



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ**  
**ΣΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ**  
**ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΜΙΧΟΣ**  
**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



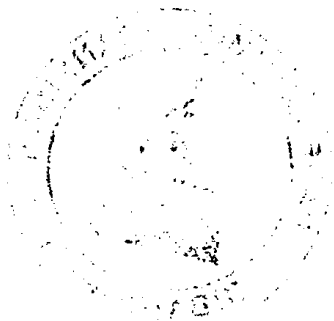
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000304417



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Μίχου Γ. Κωνσταντίνου: 2-11-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 371<sup>α</sup>/22-12-1998

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μάλαμας Μιχάλης Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-12-1998

*«Συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στις λειτουργικές παραμέτρους του καταμηνιαίου κύκλου του θήλεος»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 612<sup>ο</sup>/12-7-2007

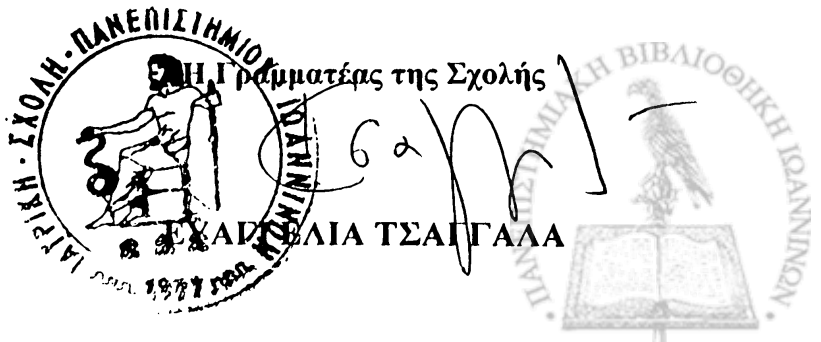
Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσελέπης Αλέξανδρος	Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μάλαμας Μιχάλης	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στέφος Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-9-2007

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε μεταξύ των ετών 1998 και 2006 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

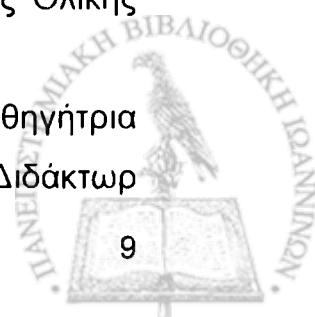
Η μελέτη του αντιοξειδωτικού stress είναι σήμερα ένα από τα πιο επίκαιρα θέματα και αντικείμενα έρευνας καθώς έχει δειχθεί ότι το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία άνω των 100 ασθενειών, όπως επίσης και στην φυσιολογία των λειτουργιών των έμβιων όντων.

Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός και η επίδραση που έχει σ' αυτόν η κυκλική διακύμανση των επιπέδων της οιστραδιόλης όπως επίσης και η συμμετοχή του οξειδωτικού stress στην Φυσιολογία του έμμηνου κύκλου του θήλεος. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δημοσιεύθηκαν σε έγκυρα διεθνή επιστημονικά περιοδικά όπως επίσης και σε διεθνή και πανελλήνια συνέδρια.

Για την επιτυχή και άρτια διεκπεραίωση της διδακτορικής διατριβής συνεργάστηκαν και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και ειδικότερα τον επιβλέποντα Καθηγητή κο Άγγελο Ευαγγέλου για την ανάθεση του θέματος και την καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της διδακτορικής διατριβής καθώς και τους Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κο Δημήτριο Γαλάρη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κο Μιχαήλ Μάλαμα για τις υποδείξεις και την καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Λέκτορα Φυσιολογίας κο Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα για την τεχνική και επιστημονική βοήθεια που μου προσέφερε στις εργαστηριακές μεθόδους της διδακτορικής διατριβής καθώς και τον καθηγητή Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος κο Αλέξανδρο Τσελέπη για την παραχώρηση του εξοπλισμού του εργαστηρίου για τις μετρήσεις της Ολικής Αντιοξειδωτικής Κατάστασης Πλάσματος.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κα Καλφακάκου Βασιλική όπως επίσης και τη Βιολόγο Διδάκτωρ



της Ιατρικής Σχολής κα Μανέ Φωτεινή για την ουσιαστική τους βοήθεια στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων μετάλλων.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας κο Κιόρτση Δημήτριο για την σημαντική του συμβολή στην στατιστική ανάλυση όλων των παραμέτρων (πλην συγκεντρώσεων μετάλλων).

Στην στατιστική ανάλυση των συγκεντρώσεων μετάλλων συνέβαλαν καθοριστικά με τη δημιουργία ειδικού λογισμικού (software) οι στατιστικοί κα Ibrahimovic Maria και ο κος Andersson Johan, διδάκτορες μαθηματικοί του Πανεπιστημίου της Uppsala στην Uppsala της Σουηδίας, αμφότεροι μέλη του τμήματος έρευνας και εξέλιξης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Akademiska, στην Uppsala της Σουηδίας (Akademiska Universitetssjukhus, Uppsala, Forskning och Utvecklings Centrum). Για αυτή τους τη συμβολή θέλω να τους ευχαριστήσω θερμά.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω ολόψυχα τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου Μίχο Γεώργιο και Μίχου Ιωάννα, όπως και στα αδέρφια μου Μίχο Αναστάσιο και Μίχο Ανδρέα για την αμέριστη υλική και ηθική συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	15
2.	ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ, ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ • ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS, ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	17
3.	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ – ΔΕΥΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	29
4.	ΧΑΛΚΟΣ, ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟ- ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ	33
5.	ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	39
6.	ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ	47
7.	ΠΡΟ- ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ	53
8.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ	61
9.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
10.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΗΜΑΣΙΑ	77
11.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
12.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	87
13.	SUMMARY IN ENGLISH	89
14.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
15.	ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	103



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





# 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η διερεύνηση και οι μεταβολές του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του φυσιολογικού ανθρωπίνου θήλεος κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου. Γίνεται προσπάθεια τόσο για την ποιοτική, όσο και για την ποσοτική διερεύνηση των μεταβολών αυτών.

Η υπόθεσή μας, με δεδομένη την ύπαρξη σημαντικών οξειδωτικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα και συμμετέχουν καθοριστικά στην φυσιολογία του καταμήνιου κύκλου και που θα αναλυθούν διεξοδικά παρακάτω, αφορούσε στην ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών και ιδιαιτεροτήτων ειδικά στο θήλυ, προκειμένου για την προστασία του από το οξειδωτικό stress.

Τόσο κατά την εποχή σχεδιασμού της συγκεκριμένης διδακτορικής εργασίας, αλλά και στον παρόντα χρόνο ο καταμήνιος κύκλος της γυναίκας από αντιοξειδωτικής άποψης έχει ελάχιστα διερευνηθεί.

Αντιθέτως υπάρχουν αρκετές μελέτες που διερευνούν και συγκρίνουν διαταραχές και διαφορές στην προ- αντιοξειδωτική ισορροπία ανάμεσα σε ευμηνορροϊκά και δυσμηνορροϊκά ή αμηνορροϊκά θήλεα ή σε θήλεα που λαμβάνουν εξωγενώς οιστρογόνα και προσπαθούν να τις συσχετίσουν με παθολογικές καταστάσεις. Κλινικές καταστάσεις όπως η νόσος του Alzheimer, ή η αθηρωμάτωση με βάση επιδημιολογικά στοιχεία απαντώνται σπάνια σε γυναίκες στην αναπαραγωγική ηλικία και αντίθετα εμφανίζονται αρκετά συχνά σε γυναίκες στην εμμηνόπαυση. Ταυτόχρονα υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την συμμετοχή στην παθοφυσιολογία τους, διαταραχών σε προ- αντιοξειδωτικό επίπεδο. Γίνεται λοιπόν προσπάθεια εύρεσης του συνδετικού κρίκου.

Μελέτες με το παραπάνω αντικείμενο κατέδειξαν σαφή συμμετοχή των οιστρογόνων και ειδικά της οιστραδιόλης στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, κατέληξαν όμως σε μεγάλο βαθμό σε αντικρουόμενα συμπεράσματα και αποτελέσματα. Οι μελέτες αυτές απέδιδαν στα οιστρογόνα τον κυρίαρχο ρόλο στις παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και στις υπόλοιπες.

Το πρόβλημα στο σχεδιασμό των μελετών αυτών κατά την άποψή μας είναι ότι χρησιμοποιούσαν ως πληθυσμό αναφοράς για τις παθολογικές καταστάσεις που διερευνούσαν, γυναίκες με φυσιολογικό καταμήνιο κύκλο χωρίς να υπολογίζουν σε ποια φάση του κύκλου οι γυναίκες αυτές βρισκόταν. Αυτό πιθανά ήταν το λάθος στο σχεδιασμό, εφόσον κατά τον έμμηνο κύκλο υπάρχει διακύμανση στα επίπεδα οιστρογόνων και θεωρητικά ήταν πιθανή και η διακύμανση της αντιοξειδωτικής κατάστασης των γυναικών αυτών. Ελάμβαναν λοιπόν ως πληθυσμό αναφοράς έναν ετερόκλητο πληθυσμό αφού οι μετρήσεις δεν γίνονταν στην ίδια φάση του κύκλου και ενδεχόμενα αυτό να οδήγησε στα αντιφατικά συμπεράσματα.

Η ύπαρξη λοιπόν οξειδωτικών φαινομένων που συμμετέχουν και είναι απαραίτητα για την φυσιολογία του έμμηνου κύκλου, όπως και η δεδομένη αντιοξειδωτική ικανότητα των οιστρογόνων και διακύμανσή τους κατά τον κύκλο σε συνδυασμό με την έλλειψη άλλων μελετών πάνω σε αυτό το αντικείμενο μας οδήγησαν στην απόφαση για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Για το σκοπό αυτό και για λόγους που θα εξηγήσουμε εκτενέστερα στη συνέχεια, επιλέξαμε να ερευνήσουμε πιθανές διακυμάνσεις κάποιων βιοχημικών παραμέτρων που κατά τη γνώμη μας θα αντανάκλασαν αντικειμενικά τη διακύμανση στην προ- αντιοξειδωτική ισορροπία κατά τη διάρκεια του κύκλου. Οι παράμετροι αυτοί κύρια ήταν εκτός από φυσικά η οιστραδιόλη ( $E_2$ ), το Ασκορβικό οξύ (AA), το Δευδροασκορβικό οξύ (DHAA), το λόγο αυτών των δύο (AA/DHAA), την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος (TAPS) όπως επίσης και τα μέταλλα χαλκό (Cu) και ψευδάργυρο (Zn). Ταυτόχρονα μελετήσαμε και άλλες βιοχημικές παραμέτρους όπως το λιπιδαιμικό προφίλ, το ουρικό οξύ, τις θυρεοειδικές ορμόνες κα.



## 2. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ, ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS, ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ, ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Όλα τα κύτταρα που ζουν σε αερόβιες συνθήκες είναι αναγκασμένα να υφίστανται και να αντιμετωπίζουν το λεγόμενο παράδοξο του οξυγόνου: ενώ το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ζωής ταυτόχρονα οι μεταβολίτες του όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να τροποποιήσουν κυτταρικές λειτουργίες και να βάλουν σε κίνδυνο την επιβίωση του κυττάρου.

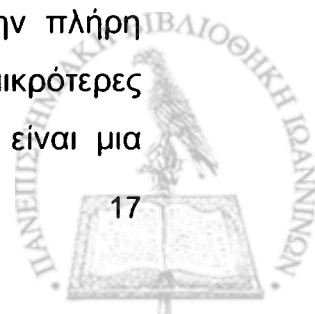
Οι σχετικοί όροι όπως οξειδωτικό stress, οξειδωτικές βλάβες, ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά έχουν πλέον ενσωματωθεί στην κοινή επιστημονική ορολογία.

Ενώ οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστές από τις αρχές του αιώνα, μόλις το 1954 (1) προτάθηκε η πιθανή εμπλοκή τους και ο σημαντικός τους ρόλος στα βιολογικά συστήματα και η ενδεχόμενη βλαπτική τους επίδραση στα κύτταρα. Αμέσως μετά, το 1956 (2) όταν και προτάθηκε η πιθανή συμμετοχή τους στις διαδικασίες γήρανσης, ήταν που η επιστημονική κοινότητα έστρεψε το ενδιαφέρον της και άρχισε να ασχολείται εντατικά μ' αυτές. Σήμερα θεωρούνται βασικοί συμμετοχοί σε διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, σε φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Ένα σημαντικό βήμα στο πεδίο των ερευνών έγινε το 1969, όταν ανακαλύφθηκε ο ρόλος της πρωτεΐνης αιμοκουπρίνης στην δέσμευση των ριζών υπεροξειδίου και η ύπαρξη του ενζύμου της υπεροξειδίου-δισμουτάσης (SOD) σε σχεδόν όλα τα κύτταρα (3).

Για την τοξικότητα του  $O_2$  ευθύνεται κυρίως η ικανότητά του να οξειδώνει ζωτικά κυτταρικά συστατικά, καταστρέφοντάς τα.

Με την εμφάνιση του  $O_2$  στην ατμόσφαιρα, οι οργανισμοί είχαν τρεις επιλογές: να εξαφανιστούν, να περιοριστούν σε αναερόβια περιβάλλοντα ή να αναπτύξουν με το χρόνο εξελιγμένα αντιοξειδωτικά συστήματα.

Στον άνθρωπο, τα περισσότερα κύτταρα δεν υφίστανται την πλήρη τοξικότητα του ατμοσφαιρικού  $O_2$ , αλλά έρχονται σε επαφή με πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις  $O_2$  από αυτή της ατμόσφαιρας. Το γεγονός αυτό είναι μια



πρώτη γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας καθώς η μερική πίεση του O<sub>2</sub> πέφτει σταδιακά από 100-110mmHg που είναι στα τριχοειδή του πνεύμονα σε 60-50mmHg στους περιφερικούς ιστούς, για να φτάσει τα 1-10mmHg ενδοκυτάρια, πίεση που είναι αρκετή για να λειτουργήσει η αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια.

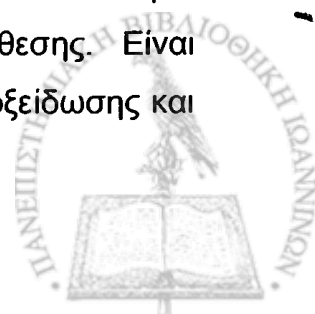
Απ' τις αρχές της δεκαετίας του '80 παρατηρήθηκε ότι σε πληθώρα ετερόκλητων νόσων, από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και το shock ως την κυστική ίνωση, την μυοκαρδιοπάθεια και το AIDS, η ιστική βλάβη συνοδευόταν πάντα από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Σε κάποιες από αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι το αποτέλεσμα του παθοφυσιολογικού μηχανισμού ενώ σε άλλες το αίτιο.

Για να θεωρηθεί ότι στην παθοφυσιολογία κάποιας νόσου εμπλέκονται αιτιολογικά οι ελεύθερες ρίζες θα πρέπει να πληρούνται όλα τα παρακάτω κριτήρια:

1. Να είναι πάντα παρούσες, τοπογραφικά και χρονικά, κάθε φορά που εμφανίζεται η ιστική βλάβη ή εκφράζεται η νόσος.
2. Η χρονική τους εμφάνιση να συμβαδίζει με τη χρονική εξέλιξη της νόσου.
3. Απευθείας έγχυση ή παραγωγή ελευθέρων ριζών σε υγιείς ιστούς, σε συγκέντρωσή τους παρόμοια με την in vivo, να προκαλεί και να αναπαραγάγει όλες ή τις περισσότερες από τις βλάβες που παρατηρούνται στη νόσο.
4. Αφαιρώντας ή αναστέλλοντας το σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας, να έχουμε παράλληλη ελάττωση της ιστικής βλάβης, ανάλογη με την αναστολή της ουσίας. (4)

### Ορισμοί

Στην βιολογία μια αναγωγική ουσία δρα δίνοντας ηλεκτρόνια συνήθως με την μορφή δωρεάς υδρογόνου ή λήψης οξυγόνου. Το αντίθετο γίνεται με μια οξειδωτική ουσία που ή παίρνει υδρογόνο ή χάνει οξυγόνο. Οι αντιδράσεις αυτές προϋποθέτουν η μια την άλλη και γι' αυτό απαντώνται πάντα σε ζεύγη και ονομάζονται οξειδοαναγωγές. Στις οξειδοαναγωγές βασίζονται άπειροι βιοχημικοί καταρράκτες της κυτταρικής χημείας και βιοσύνθεσης. Είναι απαραίτητες για την κατανόηση του φαινομένου της βιολογικής οξειδωσης και των αντιδράσεων ανάμεσα σε ρίζες και αντιοξειδωτικά.



Στην ουσία, αν και κάπως αυθαίρετα, οι έννοιες οξειδωτικό – αναγωγικό σώμα είναι χημικοί όροι, που όταν αφορούν σε βιολογικά περιβάλλοντα, λέγονται προοξειδωτικά – αντιοξειδωτικά αντίστοιχα (5).

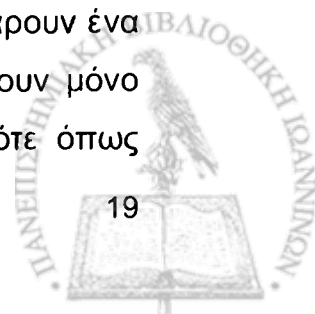
Ελεύθερη ρίζα: Στα άτομα και στα μόρια τα ηλεκτρόνια περιφέρονται γύρω από τους πυρήνες σε χώρους που ονομάζονται *τροχιακά*. Κάθε τροχιακό έχει τη δυνατότητα να συγκρατεί από 1 ως 2 το πολύ ηλεκτρόνια. Εκτός απ' την περιστροφή τους γύρω από τον πυρήνα, τα ηλεκτρόνια περιστρέφονται και γύρω από τον εαυτό τους. Η κίνηση αυτή εκφράζεται με το spin το οποίο παίρνει πάντα μόνο δύο τιμές:  $\pm 1/2$ .

Δύο ηλεκτρόνια που έχουν ίδιο spin λέγονται παράλληλα, ενώ δύο με αντίθετο spin αντιπαράλληλα. Όταν τα ηλεκτρόνια βρίσκονται ανά ζεύγη στα τροχιακά (συζευγμένα) έχουν πάντα αντιπαράλληλα spin και κάθε τροχιακό που έχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο (ασύζευκτο) στο τροχιακό του, μπορεί να δεχτεί μόνο αντιπαράλληλο ηλεκτρόνιο.

*Κάθε στοιχείο που έχει τη δυνατότητα για ανεξάρτητη ύπαρξη, έχοντας σε ένα ή περισσότερα τροχιακά του ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ονομάζεται ελεύθερη ρίζα.* Η κατάσταση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής και στο βιοπεριβάλλον, η ελεύθερη ρίζα ταχύτατα αποδίδει η προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από κάποιο άλλο μόριο. Το φαινόμενο αυτό, πολύ μικρής διάρκειας, κάνει τις ελεύθερες ρίζες πολύ δραστικά μόρια, επιτρέποντάς τους να αντιδράσουν ταχύτατα με βιομόρια, ενεργοποιώντας συχνά μ' αυτόν τον τρόπο αλυσιδωτές αντιδράσεις και τροποποιώντας την δομή και την λειτουργία των βιομορίων με επακόλουθο την εμφάνιση παθολογίας.

Η ταχύτητα με την οποία αντιδρούν οι ελεύθερες ρίζες με άλλα μόρια είναι μία πρώτη δυσκολία στον εντοπισμό τους και στην μέτρησή τους. Συχνά εντοπίζονται μόνο από τα αποτελέσματά τους. Όσο πιο δραστική είναι μια ελεύθερη ρίζα τόσο πιο πολύ αντιδρά και τόσο πιο τοξική είναι για το περιβάλλον της.

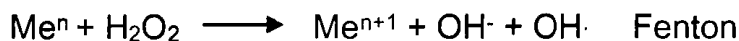
Οι ελεύθερες ρίζες συμβολίζονται με μια τελεία στον εκθέτη, όπως πχ.  $OH \cdot$ . Μπορούν να προκύψουν από μη ρίζες εάν αυτές χάσουν ή πάρουν ένα ηλεκτρόνιο. Τα περισσότερα βιολογικά μόρια είναι μη ρίζες και έχουν μόνο συζευγμένα ηλεκτρόνια. Αν έρθουν σε επαφή με ελεύθερη ρίζα τότε όπως



περιγράψαμε παραπάνω, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, ενδέχεται να εμφανιστούν αλυσιδωτές αντιδράσεις όπου η ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνεται από το βιολογικό μόριο που δίνει ή παίρνει ένα ηλεκτρόνιο. Με τον τρόπο αυτό όμως το βιολογικό μόριο ενδέχεται να μετατραπεί σε ελεύθερη ρίζα και να αντιδράσει με τη σειρά του με μια μη ρίζα και ούτω καθ' εξής.

Ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά την διάρκεια πολλών βιολογικών διεργασιών και η παρουσία τους μπορεί να είναι μέρος φυσιολογικού μηχανισμού δράσης (μπορεί να είναι δηλαδή ωφέλιμες, πχ στην άμυνα ενός οργανισμού). Όταν όμως παράγονται ως παράπλευρο προϊόν σε περίσσεια προκαλούν σημαντικές μοριακές, κυτταρικές ή ιστικές βλάβες.

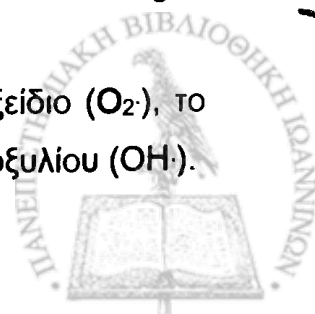
Ένας σημαντικός τρόπος παραγωγής τους είναι με την παρουσία μετάλλων σύμφωνα με την αντίδραση Haber-Weiss. Κατ' αυτήν, παρουσία ελάχιστης ποσότητας ενός ατόμου μετάλλου ως καταλύτη (Fe ή Cu) που προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο  $H_2O_2$ , παράγονται ένα μόριο και μία ρίζα υδροξυλίου. Εν συνεχεία το μέταλλο αποδίδει το ηλεκτρόνιο που προσέλαβε σε ένα ανιόν σουπεροξειδίου του  $O_2$  και είναι έτοιμο να συνεχίσει την αντίδραση:



Η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει είτε αν μια ρίζα συμπληρώσει ή αποβάλλει το ηλεκτρόνιό της σε μια άλλη ρίζα, πράγμα απίθανο λόγω χαμηλής τους συγκέντρωσης και μικρής διάρκειας ζωής, είτε αν αντιδράσει με μια μη ρίζα όπως περιγράψαμε πιο πάνω.

Δραστικά σώματα: Ο όρος *δραστικά σώματα  $O_2$*  (Reactive Oxygen Species, ROS) εμπεριέχει όλες τις ελεύθερες ρίζες που έχουν για κεντρικό άτομο το  $O_2$  καθώς και μερικές μη ρίζες που όμως εύκολα μετατρέπονται σε ρίζες. Αντιστοίχως υπάρχει και ο όρος *δραστικά σώματα  $N_2$*  (Reactive Nitrogen Species, RNS).

Οι τρεις κύριοι εκπρόσωποι των ROS είναι το σουπεροξειδίο ( $O_2^{\cdot-}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ).



Οι κύριοι εκπρόσωποι των RNS είναι το οξειδίο του αζώτου (NO) και το διοξειδίο του αζώτου (NO<sub>2</sub>). Το οξειδίο του αζώτου παράγεται κατά την ενζυμική μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κίτρουλίνης από το ένζυμο συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (NOS).

Το NO έχοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αποτελεί μια πολύ δραστική ελεύθερη ρίζα με ικανότητα να βλάπτει πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες, νουκλεοτίδια και λιπίδια και σε συνέργεια με άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες προκαλεί κυτταρική και ιστική βλάβη, άσηπτη φλεγμονή και συμφύσεις. Έχει την ιδιότητα να προκαλεί έντονη αγγειοδιαστολή σε αρτηριακό και φλεβικό επίπεδο χαλαρώνοντας τις λείες μυϊκές ίνες του τοιχώματος των αγγείων και σε μικρότερο βαθμό προκαλεί αναστολή στην συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Οι τελευταίες αυτές δυνατότητες έχουν εγείρει σειρά μελετών για ενδεχόμενη θεραπευτική αξιοποίηση. Όπως και οι υπόλοιπες ρίζες, ενώ σε μικρό βαθμό οι RNS έχουν φυσιολογική σημασία η περίσσειά τους είναι παθολογική.

Υπάρχουν τρία διαφορετικά ισοένζυμα NOS: η *ενδοθηλιακή (e)*, η *νευρωνική (n)* και η *επαγωγίμη (i)*. Η nNOS και η eNOS είναι μόνιμα ένζυμα και ευθύνονται για την βασική παραγωγή του NO, ενώ η iNOS απαντάται στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα και παράγει μεγάλες ποσότητες NO ως απάντηση σε κυτταροκίνες (όπως η ιντερλευκίνη και ο TNF) και σε λιποπολυσακχαρίτες. Η eNOS εκφράζεται στα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης των ωοθηκών και στην επιφάνεια του ωοκυττάρου κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

Οξειδωτικό Stress: Ο όρος αποδίδεται στο Sies που τον εισήγαγε το 1985 και υπονοεί σοβαρή διαταραχή στην ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ROS/RNS και στην αντιοξειδωτική άμυνα. Ορίζεται ως *κάθε διαταραχή στην προοξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία προς όφελος της πρώτης, που δυνητικά οδηγεί σε βλάβη.*

Στην πράξη το οξειδωτικό stress προκαλείται:

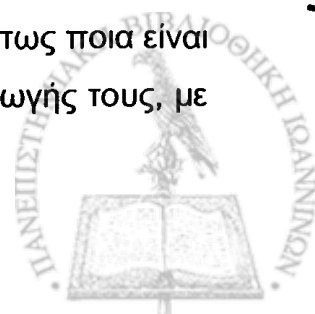
1. Από μείωση των αντιοξειδωτικών μέσων (πχ ελαττωματική παραγωγή κάποιου αντιοξειδωτικού ενζύμου, μειωμένη διαιτητική πρόσληψη)
2. Από αυξημένη παραγωγή ROS/RNS (πχ έκθεση σε αυξημένη  $pO_2$ , παραγωγή από τοξίνες, κτλ)

Το οξειδωτικό stress μπορεί να προκαλέσει:

1. *Προσαρμογή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.* Η προσαρμογή μπορεί να είναι τέτοια ώστε να υπάρχει πλήρης προστασία, μερική προστασία ή υπερπροστασία. Παράδειγμα υπερπροστασίας αποτελεί το ισχαιμικό preconditioning στο μυοκάρδιο.
2. *Ιστική βλάβη.* Πρακτικά όλα τα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) αποτελούν στόχο των ελευθέρων ριζών.
3. *Κυτταρικό θάνατο.* Μπορεί να προκληθεί ουσιαστικά με δύο μηχανισμούς. Είτε με νέκρωση όπου το κύτταρο διογκώνεται, ρήγνεται και ελεύθερες ρίζες διαχέονται στο περιβάλλον με αποτέλεσμα τη διάχυση της βλάβης, είτε με απόπτωση όπου ενεργοποιείται ο μηχανισμός «αυτοκτονίας» του κυττάρου, κατά κανόνα χωρίς ρήξη της μεμβράνης. Η παθοφυσιολογία πολλών από τα εκφυλιστικά νοσήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος όπως η νόσος του Alzheimer, αποδίδεται σε αυξημένο ρυθμό απόπτωσης νευρικών κυττάρων λόγω αυξημένου οξειδωτικού stress.

Αντιοξειδωτικά: Σχεδόν κάθε ουσία θεωρητικά μπορεί υπό τις κατάλληλες εργαστηριακές συνθήκες να εμφανίσει αντιοξειδωτικές ικανότητες. Για να βάλουν μια τάξη οι Halliwell και Gutteridge το 1989 όρισαν ως αντιοξειδωτική ουσία, *κάθε ουσία που έχει την ικανότητα, σε πολύ μικρή συγκέντρωση συγκρινόμενη με το προς οξείδωση υπόστρωμα, να καθυστερήσει σημαντικά ή να αναστείλει την οξείδωσή του.* Ως υπόστρωμα προς οξείδωση νοείται κάθε μόριο που απαντάται in vivo.

Όταν παράγονται ROS/RNS σε ένα οργανισμό, το ποια ουσία θα δράσει ως αντιοξειδωτικό εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως ποια είναι τα ROS/RNS που παρήχθησαν, τον τρόπο και τον τόπο παραγωγής τους, με βάση ποιο μόριο – στόχο ορίζουμε την οξειδωτική βλάβη κτλ.





Οι γνωστοί μηχανισμοί με τους οποίους αντιοξειδωτικά μόρια δρουν προστατευτικά είναι οι εξής:

1. κατάλυση αντιδράσεων με τις οποίες απομακρύνονται - αδρανοποιούνται τα ROS/RNS. Πρόκειται για τον τρόπο με τον οποίο δρουν κυρίως αντιοξειδωτικά ένζυμα, ή ενζυμικά συστήματα όπως η **υπεροξειδιο-δισμουτάση (SOD)**, **καταλάση (CAT)**, **γλουταθειόν-υπεροξειδάση (GSH-Px)**, άλλες **υπεροξειδάσες** και **θειολ-ειδικά ένζυμα**.

2. ελάττωση της βιοδιαθεσιμότητας των προοξειδωτικών στους ιστούς. Έτσι δρουν κυρίως πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα όπως τα ιόντα σιδήρου, χαλκού κτλ. Παραδείγματα αποτελούν οι **τρανσφερίνες**, **απποσφαιρίνες**, **μεταλλοθειονίνες** κτλ. Σ' αυτήν την κατηγορία υπάγονται και πρωτεΐνες που οξειδώνουν το δισθενή σίδηρο όπως η **σερρουλοπλασμίνη**.

3. προστασία των βιομορίων από βλαπτικά αίτια (συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού stress) με άλλους εναλλακτικούς μηχανισμούς. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ουσίες όπως οι **heat shock proteins** κτλ.

4. «καθαρίζοντας», εξουδετερώνοντας τα ROS/RNS αντιδρώντας μαζί τους. Μ' αυτόν τον τρόπο δρουν μικρομοριακές ενώσεις όπως η **γλουταθειόνη**, η **ατοκοφερόλη**, η **χολερυθρίνη**, το **ουρικό οξύ**, το **ασκορβικό οξύ**, ο **ψευδάργυρος**, τα **καροτένια** κτλ.

Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται καθώς και η σύνθεση του διαφέρει από ιστό σε ιστό, από είδος κυττάρου σε είδος κυττάρου, ακόμη και από κύτταρο σε κύτταρο του ίδιου ιστού. Επίσης λόγω διαφορετικής σύνθεσης διαφέρει στον εξωκυττάριο από τον ενδοκυττάριο χώρο. Για παράδειγμα στο εξωκυττάριο υγρό σχεδόν δεν ανιχνεύεται ενζυμική δράση CAT, SOD, GPX και εδώ φαίνεται την κύρια αντιοξειδωτική προστασία να αναλαμβάνουν ουσίες που δεσμεύουν μέταλλα και οι μικρομοριακές ενώσεις που προαναφέραμε (4,6).

## Ωφέλιμες δράσεις των ROS/RNS, λόγοι αποτυχίας αντιοξειδωτικών θεραπειών, το ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΠΑΡΑΔΟΞΟ

Παρόλο που ακούγεται παράδοξο, ενώ το οξειδωτικό stress εμπλέκεται σε σειρά παθολογικών διεργασιών εμπλέκεται εξίσου και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών για την εξέλιξη και την ανάπτυξη του κυττάρου (7). Τα ROS και RNS παίζουν σημαντικό ρόλο για παράδειγμα στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (8), στην κυτταρική ανάπτυξη (9), στην ρύθμιση και τροποποίηση χημικών αντιδράσεων στο κύτταρο (10), στην άμυνα κατά των μικροβίων (11), στην ρύθμιση της αγγειοδιαστολής (NO) (12), στην ανάπτυξη του εμβρύου (13) και πολλά άλλα. Ο ρόλος τους ειδικά στην διατήρηση φυσιολογικής αναπαραγωγικής ικανότητας είναι καίριος και θα συζητηθεί στη συνέχεια.

