167(15): 1610–1618.
24. Daisy P., Balasubramanian K., Rajalakshmi M., Eliza J., Selvaraj J. Insulin mimetic impact of Catechin isolated from *Cassia fistula* on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Phytomedicine* 2010; 17: 28–36.
25. Danne-Dolle I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52(4): 601-623.
26. Davies MJ, Fu S, Wang H et al. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease [Review]. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1151–61.
27. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage [Review]. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703: 93–109.
28. Davis CA, Hearn AS, Fletcher B et al. Potent anti-tumor effects of an active site mutant of human MnSOD. Evolutionary conservation of product inhibition. *J Biol Chem* 2004; 279: 12769-12776.

29. Desideri A and Falconi M. Prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutases. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1322-1325.
30. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18: 655–673.
31. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1102–1115.
32. Evangelou A, Kalpouzos G, Karkabounas S, et al. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants- anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Lett* 1997; 115: 105-111.
33. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M et al. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94: 10895–10900.
34. Fossel M. *Cells, Aging and Human Disease*. New York, USA: Oxford University Press, 2003.
35. Fresco P, Borges F, Diniz C et al. New insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Medicinal Research Reviews* 2006; 26(6): 747-766.
36. Fridovich I. Superoxide radical and SODs. *Ann Rev BioChem* 1995; 64: 97-112.
37. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.
38. Gomes CA, da Cruz TG, Andrade JL et al. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem* 2003; 46: 5395-5401.
39. Grune T, Jung T, Merker K et al. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and «aggresomes» during oxidative stress, aging and disease [Review]. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2519–2530.

40. Grune T, Merker K, Sandig G et al. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 709–18.
41. Hail N Jr, Cortes M, Darke EN et al. Cancer chemoprevention: A radical perspective. *Free Ra. Bio. Me.* 2008; 45: 97-110.
42. Hail N Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* 2005; 10: 687-705.
43. Halliwell B and Whiteman M. Measuring RS and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharamacol* 2004; 142: 231-235.
44. Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York, USA: Oxford University Press, 2007.
45. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols. Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 268S-276S.
46. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1999; 16: 33-50.
47. Hardy G, Hardy I, Ball PA. Nutraceuticals – a pharmaceutical viewpoint: part II. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 661–671.
48. Hare JM and Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 2005; 115: 509–517.
49. Harman D. Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298–300.
50. Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 1998; 33: 639–653.

51. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572–584.
52. 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.
53. Hercberg S, Galan P, Preziosi P et al. «The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals». *Arch Intern Med* 2004; 164(21): 2335–42.
54. Hong YC, Lee KH, Yi CH et al. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. *Toxicol. Lett* 2002; 129: 255–262.
55. Imlay J. «Pathways of oxidative damage». *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 395–418.
56. Ito Y, Ichikawa T, Morohoshi Y et al. Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomed Res* 2008; 29(1): 27-32.
57. Kaneko M, Elimban V, Dhalla NS. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} pump by oxygen freeradicals. *Am J Physiol* 1989; 257: H804–H811.
58. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate. *Endocrinology* 2000; 141: 980–987.
59. Kasai H and Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *Gann* 1984; 75: 565–566.
60. Kasparova S, Brezova V, Valko M et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 2005; 46: 601–611.
61. Katz R. Biomarkers and surrogate markers: An FDA perspective. *NeuroRX* 2004; 189–195.

62. Kawada Y, Khan M, Sharma AK et al. Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 297-305.
63. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ et al. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke. The Zutphen study. *Arch Int Med* 1996; 154: 637-642.
64. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: perspectives on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 921–937.
65. Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM et al. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 1999; 274: 13908-13914.
66. Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C et al. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005; 29: 615–623.
67. Krinsky NI. Actions of carotenoids in biological systems. *Ann Rev Nutr* 1993; 13: 561-587.
68. Kukreja RC and Hess ML. The oxygen free-radical system—From equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 641–655.
69. Larini A and Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Vitro* 2005; 19(1): 55-61.
70. Latruffe N, Delmas D, Jannin B et al. «Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent». *Int J Mol Med* 2002; 10(6): 755–760.

71. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM. «Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial». *JAMA* 2005; 294(1): 56–65.
72. Lepley DM, Li B, Birt DF et al. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2367-2375.
73. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(8): 3704-3709.
74. Li YM, Chan HYE, Huang Y et al. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 546–554.
75. Lin S, Wei X, Bales KR et al. Minocycline blocks bilirubin neurotoxicity and prevents hyperbilirubinemia-induced cerebellar hypoplasia in the Gunn rat. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 21-27.
76. Liu YR, Zhu B, Wang X et al. Bilirubin as potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 139: 27-35.
77. Lombardi V, Valko L, Stolc S et al. Free radicals in rabbit spinal cord ischemia: Electron spin resonance spectroscopy and correlation with SOD activity. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 399–412.
78. Lotito SB and Frei B. «Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?» *Free Radic Biol Med* 2006; 41(12): 1727–1746.
79. 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.

80. Maine MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *FASEB J* 1998; 2: 2257-2268.
81. Maiorino M, Roveri A, Benazzi L et al. Functional interaction of PHGPx with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *J Biol Chem* 2005; 280: 38395-383402.
82. Manach C and Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004; 38: 771-785.
83. Manach C, Scalbert A, Morand C et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
84. Manach C, Williamson G, Morand C et al. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans: I. Review of 97 Bioavailability Studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 230S-242S.
85. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361–370.
86. Marnett LJ. Oxyradicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol* 2002; 181–182: 219–222.
87. Maurice MM, Nakamura H, van der Voort EAM et al. Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1997; 158: 1458–1465.
88. McCall MR and Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1034-1053.
89. Misoek ES, McLaughlin B, Morrow JD. Electrophilic cyclopentenone isoprostanes in neurodegeneration, *J Mol Neurosci* 2007; 33: 80–86.

90. Molavi B and Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: Molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19: 488–493.
91. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress [Review]. *FASEB J* 2004; 18: 1791–800.
92. Moridani MY, Galati G, O'Brien PJ. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem Biol Interact* 2002; 139: 251-264.
93. Nanjo F, Honda M, Okushio K et al. Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biol Pharma Bull* 1993; 16: 1156–1159.
94. Niedowicz D.M. & Daleke D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43: 289-330.
95. Niedowicz DM and Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43: 289–330.
96. Niki E, Yoshida Y, Saito Y et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668–676.
97. Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* 2000; 33(6): 809-817.
98. Otani K, Shimizu S, Chijiwa K et al. Increased urinary excretion of bilirubin oxidative metabolites in septic patients: a new marker for oxidative stress in vivo. *J Surg Res* 2001; 96: 44-49.
99. Passi S, Picardo M, Nazarro-Porro M. Comparative cytotoxicity of phenols in vitro. *Biochem J* 1987; 245: 537-542.

100. 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.
101. Pyne-Geithman GJ, Morgan CJ, Wagner K et al. Bilirubin production and oxidation in CSF of patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1070-1077.
102. Radimer K, Bindewald B, Hughes J et al. «Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000». *Am J Epidemiol* 2004; 160(4): 339–349.
103. Ramos S, Alia M, Bravo L et al. Comparative effects of food derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1271-1280.
104. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 427-442.
105. Renaud S and de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 20: 1523-1526.
106. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7): 933-56.
107. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A et al. «Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men». *N Engl J Med* 1993; 328(20): 1450–1456.
108. Roberts DCK. Vitamin E. Sydney: Australian Professional Publications, 1990
109. Roberts LJ, Oates JA, Linton MF. «The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans». *Free Radic Biol Med* 2007; 43(10): 1388–1393.

110. Rodriguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG et al. 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.
111. Romero-Ramos M, Venero JL, Garcia-Rodriguez S et al. Semichronic inhibition of glutathione reductase promotes oxidative damage to proteins and induces both transcription and translation of tyrosine hydroxylase in the nigrostriatal system. *Free Radic Res* 2003; 37: 1003-1012.
112. Sabu MC and Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 229–233.
113. Sergediene E, Jonsson K, Szymusiak H et al. Prooxidant toxicity of polyphenols antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett.* 1999; 462: 392-396.
114. Servais S, Boussouar A, Molnar A et al. Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure. *Free Radic Res* 2005; 39(3): 305–316.
115. Sesso HD, Buring JE, Christen WG. «Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial». *JAMA* 2008; 300(18): 2123–33.
116. Shenkin A. «The key role of micronutrients». *Clin Nutr* 2006; 25(1): 1–13.
117. Sies H. (1991) *Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, London
118. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 291–295.
119. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215(2): 213 – 219.
120. Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences [Review]. *Antiox Redox Signal* 2003; 5: 577–582.

