



ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΜΣ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2018-2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΟΜΟΙΑΖΟΥΝ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΠΤΗΣΕΩΝ»
«ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
CONDITIONS SIMULATING FLIGHT CONDITIONS»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΠΕΤΡΑΚΗ
A.M. 2172

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΝΑΙΡ ΤΩΝΙΑ ΒΑΣΙΛΑΚΟΥ

Αθήνα, Ιούνιος 2021



ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΜΣ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2018-2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΟΜΟΙΑΖΟΥΝ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΠΤΗΣΕΩΝ»
«ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
CONDITIONS SIMULATING FLIGHT CONDITIONS»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΠΕΤΡΑΚΗ (Α.Μ. 2172)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ναίρ-Γώνια Βασιλάκου (επιβλέπουσα): Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Δημήτριος Κουρέτας : Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κώστας Κοτροκόης : Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αθήνα, Ιούνιος 2021



ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΜΣ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2018-2019

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΟΜΟΙΑΖΟΥΝ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΤΗΣΕΩΝ», που παρουσιάστηκε από την Κωνσταντίνα Πετράκη του Γεωργίου, υποψήφια για τον τίτλο μεταπτυχιακών σπουδών στη Δημόσια Υγεία και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

- **Ναίρ-Τώνια Βασιλάκου** (επιβλέπουσα): Καθηγήτρια, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

- **Δημήτριος Κουρέτας** : Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

- **Κώστας Κοτροκόης** : Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κωνσταντίνα Πετράκη του Γεωργίου με αριθμό μητρώου 2172, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Δημόσιας Υγείας, του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ότι: «Είμαι συγγραφέας της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς, είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου για 12 μήνες και έπειτα από αίτησή μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Κωνσταντίνα Πετράκη



Copyright ©Κωνσταντίνα Πετράκη - ΠΑΔΑ 2021
Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία, του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τώνια Βασιλάκου, επιβλέπουσα καθηγήτρια, για την εμπιστοσύνη και την ιδέα που μου μετέδωσε να πραγματοποιήσω μελέτη με θέμα το οξειδωτικό στρες και για όλη την κατανόηση και βοήθειά της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτρη Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρακάτω μελέτη και για την τόσο θετική διάθεση συνεργασίας, καθώς και το τρίτο μέλος της επιτροπής τον κύριο Κώστα Κοτροκόη που συμμετείχε σε αυτήν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη διοίκηση αλλά και όλο το προσωπικό του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής για την βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της έρευνας καθώς και τους ιπτάμενους, αλλά και τους μαθητές για τη συμμετοχή τους στη μελέτη .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά την Μαρίνα Ορφανού, που με ανέλαβε και μαζί φέραμε εις πέρας όλες τις εργαστηριακές μετρήσεις της παρούσας εργασίας, για την υπομονή της και όλη την ανιδιοτελή βοήθεια.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την οικογένειά μου, για την ψυχολογική υποστήριξη, τον άντρα μου για την κατανόηση για όλες τις επιπλέον ώρες της απουσίας μου και την αδερφή μου με τους γονείς μου για την επιπλέον ενθάρρυνση. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καλό μου φίλο Νεκτάριο που αν και από μακριά με βοήθησε τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά στην εκπόνηση της εν λόγω εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα αφιερώσω αυτή την εργασία στους δυο γιούς μου που μου δίνουν καθημερινά την αφορμή να θέλω να προσπαθώ να βελτιώνομαι σε όλους τους τομείς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	9
Abstract.....	10
Κατάλογος πινάκων εργασίας.....	12
Κατάλογος Γραφημάτων εργασίας	13
Κατάλογος εικόνων εργασίας	14
Κατάλογος συντομεύσεων εργασίας	15
A. Γενικό Μέρος.....	17
Εισαγωγικά σχόλια.....	18
Κεφάλαιο 1	19
1.1. Οξειδωτικό στρες - σύντομη περιγραφή.....	19
1.2. Οξειδωτική καταστροφή - σύντομη περιγραφή	21
1.3. Επίδραση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό	23
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	24
1.5. Υπολογισμός οξειδωτικού στρες.....	33
Κεφάλαιο 2	36
2.1. Δείκτες οξειδωτικού στρες.....	36
2.1.1. Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων	37
2.1.2. Δείκτες οξείδωσης του DNA.....	40
2.1.3 Προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών.....	41
2.1.4. Καρβονύλια πρωτεϊνών, ALEs & AGEs	43
2.1.5. Νιτροτυροσίνη.....	46
2.1.6. Εξελιγμένα προϊόντα πρωτεϊνικής οξείδωσης.....	47
2.1.7. Οξειδωμένη LDL	48
2.1.8. Τροποποιημένα από την ισχαιμία αλβουμίνη.....	49
Κεφάλαιο 3	51
3.1 Οξειδωτικό στρες & πτήσεις	51
B. Ειδικό Μέρος.....	63
Κεφάλαιο 4	64
4.1. Σκοπός και Στόχοι.....	64
4.2 Μεθοδολογία	65
4.2.1. Πρωτόκολλο παρέμβασης.....	65
4.2.2. Συμμετέχοντες.....	67

4.2.3. Συλλογή αίματος και επεξεργασία.....	67
4.2.4. Αξιολόγηση των δεικτών οξειδοαγωγικής κατάστασης	68
4.2.5. Στατιστική ανάλυση	74
Κεφάλαιο 5	75
Αποτελέσματα.....	75
5.1. Καταλάση.....	76
5.2. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)	77
5.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).....	78
5.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	79
5.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	80
Κεφάλαιο 6	81
Συζήτηση	81
Κεφάλαιο 7	85
Συμπεράσματα - Προτάσεις	85
Βιβλιογραφία	86
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	86
Ελληνική Βιβλιογραφία	106
1. Έγκριση Επιστημονικού Συμβολίου 251 ΓΝΑ.....	107
2. Έγκριση Διοικητή Κ.Α.Ι.....	109
3. Έγκριση Διενέργειας Αιμοληψιών.....	110
4. Έντυπο Έγγραφης Συγκατάθεσης και Ενημέρωσης Εθελοντών.....	111

Περίληψη

Εισαγωγή: Η υποξία αποτελεί μια κατάσταση, κατά την οποία ο οργανισμός βρίσκεται σε έλλειψη οξυγόνου για ένα διάστημα. Η υποξία έχει συσχετιστεί με την παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS). Οι ROS, όταν παράγονται στο κύτταρο σε μεγάλες ποσότητες, μπορεί να οδηγήσουν σε εμφάνιση οξειδωτικού στρες. **Σκοπός:** Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της εμφάνισης οξειδωτικού στρες σε εθελοντές που εκτέθηκαν σε συνθήκες υποξίας. **Υλικό και Μέθοδος:** Στην έρευνα συμμετείχαν εθελοντές πιλότοι και μαθητευόμενοι πιλότοι που χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η πρόκληση των συνθηκών υποξίας πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο χαμηλής πίεσης του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής της Πολεμικής Αεροπορίας. Πριν και μετά την δοκιμασία αναλύθηκαν φασματοφωτομετρικά 5 δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η λιπιδική υπεροξειδωση (TBARS), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), και η δραστικότητα καταλάσης (CAT) σε δείγμα αίματος των εθελοντών. **Αποτελέσματα:** Οι δείκτες CARB, TBARS, TAC και GSH δεν μεταβλήθηκαν σε καμιά ομάδα λόγω της παρέμβασης. Μόνο η δραστικότητα καταλάσης αυξήθηκε στην ομάδα των μαθητευόμενων πιλότων μετά την παρέμβαση, καθώς η συγκεκριμένη ομάδα εκτέθηκε για πρώτη φορά σε συνθήκες υποξίας. Επιπρόσθετες διαφορές υπήρχαν μεταξύ των ομάδων στα CARB και στην TAC, οι οποίες δεν σχετίζονται με την παρέμβαση. Οι έμπειροι πιλότοι παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα TAC και CARB πριν την παρέμβαση γεγονός που υποδηλώνει κάποιες προσαρμογές που οφείλονται πιθανώς στην ηλικία, αλλά και στην συνεχή έκθεση σε συνθήκες υποξίας. **Συμπεράσματα:** Το πρωτόκολλο υποξίας επηρέασε διαφορετικά τα επίπεδα δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους έμπειρους πιλότους και στους μαθητευόμενους, υποδεικνύοντας πιθανές προσαρμογές στην ομάδα των πιλότων.

Λέξεις κλειδιά: Αντιοξειδωτικά, οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, υποξία, πιλότοι

Abstract

Background: Hypoxia is a condition, in which the body is deficient in oxygen for a period of time. Hypoxia has been linked to the production of free radicals (ROS). When ROS are produced in large amounts within the cells, it could lead to oxidative stress. **Aim:** The aim of the present study was to examine the occurrence of oxidative stress in volunteers exposed to hypoxia. **Methods:** Volunteer pilots and trainee pilots participated in the research divided into two groups. The hypoxia was induced in the low-pressure chamber of the Aviation Medicine Center. Before and after the test, 5 biomarkers of redox status were analyzed spectrophotometrically in blood samples of the volunteers. The biomarkers analyzed were: reduced glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyls (CARB) and Catalase activity (CAT). **Results:** The CARB, TBARS, TAC and GSH indices did not change in any group due to the intervention. Only catalase activity increased in the trainee pilot group after the intervention as this group was exposed to hypoxia for the first time in their life. There were additional differences between the groups in CARB and TAC, which are not related to the intervention. Experienced pilots showed increased levels of TAC and CARB before the intervention in relation to the trainees, which suggests some adjustments due to different age, but also to regular exposure to hypoxia. **Conclusions:** Hypoxia intervention affected differentially the oxidative stress biomarkers among the experienced pilots and the trainees, indicating possible adjustments in the group of the experienced pilots.

Keywords: Antioxidants, oxidative stress, free radicals, hypoxia, pilots

Κατάλογος πινάκων εργασίας

Πίνακας 1 Δείκτες που βασίζονται σε τροποποιήσεις που επάγει η δράση των ROS.....	33
Πίνακας 2 Πιθανές εστίες συμβολής στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες σε υψόμετρο.....	51
Πίνακας 3 Σύγκριση της συγκέντρωσης υδροπεροξειδίων του πλάσματος στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα των πιλότων της εν λόγω μελέτης.....	58
Πίνακας 4 Σύγκριση της συγκέντρωσης γλυκοϋδρολασών στην κυτοσολική και πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των πιλότων της εν λόγω μελέτης.....	59
Πίνακας 5 Καταγραφή τιμών αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στον ορό, SOD και GPx στην ομάδα των 229 συμμετεχόντων πιλότων της μελέτης.....	60
Πίνακας 6 Καταγραφή εύρους συχνοτήτων αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στον ορό, SOD και GPx στην ομάδα των 229 συμμετεχόντων πιλότων της μελέτης.....	60
Πίνακας 7 Χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων	76
Πίνακας 8 Τιμές δεικτών οξειδωτικού στρες στις δυο ομάδες πριν και μετά την παρέμβαση.....	77

Κατάλογος Γραφημάτων εργασίας

Διάγραμμα 1. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη δραστικότητα της καταλάσης.....	73
Διάγραμμα 2. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης	74
Διάγραμμα 3. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στην TAC.....	75
Διάγραμμα 4. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση των TBARS	75
Διάγραμμα 5. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	76

Κατάλογος εικόνων εργασίας

Εικόνα 1 Οξειδωτικό στρες και διαγραμματική απεικόνιση μηχανισμών οξειδωτικών βλαβών βασικών βιομορίων.....	16
Εικόνα 2 Μη αντιστρεπτές οξειδωτικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις.....	39
Εικόνα 3 Πιθανές πηγές εκδήλωσης οξειδωτικού στρες σε συνθήκες υψομέτρου.....	50
Εικόνα 4 Συσχετισμός (α) μεταξύ πρωτεϊνικών καρβονυλίων και χρονικής στιγμής μελέτης και (β) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και χρονικής στιγμής μελέτης στον Ευρωπαϊκό κοκκινολαίμη.....	52
Εικόνα 5 Συσχετισμός (α) μεταξύ πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μυϊκής ικανότητας, (β) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και μυϊκής ικανότητας και (c) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και ηλικίας του μεταναστευτικού πτηνού (ενός έτους ή ενήλικο) στον Ευρωπαϊκό κοκκινολαίμη.....	53
Εικόνα 6 Επίπεδα TBARS (παραπροϊόν λιπιδιακής υπεροξειδωσης ως αποτέλεσμα βλαβών οξειδωτικού στρες) στα ερυθροκύτταρα ποντικών που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες πτήσης (μαύρη ράβδος), έναντι ποντικών σε συνθήκες εδάφους (ράβδος ριγέ) και φυσιολογικές συνθήκες (άσπρη ράβδος).....	54
Εικόνα 7 Επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα ποντικών που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες πτήσης (μαύρη ράβδος), έναντι ποντικών σε συνθήκες εδάφους (ράβδος ριγέ) και φυσιολογικές συνθήκες (άσπρη ράβδος).....	55
Εικόνα 8 Καταγεγραμμένα επίπεδα στον ορό καρβονυλικών πρωτεϊνών σε πιλότους αεροσκαφών, πριν (T0) και έπειτα (T1) από τη διενέργεια πτήσης, έναντι της ομάδας ελέγχου της μελέτης.....	57
Εικόνα 9 Καταγεγραμμένα επίπεδα στον ορό 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνης σε πιλότους αεροσκαφών, πριν (T0) και έπειτα (T1) από τη διενέργεια πτήσης, έναντι της ομάδας ελέγχου της μελέτης.....	57

Κατάλογος συντομεύσεων εργασίας

8-hydroxyguanine: 8-OH-G

8-OhdG: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine

8oxodG: 7,8-dihydroxy-8-oxo-2'-deoxyguanosine

8-oxoGuo: 7,8-dihydroxy-8-oxoguanosine

ABC test: binding capacity of albumin for cobalt

ACB: albumin cobalt-binding

AGEs: advanced glycation end products

ALEs: advanced lipoxigenation end products

AOPP: advanced oxidation protein products

CABG: coronary artery bypass grafting

CAT: catalase

DNP: dinitrophenyl

DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

ECD: electrochemical detection

ESR: electron spin resonance

F2-IsoPs: F2-isoprostanes

F-AGE: serum fluorescence AGE

GC: gas chromatography

GC-MS: gas chromatography coupled with mass spectroscopy

GCR: β -D-glucuronidase

GPx: glutathione peroxidase

GTS: glutathione transferase

HClO: hypochlorous acid

HDL: high-density lipoprotein

HEX: hexosaminidase

HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

HPLC: high-performance liquid chromatography

HPLC-ECD: high performance liquid chromatography-electrochemical detection

IMA: ischemia-modified albumin

LDL: low density lipoprotein

LPO: lipid peroxides

MCO: metal catalyzed oxidation

MDA: malondialdehyde

MS: mass spectroscopy
MSR: methionine sulfoxide reductase
NA: nucleic acid
NOS: nitric oxide synthetase
O-GlcNAcase: O- β -N-acetyl-D-glucosaminidase
PGF2a: prostaglandin F2a
PUFAs: polyunsaturated fatty acids
RAGE: receptor for advanced glycation end products
RNS: reactive nitrogen species
ROS: reactive oxygen species
RSH-px: thiole-specific peroxidase
SOD: superoxide dismutase
TAC: total antioxidant capacity
TAS: total antioxidative activity in serum
TBA: thiobarbituric acid
TBARS: thiobarbituric acid reactive substances
 ϵ dA: 1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine
 ϵ dC: 3,N(4)-etheno-2'-deoxycytidine

Α. Γενικό Μέρος

Εισαγωγικά σχόλια

Η ανταλλαγή ενέργειας αποτελεί αναπόσπαστη βιολογική διαδικασία που επισυμβαίνει μεταξύ των διαφόρων οργανισμών και συμβάλλει στην εξέλιξη της ζωής. Οι κυτταρικές ανάγκες του κάθε οργανισμού επιτυγχάνονται και υλοποιούνται με εξειδικευμένες για κάθε περίπτωση χημικές αντιδράσεις. Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει την ικανότητα αξιοποίησης του οξυγόνου, το οποίο βοηθά στην αποτελεσματική έκλυση ποσοτήτων ενέργειας. Υπάρχουν όμως καταστάσεις, οι οποίες και απαιτούν ενίοτε την παρεμπόδιση της οξειδωσης ζωτικών συστημάτων ενός οργανισμού. Για το σκοπό αυτό έχει αναπτυχθεί ο μηχανισμός του οξειδωτικού στρες, μέσω του οποίου παράγονται οι κατάλληλες αντιδραστικές ουσίες, η στοχευμένη δράση των οποίων συμβάλλει στην ικανοποίηση των εκάστοτε κυτταρικών αναγκών. Ταυτόχρονα, επιτυγχάνεται η διασφάλιση της ισορροπίας μεταξύ της τοξικότητας διαφόρων προϊόντων καύσης χημικών αντιδράσεων και της αποτελεσματικότητας του χρησιμοποιούμενου ενεργειακού αποθέματος. Οι μηχανισμοί που έχουν αναπτυχθεί, προκειμένου να επέλθει αναστολή των επιδράσεων της τοξικότητας, ονομάζονται αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και έχουν διερευνηθεί εκτενώς στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να αναφερθεί πως η γήρανση των κυττάρων, αποτελεί δυναμική διαδικασία, η οποία συνοδεύεται από εξελισσόμενη οξειδωτική καταστροφή και στηρίζεται στις λεγόμενες ελεύθερες ρίζες. Οι προαναφερθείσες έννοιες αναμένεται να αποτελέσουν σημείο αναφοράς της συγκεκριμένης εργασίας και θα παρατεθούν αναλυτικότερα στις ενότητες που ακολουθούν (Finkel & Holbrook, 2000; Beckman & Ames, 1998).

Κεφάλαιο 1

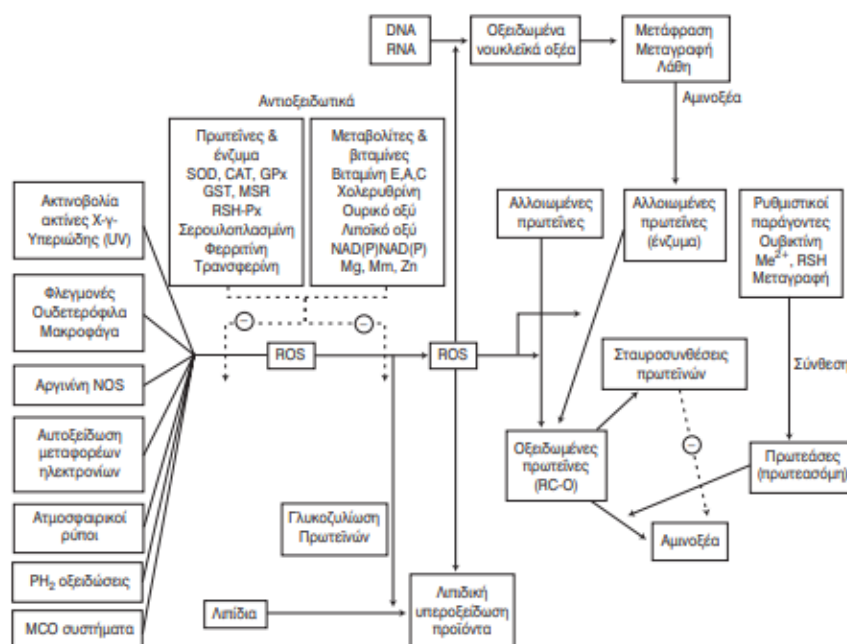
1.1. Οξειδωτικό στρες - σύντομη περιγραφή

Ο όρος του οξειδωτικού στρες, ο οποίος καταγράφεται σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό, περιγράφει την παθολογική κατάσταση που προκύπτει λόγω της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των επιπέδων οξειδωτικών παραγόντων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι παράγοντες που εμπλέκονται περιλαμβάνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), ορισμένες εκ των οποίων είναι ελεύθερες ρίζες. Κατά την εκδήλωση του οξειδωτικού στρες, καταγράφεται αυξημένος ρυθμός παραγωγής των συγκεκριμένων παραγόντων ή μειωμένη ικανότητα απομάκρυνσής τους από το κύτταρο ή τον οργανισμό, αντίστοιχα (Γαλάρης και συν., 2002; Halliwell & Gutteridge, 1999). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι περισσότεροι οργανισμοί επιστρατεύουν αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, εκτός από τους εκάστοτε ενδογενείς παράγοντες στους οποίους εκτίθεται ένας οργανισμός, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες μέσω της δράσης των οποίων μπορεί να εκδηλωθεί οξειδωτικό στρες (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία, όζον, περιβαλλοντική μόλυνση κ.ά.). Στη δεύτερη περίπτωση, ο οργανισμός καλείται να επιστρατεύσει πρόσθετες αντιοξειδωτικές ουσίες, προκειμένου να ανταπεξέλθει επαρκώς στις εκάστοτε κυτταρικές προκλήσεις (Βαλαβανίδης, 2006; Hand & Hardewig, 1996) (Εικόνα 1).

Η εκδήλωση οξειδωτικού στρες οφειλόμενου σε ROS περιλαμβάνει τα πάσης φύσεως οξειδωτικά συμβάντα, τα οποία προκαλούνται από ελεύθερες και μη ελεύθερες ρίζες. Στην περίπτωση των ελευθέρων ριζών, τα ROS συγκροτούνται από άτομα ή στοιχεία που περιέχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές τους τροχιές. Οι περισσότερο αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις περιλαμβάνουν το υπεροξείδιο του υδροξυλίου, το οξείδιο του υδροξυλίου και το οξείδιο του νιτρικού οξέος (Finkel & Holbrook, 2000). Τα συγκεκριμένα οξειδωτικά προϊόντα χαρακτηρίζονται από αστάθεια και η παρουσία τους διαρκεί για μικρο- ή νανο-δευτερόλεπτα, αποτελώντας τον προπομπό για την εκδήλωση αλυσιδωτών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα την σταδιακή κλιμάκωση της κυτταρικής καταστροφής. Από την άλλη πλευρά, οι περισσότερο αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις μη ελευθέρων οξειδωτικών ριζών περιλαμβάνουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υποχλωρικό οξύ και το οξυγόνο σε ελεύθερη μορφή. Το χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων ουσιών

είναι πως η παρουσία τους διαρκεί περισσότερο, με αποτέλεσμα να προκαλούν αυξημένη οξειδωτική καταστροφή (Surai, 2002).