Τα ROS/RNS έχουν όπως αναφέραμε ελάχιστο χρόνο ημίσειας ζωής. Για να παράσχει ένα αντιοξειδωτικό προστασία, θα πρέπει να είναι συνεχώς παρόν, πριν γίνει η βλάβη, σε υψηλές συγκεντρώσεις στην εκτεθειμένη περιοχή. Είναι αδύνατο να γίνει παροχή επαρκούς προστασίας αναδρομικά, αφού δηλαδή το μόριο-στόχος εκτεθεί σε stress. Ακόμη και προσωρινή άρση της προστασίας ενδέχεται να δώσει το χρόνο στη ρίζα να δράσει. Από την άλλη, ένα overload του κυττάρου με αντιοξειδωτικά μπορεί να εξουδετερώσει υπερβολικά τα ROS/RNS, αναστέλλοντας έτσι βασικούς βιοχημικούς καταρράκτες, απαραίτητους για το κύτταρο. Η υπερφόρτωση του κυττάρου με αντιοξειδωτικά μπορεί να οδηγήσει τελικά σε αντίθετα αποτελέσματα και σε αντιοξειδωτικό (αναγωγικό) stress.

Με βάση αυτή τη γνώση, γίνεται κατανοητό γιατί διάφορες προσπάθειες για θεραπεία με αντιοξειδωτικά στέφονται συχνά με αποτυχία, ή ακόμη χειρότερα, επιδεινώνουν προϋπάρχουσες νόσους. Πρόκειται για πολύ λεπτές και πολυπαραγοντικές ισορροπίες του κυττάρου. Τέτοιες αποτυχίες παρουσιάστηκαν στις μελέτες CHAOS και στη μελέτη πρόληψης του καρκίνου με β-καροτένια (14,15).



## Μέθοδοι μέτρησης του οξειδωτικού stress

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η διάρκεια ζωής των ελευθέρων ριζών είναι απειροελάχιστη γιατί τάχιστα αντιδρούν ή εξουδετερώνονται από άλλα μόρια. Το γεγονός αυτό καθιστά εξαιρετικά δύσκολο, τόσο την μέτρησή τους, όσο και την μέτρηση και εκτίμηση του οξειδωτικού stress που προκαλούν. Αυτό είναι ακόμη πιο δύσκολο να εκτιμηθεί *in vivo*.

• Η μοναδική τεχνική με την οποία είναι δυνατό να ανιχνευθούν άμεσα οι ελεύθερες ρίζες είναι ο *συντονισμός των ηλεκτρονικών spin (electron spin resonance - ESR)*, συχνά αποκαλούμενος και *παραμαγνητικός συντονισμός (electron paramagnetic resonance - EPR)*. Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται ακριβής προσδιορισμός των ασύζευκτων ηλεκτρονίων.

Ως γνωστό τα ηλεκτρόνια μπορούν να πάρουν μόνο τιμές spin  $+1/2$  ή  $-1/2$ . Αν εκτεθούν σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο τότε προσανατολίζονται με βάση το spin τους σε προσανατολισμό ελάχιστης ενεργειακής κατάστασης. Αν ακτινοβοληθούν με κατάλληλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ένα μέρος θα απορροφηθεί για να προσανατολιστούν στο επίπεδο υψηλής ενεργειακής κατάστασης. Η διαφορά που προκύπτει στην ακτινοβολία, αντιστοιχεί στον αριθμό ηλεκτρονίων που την απορρόφησαν. Δυστυχώς σε ζώντες οργανισμούς η μέθοδος είναι μη ακριβής για την ανίχνευση ριζών όπως του υδροξυλίου ή του οξυγόνου και είναι κατάλληλη μόνο για λιγότερο δραστικές ρίζες όπως του ασκορβικού.

Μια τροποποίηση της μεθόδου είναι το *trapping*. Κατά αυτήν την τεχνική η ελεύθερη ρίζα αντιδρά με κάποιο μόριο «παγίδα» για να δημιουργηθεί ένα ή περισσότερα σταθερά προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια μετρούνται. Παραλλαγή αυτής της μεθόδου είναι το *spin trapping*. Είναι αποτελεσματική για μετρήσεις *in vitro* αλλά η χρησιμότητά της *in vivo* είναι περιορισμένη. Ένας απ' τους περιοριστικούς παράγοντες της μεθόδου είναι ότι τα μόρια παγίδες αλληλεπιδρούν στο υπό μελέτη σύστημα καθώς τα περισσότερα δρουν ως αντιοξειδωτικά. Μάλιστα για μερικά από αυτά τα μόρια διερευνάται η πιθανή κλινική αξιοποίησή τους ως αντιοξειδωτικά.

Μια εναλλακτική του trapping είναι το *finger- ή footprinting*. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι η μέτρηση των προϊόντων που προκύπτουν απ' τη βλαπτική επίδραση των ROS/RNS, στην ουσία δηλαδή ο έμμεσος



προσδιορισμός των ριζών από τη βλάβη που αυτές προκαλούν. Ο περιορισμός είναι ότι οι προς μέτρηση markers θα πρέπει να είναι ειδικοί για τις ρίζες και για το είδος της βλάβης και του οργάνου-στόχου, να μην απαντώνται δηλαδή τυχαία ή στα πλαίσια του φυσιολογικού μεταβολισμού.

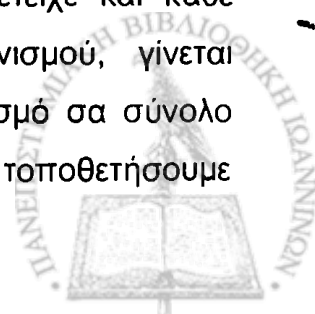
Ένας τέτοιος δείκτης είναι το ασκορβικό οξύ και η ρίζα του. Το ασκορβικό οξύ δρα αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες. Αρχικά μετατρέπεται σε ρίζα ασκορβικού η οποία είναι σχετικά σταθερή και μπορεί να μετρηθεί εύκολα σε βιολογικά συστήματα με ESR. Γι' αυτό το λόγο συχνά χρησιμοποιείται ως βιολογικός δείκτης οξειδωτικού stress σε βιολογικά υγρά και σε όργανα σε μοντέλα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Μειονέκτημα εδώ είναι ότι τα επίπεδα της ασκορβικής ρίζας, πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο οξειδωτικού stress δεν αντιστοιχούν γραμμικά στο οξειδωτικό stress, γιατί το ασκορβικό ανακυκλώνεται σύμφωνα με την αντίδραση:



Μειονέκτημα όλων των πιο πάνω μεθόδων in vivo είναι ότι η αυξημένη παραγωγή ROS/RNS προκαλεί «ξέπλυμα» από τον οργανισμό μιας ή περισσότερων αντιοξειδωτικών ουσιών. Η ανίχνευση της μείωσης αυτής δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ταυτόχρονα έχουν συμβεί και οξειδωτικές βλάβες. Θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής άμυνας του οργανισμού που όμως εξουδετέρωσε επιτυχώς και επαρκώς το stress χωρίς τη δημιουργία βλάβης. Σ' αυτήν την περίπτωση ενδεχομένως δε θα σχηματιστούν και δεν θα είναι παρούσες οι αναμενόμενες fingerprinting ουσίες.

Τέλος, είδαμε ότι για την εξουδετέρωση οξειδωτικού stress, ανάλογα με το είδος του stress, το όργανο στόχο και τις καταστάσεις που επικρατούν, υπάρχουν διαθέσιμα διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια ή συστήματα, που μάλιστα μπορεί να εμπλέκονται ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό, μια άλλη προσέγγιση του προβλήματος της μέτρησης του οξειδωτικού stress είναι οι μέθοδοι *ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης πλάσματος*.

Με τις μεθόδους αυτές, αντί να εισέλθουμε στη διαδικασία να αναγνωρίσουμε και να μετρήσουμε κάθε ουσία που συμμετείχε και κάθε πιθανό παράγοντα του σύνθετου αντιοξειδωτικού μηχανισμού, γίνεται προσπάθεια να μετρήσουμε όλον τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό σε σύνολο χωρίς να ενδιαφερόμαστε για τα επιμέρους. Θεωρητικά εάν τοποθετήσουμε



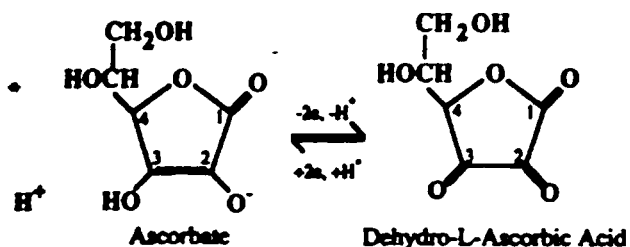
ποσότητα του υλικού του οποίου την οξειδωτική/αντιοξειδωτική κατάσταση θέλουμε να μετρήσουμε, να εξουδετερώσει τιτλοποιημένο οξειδωτικό διάλυμα, μπορούμε να εκφράσουμε την αντιοξειδωτική του ικανότητα ως προς το πόσες μονάδες οξειδωτικού διαλύματος εξουδετέρωσε τελικά.

Πλεονέκτημα των μεθόδων ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης είναι ότι προσφέρουν σφαιρική εικόνα όλων των επιμέρους διαδικασιών που έλαβαν χώρα. Επίσης μπορεί να γίνει σύγκριση του πως μεταβλήθηκαν σε σύνολο οι παράμετροι σε διάφορες κλινικές καταστάσεις. Ακόμη είναι αρκετά ευαίσθητη μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση αλλαγών στην αντιοξειδωτική κατάσταση που εάν κάποιος προσπαθούσε να ανιχνεύσει μελετώντας μόνο κάποιο συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό να μην ήταν ανιχνεύσιμες. Μειονεκτήματα είναι ότι δεν πληροφορούν για τις ακριβείς διαδικασίες που έλαβαν χώρα, ότι η πληροφορία δεν έχει βάθος χρόνου και αφορά τη στιγμή της μέτρησης και ότι εκφράζονται ως μονάδες συγκεκριμένου τιτλοποιημένου διαλύματος, οπότε είναι αδύνατη η σύγκριση μεταξύ τους. Επίσης είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος και οι χρόνοι μέτρησης στο φασματοφωτόμετρο πρέπει να τηρούνται επακριβώς (16).

Γενικά, και από ότι φαίνεται από τα παραπάνω, η ιδανική μέθοδος μέτρησης οξειδωτικού stress και μελέτης της επάρκειας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού δεν υπάρχει.

### 3. ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ – ΔΕΥΔΡΟΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ

Το ασκορβικό οξύ (AA), ή αλλιώς βιταμίνη C, είναι κρυσταλλική ουσία, πολύ υδατοδιαλυτή που παράγεται στα φυτά από τη γλυκόζη. Για τον



άνθρωπο και κάποια από τα θηλαστικά αποτελεί βιταμίνη, λόγω έλλειψης ενός ενζύμου που καθιστά αδύνατη την παραγωγή του, της οξειδάσης

της gulonolactone (17). Απορροφάται από το έντερο με ένα Na<sup>+</sup> - εξαρτώμενο μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς. Η μεταφορά του εντός του κυττάρου γίνεται πάλι με μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς πιθανά με ένα γλυκόζο - εξαρτώμενο μηχανισμό. Στα νεφρά επίσης υπάρχει μηχανισμός ενεργητικής επαναρόφησης. Η περίσσεια AA αποβάλλεται (18).

Είναι απαραίτητο in vivo για τη λειτουργία τουλάχιστον 8 ενζύμων (19). Τα πιο γνωστά είναι η υδροξυλάση της προλίνης και η υδροξυλάση της λυσίνης που εμπλέκονται στην σύνθεση του κολλαγόνου. Επίσης είναι απαραίτητο στην λειτουργία της υδροξυλάσης της ντοπαμίνης, ένζυμο που μετατρέπει την ντοπαμίνη σε νοραδρεναλίνη.

Η συγκέντρωσή του σε διάφορους ιστούς παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

TABLE 1. Ascorbic acid content of adult human tissues\*

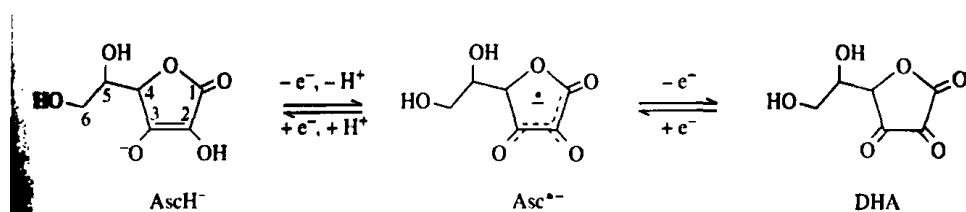
Tissue	Tissue concentration, $\mu\text{mol/l}$	% of total pool	Plasma concentration, $\mu\text{mol/l}$	References
<b>Blood</b>				
Erythrocytes	0.043		0.043	(18)
Platelets	1.9		0.043	(18)
Granulocytes	1.2		0.043	(18)
Leukocytes	3.8		0.043	(18)
<b>Eye</b>				
Aqueous humor	0.9		0.06	(19)
Lens	1.1		0.06	(19)
Vitreous	2.0		0.06	(19)
Adrenal gland	1.9	0.17	0.04	(20)
Brain	0.7	10.3	0.04	(20)
Kidney	0.6	0.8	0.04	(20)
Liver	0.7	8.9	0.04	(20)
Lung	3	0.9	0.04	(20)
Muscle, skeletal	0.1	66.6	0.04	(20)
Pituitary gland	2.5	0.01	0.04	(20)
Thyroid	0.1	0.03	0.04	(20)

\*Values are calculated as though all tissue weight is water; this leads to a minor underestimate of concentration in the case of aqueous humor, a ~40% underestimate for lens, and intermediate values for other tissues (depending on their water content). All values are approximations.



Υψηλές συγκεντρώσεις AA σε σχέση με το πλάσμα (4-5 φορές παραπάνω) παρατηρούνται στο ωοθυλάκιο και στα κοκκιώδη κύτταρα και την πιθανή σημασία αυτού του γεγονότος θα εξηγήσουμε στην συνέχεια (20).

Χημικά το AA έχει σημαντική αναγωγική ικανότητα ως δότης ηλεκτρονίων. Όλες οι γνωστές βιολογικές ικανότητες του AA αποδίδονται στην διάθεση ηλεκτρονίων. Η αντιοξειδωτική του ικανότητα είναι αποδεδειγμένη *in vitro* και βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως πρόσθετο στην βιομηχανία τροφίμων για την αποφυγή οξείδωσης. Δίαιτα πλούσια σε AA έχει συσχετιστεί με μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και καρκίνων. Δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο μετατρέπεται σε ασκορβική ρίζα η οποία στην συνέχεια οξειδώνεται περαιτέρω σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHAA) όπως φαίνεται παρακάτω:



Η ασκορβική ρίζα εμφανίζει μικρή δραστικότητα ως ρίζα και αυτό το γεγονός καθιστά πολύτιμο αντιοξειδωτικό το AA δίνοντάς του την δυνατότητα να απενεργοποιεί άλλες πιο ενεργές ρίζες (21,22).

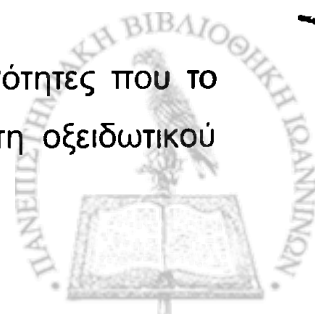
Η ίδια η ρίζα μετατρέπεται ταχύτατα σε AA και DHAA κατά την αντίδραση:



Το DHAA στην συνέχεια με την βοήθεια ενζύμων ανακυκλώνεται εν μέρει σε AA, καταναλώνοντας NADH ή GSH.

Το AA ενδέχεται υπό προϋποθέσεις να δρα ακόμη και προοξειδωτικά. Παρουσία μετάλλων, όπως σιδήρου ή χαλκού, το AA δρα ανάγοντας τα από τρισθενή σε δισθενή παρέχοντας προϋποθέσεις για οξειδωτικό stress. Σε καταστάσεις λοιπόν που χαρακτηρίζονται από υπερφόρτωση μετάλλων (πχ αιμοχρωμάτωση, *v Willis*) η χορήγηση AA ενδέχεται να βλάπτει περισσότερο, απ' ό τι προστατεύει (23).

Στην μελέτη του οξειδωτικού stress έχει μοναδικές ικανότητες που το καθιστούν χρήσιμο τόσο ως αντιοξειδωτικό όσο και ως δείκτη οξειδωτικού



stress. Οι ιδιότητες αυτές είναι εκτός από την αναγωγική του ικανότητα και τη μικρή δραστικότητα της ρίζας του, η παρουσία του σε ικανή συγκέντρωση στους ανθρωπίνους ιστούς και η δυνατότητα ανακύκλωσής του και τέλος η ικανότητά του να αντιδρά με ένα μεγάλο εύρος ελευθέρων ριζών (24).

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να αντιδράσει ως με διάφορους τρόπους και να εξουδετερώσει ένα ευρύ φάσμα προοξειδωτικών που εμπλέκονται στην ανθρώπινη παθολογία (25):

- Αντιδρά με ROS/RNS απευθείας
- Αντιδρά με ουσίες που έχουν δημιουργηθεί από προηγούμενες αντιδράσεις αντιοξειδωτικών με ελεύθερες ρίζες όπως πχ την ρίζα α-τοκοφερόλης ανακυκλώνοντάς την σε α-τοκοφερόλη (26, 27).
- Αντιδρά απευθείας με μεταβατικά μέταλλα (σε αυτή την αντίδραση αναλόγως τη συγκέντρωση του μετάλλου, μπορεί να δρα και ως προοξειδωτικό).

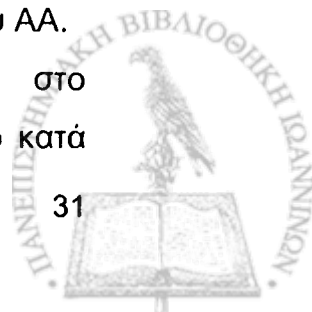
Το AA εμπλέκεται λοιπόν ως αντιοξειδωτικό με πολλούς τρόπους και γι' αυτό ο προσδιορισμός του αποκαλύπτει χρήσιμα στοιχεία για την προ-αντιοξειδωτική ισορροπία.

Η μέτρηση του λόγου AA προς DHAA αποτελεί επίσης ένα χρήσιμο δείκτη στην εκτίμηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Ο λόγος αυτός, υπολογίζεται εύκολα και αποτελεί μια απλή παράμετρο, ενδεικτική τόσο του πρόσφατου οξειδωτικού ιστορικού ενός συστήματος όσο και της επάρκειας του (28).

Οι τρεις κύριες βιολογικές του δράσεις (στη σύνθεση του κολλαγόνου, στην ρύθμιση σύνθεσης και έκκρισης ορμονών, και η αντιοξειδωτική του ικανότητα) φαίνεται να το καθιστούν απαραίτητο για την ομαλή λειτουργία του έμμηνου κύκλου και την γονιμότητα του θήλεος.

Σε μετρήσεις που έγιναν σε ωοθυλάκια που συνελέγησαν κατά την διάρκεια IVF αναδείχθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων του AA στο πλάσμα με την συγκέντρωσή του στα ωοθυλάκια. Υπήρχε μάλιστα μια κλίση συγκέντρωσης προς τα ωοθυλάκια της τάξης του 4,5 προς 1. Επίσης μια άλλη εργασία, συσχετίζει το μέγεθος των ωοθυλακίων με την συγκέντρωση του AA.

Μια επιπρόσθετη ένδειξη της χρησιμότητας του AA στο μικροπεριβάλλον της ωοθήκης εντοπίζεται στην ανάγκη για κολλαγόνο κατά





την διάρκεια του κύκλου. Το κολλαγόνο είναι απαραίτητο τόσο για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, όσο και για την ανάπτυξη και διατήρηση του ωχρού σωματίου (99).



#### 4. ΧΑΛΚΟΣ, ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ.

##### Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ

##### ΠΡΟ - ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ

Μια σημαντική βιολογική λειτουργία των ιόντων μετάλλων είναι η σταθεροποίηση των πρωτεϊνών. Εντυπωσιακή, αναφορικά με την σταθερότητα των μεταλλοπρωτεϊνών ήταν η ανακάλυψη και απομόνωση σε μούμια ηλικίας 2500 ετών, των ενζύμων CuZn-SOD και ALP τα οποία ύστερα από τόσα χρόνια παρέμεναν απολύτως λειτουργικά (29). Τόσο ο Cu όσο και ο Zn, είναι από τα μέταλλα που απαντούν σε μεγάλη σχετικά συγκέντρωση στον ανθρώπινο οργανισμό και συμμετέχουν ενεργά στον μεταβολισμό του O<sub>2</sub> και στην βιοχημεία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Το ένζυμο CuZn-SOD καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του O<sub>2</sub> που παράγεται κατά τον αερόβιο μεταβολισμό σε O<sub>2</sub> και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ο Cu και ο Zn συνδυάζονται στην κυτταρική άμυνα κατά του οξειδωτικού stress με την συμμετοχή και του σεληνίου (Se) (30).

Στην ελεύθερη τους μορφή τα μέταλλα είναι τοξικά για τον οργανισμό. Για τον λόγο αυτό βρίσκονται συνδεδεμένα με πρωτεΐνες. Μέταλλα συνδεδεμένα στενά με πρωτεΐνες είναι σχετικά ασφαλή, ενώ μέταλλα ελεύθερα ή σε χαλαρή σύνδεση με πρωτεΐνες, DNA, λιπίδια και άλλα βιομόρια είναι τοξικά ακόμη και σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις (31).

Ο χαλκός σχεδόν στο σύνολο του στο ανθρώπινο σώμα βρίσκεται συνδεδεμένος με πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του ελεύθερου χαλκού που είναι τοξικός, να είναι πρακτικά μηδέν. Είναι απαραίτητος για ένζυμα όπως η SOD, οι κυτόχρωμο-οξειδάσες, η οξειδάση της λυσίνης, η ντοπαμίνη β-υδροξυλάση και η σερουλοπλασμίνη. Η μέση ημερήσια διαίτα περιέχει περίπου 2 – 3 mg από τα οποία μόνο το μισό περίπου απορροφάται. Το ποσό του χαλκού που απορροφάται και υπερβαίνει τις ανάγκες αποβάλλεται μέσω χολής. Το σώμα του ενήλικα περιέχει περίπου 150 mg από τα οποία 10 – 20 mg βρίσκονται στο ήπαρ. Η μέση συγκέντρωση στο πλάσμα κυμαίνεται ανάμεσα σε 70-150 µg/dL.

Το συνολικό πόσο ψευδαργύρου στο ανθρώπινο σώμα είναι 2 – 3 gr. Από τα 100 μg/dl (15,3 μmol/l) του ολικού ψευδαργύρου στο πλάσμα το 1/3 βρίσκεται συνδεδεμένο χαλαρά με λευκωματίνες και τα 2/3 με σφαιρίνες. Υπάρχουν πάνω από 100 είδη μεταλλοενζύμων που περιέχουν ψευδάργυρο συμπεριλαμβανομένου μεγάλου αριθμού των NADH, RNA- και DNA-πολυμερασών, DNA transcription factors (Zinc fingers), όπως επίσης της αλκαλικής φωσφατάσης, της υπεροξειδιοδισμουτάσης, της καρβονικής ανυδράσης κτλ. Η πρόσληψη με τη δίαιτα είναι περίπου 6-15 mg ημερησίως από τα οποία απορροφάται ένα 20%.

Φαίνεται ότι στο επίπεδο της απορρόφησης υπάρχει ανταγωνισμός για τις θέσεις σύνδεσης στον εντερικό βλεννογόνο μεταξύ Cu και Zn. Αυτό χρησιμοποιείται σε νόσους όπου υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση Cu στο πλάσμα (πχ Willson). Χορήγηση διαίτας πλούσια σε Zn μειώνει την απορρόφηση Cu.

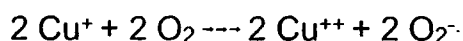
Όλα σχεδόν τα μέταλλα της τετάρτης περιόδου του περιοδικού πίνακα, έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και με την ευρεία έννοια του ορισμού των ελευθέρων ριζών μπορούν να χαρακτηριστούν ως τέτοιες. Εξάιρεση αποτελεί ο Zn.

Ο χαλκός εμφανίζει στα ιόντα του 2 σθένη (Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>++</sup>). Το γεγονός αυτό επιτρέπει στο χαλκό να παίρνει μέρος σε αντιδράσεις στις οποίες δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες. Κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί τόσο να δώσει όσο και να λάβει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο.



## A. ΧΑΛΚΟΣ

Ο Cu συμμετέχει τόσο στην παραγωγή όσο και στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα, μπορεί να δράσει δηλαδή τόσο ως προ- όσο και ως αντιοξειδωτικό. Η αλληλεπίδραση Cu με θειόλες όπως η γλουταθειόνη (GSH) και O<sub>2</sub> οδηγεί στην παραγωγή υπεροξειδίου του O<sub>2</sub> και υπεροξειδίου του υδρογόνου με βάση την αντίδραση:



Από την στιγμή που θα σχηματιστεί ενδοκυττάρια ο Cu<sup>+</sup> υπάρχει η δυνατότητα να αντιδράσει περαιτέρω με υδροξυπεροξειδία για το σχηματισμό αλκοξυλικών και υδροξυλικών ριζών κατά Fenton.



Για την ανωτέρω αντίδραση απαιτούνται συνήθως κυτταρικές συγκεντρώσεις υδροξυπεροξειδίων πάνω από τις φυσιολογικές.

Το γεγονός ότι ο Cu δρα και σαν προοξειδωτικό μπορεί να είναι ο λόγος που οι κυτταρικοί μηχανισμοί άμυνας που αναπτύχθηκαν κατά την εξέλιξη, χρησιμοποιούν εν μέρει αυτό το ιόν. Ο βασικότερος και καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης του χαλκού είναι αυτός μέσω CuZn-SOD που καταλύει την αντίδραση:



Επιπλέον, η άμυνα κατά στρεσογόνων ερεθισμάτων όπως τα ROS/RNS δεν αφορά μόνο στην άμεση αδρανοποίηση τους αλλά και έμμεσα στην επαγωγή μηχανισμών μακροπρόθεσμης προστασίας. Είναι γνωστό ότι ROS όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τα υπεροξειδία του N<sub>2</sub> εκτός από την κυτταρική βλάβη που προκαλούν, ενεργοποιούν βιοχημικούς μηχανισμούς και μόρια που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον κυτταρικό θάνατο και εν μέρει θεωρούνται αντιαποπτωτικοί. Τέτοιοι μηχανισμοί και μόρια είναι οι από μιτογόνο ενεργοποιούμενες πρωτεϊνικές κινάσες (mitogen activated protein kinases – MAPK) και ο καταρράκτης της φωσφοϊνοσιτιδικής-3-κινάσης (P13K/Akt). Πράγματι ενεργοποίηση των ανωτέρω μηχανισμών και ενζύμων από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί αυξημένη αντίσταση των κυττάρων στο οξειδωτικό stress (32-34).

Παρομοίως, τα ιόντα μετάλλων ενεργοποιούν βιοχημικούς μηχανισμούς που είναι γνωστό ότι προστατεύουν το κύτταρο στην έκθεσή του στο



οξειδωτικό stress. Τα ιόντα Cu ενεργοποιούν πολύ έντονα τον αντιαποπτωτικό μηχανισμό της P13K/Akt. Το ίδιο ισχύει σε μικρότερο βαθμό και για τα ιόντα Zn.

Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί ότι η ενεργοποίηση του μηχανισμού από τα ιόντα Cu, είναι ανεξάρτητη από την παραγωγή ή όχι οξειδωτικού stress από τον Cu και μάλιστα εάν τυχόν παραχθούν παράλληλα ελεύθερες ρίζες από τον ελεύθερο Cu τότε η ενεργοποίηση του μηχανισμού προηγείται χρονικά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι όταν εξαιτίας του ελεύθερου Cu αρχίσουν να παράγονται ελεύθερες ρίζες τότε το κύτταρο έχει ήδη προετοιμάσει την άμυνά του (35).

Είναι επίσης γνωστό ότι τα ιόντα μετάλλου όπως του Cu, του Zn και του Cd επάγουν την έκφραση των μεταλλοθειονεϊνών οι οποίες είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα μετάλλου και να αποτοξινώνουν. Αναφορικά με τον Cu, οι πρωτεΐνες αυτές τον δεσμεύουν έτσι ώστε να μην είναι ελεύθερος και να μπορεί να προκαλέσει παραγωγή οξειδωτικού stress (36).

Στα θηλαστικά η ενεργοποίηση της επαγωγής των μεταλλοθειονεϊνών από ιόντα μετάλλων εν μέρει συμβαίνει λόγω ενεργοποίησης του μεταλλοεξαρτώμενου παράγοντα μεταγραφής-1 (metal transcription factor-1, MTF-1) ο οποίος εν συνεχεία συνδέεται με τα στοιχεία απόκρισης στα μέταλλα (metal-responsive elements, MRE) που εντοπίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων (37). Παρότι ο Zn φαίνεται να συνδέεται απευθείας και να ενεργοποιεί τον MTF-1 ο μηχανισμός ενεργοποίησης από Cu παραμένει άγνωστος. Η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι ο Cu ενεργοποιεί τον MTF-1 έμμεσα μέσω του Zn, εκτοπίζοντάς τον από τις μεταλλοθειονεΐνες. Ο ελεύθερος πλέον Zn, συνδέεται και ενεργοποιεί τον μηχανισμό όπως αναφέραμε πιο πάνω (38).



## Β. ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ

Παρόμοια με το Cu, ο Zn συμμετέχει ως συνένζυμο στην CuZn-SOD. Αντίθετα όμως με τον Cu ο Zn είναι οξειδοαναγωγικά αδρανής στα βιολογικά συστήματα. Επίσης, με την ευρύτερη έννοια του ορισμού των αντιοξειδωτικών είναι προφανές ότι εφόσον είναι αδρανής δεν μπορεί να χαρακτηριστεί άμεσα τουλάχιστον αντιοξειδωτικό.

Εντούτοις, υπάρχουν πολλές μελέτες που παρέχουν ενδείξεις αν όχι αποδείξεις ότι έχει ενεργό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου. Φαίνεται ότι αυτό επιτυγχάνεται με έμμεσους τρόπους.

Ο Zn έχει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες σε καταστάσεις οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου καθώς φαίνεται να μειώνει το από τις κατεχολαμίνες προκαλούμενο ισχαιμικό τραύμα και τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης (39,40). Επίσης στα νεφρά αυξάνει την μεθισχαιμική τους λειτουργία, μειώνει το μεθισχαιμικό τραύμα στο λεπτό έντερο και μειώνει το μέγεθος του εμφράκτου και του εγκεφαλικού οιδήματος μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (41, 42, 43).

Ο ρόλος του, στην CuZn-SOD δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του δράση αλλά φαίνεται ότι σταθεροποιεί το μόριο.