121. Stanner SA, Hughes J, Kelly CN et al. «A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis». *Public Health Nutr* 2004; 7(3): 407–422.
122. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update, *J Lipid Res* 2009; 50: S376-S381.
123. Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR et al. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 1997; 21: 19–29.
124. Sun SY, Hail N Jr, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Natl Cancer Ins.* 2004; 96: 662-672.
125. Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Nutr Cancer* 2005; 53: 220-231.
126. Texeira S, Siquet C, Alves C et al. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1099-1108.
127. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A et al. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 504–511.
128. Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification [Review]. *Amino Acids* 2003; 25: 249–57.
129. Valko M, Izakovic M, Mazur M et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37–56.
130. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
131. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1–40.
132. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. «The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview». *Curr Pharm Des* 2004; 10(14): 1677–1694.

133. Villasenor IM, Simon MK, Villanueva AM. Comparative potencies of nutraceuticals in chemically induced skin tumor prevention. *Nutr Cancer* 2002; 44: 66–70.
134. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK et al. «Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials». *Lancet* 2003; 361(9374): 2017–2023.
135. Wagner H. & Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 2009; 16: 97–110.
136. Wagner H. Multitarget therapy – The future of treatment formore than just functional dyspepsia. *Phytomedicine* 2006; 13: SV122–129.
137. Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health-a review of recent data relevant to human requirements [Review]. *Int J Vitam Nutr Res.* 1996; 66(1): 19-30.
138. Winterbourn CC and Stern A. Human red cells scavage extracellular H₂O₂ and inhibit formation of HOCl and OH[•]. *J Clin Invest* 1987; 80: 1486-1491.
139. Xu J and Loo G. Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast caner cell lines. *J Cell Biochem* 2001; 82: 78-88.
140. Yang CS, Sang S, Lambert JD et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: S139 – S151.
141. Ying CJ, Sun XF, Zhang SL et al. ROS related enzyme expressions in endothelial cells regulated by tea polyphenols. *Biomed Environ Sci* 2004; 17: 33–39.
142. Young IS and Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.

143. Zhang Z.F., Li Q., Liang J., Dai X.Q., Ding Y., Wang J.B., Li Y. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine* 2010; 17: 14–18.

9. Συντμήσεις

CVD: Καρδιαγγειακές παθήσεις, (CVD, Cardiovascular diseases)

EGCG: Επιγαλλοκατεχίνη, (EGCG, Epigallocatechin gallate)

GPx: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, (GPx, Glutathione peroxidase)

GSH: Γλουταθειόνη

GTC: Κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, (GTC, Green tea catechins)

Hb: Αιμοσφαιρίνη, (Hb, Hemoglobin)

Ht: Αιματοκρίτης, (Ht, Hematocrit)

I.p.: Ενδοπεριτοναϊκή, (I.p., Intraperitoneal)

MDA: Μαλονική διαλδεϋδη, (MDA, Malondialdehyde)

RBC: Ερυθρά αιμοσφαίρια, (RBC, Red Blood Cells)

ROS: Ενεργές ρίζες οξυγόνου, (ROS, Reactive Oxygen Species)

SOD: Δισμουτάση του υπεροξειδίου, (SOD, Super oxide dismutase)

TAC: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, (TAC, Total antioxidant capacity)

TAS: Ολική αντιοξειδωτική κατάσταση, (TAS, Total antioxidant status)

TBA: Θειοβαρβουτρικό οξύ, (TBA, Thiobarbituric acid)

TBARS: Δραστικές ουσίες θειοβαρβουτρικού οξέος (TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances)

TNF-a: Παράγοντας νέκρωσης όγκων, (TNF-a, Tumor Necrosis Factor a)

WBC: Λευκά αιμοσφαίρια, (WBC, White Blood Cells)