Εικόνα 1 Οξειδωτικό στρες και διαγραμματική απεικόνιση μηχανισμών οξειδωτικών βλαβών βασικών βιομορίων



(Συντομογραφίες: MSR/methionine sulfoxide reductase, GPx/glutathione peroxidase, CAT/catalase, SOD/superoxide dismutase, RSH-Px/thiole-specific peroxidase, NOS/nitric oxide synthetase, NA/nucleic acid, GTS/glutathione transferase, MCO/metal catalyzed oxidation, RSH/thioles)

Πηγή: Ντουνούση και συν., 2009

Εκτός από τα ROS υπάρχουν και τα RNS, η παρουσία των οποίων συνδυάζεται με νιτρικές επιδράσεις στον οργανισμό. Φαίνεται, ωστόσο, πως σε σχέση με τα ROS, δεν κατέχουν τον ίδιο βαθμό σημαντικότητας σε επίπεδο πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Είναι άκρως σημαντικό να αναφερθεί πως η παραγωγή ROS δεν συνδυάζεται αποκλειστικά με την εκδήλωση αρνητικών συνεπειών για ένα κύτταρο ή ένα οργανισμό. Μελέτες σε ζωικά κύτταρα έχουν δείξει πως ένα ποσοστό της τάξεως του 10% των παραγόμενων ROS χρησιμεύουν σε εποικοδομητικές για τον οργανισμό κυτταρικές διαδικασίες, που περιλαμβάνουν την κυτταρική σήμανση, κυτταρικές μετατροπές, χαλάρωση μυϊκών ινών, καθώς επίσης και ανοσολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς (Droge, 2002). Το υπόλοιπο 90% της παραγωγής αντιστοιχεί σε φυσιολογικές διαδικασίες που άπτονται της διαδικασίας του μεταβολισμού (Balaban et al., 2005).

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται με δύο διαφορετικούς τρόπους (Cheeseman & Slater, 1993). Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο, σε ομοιοπολικούς

δεσμούς μορίων πραγματοποιείται ομολυτική διάσπαση με αποτέλεσμα την έκλυση μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας (π.χ. ιοντική ακτινοβολία, υπεριώδης ακτινοβολία, θερμότητα). Ο δεύτερος τρόπος, ο οποίος είναι και ο συχνότερος, περιλαμβάνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, κατά τις οποίες προστίθεται ή αφαιρείται ένα ηλεκτρόνιο από ένα κανονικό μόριο, καθώς δεν απαιτούνται για την εκτέλεσή τους αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών για ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό εξαρτάται από τα εκάστοτε επίπεδά τους. Πιο συγκεκριμένα, χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών είναι επιβλαβείς για τη διασφάλιση της κυτταρικής λειτουργίας, ενώ αντίστοιχα υψηλές συγκεντρώσεις είναι επιβλαβείς για την πρόκληση κυτταρικών βλαβών και καταστροφής. Οι βασικότερες κυτταρικές βλάβες περιλαμβάνουν τη λιπιδική υπεροξείδωση, αλλοιώσεις της πρωτεϊνικής δομής με αποτέλεσμα την αναστολή της ενζυμικής δράσης, βλάβες σε υδατάνθρακες, καθώς επίσης και βλάβες σε μόρια νουκλεϊκών οξέων (Γαλάρης και συν., 2002).

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές πως η εκδήλωση του οξειδωτικού στρες επισυμβαίνει όταν τα υφιστάμενα ενζυμικά και μη αντιοξειδωτικά μέσα αδυνατούν να καταστείλουν το ρυθμό παραγωγής των ROS, με αποτέλεσμα τον παρατεταμένο χρόνο δράσης τους και την πρόκληση οξειδωτικής κυτταρικής καταστροφής. Ο βαθμός έκτασης της οξειδωτικής κυτταρικής καταστροφής καθορίζεται από το πόσο επιρρεπή είναι τα εκάστοτε βιομόρια που υφίστανται την οξείδωση στο να αλληλεπιδράσουν και να ενωθούν με ROS. Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες ο οργανισμός καταφέρνει να αντιρροπήσει την αυξημένη παραγωγή ROS, επιστρατεύοντας αυξημένη παραγωγή αμυντικών μηχανισμών. Επομένως, δεν είναι αυτονόητο ούτε απόλυτο πως όταν εκδηλώνεται αυξημένος ρυθμός παραγωγής ROS, αυτόματα θα συνοδευτεί και από εκδήλωση οξειδωτικού στρες. Ο περισσότερο πρακτικός τρόπος εκτίμησης του οξειδωτικού στρες παραμένει η καταμέτρηση της καταστροφής ή της παρουσίας αυξημένων επιπέδων ROS.

1.2. Οξειδωτική καταστροφή - σύντομη περιγραφή

Ο βαθμός έκτασης της προκληθείσας οξειδωτικής καταστροφής καθορίζεται από το πόσο επιρρεπή είναι τα εκάστοτε βιομόρια που υφίστανται την οξείδωση στο να αλληλεπιδράσουν και να ενωθούν με ROS, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα περισσότερο συνηθισμένα είδη βιολογικών μορίων, των οποίων η λειτουργία επηρεάζεται αρνητικά από την λειτουργία των ROS περιλαμβάνουν το DNA, τις

πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αποτέλεσμα της εν λόγω αλληλεπίδρασης είναι η ανεξέλεγκτη παραγωγή ROS, η οποία οδηγεί σε οξειδωτική κυτταρική καταστροφή. Είναι γνωστό πως οι μηχανισμοί της οξείδωσης ή μεθυλίωσης των βάσεων του DNA ενός κυττάρου επιδρούν καταλυτικά στον κυτταρικό φαινότυπο (Falnes et al., 2007). Η δράση των ROS αντιστοιχεί σε περίπου 10.000 μετατροπές DNA βάσεων ημερησίως (Ames et al., 1991)! Εκ των διαφόρων μορφών DNA, η μιτοχονδριακή καταγράφεται ως η περισσότερο επιρρεπής στη δράση των ROS (Balaban et al., 2005). Εξίσου επιρρεπή εμφανίζονται και τα άκρα των χρωμοσωμάτων, που ονομάζονται τελομερή, και τα οποία κατέχουν προεξέχοντα ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιακού υλικού των οργανισμών. Η διαδικασία λειτουργίας των ROS επάγει την προοδευτική σμίκρυνση του μεγέθους των τελομερών (telomere shortening), ως αποτέλεσμα εκδήλωσης οξειδωτικού στρες. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός έχει μελετηθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία και θεωρείται πως συμμετέχει στην επιτάχυνση της διαδικασίας της γήρανσης (Richer & von Zglinicki, 2007).

Η δράση των ROS σε επίπεδο πρωτεϊνών συνδυάζεται με την οξείδωση των συγκεκριμένων μορίων, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία δυσουλφιδικών γεφυρών και εν τέλει στη μεταβολή της λειτουργίας τους. Αναλόγως με την θέση της εκάστοτε πρωτεΐνης και τη σύσταση-δομή των διαφόρων ROS, διαμορφώνεται ο βαθμός της πρωτεϊνικής καταστροφής (Droge, 2002). Εκ των 20 διαφορετικών ειδών αμινοξέων, υπάρχουν μεμονωμένες περιπτώσεις (π.χ. τυροσίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη) που καταγράφονται ως περισσότερο επιρρεπείς στη δράση των ROS. Ωστόσο, αποτελεί γεγονός πως η επίδραση της δράσης των ROS δύναται να είναι σημαντική, τόσο στη δευτεροταγή όσο και στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών (Surai, 2002; Droge, 2002).

Σημαντικές επιπτώσεις καταγράφονται και στα λιπίδια έχοντας ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της λειτουργίας και δομής της κυτταρικής μεμβράνης. Στη συγκεκριμένη κατηγορία βιολογικών μορίων, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καταγράφονται ως περισσότερο επιρρεπή στην οξείδωση, έναντι των μονοακόρεστων ή των κορεσμένων λιπαρών οξέων, αντίστοιχα. Ανάλογα με το βαθμό ποικιλίας μίας μεμβράνης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, επηρεάζεται και ο βαθμός της οξειδωτικής καταστροφής (Hulbert et al., 2007). Επιπρόσθετα, η οξείδωση των λιπιδίων δύναται να συνδυασθεί και με έτερες συνέπειες, ως αποτέλεσμα της δράσης της λιπιδικής υπεροξειδάσης που εμπλέκεται στη διαδικασία του κυτταρικού μεταβολισμού, με πιθανές προεκτάσεις τόσο σε επίπεδο DNA, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Kastan & Bartek, 2004).

1.3. Επίδραση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό

Το οξειδωτικό στρες δηλαδή η υπερίσχυση των ελευθέρων ριζών μπορεί να επηρεάζει αρνητικά τα κυτταρικά βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Αναλυτικότερα, οι πρωτεΐνες αποτελούν πρωταρχικούς στόχους οξείδωσης από τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό καρβονυλικών ομάδων σε συγκεκριμένα αμινοξέα, όπως η αργινίνη, η ιστιδίνη, η προλίνη και η λυσίνη. Οι καρβονυλικές ομάδες στην συνέχεια δεν μπορούν να διασπαστούν από το πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο κύτταρο. Το πρωτεάσωμα είναι ο βασικός κυτταρικός μηχανισμός απομάκρυνσης των κατεστραμμένων πρωτεϊνών και η λειτουργία του μειώνεται με τη γήρανση. Οι αλλαγές που προκύπτουν στη δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλουν αρνητικά ή εξαλείφουν την λειτουργία της πρωτεΐνης. Παράλληλα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που βρίσκονται κυρίως στη μεμβράνη του κυττάρου, μπορούν να οξειδωθούν από τις ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ρίζας αλκυλίου, και στη συνέχεια μιας υπεροξειδικής ρίζας LOO-, η οποία οξειδώνει αλυσιδωτά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οδηγεί σε διαρκή παραγωγή υπεροξειδίων των λιπιδίων LOOH. Το αποτέλεσμα των παραπάνω αντιδράσεων είναι η παραγωγή διενίων, όπως αλκαδιένια και μηλονική διαλδεύδη. Η λιπιδική υπεροξείδωση θα οδηγήσει σε αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης του κυττάρου, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με το DNA. Αυτό οδηγεί σε θραύση των αλυσίδων του DNA. Η οξειδωτική βλάβη της γουανίνης θα οδηγήσει στην παραγωγή 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνης, η οποία προκαλεί μεταλλάξεις και κατά συνέπεια πρόωρη γήρανση και καρκινογένεση.

Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

Όλες οι παραπάνω βλάβες που μπορούν να εμφανιστούν στα βιομόρια οδηγούν σε απώλεια κυτταρικών λειτουργιών με δυσμενείς συνέπειες για το κύτταρο. Όταν οι βλάβες συσσωρεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, τότε το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Όλο και περισσότερες ασθένειες φαίνεται να σχετίζονται με διαταραχές στην οξειδω-αναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Τα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως οι νόσοι Alzheimer, Parkinson και Huntington, η κατάθλιψη, ο αυτισμός και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Hollis et al., 2017; Haili et al.,

2011; Palet et al., 2011). Το οξειδωτικό στρες επίσης έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακά νοσήματα. Η αυξημένη οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο λόγω των ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αθηρωματικών πλάκων που συνδέονται με καρδιαγγειακά νοσήματα (Hartley et al., 2019).

Το οξειδωτικό στρες παίζει επίσης ρόλο στην ισχαιμία που ακολουθεί ένα επεισόδιο υποξίας. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οδηγήσει τόσο σε εγκεφαλικά επεισόδια όσο και σε καρδιακές προσβολές (Hartley et al., 2019). Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί επίσης με το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης (Nijs et al., 2006 & Romá-Mateo et al., 2015), με τον τραυματισμό των ιστών μετά από ακτινοβολία (D' Orazio et al., 2013), καθώς και στον διαβήτη (Luc et al., 2019). Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οξειδωτικό στρες είναι πιθανό να εμπλέκεται στην ανάπτυξη μορφών καρκίνου που σχετίζονται με την ηλικία. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται μπορούν να προκαλέσουν άμεση βλάβη στο DNA και συνεπώς να δράσουν ως μεταλλαξιογόνα και μπορεί επίσης να καταστέλλουν την απόπτωση, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Hwags et al., 2013).

Ο καπνός του τσιγάρου, με τα διάφορα εποξειδία και υπεροξειδία που περιέχει, καθώς και η εισπνοή ανόργανων σωματιδίων, όπως η άσβεστος προκαλούν οξειδωτική βλάβη των πνευμόνων (Ambrose et al., 2004). Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, όπως της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας, διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου X χρωμοσώματος (Poprac et al., 2017).

1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

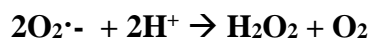
Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών διακρίνεται σε ενδογενή και εξωγενή.

Ενδογενής Αντιοξειδωτική Άμυνα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), καθώς επίσης και αντιοξειδωτικά μόρια που παράγει ο οργανισμός, όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ και διάφορες πρωτεΐνες (Sies et al., 1999).

Η επιλογή των κατάλληλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό, προκειμένου να αντιμετωπισθεί επιτυχώς και με αποτελεσματικό τρόπο η εκδήλωση οξειδωτικής καταστροφής, γίνεται με τρόπο σταδιακό. Το πρώτο επίπεδο άμυνας αποσκοπεί στην ελάττωση της ανεξέλεγκτης παραγωγής ROS από το κύτταρο. Κύριος στόχος είναι η σύσταση των μιτοχονδριακών μεμβρανών, των οποίων η κατάσταση ποικίλλει από είδος σε είδος και από ιστό σε ιστό και αναλόγως της ηλικίας, και δυνητικά εμπλέκονται στη παραγωγή ROS (Hulbert et al., 2007). Για το λόγο αυτό απαιτείται αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και παραγωγή ATP, παράμετροι οι οποίοι επάγουν την παραγωγή θερμότητας, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια. Το εν λόγω σενάριο υλοποιείται με τη δράση τριών ομάδων αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία εξασφαλίζουν το αντίθετο ακριβώς αποτέλεσμα έναντι της δράσης του ανιόντος του υπεροξειδίου. Πιο συγκεκριμένα, η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου δρα στο ανιόν του υπεροξειδίου, προκειμένου να παράγει είτε υπεροξείδιο του υδρογόνου είτε μοριακό οξυγόνο. Τα δύο αυτά προϊόντα από μόνα τους δρουν δυνητικά καταστροφικά ως προς την παραγωγή ROS.

Η *Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα, καθώς καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:

SOD



Η ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ όταν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα, ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα (Yamada et al., 2019). Η SOD δρα ως αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες στο σώμα, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες που μπορούν να οδηγήσουν σε γήρανση και προκαρκινικές αλλαγές στα κύτταρα (Yamada et al., 2019).

Υπάρχουν δύο ακόμα ένζυμα, η καταλάση και η οξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ύδωρ.

Η *καταλάση (CAT)* βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου, καταλύοντας την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Antunes et al. 2002):

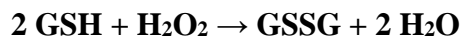
CAT



Η καταλάση συνεργάζεται με την υπεροξειδική δισμουτάση για την πρόληψη της συσσώρευσης των ελευθέρων ριζών στο σώμα. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει τη ρίζα του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια η καταλάση μετατρέπει σε νερό και οξυγόνο (Antunes et al. 2002).

Η *Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)* βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο σε διάφορες ισομορφές. Παρόμοια με την καταλάση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 , χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται στην οξειδωμένη της μορφή (Antunes et al. 2002). Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση:

GPx



Ωστόσο, η GPx ενεργοποιείται όταν το H_2O_2 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η καταλάση δρα όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι υψηλή (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Το δεύτερο επίπεδο άμυνας περιλαμβάνει την έκκριση αντιοξειδωτικών ουσιών, η δράση των οποίων επάγει την ουδετεροποίηση στη παραγωγή των ROS, μέσω της χημικής διάσπασης αλυσίδων. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες προέρχονται είτε ενδογενώς από τον ίδιο τον οργανισμό είτε εξωγενώς μέσω της διαιτητικής πρόσληψης. Όσον αφορά τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες, αυτές περιλαμβάνουν βασικά κυτταρικά συστήματα, μεταξύ των οποίων ιδιαίτερα σημαντικά είναι αυτά της θειορεδοξίνης, της γλουταθειόνης και των ουμπικινονών. Εκτιμάται πως η γλουταθειόνη αποτελεί το περισσότερο δραστικό αντιοξειδωτικό μέσο των διαφόρων βιολογικών συστημάτων (Surai, 2002). Η δράση της εστιάζεται στη καταστροφή των ελευθέρων ριζών υδροξυλίων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμο κάποιο ένζυμο που να επιτελέσει τη συγκεκριμένη λειτουργία.

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο, που συντίθεται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Αποτελεί την σημαντικότερη μικρομοριακή θειόλη που έχει βρεθεί στα ζωντανά κύτταρα όλων των οργανισμών. Αποτελεί ένα σταθερό μόριο, καθώς η παρουσία του γ-πεπτιδικού

δεσμού στο μόριο το καθιστά ανθεκτικό στην αποικοδόμηση μέσω αμινοπεπτιδασών. Η οξειδωμένη μορφή GSSG προκύπτει από την οξείδωση και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης. Πέρα από την αυτοοξείδωση της, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως την ελεύθερη κυστεΐνη, το συνένζυμο A, καθώς και με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (Sies, 1999). Το μεγαλύτερο ποσοστό της γλουταθειόνης του κυττάρου βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μόνο το 10% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια (Halliwell and Gutteridge, 1998).

Η Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί ένα φυσιολογικό λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά. Η GR χρησιμοποιεί ως συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Η φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι, σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση:

GR



Πρόσθετες ενδογενώς παραγόμενες αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνουν την υδατοδιαλυτή μορφή της βιταμίνης C και το ουρικό οξύ (Droge, 2002).

Το ουρικό οξύ είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο που βρίσκεται τόσο στα κύτταρα, όσο και στα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και η αντίδραση για το σχηματισμό του καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως άμεσο αντιοξειδωτικό, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά έναντι των οξειδωτικών βλαβών (Valko et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της άσκησης και της παρατεταμένης νηστείας αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green and Fraser, 1988).

Άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι: η το συνένζυμο Q10, η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και η χολερυθρίνη.

Το συνένζυμο Q10 είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο, που αποτελεί μια λιπιδική δομή που λειτουργεί ως συνένζυμο. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές του,

περιλαμβάνουν τόσο την άμεση δράση του ως δεσμευτή των ελευθέρων ριζών, αλλά και τη συνεισφορά του ως συνένζυμο της επαναφοράς της βιταμίνης E στην ενεργή της μορφή, έπειτα από την αντίδρασή της με κάποια ελεύθερη ρίζα. Το συνένζυμο Q10 παράγεται στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά προσλαμβάνεται και μέσω κάποιων τροφών (όπως τα λιπαρά ψάρια). Επίσης, το συνένζυμο Q10 εντοπίζεται και στα τρόφιμα (κυρίως στο κρέας), αλλά το μαγείρεμα και οι μέθοδοι κατεργασίας μπορούν να το καταστρέψουν (Halliwell and Gutteridge, 1998).

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει το H_2O_2 και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH.

Η χολερυθρίνη δημιουργείται από την δράση του ενζύμου ρεδουκτάση της χολοπρασίνης (biliverdin reductase). Η χολοπρασίνη είναι προϊόν του καταβολισμού της αίμης (Jansen and Daiber, 2012). Σε μελέτες in vitro φαίνεται να αναστέλλει τη παραγωγή του υπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα. Συνδεδεμένη η χολερυθρίνη με την αλβουμίνη μπορεί να δράσει προστατευτικά ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, τόσο για την αλβουμίνη όσο και για τα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται από αυτή.

Από την άλλη πλευρά, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν και αντιοξειδωτικές ουσίες που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, μεταξύ των οποίων η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή και το σελήνιο. Ο ρόλος της βιταμίνης E χρήζει ιδιαίτερης σημασίας, καθώς διαδραματίζει βασικό αντιοξειδωτικό ρόλο στα διάφορα είδη κυτταρικών μεμβρανών, μέσω της απομάκρυνσης του ελεύθερου οξυγόνου και της διακοπής της χημικής αντίδρασης της υπεροξειδάσης των λιπών.

Το τελικό επίπεδο άμυνας περιλαμβάνει την απομάκρυνση ή επιδιόρθωση κατεστραμμένων μορίων, ως αποτέλεσμα εκδήλωσης της οξειδωτικής καταστροφής. Το συγκεκριμένο στάδιο επιβεβαιώνει πως ανεξαρτήτως των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών που αναφέρθηκαν, θα επέλθει τελικά κάποιου βαθμού οξειδωτική καταστροφή. Η διαδικασία επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού είναι κομβικής σημασίας για την κυτταρική λειτουργία ενός οργανισμού και απαιτείται η λειτουργία σύνθετων οδών αναγνώρισης της κυτταρικής καταστροφής (Kastan & Bartek, 2004).