Όπως και ο Cu, συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό με, 1<sup>ον</sup> την ενεργοποίηση της MTF-1 εξαρτώμενης μεταγραφής των μεταλλοθειονεϊνών (40, 41), 2<sup>ον</sup> την ενεργοποίηση καταρακτών απάντησης στο οξειδωτικό stress όπως η MAPK και η P13K/Akt (35, 44, 45) και 3<sup>ον</sup> με την σύνδεση του με θειόλες και την επακόλουθη σταθεροποίησή τους (46). Έκθεση των πρωτεϊνών αυτών (θειολών) σε οξειδωτικά μέσα ικανής συγκέντρωσης να τις οξειδώσουν προκαλεί την έκλυση Zn και την επακόλουθη προστασία τους (47). Οι παραπάνω μηχανισμοί φαίνεται να ανήκουν σε ένα σχετικά χρόνιο τρόπο προστασίας από το οξειδωτικό stress.

Φαίνεται όμως ότι και οξέως συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα. Τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα όπως είδαμε νωρίτερα μπορούν εν δυνάμει να αποτελέσουν πηγή ελευθέρων ριζών και με τον τρόπο αυτό να προκαλέσουν οξειδωτικό stress. Παραδείγματα των πιο συχνά εμπλεκόμενων είναι ο Cu και ο Fe. Για να προστατευτεί το κύτταρο από τα βαρέα αυτά μέταλλα υπάρχουν δύο τρόποι: η μέθοδος «pull - έλκω» και η μέθοδος «push - ωθώ». Το πρώτο



το πετυχαίνουμε δεσμεύοντας το μέταλλο με διάφορους χηλικούς παράγοντες (πχ δεσφεριοξαμίνη), ενώ το δεύτερο διώχνοντάς το εκτός της θέσης του με ένα άλλο πιο αδρανές μέταλλο που το αντικαθιστά όπως είναι ο Ζη. Με αυτόν τον τρόπο, τον ανταγωνισμό δηλαδή, προκειμένου για θέσεις σύνδεσης με άλλα βαρέα μέταλλα και τον εκτοπισμό τους επιτυγχάνεται έμμεσα η προστασία του κυττάρου (48, 49).

Συνοψίζοντας: ο Ζη ασκεί έμμεσα αντιοξειδωτική προστασία καθώς σταθεροποιεί σημαντικά ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, επάγει άλλα, και τέλος ανταγωνίζεται και εκτοπίζει από τις θέσεις σύνδεσης στο κύτταρο άλλα τοξικά βαρέα μέταλλα.



## 5. ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

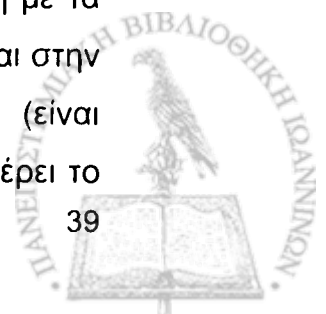
Η κύρια θέση παραγωγής των οιστρογόνων όπως είναι γνωστό είναι οι ωοθήκες και τα επινεφρίδια. Μικροποσότητες παράγονται όμως και σε άλλα σημεία του ανθρωπίνου σώματος από αρωματοποίηση των ανδρογόνων. Το κυρίαρχο και πιο δραστικό οιστρογόνο είναι η οιστραδιόλη ( $E_2$ ), αλλά κυκλοφορούν επίσης ελάχιστες ποσότητες οιστριόλης ( $E_3$ ) και οιστριόνης ( $E_1$ ). Τα οιστρογόνα σε ένα ποσοστό 60% κυκλοφορούν στο αίμα συνδεδεμένα με πρωτεΐνες και με τον τρόπο αυτό μεταφέρονται στα όργανα στόχους. Τα οιστρογόνα είναι λιπόφιλα μόρια, χαμηλού σχετικά μοριακού βάρους, γεγονός που τους επιτρέπει να διαχέονται εύκολα και να περνούν ακόμη και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό και τεκμηριωμένο ότι τα οιστρογόνα διαθέτουν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Παρά τις πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για την αντιοξειδωτική τους δράση, ο μηχανισμός με τον οποίο εξασκούν αυτή τους τη δράση δεν είναι πλήρως σαφής.

Οι αρχικές ενδείξεις για την αντιοξειδωτική ικανότητά των οιστρογόνων τέθηκαν από μια σειρά επιδημιολογικών και κλινικών μελετών οι οποίες συσχέτιζαν θετικά την απουσία ή τα μειωμένα επίπεδα οιστρογόνων με κλινικές καταστάσεις στις οποίες ο ρόλος του οξειδωτικού stress ως ενοχοποιητικού παράγοντα είχε ήδη αποδειχθεί. Άλλη σημαντική ένδειξη ήταν η ύπαρξη διαφορών στην επιδημιολογία της εκδήλωσης διαφόρων εκφυλιστικών νόσων ανάμεσα στα δυο φύλα.

Τέτοιες παρατηρήσεις ξεκίνησαν καταρχάς από μελέτες που ασχολούνταν είτε με εκφυλιστικά νευρολογικά νοσήματα, είτε με αθηρωματικές αλλοιώσεις. Περίπου από το 1995 μελέτες έδειχναν ότι τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων αποτελούν προδιαθεσικό και επιβαρυντικό παράγοντα για την εκδήλωση ασθενειών όπως το Alzheimer, το Parkinson και άλλα εκφυλιστικά νευρολογικά νοσήματα.

Το μόριο των οιστρογόνων και των αναλόγων τους, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φυσικά στεροειδή έχουν δομή φαινόλης γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας στη θέση του  $C_3$  στον δακτύλιο A (είναι υδρόφοβα φαινολικά σύμπλοκα). Αυτή τους η ιδιομορφία, τους προσφέρει το



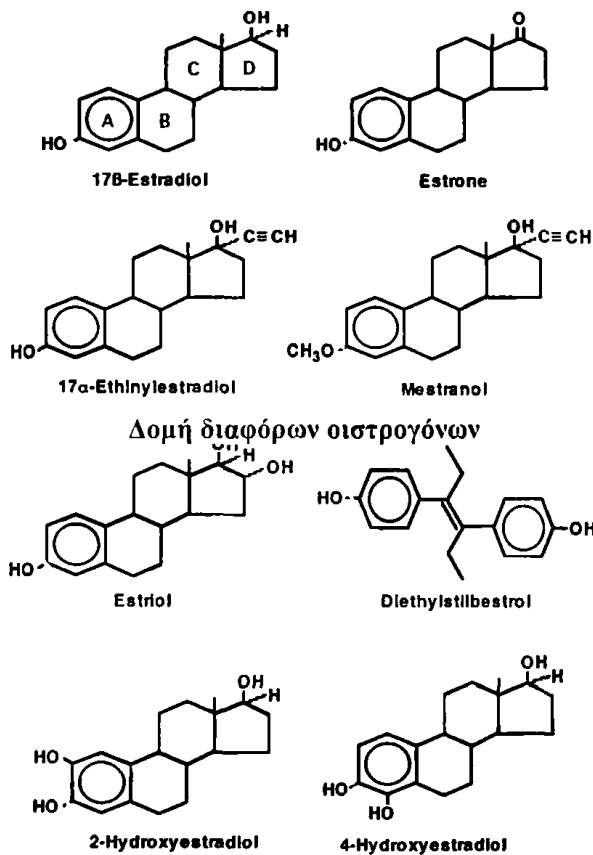


μοναδικό χαρακτηριστικό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα σε όλα τα στεροειδή.

Οι Moosman και Behl (50) με μια σειρά πειραμάτων προσπάθησαν να διερευνήσουν τον μηχανισμό με τον οποίο δρουν τα οιστρογόνα

αντιοξειδωτικά. Πιο αναλυτικά οι ανωτέρω ερευνητές εξέθεσαν καλλιέργειες νευρικών κυττάρων από ιππόκαμπο επιμύων και από ανθρώπινα νευρικά κύτταρα σε οξειδωτικό stress (διάλυμα χαλκού και πηγή  $H_2O_2$ ).

Στο συγκεκριμένο μοντέλο ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική δράση της οιστραδιόλης σε διάφορες συγκεντρώσεις τόσο μικρότερες των απαντώμενων in vivo όσο και μεγαλύτερων, καθώς και άλλων συγγενών χημικά μορίων όπως των φυτοοιστρογόνων αλλά και κατεχολοιστρογόνων με μικρή ή ανύπαρκτη οιστρογονική βιολογικά



δράση .

Ως δείκτη αντιοξειδωτικής προστασίας χρησιμοποιήσαν τόσο την μέτρηση της αντοχής στην οξείδωση των νευρικών λιπιδίων των κυττάρων και όσο και την αντοχή της LDL στην οξείδωση.

Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων ήταν τα εξής:

α. η αντιοξειδωτική δράση είναι ανεξάρτητη της ενεργοποίησης οιστρογονικών υποδοχέων. Αυτό αποδείχτηκε καθαρά από το γεγονός ότι ακόμη και μόρια φυτοοιστρογόνων που δεν είχαν χημική συγγένεια και δεν δεσμεύονταν σε οιστρογονικούς υποδοχείς εμφάνιζαν προστατευτική αντιοξειδωτική δράση στο συγκεκριμένο μοντέλο.

β. η αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων δεν ακυρώθηκε από την προσθήκη ανταγωνιστών οιστρογονικών υποδοχέων όπως η ταμοξιφαίνη και

γ. η αντιοξειδωτική δράση ήταν κοινή, σε διαφορετικό όμως βαθμό, για όλα τα οιστρογόνα συμπεριλαμβανομένων και των φυτοοιστρογόνων που στερούνται πλήρως ορμονικής δράσης και η ικανότητά τους αυτή ήταν εξαρτώμενη από τη δομή του δακτυλίου A και την ύπαρξη ή όχι OH στη θέση C<sub>3</sub>.

Φαίνεται ότι ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν είναι πολυσύνθετος και περιλαμβάνει τόσο άμεσα τη δέσμευση ελευθέρων ριζών όσο και την ικανότητα να ανάγουν ή να δρουν ως χηλικοί παράγοντες μετάλλων (100). Πολλές μελέτες χρησιμοποιώντας διάφορα μοντέλα έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα μειώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (101). Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα δρουν συνεργικά με άλλα αντιοξειδωτικά (κύρια την γλουταθειόνη) αλλά και ότι εμμέσως επιδρούν θετικά στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό μέσω επαγωγής στη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Οι Badeau και Adlercreutz σε μια ενδιαφέρουσα εργασία συνέκριναν *in vitro* την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφόρων οιστρογόνων και παραγώγων τους. Έλεγξαν 43 διαφορετικά οιστρογόνα (μεταξύ των οποίων φυσικά και την οιστραδιόλη, οιστριόνη και οιστριόλη) σε διάφορες συγκεντρώσεις ως προς την αντιοξειδωτική τους ισχύ. Αντικειμενικός σκοπός ήταν να καταδείξουν τα χαρακτηριστικά εκείνα του μορίου των οιστρογόνων που τους δίνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των μορίων υπολογίστηκε ο ρυθμός με τον οποίο επιβραδύνονταν η οξειδωση προτύπων διαλυμάτων LDL και η παραγωγή συζευγμένων διενίων. Με τα αποτελέσματά τους επιβεβαίωσαν ότι προϋπόθεση για την αντιοξειδωτική δράση είναι η ύπαρξη υδροξυλίου στον δακτύλιο A στο άτομο C<sub>3</sub>. Επιπλέον ρίζες OH στα γειτονικά άτομα άνθρακα εξασθενούν την αντιοξειδωτική δράση. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί τόσο άμεσοι όσο και έμμεσοι (102).

Μεγάλη διαφωνία υπάρχει στην επιστημονική κοινότητα για το αν τα οιστρογόνα είναι αποτελεσματικά ως αντιοξειδωτικά, στις συγκεντρώσεις που απαντώνται φυσιολογικά στα έμβια, για το αν δηλαδή η αντιοξειδωτική τους



ικανότητα θα ήταν τέτοια ώστε θεωρητικά να είχε κάποιο ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό.

Πράγματι, ενώ κάποιοι ερευνητές έχουν δείξει ότι και στις φυσιολογικές τους συγκεντρώσεις η οιστραδιόλη και η οιστριόλη εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες *in vitro*, οι περισσότερες μελέτες είτε το απορρίπτουν, είτε έχουν διενεργηθεί με πάρα πολύ υψηλές συγκριτικά με την συγκέντρωσή τους στον οργανισμό συγκεντρώσεις που καθιστούν απαγορευτική την εξαγωγή συμπερασμάτων. (103, 104, 105)

Μια πιθανή εξήγηση για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα δίνει η εργασία των Reyes et al. (108). Οι ερευνητές αυτοί έλεγξαν 5 διαφορετικά στεροειδή σε διάφορες συγκεντρώσεις, την δευδροεπιανδροστερόνη, την οιστραδιόλη, την οιστριόλη, την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη ως προς την ικανότητά τους να προστατεύσουν το λινοϊκό οξύ από την αυτοοξειδωσή του και ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώσουν ένα πρότυπο διάλυμα διφαινυλπικρυλυδραζιλής (DPPH). Η αυτοοξειδωση του λινοϊκού οξέος είναι μια αντίδραση οξειδωσης που εμποδίζεται από αντιοξειδωτικά που είναι δότες υδρογόνου. Η εξουδετέρωση της DPPH γίνεται από αντιοξειδωτικά που είναι δότες ηλεκτρονίων. Τα συμπεράσματά τους ήταν:

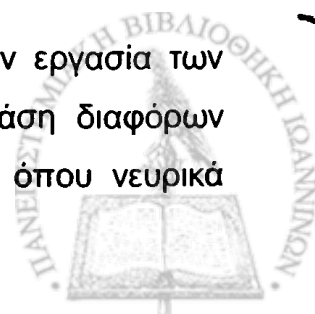
α. μόνο η οιστραδιόλη και η οιστριόλη κατάφεραν στο συγκεκριμένο μοντέλο να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά.

β. για την πρώτη αντίδραση, ως δότες υδρογόνου, τόσο η οιστραδιόλη όσο κυρίως η οιστριόλη προστάτευσαν το λινοϊκό απ' την αυτοοξειδωση σε συγκεντρώσεις που απαντώνται σε φυσιολογικές καταστάσεις στον ανθρώπινο οργανισμό.

γ. η εξουδετέρωση της DPPH από τα οιστρογόνα, ως δότες ηλεκτρονίων, ήταν αρκετά πιο περιορισμένη, αλλά κυρίως εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιες των φυσιολογικών (επιπέδου δεκάδων  $\mu\text{M}$  ως  $\text{mM}$ ).

Πιθανόν λοιπόν τα αντικρουόμενα συμπεράσματα να οφείλονται στα διαφορετικά μοντέλα μελέτης.

Τα παραπάνω συμπεράσματα ενισχύονται και από την εργασία των Gridley et al. (109). Οι ερευνητές αυτοί μελέτησαν την δράση διαφόρων αντιοξειδωτικών σε ποικίλες συγκεντρώσεις, σε ένα μοντέλο όπου νευρικά



κύτταρα διαφόρων τύπων, υφίστανται το οξειδωτικό stress ενός πεπτιδίου που ενοχοποιείται ότι συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της νόσου του Alzheimer. Το πεπτίδιο αυτό ονομάζεται βΑΡ και συνάθροισή του στις νευρικές μεμβράνες προκαλεί την παραγωγή αυξημένων ποσών  $H_2O_2$  με συνέπεια την οξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο (106, 107) Τα μόρια των οποίων η αντιοξειδωτική δράση ερευνηθήκε, ήταν η οιστραδιόλη, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό, η α-τοκοφερόλη και διάφορα θειολικά άλλα σύμπλοκα. Το ενδιαφέρον στην εργασία αυτή είναι ότι κάθε ένας παράγοντας αξιολογήθηκε μόνος του, ενώ στη συνέχεια και στην αναζήτηση συνεργειών αξιολογήθηκε η δράση τους και ανά δύο.

Το εντυπωσιακό στα αποτελέσματά τους ήταν ότι για την αντιοξειδωτική προστασία του μοντέλου τόσο για τη γλουταθειόνη όσο και για την οιστραδιόλη απαιτήθηκαν συγκεντρώσεις που ξεπερνούν κατά πολύ τις φυσιολογικές στον οργανισμό (325 $\mu$ M και 200 $\mu$ M αντίστοιχα). Η ελάχιστη όμως απαιτούμενη συγκέντρωση οιστραδιόλης για την προστασία του μοντέλου από το stress όταν χρησιμοποιούνταν σε συνδυασμό με φυσιολογικές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης ήταν της τάξης των  $10^{-2}$  nM, συγκέντρωση μικρότερη και από την φυσιολογική. Η δε αντιοξειδωτική προστασία που παρατηρήθηκε ήταν η υψηλότερη από οποιονδήποτε άλλο συνδυασμό. Η πιθανή τους εξήγηση για τη διαφαινόμενη αυτή συνέργεια ανάμεσα στη γλουταθειόνη και την οιστραδιόλη είναι ότι πιθανά η οιστραδιόλη δρα ως δότης υδρογόνου, οξειδώνεται και εν συνεχεία ανακυκλώνεται από τη γλουταθειόνη. Η δράση τους φαίνεται να ενισχύεται σημαντικά με την ύπαρξη ικανής συγκέντρωσης σε γλουταθειόνη (51, 52).

Από αναφορές που έχουμε μέχρι σήμερα φαίνεται ότι τα οιστρογόνα έχουν σημαντικά ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκρίσιμη ή και ανώτερη των ήδη γνωστών ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης.

Μελετώντας *in vitro* το μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης της οιστραδιόλης οι Ayres et al (110). σύγκριναν ταυτόχρονα και την αντιοξειδωτική ισχύ της οιστραδιόλης σε δόσεις κοντά ή και υψηλότερες από τις ανώτερες φυσιολογικές (0.1 – 100 $\mu$ M) με διάφορα άλλα αντιοξειδωτικά όπως η καταλάση (0,1mg/ml), η μαννιτόλη (5mM), η SOD (0,1mg/ml) και το Sodium Azide (5mM).



Η σύγκριση έγινε σε διάφορα μοντέλα όπου μελετήθηκαν η ικανότητα για αναστολή στην οξειδωση λιπιδίων, για προστασία του υπερελικωμένου DNA (supercoiled DNA) από βλάβες απ' την έκθεσή του σε οξειδωτικό stress καθώς και για αναστολή στην παραγωγή διαφόρων οξειδωτικών ριζών ( $O^{\cdot-}_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O^{\cdot}H$ ) από κυτταρικές καλλιέργειες. Οι ερευνητές κατέληξαν στα συμπεράσματα ότι η οιστραδιόλη είναι εξίσου αποτελεσματική ή και αποτελεσματικότερη ως αντιοξειδωτικό από τα μόρια που ελέγχθηκαν όσον αφορά στις βλάβες του DNA και την οξειδωση των λιπιδίων, ενώ αναστέλλει (σε αρκετά υψηλές όμως συγκεντρώσεις) εξίσου ικανοποιητικά την παραγωγή  $O^{\cdot-}_2$  όχι όμως και της ρίζας του  $O^{\cdot}H$  και του  $H_2O_2$  από κυτταρικές καλλιέργειες.

Σε παρόμοια αποτελέσματα καταλήγουν και άλλες συγκριτικές μελέτες που έχουν γίνει από άλλους ερευνητές κύρια συγκρίνοντας την ισχύ αναφορικά με την αναστολή οξειδωσης λιπιδίων και χοληστερόλης. Στις μελέτες αυτές έχει γίνει σύγκριση διαφόρων συγκεντρώσεων οιστραδιόλης (και φυσιολογικών) σε σχέση με την α- και γ-τοκοφερόλη, την μελατονίνη, τα β-καροτένια και το ασκορβικό οξύ και τα συμπεράσματα είναι ότι ως αντιοξειδωτικό υπερέχει όλων των άλλων στα συγκεκριμένα μοντέλα. (100, 111)

Τέλος η οιστραδιόλη φαίνεται να συνεισφέρει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό ακόμη και έμμεσα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι επάγει την παραγωγή και ενισχύει την δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH - Px) Σε μια εργασία που έγινε σύγκριση στην δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε ερυθροκύτταρα 13 γυναικών παραγωγικής ηλικίας και 13 εμμηνοπαυσιακών γυναικών βρέθηκε ότι τα επίπεδα στις πρώτες ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τις δεύτερες και ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων με τα επίπεδα της οιστραδιόλης (112).

Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται ακόμη περισσότερο καθώς και οι Massafra et al (54) με μια σειρά εργασιών καταλήγουν στα ίδια συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα μελέτησε την δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων σε 90 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, 60 εμμηνοπαυσιακές και σε 150 άντρες αντίστοιχης ηλικίας και κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:



α. Η δραστικότητα της GSH – Px ήταν υψηλότερη στις γυναίκες παραγωγικής ηλικίας σε σχέση με τις εμμηνόπαυσιαικές.

β. Η δραστικότητα της GSH – Px ήταν υψηλότερη στις γυναίκες παραγωγικής ηλικίας σε σχέση με άντρες αντίστοιχης ηλικίας.

γ. Η χορήγηση θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης αύξαινε σημαντικά τη δραστικότητα της GSH – Px.

δ. Σε όλες τις ομάδες τα επίπεδα οιστραδιόλης είχαν θετική συσχέτιση με τη δραστικότητα της GSH – Px.

Συνοψίζοντας, με βάση τα σημερινά δεδομένα, είναι αποδεκτό ότι τα οιστρογόνα και ειδικά η οιστραδιόλη, έχουν αντιοξειδωτική δράση *in vitro*. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι παρόμοια δράση εμφανίζουν και *in vivo* στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις που απαντώνται κατά την αναπαραγωγική ηλικία του θήλεος.

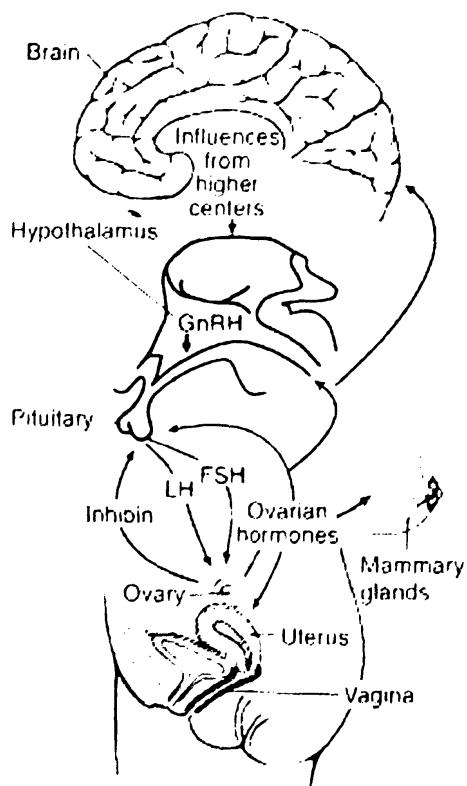
Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της οιστραδιόλης φαίνεται να είναι πολύπλοκος. Κατά κύριο λόγο οφείλεται στην ικανότητα να είναι δότης υδρογόνου τερματίζοντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Σε υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ακόμη να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες. Η δράσεις αυτές πιθανά ενισχύονται από την συνέργεια με την γλουταθειόνη. Επιπλέον εκτιμάται ότι και έμμεσα μπορεί να επηρεάζει τη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η GSH – Px.

## 6. ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ

### Γενικά Στοιχεία, Στοιχεία Φυσιολογίας

Η συγχρονισμένη και οργανωμένη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ωοθήκες και του υπόλοιπου αναπαραγωγικού συστήματος του θήλεος, έχουν σαν αποτέλεσμα τον ωορρηκτικό καταμήνιο κύκλο. Ο

καταμήνιος κύκλος διαιρείται σε δύο βασικές φάσεις: την *ωοθυλακική ή παραγωγική* και την *ωχρινική ή εκκριτική*.



Η διάρκεια του καταμήνιου κύκλου ορίζεται από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως ως την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως του επόμενου κύκλου. Η μέση διάρκειά του κατά την αναπαραγωγική ηλικία είναι 28 ημέρες ενώ κυμαίνεται από 25–30 ημέρες. Η διάρκειά του έχει μεγάλες διακυμάνσεις στα ηλικιακά άκρα της αναπαραγωγής δηλαδή κατά την εμμηναρχή και την εμμηνόπαυση. Η μικρότερη διακύμανση στην διάρκεια του κύκλου

παρατηρείται μεταξύ των ηλικιών 20-30.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει για να συγκρίνουν τις φάσεις του αναπαραγωγικού κύκλου αποκαλύπτουν μια αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης η οποία διαρκεί πάντα 13-14 ημέρες σε υγιή άτομα. Η διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης ποικίλει από 10-16 ημέρες, γεγονός στο οποίο οφείλεται η σημαντική διακύμανση του καταμήνιου κύκλου ανάμεσα στα θήλεα. Με αυτό ως δεδομένο και με βάση το peak της LH υπολογίσαμε τις χρονικές φάσεις στις οποίες κάναμε τις αιμοληψίες ούτως ώστε να έχουμε μια κατά το δυνατό καλύτερη αντιπροσώπευση του κύκλου και παράλληλα να μπορέσουμε να ομαδοποιήσουμε τα αποτελέσματά μας για λόγους στατιστικής ανάλυσης.

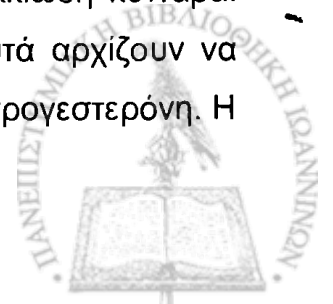
i. Ωοθηλακική φάση

Η προετοιμασία για την ανάπτυξη του ωοθυλακίου ή αλλιώς *ωοθυλακιογέννεση* αρχίζει κατά τις τελευταίες μέρες του προηγούμενου κύκλου και τελειώνει με την έμμηνο ρύση. Κοντά στο τέλος κάθε κύκλου, η συγκέντρωση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων στο πλάσμα αρχίζει να πέφτει (με την προϋπόθεση ότι δεν έχει επέλθει γονιμοποίηση) λόγω σταδιακής αποδόμησης του ωχρού σωματίου. Αυτό έχει σαν επακόλουθο την άνοδο των επιπέδων της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulating Hormone – FSH).

Η άνοδος της FSH προκαλεί την *στρατολόγηση* (1<sup>ο</sup> στάδιο) αρκετών ωοθυλακίων, από τα οποία ένα θα δώσει το ωάριο κατά την ωορρηξία. Η στρατολόγηση φυσιολογικά συμβαίνει κατά το διάστημα μεταξύ της 1<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> ημέρας από την έναρξη της περιόδου. Ακολουθεί το 2<sup>ο</sup> στάδιο της *επιλογής*, που διαρκεί από την 5<sup>η</sup> ως την 7<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου, κατά το οποίο επιλέγεται από τα στρατολογημένα ωοθυλάκια, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο που θα προχωρήσει σε ωορρηξία. Το τρίτο και τελευταίο στάδιο πριν από την ωορρηξία είναι το στάδιο της *κυριαρχίας*, όπου το κυρίαρχο ωοθυλάκιο συνεχίζει να μεγαλώνει σε μέγεθος, εμποδίζοντας την ωρίμανση των υπολοίπων ωοθυλακίων που στρατολογήθηκαν και διαρκεί από την 8<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου ως την ωορρηξία.

Κατά την ωοθυλακική φάση, τα επίπεδα των οιστρογόνων αυξάνουν παράλληλα με την ανάπτυξη του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Επίσης αυξάνουν και οι υποδοχείς FSH, σαν αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των κοκκιωδών κυττάρων γύρω από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο. Οι υποδοχείς FSH βρίσκονται αποκλειστικά στα κοκκιώδη κύτταρα.

Η αύξηση των επιπέδων της FSH και των υποδοχέων της, έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση των δράσεών της, μεταξύ των οποίων την αυξημένη παραγωγή αρωματάσης, οιστραδιόλης και υποδοχέων οιστραδιόλης. Επίσης παρουσία οιστραδιόλης, η FSH προκαλεί αύξηση των υποδοχέων ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing Hormone – LH) στα κοκκιώδη κύτταρα. Μόλις αυξηθούν οι υποδοχείς LH στα κοκκιώδη κύτταρα αυτά αρχίζουν να παράγουν σε μικρές ποσότητες προγεστερόνη και 17-υδροξυπρογεστερόνη. Η





προγεστερόνη και η οιστραδιόλη με μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) στην υπόφυση αυξάνουν τα επίπεδα LH.

Οι συγκεντρώσεις ορμονών στο ωοθυλάκιο είναι πολλαπλάσιες αυτών στην κυκλοφορία. Με βάση την συγκέντρωση ορμονών διακρίνουμε δύο ειδών ωοθυλάκια: τα μεγάλα >8mm σε διάμετρο, όπου η συγκέντρωση FSH, οιστρογόνων και προγεστερόνης είναι υψηλές και τα μικρά. Στα μικρά ωοθυλάκια, η συγκέντρωση ανδρογόνων είναι υψηλότερη σε σχέση με τα μεγάλα ενώ η συγκέντρωση οιστρογόνων πολύ μικρότερη. Φαίνεται ότι αυτές οι διαφορές συγκεντρώσεων στο μικροπεριβάλλον είναι που επιτρέπουν την διαφοροποίηση του κυρίαρχου από τα άλλα ωοθυλάκια.

Με την πρόοδο της ωοθυλακικής φάσης, τα επίπεδα της FSH σταδιακά πέφτουν ενώ της LH ανεβαίνουν.

## ii. Ωορρηξία

Προ της ωορρηξίας, η παραγωγή οιστρογόνων από το προωορρηκτικό ωοθυλάκιο αυξάνεται δραματικά και δίνει το έναυσμα για την άνοδο της LH. Η άνοδος της LH ξεκινάει τη διαδικασία της ωχρινοποίησης των κοκκιωδών κυττάρων, τη διαδικασία ολοκλήρωσης της μείωσης στο ωοθυλάκιο και αυξάνει την παραγωγή προγεστερόνης η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εκ νέου άνοδο της FSH κατά την ωορρηξία. 36-48 ώρες μετά την έναρξη της ανόδου της LH πραγματοποιείται η ωορρηξία.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η ρήξη του ωοθυλακίου και η απελευθέρωση του ωαρίου είναι άγνωστος. Η διαδικασία πάντως έχει φωτογραφηθεί και διαρκεί λίγα λεπτά. Τα κοκκιώδη κύτταρα υπό την επίδραση της FSH αποκτούν υποδοχείς για την LH. Η δράση της στα κοκκιώδη κύτταρα προκαλεί την έκκριση cAMP. Πιστεύεται ότι το cAMP και η προγεστερόνη ενεργοποιούν πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η κολλαγενάση και η πλασμίνη που προκαλούν πέψη του κολλαγόνου στο τοίχωμα του ωοθυλακίου, δημιουργώντας αστάθεια και λέπτυνσή του. Επίσης ρόλο πιθανά να παίζει ο ιστικός παράγων ενεργοποίησης πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator – TPA) ο οποίος φαίνεται να ενεργοποιείται από το peak των γοναδοτροφινών. Τέλος, κάποιες προσταγλανδίνες (των σειρών E και F) και μεθυλικοί εστέρες του υδροξυεικοσιτετραεονικού οξέος

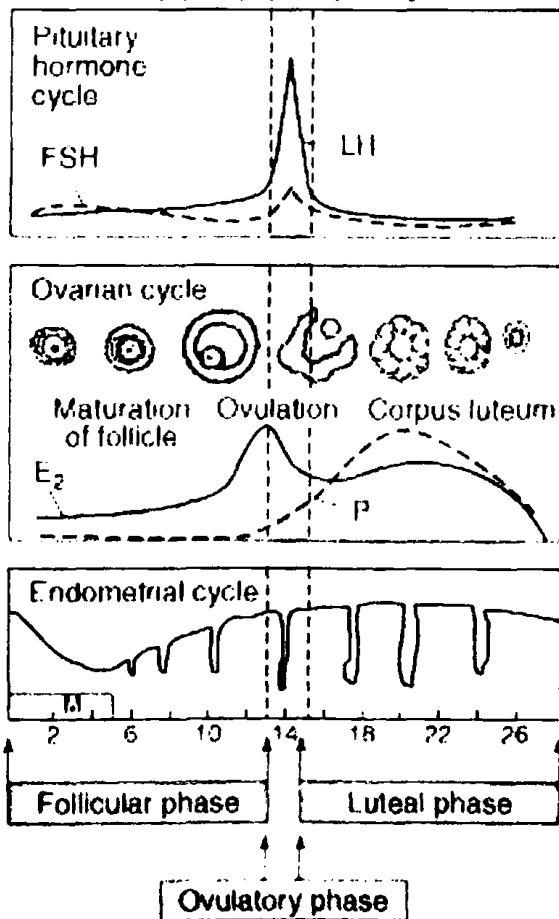


(Hydroxyeicosatetraenoic methyl esters – HETES) φαίνεται να εμπλέκονται. Τα μόρια αυτά έχουν μέγιστη συγκέντρωση στο ωοθυλακικό υγρό λίγο πριν την ωορρηξία. Πιθανά δρουν αυξάνοντας την συσταλτικότητα των λειών μυϊκών ινών στην περιοχή, βοηθώντας την έξοδο του ωαρίου. Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκαν υψηλές δόσεις ινδομεθακίνης ή άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (Non Steroid Antiinflammatory Drugs – NSAIDs) απέτυχαν να κάνουν ωορρηξία. Ως εκ τούτου, σε θήλεα που επιθυμούν κύηση συστήνεται η αποφυγή τέτοιων φαρμάκων κατά την περίοδο που τοποθετείται η ωορρηξία.

Ακριβώς πριν από το peak της LH, τα επίπεδα οιστραδιόλης μειώνονται είτε γιατί εξαντλούνται τα ανδρογόνα από την αρωματοποίηση των οποίων προέρχεται, είτε γιατί υπάρχει μείωση των υποδοχέων της LH από παλίνδρομη αρνητική δράση της ίδιας της LH. Η μείωση της οιστραδιόλης προκαλεί με τη σειρά της πτώση των επιπέδων LH.

### iii. Ωχρινική φάση

Μετά την ωορρηξία το ωοθυλάκιο υφίσταται σημαντικές μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές ώστε κατά την ωχρινική φάση μετατρέπεται σε



*ωχροό σωματίο.* Η φυσιολογική σημασία του ωχρού σωματίου είναι η έκκριση προγεστερόνης, η προαγωγή της ωρίμανσης του ενδομητρίου που ήδη βρίσκεται υπό την επίδραση των οιστρογόνων για εμφύτευση και η διατήρηση της κύησης στα αρχικά στάδια. Η εγκατάσταση αγγειακής κυκλοφορίας στο ωχροό σωματίο είναι αποτέλεσμα απάντησης στην έκκριση αγγειογόνων παραγόντων από τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης. Η μέγιστη αγγειακή κυκλοφορία στο ωχροό συμπίπτει χρονικά με την μέγιστη συγκέντρωση προγεστερόνης στο πλάσμα.

Κατά τα αρχικά στάδια της ωχρινικής φάσης τα επίπεδα οιστρογόνων παρουσιάζουν μικρή ύφεση για να ακολουθήσει εκ νέου αιχμή λίγο πριν από τα μισά της φάσης. Προς το τέλος της τα οιστρογόνα σταδιακά μειώνονται και φτάνουν στη χαμηλότερή τους τιμή με την έναρξη του νέου κύκλου. Τα επίπεδα οιστρογόνων στο πλάσμα κατά την ωχρινική φάση ακολουθούν πορεία αντίστοιχη της προγεστερόνης. Μελέτες που έχουν γίνει με μετρήσεις επιπέδων στεροειδικών ορμονών στην φλεβική κυκλοφορία των ωοθηκών, δείχνουν ότι το ωχρό σωματίο είναι ο κύριος τόπος παραγωγής τους κατά την ωχρινική φάση.

Συνοπτικά, τα επίπεδα οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, εμφανίζουν δυο αιχμές: η μεγαλύτερη πριν από την ωορρηξία που διαρκεί λιγότερο και η δεύτερη κατά τα μισά της ωχρινικής φάσης, που διαρκεί περίπου μέχρι δύο μέρες πριν από το τέλος του κύκλου.

## 7. ΠΡΟ- ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ

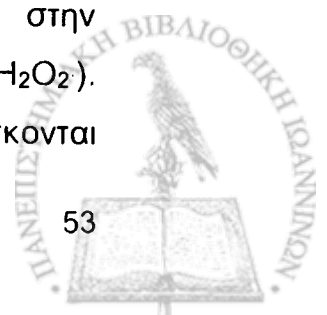
Το οξειδωτικό stress έχει διπλό ρόλο. Στη μελέτη του έχει δοθεί βάρος κυρίως στις αρνητικές επιπτώσεις. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι δεν παίζει σημαντικό ρόλο και δεν είναι απαραίτητο σε σημαντικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς. Ενδεικτικά αναφέρουμε την αναγκαιότητά του στην καταπολέμηση των μικροβίων από τα λευκοκύτταρα και τον ρόλο του στην φαγοκυττάρωση.

Αυτός ο διπλός ρόλος είναι εμφανέστατος στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του θήλεος. Τα ROS/RNS έχουν ρόλο – κλειδί ως μόρια διαβιβαστές σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες από την επιλογή και ωρίμανση του ωοθυλακίου, την ωοθηκική στεροειδογένεση, τη λειτουργία και λύση του ωχρού σωματίου έως την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και την κύηση. Έχει προταθεί η συμμετοχή τους στον αιτιοπαθολογικό μηχανισμό της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας του θήλεος με την πάροδο της ηλικίας και τις καταστάσεις υπογονιμότητας. Σημαντικός είναι ο ρόλος της παραγωγής ROS/RNS από το έμβρυο. Ενδεχομένως, ακόμη και η έναρξη του τοκετού να σηματοδοτείται και να υποβοηθείται από ROS/RNS.

### Ωοθήκες

Υπάρχουν ενδείξεις ότι στον έλεγχο του στρώματος και των γεννητικών κυττάρων των ωοθηκών συμμετέχουν καθοριστικά ως ρυθμιστές τα ROS/RNS. Έχει προταθεί ότι ρυθμιστικοί μηχανισμοί με κυτταροκίνες και ROS/RNS αλληλοσυνδέονται και πρακτικά λειτουργούν ως εξω- και ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι στις ωοθήκες. Η ακεραιότητα ενός τέτοιου μηχανισμού, όπως και η ισορροπία ανάμεσα σε προ και αντιοξειδωτικά αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την ομαλή λειτουργία του έμμηνου κύκλου και τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας της γυναίκας.

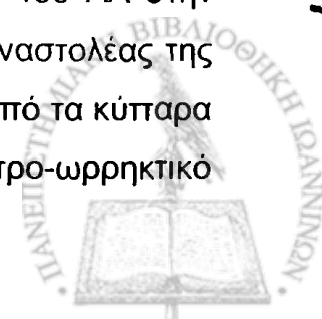
1. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η εκφύλιση του ωχρού σωματίου οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή ROS/RNS και συγκεκριμένα στην παραγωγή σουπεροξειδίου του  $O_2$  ( $O_2^{\cdot-}$ ) και υπεροξειδίου του  $H_2$  ( $H_2O_2$ ). Κύρια πηγή αυτών είναι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα που βρίσκονται



στην περιοχή (58,60). Η δράση των ROS/RNS ευνοείται από την ταυτόχρονη έκπλυση του ασκορβικού οξέος από την περιοχή, η οποία είναι αναστρέψιμη και επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο. Η διαδικασία είναι η αυτή είτε πρόκειται για εκφύλιση στα πλαίσια ενός φυσιολογικού κύκλου, είτε πρόκειται για εκφύλιση προκλητή από προσταγλανδίνες. Τα ROS/RNS προκαλούν άμεση αποσύνδεση του υποδοχέα της LH από την cAMP, με αποτέλεσμα την αναστολή της στεροειδογένεσης λόγω διακοπής της μεταφοράς της χοληστερόλης ενδομιτοχονδριακά.

2. ROS/RNS παράγονται συνεχώς στο ωοθυλάκιο κατά την ωορρηξία. Και εδώ κύρια πηγή τους είναι τα λευκά. Υπερβολική συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά μπλοκάρει την εκκίνηση της δεύτερης μείωσης στα ωοκύτταρα και κατά συνέπεια την ωορρηξία. Η βλαπτική αυτή μετατόπιση της προ-αντιοξειδωτικής ισορροπίας αναφέρθηκε και παραπάνω και ονομάζεται *αντιοξειδωτικό stress*. Τα ROS/RNS είναι άκρως απαραίτητα για την διαδικασία της ωρίμανσης των ωοκυττάρων μέσα στα θυλάκια (61).

3. Στο μικροπεριβάλλον της ωοθήκης υπάρχουν ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις σε ασκορβικό (AA). Το ασκορβικό γενικά, μεταφέρεται από το πλάσμα εντός του κυττάρου με ειδικούς υποδοχείς-μεταφορείς, με μηχανισμό που απαιτεί ενέργεια και είναι εξαρτώμενος από το νάτριο. Υποδοχείς AA είναι παρόντες στα ωχρινικά και κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης. Ρυθμίζονται προς τα πάνω (up regulated) από τον Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) και τις γοναδοτροπίνες (62, 63). Άλλα αντιοξειδωτικά παρόντα το μικροπεριβάλλον των ωοθηκών είναι η Cu,Zn-SOD, η GSH και διάφορες υπεροξειδάσες όπως η λακτοϋπεροξειδάση, η μυελοϋπεροξειδάση και η ηωσινοφιλική υπεροξειδάση. Για την αντιοξειδωτική δράση αυτών των ενζύμων, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρουσία AA. Η έκπλυση του AA είναι ταχύτατη, εντός 2-3 λεπτών και είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ωορρηξία και την ωχρινοποίηση. Η έκπλυση και η επανείσοδος του AA στα κύτταρα γίνεται με περιοδικό τρόπο και ρυθμίζεται κύρια με την προσταγλανδίνη  $PGF_{2\alpha}$  και λιγότερο με την LH. Αυτό γίνεται εν μέρει με ρύθμιση του αριθμού των υποδοχέων του AA στην κυτταρική μεμβράνη. Η προσταγλανδίνη  $PGF_{2\alpha}$  είναι ισχυρός αναστολέας της πρόσληψης του AA και ταυτόχρονα διεγείρει την έξοδο του AA από τα κύτταρα του ωχρού. Η LH διεγείρει την έκπλυση του AA από το προ-ωορρηκτικό



θυλάκιο. Η δράση αυτή είναι απαραίτητη τόσο για την επανέναρξη της μείωσης, όσο και για την ρήξη του ωοθυλακίου.

Στα άωρα ωοθυλάκια η διαδικασία της ωρίμανσης συμπεριλαμβάνει την δεύτερη μείωση του DNA. Αυτή πειραματικά αναστέλλεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών και επανέρχεται με την προσθήκη ROS.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών παρόλο που αποτελεί αναπόσπαστο και αναγκαίο γεγονός για τον φυσιολογικό έμμηνο κύκλο, προκαλεί μια σειρά από παθολογικά φαινόμενα στην ωοθήκη καθώς όπως αναφέραμε πρόκειται για ουσίες μεταλαξιόνες, που προκαλούν φλεγμονή, νέκρωση και απόπτωση. Η φυσιολογική και απαραίτητη κυκλική παραγωγή οξειδωτικού stress σε κάθε έμμηνο κύκλο, ενδεχομένως προκαλεί αθροιστικές βλάβες στο DNA που μακροχρόνια μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση νόσου (58-63). Πράγματι:

1. Αιτιολογικός παράγοντας στον καρκίνο των ωοθηκών είναι ο αυξημένος και συχνός αριθμός ωορρηξιών. Η μεγάλη ηλικία έναρξης της αναπαραγωγικής φάσης του θήλεος, οι πολλαπλές εγκυμοσύνες και τα αντισυλληπτικά χάπια που αναστέλλουν την ωορρηξία αποτελούν προστατευτικό παράγοντα κατά του καρκίνου των ωοθηκών. Συνδυετικός κρίκος μεταξύ της αυξημένης συχνότητας ωορρηξιών και οξειδωτικού stress στην πρόκληση καρκίνου φαίνεται να είναι η βλάβη από επαναλαμβανόμενη και παρατεταμένη έκθεση του DNA των επιθηλιακών κυττάρων της ωοθήκης στα ROS/RNS. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων ωοθήκης εκδηλώνονται από το επιθήλιο της ωοθήκης. Το μικροπεριβάλλον της ωοθήκης υφίσταται εντονότατο οξειδωτικό stress κατά την διάρκεια της ωορρηξίας. Stress που με βάση όσα είδαμε πιο πάνω είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών.

2. Η απειλητική για τη ζωή φλεγμονώδης αντίδραση που προκαλείται μερικές φορές από την τεχνητή υπερδιέγερση των ωοθηκών (σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών) που διενεργείται κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι άλλο ένα παράδειγμα δράσης ανεξέλεγκτου οξειδωτικού stress.

## Προεκλαμψία

Η ελαττωματική εμφύτευση του πλακούντα προκαλεί υποξία και βλάβες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών. Σαν συνέπεια αυτό έχει την απελευθέρωση κυτταροκινών και προσταγλανδινών με τελικό αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την εκδήλωση προεκλαμψίας. Την ενδοθηλιακή βλάβη έχει δειχθεί ότι προκαλεί η κυτταροκίνη TNF- $\alpha$ .

Εκτός της αύξησης του επιπέδου των κυτταροκινών τα ROS προκαλούν και αυξημένη έκφραση των υποδοχέων των κυτταροκινών στην συγκυτιοτροφοβλάστη, στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων και στο ενδομήτριο επιδεινώνοντας ακόμη περισσότερο με τον τρόπο αυτό την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (64-67).

## Ενδομητρίωση

Στην ενδομητρίωση η ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μπορεί να πυροδοτηθεί από μια σειρά παραγόντων μεταξύ των οποίων και τα κατεστραμμένα ερυθρά και τα αποπτωτικά κύτταρα του ενδομητρίου. Έχει αναφερθεί η θετική συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του TNF- $\alpha$  στο περιτοναϊκό υγρό και στην ενδομητρίωση. Οι κυτταροκίνες επηρεάζουν την προ-αντιοξειδωτική ισορροπία στον έκτοπο ενδομητρικό ιστό σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Η δραστικότητα της SOD και της GPX όπως και η υπεροξειδωση των λιπιδίων μετρήθηκαν σε έκτοπο ενδομητρικό ιστό. Η SOD ήταν σημαντικά αυξημένη στον έκτοπο ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό ενδομήτριο. Επίσης παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση στο πλάσμα ανάμεσα στα επίπεδα της μαλονικής δεαλδεϋδης και της 17- $\beta$ -οιστραδιόλης. Φαίνεται ότι στον έκτοπο ενδομητρικό ιστό οι κυτταροκίνες προκαλούν μια προς τα πάνω ρύθμιση του αντιοξειδωτικού συστήματος και αυτό ενδεχομένως να αποτελεί ένα μηχανισμό αυτοπροστασίας (68-71).

Από την άλλη μεριά μελέτες δείχνουν ότι ασθενείς με ενδομητρίωση έχουν υψηλά επίπεδα NO τόσο στο περιτοναϊκό, όσο και στο ενδοσαλπινγικό υγρό. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει ως ένα σημείο την υπογονιμότητα που έχουν αυτές οι ασθενείς ειδικά με την δράση του NO στις σάλπιγγες και τα σπερματοζώαρια, όπως εξηγούμε παρακάτω.



## Νεοαγγειογέννεση

Νεοαγγειογέννεση είναι η παθοφυσιολογική διαδικασία κατά την οποία έχουμε την δημιουργία νέων αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα. Εκλυτικός παράγων είναι η ιστική έλλειψη οξυγόνου και διάφοροι αγγειογεννητικοί παράγοντες. Παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη του ωοθυλακίου, του ενδομητρίου, του εμβρύου, του πλακούντα κτλ. Είναι απαραίτητη για την κυκλική ανάπλαση του ενδομητρίου στον έμμηνο κύκλο. Ένα σύμπλεγμα κυτταροκινών επηρεάζουν την εμβρυομητρική μονάδα και δημιουργούν τις προϋποθέσεις για την εμφύτευση του εμβρύου. Τα οιστρογόνα προάγουν την νεοαγγειογέννεση στο ενδομήτριο ελέγχοντας την έκφραση του παράγοντα VEGF (vessel endothelial growth factor). Κρίσιμη για τον παράγοντα αυτό είναι η παρουσία σε μικρά ποσά ROS. Σειρά μελετών εκπονείται σήμερα για την διερεύνηση του ρόλου των ROS στην νεοαγγειογέννεση που παρατηρείται στο γυναικείο γεννητικό σύστημα (71-80).

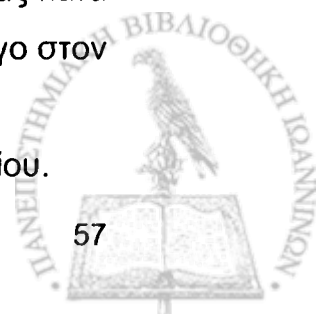
## Σάλπιγγες

Στις σάλπιγγες υπάρχει τόσο το ενδοθηλιακό (eNOS) όσο και το επαγωγίμο (iNOS) ένζυμο της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου. Το NO που έχει χαλαρωτική δράση όπως αναφέρθηκε στις λείες μυϊκές ίνες, έχει παρόμοια δράση στις σάλπιγγες. Ανεπάρκεια σε NO προκαλεί δυσκινησία και δυστονία στις σάλπιγγες που μπορεί να οδηγήσει σε κατακράτηση του ωαρίου, καθυστερημένη μεταφορά του σπερματοζωαρίου και υπογονιμότητα. Φαίνεται ότι η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων NO είναι απολύτως απαραίτητη για την άρτια σαλπιγγική λειτουργία και την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Από την άλλη μεριά, υπερβολικές ποσότητες NO μπορεί να είναι τοξικές για το σπερματοζωάριο (81-83).

## RNS και ενδομήτριο, μιομήτριο

Στο ενδομήτριο, στο μιομήτριο και στα αγγεία του εκφράζονται επίσης η eNOS και η iNOS. Το παραγόμενο NO ρυθμίζει την μικροκυκλοφορία στο ενδομήτριο και τον μυϊκό τόνο του μιομητρίου. Μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση ανάμεσα σε αυξημένα επίπεδα NO και αυξημένης αιμορραγίας κατά την έμμηνο ρύση (μηνορραγία), γεγονός που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στον μειωμένο τόνο της μήτρας.

Φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου.





Ακόμη σημαντικός είναι ο ρόλος του NO τόσο κατά την κύηση όσο και κατά τον τοκετό. Σε μια μελέτη η έκφραση της iNOS και τα επίπεδα NO στο ενδομήτριο ήταν σημαντικά υψηλότερα κατά όλη την διάρκεια της κύησης σε σχέση με την τελευταία εβδομάδα, ενώ ήταν πρακτικά μηδέν κατά την διάρκεια του τοκετού υποδηλώνοντας κάποιο ρόλο του NO στην διατήρηση της χάλασης της μήτρας (84-87).

**ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΝΕΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ & Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ**

Αντιοξειδωτικό	Εντοπισμός	Σχόλια
<b>ΕΝΖΥΜΙΚΑ</b>		
Υπεροξειδιοδισμουτάση (SOD)	Κυταρόπλασμα (CuZnSOD) Μιτοχόνδρια (MnSOD) Ενδομήτριο	Αυξημένη επιβίωση βλαστοκύστης. Μειωμένες συγκεντρώσεις σχετίζονται με προεκλαμψία Αυξημένα επίπεδα προστατεύουν από διαβητική εμβρυοπάθεια
Καταλάση (CAT)	Σάλπιγγες	Αυξάνει το ποσοστό των ζυγωτών που διαιρούνται
Γλουταθειονυπεροξειδάση (GSH-Px)	Ενδομήτριο	
<b>ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ</b>		
Βιταμίνη E	Ωοθήκες, Σάλπιγγες	Αυξάνει την επιβίωση των βλαστοκυστεών Αυξάνει την επιβίωση εμβρύων που έχουν υποστεί heat shock Μειώνει την πιθανότητα ανευπλοειδίας και διπλοειδίας σε wάρια ηλικιωμένων ποντικών
Βιταμίνη C	Ωοθήκες	Ανακύκλωση βιταμίνης E Σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την ανάπτυξη του εμβρύου Μειώνει την πιθανότητα ανευπλοειδίας και διπλοειδίας σε wάρια ηλικιωμένων ποντικών Έλλειψη προκαλεί ατροφία και ατρησία ωοθηκών
Γλουταθειόνη	Σάλπιγγες, ωοκύτταρα, έμβρυο	Προστατεύει το έμβρυο από οξειδωτικό stress Έλλειψη προκαλεί αύξηση του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Έλλειψη στα αρχικά στάδια της οργανογένεσης συνδέεται με την εμβρυοπάθεια λόγω υπεργλυκαιμίας
N-ακετυλο-κυστεΐνη		Πρόδρομος ουσία της γλουταθειόνης Αναστέλλει την ενεργοποίηση της NF-kappaB Αναστέλλει την προφλεγμονώδη έκλυση κυταροκινών
EDTA		Απαραίτητο για να ξεπεράσει το in vitro γονιμοποιημένο wάριο το 2 cell block



# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### Πληθυσμός – Κριτήρια Αποκλεισμού

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν αρχικά από 31 θήλεα με φυσιολογικό κύκλο. Στην μεγάλη τους πλειοψηφία επρόκειτο για νεαρές εργαζόμενες στο Γενικό Νοσοκομείο Πρέβεζας, καθώς η στρατολόγηση από το γενικό πληθυσμό αποδείχτηκε αδύνατη. Το ηλικιακό εύρος κυμαινόταν από 21 έως 30 ετών, με μέσο όρο ηλικίας τα 24,1 έτη. Όλες οι γυναίκες είχαν στο ιστορικό τους φυσιολογικό έμμηνο κύκλο με διάρκεια μεταξύ 27 και 31 ημέρες.

Από όλες λάβαμε ένα λεπτομερές ιατρικό και γυναικολογικό ιστορικό για να αποκλειστούν όσες έπασχαν από πρόσφατο οξύ ή χρόνια νόσημα και για να διαπιστωθεί η κανονικότητα του έμμηνου κύκλου.

Όλες οι συμμετέχουσες είχαν φυσιολογική θυρεοειδική λειτουργία. Για την επιβεβαίωση αυτή επανελέγχθηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης.

Επίσης στα κριτήρια αποκλεισμού λήφθηκε υπόψη ο δείκτης μάζας – σώματος και αποκλείστηκαν όσες υπερέβαιναν τα 25 kg/m<sup>2</sup>.

Κατά την διάρκεια της μελέτης αποκλείστηκε η λήψη οιασδήποτε φαρμακευτικού σκευάσματος, όπως επίσης και η λήψη οποιουδήποτε διατροφικού συμπληρώματος που περιείχε βιταμίνες ή ουσίες που γενικά θεωρείται ότι αποτελούν αντιοξειδωτικά. Ταυτόχρονα έλαβαν οδηγίες από διαιτολόγο.

Απαγορεύτηκε η εντατική σωματική άσκηση κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Όλες οι συμμετέχουσες ήταν απαραίτητως μη καπνίστριες.

Εθελόντριες με πρόσφατη εγκυμοσύνη, διακοπή κύησης ή σε ορμονική αντισύλληψη αποκλείστηκαν (σαν πρόσφατη θεωρήθηκε περίοδος μικρότερη των έξι μηνών προ της έναρξης της μελέτης).

Από όλες τις συμμετέχουσες λήφθηκε εγγράφως και κατόπιν πληροφόρησης περί του αντικειμένου της έρευνας η συναίνεσή τους.

Εφαρμόζοντας τα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού, αποκλείστηκαν τελικώς από την έρευνα τρεις γυναίκες.

## Αιμοληψία – Αναλύσεις

Δείγματα φλεβικού αίματος (40ml) λήφθηκαν πρωινές ώρες, μεταξύ 0800 και 0900, από την βασιλική φλέβα την πρώτη μέρα του κύκλου (time 1), στην μεσοωθουλακική φάση (time 2), κατά την ωορρηξία (time 3) και κατά την μεσωχρινική φάση (time 4), ούτως ώστε να υπάρχει πλήρης αντιπροσώπευση του κύκλου.

Οι ακόλουθες παράμετροι υπολογίζονταν αμέσως στο βιοχημικό και αιματολογικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Πρέβεζας: πλήρης γενική αίματος και οι συγκεντρώσεις πλάσματος γλυκόζης, ουρίας, κρεατινίνης, καλίου, νατρίου, ολικής και άμεσης χολερυθρίνης, ουρικού οξέος, τριγλυκεριδίων, ολικής χοληστερόλης, HDL, με βάση τις μεθόδους ρουτίνας του συγκεκριμένου εργαστηρίου. Στόχος ήταν ο αποκλεισμός ατόμων με αποκλίνουσες τιμές. Κανένα άτομο δεν αποκλείστηκε.

Το υπόλοιπο κλάσμα κάθε αιμοληψίας, συλλέχθηκε σε σωλήνες με EDTA και φυγοκεντρήθηκε άμεσα στις 3000 στροφές για 10 min στους 4°C. Έγινε διαχωρισμός πλάσματος και κλάσματα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες κενού προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση και αποθηκεύθηκαν στους -80°C έως την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Οι υπόλοιπες μετρήσεις έγιναν σε μια συνεδρία με το πέρας της περιόδου αιμοληψίας (που διήρκησε περίπου 50 ημέρες).

Λόγω μη τήρησης του αυστηρού χρονοδιαγράμματος, αδυναμίας συμμόρφωσης με το σχεδιασμό της εργασίας, όπως και δυσανασχέτησης λόγω των σχετικά μεγάλων σε ποσότητα αιμοληψιών αποχώρησαν από την μελέτη άλλες 15 συμμετέχουσες ώστε τελικά ολοκλήρωσαν το πρόγραμμα 13. Η αντικατάστασή τους δεν κατέστη εφικτή με άλλα άτομα λόγω του ότι ο στόχος ήταν οι μετρήσεις να γίνουν σε μια συνεδρία κάθε φορά και όσο το δυνατό πιο κοντά στην αιμοληψία για να αποφευχθούν λάθη από επιμόλυνση των δειγμάτων, αλλά και λόγω του γεγονότος ότι δεν υπήρχε επιπλέον διαθέσιμος πληθυσμός .



### Μέτρηση Ορμονών:

Οι ορμόνες ελεύθερη τριϊωδοθυρονίνη (FT<sub>3</sub>), ελεύθερη θυροξίνη (FT<sub>4</sub>), θυρεοτρόπος (TSH), οιστραδιόλη (E<sub>2</sub>), προγεστερόνη (PRG), ωοθυλακιότροπος (FSH) και ωχρινότροπος (LH) μετρήθηκαν με τη μέθοδο ELFA (enzyme immunoassay with final fluorescent detection) και το kit VIDAS.

Πρόκειται για μέθοδο ενζυμικού ανοσοφθορισμού. Στη μέθοδο αυτή στο πρώτο βήμα προστίθεται το προς εξέταση δείγμα σε ένα μέσο που περιέχει υποδοχείς στερεής φάσης. Οι υποδοχείς αυτοί είναι αντισώματα ειδικά για κάθε ορμόνη. Τα μόρια της προς μέτρηση ορμόνης που περιέχονται σε κάθε δείγμα δεσμεύονται από τους υποδοχείς και οι υπόλοιπες ουσίες ξεπλένονται.

Εν συνεχεία προστίθεται ειδικό αντιδραστήριο για κάθε ορμόνη που δεσμεύεται στις εναπομείνουσες θέσεις υποδοχέων που δεν έχουν δεσμευτεί. Το αντιδραστήριο αυτό έχει μια ειδική θέση σύνδεσης στον υποδοχέα-αντίσωμα ενώ ταυτόχρονα είναι και ένζυμο που καταλύει την αντίδραση σύνθεσης της προς μέτρηση φθορίζουσας ουσίας. Η περίσσεια και πάλι ξεπλένεται.

Στο τελευταίο βήμα προστίθεται το 4-Methyl-Umbelliferone. Αυτό υδρολύεται από το ένζυμο - αντιδραστήριο δίνοντας αναλογικά ένα προϊόν που φθορίζει και μετράται στα 450nm. Η ένταση του φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της προς μέτρηση ορμόνης.

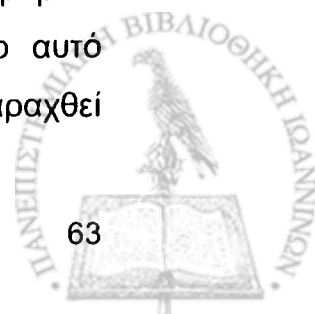
Οι μετρήσεις έγιναν αυτοματοποιημένα στο βιοχημικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Πρέβεζας.

Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις διπλούν.

### Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Κατάστασης Πλάσματος

Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση του πλάσματος (TAPS) μετρήθηκε με τη βοήθεια μιας χρωματομετρικής μεθόδου με τη χρήση του kit της RANDOX (TAS, Cat No NX2332, Randox Laboratories, San Francisco, USA).

Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση ενός χρωμογόνου, του μορίου ABTS ( 2,2-Azino-di- {3-ethylbenthiazoline sulphonate} ). Το μόριο αυτό επωάζεται μαζί με μια υπεροξειδάση (Metmyoglobin) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για να παραχθεί η ελεύθερη ρίζα ABTS\*<sup>+</sup>.



Το κατιόν αυτό δίνει ένα σχετικά σταθερό χρώμα που μετράται στα 600nm. Αν στο διάλυμα προστεθεί το προς μέτρηση δείγμα πλάσματος, τότε τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται σ' αυτό εξουδετερώνουν το ABTS<sup>•+</sup> και προκαλούν μείωση της απορρόφησης ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Για την ακρίβεια της μεθόδου απαιτείται η μέτρηση να γίνεται ακριβώς 3 min μετά την προσθήκη του δείγματος και η θερμοκρασία στο θάλαμο μέτρησης να είναι στους 37°C.

Η απορρόφηση είναι γραμμική σε σχέση με την συγκέντρωση για τιμές έως 2,5 mmol/l ολικών αντιοξειδωτικών.

Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Οι μετρήσεις έγιναν στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

#### Μέτρηση Ασκορβικού και Δεϋδροασκορβικού Οξέος

Για την μέτρηση του ασκορβικού, καθώς και του δεϋδροασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε επίσης μια χρωματομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στην 2,4 δινιτροφενυλυδραζίνη (DNPH).

Κατά τη μέθοδο αυτή, αρχικά υπολογίζεται η συγκέντρωση του DHAA. Το DHAA αντιδρά με την DNPH, προκειμένου να σχηματίσει ένα παράγωγο υδραζίνης. Η συγκέντρωση του παραγώγου υδραζίνης μετράται με φασματοφωτόμετρο στα 515 nm και είναι ανάλογη της απορρόφησης.

Από πρότυπες καμπύλες που έχουν ετοιμαστεί νωρίτερα με πρότυπα διαλύματα DHAA, γίνεται απευθείας αντιστοίχιση της απορρόφησης αυτής με την συγκέντρωση του DHAA στο εκάστοτε δείγμα.

Εν συνεχεία ένα άλλο κλάσμα του ίδιου δείγματος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ολικού AA οξειδωμένου και μη.

Για τον σκοπό αυτό όλο το AA οξειδώνεται και μετατρέπεται έτσι σε DHAA. Υπολογίζεται με τον ίδιο τρόπο που αναφέραμε παραπάνω η συγκέντρωση του DHAA, που ύστερα από την οξείδωση αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του ολικού AA.