Εξωγενής Αντιοξειδωτική Άμυνα

Όπως προαναφέρθηκε, στη φύση υπάρχει ένα σύνολο χημικών μορίων που εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση. Πολλά από αυτά που βρίσκονται στις τροφές, όπως η βιταμίνη C και E, και αποτελούν απαραίτητα στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου. Τα περισσότερα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι φυτικής προέλευσης και περιλαμβάνουν μια πληθώρα χημικών ομάδων, όπως τα καροτένια και οι φαινολικές ενώσεις.

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελεί μια απαραίτητη λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από οκτώ φυσικές τοκοφερόλες. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη E αποτελούν οι ξηροί καρποί, αλλά και τα φυτικά έλαια όπως το ελαιόλαδο. Η πιο δραστική και πιο άφθονη τοκοφερόλη στις τροφές είναι η α-τοκοφερόλη. Εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου και προστατεύει τα λιπίδια και τη βιταμίνη A από την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες, δρώντας ως αντιοξειδωτικό (Halliwell and Guttering, 2015).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Εμφανίζεται με δύο ενεργές μορφές: το L-ασκορβικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ. Βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και στα λαχανικά. Υψηλές ποσότητες σε βιταμίνη C περιέχουν τα εσπεριδοειδή, διάφορα μούρα, το ακτινίδιο και οι πιπεριές. Δρα ως αναγωγικός παράγοντας (Page, et al., 2000) και ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, εξουδετερώνοντας άμεσα τις ROS (Halliwell and Guttering, 2015).

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χημικές χρωστικές που συναντώνται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν μπορούν να παραχθούν βιοχημικά σε ζωικούς οργανισμούς. Προσδίδουν το κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα διαφόρων φρούτων και των λαχανικών. Τα καροτενοειδή περιλαμβάνουν πάνω από 600 διαφορετικές χημικές ουσίες με σημαντικότερες το β-καροτένιο και το λυκοπένιο. Το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία εξουδετερώνουν τα μονήρη ηλεκτρόνια (Pham-Huy et al., 2008). Το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε δύο όμοια μόρια βιταμίνης A. Επιπλέον, τα καροτένια δρουν σταθεροποιώντας τις υπεροξειδικές ρίζες (Valko et al., 2006).

β-καροτένιο

Το β-καροτένιο αποτελεί ένα λιποδιαλυτό μόριο το οποίο βρίσκεται δεσμευμένο σε ειδικούς υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών. Δρα προστατευτικά έναντι των ελευθέρων ριζών, περιορίζοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Halliwell and Guttering, 2015; Page, et al., 2000). Πιστεύεται ότι διαδραματίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλληλεπιδρώντας με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell and Guttering, 2015).

Λυκοπένιο

Το λυκοπένιο ανήκει στα καροτενοειδή. Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή χρωστική που δίνει κόκκινο χρώμα σε διάφορα φυτικά τρόφιμα. Το λυκοπένιο αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι εξουδετερώνει ορισμένες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως η ρίζα του υδροξυλίου (HO·), το υπεροξειδικό ανιόν (O₂⁻), τα υπεροξειδία (RO-O·) και το μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen). Είναι ισχυρότερο αντιοξειδωτικό από τη βιταμίνη E και τη γλουταθειόνη. Η δράση του είναι 10 φορές πιο ισχυρή από την τοκοφερόλη, 100 φορές από την βιταμίνη E και 125 φορές από την γλουταθειόνη (Böhm et al., 2001).

Λουτεΐνη

Η λουτεΐνη ανήκει στα καροτενοειδή και αποτελεί μια αντιοξειδωτική ουσία. Στον άνθρωπο εντοπίζεται κυρίως στους οφθαλμούς. Η λουτεΐνη φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα και τους ιστούς στους οφθαλμούς και συγκεκριμένα την ωχρά κηλίδα, από οξειδωτικές βλάβες προκαλούμενες από το φως (Li et al., 2020).

Ζεαξανθίνη

Η ζεαξανθίνη ανήκει στα καροτενοειδή. Η ζεαξανθίνη, ως καροτενοειδές, μπορεί να συμβάλλει στη μείωση των κινδύνων εμφάνισης καρκίνου του μαστού και των πνευμόνων λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής της ικανότητας, αλλά και στη μείωση εμφάνισης καρδιακών παθήσεων και εγκεφαλικού επεισοδίου (Handelman et al., 2001).

Σελήνιο

Το σελήνιο αποτελεί ένα ιχνοστοιχείο που δρα αντιοξειδωτικά ως συμπαραγοντας της GPx και είναι απαραίτητο για την πρόληψη ασθενειών (καρδιακές μυοπάθειες) (Halliwell and Guttering, 2015; Page, et al., 2000).

Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος είναι ένα βασικό ιχνοστοιχείο που συμμετέχει στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Έχει αντιοξειδωτική δράση και συμμετέχει ως συμπάραγοντας στο μεταβολισμό μακροθρεπτικών συστατικών. Συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, στο πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων και στην άμυνα του οργανισμού. Επιπλέον, έχει σημαντικό ρόλο στην υγεία του δέρματος, των μαλλιών και των οστών, στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων τεστοστερόνης στο αίμα, και στη διατήρηση της φυσιολογικής όρασης (Muhamed et al., 2014).

Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες, αποτελούν ένα ιδιαίτερο σύνολο φυτοχημικών ουσιών που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Είναι απαραίτητες για τη φυσιολογία πολλών φυτών, καθώς συμμετέχουν στην φυσική άμυνα του φυτού απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια μύκητες και ιούς, αλλά και τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας, του όζοντος, καθώς και σε περιβαλλοντικές μολύνσεις (Korkina et al., 2009).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά προέρχονται από τον μεταβολισμό κυρίως των αμινοξέων και των υδατανθράκων, μέσω προσθήκης χημικών ομάδων όπως μεθυλίου, υδροξυλίου και γλυκοξυλίου. Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών και έχουν αναγνωριστεί πάνω από 8000 διαφορετικές δομές. Κάποιες κατηγορίες τους περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή, τα κουρκουμινοειδή, τις ταννίνες κ.α. (Rahman et al., 2006). Όλες οι πολυφαινόλες διαθέτουν μια κοινή δομή, έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, δηλαδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις (Duthie et al., 2003). Ερευνητικά δεδομένα αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία των φυτικών τροφών και αφεψημάτων στις πολυφαινόλες (Korkina et al., 2009).

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, αναφέρονται οι εξής ομάδες (Manach et al., 2004):

- Φλαβονοειδή (π.χ. κερκετίνη, κατεχίνη, καμφερόλη)

- Πολυφαινολικά οξέα (καφεϊκό)
- Στιλβένια (ρεσβερατρόλη)
- Λιγνάνες

Μεσογειακή διατροφή και αντιοξειδωτικά

Η μεσογειακή διατροφή, δηλαδή η παραδοσιακή διατροφή των χωρών της Μεσογείου, έχει ως βασικό χαρακτηριστικό της, μεταξύ άλλων, την υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, καθώς και των προϊόντων τους, όπως το κρασί και το ξύδι. Παράλληλα, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την επίδραση προϊόντων όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, αλλά και ουσιών που υπάρχουν σε αυτά, στην υγεία. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση ουσιών, όπως οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο κρασί, σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών και άλλων εκφυλιστικών νοσημάτων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά της διατροφής, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, περιλαμβάνουν την βιταμίνη C, την βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, τις πολυφαινόλες, και ανόργανα συστατικά όπως το σελήνιο. Πολλά φρούτα που περιλαμβάνονται στην μεσογειακή διατροφή έχουν μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα μούρα και το ρόδι. Τα μούρα και ειδικότερα τα μύρτιλλα όταν καταναλώνονται για διάστημα έξι εβδομάδων φαίνεται ότι μειώνουν το οξειδωτικό στρες και τις οξειδωτικές βλάβες στο DNA. Επίσης ο χυμός ροδιού φαίνεται ότι μέσα σε 15 ημέρες μπορεί να μειώσει σημαντικά την λιπιδική υπεροξείδωση και να αυξήσει τα επίπεδα της γλουταθειόνης (Mathaiou et al., 2014).

Στην παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή εξέχουσα θέση καταλαμβάνουν διάφορα μυρωδικά που συνοδεύουν τις τροφές όπως σαλάτες και μαγειρεμένα φαγητά αλλά και βότανα που καταναλώνονται με την μορφή αφεψήματος. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η ρίγανη, ο βασιλικός, η δάφνη, το δενδρολίβανο, ο δυόσμος, το θυμάρι, η μέντα, ο μαιντανός και ο άνηθος. Η ρίγανη περιέχει πλήθος αιθέριων ελαίων, τα οποία σύμφωνα με μελέτες, έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και αντιμικροβιακή δράση προφυλάσσοντας τον οργανισμό από διάφορες ασθένειες. Το εκχύλισμα του βασιλικού έχει δράση που προλαμβάνει τις άφτρες, τους πονοκεφάλους και βοηθά στην πέψη των τροφών και καταπραΰνει τους σπασμούς (Bower A et al., 2016). Τα φύλλα της δάφνης χρησιμοποιούνται σε σάλτσες, ψαρικά, κρέατα και όσπρια, ενώ το

εκχύλισμή της καταπολεμά τη δυσπεψία και αυξάνει την όρεξη. Έχει αντισηπτικές ιδιότητες και είναι πολύτιμη για το συνάχι και τη βρογχίτιδα (Bower A et al., 2016). Το δαφνέλαιο είναι κατάλληλο για τους ρευματισμούς. Το δενδρολίβανο τονώνει τη λειτουργία του ήπατος, βοηθά στη μείωση της χοληστερίνης και αναζωογονεί τον κουρασμένο οργανισμό. Ο δυόσμος καταπολεμά τους πόνους του στομάχου, την ναυτία και τη δυσπεψία. Στη μαγειρική χρησιμοποιείται αρκετά ως μυρωδικό σε κεφτέδες, καλτσούνια, μυζηθρόπιτες, σάλτσες κλπ. Το εκχύλισμα θυμαριού μπορεί να προλαμβάνει το κρύωμα, ρίχνει τον πυρετό, καταπολεμά τη γρίπη, τις εντερικές διαταραχές και δερματικές. Η μέντα είναι αντισηπτική, καταπολεμά το συνάχι, τη γρίπη και τον πονόλαιμο. Επίσης βοηθά στην χώνεψη (Bower A et al., 2016). Ο μαϊντανός δρα ως διουρητικό, ως τονωτικό και αντιφλεγμονώδες. Τέλος ο άνηθος είναι πλούσιος σε βιταμίνες και μέταλλα όπως φώσφορος, κάλιο, ασβέστιο και μαγνήσιο.

1.5. Υπολογισμός οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα στοιχεία, μεταξύ των οποίων η παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι αντιοξειδωτικές άμυνες, η οξειδωτική καταστροφή και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης, των οποίων είναι εφικτή η μέτρηση. Η ποικιλία μεθόδων που υφίσταται για τη μέτρηση κάθε στοιχείου είναι μεγάλη και έχει μελετηθεί ποικιλοτρόπως στη διεθνή βιβλιογραφία (Marcos & Bravo, 2007; Somogyi et al., 2007; Del Rio et al., 2005; Guetens et al., 2002).

Η ESR (electron spin resonance) τεχνική αποτελεί τη μοναδική προσέγγιση, μέσω της οποίας είναι εφικτή η απευθείας παρατήρηση των ελευθέρων ριζών (Halliwell & Gutteridge, 2007). Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται συνδυαστικά με την τεχνική του spin trapping, οπότε και επιλέγεται ένα μόριο-παγίδα προκειμένου να αντιδράσει με μια ρίζα, με στόχο την παραγωγή ενός σταθερότερου και, το βασικότερο, μετρήσιμου προϊόντος. Ωστόσο, η εφαρμογή των συγκεκριμένων μεθόδων ενδέχεται να συνοδεύεται και από σφάλματα, γεγονός που περιορίζει το βαθμό αποτελεσματικότητάς τους.

Η αξιολόγηση των διαφόρων αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών επιτυγχάνεται με την μέτρηση τόσο ενζυμικών, όσο και μη ενζυμικών ουσιών σε ιστούς και βιολογικά υγρά (Selman et al., 2002). Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC (total antioxidant capacity) εκτιμάται με ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μεθόδων στο πλάσμα και στα βιολογικά υγρά (Somogyi et al.,

2007; Cohen et al., 2007). Ωστόσο, δεν έχουν επί του παρόντος συσχετισθεί τα εκάστοτε *in vivo* και *in vitro* ευρήματα (Somogyi et al., 2007).

Η εκδήλωση οξειδωτικής καταστροφής πραγματοποιείται στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Όταν εκδηλώνεται η οξειδωτική καταστροφή του γενετικού υλικού, τροποποιούνται σάκχαρα και βάσεις, καταστρέφεται η δεοξυριβόζη, ενώ επίσης διαταράσσονται οι εκάστοτε πρωτεϊνικές χημικές συνδέσεις (Halliwell & Gutteridge, 2007). Οι δείκτες καταστροφής του DNA που χρησιμοποιούνται συχνότερα περιλαμβάνουν τις συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OhdG) και 8-hydroxyguanine (8-OH-G). Τα συγκεκριμένα προϊόντα αποτελούν τα οξειδωμένα παράγωγα της γουανίνης, του νουκλεοτιδίου που είναι το περισσότερο επιρρεπές στην οξείδωση. Η HPLC τεχνική με ηλεκτροχημική ανίχνευση (HPLC-ECD, high performance liquid chromatography-electrochemical detection) αποτελεί τη κυριότερη μέθοδο ανίχνευσης των επιπέδων των 8-OhdG και 8-OH-G, αντίστοιχα.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται είτε με απευθείας επίθεση των ROS είτε με έμμεση δράση από τη λιπιδική υπεροξειδάση (Halliwell & Gutteridge, 2007). Ακολούθως, ρίζες καρβονυλίου εισέρχονται στις πρωτεΐνες με άμεση οξείδωση των αμινοξέων ή με έμμεση προσκόλληση μέρους του καρβονυλίου. Με αυτόν τον τρόπο μεταβάλλεται η δομή των πρωτεϊνών στο χώρο και η λειτουργικότητά τους. Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση καρβονυλομάδων στις πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τη φασματοφωτομετρία, την ELISA και την ηλεκτροφόρηση με Western blot (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Αναφορικά με την οξείδωση των λιπιδίων, αποτελούν μείζονα στόχο του οξειδωτικού stress και η λιπιδική υπεροξειδάση οδηγεί σε σχηματισμό επιβλαβών προϊόντων, εκ των οποίων οι σημαντικότεροι δείκτες είναι η F2-isoprostanes και η malondialdehyde (MDA), που αποτελούν προϊόντα αποσύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Επιπρόσθετα, έχουν αναπτυχθεί πολλές φασματομετρικές και χρωματογραφικές μέθοδοι για τη μέτρηση των MDA και των ισοπροστανών (Del Rio et al., 2005).

Ένα σημαντικό σημείο που πρέπει να αναφερθεί και να διευκρινιστεί είναι πως η μέτρηση ενός μόνο προϊόντος οξείδωσης στο DNA δεν επαρκεί για την αντικειμενική εκτίμηση της οξείδωσης του DNA. Προτείνεται η μέτρηση πολλαπλών τροποποιημένων βάσεων κατά την ίδια χρονική στιγμή με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας (gas chromatography-mass spectrometry). Λοιπές μέθοδοι για την εκτίμηση της οξείδωσης του DNA αποτελούν η High Performance

Liquid Chromatography (HPLC) με φασματομετρία μάζας, η Antibody-based Immunoassays, η Aldehyde Reactive Probe (ARP) assay σε συνδυασμό με ELISA-like assay και η Comet assay (Marcos & Bravo, 2007; Guetens et al., 2002). Οι συγκεκριμένες μετρήσεις δεν διευκρινίζουν που συμβαίνει η βλάβη, κοινώς εάν η οξείδωση επισυμβαίνει σε ενεργά γονίδια, σε τελομερή ή σε “junk” DNA, οπότε και απαιτείται να είναι γνωστός ο τύπος οξείδωσης του DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Τέλος, σχετικά με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι (π.χ. φασματοφωτομετρία, Comet assay), μέσω των οποίων είναι εφικτή η δυνατότητα επανόρθωσης της ενζυμικής δραστηριότητας.

Κεφάλαιο 2

2.1. Δείκτες οξειδωτικού στρες

Υπάρχουν σταθεροί δείκτες οξειδωτικού στρες, των οποίων η δράση μπορεί να απορρέει από συστηματικό ή εξαρτώμενο από κάποιον ιστό οξειδωτικό στρες. Χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων μορίων είναι ότι τροποποιούνται μέσα από αλληλεπίδραση με ROS του μικροπεριβάλλοντος χώρου (Knasmuller et al., 2008) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Δείκτες που βασίζονται σε τροποποιήσεις που επάγει η δράση των ROS

Markers	Methods	Limitations and confoundings
<i>Lipid oxidation</i>		
HNE	HPLC, GC-MS Immunoassay	
MDA, alkenals, alkadienals	Spectrophotometric/fluorimetric (TBARS), HPLC (UV or fluorescence) Immunoassay	Sugars, amino acids, bilirubin and albumin, hemolysis
F2-IsoPs	Gas/liquid chromatography coupled with mass spectroscopy techniques Immunoassay	Hemolysis Antibody specificity
<i>DNA oxidation</i>		
8oxodG, 5-chlorocytosine, 5-chlorouracil, edA, edC	ELISA assays, HPLC-ECD, HPLC/GC-MS	Antibody specificity
<i>Protein oxidation</i>		
ALEs, AGEs	HPLC, Western blot after one-dimensional or two-dimensional electrophoretic separation, immunohistochemistry, ELISA	Structural heterogeneity of these products Antibody specificity
Carbonils	Spectrophotometric, HPLC, ELISA	
3-NO-Tyr	HPLC/GC-MS, ELISA	Possible nitration of tyrosine residues in the sample by the presence of nitrite and the acid conditions during protein precipitation and hydrolysis Antibody specificity
AOPP	MS, colorimetric assays	
oxLDL	Immunodetection (ELISA)	Antibody specificity
IMA	ABC test, immunodetection (ELISA)	Sensitive to pH changes, temperature, and time of sample storage Antibody specificity

(Συντομογραφίες: ROS-reactive oxygen species, 8oxodG-7,8-dihydroxy-8-oxo-2'-deoxyguanosine, ABC test-binding capacity of albumin for cobalt, AGEs-advanced glycation end products, ALEs-advanced lipoxidation end products, AOPP-advanced oxidation protein products, F2-IsoPs-F2-isoprostanes, GC-gas chromatography, HNE-4-hydroxy-2-nonenal, HPLC-high-performance liquid chromatography, ECD- electrochemical detection, IMA-ischemia-modified albumin, MS-mass spectroscopy, MDA- malondialdehyde, TBARS-thiobarbituric acid reactive substances)

Πηγή: Marrocco et al., 2017

Τα λιπίδια, το DNA και οι πρωτεΐνες αποτελούν περιπτώσεις μορίων που δύνανται να τροποποιηθούν με περίσσεια ROS *in vivo* (Knasmuller et al., 2008). Ορισμένες από αυτές τις τροποποιήσεις έχουν άμεσο αποτέλεσμα στη λειτουργία μορίων-στόχων, όπως για παράδειγμα την αναστολή της ενζυματικής λειτουργίας, ενώ άλλες τροποποιήσεις απλά αντικατοπτρίζουν το βαθμό του οξειδωτικού στρες. Ως εκ τούτου, η κλινική εφαρμογή αρκετών δεικτών οξειδωτικού στρες επηρεάζεται, καθώς η λειτουργική σημασία ή η αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικών τροποποιήσεων και

βιολογικών λειτουργιών αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό της εγκυρότητας ενός μεμονωμένου δείκτη (Πίνακας 1).

Αξίζει να αναφερθεί πως εάν και ο υπολογισμός του οξειδωτικού στρες στο ωτιαίο μυελό (Juramek et al., 2015) και τους ιστούς (Ozbay et al., 2016; Mateu-Jimenez et al., 2016) κρίνεται ως περιοριστικός σε συγκεκριμένες παθήσεις, το φλεβικό αίμα και τα ούρα αποτελούν τα δείγματα που χρησιμοποιούνται συνήθως στην κλινική πράξη (Asare et al., 2016; Suehiro et al., 2016; Turk et al., 2004). Εκτός όμως από τα προαναφερθέντα δείγματα, έχουν επίσης προταθεί στη διεθνή βιβλιογραφία άλλες περιπτώσεις μη επεμβατικών και χαμηλού κόστους μεθόδων για τον έλεγχο του οξειδωτικού στρες, όπως η ανάλυση της σιέλου (Kaur et al., 2016; Smriti et al., 2016; Antus, 2016) ή της ανάσας στην εκπνοή (Yildirim et al., 2016; Schumer et al., 2016; 2015). Υπάρχουν ωστόσο μεμονωμένα ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία οι δείκτες της κρεατινίνης στα ούρα δεν κρίνονται ως κατάλληλοι δείκτες για ασθενείς με διαταραγμένη νεφρική λειτουργία (Turk et al., 2004). Επομένως, η αξιοπιστία ενός δείκτη συνδιαμορφώνεται από την επιλογή του δείγματος με βάση τα χαρακτηριστικά των ασθενών και τη βέλτιστη αναλογία κόστους-οφέλους.