Με απλή αφαίρεση από την συγκέντρωση του ολικού AA της συγκέντρωσης του DHAA, για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση του AA.



Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Οι μετρήσεις έγιναν στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ενδεχομένως να προσμετρηθούν και άλλα αναγωγικά σώματα, έτσι ώστε οι τελικές τιμές του ασκορβικού και του δεϋδροασκορβικού να είναι ψευδώς υψηλότερες. Σε κάθε περίπτωση όμως θεωρούμε ότι δεν επηρέασαν τα τελικά μας αποτελέσματα μιας και το ενδιαφέρον μας εστιάσθηκε στην μεταβολή των ουσιών αυτών και όχι στις απόλυτες τιμές.

### Προσδιορισμός συγκέντρωσης Χαλκού και Ψευδαργύρου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μετάλλων έγινε με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrophotometry), επίσης στο εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

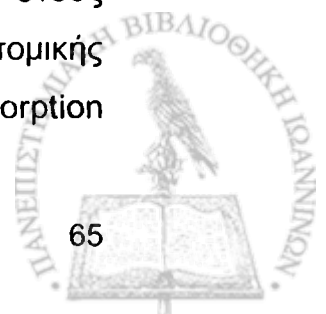
Στη μέθοδο της Ατομικής Απορρόφησης, με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου μία περιοχή συγκεκριμένου μήκους κύματος απομονώνεται από το υπόλοιπο φάσμα και μετράται η μεταβολή της έντασης αυτής της περιοχής.

Οι βασικές αρχές είναι οι ακόλουθες:

Τα προς ανάλυση μεταλλικά άλατα, που προκύπτουν μετά την όξινη πέψη των δειγμάτων, φέρονται σε ατομική κατάσταση και παρεμβάλλονται στη διαδρομή της εκπεμπόμενης φωτεινής συχνότητας του φωτόμετρου.

Για κάθε μέταλλο χαρακτηριστικά φάσματα φωτεινών συχνοτήτων ενεργοποιούνται στην πηγή του φωτόμετρου με τη βοήθεια μιας κοίλης λυχνίας καθόδου (hollow cathode lamp). Τα άτομα του μετάλλου τότε απορροφούν επιλεκτικά την ακτινοβολία που εκπέμπεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ατόμου τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η μείωση στην ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των μετάλλων Cu και Zn στους ορούς ασθενών χρησιμοποιήθηκε Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης Perkin-Elmer mod.560 με φλόγα (Flame Atomic Absorption



Spectrophotometer, F-AAS) με διορθωτή υποστρώματος λάμπα δευτερίου (background corrector).

Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Για την ατομοποίηση χρησιμοποιήσαμε φλόγα αέρα-ασετιλίνης. Το δείγμα σε υγρή κατάσταση (περίπου 2 ml ήταν απαραίτητα για κάθε μέτρηση στη φλόγα) μετετράπη σε αερόλυμα (aerosol) με τη βοήθεια νεφελοποιητή (nebulizer) και μετά τη μίξη του με τα αέρια της φλόγας κάηκε και ατομοποιήθηκε. Ένα σταθερό σήμα, του οποίου η ένταση ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου, καταγραφόταν κατά το χρονικό διάστημα που το δείγμα εκτίθονταν στη φλόγα. Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων υπολογίστηκαν τελικά από τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{Καθαρή Απορρόφηση δείγματος} \times \text{Συγκέντρωση προτύπου}}{\text{Καθαρή Απορρόφηση προτύπου}}$$

Εν συνεχεία και λόγω της αραιώσης:

$$\text{Μέταλλο (}\mu\text{g/ml)} = \text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} \times \text{Αραιώση (Dilution factor)}$$

Τα δείγματα του ορού μετρήθηκαν για Cu, αφού προηγήθηκε αραιώσή τους 1:2 (Dilution factor=2) με δις-αποσταγμένο νερό, ενώ για την ανάλυση για Zn, προηγήθηκε αραιώσή τους 1:4 (Dilution factor=4) με δις-αποσταγμένο νερό.





## 9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η στατιστική ανάλυση όλων των παραμέτρων έγιναν με την μέθοδο ANOVA ακολουθούμενων από το τεστ ελάχιστης στατιστικής σημαντικότητας (least significant difference LSD test). Για την κατάδειξη συσχετίσεων υπολογίσθηκαν οι συντελεστές Pearson και Spearman. Τιμές του  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση έγινε από έμπειρο προσωπικό του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, εξοικειωμένο με τέτοιου είδους στατιστικές αναλύσεις.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του χαλκού και του ψευδαργύρου καθώς και τις συσχετίσεις, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η μέθοδος Bootstrap και δημιουργήθηκε ειδικό λογισμικό (software) για την υπολογιστική τους μελέτη. Το λογισμικό όπως και η στατιστική επεξεργασία έγινε από το στατιστικό τμήμα, του τμήματος έρευνας και εξέλιξης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Akademiska, στην Uppsala της Σουηδίας (Akademiska Universitetssjukhus, Uppsala, Forskning och Utvecklings Centrum). Και εδώ, τιμές του  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Η μέση διάρκεια των εμμήνων κύκλων ήταν  $29 \pm 1$  ημέρες. Η διάρκεια των εμμήνων ρύσεων ήταν  $4 \pm 1$  ημέρες.

Αρχικά έγινε στατιστική ανάλυση όλων των παραμέτρων για τον υπολογισμό των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι μέσες τιμές για οιστραδιόλη, ασκορβικό, δεϋδροασκορβικό οξύ, ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος, χαλκό και ψευδάργυρο. Οι μέσες τιμές όλων των άλλων παραμέτρων παρατίθενται σε παράρτημα στο τέλος του κειμένου.

ΜΕΤΡΗΣΗ	E <sub>2</sub> pg/ml (mean +/- SD)	ASC μM x 10 <sup>-2</sup> (mean +/- SD)	DHAA μM x 10 <sup>-4</sup> (mean +/- SD)	TAPS mmol/lit (mean +/- SD)	Cu μg/ml (mean +/- SD)	Zn μg/ml (mean +/- SD)
1H	29,26 (+/-17,23)	30,30 (+/-19,04)	15,65 (+/-10,44)	1,05 (+/-0,49)	1,1 (+/-0,11)	0,85 (+/-0,11)
2H	38,39 (+/-20,38)	35,62 (+/-25,20)	15,19 (+/-7,10)	1,09 (+/-0,46)	0,87 (+/-0,14)	0,91 (+/-0,07)
3H	269,68 (+/-39,71)	59,06 (+/-22,92)	7,35 (+/-8,13)	1,54 (+/-0,47)	0,88 (+/-0,1)	0,96 (+/-0,08)
4H	115,28 (+/-27,49)	47,99 (+/-6,44)	14,41 (+/-9,14)	1,30 (+/-0,49)	0,97 (+/-0,11)	0,92 (+/-0,07)

Εν συνεχεία με ANOVA single factor analysis ελέγχθηκε, αν και ποιες παράμετροι εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διακύμανση κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου.

Από την ανάλυση αυτή προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις σε σχέση με τους χρόνους που μετρήσαμε, για τις εξής βιοχημικές παραμέτρους:

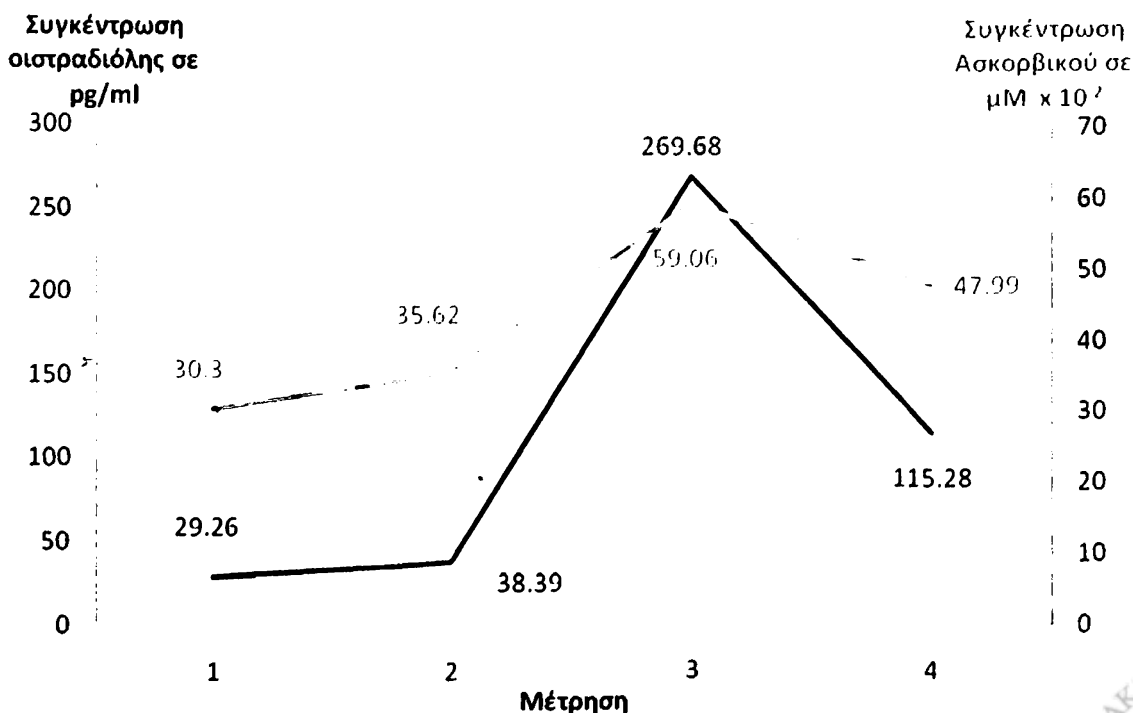
1. Το *ασκορβικό οξύ* (AA). Μέγιστη τιμή κατά την ωορρηξία. P<0,01.
2. Το *δεϋδροασκορβικό οξύ* (DHAA). Παρουσίασε διακυμάνσεις μόνο όταν συγκρίναμε διαδοχικούς χρόνους κάθε φορά (P<0,01) ενώ η συνολική διακύμανση και στους 4 χρόνους ήταν στατιστικά μη σημαντική (P<0,1). Ελάχιστη τιμή κατά την ωορρηξία.
3. Το *λόγο του ασκορβικού προς το δεϋδροασκορβικό* (A/DHAA). Μέγιστη τιμή κατά την ωορρηξία. P<0,01.
4. Την *ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος* (TAPS). Μέγιστη τιμή κατά την ωορρηξία. P<0,05.
5. Τον *ψευδάργυρο* (Zn). Μέγιστη τιμή κατά την ωορρηξία. P<0,01.



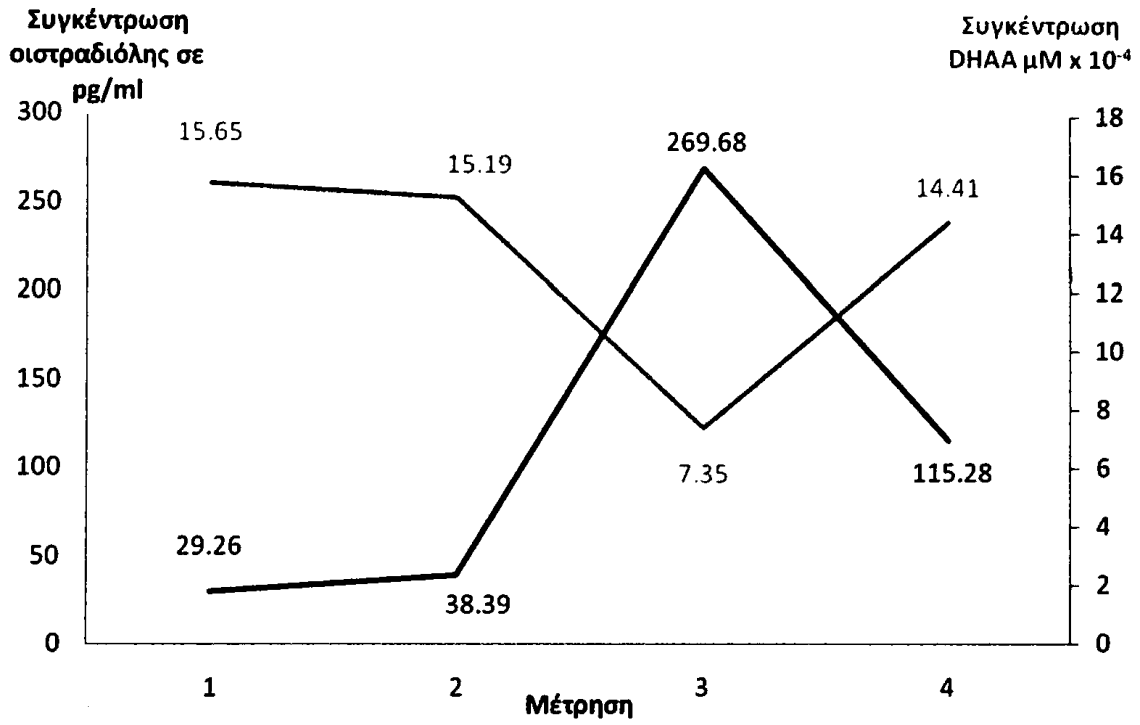
6. Τον χαλκό (Cu). Μέγιστη τιμή κατά την έμμηνο ρύση.  $P < 0,01$ .
7. Φυσικά την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη.
8. Το ουρικό οξύ (URCA). Μέγιστη τιμή κατά την μεσοωοθυλακική φάση.  $P < 0,01$ .
9. Την ολική χοληστερόλη (Chol). Μέγιστη τιμή κατά την μεσοωοθυλακική φάση.  $P < 0,01$ .
10. Την HDL χοληστερόλη (HDL). Παρουσίασε διακυμάνσεις μόνο όταν συγκρίναμε διαδοχικούς χρόνους κάθε φορά ( $P < 0,05$ ), ενώ η συνολική διακύμανση και στους 4 χρόνους ήταν στατιστικά μη σημαντική ( $P < 0,1$ ). Μέγιστη τιμή στην ωορρηξία.
11. Τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH). Μέγιστη τιμή κατά την μεσοωοθυλακική φάση.  $P < 0,01$ .

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα με τις διακυμάνσεις κάποιων από τις παραμέτρους σε σχέση με την οιστραδιόλη (για λόγους οικονομίας χώρου παραθέτουμε μόνο διαγράμματα παραμέτρων των οποίων οι τιμές εμφάνισαν στατιστική διακύμανση στους διάφορους χρόνους των μετρήσεων):

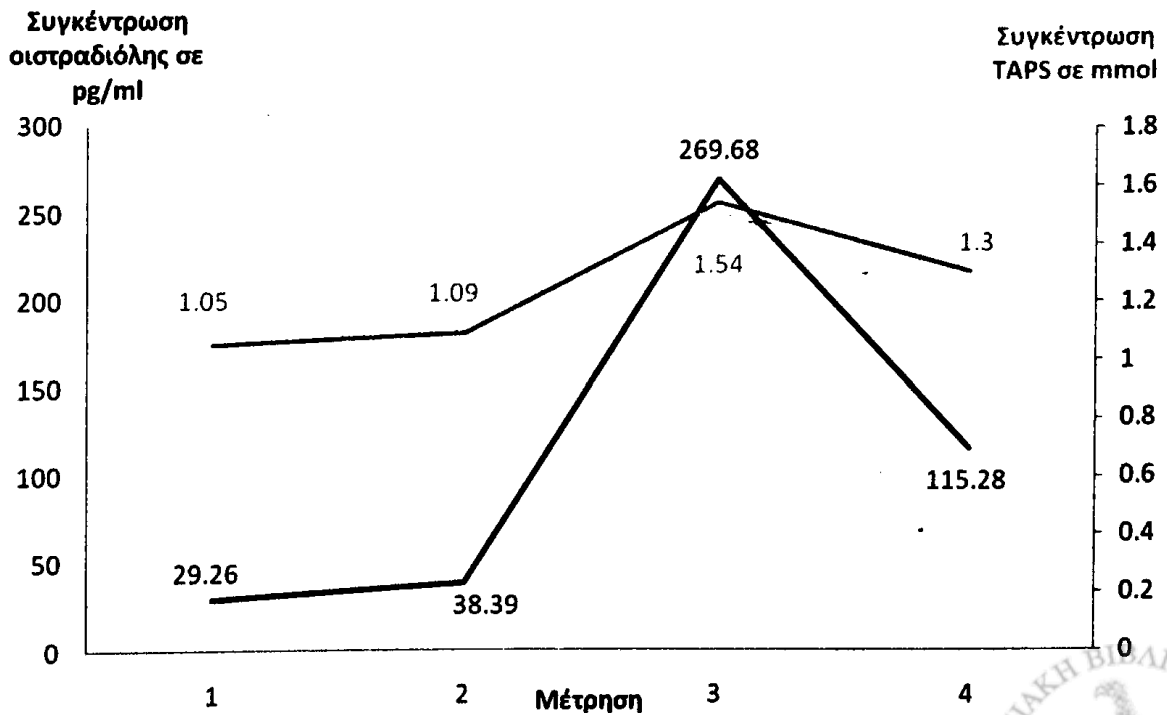
Διακύμανση συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και ασκορβικού σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



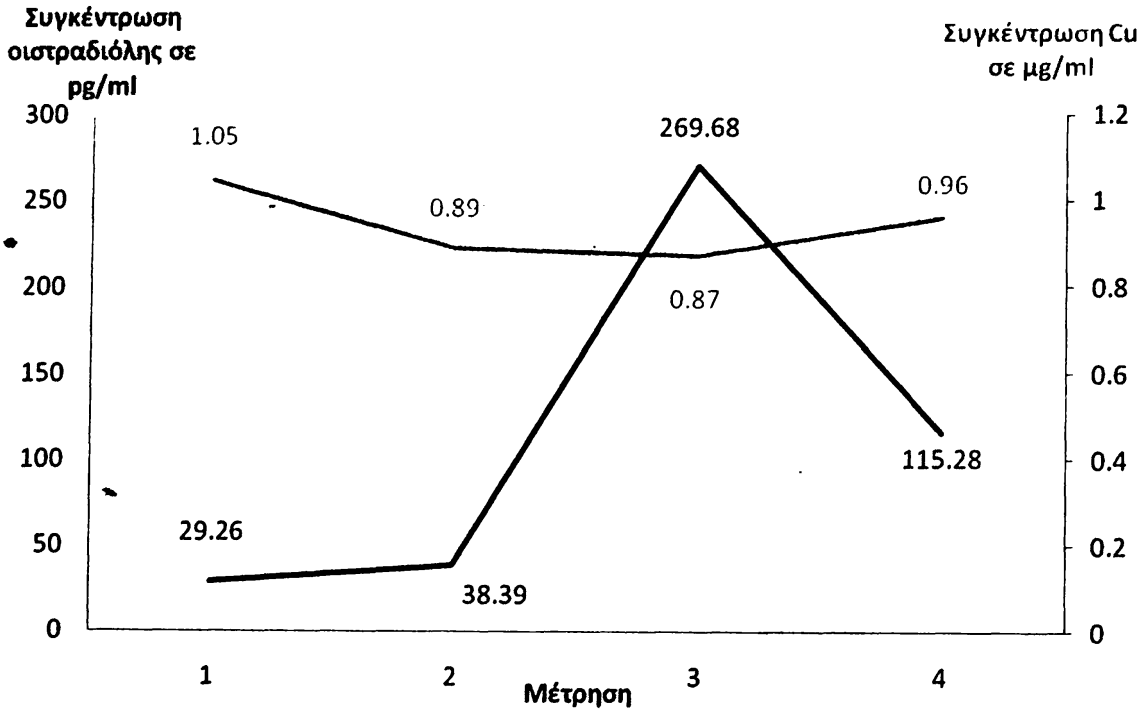
Διακύμανση συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και DHAA σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



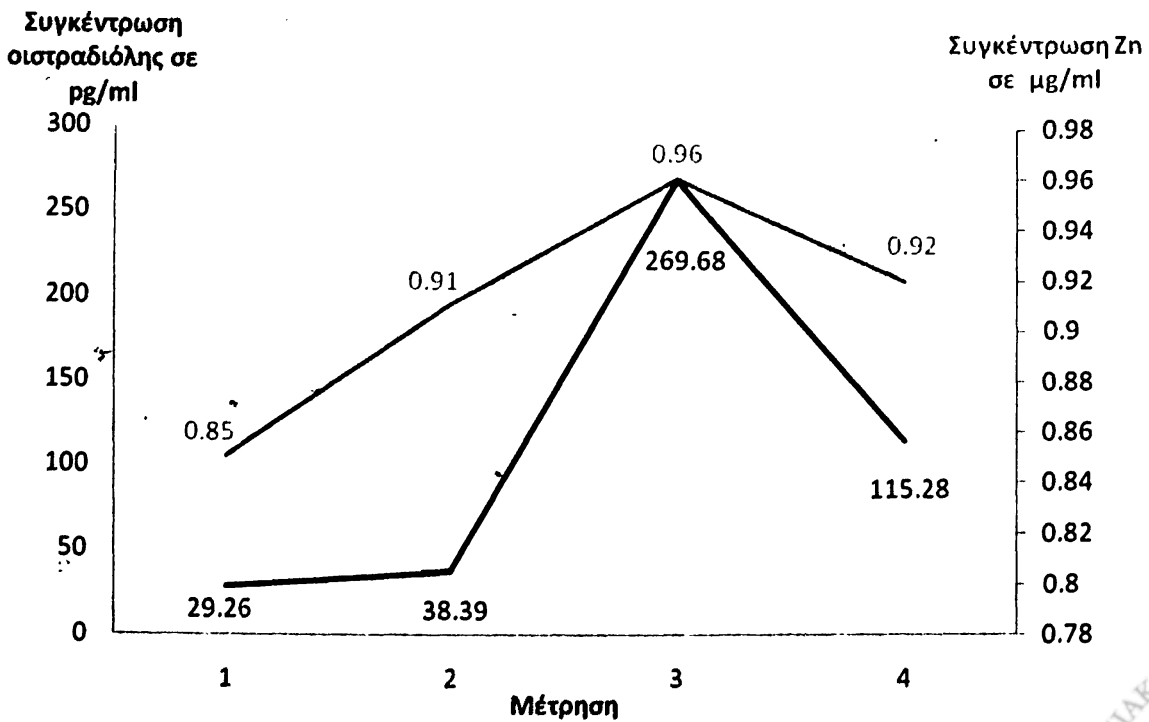
Διακύμανση συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και TAPS σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



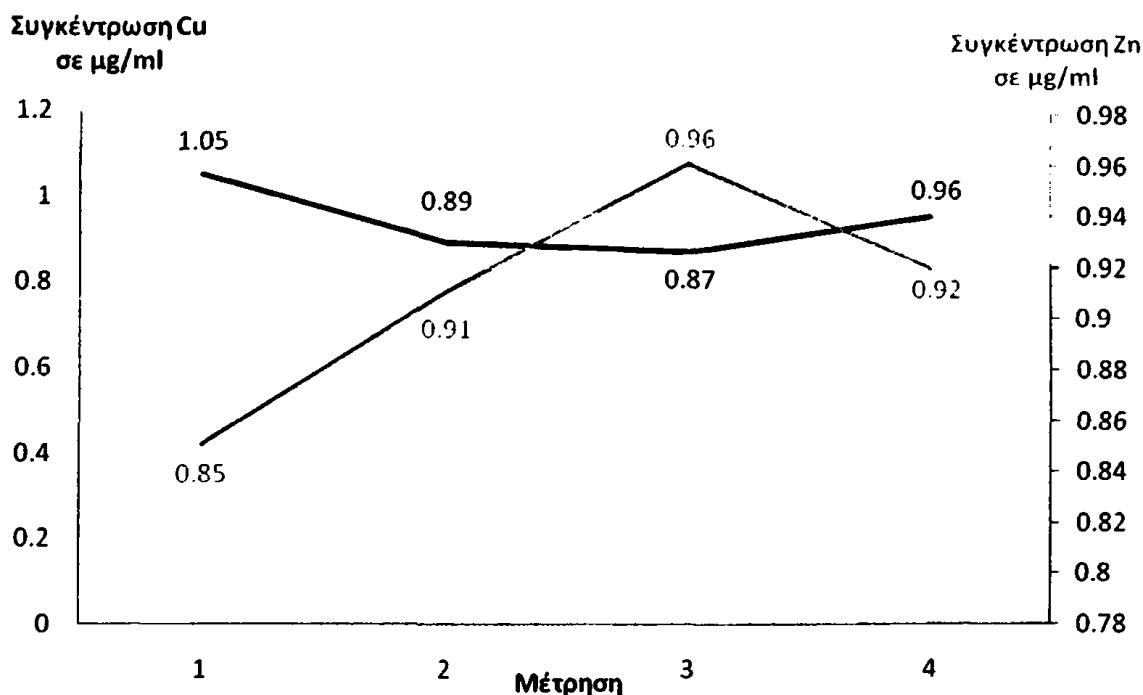
Διακύμανση συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και Cu σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



Διακύμανση συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και Zn σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



Διακύμανση συγκεντρώσεων Cu και Zn σε σχέση με τους χρόνους μέτρησης



Τελικά, και για όσες από τις βιοχημικές παραμέτρους εμφάνισαν στατιστική διακύμανση κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, υπολογίστηκαν οι συσχετίσεις (Correlations)

Από την ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική και ισχυρή συσχέτιση στα επίπεδα πλάσματος:

1. Μεταξύ οιστραδιόλης και

- του ασκορβικού. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- του δεϋδροασκορβικού. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- του λόγου AA/DHAA. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- της TAPS. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- του ψευδάργυρου. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- του χαλκού. Μετρίου βαθμού αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,5$   $p < 0,05$ )
- του ουρικού οξέος. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- της ολικής χοληστερόλης. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- της HDL χοληστερόλης. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )

Μεταξύ οιστραδιόλης και TSH δεν υπήρξε συσχέτιση.



2. Μεταξύ AA και

- DHAA. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- λόγου AA/DHAA. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- TAPS. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- ψευδάργυρου. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- χαλκού. Μετρίου βαθμού αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,5$   $p < 0,05$ )
- ουρικού οξέος. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,7$   $p < 0,05$ )
- ολικής χοληστερόλης. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- HDL χοληστερόλης. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )

3. Μεταξύ TAPS και

- DHAA. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- ψευδάργυρου. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- χαλκού. Μετρίου βαθμού αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,5$   $p < 0,05$ )
- ουρικού οξέος. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,7$   $p < 0,05$ )
- ολικής χοληστερόλης. Αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )
- HDL χοληστερόλης. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )

4. Μεταξύ ψευδαργύρου και

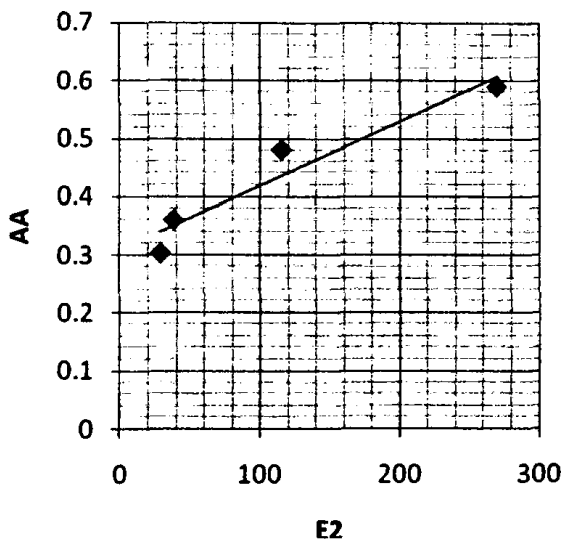
- χαλκού. Πολύ ισχυρή αρνητική συσχέτιση ( $r \geq 0,9$   $p < 0,05$ )
- ουρικού οξέος. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,7$   $p < 0,05$ )
- ολικής χοληστερόλης. Ασθενής συσχέτιση ( $r \geq 0,4$   $p < 0,05$ )
- HDL χοληστερόλης. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )

5. Μεταξύ TSH και ολικής χοληστερόλης. Θετική συσχέτιση ( $r \geq 0,8$   $p < 0,05$ )

Στο τέλος του κειμένου, σε παράρτημα, παρατίθεται αναλυτικός πίνακας με όλες τις συσχετίσεις που προέκυψαν.

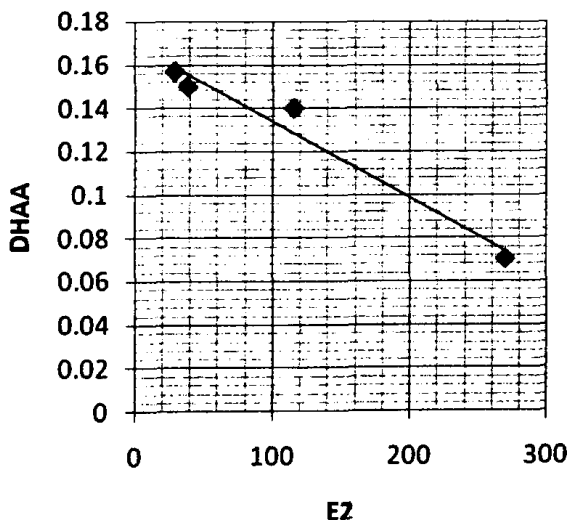
Καμία συσχέτιση δεν αναδείχθηκε μεταξύ των επιπέδων της προγεστερόνης και των υπολοίπων παραμέτρων που μετρήθηκαν.

Παρακάτω απεικονίζονται διαγραμματικά οι πλέον ενδιαφέρουσες από τις συσχετίσεις που προέκυψαν:



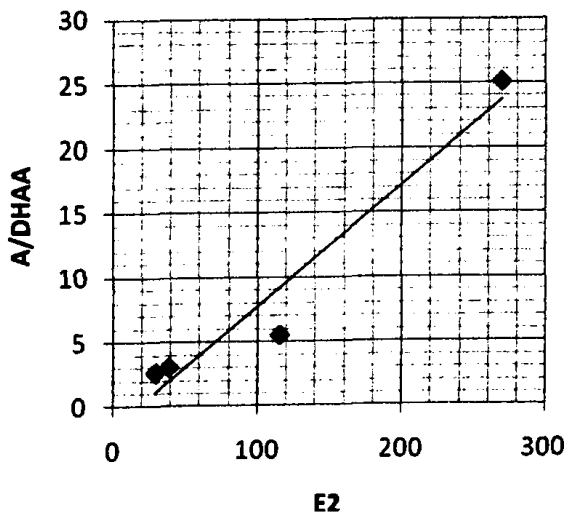
◆ Συσχέτιση E2 και Asc  
 $r = 0,96$

— Linear (Συσχέτιση E2 και Asc  $r = 0,96$ )



◆ Συσχέτιση E2 και DHAA  
 $r = -0,98$

— Linear (Συσχέτιση E2 και DHAA  $r = -0,98$ )

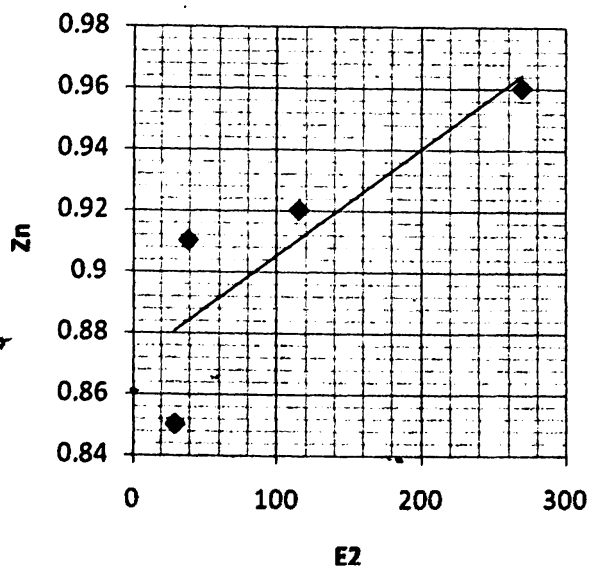
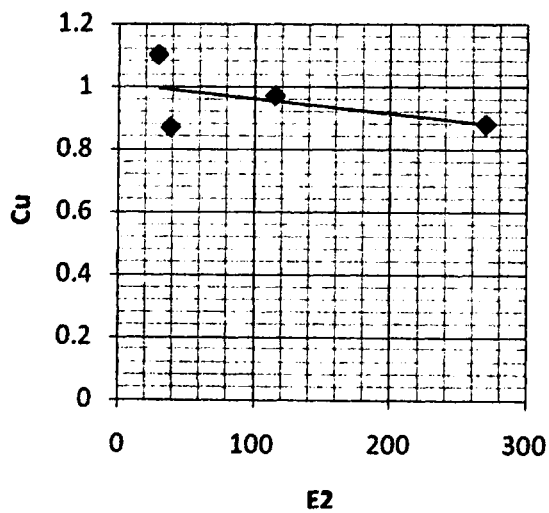
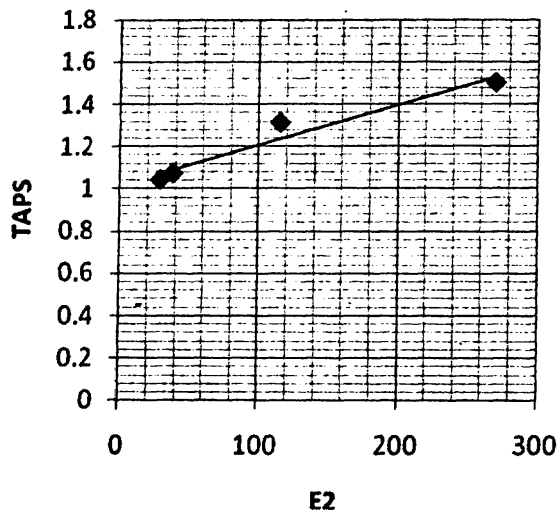


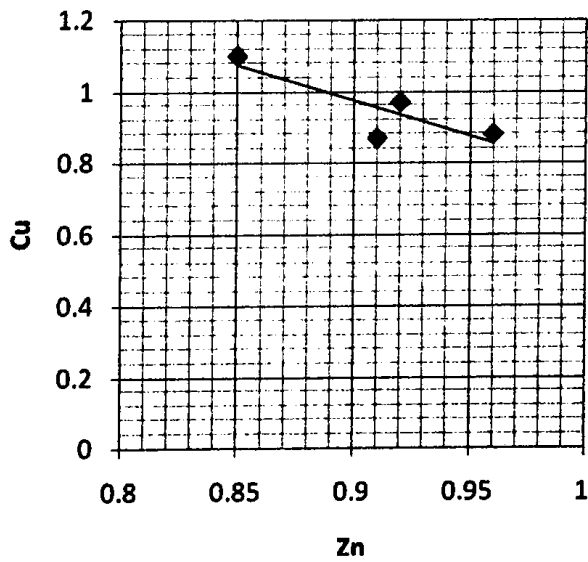
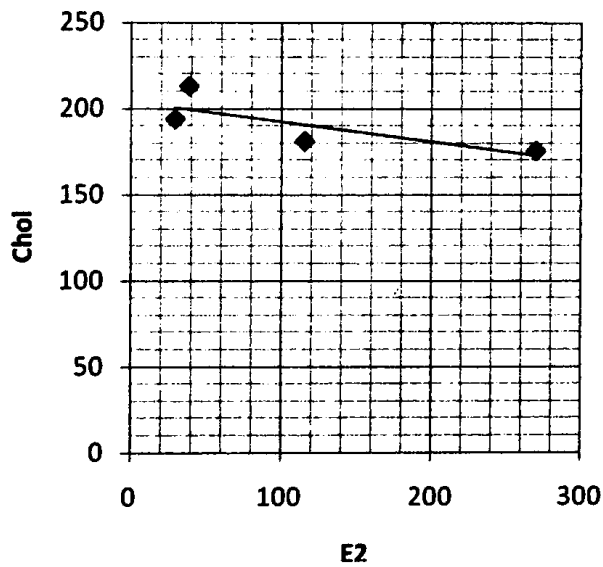
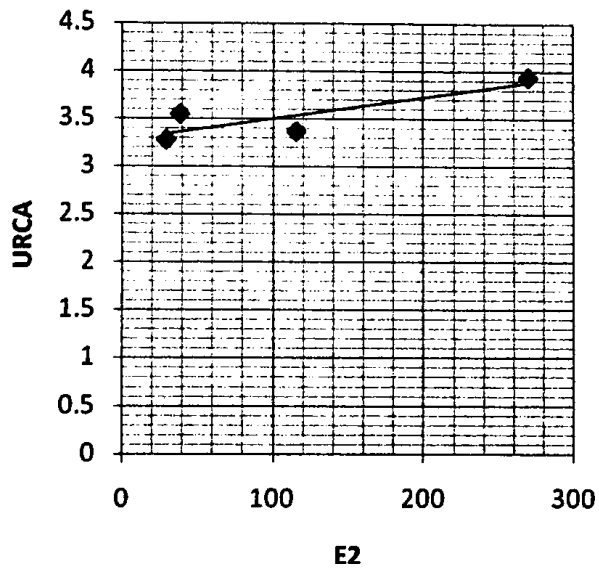
◆ Συσχέτιση E2 και A/DHAA  
 $r = 0,97$

— Linear (Συσχέτιση E2 και A/DHAA  $r = 0,97$ )









## 10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΗΜΑΣΙΑ

Είναι πλέον γνωστό ότι η οιστραδιόλη έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Όλα τα οιστρογόνα έχουν χημική δομή που διαθέτει φαινολικό δακτύλιο. Αυτή η δομή τους δίνει την δυνατότητα να προσφέρουν ένα άτομο υδρογόνου από τον φαινολικό δακτύλιο. Παράλληλα υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν ότι η αντιοξειδωτική δράση τους ενισχύεται έμμεσα λόγω του ότι επάγουν και ενισχύουν τη δράση άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της GSH-Px.

Αυτές τους οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι ανεξάρτητες των ορμονικών τους ιδιοτήτων και μάλιστα τις εκφράζουν και παραπλήσια χημικά μόρια που δεν έχουν καμία χημική συγγένεια με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Το γεγονός αυτό γίνεται προσπάθεια να αξιοποιηθεί για την χρήση μορίων που ανήκουν στην κατηγορία των οιστρογόνων αλλά δεν εμφανίζουν καθόλου ορμονικές ιδιότητες, ως ισχυρών αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά αυτά ελλείψει ορμονικών δράσεων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αφενός και στους άρρενες, αφετέρου σε υψηλότερες δόσεις και στις γυναίκες αφού είναι απαλλαγμένα από τις γνωστές παρενέργειες των κλασσικών οιστρογόνων.

Βασικό μέλος του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά αποτελεί το ασκορβικό οξύ (AA). Στα πλεονεκτήματά του είναι ότι δρα εξουδετερώνοντας τα περισσότερα οξειδωτικά μετατρεπόμενο σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHAA), διεισδύει σχετικά εύκολα ενδοκυτάρια ενώ ταυτόχρονα μπορεί να συγκεντρωθεί σε αυξημένες πυκνότητες σε περιοχές στόχους οξειδωτικού stress, αλληλεπιδρά με άλλα αντιοξειδωτικά τα οποία και ανακυκλώνει και ταυτόχρονα υπάρχει μηχανισμός ανακύκλωσης του ίδιου. Ο δείκτης του AA/DHAA θεωρείται από πολλούς ως δείκτης υγείας των ιστών και δίνει πληροφορίες για την αρτιότητα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.

Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος από την άλλη μεριά είναι ένας χρήσιμος δείκτης με την έννοια δείχνει την γενικότερη ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών.

Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση κατά την φάση της ωορρηξίας του AA, του λόγου AA/DHAA, της TAPS και του



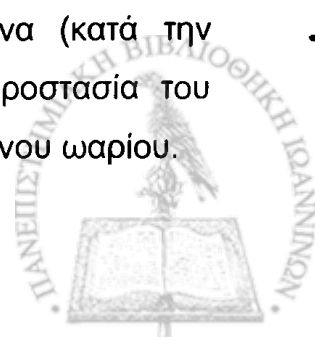
ψευδαργύρου. Ταυτόχρονα αναδείχθηκε μια πτώση στα επίπεδα στο πλάσμα του χαλκού και του DHAA, στην ίδια φάση.

Επιπλέον αναδείχθηκε μια κυκλική διακύμανση του AA, του λόγου AA/DHAA, της TAPS, του ψευδαργύρου, του χαλκού και του DHAA που ακολουθεί και συσχετίζεται με τα επίπεδα της οιστραδιόλης και μάλιστα άτομα που είχαν μεγαλύτερη διακύμανση στα επίπεδα της οιστραδιόλης εμφάνισαν και μεγαλύτερη διακύμανση στα επίπεδα των λοιπών παραμέτρων.

Για δε το AA και την TAPS, φάνηκε ότι η διακύμανση αυτή πιθανότατα οφείλεται σε ενδογενείς παράγοντες και όχι σε κάποια πιθανή διαιτητική ή άλλη εξωγενή παρεκτροπή, καθότι άτομα που εισήλθαν στην μελέτη με υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με άλλα συνέχισαν να έχουν υψηλότερα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Όλα τα παραπάνω κατά τη γνώμη μας αποτελούν σαφείς ενδείξεις ότι υπάρχει μια κυκλική διακύμανση στα επίπεδα σημαντικών προ-αντιοξειδωτικών παραμέτρων στο υγιές θήλυ κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Ο Massafra και συνεργάτες, παρατήρησε επίσης μια θετική συσχέτιση μεταξύ της κυκλικής διακύμανσης των επιπέδων οιστραδιόλης στο πλάσμα και της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Στη δική του μελέτη υπήρξε μια αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά την όψιμη ωοθυλακική περίοδο, μια περίοδο κατά την οποία εμφανίζεται και αύξηση στην ωοθηκική παραγωγή οιστραδιόλης. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν σημαντικές κυκλοεξαρθώμενες διακυμάνσεις στα επίπεδα και στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της γλουταθειόνης που περιέχεται στο ενδομήτριο (88,89).

Οι δικές μας παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η διακύμανση δεν αφορά μόνο σε μεμονωμένα ένζυμα αλλά πιθανότατα σε όλο τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Η φυσιολογική σημασία του γεγονότος αυτού θα μπορούσε να είναι πρώτον η προετοιμασία και προστασία του θήλεος σε μια περίοδο που τουλάχιστον σε τοπικό – γυναικολογικό επίπεδο εκτίθεται σε αυξημένο οξειδωτικό stress και μάλιστα επαναλαμβανόμενα κάθε μήνα (κατά την διάρκεια της ωορρηξίας) και δεύτερο η προετοιμασία και προστασία του περιβάλλοντος γονιμοποίησης και εμφύτευσης του γονιμοποιημένου ωαρίου.



Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα έχουν καθοριστικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του θήλεος και μάλιστα ότι ο μηχανισμός αυτός διαφέρει από τον αντίστοιχο του άρρενος και στο γεγονός ότι έχει κυκλική διακύμανση. Από την άλλη μεριά όμως και η οξειδωτική πίεση που δέχεται κάθε μήνα το θήλυ είναι εντονότερη, κύρια στο μικροπεριβάλλον του γεννητικού συστήματος. Όπως δείξαμε εμείς, το ισοζύγιο ως εκφράζεται από την TAPS είναι τελικά θετικό για το υγιές θήλυ, ακόμη και κατά την περίοδο που δέχεται την μέγιστη οξειδωτική πίεση. Από τα αποτελέσματα διαφαίνεται ότι υπάρχει φυλοεξαρτώμενη διαφορά των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε άρρεν και θήλυ στα θηλαστικά.

Πράγματι σε μια μελέτη σε ποντίκια καταδεικνύεται αυτή ακριβώς η διαφορά. Το μεταβολικό σύνδρομο, ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερλιπιδαιμία και υπέρταση έχει παρατηρηθεί επιδημιολογικά ότι εκφράζεται πολύ συχνότερα σε άνδρες από ότι σε γυναίκες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στον όλο παθοφυσιολογικό μηχανισμό του συνδρόμου εμπλέκεται το οξειδωτικό stress.

Στα θήλεα που νοσούν από το μεταβολικό σύνδρομο, συχνά συνυπάρχει μια σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, υπογονιμότητα και λιπώδης εκφύλιση του ήπατος και κάποιοι πιστεύουν ότι πιθανά να πρόκειται για κλινικές εκδηλώσεις του ίδιου συνδρόμου. Κοινός παρονομαστής σε όλα αυτά τα σύνδρομα είναι η αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη και η διαταραχή στην προ-αντιοξειδωτική ισορροπία σε όφελος των προοξειδωτικών που πιθανά να υποδηλώνει κάποιο ελάττωμα στο αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Πρόθεση μας στο μέλλον είναι να εστιάσουμε στα επίπεδα οιστρογόνων των θήλεων αυτών και να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση των επιπέδων με τα ανωτέρω σύνδρομα.

Οι Busserolles και συν. χρησιμοποίησαν ένα πειραματικό μοντέλο μεταβολικού συνδρόμου σε ποντίκια που σιτίζονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη. Με τον τρόπο αυτό νωρίτερα είχε αποδειχτεί ότι σε αρσενικά ποντίκια του συγκεκριμένου μοντέλου προκαλούνταν μεταβολικό σύνδρομο και ταυτόχρονα εμφάνιζαν οξειδωτικό stress. Στο μοντέλο τους χρησιμοποίησαν τρεις σειρές ποντικιών, φυσιολογικά αρσενικά, φυσιολογικά θηλυκά και ωοθηκεκτομημένα θηλυκά. Η πρόθεσή τους ήταν να ελέγξουν αν η



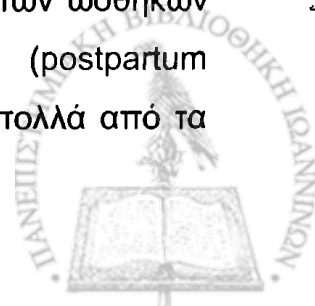
επιδημιολογική παρατήρηση θα παρατηρούνταν και στο μοντέλο (αν δηλαδή τα αρσενικά ποντίκια θα ήταν πιο εκτεθειμένα στο οξειδωτικό stress και στην εκδήλωση του συνδρόμου από τα θηλυκά) και αν θα υπήρχε διαφορά ανάμεσα στα φυσιολογικά και στα ωθηκεκτομημένα θήλεα. Τελικά εμφάνισαν το σύνδρομο τόσο τα αρσενικά, όσο και τα ωθηκεκτομημένα ποντίκια ενώ τα φυσιολογικά θηλυκά φάνηκε να προστατεύονται γεγονός που αποδόθηκε στα οιστρογόνα (90).

Εάν αποδειχθεί ότι η διαφορά αυτή εκφράζεται κυρίως στο επίπεδο των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της οιστραδιόλης και εφόσον οι ιδιότητες αυτές είναι εντελώς ανεξάρτητες της ορμονικής της δράσης θα μπορούσε ίσως μελλοντικά να αξιοποιηθεί το γεγονός αυτό για τον σχεδιασμό ή την χρήση ήδη υπαρχόντων μορίων (πχ φυτοοιστρογόνων, κατεχολοιστρογόνων κτλ) ως ισχυρών αντιοξειδωτικών.

Η κυκλική διακύμανση της ισχύος του αντιοξειδωτικού μηχανισμού θα πρέπει πλέον να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη (κατά την άποψη μας) στον σχεδιασμό στο μέλλον μελετών πάνω στο οξειδωτικό stress με αντικείμενα μελέτης θήλεα. Οι διάφορες μετρήσεις, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, θα πρέπει να γίνονται σε στιγμές που τα θήλεα θα βρίσκονται σε παρόμοιες φάσεις στον κύκλο. Αλλιώς ο κίνδυνος παραγωγής αντιφατικών συμπερασμάτων είναι μεγάλος, όπως ήδη έχει συμβεί με διάφορες μελέτες.

Ενδιαφέρον ακόμη θα είχε η μελέτη διαφόρων νοσημάτων (πχ προεμμηνορρυσιακό σύνδρομο) που εκφράζουν την συμπτωματολογία τους κυκλικά και ο έλεγχος πιθανής συσχέτισης με ανωμαλίες στη φυσιολογική διακύμανση των οιστρογόνων που θα μπορούσε να σημαίνει διαταραχή στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό.

Επίσης ενδιαφέρον αντικείμενο προς μελέτη αποτελεί πιθανή εμπλοκή - ανεπάρκεια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού ως αιτιολογικού παράγοντα στην παθοφυσιολογία νόσων που σχετίζονται ή συμβαίνουν ταυτόχρονα με σημαντικές ή/και απότομες μεταβολές των επιπέδων οιστρογόνων όπως για παράδειγμα στην φαρμακευτική ωθηκεκτομή, στην διέγερση των ωθηκών (σύνδρομο διέγερσης ωθηκών), ή μετά των τοκετό (postpartum cardiomyopathy, επιλόχεια κατάθλιψη κτλ). Σημειωτέον ότι σε πολλά από τα



προαναφερθέντα σύνδρομα/νόσους υπάρχουν ήδη ενδείξεις αν όχι αποδείξεις για την συμμετοχή του οξειδωτικού stress στην παθοφυσιολογία τους.

Τέλος, άξια αναφοράς είναι τα υψηλά επίπεδα DHAA στην ωχρινική φάση του κύκλου αν και από τις υπόλοιπες παραμέτρους διαφαίνεται επάρκεια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, το οποίο κατά την άποψή μας είναι ένδειξη παραγωγής οξειδωτικού stress. Αυτό πιθανότατα οφείλεται όπως έχουν προτείνει νωρίτερα προηγούμενες μελέτες στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS από το ωχρό σωματίο και ειδικά κατά την εκφύλιση του.

Στα θηλαστικά ο χαλκός και ο ψευδάργυρος απορροφώνται κυρίως από το λεπτό έντερο. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι ειδικά για τον ψευδάργυρο υπάρχουν ειδικοί μεταφορείς (Zinc transporters). Οι μελέτες αυτές έχουν βοηθήσει κάπως στην κατανόηση του μηχανισμού απορρόφησης του ψευδαργύρου, όχι όμως και του τρόπου και του μηχανισμού που αυτός κατανέμεται στο ανθρώπινο σώμα. Ο μεταφορέας Zn-T1 εδράζει κύρια στο εγγύς λεπτό έντερο και είναι πρωτεΐνη. Δεν είναι απολύτως βέβαιο αν ο ρόλος του στην ομοιοστάση του ψευδαργύρου είναι κυρίως στην απορρόφηση ή στην ενεργητική έκκρισή του (91,92). Ένας άλλος μεταφορέας που φαίνεται να εμπλέκεται είναι ο DCT1 ο οποίος φαίνεται να είναι μη ειδικός και να βοηθάει στην απορρόφηση και άλλων ιχνοστοιχείων (93).

Για τον χαλκό δύο φαίνεται να είναι οι μηχανισμοί απορρόφησης του. Ο ένας προϋποθέτει τη σύνδεση του χαλκού με αμινοξέα. Στην συνέχεια τα σύμπλοκα αυτά απορροφούνται και φτάνουν στο ήπαρ. Ο βασικότερος όμως μηχανισμός φαίνεται να είναι η απορρόφησης του μέσω σύνδεσης σε 2 πρωτεΐνες υποδοχείς. Η μια είναι η υπεροξειδιοδισμουτάση και η κύρια είναι με μια πρωτεΐνη του εντερικού βλεννογόνου που έχει χαρακτηριστικά μεταλλοθειονίνης. Φαίνεται αρχικά να αποθηκεύεται στις πρωτεΐνες αυτές και εν συνεχεία να απελευθερώνεται σταδιακά στην κυκλοφορία (94, 95).

Όπως και να χει πάντως από το γεγονός ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης τόσο του χαλκού όσο και του ψευδαργύρου στη δίαιτα μειώνεται το ποσοστό απορρόφησης τους ότι και η απορρόφηση και των δυο μετάλλων υπόκεινται σε κορεσμό πράγμα που υποδηλώνει μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς.

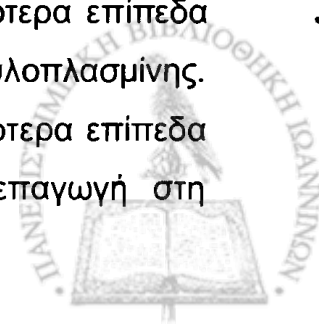
Ο χαλκός και ο ψευδάργυρος είναι δυο μέταλλα που δρουν ανταγωνιστικά το ένα ως προς το άλλο και το αυτό ισχύει στην απορρόφησή τους. Μάλιστα στον ανταγωνισμό αυτό ο «αδύναμος» είναι ο χαλκός γιατί η χημική συγγένεια του ψευδαργύρου ως προς τους μεταφορείς είναι μεγαλύτερη εκτοπίζοντας τελικά τον χαλκό από τις θέσεις σύνδεσης. Κλινικά το γεγονός αυτό χρησιμοποιείται από παλιά, για παράδειγμα σε παθολογικές καταστάσεις όπου υπάρχει αυξημένη απορρόφηση χαλκού (ή μειωμένη αποβολή) δίαιτα πλούσια σε ψευδάργυρο ώστε να μπλοκαριστεί η απορρόφηση χαλκού (96, 97).

Σημαντικό ρόλο στην διακίνηση του ψευδαργύρου και του χαλκού φαίνεται να παίζουν και οι μεταλλοθειονίνες, πρωτεΐνες που βρίσκονται κύρια ενδοκυττάρια και δεσμεύουν μέταλλα. Με αυτό τον τρόπο φαίνεται να δημιουργείται μια ενδοκυττάρια αποθήκη μετάλλων.

Αναφορικά με την ομοίωση του χαλκού τα πράγματα είναι πιο ξεκάθαρα. Μόλις απορροφηθεί από το έντερο, το μεγαλύτερο ποσοστό συνδέεται με την πρωτεΐνη σερουλοπλασμίνη και ένα μικρότερο ποσοστό με άλλες λευκωματίνες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι πλούσια και στις 2 αυτές πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό ο χαλκός μεταφέρεται στο ήπαρ όπου και αποθηκεύεται.

Έχει αποδειχτεί ότι οι συγκεντρώσεις χαλκού ανάμεσα στα δυο φύλα είναι στατιστικά σημαντικές με υπεροχή της συγκέντρωσης του χαλκού στα θήλεα. Επίσης μελέτες δείχνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις χαλκού σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά που περιέχουν οιστρογόνα σε σχέση με αυτές που δεν λαμβάνουν και σε εγκύους σε σχέση με μη. Τέλος σε εμμηνοπαυσιακές ηλικίες δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις του χαλκού ανάμεσα στα 2 φύλα (98).

Δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη αν η διαφορά οφείλεται σε αυξημένη απορρόφηση, ή σε διαφορετική κατανομή του αποθηκευμένου χαλκού. Αυτό όμως που έχει δείχθει είναι ότι κύριο ρόλο στην διαφορά αυτή παίζει η συγκέντρωση των οιστρογόνων. Οι γυναίκες εκτός από υψηλότερα επίπεδα χαλκού έχουν και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σερουλοπλασμίνης. Συνδυετικός κρίκος σε όλες αυτές τις καταστάσεις είναι τα υψηλότερα επίπεδα οιστρογόνων. Φαίνεται ότι τα οιστρογόνα προκαλούν μια επαγωγή στη





αύνθεση σερουλοπλασμίνης από το ήπαρ με αποτέλεσμα είτε την αυξημένη απορρόφηση χαλκού είτε την διαφορετική του κατανομή με κινητοποίηση του χαλκού από το ήπαρ και κυκλοφορία του στο αίμα. Η φυσιολογική σημασία του γεγονότος αυτού παραμένει αδιευκρίνιστη.

Τόσο ο χαλκός όσο και ο ψευδάργυρος επηρεάζουν τα αναπαραγωγικά όργανα τόσο άμεσα με τον ρυθμιστικό τους ρόλο στην έκκριση ορμονών και κύρια την GnRH και των γοναδοτροφινών αλλά και έμμεσα με την συμμετοχή τους και την τροποποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Με βάση προηγούμενες παρατηρήσεις η αύξηση των επιπέδων του χαλκού προκαλεί αύξηση στο ρυθμό έκκρισης της FSH και της LH (97).

Στη δική μας μελέτη παρατηρήσαμε καταρχάς μια αύξηση στα επίπεδα του χαλκού μετά το peak στις συγκεντρώσεις των οιστρογόνων. Αυτή η αύξηση θα μπορούσε να αποδοθεί στην επαγωγή σερουλοπλασμίνης από τα οιστρογόνα που μεταφράζεται με κάποια καθυστέρηση με αύξηση των επιπέδων του χαλκού.

Αντίθετα ο ψευδάργυρος εμφανίζει την αντίθετη ακριβώς πορεία από τα επίπεδα του χαλκού. Η άνοδος των επιπέδων του ακολουθεί χρονικά την άνοδο των επιπέδων του χαλκού. Αυτό, παρά τον ανταγωνιστικό τους ρόλο, έχει παρατηρηθεί και προηγουμένως και μια θεωρία είναι η κινητοποίηση και έξοδος του ψευδαργύρου από τα κύτταρα προκειμένου να αντιμετωπιστεί το αυξημένο stress λόγω των υψηλών του χαλκού. Μια άλλη λογική εξήγηση είναι η άνοδος του ψευδαργύρου να αντανακλά μια πραγματική αύξηση λόγω αυξημένης επαναρρόφησης από το λεπτό σαν απάντηση στην προσπάθεια για αυξημένη αποβολή χαλκού.

Από αντιοξειδωτικής άποψης, ακόμη και αν οι αρχικές αυτές διακυμάνσεις δεν οφείλονται απευθείας σε προ-αντιοξειδωτικά συμβάντα έρχονται πάρα πολύ «βολικές» για τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό: η διακύμανση του ψευδαργύρου ταυτίζεται με του υπόλοιπου αντιοξειδωτικού μηχανισμού και είναι στα υψηλότερα επίπεδα όταν η οξειδωτική πίεση στο θήλυ είναι η μέγιστη.

Από ορμονικής άποψης και σε σχέση με τα επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου, τα συμβάντα στον έμμηνο κύκλο έχουν ως εξής με βάση τις παρατηρήσεις μας: τα αυξημένα επίπεδα του χαλκού στην αρχή του κύκλου



ακολουθούνται με κάποια καθυστέρηση από υψηλά επίπεδα FSH, LH, E<sub>2</sub>. Εν ,  
συνεχεία τα επίπεδα του χαλκού πέφτουν για να ξανανέβουν μετά από την  
άνοδο των οιστρογόνων στα μέσα του κύκλου. Διαφαίνεται δηλαδή μια ακόμη  
κυκλική ρύθμιση στον έμμηνο κύκλο. Το ερώτημα που μένει να απαντηθεί είναι  
αν οι αυξομειώσεις του χαλκού είναι αποτέλεσμα των αυξομειώσεων στα  
οιστρογόνα, ή αν αντίθετα η αιτία μέσω της θετικής δράσης του χαλκού στην  
GnRH, που με τη σειρά της επηρεάζει θετικά τα επίπεδα FSH LH, που  
αυξάνουν τα επίπεδα οιστρογόνων.



## 11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήσαμε σημαντικές παραμέτρους του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του θήλεος όπως αυτές μεταβάλλονται κατά την διάρκεια του φυσιολογικού έμμηνου κύκλου.

- Προέκυψαν ενδείξεις για σημαντική συμμετοχή της οιστραδιόλης στο μηχανισμό αυτό. Η διακύμανση των επιπέδων της οιστραδιόλης φάνηκε να επηρεάζει το σύνολο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του θήλεος.

Η φυσιολογική σημασία αυτού του γεγονότος είναι μεγάλη γιατί τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης ενισχύουν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό κατά το διάστημα του κύκλου που ο θήλυ είναι περισσότερο εκτεθειμένο σε αυτό. Το αυξημένο οξειδωτικό stress σε επίπεδο ωοθηκών που εμφανίζεται φυσιολογικά κατά την ωορρηξία και κατά την ωχρινική φάση του κύκλου είναι απολύτως απαραίτητο για την αναπαραγωγική ικανότητα του θήλεος και είναι σημαντική η ύπαρξη προστατευτικού μηχανισμού, όπως αυτός εκφράζεται μέσω των αυξημένων επιπέδων οιστραδιόλης κατά το ίδιο χρονικό διάστημα.

Το γεγονός ότι η οιστραδιόλη επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του θήλεος θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στο σχεδιασμό μελλοντικών μελετών.

Στη δική μας μελέτη είδαμε ότι όταν η οιστραδιόλη είναι στα υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα κατά τη διάρκεια του κύκλου οι παράγοντες που μετρήσαμε (δηλαδή ασκορβικό, TAPS και ο λόγος ασκορβικού προς δεϋδροασκορβικό) είναι επίσης στα υψηλότερα επίπεδα.

Αναφορικά με τα μέταλλα χαλκό και ψευδάργυρο είδαμε ότι τα επίπεδά τους κινούνται αντίθετα (όταν ο χαλκός είναι στα υψηλότερα ο ψευδάργυρος είναι στα κατώτερα και αντίστροφα) γεγονός αναμενόμενο με δεδομένο τον ανταγωνισμό μεταξύ τους. Είδαμε επίσης ότι υπήρχε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην διακύμανση των επιπέδων του καθενός με την διακύμανση των επιπέδων της οιστραδιόλης. Με τις παρούσες γνώσεις δεν μπορέσαμε να ερμηνεύσουμε ποια από τις δυο διακυμάνσεις είναι η αιτία και ποια το αποτέλεσμα δηλαδή αν η μεταβολή στα επίπεδα οιστραδιόλης είναι αυτή που προκαλεί την διακύμανση στα μέταλλα ή αντιστρόφως.

Η διακύμανση των επιπέδων των μετάλλων δεν φαίνεται επίσης να σχετίζεται σε αιτιολογικό επίπεδο άμεσα με τις μεταβολές του αντιοξειδωτικού μηχανισμού παρόλο που φαίνεται ότι τελικά τον εξυπηρετεί.



## 12. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Τα οιστρογόνα εκτός από τον κλασσικό τους ρόλο ως στεροειδικές ορμόνες διαθέτουν και σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε για να μελετηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό του υγιούς θήλεος κατά τις διάφορες φάσεις του φυσιολογικού έμμηνου κύκλου και να διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση των επιπέδων οιστραδιόλης με αντιοξειδωτικές παραμέτρους όπως το ασκορβικό και το δεϋδροασκορβικό οξύ, η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος. Μελετήσαμε επίσης τις διακυμάνσεις των επιπέδων δυο μετάλλων με κεντρικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ισορροπία του χαλκού και του ψευδάργυρου και τις συσχετίσεις των διακυμάνσεων με αυτές της οιστραδιόλης.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε 13 γυναίκες με φυσιολογικό έμμηνο κύκλο. Μετρήθηκαν όλες οι ανωτέρω παράμετροι και επιπλέον τα επίπεδα της προγεστερόνης και της ωοθυλακιότροπου και ωχρινότροπου ορμόνης σε τέσσερις χρόνους (κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα εμμηνορρυσίας, κατά το μέσο της ωοθυλακικής φάσης, κατά την ωορρηξία και κατά το μέσο της ωχρινικής φάσης). Υπολογίσαμε επίσης για κάθε μια μέτρηση και τον λόγο του ασκορβικού προς του δεϋδροασκορβικού οξέος.