2.1.1. Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων

Η διαδικασία του καθορισμού των τελικών προϊόντων της διαδικασίας οξείδωσης των λιπιδίων οδηγεί στην εύρεση δεικτών του οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία διπλών δεσμών συμβάλλει στην ευπάθεια των μορίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) (με κύριο χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο το αραχιδονικό οξύ) στην οξειδωτική βλάβη, κάτω από συνθήκες παρουσίας ROS ή άλλων ελεύθερων ριζών (Negre-Salvayre et al., 2010). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω ενζυματικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από την λιποοξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση. Τα συγκεκριμένα ένζυμα οξειδώνουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνη, θρομβοξάνη και λευκοτριένια (Sousa et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία ελεύθερων ριζών ROS (κυρίως HO^{*} και ROO^{*}) ενεργοποιεί μία αυτοκαταλυτική αλυσιδωτή αντίδραση, μέσω της οποίας αφαιρείται ένα άτομο υδρογόνου και ακολούθως δημιουργείται μία ρίζα άνθρακα που μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο και να παράγει μία ρίζα υπεροξυλίου. Το συγκεκριμένο είδος ρίζας δρα μέσω της μεταφοράς ιόντων σε μορφή αλυσίδας και της δημιουργίας λιπιδιακών υδροπεροξειδίων. Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες υπάρχουν μέταλλα μεταβατικού

τύπου, είναι δυνατή η δημιουργία αλκοξυλιακών λιπιδικών ομάδων, καθώς επίσης και HO* και ROO*, οι οποίες επιτείνουν την αντίδραση οξειδωσης και διευκολύνουν τη δημιουργία οξειδωτικών προϊόντων με περιορισμένο αριθμό ατόμων (π.χ. αλδεύδες, αλκάνια και αλκένια). Τα περισσότερο καλά μελετημένα τελικά προϊόντα λιπιδικής οξειδωσης περιλαμβάνουν τα μόρια MDA (malondialdehyde) και HNE (4-hydroxy-2-nonenal) (Sousa et al., 2017).

Ο εντοπισμός της HNE πραγματοποιείται είτε απευθείας με HPLC (high-performance liquid chromatography) είτε ως παράγωγο προϊόν με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη ή 1,3-κυκλοεξανιδιόνη με GC-MS (χρωματογραφία αερίων σε συνδυασμό με σπεκτρομετρία μάζας) είτε με ανοσολογικές τεχνικές και χρησιμοποίηση ειδικών αντι-HNE αντισωμάτων (Sousa et al., 2017; Zelzer et al., 2015; Goldring et al., 1993). Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί, πως σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές σε δείγματα πλάσματος και ούρων μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών ατόμων, υποδεικνύοντας πως μόνο το δείγμα πλάσματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης εξέλιξης της συγκεκριμένης αυτοάνοσης πάθησης (Luczaj et al., 2016).

Το MDA, τα αλκένια και τα αλκαδιένια συγκροτούν τα TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), τα οποία αντιδρούν με δύο μέρη TBA (thiobarbituric acid) και δίνουν ένα σύμπλοκο ροζ χρώματος, που μπορεί να εντοπισθεί με μία θερμοδομετρική ή φθορισμομετρική δοκιμασία (Πίνακας 1). Εάν και υπάρχει η δοκιμασία TBA για τη μέτρηση του MDA με σκοπό την αξιολόγηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, εντούτοις η συγκεκριμένη μέθοδος χαρακτηρίζεται ως μη ειδική και επιρρεπής στη συχνή παραγωγή παραπροϊόντων (Del Rio et al., 2005; Abuja & Albertini, 2001; Knight et al., 1988). Αποτελεί γεγονός πως το TBA μπορεί να αντιδράσει με σάκχαρα, αμινοξέα, χολερυθρίνη και αλβουμίνη, δημιουργώντας προβλήματα στη διαδικασία της μέτρησης (Πίνακας 1). Ως εκ τούτου, επιστρατεύονται παρεμβάσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την προσθήκη αντιοξειδωτικών παραγόντων (π.χ. Butylated Hydroxytoluene, BHT) και την ελάττωση του χρόνου θέρμανσης. Ένα πρόσθετο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεσολάβηση της αιμόλυσης, με αποτέλεσμα να αυξάνονται ψευδώς τα επίπεδα MDA (Πίνακας 1). Υπό αυτή την έννοια, δεν προκαλεί εντύπωση πως πλειάδα πρωτοκόλλων και συνοδών τροποποιήσεων είναι διαθέσιμες στο χώρο της βιβλιογραφίας. Ο καθορισμός MDA με HPLC (συνδυαστικά με UV ή φθορισμό) αποτελεί στις μέρες μας την περισσότερο αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη μέθοδο (Domijan et al., 2015; Grotto et al., 2007; Sim et al., 2003). Παρά τους διάφορους μεθοδολογικούς περιορισμούς, η καταγραφή των

MDA επιπέδων μπορεί να αξιοποιηθεί σε κλινικό επίπεδο, ως αποτέλεσμα του παθογενετικού ρόλου σε επίπεδο επαγωγής παραχθέντων IL-17 κυττάρων (Natarajan et al., 2015), καθώς και ως συνδετικός κρίκος μεταξύ της λιπιδικής υπεροξειδωσής και των βοηθητικών T-17 κυττάρων σε παθήσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Ueno et al., 2015).

Τα F2-IsoPs (F2-isoprostanes) αποτελούν προσομοιάζοντα με προσταγλανδίνη ισομερή, τα οποία χαρακτηρίζονται από χημική σταθερότητα, δημιουργούνται μέσω της αντίδρασης των PUFAs με φωσφολιπίδια των μεμβρανών, ελεύθερες ρίζες ή ROS και αποτελούν επίσης αξιόπιστο δείκτη αξιολόγησης του οξειδωτικού στρες *in vivo* (Smith et al., 2011; Dreissigacker et al., 2010; Proudfoot et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, δημιουργούνται στις λιπιδικές μεμβράνες ως απόρροια εκδήλωσης οξειδωτικού στρες και ακολούθως αποδεσμεύονται σε ελεύθερη μορφή με την δράση της φωσφολιπάσης. Το γεγονός πως τα F2-IsoPs παραμένουν ανεπηρέαστα από τη σύσταση τους διαιτητικού λίπους συνεπάγεται πως η μέτρησή τους σε βιολογικά υγρά και τα εκπνεόμενα αέρια μπορεί να προσφέρει μία εκτίμηση του συνόλου της σωματικής παραγωγής τους. Από την άλλη πλευρά, ο υπολογισμός των εστεροποιημένων ισομερών των F2-IsoPs σε συγκεκριμένους ιστούς, μπορεί να προσφέρει πληροφορίες εντοπισμού και μέτρησης ενός συγκεκριμένου τύπου οξειδωτικού στρες. Εκτός όμως από τις προαναφερθείσες επισημάνσεις, η αξιοποίηση των F2-IsoPs ως βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες παραμένει περιορισμένη, καθώς η μέτρησή τους κρίνεται ως αυξημένου κόστους (απαιτείται συνδυασμός των HPLC και Χρωματογραφίας αερίων - Φασματομετρίας μάζας, GC-MS).

Οι τεχνικές ανοσοδοκιμασίας, η χρήση των οποίων βασίζεται σε συγκεκριμένα αντισώματα, τελούν προς το παρόν υπό διαμόρφωση και οι εφαρμογές τους είναι περιορισμένες, καθώς τα αναμενόμενα αποτελέσματα δεν συμβαδίζουν με τις αντίστοιχες μετρήσεις σπεκτρομετρίας μάζας (Smith et al., 2011; Ilyasova et al., 2004; Proudfoot et al., 1999). Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη πως σε ορισμένες περιπτώσεις φλεγμονωδών καταστάσεων, το ενζυματικό προϊόν του αραχιδονικού οξέος PGF2a (prostaglandin F2a) πρέπει να αξιολογηθεί με μη ενζυματικά οξειδωμένα προϊόντα σε διαφορετικά είδη ιστών (Lam et al., 2016). Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν πως καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα PGF2a στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα επίπεδα των F2-IsoPs. Ωστόσο, στο πλάσμα καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα PGF2a και f2-IsoPs στους ασθενείς, ανάλογα με τον βαθμό εξέλιξης της νόσου (Lam et al., 2016). Πρόσφατες μελέτες σε

ζωικά μοντέλα με ρευματοειδή αρθρίτιδα προτείνουν τη διερεύνηση του προφίλ του μεταβολώματος των εικοσανοειδών (Wang et al., 2017; 2016).

2.1.2. Δείκτες οξειδωσης του DNA

Η διαδικασία οξειδωσης των συστατικών του DNA με ROS/RNS αποτελεί την βασική πηγή επαγωγής των βλαβών του DNA, με συνεπακόλουθο σειρά τροποποιήσεων που περιλαμβάνουν την οξειδωση των νουκλεοτιδίων, τη διάσπαση αλύσων, την απώλεια βάσεων, καθώς επίσης και το σχηματισμό προϊόντων αντιδράσεων προσθήκης (Dizdaroglu et al., 2002; Wiseman & Halliwell, 1996). Η ρίζα HO διαθέτει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με όλες τις διαθέσιμες πουρίνες και πυριμιδίνες, καθώς και με το σκελετό δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, το σημαντικότερο εκ των οποίων είναι η 8oxodG (7,8-dihydroxy-8-oxo-2'-deoxyguanosine) (Cadet et al., 2003).

Οι οξειδωτικά επαγόμενες βλάβες μπορεί να οδηγήσουν σε αποδόμηση αλληλουχιών βάσεων και δημιουργία ιόντων άνθρακα, η δράση των οποίων τις περισσότερες φορές έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των αλυσίδων DNA. Έκθεση του DNA σε RNS προάγει την απαμίνωση των βάσεων DNA και τη μετατροπή της γουανίνης σε ξανθίνη, οξανίνη και 8-νιτρογουανίνη. Τα βασικά τελικά προϊόντα των επαγόμενων από το υποχλωριώδες οξύ (HClO) αντιδράσεων περιλαμβάνουν την 5-χλωροκυτοσίνη και την 5-χλωρουρακίλη, οι οποίες αποτελούν τροποποιημένες βάσεις, εντοπίζονται σε εστίες φλεγμονής και είναι δηλωτικές βλαβών στο DNA *in vivo*-επαγόμενης από το υποχλωριώδες οξύ (Knaapen et al., 2006).

Η πρόκληση βλαβών στο DNA μπορεί επίσης να επιτευχθεί από αντιδρώντα προϊόντα, αποτέλεσμα των ROS-επαγόμενων τροποποιήσεων άλλων μορίων, όπως για παράδειγμα λιπιδίων. Σε αυτή την περίπτωση, δημιουργούνται etheno-DNA προσθήκες, όπως οι edA [1,N(6)-etheno-2'-deoxyadenosine] και edC [3,N(4)-etheno-2'-deoxycytidine], οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες (Li et al., 2015). Μία πρόσθετη λειτουργία τους που έχει καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ως δυνητικοί δείκτες αξιολόγησης της εξέλιξης φλεγμονωδών καρκινικών νοσημάτων (Bartsch & Nair, 2005). Αυξημένα επίπεδα edC καταγράφονται σε ιστούς ασθενών που υποφέρουν από χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (Nair et al., 2006), ενώ αυξημένα επίπεδα edA στα ούρα έχουν αναφερθεί σε εργάτες που έχουν εκτεθεί σε εξάτμιση πετρελαιοκινητήρων (Bin et al., 2016). Ο

τρόπος μέτρησης των επιπέδων etheno-DNA επιτυγχάνεται με αξιοποίηση τεχνικών που βασίζονται στη λειτουργία της υγρής χρωματογραφίας μάζας (HPLC/MS) (Li et al., 2015; Cui et al., 2014).

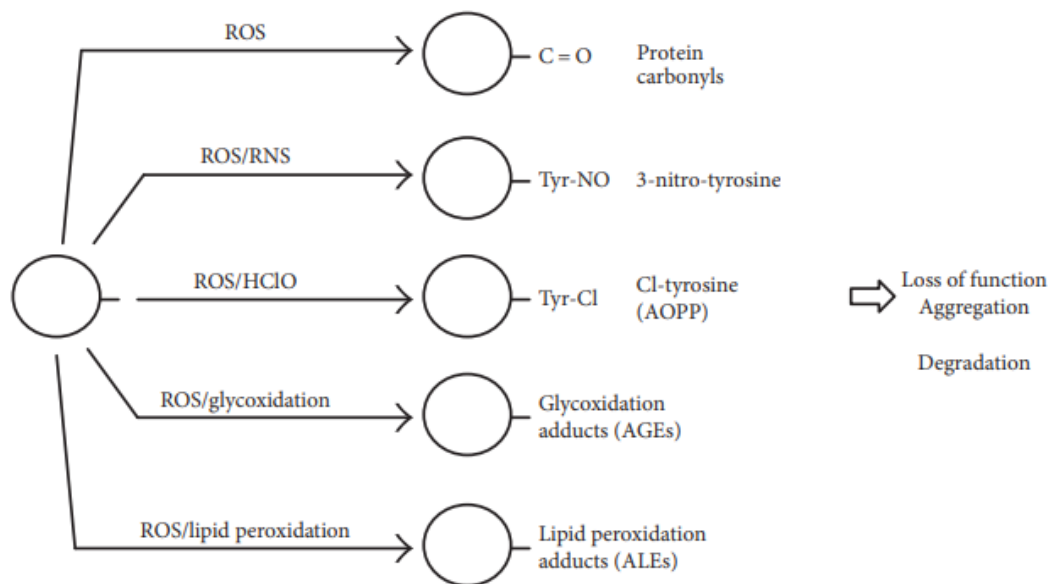
Έχει εκτιμηθεί πως αρκετές εκατοντάδες 8-oxodG επαγόμενων βλαβών μπορούν να δημιουργηθούν ημερησίως σε ένα κύτταρο των θηλαστικών, αντιστοιχώντας στο 5% επί του συνόλου των οξειδωτικών βλαβών. Υπό αυτή την έννοια, η 8-oxodG αποτελεί τον περισσότερο χαρακτηριστικό δείκτη οξείδωσης του DNA και μέτρησης του οξειδωτικού στρες (Cadet & Wagner, 2014; Dizdaroglu & Jaruga, 2012; Ravanat et al., 2012). Αποτελεί πραγματικότητα το γεγονός πως έχουν καταγραφεί αρκετές δυσκολίες σε επίπεδο υπολογισμού της 8-oxodG και λοιπών περιπτώσεων οξειδωμένων πουρινών και πυριμιδινών. Ο συνδυασμός χρωματογραφίας και σπεκτρομετρίας μάζας έχει συμβάλλει στη δημιουργία αξιόπιστων δοκιμασιών, ανεξάρτητα από την διαθεσιμότητα ειδικών αντισωμάτων για ELISA (European Standards Committee on Urinary Lesion et al., 2010; Gedik et al., 2005). Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί πως αν και οι δοκιμασίες ELISA υπολείπονται ειδικότητας, υπάρχουν κάποιες μεμονωμένες περιπτώσεις που έχουν βρεθεί κατάλληλες σε δείγματα ούρων (Cooke et al., 2008). Τα οξειδωμένα νουκλεοτίδια εκκρίνονται στα ούρα και ο υπολογισμός των επιπέδων τους έχει προγνωστικό ρόλο στην εκδήλωση αρκετών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα οξείδωσης του DNA, υπολογιζόμενα ως έκκριση της 8-oxodG στα ούρα, είναι δηλωτικά κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του μαστού και των πνευμόνων, αθηροσκλήρωσης και διαβήτη (Kant et al., 2016; Sova et al., 2010; Loft et al., 2006; Wu et al., 2004). Πρόσφατα, έχει καταγραφεί η RNA οξείδωση, υπολογίζοντας τα επίπεδα της 8-oxoGuo (7,8-dihydroxy-8-oxoguanosine), ως δείκτη νευροεκφυλισμού και διαβήτη, ενώ αυξημένα επίπεδά της έχουν επίσης συσχετισθεί με εκδήλωση καρκίνου του μαστού σε διαβητικές γυναίκες (Broedbaek et al., 2015).

2.1.3 Προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αποτελούν έναν ευρύ στόχο για τις ROS και RNS, η δημιουργία των οποίων λαμβάνει χώρα τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, και οι οξειδωμένες πρωτεΐνες θεωρούνται ως ανιχνευτές των ελευθέρων ριζών. Αρκετά κατάλοιπα αμινοξέων υφίστανται οξειδωτικές τροποποιήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν οξείδωση καταλοίπων που εμπεριέχουν θείο, υδροξυλίωση αρωματικών και αλειφατικών ομάδων, αζωτοποίηση καταλοίπων τυροσίνης,

νιτροζυλίωση και γλουταθειοζυλίωση καταλοίπων κυστεΐνης, χλωρίωση αρωματικών και πρωτογενών αμινομάδων, καθώς και μετατροπή ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων σε ανάλογα καρβονυλίου (Εικόνα 2) (Davies, 2016; Stadtman, 2006). Η οξείδωση μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αποδιάταξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και δημιουργία πολυπλεκτικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Ott & Grune, 2014; Hohn et al., 2014).

Εικόνα 2 Μη αντιστρεπτές οξειδωτικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις



(Συνομογραφίες: advanced glycation end products/AGEs; advanced peroxidation end products/ALEs, advanced oxidation protein products/AOPP, hypochlorous acid/HClO, reactive nitrogen species/RNS, reactive oxygen species/ROS)

Πηγή: Marrocco et al., 2017

Εάν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνικών καταλοίπων δεν απομακρυνθούν ή αποκατασταθούν επαρκώς, υπάρχει κίνδυνος διατάραξης της τρισδιάστατης δομής, ενώ ταυτόχρονα οι εκάστοτε φυσικοχημικές ιδιότητες δύνανται να εκδηλώσουν τοξικότητα. Μη αντιστρεπτές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν καρβονυλίωση, νιτροζυλίωση, διάσπαση δακτυλίων ιστιδίνης και τρυπτοφάνης, καθώς επίσης και υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών παρουσία προλίνης (Berlett & Stadtman, 1997). Η τελευταία εκ των προαναφερθέντων τροποποιήσεων λαμβάνει χώρα στο κολλαγόνο, το οποίο είναι πλούσιο σε προλίνη και υδροξυπρολίνη και ιδιαίτερα ευπαθές σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Monboisse & Borel, 1992).

Ο καθορισμός του βαθμού της πρωτεϊνικής οξείδωσης έχει βιολογική σημασία και καλή κλινική συσχέτιση. Πιο συγκεκριμένα, σε διάφορες περιπτώσεις ασθενειών που σχετίζονται με τις παραμέτρους του στρες ή της ηλικίας, δημιουργείται ένα συγκεκριμένο προφίλ οξειδωμένων πρωτεϊνών (Vanhooren et al., 2015; Butterfield et

al., 2014; Hohn et al., 2013). Επιπρόσθετα, η βιολογική σημασία της πρωτεϊνικής οξειδωσης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα χημικής σταθερότητας και δημιουργίας υψηλού βαθμού απόδοσης. Η διαθεσιμότητα του δείγματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα περιορισμού της αξιοπιστίας ενός βιοδείκτη. Η μέτρηση μπορεί να επιτευχθεί σε δείγματα αίματος και ούρων, ωστόσο περισσότερες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν σε δείγματα ιστού ή κυττάρου. Θα πρέπει βεβαίως να επισημανθεί ο κίνδυνος εξαγωγής και παραπροϊόντων κατά την διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας (Breusing & Grune, 2010). Ο ρυθμός των αντιδράσεων οξειδωσης εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη θερμοκρασία του δείγματος, την φυσική μορφή του δείγματος, την παρουσία οξυγόνου και καταλυτών (ιόντα μετάλλων και φως) (Hawkins et al., 2009). Ως εκ τούτου, η αξιοποίηση της πρωτεϊνικής οξειδωσης ως βιοδείκτη θα πρέπει να χαρακτηρίζεται και να συνδυάζει υψηλό βαθμό αναπαραγωγιμότητας, ευαισθησίας και ειδικότητας. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές διαφορετικές μεθοδολογίες για τον εντοπισμό διαφορετικών ειδών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Ωστόσο, η βιολογική και κλινική συσχέτιση της πρωτεϊνικής οξειδωσης ως βιοδείκτη εξακολουθεί να περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα κατάλληλων μεθοδολογικών προσεγγίσεων εντοπισμού και ποσοτικοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών οξειδωτικών τροποποιήσεων.

2.1.4. Καρβονύλια πρωτεϊνών, ALEs & AGEs

Οι ομάδες καρβονυλίου μπορούν να προκύψουν μέσα από διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα μέσω της οξειδωτικής διάσπασης του πρωτεϊνικού σκελετού (κυρίως σε επίπεδο πλευρικών ομάδων γλουταμίνης) και οξειδωτικής απαμίνωσης της λυσίνης. Ένας άλλος τρόπος περιλαμβάνει την προσάρτηση ιόντων OH σε πλευρικές ομάδες προλίνης, λυσίνης, αργινίνης και θρεονίνης (Stadtman & Levine, 2003). Ο υπολογισμός του επιπέδου των καρβονυλίων στις πρωτεΐνες αποτελεί τον περισσότερο διαδεδομένο δείκτη οξειδωτικής πρωτεϊνικής βλάβης, καθώς ιστοί με βλάβες λόγω οξειδωτικού στρες συνήθως έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (Chevion et al., 2000; Berlett & Stadtman, 1997). Επιπρόσθετα, ο συγκεκριμένος βιοδείκτης πλεονεκτεί έναντι του υπολογισμού του επιπέδου άλλων οξειδωτικών προϊόντων, ως αποτέλεσμα της πρώιμης δημιουργίας και σχετικής σταθερότητας των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Είναι χαρακτηριστικό πως τα επίπεδα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών αυξάνονται με την ηλικία, καθώς επίσης και με ορισμένα υποκείμενα παθολογικά νοσήματα, συμπεριλαμβανομένων των

νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, της παχυσαρκίας και του διαβήτη (Gil et al., 2006; Sultana et al., 2006).

Οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε ELISA και HPLC χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον σε επίπεδο κλινικών αξιολογήσεων. Ο εντοπισμός πρωτεϊνικών καρβονυλιωμένων ομάδων γενικώς περιλαμβάνει την παραγωγή της καρβονυλομάδας με DNP (2,4-dinitrophenylhydrazine), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σταθερού DNP (dinitrophenyl) προϊόντος. Το τελευταίο μπορεί να εντοπισθεί με αρκετές μεθόδους που περιλαμβάνουν την απευθείας σπεκτροφωτομετρική μέτρηση DNP προσθέτων, καθώς και περισσότερο εξειδικευμένες τεχνικές που βασίζονται σε αντι-DNP αντισώματα (π.χ. ELISA, Western blotting, immunohistochemistry, HPLC) (Buss et al., 1997; Reznick & Packer, 1994; Levine et al., 1994).

Οι λειτουργικές ομάδες των πρωτεϊνών μπορούν να αντιδράσουν με αρκετά διαφορετικά προϊόντα που προκύπτουν από την ROS-επαγόμενη οξείδωση των PUFAs και των υδατανθράκων, με αποτέλεσμα την παραγωγή αδρανών ALEs (advanced peroxidation end products) και AGEs (advanced glycation end products), αντίστοιχα (Εικόνα 2) (Delgado-Andrade, 2016; Vistoli et al., 2013). Κατάλοιπα λυσίνης, ιστιδίνης και κυστεΐνης αντιδρούν με προϊόντα λιπιδιακής υπεροξείδωσης, (π.χ. 4-Hydroxynonenal, HNE και μαλονδιαλδεΐδη, MDA), μέσω αντίδρασης προσθήκης κατά Michael, ενώ ε-αμινομάδες λυσίνης δύνανται να αντιδράσουν με σάκχαρα μειωμένου αριθμού ανθράκων και των οξειδωτικών τους προϊόντων, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών καρβονυλικών παραγώγων (Perluigi et al., 2012; Grimsrud et al., 2008).

Τα AGEs αποτελούν ετερογενή ομάδα μορίων με τις καρβοξυμεθυλ-λυσίνη, καρβοξυμεθυλ-βαλίνη και πεντοσιδίνη να συνιστούν τα κύρια προϊόντα, ενώ η καρβοξυμεθυλ-λυσίνη αποτελεί κοινό προϊόν των αντιδράσεων λιπιδιακής υπεροξείδωσης και γλυκοξείδωσης (Anguizola et al., 2013; Monnier & Sell, 2006; Fu et al., 1996). Τα επίπεδά τους αυξάνονται με την ηλικία και η δημιουργία τους συσχετίζεται με τα επίπεδα υδατανθράκων, ως εκ τούτου έχει προταθεί η συσχέτισή τους με ασθένειες όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία (Loomis et al., 2017), καθώς επίσης και με άλλες ασθένειες που περιλαμβάνουν την αθηροσκλήρωση, τη νόσο Alzheimer και τη νεφρική ανεπάρκεια (Sanchez et al., 2017; Lohou et al., 2016). Τεχνικές που βασίζονται σε σπεκτρομετρία μάζας αντιπροσωπεύουν τον βασικό τρόπο εντοπισμού πρωτεϊνικών προϊόντων και του εκάστοτε σημείου τροποποίησής τους, ωστόσο η εφαρμογή τους είναι προς το παρόν περιορισμένη σε επίπεδο καθημερινής

κλινικής ανάλυσης (Di Domenico et al., 2014; Colzani et al., 2013). Ως εκ τούτου, οι περισσότερες δοκιμασίες βασίζονται ως επί το πλείστον στη χρησιμοποίηση συγκεκριμένων αντισωμάτων ή μετρήσεων σπεκτροφθορισμού βάσει των ιδιοτήτων των AGEs (Da Moura Semedo et al., 2017; Ashraf et al., 2015). Εάν και προέκυψαν υποσχόμενα ευρήματα από μελέτες δερματικού αυτοφθορισμού διαβητικών ασθενών (Liu et al., 2017; Osawa et al., 2017), δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός γυναικών με διαβήτη κύησης από την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου με τη μέθοδο F-AGE (serum fluorescence AGE) (Lobo et al., 2017).

Η διαθεσιμότητα πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία και χρησιμοποιούνται στοχευμένα έναντι HNE-διαφορετικών πρωτεϊνικών προϊόντων (συμπεριλαμβανομένων των καταλοίπων κυστεΐνης, λυσίνης ή ιστιδίνης), έχει επιτρέψει τη δημιουργία και εφαρμογή μεθόδων ανοσοεντοπισμού, οι οποίες πωλούνται πλέον εμπορικά. Ως εκ τούτου, συγκεκριμένα αντισώματα χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των HNE-προϊόντων ιστιδίνης σε ιστούς ή βιολογικά δείγματα, ενώ η τροποποιημένη HNE tau πρωτεΐνη έχει συσχετισθεί με νευροϊνδιακά συμπλέγματα στη νόσο Alzheimer (Liu et al., 2005). Η αξιοπιστία των εν λόγω ανοσολογικών δοκιμασιών εξαρτάται ως επί το πλείστον από την ειδικότητα των εφαρμοζόμενων αντισωμάτων. Ως εναλλακτικοί βιοδείκτες χρησιμοποιούνται στη διεθνή βιβλιογραφία η δοκιμασία φρουκτοζαμίνης για τον εντοπισμό κεταμίνης μέσω της μη-ενζυματικής αντίδρασης γλυκοζυλίωσης και η μέτρηση φουροζίνης με HPLC (ειδικό προϊόν έπειτα από υδρόλυση της ε-αμινο-φρουκτόζο-λυσίνης (Johnson et al., 1983; Schleicher & Wieldand, 1981).

Συγκεκριμένες περιπτώσεις AGEs, όπως η πεντοσιδίνη και η καρβοξυμεθυλ-λυσίνη, μπορούν να υπολογισθούν με HPLC (Xu et al., 2013; Scheijen et al., 2009). Ωστόσο, η χρήση τους ως βιοδείκτες και η διαμόρφωση εξειδικευμένων δοκιμασιών σε επίπεδο κλινικής εφαρμογής, περιορίζεται σημαντικά από τη δομική ετερογένεια των εν λόγω προϊόντων, ως αποτέλεσμα των διαφορετικών δομικών μηχανισμών και του περιορισμένου αριθμού των χαρακτηριζόμενων ήδη ως AGEs. Εκτός από την εφαρμογή των AGEs ως δείκτη οξειδωτικού στρες, η κλινική σημασία τους υποδεικνύεται και από τον παθογόνο ρόλο που ασκούν σε ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις νόσους (Xu et al., 2013). Ο ρόλος του υποδοχέα των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (receptor for advanced glycation end products, RAGE) συνάδει με τη μη ενζυματική γλυκοζυλιωμένη θεωρία της γήρανσης, υποδεικνύοντας κομβικό ρόλο των AGEs σε περιπτώσεις νοητικής έκπτωσης που εξαρτώνται από την ηλικία (Sawikr et al., 2017). Επιπρόσθετα, ο διαλυτός υποδοχέας RAGE διαδραματίζει σημαντικό

ρόλο στη παθογένεση του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Gu et al., 2014). Υπάρχουν επίσης αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες έχει προταθεί ο ρόλος των AGE συμπλόκων στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, καθώς τόσο διαβητικοί όσο και μη διαβητικοί ασθενείς με στεφανιαία νόσο εμφάνισαν αυξημένη συγκέντρωση ανοσοσυμπλόκων AGE (Turk et al., 2003). Αυτοαντισώματα για IgG-AGE ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, υποδεικνύοντας πως η γλυκοζυλίωση της IgG οδηγεί στη δημιουργία νέων αντιγονικών επιτόπων και, επομένως, τα AGEs πιθανώς να αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στο μεταβολικό σύνδρομο και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Xu et al., 2013).

2.1.5. Νιτροτυροσίνη

Η 3-νιτρο-τυροσίνη (3-NO-Tyr) αποτελεί το βασικό προϊόν της διαδικασίας οξείδωσης της τυροσίνης, η οποία επισυμβαίνει είτε εντός του πολυπεπτιδίου είτε σε ελεύθερα κατάλοιπα τυροσίνης. Το συγκεκριμένο είδος τροποποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφορετικών οδών που περιλαμβάνουν την αντίδραση των ROS και RNS-like-ONOO με ιόντα NO_2 (Εικόνα 2) (Souza et al., 2008; Bartesaghi et al., 2007; Schopfer et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, ιόντα NO που προκύπτουν από την αντίδραση NOS με ιόντα οξυγόνου δημιουργούν την ρίζα ONOO, η οποία σε συνθήκες όξινου pH εμφανίζεται με την μορφή ONOOH. Η τελευταία, διασπάται σε ιόντα HO και NO_2 σε ποσοστό της τάξεως περίπου του 30% (Korpenol et al., 2012). Σε γενικές γραμμές, η διαδικασία οξείδωσης της τυροσίνης ολοκληρώνεται σε δύο στάδια, που περιλαμβάνουν αρχικά την δημιουργία ενός ιόντος τυροσίνης (το οποίο έχει προκύψει από διαφορετικά οξειδωτικά βήματα) και ακολούθως την αντίδραση με ιόντα NO_2 . Ο ακριβής καθορισμός της 3-νιτρο-τυροσίνης (3-NO-Tyr) σε βιολογικά δείγματα απαιτεί την εφαρμογή τεχνικών αέρας ή υγρής χρωματογραφίας, σε συνδυασμό με σπεκτρομετρία μάζας, σε συνθήκες οι οποίες δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες σε ευρεία κλίμακα και σε επίπεδο κλινικής ανάλυσης (Tsikas & Duncan, 2014; Rabbani & Thornalley, 2008; Kamisaki et al., 1996). Για το λόγο αυτό, τα διάφορα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των βιολογικών δειγμάτων θα πρέπει να υδρολύονται πλήρως, πριν την ποσοτικοποίηση της 3-NO-Tyr με χρωματογραφία. Ένα μειονέκτημα της συγκεκριμένης προσέγγισης είναι η πιθανή αζωτοποίηση καταλοίπων τυροσίνης του υπό εξέταση δείγματος, λόγω παρουσίας νιτρώδους άλατος και όξινων συνθηκών κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής κατακρήμνισης και υδρόλυσης (Gaut et al., 2002).

Θα πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχουν διαθέσιμες δοκιμασίες που στηρίζονται στην αρχή λειτουργίας της ELISA και στη δράση συγκεκριμένων αντισωμάτων. Ωστόσο, η εφαρμογή τους περιορίζεται λόγω του διαφορετικού βαθμού συγγένειας που επιδεικνύουν τα αντισώματα για τις εκάστοτε νιτρώδεις πρωτεΐνες και της μειωμένης ευαισθησίας (Xu et al., 2006; Khan et al., 1998). Η 3-NO-Tyr έχει περιγραφεί ως σταθερός δείκτης του οξειδωτικού/νιτρώδους στρες σε φλεγμονώδεις νόσους (Meredith et al., 2014; Herce-Pagliai et al., 1998), ωστόσο η χρησιμότητά της ως κλινικού βιοδείκτη εξακολουθεί να αμφισβητείται. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα της 3-NO-Tyr στο πλάσμα αυξάνονται σε διάφορες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στο άσθμα, τον διαβήτη, τις καρδιαγγειακές νόσους, καθώς επίσης και στο μειωμένο βαθμό ανταπόκρισης έπειτα από την ολοκλήρωση ενός θεραπευτικού πρωτοκόλλου (Jayakumari et al., 2014; Peluffo & Radi, 2007). Επιπρόσθετα, υπάρχουν ευρήματα σύμφωνα με τα οποία αναφέρεται συμμετοχή της 3-NO-Tyr σε νευροεκφυλιστικές νόσους - άμεσα εξαρτώμενες από την παράμετρο της ηλικίας (Yeo et al., 2015; Sultana et al., 2006).

2.1.6. Εξελιγμένα προϊόντα πρωτεϊνικής οξείδωσης

Η χημική αντίδραση πρωτεϊνών με χλωριωμένα οξειδωτικά στοιχεία, όπως το υποχλωριώδες οξύ, οδηγεί στη χλωρίωση των καταλοίπων αμινοξέων και σχηματισμού των 3-χλωρο-τυροσίνης (3-Cl-Tyr) και 3,5-διχλωρο-τυροσίνης ως τα κύρια προϊόντα της αντίδρασης. Τα εν λόγω προϊόντα κατηγοριοποιούνται σε εξελιγμένα προϊόντα πρωτεϊνικής οξείδωσης (advanced oxidation protein products, AOPP) και περιλαμβάνουν συσσωματώματα πρωτεϊνών με δισουλφιδικούς δεσμούς και/ή διασταυρούμενη σύνδεση τυροσίνης. Αποτελούν δείκτη οξειδωτικού στρες ως αποτέλεσμα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, καθώς επίσης και της φλεγμονής διαφορετικών νόσων (Cristani et al., 2016; Cao et al., 2014; Witko-Sarsat et al., 1998). Τόσο η χλωρο-τυροσίνη, όσο και η 3-νιτρο-τυροσίνη, δύνανται να παραχθούν με αντίδραση με υποχλωριώδες οξύ και ρίζα ONOO (αμφότερα εκ των οποίων παράγονται κατά τη διάρκεια φλεγμονής) και έχει παρατηρηθεί πως τα AOPP μπορούν να δράσουν ως ενδιάμεσοι διαβιβαστές της διαδικασίας φλεγμονής και της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων (Witko-Sarsat et al., 1998). Τα επίπεδα των AOPPs καταγράφονται αυξημένα σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, η ουραιμία, η αθηροσκλήρωση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς επίσης και σε νεφρικού τύπου επιπλοκές ως αποτέλεσμα εξέλιξης χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (Cristani et al.,

2016; Du et al., 2015; Cao et al., 2014; Kalousova et al., 2002). Ο τρόπος υπολογισμού των επιπέδων τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρωματομετρικές δοκιμές, χρησιμοποιώντας χλωραμίνη ή ανάλογα ανθρώπινης αλβουμίνης σε ορό (Taylor et al., 2015). Η 3-CI-Tyr αποτελεί περίπτωση βιοδείκτη με αυξημένο επίπεδο ειδικότητας και δύνανται να εντοπιστεί με εξαιρετικά ευαίσθητες μεθοδολογίες, όπως για παράδειγμα η σπεκτρομετρία μάζας (Gaut et al., 2002; Hazen et al., 1997). Εντοπίζεται σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση (Hazen & Heinecke, 1997), ρευματοειδή αρθρίτιδα (Wu & Pizzo, 2001), σε παιδιά με κυστική ίνωση (Kettle et al., 2004) και στους αεραγωγούς πρόωρων νεογνών (Buss et al., 2003).

2.1.7. Οξειδωμένη LDL

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (low density lipoproteins, LDLs) υπόκεινται σε οξειδωτική τροποποίηση, γεγονός που σχετίζεται με την εκδήλωση αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακών νόσων (Verhoye et al., 2009; Holvoet et al., 2008). Η περισσότερο συνήθης διαδικασία για την εκτίμηση της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών αξιοποιεί συγκεκριμένα αντισώματα που αναγνωρίζουν επιλεκτικές τροποποιήσεις αμινοξικών καταλοίπων των LDLs (π.χ. αλδεϋδικά τροποποιημένα κατάλοιπα λυσίνης ή οξειδωμένα φωσφολιπιδικά τροποποιημένα κατάλοιπα). Ωστόσο, έχει υπάρξει αμφισβήτηση αναφορικά με την χρησιμότητα της oxLDL ως βιοδείκτη οξειδωτικού στρες, κυρίως λόγω της ετερογένειας των προϊόντων οξείδωσης, το μειωμένο βαθμό ειδικότητας των αντισωμάτων και τα ετερόκλητα ευρήματα που εξάγονται αναλόγως της δοκιμασίας που έχει επιλεγθεί (Frijhoff et al., 2015; Maiolino et al., 2013).

Μία πρόσθετη παράμετρος που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι αυτή της κάθαρσης της oxLDL και της δημιουργίας ανοσοσυμπλόκων. Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό και ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση εκδηλώνουν αυξημένα επίπεδα oxLDL και ακολούθως απότομη μείωση των επιπέδων της, έπειτα από την κατανάλωση γεύματος με προκαθορισμένη αναλογία λιπαρών. Η εν λόγω μείωση των επιπέδων της είναι μεγαλύτερη έναντι της αντίστοιχης ασθενών με εξωκρανιακή αθηροσκλήρωση, υποδηλώνοντας για τους πρώτους ασθενείς αυξημένο βαθμό κάθαρσης της oxLDL έπειτα από την κατανάλωση γεύματος (Kasab et al., 2017). Αυξημένη πρόσληψη oxLDL έχει επίσης καταγραφεί σε μακροφάγα κύτταρα ασθενών με διαβήτη τύπου 2, με αποτέλεσμα την πιθανή επαγωγή δημιουργίας αφοκυττάρων και αθηροσκλήρωσης (Balderas et al., 2016). Η oxLDL δύνανται επίσης να επάγει την

ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων, τη ρύθμιση της μετάβασης ενεργοποίησης των μακροφάγων από την κλασική (classical, M1) στην εναλλακτική (alternative, M2) μορφή, καθώς επίσης και τον τρόπο απόκρισης των T βοηθητικών κυττάρων (Th1 ή Th2), αφήνοντας να εννοηθεί ότι υπάρχει ένας πιθανός τρόπος σύνδεσης ανάμεσα στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία (Peluso et al., 2012). Η Th2-επαγόμενη απόκριση μπορεί να δικαιολογήσει πιθανώς την παρουσία anti-oxLDL αντισωμάτων σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και αρρυθμιστη ανοχή γλυκόζης (Babakr et al., 2014), καθώς επίσης και τον εντοπισμό anti-MDA-LDL IgGs στον ορό ασθενών που υποβάλλονται σε CABG (coronary artery bypass grafting) με την επιβολή ή μη λειτουργίας αντλίας (Rahsepar et al., 2015). Επομένως, η oxLDL, πέρα από δείκτης οξειδωτικού στρες, μπορεί να λειτουργήσει και ως παθογονικός παράγοντας, του οποίου οι τιμές θα πρέπει να αξιολογούνται στο ευρύτερο πλαίσιο της κλινικής εξέτασης του ασθενούς.

2.1.8. Τροποποιημένη από την ισχαιμία αλβουμίνη

Η αλβουμίνη αποτελεί την περισσότερο διαδεδομένη πρωτεΐνη του ορού και των λοιπών σωματικών υγρών και τον μεταφορέα πολλών βιομορίων. Εμφανίζει ευαισθησία στην οξείδωση και στην καρβονυλίωση και μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό σύστημα, μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης των καταλοίπων κυστεΐνης. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ως γενικός οξειδωτικός βιοδείκτης σε αρκετές παθήσεις στον άνθρωπο. Στην περίπτωση της εκδήλωσης ισχαιμίας του μυοκαρδίου, λαμβάνουν χώρα δομικές αλλαγές στο N-άκρο της αλβουμίνης του ορού, το οποίο σχετίζεται με την παραγωγή ROS (Roy et al., 2006; Marx & Chevion, 1986). Οι συγκεκριμένες αλλαγές μειώνουν την ικανότητα πρόσδεσης της αλβουμίνης σε μέταλλα, κυρίως κατιόντα κοβαλτίου, τα οποία και εντοπίζονται με την σχετική δοκιμασία πρόσδεσης αλβουμίνης σε κοβάλτιο (albumin cobalt-binding, ACB) (Gaze, 2009; Bar-Or et al., 2001; Christenson et al., 2001). Εκτός όμως από το προαναφερθέν σημείο πρόσδεσης, η αλβουμίνη περιλαμβάνει και δύο πρόσθετα σημεία, στα οποία όταν προσδένονται μόρια λιπαρών οξέων, μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης της αλβουμίνης. Επομένως, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η απελευθέρωση λιπαρών οξέων σε ασθενείς με ισχαιμικό έμφραγμα ευθύνεται για τη μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της αλβουμίνης σε κατιόντα κοβαλτίου (Mothes & Faller, 2007). Η ACB δοκιμασία ανιχνεύει με έμμεσο τρόπο την τροποποιημένη από την ισχαιμία αλβουμίνη (ischemia modified albumin, IMA), μέσω του υπολογισμού της μειωμένης ικανότητας

πρόσδεσης στο κοβάλτιο (Bar-Or et al., 2000) και χρησιμοποιείται από τον FDA στον εντοπισμό ισχαιμιών του μυοκαρδίου. Αρκετές μελέτες αναφέρουν πως η IMA δεν είναι ειδική μόνο για την καρδιακή ισχαιμία, καθώς αυξημένα επίπεδα της παραμέτρου καταγράφονται σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος, πνευμονική εμβολή, σακχαρώδη διαβήτη, αγγειοεγκεφαλική νόσο, νόσο Alzheimer (Altunoglu et al., 2015; Ma et al., 2012; Kumar, 2012; Gunduz et al., 2008). Επομένως, η καταγραφή των IMA επιπέδων στον ορό θα μπορούσαν να αποτελέσουν την περίπτωση ενός νέου δείκτη οξειδωτικής ανισορροπίας. Δοθείσης όμως της ευαισθησίας της ACB δοκιμασίας στη μεταβολή του pH, είναι εύκολο να μεταβληθεί η ικανότητα πρόσδεσης της αλβουμίνης σε ένα μέταλλο, καθώς η θερμοκρασία και η χρονική στιγμή αποθήκευσης του δείγματος μπορεί να επηρεάσουν την δοκιμασία. Υπό αυτούς τους περιορισμούς, η ανάλυση του δείγματος θα πρέπει να πραγματοποιείται εντός χρονικού διαστήματος της τάξεως των δύο ωρών ή εναλλακτικά το υπό εξέταση δείγμα αίματος θα πρέπει να διαχωρίζεται άμεσα σε ερυθροκύτταρα και πλάσμα και να καταψύχεται (Sbarouni et al., 2011; Collinson & Gaze, 2008). Πρόσφατα, έχουν εισαχθεί στο εμπόριο αρκετές διαφορετικές ανοσοδοκιμασίες, η αρχή λειτουργίας των οποίων βασίζεται σε συγκεκριμένα anti-IMA αντισώματα.