Είδαμε μια στατιστικά σημαντική βαθμιαία αύξηση στα επίπεδα του ασκορβικού ( $p < 0,01$ ), του λόγου του AA/DHAA ( $p < 0,001$ ) και της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης πλάσματος ( $p < 0,05$ ) από την 1<sup>η</sup> ημέρα εμμηνορρυσίας ως την ωορρηξία. Ταυτόχρονα σημειώθηκε μια στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων του δεϋδροασκορβικού ( $p < 0,05$ ). Οι μεταβολές της οιστραδιόλης συσχετίστηκαν σημαντικά και θετικά με το ασκορβικό οξύ ( $p < 0,05$   $r < 0,5$ ), το λόγο AA/DHAA ( $p < 0,05$   $r < 0,5$ ) και την ολική αντιοξειδωτική κατάσταση πλάσματος ( $p < 0,05$   $r < 0,8$ ) σε όλες τις φάσεις του έμμηνου κύκλου.

Είδαμε ακόμη μια στατιστικά σημαντική βαθμιαία πτώση των επιπέδων του χαλκού από την 1<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου προς την ωορρηξία ( $p < 0,05$ ) και μια αύξηση αντίστοιχα στα επίπεδα του ψευδαργύρου ( $p < 0,05$ ) στο ίδιο διάστημα. Οι μεταβολές των μετάλλων εμφάνισαν επίσης στατιστικά σημαντική



συσχέτιση με τις μεταβολές στα επίπεδα της οιστραδιόλης ( $p < 0,05$   $r < 0,5$  και για τα 2) θετική για τον ψευδάργυρο και αρνητική για το χαλκό.

Συμπερασματικά ανιχνεύσαμε ενδείξεις για αυξημένη αντιοξειδωτική προστασία του θήλεος κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας και της μεσωχρινικής φάσης. Οι μεταβολές αυτές φαίνεται να σχετίζονται και να οφείλονται στην ταυτόχρονη άνοδο των επιπέδων της οιστραδιόλης.



### 13. SUMMARY IN ENGLISH

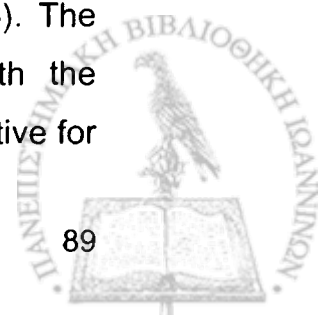
Estrogens apart from their classic role as steroid hormones also possess significant antioxidant properties. The present study was undertaken to assess the antioxidant potential of the female during the various menstrual phases and to investigate the correlation between Ascorbic Acid, Dehydroascorbic Acid plasma levels, Total Antioxidant plasma Status and Estradiol levels.

We studied also the fluctuations of the concentrations of two key metals in the oxidant – antioxidant balance, Copper and Zinc, and the possible correlations to Estradiol levels.

In this purpose thirteen eumenorrhic women were studied. Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid plasma levels, Total Antioxidant plasma Status, Estradiol, Progesterone, Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone, Copper and Zinc during time of menstruation, midfollicular phase, time of ovulation and midluteal phase were determined. Ascorbic-Dehydroascorbic Acid ratio was also calculated.

A progressive significant rise in Ascorbic Acid plasma levels ( $p < 0.01$ ), Ascorbic-Dehydroascorbic Acid ratio ( $p < 0.001$ ) and Total Antioxidant plasma Status ( $p < 0.05$ ) from menstruation to ovulation was observed. Moreover, a significant decrease in Dehydroascorbic Acid was found at the same phases ( $p < 0.05$ ). Changes of Estradiol levels, during the menstrual cycle, correlated positively with the changes of Ascorbic Acid levels and Total Antioxidant plasma Status ( $p < 0.05$ ). Furthermore, Estradiol levels correlated positively with Ascorbic Acid levels ( $p < 0.05$   $r < 0.5$ ), Ascorbic-Dehydroascorbic Acid ratio ( $p < 0.05$   $r < 0.5$ ) and Total Antioxidant plasma Status ( $p < 0.05$   $r < 0.8$ ) in all menstrual phases.

We noticed also a progressive statistical significant fall in the concentrations of Copper from menstruation to ovulation ( $p < 0.05$ ) with a simultaneously progressive rise in the concentrations of Zinc ( $p < 0.05$ ). The changes of both metals correlated also statistically significant with the changes in the concentrations of Estradiol ( $p < 0.05$ ,  $r < 0.5$  for both), positive for Zinc and negative for Copper.



Conclusively an elevated antioxidant protection during the ovulation, and midluteal phase appears to be present in the eumenorrhoeic women. Moreover we observed a cyclic variation in the antioxidant parameters we assayed in the females at the present study, which could be due to the cyclic changes in E<sub>2</sub> levels.





## 14. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

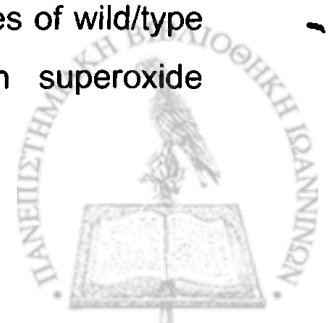
1. Gilbert DL (ed) (1981). Perspective on the history of oxygen and life. In: *Oxygen and the Living Process: An Inter-disciplinary Approach*. Springer Verlag, New York, pp 1-43.
2. Harman D (1956). Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
3. McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
4. Halliwell B (1997). Free Radicals and Human Disease – Trick or Treat. In: *Oxygen Radicals and the Disease Process*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 1-14.
5. Cao G, Prior RL (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 44: 1309-1315.
6. Halliwell B, Gutteridge J (1999). Oxygen is a toxic gas – An introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publications, London, pp 1-35.
7. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073.
8. Engelhart JF (1999). Redox-mediated gene therapies for environmental injury: Approaches and concepts. *Antiox Redox Signal* 1: 5-27.
9. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28: 1387-1404
10. Sen CK (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36: 1-30.
11. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Kovacic P (1998). Phagomimetic action of antimicrobial agents. *Free Radic Res* 28: 1-14.
12. Wolin MS (2000). Interactions of oxidants with vascular signalling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1430-1442.
13. Saugstad OD (2001). Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13: 147-153.

14. Stepens NG, Parsons A, Schonfield PM, et al. (1996). Randomised, controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347: 781-786.
15. Rapola JM, Virtamo J, Eipatti S, et al. (1997). Randomized trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 349: 1715-1720.
16. Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, et al. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Cur Op Clin Nutr Met Care* 3: 373-384.
17. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, et al. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human non-functional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 269: 13685-13688.
18. Nishikimi M, Yagi K. (1996). Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem* 25: 17-39.
19. Levine M, Rumsey SC, Wang Y et al. (2000). Vitamin C. In *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. W B Saunders, Philadelphia, pp 541-567.
20. Biskind GR, Glind D. (1936) Studies on Histochemistry. V. The Vitamin C concentration of the corpus luteum with reference to the stage of the estrous cycle and pregnancy. *J Biol Chem* 113: 27-34
21. Buettner GR, Moseley PL. (1993). EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free Radic Res Commun* 19: 89-93.
22. Bielski BH, Righter HW, Chan PC. (1975). Some properties of the ascorbate free radical. *Ann N Y Acad Sci* 258: 231-237.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol*. 186: 1.
24. Rose R, Bode AM. (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J*. 7: 1135-1142.

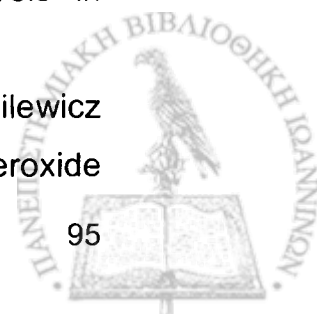


25. Buettner GR. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-543.
26. Gohil K, Packer L, Lumen B, et al. (1986). Vitamin E deficiency and vitamin C supplements: exercise and mitochondrial oxidation. *J Appl Physiol* 74: 1986-1991.
27. Wefer H, Sies H. (1988). The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174: 766-773.
28. Chevion S. (1998) Ph.D.thesis (The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem)
29. Etspüler H, Kaup Y, Bailyes EM, et al. (1994). Monoklonal antibodies recognize 2300 years aged alkaline phosphatase. *Immunol Lett* 48: 187-191.
30. Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk D, Sies H (2003). Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 133: 1448-1451.
31. Galaris D, Evangelou A (2002). The role of oxidative stress in metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 42: 93-103.
32. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem J* 333: 291-300.
33. Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* 448: 301-303.
34. Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000). Epidermal growth factor receptor – dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275: 14624-14631.
35. Ostrakovitch EA, Lordnejad MD, Schliess F, Sies H, Klotz LO (2002). Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 397: 232-239.

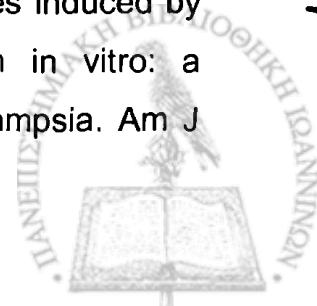
36. Murata M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S (1999). Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol* 180: 105-113.
37. Giedroc DP, Chen X, Apuy JL (2001). Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function and regulation. *Antiox Redox Signal* 3: 577-596.
38. Palmiter RD (1994). Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1219-1223.
39. Persoon-Rother M, van der Valk-Kokshoorn EJM, Egas-Kenniphaas JM, et al (1989). Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1285–1291.
40. Powell SR, Aiuto L, Hall D, Tortolani AJ (1995). Zinc-supplementation enhances the effectiveness of St. Thomas No. 2 cardioplegic solution in an in vitro model of hypothermic cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110: 1642–1648.
41. Hegenauer J, Saltman P, Fairchild R, Halasz NA (1991). Improved function of reperfused rabbit kidney following administration of zinc histidine. *J Trace Elem Exp Med* 4:103–107.
42. Tons C, Klosterhalfen B, Klein HM, et al (1997). Induction of heat shock protein 70 (HSP70) by zinc bis (DL-hydrogen aspartate) reduces ischemic small-bowel tissue damage in rats. *Langenbecks Arch Chir* 382:43–48.
43. Kadoya C, Domino E, Yang GY, Stern JD, Betz AL (1995). Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26:1035–1038.
44. Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA (1992). Atomic structures of wild/type and thermostable mutant recombinant human Cu, Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6109-6113.



45. Lichtlen P, Schaffner W (2001). Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioassays* 23: 1010-1017.
46. Palmiter RD (1994). Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci Usa* 91: 1219-1223.
47. Samet JM, Graves LM, Quay J, et al (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 277:L551-L558.
48. Wu W, Graves LM, Jaspers I et al (1999). Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 277: 924-931.
49. Powell SR (2000). The antioxidant properties of Zinc. *J Nutr* 130: 1447-1454.
50. Moosman B, Behl C (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Biochem* 96: 8867-8872.
51. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M et al (1993). Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J of Clin Endocrinol and Metabol* 77: 1095-1097.
52. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M (1987). Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 210: 37-39.
53. Ayres S, Ablanalp W, Liu JH, Subbiah R (1998). Mechanisms involved in the protective effect of Estradiol-17 $\beta$  on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J of Physiol* 274: E1002-E1008.
54. Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I, Farina G (1997). Effects of estradiol and medroxyprogesterone-acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. *J Clin Endocrin Metabol* 82: 173-175.
55. Bednarek-Tupikowska G, Bohdanowicz-Pawlak A, Bidzińska B, Milewicz A, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R (2001). Serum lipid peroxide



- levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrin* 15(4): 258-303.
56. Ayres Sa, Tang M, Subbiah MTR (1996). Estradiol-17 $\beta$  as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* 128: 367-375.
  57. Yagi K, Komura S (1986). Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochem Int* 13: 1051-1055.
  58. Aten RF, Duarte KM, Behrman HR (1992). Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidation by LH and prostaglandin F<sub>2a</sub>. *Biol Reprod* 46: 401-407.
  59. Guarnaccia MM, Takami M, Jones EE et al (2000). LH depletes ascorbic acid in preovulatory rat follicles. *Fertil Steril* 74: 959-63.
  60. Riley JCM, Behrman HR (1991). In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinol* 128: 1749-53
  61. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S (2001). Oxidative Stress and the Ovary. *J Soc Gynecol Investig* 8: S40-2
  62. Musicki B, Kodaman PH, Aten RF Behrman HR (1996). Endocrine regulation of ascorbic acid transport and secretion in luteal cells. *Biol Reprod* 54: 399-406.
  63. Behrman HR, Preston SL, Aten RF et al (1996). Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells.
  64. Malek A, Sager R, Schneider H (2001). Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. *Placenta* 22: 45-50
  65. Bilodeau JF, Hubel CA (2003). Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 25: 742-750
  66. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ (2004). Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol* 164: 1049-1061.



67. Banerjee S, Smallwood A, Moorhead J, Chambers AE, Papageorghiou A, Campbell S, Nicolaides K (2005). Placental expression of Interferon-gamma (IFN-gamma) and its receptor (IFN-gamma) R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in pre-eclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 944-952.
68. Bedaiwy MA, Falcone T (2003). Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Ginecol* 55: 333-345.
69. Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Gurdol F, Korkmaz D, Buyru F (2004) Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 57: 214-217.
70. Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H (2002). Nuclear factor-kappa B is required for tumor necrosis factor-alpha-induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3845-3850.
71. Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y (2004) Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2alpha production through nuclear factor-kappa B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev* 50:215-225.
72. Zbucka M, Koda M, Tomaszewski J, Przystupa W, Sulkowski S, Wolczynski S (2004) Angiogenesis in the female reproductive processes. *Ginekol Pol* 75: 649-657.
73. Krussel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simon C (2003) Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110: 2-9.
74. Sherer DM, Abulafia O (2001) Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 22: 1-13.
75. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH(2003) Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 66: 24-31.
76. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB (1996) Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes:

- possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. J Clin Endocrinol Metab 81: 353-359.
77. Bausero P, Cavaille F, Meduri G, Freitas S, Perrot-Applanat M (1998) Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis* 1998, 2: 167-182
  78. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, Anderson LD, Udoff LC, Pepe GJ (2003) Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 18: 2039-2047.
  79. Ushio-Fukai M, Alexander RW (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264: 85-97.
  80. Eyries M, Collins T, Khachigian LM (2004) Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress. *Endothelium* 11: 133-139.
  81. Ekerhovd E, Brannstrom M, Alexandersson M, Norstrom A (1997) Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Hum Reprod* 12: 301-305.
  82. Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ, Imthurn B (1996) Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* 2: 607-612.
  83. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ (1995) Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* 10: 1786-1790.
  84. Norman JE, Thompson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT (1999). Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Mol Hum Reprod* 5: 175-181.
  85. Sun X, Qiu X, Gemzell-Danielsson K (2003). Effects of mifepristone on expression of endothelial nitric oxide synthase in human endometrium during the implantation phase. *Fertil Steril* 80: 1454-60.





86. Shaamash AH, Zakhari MM (2005). Increased serum levels of nitric oxide metabolites among users: a possible role in progestin-induced bleeding. *Hum Reprod* 20: 302-306.
87. Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, Zaloudek CJ, Ecker JL, Riemer RK (1997). A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest* 99: 2502-2508.
88. Massafra C, Gioia D, De Felice C, Picciolini E, De Leo V, Bonifazi M, et al. (2000) Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* 167: 447-452.
89. Serividio G, Loverro G, Vicino M, Prigigallo F, Grattagliano I Altomare E, et al. (2002) Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: Relation with sex hormones. *J Clin Endocrinol Metabol* 87: 2843-2848.
90. Busserolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y. (2002) Metabolic syndrome in the rat: Females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med (Maywood, N.J.)* 227(9): 837-842.
91. Krebs N. (2000) Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. *J Nutr* 130: 1374S – 1377S.
92. McMahon RJ, Cousins RJ (1998) Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary Zinc. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4841-4846.
93. McMahon RJ, Cousins RJ (1998) Mammalian Zinc transporters. *J Nutr* 128: 667-670.
94. Gaetke L, Chow CK. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
95. Wapnir A (1998) Copper absorption and Bioavailability. *Am J Clin Nutr (suppl)* 67: 1054S-1060S.
96. Burch R, Hahn H, Sullivan J (1975) Newer aspects of the role of Zinc, Manganese, Copper in Human Nutrition. *Clin Chem* 21/4: 501-520.
97. Tsanadis G, Sotiriadis A, Vezyraki P, Kalfakakou V et al (2003) FSH, TSH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> changes in relation to plasma copper and zinc alterations

- during D-penicillamine administration in female Wistar rats. *Nutr Res* 23: 111-116.
98. Johnsson P, Milne D, Lykken G (1992) Effects of age and sex on Copper absorption, biological half-life and status in humans. *Am J Clin Nutr* 56: 917-25.
  99. Luck M, Jeyaseelan I, Scholes R. (1995). Ascorbic acid and Fertility. *Biol Reprod* 52: 262-266.
  100. Ayres SA, Tang M, Subbiah M. (1996). Estradiol-17 $\beta$  as an antioxidant. Some distinct features when compared with common fat soluble antioxidants. *J Lab Clin Med.* 128: 367-75.
  101. Subbiah M, Kessel B, Agrawal R et al. (1993). Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 1095-8.
  102. Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P et al. (2005). Estrogen A-ring structure and antioxidative effect on lipoproteins. *J Ster Biochem Mol Biol.* 96: 271-8.
  103. Sack M, Rader D, Canon III. (1994). Oestrogen and inhibition of oxidation of low density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet.* 343: 269-70.
  104. Manus J, Eney J, Thompson W et al. (1997). The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low density lipoprotein in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 135 73-81.
  105. Brussaard H, Gevers-Leuven J, Kluft C. (1997). Effect of 17 $\beta$ -estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal women with type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 324-330.
  106. Mattson M, Tomaselli K, Rydel R. (1993) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated  $\beta$ -amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res* 621: 35-49.
  107. Goodman Y, Bruce A, Cheng B. (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury and amyloid  $\beta$ -peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 66: 1836-44.



108. Reyes M, Sifuentes-Alvarez A, Lazalde B. (2006) Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol.* 85: 1090-93
109. Gridley K, Green P, Simpkins J. (1998) A novel, synergistic interaction between 17 $\beta$ -estradiol and glutathione in the protection of neurons against  $\beta$ -amyloid 25-35 induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol.* 54: 874-880.
110. Ayres S, Abplanalp W, Liu J et al. (1998) Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 $\beta$  on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol.* 274: E1002-1008.
111. Arteaga E, Rojas A, Villaseca P. (2000) The effect of 17- $\beta$  estradiol and alpha-tocopherol on the oxidation of LDL cholesterol from menopausal women and the minor effect of gamma-tocopherol and melatonin. *Menopause* 7(2): 112-6
112. Bednarek-Tupikowska G, Bohdanowicz-Pawlac A, Bidzinska B et al. (2001) Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women *Gynecol Endocrinol.* 15(4): 298-303.

## 15. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Oxidative Stress during the menstrual cycle. The effects of Estradiol**, 7th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility, Athens, Greece, April 14 - 17, 2005 (*POSTER PRESENTATION*)
2. Michos C, Karkabounas S, Evangelou A, Kiortsis D: **Oxidative Stress during the menstrual cycle. The effects of Estradiol on the levels of Ascorbic and Dehydroascorbic acid plasma levels and on Total Antioxidant Plasma Status in healthy human females during the menstrual cycle**, 31<sup>st</sup> Greek Endocrinology and Metabolism Conference, Athens, Greece, 18 – 20 March 2004
3. Michos C, Kiortsis D, Evangelou A, Karkabounas S. **Antioxidant protection during the menstrual cycle: The effects of Estradiol on ascorbic – dehydroascorbic acid plasma levels and Total Antioxidant plasma Status in eumenorrhoeic women during the menstrual cycle**. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 2006;85(8):960-5
4. Michos C, Kalfakakou V, Karkabounas S, Kiortsis D, Evangelou A. **Changes in Copper and Zinc plasma concentrations during the normal menstrual cycle**. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, 2007

ORIGINAL ARTICLE

## Antioxidant protection during the menstrual cycle: the effects of estradiol on ascorbic–dehydroascorbic acid plasma levels and total antioxidant plasma status in eumenorrhoeic women during the menstrual cycle

CONSTANTINOS MICHOS, DEMETRIOS N. KIORTSIS, ANGELOS EVANGELOU & SPYRIDON KARKABOUNAS

Laboratory of Physiology, University of Ioannina, School of Medicine, Ioannina, Greece

### Abstract

**Background.** Estrogens, apart from their classic role as steroid hormones, also possess significant antioxidant properties. The present study was undertaken to assess the antioxidant potential of the female during the various menstrual phases and to investigate the correlation between ascorbic acid, dehydroascorbic acid plasma levels, total antioxidant plasma status, and estradiol levels. **Design and methods.** Thirteen eumenorrhoeic women were studied. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid plasma levels, total antioxidant plasma status, estradiol, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during time of menstruation, midfollicular phase, time of ovulation, and midluteal phase were determined. Ascorbic–dehydroascorbic acid ratio was also calculated. **Results.** A progressive significant rise in ascorbic acid plasma levels ( $p < 0.01$ ), ascorbic–dehydroascorbic acid ratio ( $p < 0.001$ ), and total antioxidant plasma status ( $p < 0.05$ ) from menstruation to ovulation was observed. Moreover, a significant decrease in dehydroascorbic acid was found at the same phases ( $p < 0.05$ ). Changes of estradiol levels during the menstrual cycle correlated positively with the changes of ascorbic acid levels and total antioxidant plasma status ( $p < 0.05$ ). Furthermore, estradiol levels correlated positively with ascorbic acid levels ( $p < 0.05$ ,  $r < 0.5$ ), ascorbic–dehydroascorbic acid ratio ( $p < 0.05$ ,  $r < 0.5$ ), and total antioxidant plasma status ( $p < 0.05$ ,  $r < 0.8$ ) in all menstrual phases. **Conclusions.** An elevated antioxidant protection during ovulation and the midluteal phase appears to be present in eumenorrhoeic women. Moreover we observed a cyclic variation in the antioxidant parameters we assayed in the females in the present study, which could be due to cyclic changes in estradiol levels.

**Key words:** free radicals, antioxidants, estradiol, total antioxidant plasma status (TAPS), ascorbic acid

**Abbreviations:** AA: ascorbic acid, AA/DHAA ratio: ascorbic to dehydroascorbic acid ratio, DHAA: dehydroascorbic acid, E2: estradiol, GSH: glutathione, GSH-Px: glutathione peroxidase, Prg: progesterone, ROS: reactive oxygen species, TAPS: total antioxidant plasma status

### Introduction

It is well established that free radicals are produced continuously during cellular metabolism. They are implicated in a wide range of disease processes. Free radicals have been considered as initiators of damage in almost every cellular component (1–3). In the female reproductive system they play various significant roles in the uterine environment, oocyte maturation, ovulation, and corpus luteum function and regression (4). Antioxidant defenses consist of

two main lines: the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (GSH-Px) and smaller antioxidant molecules such as ascorbic acid (AA), urate, tocopherols, carotenoids, vitamin A, several flavonoids, etc. They work synergistically to detoxify the human body from the produced free radicals and to maintain an optimal redox balance (5,6). The total of these defenses is reflected by the total antioxidant plasma status (TAPS), a measure of peroxy scavenging capacity (3).

Correspondence: Constantinos Michos, Department of Obstetrics-Gynecology, Gävle Sjukhus, 80187 Gävle. E-mail: constantinos.michos@lg.se

(Received 19 January 2005; accepted 10 May 2005)

ISSN 0001-6349 print/ISSN 1600-0412 online © 2006 Taylor & Francis  
DOI: 10.1080/00016340500432812



AA is present in the body as ascorbate monoanion, which is capable of offering electrons to neutralize other highly reactive radicals before converting itself into a free radical. It is converted, by the detoxification process, to dehydroascorbic acid (DHAA), which in turn is recycled, through nonenzymatic and enzymatic recycling mechanisms, back to AA (7-10).

It is well established *in vitro* and *in vivo* that estrogens, apart from their classical role as steroid hormones, also possess antioxidant properties, which are independent of their hormonal ones (11-18).

To the best of our knowledge, no study has explored the effects of estrogens on plasma levels of AA, DHAA, and TAPS during the menstrual cycle in eumenorrhic women. In the present study we investigated whether the physiological fluctuations of  $E_2$  and progesterone (Prg) plasma concentrations during the menstrual cycle affect the levels of AA, DHAA, and TAPS in eumenorrhic women.

## Materials and methods

### Subjects

The study population consisted of 13 eumenorrhic women (age range 21-30, mean age 24.1) with a history of regular menstrual cycles, 27-31 days of duration. A detailed medical and gynecological history was obtained to exclude subjects with recent acute or chronic illness and assess the regularity of menses. All the subjects had normal thyroid biology. All subjects had a body mass index less than  $25 \text{ kg/m}^2$ . None of them was permitted to be on any type of medication or nutritional supplements that contained vitamins or substances commonly assumed to be antioxidants during the study. An experienced dietician consulted the subjects during the study. Intensive physical exercise was not permitted throughout the experimental period. All subjects were nonsmokers. Subjects with recent pregnancy, termination of pregnancy, or on hormonal contraception (free history for at least six months was essential) were also excluded. An informed consent was obtained from each volunteer and the study received ethical approval.

### Study design

Blood samples were taken between 8 a.m. and 9 a.m., from the antecubital vein, after overnight fasting on day 1 of the menstrual cycle (time 1), at the midfollicular phase (time 2), at ovulation (time 3), and at the midluteal phase (time 4).

### Assays

The following parameters were determined immediately after blood uptake: full blood count and plasma concentrations of glucose, urea, creatinine, potassium, sodium, total and direct bilirubin, urate, triglycerides, total cholesterol, and high density lipoprotein cholesterol, using techniques previously described (19). The rest of each sample was collected in tubes containing EDTA and was immediately centrifuged (3,000 rpm, for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ ). Aliquots of the plasma sample were placed in vacuum tubes and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further assays were performed, protected from oxidation and desiccation.

All other assays took place in a single matrix, at the end of the study period (50 days). Free triiodothyronine, free thyroxine, thyroid-stimulating hormone,  $E_2$ , Prg, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone levels were determined by radio immune assay (RIA) as previously described (20,21).

TAPS was determined by a colorimetric method using the kit provided by Randox (TAS, Cat. No. NX2332, Randox Laboratories, San Francisco, USA). By this method a chromogen (ABTS<sup>®</sup>) is incubated with a peroxidase and  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce the radical cation ABTS<sup>®</sup>•<sup>+</sup>, which has a stable blue green color measured at 600 nm. Antioxidants in the added sample cause suppression of this color proportional to their concentrations (22).

A common colorimetric method with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was used for the determination of total AA and DHAA. In this method, AA is first oxidized to DHAA that reacts with DNPH to form a hydrazone derivative, which can be measured colorimetrically at 515 nm. For the determination of DHAA the oxidation of AA is omitted. A calibration curve of absorbance versus total AA or DHAA concentration in the standard was constructed and the concentration in each sample was read directly from the calibration curve. The difference between total AA and DHAA content corresponded to the content of AA (23).

### Statistical analysis

All results are expressed as means  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed by repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by the least significant difference (LSD) test. For parameters with skewed distribution, Friedman ANOVA test followed by the Wilcoxon signed-rank test was used. To assess correlations the Pearson and Spearman correlation coefficients were calculated. A



$p$  value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

The mean duration of the menstrual cycle was  $29 \pm 1$  (mean  $\pm$  SD) days (27–31 days). The duration of the menses was  $4 \pm 1$  days (mean  $\pm$  SD). All women examined had, according to their past history, a regular ovulatory cycle.

- Table I shows AA, DHAA,  $E_2$ , and Prg plasma concentrations and TAPS during the menstrual cycle. The changes in  $E_2$ -AA,  $E_2$ -DHAA, and  $E_2$ -TAPS during the various menstrual cycle phases are shown in Figures 1, 2 and 3 respectively.

Significant changes were observed in AA levels between times 1 and 3 ( $p < 0.01$ ), times 1 and 4, and between times 2 and 3. The highest AA levels were observed at the time of ovulation. Significant changes were also observed in DHAA between times 1 and 3, times 2 and 3, and times 3 and 4. The lowest levels were observed at the time of ovulation. TAPS showed significant changes between times 1 and 3 and between times 2 and 3 (highest levels at the time of ovulation). For all the above-mentioned significant changes,  $p < 0.05$  unless otherwise stated. Statistically significant differences were also observed for AA/DHAA ratios between times 1 and 3, times 2 and 3, and between times 3 and 4 ( $p < 0.001$ ).

Significant correlations were observed between plasma levels of AA and  $E_2$  ( $r = 0.5$ ,  $p < 0.05$ ), TAPS and  $E_2$  concentrations ( $r = 0.5$ ,  $p < 0.05$ ), and between AA plasma levels and TAPS ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.01$ ) at time 1. Similar correlations were found in all the menstrual phases. The changes of  $E_2$  levels during the various phases of the menstrual cycle correlated positively with the changes of AA and the changes of TAPS ( $p < 0.05$  for all changes).

A positive correlation was found between the levels of AA and TAPS at time 1 (baseline) with their levels at time 2, 3, and 4 i.e. subjects with higher levels of AA and TAPS on day one main-

tained higher levels throughout the whole study period ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.01$ ).

No significant correlation was observed between Prg levels and AA levels or TAPS.

## Discussion

It is well known that  $E_2$  possesses antioxidant properties. All estrogens have a chemical structure similar to phenolic compounds. This chemical structure makes them capable of offering hydrogen from their phenol-hydroxyl ring. Therefore they possess reactive oxygen species (ROS)-scavenging, chain-breaking, antioxidant activity (12–14). Another mechanism might also contribute to  $E_2$  antioxidant properties, as data exist suggesting a synergistic antioxidant interaction between  $E_2$  and glutathione (GSH) (24). A further indirect mechanism by which  $E_2$  acts as an antioxidant seems to be a positive modulation of natural cellular antioxidant enzymes activity (in particular the intracellular GSH-Px activity) (15). Thus  $E_2$  acts as an antioxidant by both nonenzymatic and enzymatic mechanisms (16), directly and indirectly. These properties are general to estrogens and are independent of their hormonal activity (13).

AA is part of the antioxidant defense mechanism against ROS in humans. It is a reducing agent trapping a variety of free radicals including the peroxy radicals (25). It easily penetrates into cells and accumulates near targets of ROS and detoxifies from highly reactive radicals by its conversion to DHAA (the oxidized form of AA) (26). An efficient recycling between the oxidized and the reduced form of AA is extremely important for the pro-oxidant-antioxidant balance (8). The ratio of AA/DHAA is referred to as an index of tissue health status and of efficacy of antioxidant potential of the organism (10). It is a simple but informative parameter that reflects the recent oxidative history of the system, as well as its antioxidant capacity to combat future challenge. It has been shown to reflect changes in the antioxidant system of human subjects (27–29).

Table I. Estradiol, progesterone, ascorbic acid (AA), dehydroascorbic acid (DHAA) plasma concentrations and total antioxidant plasma status (TAPS) of our subjects at the first day of menstruation (time 1), at the midfollicular phase (time 2), at ovulation (time 3), and at the midluteal phase (time 4).