Κεφάλαιο 3

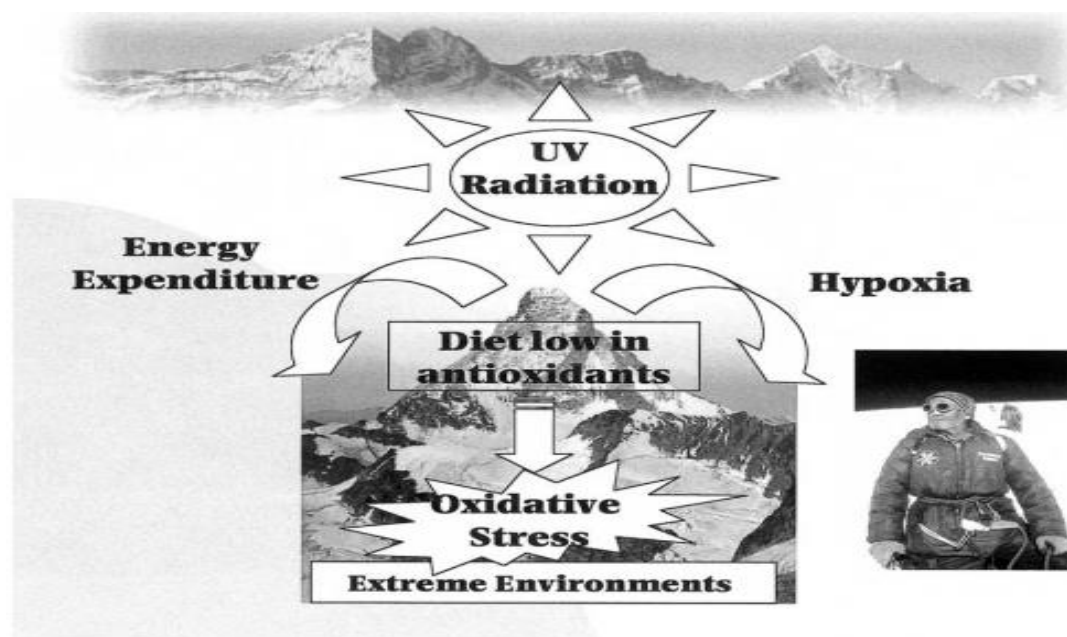
3.1 Οξειδωτικό στρες & πτήσεις

Η αυξημένη παραγωγή δεικτών οξειδωτικού στρες σε διαφορετικά κλινικά δείγματα (π.χ. αίματος, ούρων, ιστών) πειραματικών μοντέλων αρουραίων, ως απάντηση σε συνθήκες υποξίας, έχει αναδειχθεί μέσα από ένα σημαντικό αριθμό διαφορετικών βιβλιογραφικών μελετών (Hoshikawa et al., 2001; Pavazhagan et al., 2001; Arteel et al., 1999; Risby et al., 1999). Παρόμοια φύσεως ευρήματα έχουν επίσης εξαχθεί και από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού σε συνθήκες υποξίας (Wing et al., 2002; Schmidt et al., 2002; Peltonen et al., 2001; Moller et al., 2001). Από την άλλη πλευρά, ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί στον άνθρωπο, σε συνθήκες υποβαρούς υποξίας, με σκοπό τη διερεύνηση υποξίας και του οξειδωτικού στρες. Τα ευρήματα των εν λόγω μελετών έχουν δείξει πως το οξειδωτικό στρες αυξάνεται τόσο σε συνθήκες υποβαρούς υποξίας (Schmidt et al., 2002; Bailey et al., 2001), όσο και σε εργαστηριακές συνθήκες προσαρμοσμένες σε συνθήκες υψομέτρου (Moller et al., 2001). Επιπρόσθετα, η προσομοίωση συνθηκών υψομέτρου σε υποβαρή θάλαμο (Joanny et al., 2001), όσο και η προσομοίωση νορμοβαρούς υψομέτρου με αναπνοή αέριου μείγματος μειωμένης περιεκτικότητας οξυγόνου (Wing et al., 2002), έχει βρεθεί ότι είναι δηλωτική αυξημένου οξειδωτικού στρες ως λειτουργία έκθεσης σε συνθήκες υποξίας. Οι Moller et al. (2001) έχουν θέσει το ερώτημα κατά πόσο η διενέργεια άσκησης κάτω από συνθήκες υποξίας οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες, έναντι της άσκησης υπό φυσιολογικές συνθήκες παροχής οξυγόνου. Η απάντηση στο συγκεκριμένο ερώτημα ήταν πως η διενέργεια άσκησης κάτω από συνθήκες υποξίας επάγει περισσότερες διασπάσεις σε επίπεδο DNA αλυσίδων, έναντι της αντίστοιχης διενέργειας άσκησης σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής οξυγόνου. Επομένως, με αυτό τον τρόπο η υποξία αφαιρεί από τον ανθρώπινο οργανισμό την ικανότητα τμήματος της αντιοξειδωτικής λειτουργίας, η οποία έχει ως σκοπό την προστασία έναντι των δυσμενών συνεπειών του οξειδωτικού στρες. Ακολούθως, οι Wing et al. (2002) παρατήρησαν σημαντική αύξηση στην παραγωγή λιπιδικών υπεροξειδίων του ορού (lipid peroxides, LPO), έπειτα από έκθεση διάρκειας 60 λεπτών σε προσομοιωμένες συνθήκες υποξίας υψομέτρου, γεγονός δηλωτικό της αυξημένης υπεροξειδωσίας των λιπιδίων των ερυθροκυττάρων που επισυμβαίνει δευτερογενώς έπειτα από έκθεση σε συνθήκες υποξίας. Ήδη από το 1988 είχε επισημανθεί πως τα ερυθροκύτταρα υπεροξειδώνονται

σε υψόμετρο, με αποτέλεσμα τη μειωμένου βαθμού προσαρμογή τους (Simon-Schnass & Pabst, 1988).

Η παραγωγή ROS στον ανθρώπινο οργανισμό καταγράφεται αυξημένη, έπειτα από έκθεση σε περιβαλλοντικές συνθήκες που σχετίζονται με αναρρίχηση σε υψόμετρα. Εάν η ποσοστιαία σύσταση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα παραμένει σχετικά αμετάβλητη, καθώς αυξάνεται το υψόμετρο, η μείωση της βαρομετρικής πίεσης επάγει την υποχρεωτική μείωση στη μερική πίεση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Ακολούθως, μειώνεται η σύνθεση του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση υποξίας στους ιστούς (Cymerman, 1996). Επομένως, η εκδήλωση οξειδωτικού στρες σε υψόμετρο δεν μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη οξυγόνωση των ιστών. Αποκτά επομένως ενδιαφέρον η μελέτη πιθανών πηγών εκδήλωσης στρες, μέσω των οποίων θα διευκολύνεται η απάντηση οξειδωτικού στρες σε υψόμετρο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, εξωτερικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα που συνδυάζονται με ακραίου τύπου περιβαλλοντικές μεταβολές μπορούν να συμβάλλουν στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες στο ανθρώπινο σώμα (Askew, 2002).

Εικόνα 3 Πιθανές πηγές εκδήλωσης οξειδωτικού στρες σε συνθήκες υψομέτρου



Πηγή: Askew, 2002

Ο πίνακας 2 παραθέτει ορισμένες πιθανές πηγές που μπορούν να συμμετέχουν στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες σε συνθήκες υψομέτρου. Οι τέσσερις πρώτες περιπτώσεις (άσκηση, υπεριώδης ακτινοβολία, έλλειψη πρόσληψης αντιοξειδωτικών μέσω διαιτολογίου και κατεχολαμίνες) μπορούν να αποτελέσουν σημαντικές πηγές εκδήλωσης οξειδωτικού στρες, τόσο σε συνθήκες επιπέδου θαλάσσης όσο και σε συνθήκες υψομέτρου. Από την άλλη πλευρά, οι τρεις τελευταίες περιπτώσεις (ανοξία/επανοξυγόνωση, υποξανθίνη και οξειδάση ξανθίνης, αναγωγικό στρες) (πίνακας 2) σχετίζονται με την εκδήλωση υποξίας *per se*. Θα πρέπει να διευκρινιστεί πως η μεμονωμένη συνεισφορά καθεμίας από τις προαναφερθείσες πηγές στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες παραμένει άγνωστη. Ομοίως, αναλόγως της εκάστοτε κατάστασης και λαμβάνοντας υπόψη το εύρος της φυσικής άσκησης, τη διάρκεια και τον βαθμό έντασης της άσκησης, τη διαίτα και το αντιοξειδωτικό προφίλ του συμμετέχοντα, την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, τη θερμοκρασία, καθώς επίσης και τη μείωση της μερικής πίεσης του οξυγόνου σε συνθήκες υψομέτρου, ένας παράγοντας μπορεί να υπερτερεί ποσοτικά ενός άλλου παράγοντα, ενώ δεν αποκλείεται και η συνδυαστική δράση δύο διαφορετικών παραγόντων. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα περιλαμβάνει την αυξημένη παραγωγή κατεχολαμινών στο αίμα, η οποία οφείλεται στο συνδυασμό άσκησης και υποξίας.

Πίνακας 2 Πιθανές εστίες συμβολής στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες σε υψόμετρο

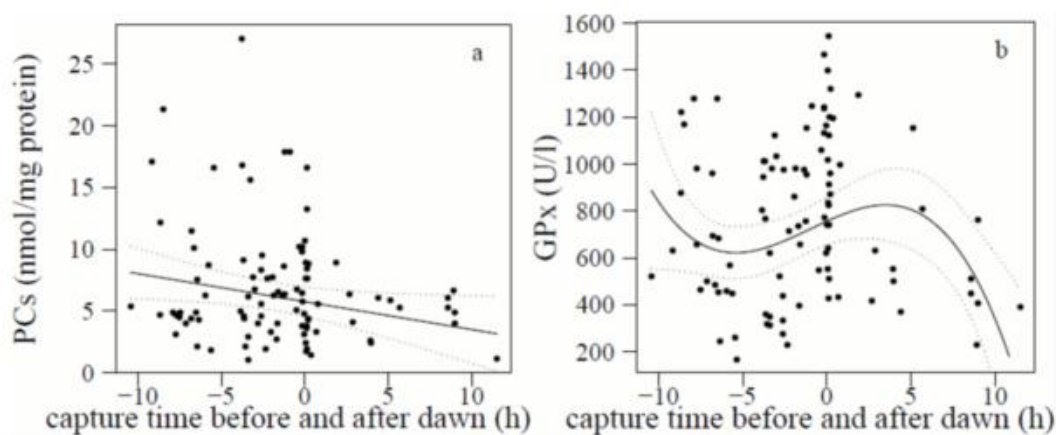
Stressor	Description
1. Exercise	Exercise is associated with free radical production from mitochondrial superoxide production
2. Ultra violet light	UVA and UVB can penetrate the epidermis and cause damage to underlying tissue
3. Lack of dietary antioxidants	More frequently than not, fresh fruits and vegetables are not an option at altitude, hence the diet may lack antioxidant nutrients
4. Catecholamines	Catecholamine production increases with hypoxia and work at altitude. Auto-oxidation of catecholamines can generate superoxide
5. Anoxia/reoxygenation	Similar to ischemia/reperfusion, flooding anoxic tissue with oxygen can lead to a burst of free radical production
6. Hypoxanthine and xanthine oxidase	Hypoxia results in an accumulation of hypoxanthine (formed as a stepwise breakdown product of ATP) which is converted to xanthine and uric acid by xanthine oxidase when reoxygenation occurs, giving rise to superoxide
7. Reductive stress	Redox potential of cells is altered by hypoxia. Mitochondrial respiration is decreased leading to a build up of reducing equivalents that cannot be transferred to oxygen at cytochrome oxidase resulting in direct single electron reduction of molecular oxygen to form superoxide

Πηγή: Askew, 2002

Οι πτήσεις αντοχής που πραγματοποιούν τα μεταναστευτικά πτηνά αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσικής δραστηριότητας, η οποία και απαιτεί σχεδόν τον διπλάσιο μεταβολικό ρυθμό που αντιστοιχεί στα θηλαστικά περιορισμένου μεγέθους κατά την διάρκεια της φυσικής άσκησης (Alfrey et al., 1996). Ο συγκεκριμένος μεταβολικός ρυθμός διατηρείται καθ' όλη την διάρκεια των πτήσεων (έως και 200 ώρες) σε ορισμένα είδη πτηνών (Grigoriev et al., 2004). Η πλειοψηφία των μεταναστευτικών πτηνών δεν τρέφεται κατά την διάρκεια των πτήσεων, γεγονός που σημαίνει πως βασίζονται αποκλειστικά σε αποθέματα του σώματος (ενέργεια και νερό). Οι διαθέσιμες πηγές ενέργειας περιλαμβάνουν πρωτεΐνες (περίπου 5%) και λίπη (περίπου 95%) (Smith, 2002), εν αντιθέσει με τον άνθρωπο και λοιπά θηλαστικά όπου τα αντίστοιχα επίπεδα λιπιδίων κυμαίνονται μεταξύ 40-50% (Voulgaridou et al., 2001). Τα παραπάνω στοιχεία είναι δηλωτικά ανάπτυξης συγκεκριμένων φυσιολογικών προσαρμογών και πιο συγκεκριμένα μηχανισμούς αποθήκευσης λίπους από το λιπώδη ιστό στα μιτοχόνδρια των μυών, καθώς επίσης και αυξημένης οξειδωτικής ικανότητας των μυών προκειμένου να καταβολίσουν λιπίδια (Alfrey et al., 1996).

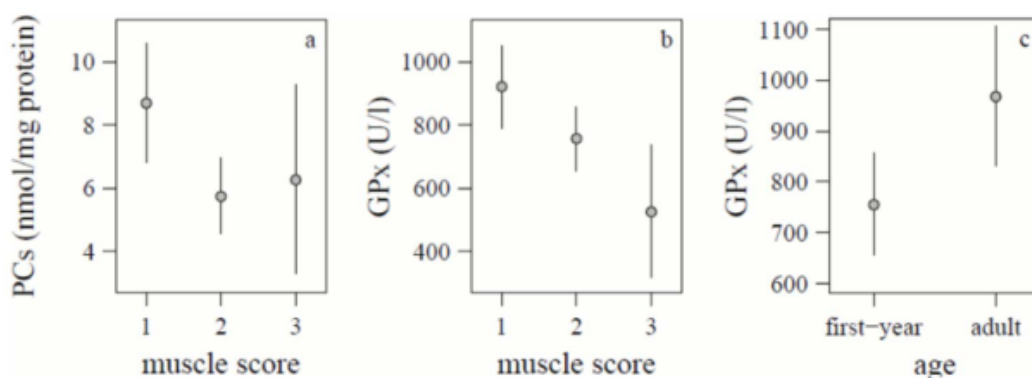
Οι Jenni-Eiermann et al. (2014) επιχείρησαν να διερευνήσουν κατά πόσο οι πτήσεις αντοχής μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, καταγράφηκε η συμπεριφορά ενός δείκτη πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών (πρωτεϊνικά καρβονύλια) και ενός δείκτη ενζυματικής αντιοξειδωτικής λειτουργίας (υπεροξυδάση γλουταθειόνης) στον Ευρωπαϊκό κοκκινολαίμη. Τα εξαχθέντα ευρήματα έδειξαν πως τα επίπεδα και των δύο προαναφερθέντων δεικτών ήταν σημαντικά αυξημένα κατά την διάρκεια της νυκτερινής πτήσης, έναντι των αντίστοιχων ωρών ξεκούρασης. Επιπρόσθετα και ανεξαρτήτως της χρονικής διάρκειας της ημέρας, οι συγκεντρώσεις των δύο δεικτών παρέμειναν σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα για πτηνά με μειωμένη μυϊκή ικανότητα πτήσης (Εικόνα 4). Τέλος, ένα εξίσου σημαντικό εύρημα ήταν πως τα ενήλικα πτηνά είχαν αυξημένη συγκέντρωση υπεροξυδάσης της γλουταθειόνης έναντι αντίστοιχων πτηνών που πραγματοποιούσαν την πρώτη μεταναστευτική τους πτήση (Εικόνα 5). Τα προαναφερθέντα ευρήματα είναι δηλωτικά εκδήλωσης οξειδωτικού στρες κατά την διάρκεια πτήσεων αντοχής των μεταναστευτικών πτηνών.

Εικόνα 4 Συσχέτιση (a) μεταξύ πρωτεϊνικών καρβονυλίων και χρονικής στιγμής μελέτης και (b) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και χρονικής στιγμής μελέτης στον Ευρωπαϊκό κοκκινολαίμη



Πηγή: Jenny-Eiermann et al., 2014

Εικόνα 5 Συσχέτιση (a) μεταξύ πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μυϊκής ικανότητας, (b) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και μυϊκής ικανότητας και (c) μεταξύ υπεροξειδάσης γλουταθειόνης και ηλικίας του μεταναστευτικού πτηνού (ενός έτους ή ενήλικο) στον Ευρωπαϊκό κοκκινολαίμη

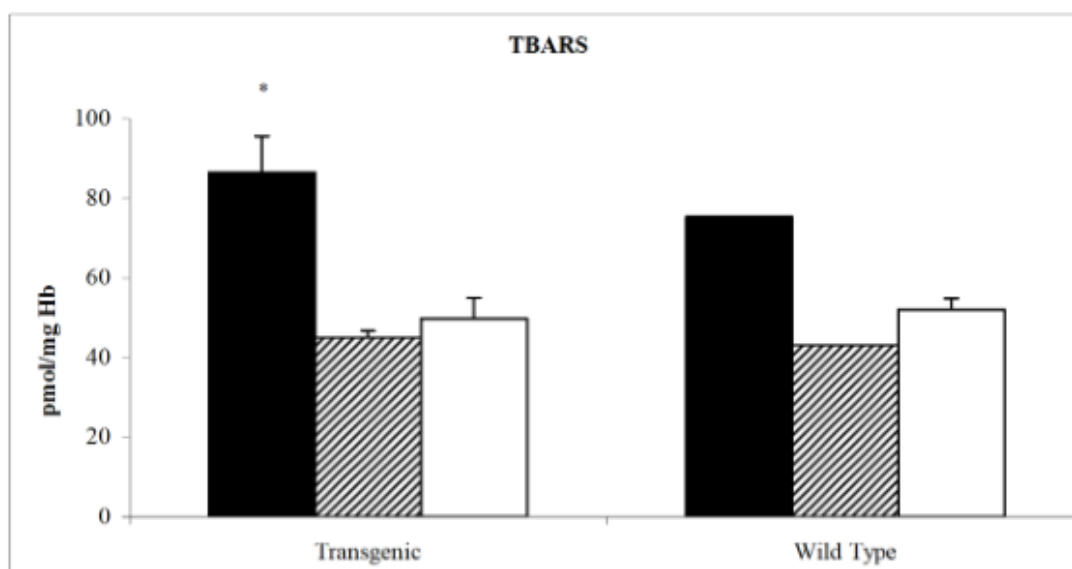


Πηγή: Jenny-Eiermann et al., 2014

Οι Rizzo et al. (2012) διερεύνησαν την επίδραση της μακροχρόνιας πτήσης στο διάστημα στα ερυθροκύτταρα τροφτικών και την πιθανότητα εκδήλωσης οξειδωτικού στρες. Κατά την διάρκεια αποστολών στο διάστημα έχει καταγραφεί μείωση στον αριθμό των ερυθροκυττάρων και των επιπέδων αιμοσφαιρίνης στον άνθρωπο, οι οποίες περιγράφονται με τον όρο «αναιμία του διαστήματος». Ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε συνθήκες μικροβαρύτητας, τα ερυθροκύτταρα αποκτούν μία τροποποιημένη ρεολογία και υπόκεινται σε εκτεταμένου βαθμού αιμόλυση. Είναι γνωστό πως η σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης δύναται να επηρεασθεί από εξωτερικές συνθήκες, όπως η υποθερμία, η υποξία, καθώς επίσης και μεταβολές σε επίπεδο βαρύτητας.

Επιπρόσθετα, μεταβολή στη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης, ιδίως των λιπαρών οξέων, επιφέρει πρόσθετη ευαισθησία σε επίπεδο υπεροξειδωτικού στρες και ακολούθως αυξημένη μεμβρανική ευαισθησία. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση στα ερυθροκύτταρα ποντικών που συμμετείχαν σε διαστημική αποστολή διάρκειας 100 ημερών, έναντι ποντικών σε συνθήκες εδάφους και έναντι ποντικών σε φυσιολογικές συνθήκες. Σκοπός της μελέτης ήταν ο καθορισμός της σύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, σε συνδυασμό με την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, στο οποίο υπεβλήθησαν τα εν λόγω ερυθροκύτταρα. Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν πως οι συνθήκες πτήσεως στο διάστημα επάγουν τροποποιήσεις στη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και αυξημένη παραγωγή προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στα ερυθροκύτταρα των ποντικών (Εικόνα 6).

Εικόνα 6 Επίπεδα TBARS (παραπροϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης ως αποτέλεσμα βλαβών οξειδωτικού στρες) στα ερυθροκύτταρα ποντικών που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες πτήσης (μαύρη ράβδος), έναντι ποντικών σε συνθήκες εδάφους (ριγέ ράβδος) και φυσιολογικές συνθήκες (άσπρη ράβδος)



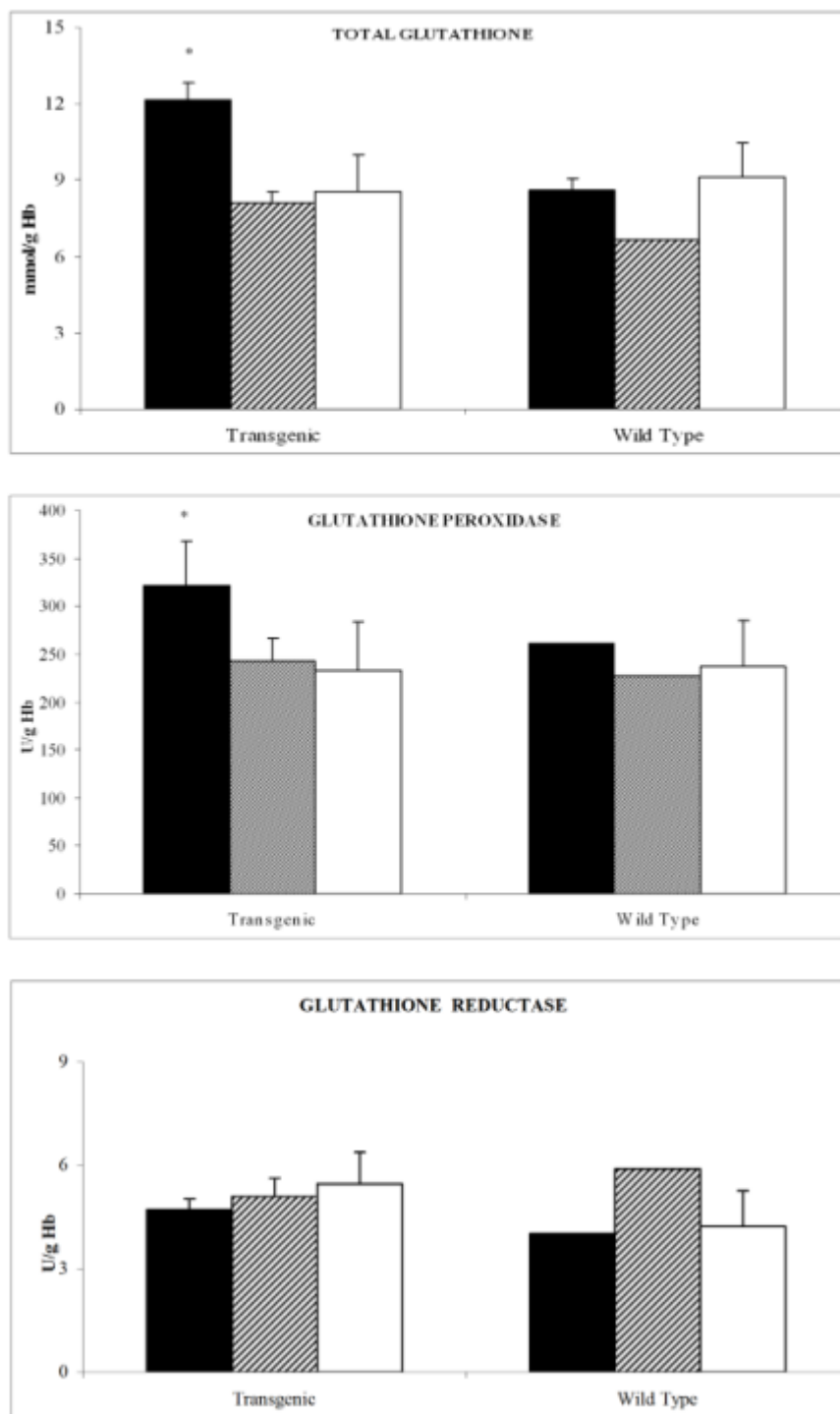
(Συντομογραφίες: TBARS-thiobarbituric acid reactive substances)

Πηγή: Rizzo et al., 2012

Επιπρόσθετα, καταγράφηκαν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί στα ποντίκια που συμμετείχαν στη μελέτη σε συνθήκες πτήσης, με σημαντικά αυξημένη τη γλουταθειόνη, έναντι των λοιπών δύο ομάδων της μελέτης (Εικόνα 7). Ωστόσο, εάν

και καταγράφηκαν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, εντούτοις δεν ήταν αρκετοί για να αποτρέψουν την εκδήλωση βλαβών οξειδωτικού στρες.

Εικόνα 7 Επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα ποντικών που έχουν υποβληθεί σε συνθήκες πτήσης (μαύρη ράβδος), έναντι ποντικών σε συνθήκες εδάφους (ράβδος ριγέ) και φυσιολογικές συνθήκες (άσπρη ράβδος)

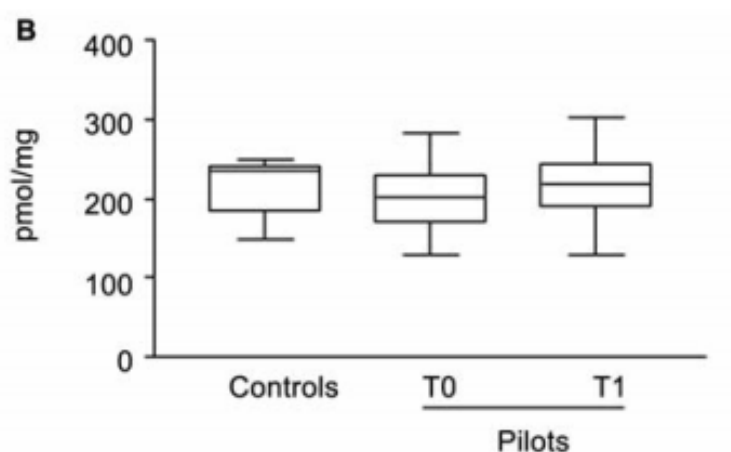


Πηγή: Rizzo et al., 2012

Ορισμένα επαγγέλματα, όπως των πιλότων μαχητικών αεροσκαφών έρχονται αντιμέτωπα με διαφόρων ειδών περιβαλλοντικού τύπου προκλήσεις, όντας εργαζόμενα σε υψηλά υψόμετρα. Το βασικό πρόβλημα έγκειται στην εκδήλωση φυσιολογικού στρες, ως απόρροια του υψηλού υψομέτρου, της υποξίας, του αέρα, της ηλιακής ακτινοβολίας και της αφυδάτωσης, καθένα εκ των οποίων δύναται να συσχετισθεί με αρνητικές για τον ανθρώπινο οργανισμό συνέπειες σε επίπεδο φυσιολογίας και διανοητικής κατάστασης (Corsi et al., 2010). Η χαμηλή πίεση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου σε υψηλά υψόμετρα περιορίζει την απαιτούμενη παραγωγή ενέργειας, ενώ η διαθεσιμότητα του οξυγόνου μειώνεται ως αποτέλεσμα της μειωμένης μερικής πίεσης του οξυγόνου, με επακόλουθο την εκδήλωση υποξαιμίας (Askew, 2002). Υπάρχουν ενδείξεις που ενοχοποιούν την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ιόντων σε ανθρώπους που εκτίθενται σε υποξία και υψόμετρο (Tahawi et al., 2001). Το αποτέλεσμα είναι η εκδήλωση μεταβολών σε φυσιολογικές και διανοητικές λειτουργίες, οι οποίες εμμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, ακόμα και έπειτα από την επιστροφή σε υψόμετρο επιπέδου θάλασσης (Neubauer, 2001).

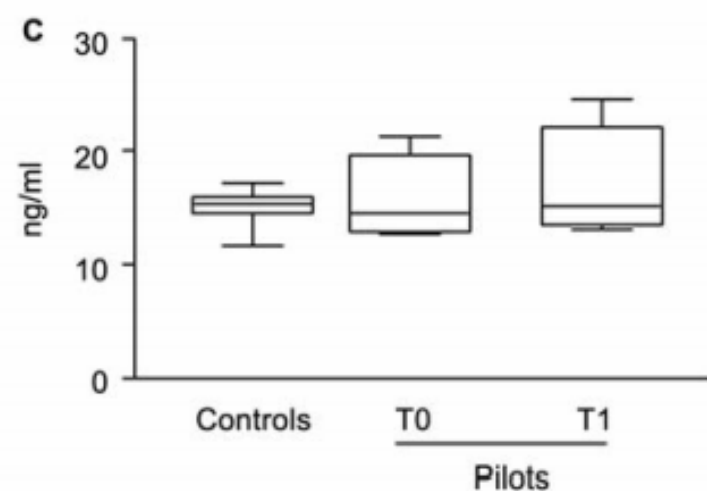
Οι Dogliotti et al. (2011) πραγματοποίησαν σχετική μελέτη με σκοπό να αξιολογήσουν το οξειδωτικό στρες σε πιλότους μαχητικών αεροσκαφών της Ιταλικής αεροπορίας. Ως εκ τούτου εξέτασαν διαφορετικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, σε συνδυασμό με τυχόν καταγραφείσες ανισορροπίες στον ορό μεταξύ ελεύθερων ιόντων και αντιοξειδωτικών μορίων. Στη μελέτη έλαβαν μέρος 13 πιλότοι που ακολουθούσαν κανονικά το πρόγραμμα ατομικής άσκησης και δίαιτας και ακολούθησε σύγκριση με ομάδα 40 υγιών εθελοντών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Έπειτα από χρονική διάρκεια τριών μηνών εντατικών πτήσεων, αξιολογήθηκαν διάφοροι δείκτες οξειδωτικού στρες που περιελάμβαναν αντιδρώντες οξειδωτικούς μεταβολίτες, καρβονυλικές πρωτεΐνες, 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη, καθώς και τη συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση των συμμετεχόντων (Εικόνες 8 και 9). Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν ανέδειξαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο σε επίπεδο δεικτών οξειδωτικού στρες, όσο και σε συνολικό αντιοξειδωτικό επίπεδο. Τα εν λόγω ευρήματα δηλώνουν πως οι πιλότοι των μαχητικών αεροσκαφών είναι δυνατόν να επιτυγχάνουν μία φυσιολογική ισορροπία ανάμεσα στην οξειδωτική και αντιοξειδωτική κατάσταση, μέσω κατάλληλης δίαιτας, τακτικής άσκησης και περιοδικών ιατρικών ελέγχων, ανεξαρτήτως από το εάν εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες φυσιολογικού στρες.

Εικόνα 8 Καταγεγραμμένα επίπεδα καρβονυλικών πρωτεϊνών στον ορό σε πιλότους αεροσκαφών, πριν (T0) και έπειτα (T1) από τη διενέργεια πτήσης, έναντι της ομάδας ελέγχου της μελέτης



Πηγή: Dogliotti et al., 2011

Εικόνα 9 Καταγεγραμμένα επίπεδα στον ορό 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνης σε πιλότους αεροσκαφών, πριν (T0) και έπειτα (T1) από τη διενέργεια πτήσης, έναντι της ομάδας ελέγχου της μελέτης



Πηγή: Dogliotti et al., 2011

Οι Corsi et al. (2010) μελέτησαν την επίδραση της O-β-N-ακετυλο-D-γλουκοσαμινιδάση στα ερυθροκύτταρα Ιταλών πιλότων που πραγματοποιούν ακροβατικού τύπου επιδείξεις. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μελέτη, προτείνονται οι ερυθροκυτταρικές γλυκοϋδρολάσες ως νέοι, ευαίσθητοι δείκτες αξιολόγησης του οξειδωτικού στρες. Τα συγκεκριμένα μόρια ανευρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και την κυτοσόλη των ερυθροκυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό και τα κινητικά τους χαρακτηριστικά, σε συνδυασμό με την τοπολογία τους, έχουν μελετηθεί διεξοδικά

(Goi et al., 2000). Τόσο τα ένζυμα της μεμβράνης, όσο και της κυτοσόλης, εμπλέκονται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Ως εκ τούτου, η μεμβρανική β-D-γλουκορονιδάση (GCR, β-D-glucuronidase) κατέχει συγκεκριμένο ρόλο στη σηματοδότηση πρώιμων μεμβρανικών μεταβολών (Goi et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, ένζυμα της κυτοσόλης, όπως η κυτοσολική εξοσαμινιδάση (HEX, hexosaminidase) και η O-β-N-ακετυλο-D-γλουκοσαμινιδάση (O-GlcNAcase, O-β-N-acetyl-D-glucosaminidase), παραμένουν ενεργά σε ασθένειες όπου εκδηλώνεται ισχυρό οξειδωτικό στρες, καθώς επίσης και φυσικο-χημικές μεταβολές της ερυθροκυτταρικής πλασματικής μεμβράνης (π.χ. σύνδρομο Down) (Massaccesi et al., 2006; Bosman et al., 1993). Στο πλαίσιο της εν λόγω μελέτης μετρήθηκαν οι ερυθροκυτταρικές συγκεντρώσεις των GCR, εξοσαμινιδάσης, O-GlcNAcase, καθώς και η ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης και τα υδροπεροξειδία του πλάσματος σε 19 πιλότους και 40 υγιείς συμμετέχοντες. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως η συγκέντρωση των υδροπεροξειδίων του πλάσματος στους πιλότους ήταν σημαντικά μειωμένη (Πίνακας 3). Ακολούθως, η συγκέντρωση της GCR ήταν μειωμένη, ενώ οι συγκεντρώσεις των O-GlcNAcase και εξοσαμινιδάσης ήταν αυξημένες αντίστοιχα, έναντι της ομάδας ελέγχου (Πίνακας 4). Τα εν λόγω ευρήματα είναι δηλωτικά της καλύτερης προστασίας των πιλότων έναντι της εκδήλωσης οξειδωτικού στρες, αποτέλεσμα του εντατικού τρόπου φυσικής εκπαίδευσης και του κατάλληλου τρόπου διατροφής.

Πίνακας 3 Σύγκριση της συγκέντρωσης υδροπεροξειδίων του πλάσματος στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα των πιλότων

	Controls n=40 (age 32.7 ± 8.4) [19–49]	Pilots n=13 (age 32.2 ± 3.6) [27–38]
Hydroperoxides (H ₂ O ₂ , mg/dL of plasma)	22.6 ± 2.5 [18.1–29.7]	16.2 ± 4.9 ^a [10.2–26.8]
Fluorescence anisotropy (rs)		
DPH	0.184 ± 0.008 [0.170–0.211]	0.176 ± 0.002 ^a [0.171–0.178]
TMA-DPH	0.233 ± 0.008 [0.217–0.251]	0.224 ± 0.002 ^a [0.222–0.229]

Πηγή: Corsi et al., 2010

Πίνακας 4 Σύγκριση της συγκέντρωσης γλυκοϋδρολασών στην κυτοσολική και πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των πιλότων

	Controls	Pilots
Cytosolic O-GlcNAcase	27.1 ± 13.6 [2.8–57.9]	51.9 ± 10.9 ^a [36.7–69.2]
Cytosolic hexosaminidase	42.4 ± 22.6 [14.1–90.3]	61.8 ± 15.2 ^b [42.3–98.9]
Membrane β-D-Glucuronidase	467 ± 186 [139–818]	325 ± 182 ^c [132–785]

Πηγή: Corsi et al., 2010

Οι Zawadzka-Bartczak et al. (2003) διερεύνησαν το αντιοξειδωτικό ενζυμικό προφίλ 229 πιλότων μαχητικών αεροσκαφών της Πολωνικής αεροπορίας, με μετρήσεις της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων των ερυθροκυττάρων, της συνολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του ορού και της συγκέντρωσης των λιπιδίων (συνολική χοληστερόλη, LDL, HDL, αθηρωματικός δείκτης). Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν τα επίπεδα δραστηριότητας των SOD, GPx και η συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα στον ορό. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως η μέση λιπιδική συγκέντρωση στην ομάδα των πιλότων καταγράφηκε σε φυσιολογικά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, το 22,2% των συμμετεχόντων είχαν φυσιολογικά ή σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, ενώ η πλειοψηφία καταγράφηκε ως έχουσα υπερλιπιδαιμία (πιο συγκεκριμένα, 40,6% ελαφρά, 30,4% μεσαία και 7,4% σοβαρή, αντίστοιχα). Ο μέσος αθηρωματικός δείκτης καταγράφηκε ως μεγαλύτερος του 5 (με ιδανική τιμή 3,5). Από την άλλη πλευρά, οι μέσες τιμές δραστηριότητας των SOD, GPx και της συνολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ήταν στο πλαίσιο των ανώτερων φυσιολογικών τιμών (Πίνακες 5 και 6). Αξίζει να αναφερθεί πως περιπτώσεις συμμετεχόντων με τιμές συνολικής χοληστερόλης μεγαλύτερες από 7,7 mmol/L, συνδυάστηκαν με μειωμένη δραστηριότητα των προαναφερθεισών τριών παραμέτρων. Τέλος, η παρουσία φυσιολογικής συγκέντρωσης της συνολικής χοληστερόλης δεν αποκλείει την περίπτωση καταγραφής μη φυσιολογικής τιμής του αθηρωματικού δείκτη. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν την άμεση ανάγκη της συνεχούς ιατρικής επίβλεψης των πιλότων πολεμικών αεροσκαφών, σε συνδυασμό με την ισορροπημένη διαίτα, τη φυσική δραστηριότητα και την χρήση υπολιπιδικών σκευασμάτων, εφόσον αυτό κριθεί απαραίτητο.

Πίνακας 5 Καταγραφή τιμών αντιοξειδωτικής δραστηρότητας στον ορό SOD και GPx στην ομάδα των 229 συμμετεχόντων πιλότων της μελέτης

Parameter	Min.	Max.	Mean	SD
TAS ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.58	2.32	1.47	0.29
SOD ($\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$)	794	2863	1528.7	351.32
GPx ($\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$)	16.8	135.4	57.32	21.24

Normal reference values: TAS 1.3–1.7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SOD 1100–1600 $\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$, GPx 27.5–73.5 $\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$.

(Συντομογραφίες: TAS-total antioxidative activity in serum, SOD-superoxide dismutase, GPx-glutathione peroxidase)

Πηγή: Zawadzka-Bartczak et al., 2003

Πίνακας 6 Καταγραφή εύρους συχνοτήτων αντιοξειδωτικής δραστηρότητας στον ορό, SOD και GPx στην ομάδα των 229 συμμετεχόντων πιλότων της μελέτης

Variable	Low N (%)	Normal N (%)	High N (%)
TAS	49 (21)	147 (64)	33 (14)
SOD	22 (9)	133 (58)	74 (32)
GPx	22 (9)	167 (72)	40 (17)

Normal reference values: TAS 1.3–1.7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, SOD 1100–1600 $\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$, GPx 27.5–73.5 $\text{U} \cdot \text{gHb}^{-1}$.

(Συντομογραφίες: TAS-total antioxidative activity in serum, SOD-superoxide dismutase, GPx-glutathione peroxidase)

Πηγή: Zawadzka-Bartczak et al., 2003

Β. Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο 4

4.1. Σκοπός και Στόχοι

Βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση και η μελέτη του οξειδωτικού stress που σχετίζεται με τις πτήσεις. Οι πιλότοι κάθε φορά που εκτελούν μια πτήση εκτίθενται σε συνθήκες υποξίας. Υπάρχει η υπόθεση ότι η υποξία θα μπορούσε να αυξήσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό του ανθρώπου και κατ' επέκταση το οξειδωτικό στρες έπειτα από μια πτήση. Μέχρι τώρα δεν έχουν αναφερθεί παρόμοιες μελέτες, όσον αφορά στη διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ιπτάμενου προσωπικού σε συνθήκες που προσομοιάζουν σε συνθήκες πτήσεως.

Επιμέρους στόχοι:

- Η διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης υγιών ιπταμένων πριν και μετά από τη δοκιμασία υποξίας στο θάλαμο χαμηλής πίεσης του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής μέσω της μελέτης δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης.
- Η διερεύνηση του ερωτήματος εάν και πώς ο θάλαμος χαμηλής πίεσης και οι συνθήκες υποξίας επηρεάζουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό.
- Η συνδρομή στην έναρξη ενός νέου πεδίου μελετών για περαιτέρω έρευνα της βελτίωσης και ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού των ιπταμένων. Ο όρος αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με τη δράση των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό μέσω ενζυμικών ή μη ενζυμικών μηχανισμών. Το γεγονός αυτό αποτελεί τη βάση για την ορθολογική εξέταση του ρόλου των αντιοξειδωτικών για την υγεία των ιπταμένων.

Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν αρχικά τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) και της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) έμπειρων πιλότων, αλλά και μαθητευόμενων πριν και μετά τη δοκιμασία υποξίας στο θάλαμο χαμηλής πίεσης του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής της Πολεμικής Αεροπορίας, μέσω φωτομέτρησης.

4.2 Μεθοδολογία

4.2.1. Πρωτόκολλο παρέμβασης

Για την παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού stress σε δείγματα αίματος, τα οποία συλλέχθηκαν από υγιείς ιπτάμενους εθελοντές πριν και μετά την έκθεσή τους στη δοκιμασία υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης που βρίσκεται στο Κέντρο Αεροπορικής Ιατρικής (Κ.Α.Ι.) της Πολεμικής Αεροπορίας (Π.Α). Οι συνθήκες στον εν λόγω θάλαμο, προσομοιάζουν σε συνθήκες πτήσεων.