	Time 1 (day 1 of cycle)	Time 2 (midfollicular)	Time 3 (ovulation)	Time 4 (midluteal)
Estradiol (pg/ml)	29.26 $\pm$ 17.23	38.39 $\pm$ 20.38	269.68 $\pm$ 39.72	115.28 $\pm$ 27.49
Progesterone (pg/ml)	906.70 $\pm$ 169.72	865.80 $\pm$ 215.81	1,818.30 $\pm$ 641.7	10,195 $\pm$ 177.82
AA (M)	30.30 $\pm$ 19.04	35.62 $\pm$ 25.19	59.06 $\pm$ 22.92	47.99 $\pm$ 6.44
DHAA (M $\times 10^{-2}$ )	15.65 $\pm$ 10.44	15.19 $\pm$ 7.10	7.35 $\pm$ 8.13	14.41 $\pm$ 9.14
TAPS (mM)	1.05 $\pm$ 0.49	1.09 $\pm$ 0.46	1.53 $\pm$ 0.47	1.30 $\pm$ 0.49

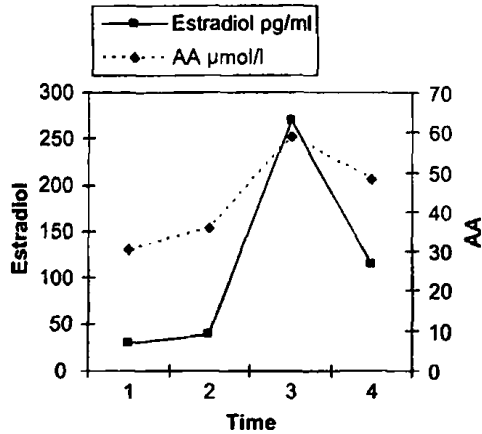


Figure 1. Concentrations of estradiol and ascorbic acid (AA) of our subjects at the first day of menstruation (time 1), at the midfollicular phase (time 2), at ovulation (time 3), and at the midluteal phase (time 4).

TAPS indicates the total antioxidant capacity of plasma at the time of plasma collection. Although the ROS-producing enzymes determine how many free radicals are produced, it is the antioxidant system which determines whether these ROS are in excess, which class of molecules they will oxidize, and what pathological changes they will produce. TAPS reflects the balance between oxidants and antioxidants that are present in plasma, as a total (30). TAPS is affected positively by the relative contributions of all the various antioxidants. It is affected negatively by the oxidative stress of free radicals. For a given level of antioxidants in plasma, increased production of ROS will result in a reduced

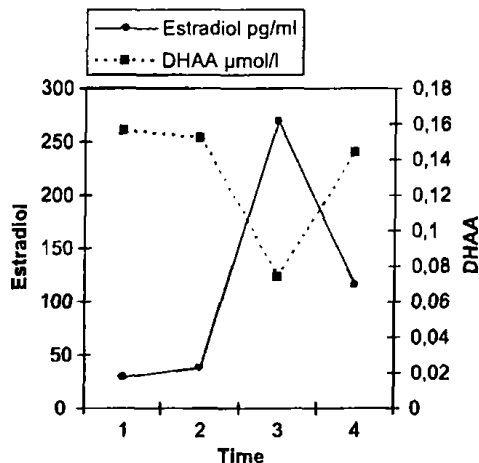


Figure 2. Concentrations of estradiol and dehydroascorbic acid (DHAA) of our subjects at the first day of menstruation (time 1), at the midfollicular phase (time 2), at ovulation (time 3), and at the midluteal phase (time 4).

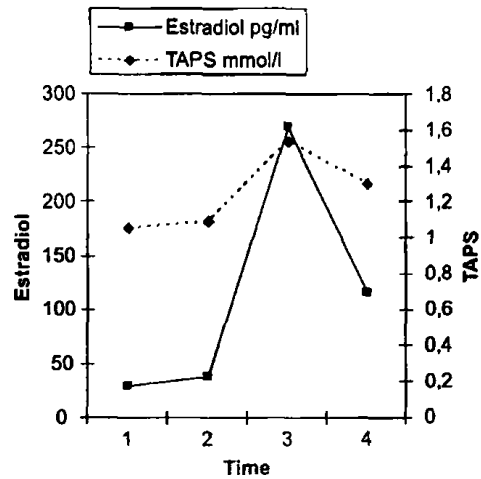


Figure 3. Estradiol concentrations and total antioxidant plasma status (TAPS) of our subjects at the first day of menstruation (time 1), at the midfollicular phase (time 2), at ovulation (time 3), and at the midluteal phase (time 4).

TAPS level and vice versa. There are several methods for analyzing the total antioxidant status as reviewed by Alho and Leinonen (31). In the present study we used ABTS-based analysis. Each method of assessment of antioxidant status has its own limitations (32–34).

In the present study a significant rise at the time of ovulation in comparison to menstruation and mid-follicular phase was observed regarding AA levels, AA/DHAA ratio, and TAPS.

The changes of these parameters, during the cycle, correlated positively with the respective changes in E<sub>2</sub> plasma levels. Moreover, a significant correlation was found between E<sub>2</sub> concentration and TAPS, AA levels, as well as AA/DHAA ratio in these eumenorrhic women in all menstrual phases. These findings may suggest that the elevated antioxidant protection observed in our subjects during ovulation and the midluteal phase might be due to the changes in the levels of E<sub>2</sub>.

Massafra et al. observed a positive correlation between physiologic cyclic changes in E<sub>2</sub> plasma levels and variations in erythrocyte GSH-Px activity during the menstrual cycle. They have found an increase of erythrocyte GSH-Px activity from the late follicular phase, a period in which there is a progressive increase of the ovarian production of estrogen (35). Furthermore it has been previously reported that significant cycle-dependent changes in endometrial GSH-Px and GSH occur (36). Our results extend these observations and indicate that E<sub>2</sub> plasma levels do not only affect a single enzyme but the entire antioxidant system.





It seems also that  $E_2$  might be responsible for important sex-related differences in the human antioxidant defense system. It might protect the female from the oxidative stress in each menstrual cycle (37–39).

DHAA was significantly higher at menstruation and at the midfollicular phases. This could be because of the lower levels of  $E_2$  in these phases. Despite relatively high antioxidant levels through the midluteal phase, DHAA had also significantly higher levels at this phase in comparison to its levels at ovulation. This could indicate an increased oxidative stress of the female during this period. Indeed, several studies have demonstrated that ROS are generated in luteal tissue during natural and prostaglandin-induced regression in several species (40,41).

No correlation was found between Prg levels and the antioxidant parameters measured. These results are in accordance with previous studies suggesting that Prg does not exert any significant antioxidant effects (42).

It remains yet to be proved if our observations reflect an additional physiological role of  $E_2$  in ovulation resulting from its antioxidant properties. Indeed evidence exists that when follicle maturation progresses,  $\alpha$ -tocopherol and AA concentrations in follicular fluid increase (43). It would also be of interest to investigate any link between abnormal  $E_2$  alterations in the menstrual cycle, reduced antioxidant protection, and conditions which exert their symptoms periodically (for example PMS) or conditions that have been already linked with a pro-oxidant-antioxidant imbalance (polycystic ovary syndrome, metabolic syndrome etc.) (44,45). Our observations could also be of interest in the physiology/pathophysiology of pregnancy and miscarriage. There is evidence that the preimplantation embryo produces ROS that are implicated in defective embryo development and miscarriage. An intact antioxidant defense may be important during oocyte maturation in order to allow the embryo to acquire the aptitude to develop (46,47).

In conclusion, in eumenorrhic women, there is an increase in AA levels as well as AA/DHAA ratio and TAPS during ovulation and the midluteal phase, suggesting an elevated antioxidant protection at these periods. Moreover we observed a cyclic variation in the antioxidant status in the female, which could be attributed to the cyclic changes in  $E_2$  levels.

## References

1. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.* 1988;63:390–408.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119:598–620.
3. Wang X, Rainwater D, VandeBerg J, Mitchell B, Mahaney M. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1190–5.
4. Riley JCM, Behrmann HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991;198:781–91.
5. Halliwell B, Gutteridge J. In: Halliwell B, Gutteridge J, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 105–7.
6. Halliwell B. In: Thomas C, Kalyanaraman B, editors. *Oxygen Radicals and Disease Process*, first edition. Amsterdam: OPA-Harwood Academic Publishers; 1997. p. 1–14.
7. Bendich A, Machlin IJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DD. The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med.* 1986;2:419.
8. Halliwell B, Gutteridge J. In: Halliwell B, Gutteridge J, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 200–8.
9. Wolf G. The mechanism of uptake of ascorbic acid into osteoblasts and leukocytes. *Nutr Rev.* 1995;54:150.
10. Hunt JV. In: Harris RJ (ed) *Subcellular Biochemistry*, Vol. 25: *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*. New York: Plenum Press, 1995: 369.
11. Subbiah MTR, Kessel B, Agrawal M, Rajan R, Abplanalp W, Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1993;77:1095–7.
12. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1987;210:37–9.
13. Moosman B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *J Neurosci.* 1999;96:8867–72.
14. Ayres S, Abplanalp W, Liu JH, Subbiah R. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 $\beta$  on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol.* 1998;274:E1002–8.
15. Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I, Farina G. Effects of estradiol and medroxyprogesterone-acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhic women. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1997;82:173–5.
16. Bednarek-Tupikowska G, Bohdanowicz-Pawlak A, Bidzinska B, Milewicz A, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2001;15(4):258–303.
17. Ayres Sa, Tang M, Subbiah MTR. Estradiol-17 $\beta$  as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med.* 1996;128:367–75.
18. Yagi K, Komura S. Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochem Int.* 1986;13:1051–5.
19. Kiortsis DN, Milionis H, Bairaktari E, Elisaf M. Efficacy of combination of atorvastatin and micronised fenofibrate in the treatment of severe mixed hyperlipidaemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56:631–5.
20. Kiortsis DN, Durack I, Turpin G. Effects of a low-calorie diet on resting metabolic rate and serum triiodothyronine levels in obese children. *Eur J Paediatr.* 1999;158:446–50.
21. Zumoff B, Miller L, Poretsky L, Levit CD, Miller EH, Heinz U, et al. Subnormal follicular-phase serum progesterone levels

- and elevated follicular-phase serum estradiol levels in young women with insulin dependent diabetes. *Steroids*. 1990; 55(12):560-4.
22. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Müllner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 1993;84:407-12.
  23. Tsao C. In: Miquel J, Quintanilha A, Weber H (eds) *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, vol III. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1988. p. 233-4.
  24. Gridley K, Green P, Simpkins J. A novel, synergistic interaction between 17  $\beta$ -estradiol and glutathione in the protection of neurons against  $\beta$ -amyloid 25-35-induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol*. 1998;54:874-80.
  25. Wefers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem*. 1988;174(2):353-7.
  26. Halliwell B, Gutteridge M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280:1-8.
  27. Chevion S. In PhD thesis. Jerusalem: The Hebrew University of Jerusalem, 1998.
  28. Chevion S, Moran D, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9): 5119-23.
  29. Choi HJ, Je HD, Jeong JH, Min YS, Choi TS, Park JH, et al. The role of ascorbic acid on the redox status and the concentration of malondialdehyde in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res*. 2003;26(3):237-43.
  30. Woo J, Leung SS, Lam CW, Ho SC, Lam TH, Janus ED. Plasma total antioxidant capacity in an adult Hong Kong Chinese population. *Clin Biochem*. 1997;30:553-7.
  31. Alho H, Leinonen J. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods Enzymol*. 1999;299: 3-15.
  32. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>+</sup> radical cation assay. *Free Radic Res*. 1997;26:195-9.
  33. Strube M, Haenen GR, Van Den Berg H, Bast A. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radic Res*. 1997;26:515-21.
  34. Haddous M, Herbeth B, Vincent-Viry M, Lamont JV, Fitzgerald PS, Visvikis S, et al. Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the Stanislas cohort: influencing factors and reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:209-15.
  35. Massafra C, Gioia D, De Felice C, Picciolini E, De Leo V, Bonifazi M, et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol*. 2000;167:447-52.
  36. Serviddio G, Loverro G, Vicino M, Prigigallo F, Grattagliano I, Altomare E, et al. Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2002;87:2843-8.
  37. Guemouri L, Arthur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem*. 1991;37:1932-7.
  38. Prohaska J, Sunde R. Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp Biochem Physiol*. 1993;105B:111-6.
  39. Sobocanec S, Balog T, Sverko V, Marotti T. Sex dependent antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in ageing mouse brain. *Free Radic Res*. 2003;37(7):743-8.
  40. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*. 2001;8:40-2.
  41. Tanaka M, Miyazaki T, Tanigaki S, Kasai K, Minegishi K, Miyakoshi K, et al. Participation of reactive oxygen species in PGF $_{2\alpha}$ -induced apoptosis in rat luteal cells. *J Reprod Fertil*. 2000;120(2):239-45.
  42. Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993;45:509-11.
  43. Cigliano L, Balestrieri M, Spagnuolo MS, Dale B, Abrescia P. Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate, alpha-tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod Fertil Dev*. 2002;14(1-2):15-21.
  44. Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril*. 2003;80(1): 123-7.
  45. Buserrolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y. Metabolic syndrome in the rat: Females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med (Maywood, NJ)*. 2002;227(9):837-42.
  46. Jenkins C, Wilson R, Roberts J, Miller H, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2(3):623-8.
  47. Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7(2):175-89.

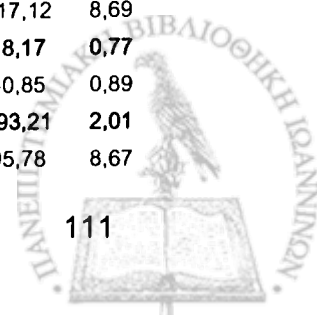


# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΠΙΝΑΚΑΣ

### ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

A/A	Zn mg/l	Cu mg/l	(VitC μM)	(Dehydro μM x 0,01)	Conc 100*(VitC/Dehydro)	C tac	FSH	LH	E2	PRG
a1	0,7	1,05	0,466	0,167	2,79	1,4205	14,23	11,27	44,23	1,12
a2	0,97	0,77	0,518	0,139	3,73	1,4091	21,32	12,94	51,32	1,09
a3	1,02	0,81	0,685	0,0123	55,7	1,6348	11,11	39,64	238,42	3,2
a4	0,88	0,94	0,593	0,07	8,47	1,5677	8,42	12,36	118,64	9,63
b1	0,92	1,08	0,277	0,156	1,77	1,2466	12,72	8,76	21,64	0,86
b2	0,95	0,94	0,558	0,122	4,57	1,3462	17,27	8,19	19,43	0,93
b3	0,99	0,89	0,679	0,0123	55,2	1,8136	11,59	43,28	289,05	1,72
b4	0,97	1,01	0,553	0,035	15,8	1,62325	8,22	9,29	102,12	8,99
c1	0,97	1,22	0,69	0,305	2,26	1,46493	16,42	8,32	19,43	0,69
c2	1	0,9	0,685	0,22	3,11	1,4238	23,21	6,35	47,12	0,84
c3	1,01	1	0,926	0,093	9,96	1,82016	19,27	29,91	200,39	1,82
c4	1,01	1,17	0,857	0,133	6,4	1,7025	12,25	7,25	98,3	8,83
d1	0,81	1,12	0,438	0,231	1,9	1,4946	17,9	14,5	48,98	0,91
d2	0,85	0,7	0,759	0,202	3,76	1,43317	19,44	16,72	71,06	0,81
d3	0,89	0,91	0,828	0,053	36	1,66314	17,98	38,9	276,34	2,72
d4	0,88	0,98	0,8	0,139	5,76	1,5423	13,2	19,9	116,16	13,85
e1	0,89	0,97	0,122	0,018	6,7	1,48976	14,27	10,54	59,35	1,12
e2	0,9	0,75	0,087	0,07	1,24	1,3152	18,47	14,32	49,27	1,08
e3	0,95	0,84	0,369	0,058	6,3	1,61579	15,48	32,6	244,93	1,82
e4	0,93	0,92	0,248	0,122	2	1,34186	14,2	11,43	124,32	11,57
f1	0,81	1,12	0,329	0,179	1,84	1	11,76	10,98	45,21	0,78
f2	0,85	1,07	0,314	0,035	8,97	1,42	14,93	14,1	68,96	0,73
f3	0,92	0,84	0,529	0,018	29,4	1,6677	12,29	29,21	317,25	1,37
f4	0,93	0,88	0,397	0,202	1,97	1	6,47	9,72	108,96	7,73
g1	0,85	0,93	0,116	0,041	2,83	1,309	13,13	13,78	11,21	0,97
g2	0,92	0,79	0,179	0,127	1,4	1,41678	13,09	12,54	13,43	0,94
g3	0,92	0,79	0,679	0,076	8,93	1,7294	12,11	50,7	236,25	1,34
g4	0,86	0,91	0,633	0,156	4,06	1,77174	11,98	10,02	99,46	11,79
h1	0,9	0,98	0,455	0,156	2,92	0,4352	18,65	14,16	9	1,03
h2	0,96	0,83	0,42	0,093	4,52	0,8092	31,47	12,17	39,12	0,74
h3	1,07	0,89	0,639	0,01	63,9	1,6932	24,62	30,72	230,18	1,05
h4	0,98	0,94	0,478	0,041	11,66	1,616	13,25	10,05	101,8	11,67
i1	1,02	0,87	0,185	0,087	2,13	1,1084	16,43	14,48	25,85	0,88
i2	1	0,7	0,282	0,248	1,14	0,8908	15,99	16,21	17,63	0,53
i3	1,03	0,75	0,547	0,076	7,2	1,7476	14,63	48,7	326,18	2,01
i4	1,01	0,78	0,282	0,173	1,63	1,0812	11,49	9,86	197,48	10,89
j1	0,64	1,21	0,139	0,047	2,96	0,4578	15,25	13,6	38,38	0,63
j2	0,79	1	0,104	0,173	0,6	0,34	17,22	11,3	31,27	0,55
j3	0,84	0,89	0,46	0,296	1,55	1,1065	12,74	41,84	312,72	0,98
j4	0,85	0,94	0,259	0,145	1,79	0,7854	11,46	9,03	117,12	8,69
k1	0,8	1,15	0,425	0,217	1,95	0,9724	8,56	14,78	18,17	0,77
k2	0,83	1,09	0,679	0,199	3,41	0,799	7,3	12,57	40,85	0,89
k3	0,84	1,11	0,763	0,062	12,3	1,0812	6,8	38,89	293,21	2,01
k4	0,8	1,18	0,732	0,117	6,26	0,9928	6,4	9,34	95,78	8,67



10	0,37	0,98	0,035	0,332	0,35	0,1292	17,21	8,65	9,63	1,12
12	0,9	0,89	0,012	0,242	0,05	0,1926	14,31	13,21	11,26	1,26
13	1	0,79	0,156	0,104	1,5	0,3376	16,37	20,99	27,22	1,73
14	0,92	0,93	0,179	0,369	0,485	0,2451	14,29	7,64	103,21	10,03



# ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

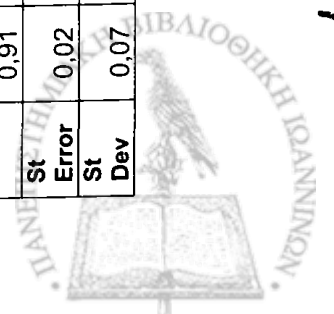
TIME 1 (ΜΕΤΡΗΣΗ 1<sup>Η</sup>)

AA	Zn <sub>mg/l</sub>	Cu <sub>mg/l</sub>	AA 100 <sup>μ</sup> M	DHAA μM	AA/ DHAA 100	C tac	Urca	Chol	Trig	Hdl	FSH	LH	E2	PRG	TSH	T3	T4
1	0,7	1,05	0,466	0,167	2,79	1,421	4	189	56	84	14,23	11,27	44,23	1,12	1,75	0,89	7,16
2	0,92	1,08	0,277	0,156	1,77	1,247	3,5	208	87	91	12,72	8,76	21,64	0,86	1,79	0,78	6,97
2	0,97	1,22	0,69	0,305	2,26	1,465	2,9	175	76	45	16,42	8,32	19,43	0,69	1,59	1,03	7,32
4	0,81	1,12	0,438	0,231	1,9	1,495	3,5	214	56	68	17,9	14,5	48,98	0,91	0,92	0,87	6,12
5	0,89	0,97	0,122	0,018	6,7	1,49	3,2	229	39	57	14,27	10,54	59,35	1,12	1,02	1,02	6,27
6	0,81	1,12	0,329	0,179	1,84	1	2,9	165	48	58	11,76	10,98	45,21	0,78	0,92	0,88	6,2
7	0,85	0,93	0,116	0,041	2,83	1,309	3,3	191	53	63	13,13	13,78	11,21	0,97	2,17	0,92	5,9
8	0,9	0,98	0,455	0,156	2,92	0,435	3,6	201	60	78	18,65	14,16	9	1,03	0,76	0,81	6,48
9	1,02	0,87	0,185	0,087	2,13	1,108	2,9	182	71	39	16,43	14,48	25,85	0,88	1,02	0,82	6,26
10	0,64	1,21	0,139	0,047	2,96	0,458	3,5	196	93	63	15,25	13,6	38,38	0,63	0,59	0,95	6,96
11	0,8	1,15				0,972	2,8	197	60	77	8,56	14,78	18,17	0,77	1,55	0,67	6,52
12	0,87	0,96	0,116	0,334	0,35	0,129	3,1	178	59	47	17,21	8,65	9,63	1,12	1,68	0,93	7,11
Mean	0,85	1,1	0,303	0,157	2,59	1,04	3,27	193,7	63,17	64,17	14,71	11,99	29,26	0,91	1,31	0,88	6,61
St Error	0,03	0,03	0,057	0,032	0,47	0,14	0,11	5,16	4,56	4,66	0,83	0,73	4,98	0,05	0,14	0,03	0,14
St Dev	0,11	0,11	0,19	0,104	1,56	0,47	0,37	17,88	15,79	16,16	2,88	2,51	17,23	0,17	0,5	0,1	0,48



TIME 2 (ΜΕΤΡΗΣΗ 2<sup>Η</sup>)

AA	Zn mg/l	Cu mg/l	AA 100- $\mu$ M	DHAA $\mu$ M	AA/ DHH A *100	C tac	Urca	Chol	Trig	Hdl	FSH	LH	E2	PRG	TSH	T3	T4
1	0,97	0,77	0,518	0,139	3,73	1,409	4,1	216	75	76	21,3	12,94	51,32	1,09	3,07	1,06	7,3
2	0,95	0,94	0,558	0,122	4,57	1,346	4,4	259	61	101	17,2	8,19	19,43	0,93	2,77	0,72	7,65
2	1	0,9	0,685	0,22	3,11	1,424	3	198	98	48	23,2	6,35	47,12	0,84	2,39	0,94	6,98
4	0,85	0,7	0,759	0,202	3,76	1,433	3,9	231	29	86	19,4	16,72	71,06	0,81	1,88	0,96	5,99
5	0,9	0,75	0,087	0,07	1,24	1,315	3,6	228	38	82	18,4	14,32	49,27	1,08	1,81	1,1	6,12
6	0,85	1,07	0,314	0,035	8,97	1,42	3,1	175	49	68	14,9	14,1	68,96	0,73	1,71	1,18	9,11
7	0,92	0,79	0,179	0,127	1,4	1,417	3,7	211	54	62	13,0	12,54	13,43	0,94	3,6	0,95	5,88
8	0,96	0,83	0,42	0,093	4,52	0,809	3,6	191	60	73	31,4	12,17	39,12	0,74	1,18	0,92	5,79
9	1	0,7	0,282	0,248	1,14	0,891	3,1	209	64	46	15,9	16,21	17,63	0,53	1,82	0,98	8,36
10	0,79	1	0,104	0,173	0,6	0,34	4	217	56	71	17,2	11,3	31,27	0,55	0,85	0,95	7,32
11	0,83	1,09				0,799	2,3	212	61	79	7,3	12,57	40,85	0,89	2,81	0,67	6,05
12	0,9	0,89	0,012	0,242	0,05	0,193	3,7	206	68	46	14,3	13,21	11,26	1,26	3,16	0,82	6,99
Mean	0,91	0,87	0,36	0,15	3,01	1,07	3,54	212,75	59,4	69,8	17,8	12,55	38,39	0,87	2,25	0,94	6,96
St Error	0,02	0,04	0,08	0,02	0,77	0,13	0,17	6,1	5,05	4,92	1,72	0,85	5,88	0,06	0,24	0,04	0,31
St Dev	0,07	0,14	0,25	0,07	2,55	0,45	0,58	21,13	17,4	17,04	5,94	2,96	20,38	0,22	0,84	0,15	1,06



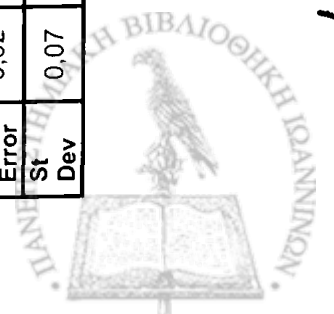
TIME 3 (ΜΕΤΡΗΣΗ 3<sup>η</sup>)

AA	Zn mg <sup>1</sup>	Cu mg <sup>1</sup>	AA 100 <sup>1</sup> µM <sup>1</sup>	DHAA µM <sup>1</sup>	AA/ DHH A *100	C tac	Urca	Chol	Trig	Hdl	FSH	LH	E2	PRG	TSH	T3	T4
1	1,02	0,81	0,685	0,0123	55,7	1,635	4,4	176	87	99	11,11	39,64	238,42	3,2	2	0,83	7,27
2	0,99	0,89	0,679	0,0123	55,2	1,814	4,6	211	76	83	11,59	43,28	289,05	1,72	1,7	0,69	6,05
2	1,01	1	0,926	0,093	9,96	1,820	3,1	175	69	63	19,27	29,91	200,39	1,82	1,61	1	7,1
4	0,89	0,91	0,828	0,053	36	1,663	4,1	168	37	91	17,98	38,9	276,34	2,72	0,69	0,93	7,69
5	0,95	0,84	0,369	0,058	6,3	1,616	3,8	167	55	78	15,48	32,6	244,93	1,82	0,98	1,01	7,54
6	0,92	0,84	0,529	0,018	29,4	1,668	3,7	153	97	64	12,29	29,21	317,25	1,37	0,8	0,83	5,68
7	0,92	0,79	0,679	0,076	8,93	1,729	4	206	67	65	12,11	50,7	236,25	1,34	2,46	0,81	5,57
8	1,07	0,89	0,639	0,01	63,9	1,693	4,7	180	77	51	24,62	30,72	230,18	1,05	0,59	0,99	6,29
9	1,03	0,75	0,547	0,076	7,2	1,748	3,3	158	58	40	14,63	48,7	326,18	2,01	1,44	0,93	6,65
10	0,84	0,89	0,46	0,296	1,55	1,107	4,2	182	59	95	12,74	41,84	312,72	0,98	0,75	0,87	6,32
11	0,84	1,11				1,081	3,1	175	72	89	6,8	38,89	293,21	2,01	1,51	0,73	7,3
12	1	0,79	0,156	0,104	1,5	0,388	4,2	154	48	75	16,87	29,99	271,22	1,78	2,2	0,96	5,78
Mean	0,96	0,88	0,59	0,07	25,1	1,5	3,93	175,42	66,8	74,4	14,62	37,87	269,68	1,82	1,39	0,88	6,6
St Error	0,02	0,03	0,06	0,03	7,24	0,12	0,16	5,26	4,82	5,27	1,34	2,15	11,47	0,19	0,18	0,03	0,22
St Dev	0,08	0,1	0,21	0,08	24	0,43	0,55	18,23	16,7	18,3	4,64	7,46	39,72	0,64	0,63	0,11	0,76



TIME 4 (ΜΕΤΡΗΣΗ 4<sup>h</sup>)

AA	Zn mg/l	Cu mg/l	AA 100 <sup>μ</sup> M	DHAA μM <sup>100</sup>	AA/ DHHA <sup>-100</sup>	C tac	Urc a	Chol	Trig	Hdl	FSH	LH	E2	PRG	TSH	T3	T4
1	0,88	0,94	0,593	0,07	8,47	1,568	4	186	65	67	8,42	12,36	118,6	9,63	1,57	0,89	6,4
2	0,97	1,01	0,553	0,035	15,8	1,623	4,2	212	72	101	8,22	9,29	102,1	8,99	1,67	0,88	7,2
2	1,01	1,17	0,857	0,133	6,4	1,703	2,9	168	60	70	12,25	7,25	98,3	8,83	1,45	1,08	8,78
4	0,88	0,98	0,8	0,139	5,76	1,542	3,2	187	42	63	13,2	19,9	116,2	13,85	0,71	0,9	5,94
5	0,93	0,92	0,248	0,122	2	1,342	3,1	158	46	86	14,2	11,43	124,3	11,57	0,9	0,97	7,78
6	0,93	0,88	0,397	0,202	1,97	1	3	157	86	69	6,47	9,72	109	7,73	1,1	1,12	6,5
7	0,86	0,91	0,633	0,156	4,06	1,772	3,6	198	30	82	11,98	10,02	99,5	11,79	2,01	1,06	6,21
8	0,98	0,94	0,478	0,041	11,66	1,616	3,8	197	84	57	13,25	10,05	101,8	11,67	0,29	0,88	6,61
9	1,01	0,78	0,282	0,173	1,63	1,081	2,8	169	38	45	11,49	9,86	197,5	10,89	1,23	0,8	6,65
10	0,85	0,94	0,259	0,145	1,79	0,785	3,7	194	76	93	11,46	9,03	117,1	8,69	0,64	89	6,24
11	0,8	1,18				0,993	2,7	187	74	94	6,4	9,34	95,78	8,67	1,42	0,78	6,84
12	0,92	0,93	0,179	0,369	0,485	0,245	3,3	158	61	83	14,29	7,64	103,2	10,03	1,61	1,16	6,78
Mean	0,92	0,97	0,48	0,14	5,46	1,31	3,3	180,92	61,2	75,8	10,97	10,49	115,3	10,2	1,22	8,29	6,83
St Error	0,02	0,03	0,07	0,03	1,46	0,13	0,1	5,31	5,34	4,83	0,83	0,95	7,94	0,51	0,15	7,34	0,23
St Dev	0,07	0,11	0,23	0,09	4,84	0,45	0,5	18,39	18,5	16,7	2,86	3,27	27,49	1,78	0,5	25,42	0,78





ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ

Mean	E2	Zn	Cu	Asc	DHAA	A/DHAA	TAPS	Urca	Chol	Trig	Hdl	FSH	LH	PRG	TSH	T3	T4
Time1	29,26	0,85	1,1	0,303	0,157	2,59	1,04	3,27	193,75	63,17	64,17	14,71	11,99	0,91	1,31	0,88	6,61
Time2	38,39	0,91	0,87	0,36	0,15	3,01	1,07	3,54	212,75	59,42	69,83	17,84	12,55	0,87	2,25	0,94	6,96
Time3	269,68	0,96	0,88	0,59	0,07	25,06	1,5	3,93	175,42	66,83	74,42	14,62	37,87	1,82	1,39	0,88	6,6
Time4	115,28	0,92	0,97	0,48	0,14	5,46	1,31	3,36	180,92	61,17	75,83	10,97	10,49	10,2	1,22	8,29	6,83
<b>Correlations</b>																	
E2		0,89	-0,49	0,96	-0,98	0,97	0,97	0,85	-0,78	0,8	0,69	-0,27	0,91	0,11	-0,36	0,01	-0,46
Zn			-0,85	0,92	-0,83	0,79	0,87	0,85	-0,46	0,38	0,88	-0,11	0,71	0,22	0,05	0,15	0,07
Cu				-0,58	0,54	-0,49	-0,48	-0,76	-0,08	0,01	-0,64	-0,35	-0,48	0,051	-0,57	0,09	-0,46
AA					-0,90	0,88	0,99	0,78	-0,76	0,62	0,86	-0,39	0,78	0,33	-0,33	0,24	-0,25
DHAA						-0,99	-0,90	-0,92	0,93	0,88	-0,58	0,09	-0,97	0,08	0,24	-0,22	0,48
A/DHAA							0,89	0,91	-0,67	0,86	0,52	-0,08	0,98	-0,12	-0,26	-0,22	-0,54
TAPS								0,75	-0,84	0,69	0,82	-0,45	0,79	0,34	-0,43	0,24	-0,36
Urca									-0,35	0,63	0,50	0,25	0,93	-0,29	0,15	-0,37	-0,23
Chol															0,86	-0,38	0,65
Trig															-0,56	-0,31	-0,89
AHdl															-0,17	0,60	0,21
TSH																-0,44	0,71
T3																	0,31