Επιγραμματικά το προφίλ της εικονικής πτήσης (στο θάλαμο χαμηλής πίεσης) έχει ως εξής:

- Πριν την πτήση: Απαζώτωση με χορήγηση 100% οξυγόνου για μισή ώρα (προστατεύει από το φαινόμενο του δυσβαρισμού).
- Αρχικά: Άνοδος με ρυθμό 2500ft/min (πόδια ανά λεπτό) μέχρι τα 5000ft (πόδια) και αμέσως μετά κάθοδος με τον ίδιο ρυθμό μέχρι τα 1000ft (πραγματοποιείται κυρίως προκειμένου να εξοικειωθούν οι επιβαίνοντες με την τεχνική Valsava).
- Στη συνέχεια: Άνοδος με ταχύτητα 2500ft/min (πόδια ανά λεπτό) μέχρι τα 25000ft (πόδια). Στο ύψος αυτό (δηλ. τα 25000 πόδια) πραγματοποιείται το τεστ της υποξίας. Οι επιβαίνοντες βγάζουν τη μάσκα και μένουν χωρίς οξυγόνο για περίπου 2-3 λεπτά, μέχρι να αναγνωριστούν τα συμπτώματα της υποξίας τα οποία και καταγράφονται. Ο κορεσμός του οξυγόνου παρακολουθείται με οξύμετρο για τον καθένα χωριστά και φτάνει μέχρι το 60-65%. Αμέσως μετά την αναγνώριση της υποξίας ο καθένας βάζει ξανά τη μάσκα του, οπότε ο κορεσμός σε λίγα δευτερόλεπτα επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα (σε περίπτωση απώλειας ελέγχου ή αισθήσεων, ο εξειδικευμένος παρατηρητής, γιατρός ή νοσηλεύτης που συνοδεύει πάντα τους επιβαίνοντες, βάζει τη μάσκα).
- Τέλος: Αφού ολοκληρωθεί το τεστ για όλους (συνήθως 5 επιβαίνοντες), αρχίζει η κάθοδος με τον ίδιο ρυθμό (ο οποίος μπορεί να μειωθεί σε περίπτωση οποιασδήποτε ενόχλησης, πχ λόγω αδυναμίας σωστής εξίσωσης των πιέσεων με την τεχνική valsava). Το πολύ μισή ώρα μετά την έκθεση στην υποξία, οι επιβαίνοντες είναι εκτός θαλάμου.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθούν τα παρακάτω:

- Ο παραπάνω ρυθμός ανόδου του εικονικού αεροσκάφους (δηλαδή του θαλάμου)

είναι 5 έως 6 φορές μεγαλύτερος του αντίστοιχου ρυθμού ανόδου των αεροσκαφών της πολιτικής αεροπορίας.

- Εκτός από τις αλλαγές στη συγκέντρωση του οξυγόνου, πολύ σημαντικές και γρήγορες είναι και οι αλλαγές στις πιέσεις, γεγονός που μπορεί να συνεπάγεται επιπρόσθετα προβλήματα για τους επιβαίνοντες. Συγκεκριμένα, με δεδομένο πως ο όγκος του αέρα που υπάρχει εγκλωβισμένος σε μία οποιαδήποτε κοιλότητα του οργανισμού (πχ σε γαστρεντερικό σωλήνα, ή μέσο ους ή παραρρίνιους κόλπους ή οδόντες) είναι αντιστρόφως ανάλογος της ατμοσφαιρικής πίεσης, κάθε μεταβολή της πίεσης (μείωση κατά την άνοδο και αύξηση κατά την κάθοδο) συνεπάγεται ταυτόχρονη μεταβολή του όγκου των αερίων στο σώμα (διαστολή κατά την άνοδο και συστολή κατά την κάθοδο). Έτσι είναι πιθανό να παρουσιάζονται κάποιες φορές ήπια φαινόμενα δυσβαρισμού (λόγω αδυναμίας εξίσωσης της εσωτερικής και εξωτερικής πίεσης σε μια κοιλότητα του οργανισμού), π.χ. πιο συγκεκριμένα, ακουστικό βαρότραυμα, ή αεροκολπίτιδα ή αεροδονταλγία κλπ.

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση εξετάστηκε με τη μέτρηση των παρακάτω πέντε (5) δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα:

1. Ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) που αποτελούν δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων,
2. πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB), που αποτελούν δείκτες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση των πρωτεϊνών.
3. Δραστικότητας της καταλάσης (CAT), που αποτελεί δείκτη για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων.
4. Επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), που αποτελεί επίσης δείκτη για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων.
5. Ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος του αίματος, που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Οι μετρήσεις από τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκαν σε εξειδικευμένο εργαστήριο, το οποίο έχει διαμορφωθεί βάσει του εργαστηρίου φυσιολογίας και τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και εξειδικεύεται στη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress. Το εργαστήριο στεγάζεται σε μικροβιολογικό ιατρείο. Κάθε φορά πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις σε κάθε δείκτη, γεγονός που προσέδωσε

μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα.

4.2.2. Συμμετέχοντες

Στην παρούσα εργασία συμμετείχαν δεκατρείς εθελοντές χωρισμένοι σε δυο ομάδες ανάλογα με την πτητική εμπειρία τους. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από 7 έμπειρους πιλότους (ηλικία: $41,6 \pm 3,12$ χρόνια, ύψος: $177,5 \pm 1,82$ cm και βάρος: $83,5 \pm 6,17$ kg) και η δεύτερη από 7 μαθητευόμενους πιλότους (ηλικία: $19,6 \pm 0,32$ χρόνια, ύψος: $175,9 \pm 2,02$ cm και βάρος: $75,2 \pm 2,80$ kg). Όσα άτομα είχαν ιστορικό μυοσκελετικού τραυματισμού δεν συμμετείχαν στη μελέτη. Κατά την επίσκεψή τους, μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 kg η μάζα σώματος (με τη χρήση πιστοποιημένου ζυγού Tanita 780), ενώ οι εθελοντές ήταν ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλητοι. Το ύψος τους μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm με τη χρήση πιστοποιημένου αναστημόμετρου (Tanita HR001).

Οι εθελοντές απείχαν από οποιαδήποτε έντονη άσκηση κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στη μελέτη, καθώς και για πέντε ημέρες πριν την συμμετοχή τους σε αυτή. Τα άτομα ενθαρρύνονταν επίσης να μην πάρουν αντι-φλεγμονώδη ή αναλγητικά φάρμακα για όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ελήφθη γραπτή συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες, αφού ενημερώθηκαν για τους κινδύνους, την επιβάρυνση και τα οφέλη της συμμετοχής στη μελέτη. Οι διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με την διακήρυξη του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000. Η απαιτούμενη άδεια δόθηκε από την επιστημονική επιτροπή του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας καθώς και από τη διοίκηση του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής (Κ.Α.Ι.).

4.2.3. Συλλογή αίματος και επεξεργασία

Όλοι οι εθελοντές στην έρευνα έδωσαν 2 φορές φλεβικό αίμα από τον βραχίονα (10mL), μία πριν και μια μετά τη δοκιμασία στο θάλαμο προσομοίωσης πτήσης. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για τις μετρήσεις της TAC, των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της δραστηριότητας γλουταθειόνης και καταλάσης. Αρχικά συλλέχθηκε το αίμα σε σωληνάρια falcon με EDTA 7.5%, ανακινήθηκε μερικές φορές και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 1370 g για 10 λεπτά στους 4°C. Έπειτα, συλλέχτηκε το υπερκείμενο (πλάσμα) και χωρίστηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf. Αφού

διαχωρίστηκε καλά το πλάσμα από το ίζημα, προστέθηκε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονταν στο κάτω μέρος του falcon και ανακινήθηκε έντονα. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο (δηλαδή το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα) συλλέχθηκε, ενώ οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων παρέμειναν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου. Τέλος, το αιμόλυμα μοιράστηκε σε φιαλίδια τύπου erpendorf. Η διατήρηση των δειγμάτων έγινε στους -80 °C.

4.2.4. Αξιολόγηση των δεικτών οξειδοαγωγικής κατάστασης

Παρακάτω περιγράφονται τα πρωτόκολλα μέτρησης των πέντε δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία φασματοφωτομετρικά, καθώς και η αρχή προσδιορισμού του καθενός από αυτά..

Προσδιορισμός της (TAC) δηλαδή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος

Αρχή της μεθόδου

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχοντας αντιοξειδωτική δράση, συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία αποτελεί γενικά μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στην παρούσα μέθοδο υπολογίστηκε κάνοντας χρήση του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Όταν υπάρχει ένας δότης υδρογόνων στον ορό, η ρίζα (DPPH•) μπορεί και ανάγεται προς το σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η παραπάνω μετατροπή (αναγωγή) υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα). Σε 480μL Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4 προστίθενται 500μL DPPH 0.1 mM και 20μL πλάσμα. Ως τυφλό έχουμε 500μL Phosphate buffer 10 mM μαζί με 500μL DPPH 0.1 mM. Δείγματα και τυφλό επωάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη

διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς την στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Έπειτα, φυγοκεντρώνεται για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση) και μετριέται η απορρόφησή τους στα 520nm.

Υπολογισμοί

$\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50, διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

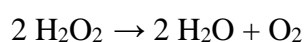
γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50, διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

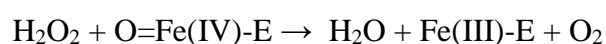
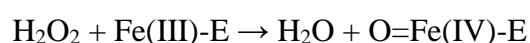
Προσδιορισμός Καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να διασπάσει σε ένα δευτερόλεπτο 83000 μόρια H_2O_2 , σε νερό και οξυγόνο. Το ιδανικό pH για την καταλάση είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η παρακάτω:

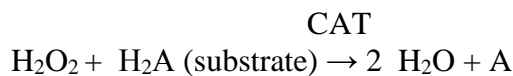


Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το ενεργό κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο)

Επίσης, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό είναι:

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (H₂O₂).

Σε 2991 μL Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4) προστίθενται 4 μL αιμολύματος αραιωμένο 1/10 με απεσταγμένο νερό. Η διαδικασία που ακολουθείται στη συνέχεια περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37° C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
3. Προσθέτουμε 5 μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = (ΔAbs_{sample per min} / 40) × (750 × 1000 × 10 × 2) / Conc. Hb (mg/mL),

όπου το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσεως που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) (3000 / 4 = 750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, παρουσία οξειδωτικού στρες στο κυτταρικό περιβάλλον, σχηματίζουν ασταθή υπεροξειδία των λιπιδίων. Η μηλονική διαλδεύδη (MDA) αποτελεί προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων και μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται ως ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεύδης αποτελεί μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα παρακάτω:

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

MB (Tris): 121.14

MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144.1

MB (Na₂SO₄): 142.04

TCA 35% και TCA 70%

Στην αρχή σε 100μL πλάσματος ή απεσταγμένου νερού (για το τυφλό) προστίθενται 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl αναδεύονται και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται 1mL Na₂SO₄-TBA και το μείγμα επωάζεται στους 95°C για 45 λεπτά (στο υδατόλουτρο) και έπειτα μπαίνει στον πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται 1mL TCA 70% και, αφού τα μείγματα αναδευτούν καλά, μεταφέρεται 1mL από κάθε δείγμα για φυγοκέντρηση στα 11200g στους 25°C για 3 λεπτά. Στο τέλος, φωτομετρούμε το υπερκείμενο στα 530nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS βρίσκεται από τη σχέση: (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 × 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 / 100 = 31) και το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης*

της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L.

* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδου-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 412 nm.

Χρησιμοποιούνται τα εξείς αντιδραστήρια:

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB:294.10

Σε erpendorf αναμειγνύονται 660μL Phosphate buffer με 330μL DTNB 1mM και 20μL από το αιμόλυμα. Στο τυφλό, αντί για το αιμόλυμα, προστίθεται ίσης ποσότητας αποσταγμένο νερό. Αναδεύονται καλά με vortex και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η εν λόγω επώαση στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Τέλος, μεταφέρεται το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση στα 412 nm (το φωτόμετρο μηδενίζεται με αέρα).

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) × 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5),

πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραιώση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5% και το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L, ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι, η συγκέντρωση της GSH εκφράζεται ανά g αιμοσφαιρίνης: GSH (mmol/ g Hb).

Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην αντίδρασή τους με τη 2,4-δινιτροφαινυλαδραζίνη (DNPH) και τη μετατροπή της σε 2,4-δινιτροφαινυλαδραζόνη (DNP-hydrazone). Στην αρχή σε 50 μL πλάσματος προσθέτουμε 50 μL 20% TCA και ανακατεύουμε με vortex. Για κάθε δείγμα που εξετάζεται, ετοιμάζουμε και ένα τυφλό. Στη συνέχεια, επωάζουμε τα δείγματα σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προστίθενται στο ίζημα 500 μL DNPH 14mM (διαλυμένα σε 2,5N HCl) για το δείγμα ή 500 μL 2,5N HCl για το τυφλό. Επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ενδιάμεσα, κάθε 15 λεπτά, ανακατεύουμε με vortex. Έπειτα, φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1mL TCA 10%, ανακατεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1000 μL μίγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1/1) και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 15.000g για 5 λεπτά στους

4°C. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές. Κατόπιν, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1mL ουρίας 5M (pH 2,3) και επωάζουμε για 20 λεπτά στους 37°C. Τέλος, φυγοκεντρούμε άλλη μια φορά στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C και μετράμε την απορρόφηση στα 375nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL)= Abs δείγματος-Abs τυφλού/0,022*1000/50. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22mM*cm-1. Το 0,022 υπολογίζεται ως εξής: 22mmol/L ισούται με 22μmol/mL = 0,022nmol/mL, ενώ 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα/50μL από το δείγμα).

4.2.5. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των δεικτών οξειδωτικού στρες, τα αιματολογικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά αναλύθηκαν με την στατιστική μέθοδο one-way ANOVA. Οι συγκρίσεις ανά ζεύγος πραγματοποιήθηκαν με Dunnet's test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές αναλύσεις είναι το πρόγραμμα SPSS, έκδοση 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SD.

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων

Χαρακτηριστικά	Πιλότοι	Μαθητευόμενοι	p value
Ηλικία (χρόνια)	41,7 ±3,12	19,6 ±0,32 ***	0,0004
Βάρος (kg)	83,5 ±6,16	75,3 ±2,80	0,12
Υψος (cm)	177,5 ±1,82	175,9 ±2,02	0,27
ΔΜΣ (kg/m ²)	26,5 ±1.88	24,3 ±0.50	0,15

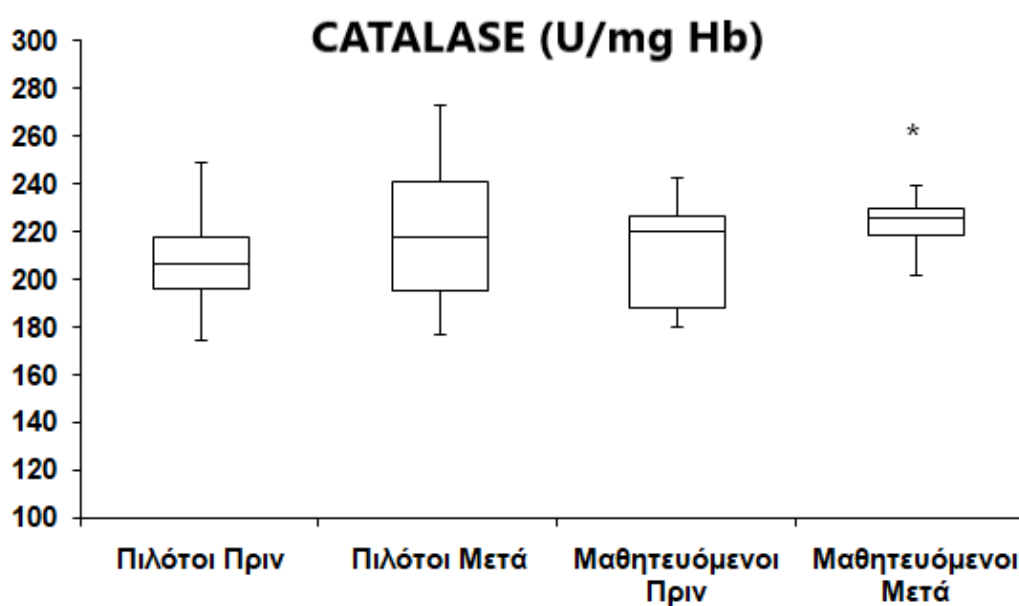
Πίνακας 8. Τιμές δεικτών οξειδωτικού στρες στις δυο ομάδες πριν και μετά την παρέμβαση

Δείκτες	Πιλότοι πριν	Πιλότοι μετά	p value	Μαθητευόμενοι πριν	Μαθητευόμενοι μετά	p value
GSH (μmol/g Hb)	3,73 ± 1,81	4,22 ± 1,43	0,07	3,5 ± 0,78	3,4 ± 0,61	0,37
Catalase (U/mg Hb)	210 ± 29	220 ± 36	0,21	210 ± 24	223 ± 13 *	0,03
TAC (mmol DPPH/L plasma)	0,87 ± 0,12	0,84 ± 0,08	0,08	0,75 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,09
TBARS (μmol/L)	5,28 ± 1,03	5,12 ± 1,86	0,19	4,66 ± 0,84	4,74 ± 0,96	0,28
Carbonls (nmol/mg protein)	0,67 ± 0,08	0,67 ± 0,11	0,45	0,59 ± 0,06	0,60 ± 0,08	0,32

5.1. Καταλάση

Βρέθηκε σημαντική επίδραση του χρόνου στην ομάδα των άπειρων ιπτάμενων. Η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε μετά την δοκιμασία υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ομάδα των έμπειρων ιπτάμενων. Μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκε διαφορά.

Διάγραμμα 1. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη δραστηριότητα της καταλάσης

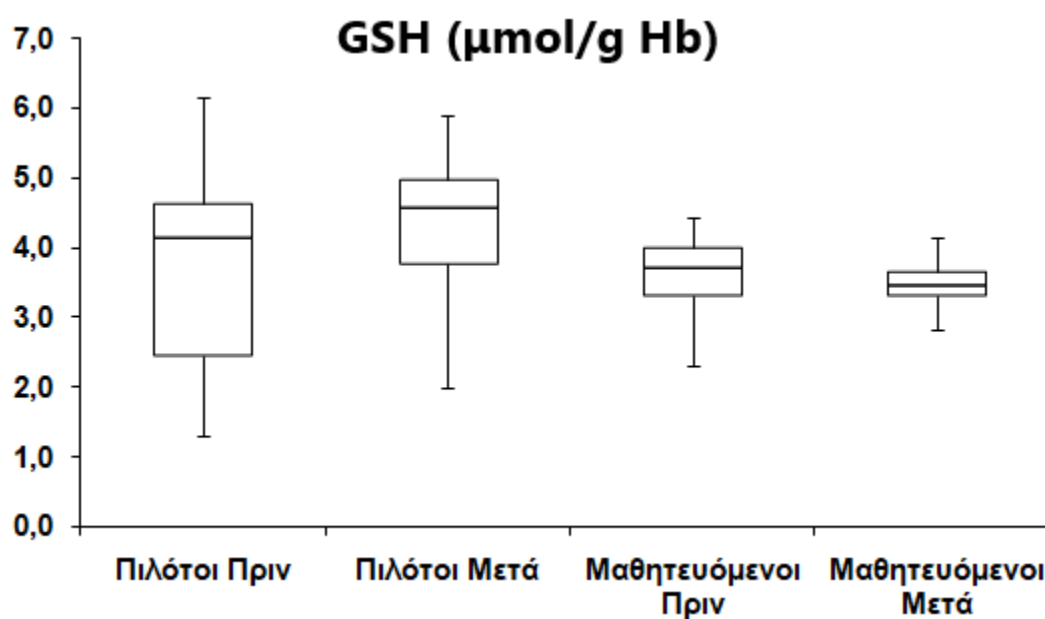


* στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά την παρέμβαση στην ίδια ομάδα ($p < 0.05$).

5.2. Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)

Δε βρέθηκε καμία επίδραση. Ωστόσο, υπήρξε μια ισχυρή τάση αύξησης των επιπέδων της ανηγμένης GSH στην ομάδα των έμπειρων ιπτάμενων μετά την δοκιμασία υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης ($p=0.077$)

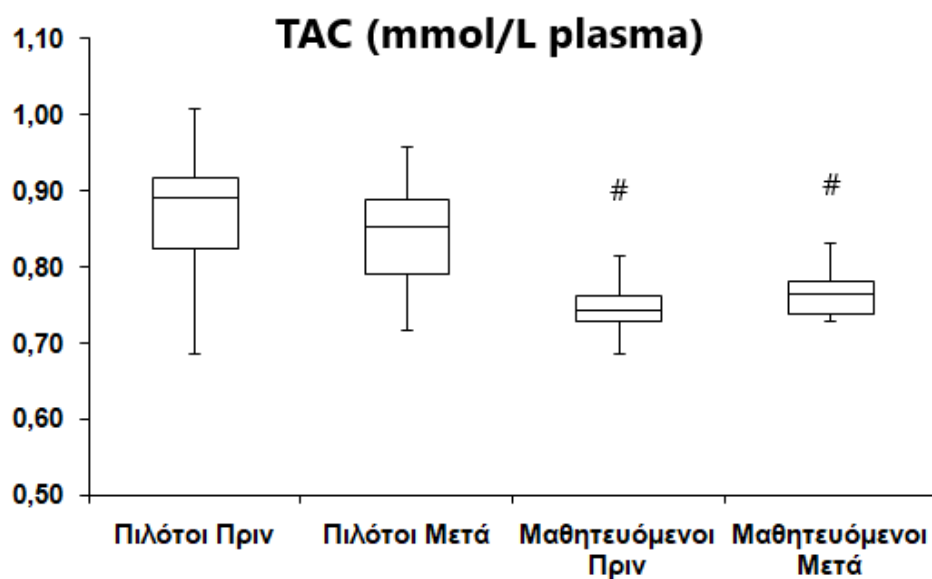
Διάγραμμα 2. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης



5.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Δεν βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, αλλά βρέθηκε διαφορά στα επίπεδα της TAC μεταξύ των ομάδων. Η TAC ήταν μειωμένη στην ομάδα των άπειρων ιπτάμενων τόσο πριν όσο και μετά την δοκιμασία υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης.

Διάγραμμα 3. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στην TAC

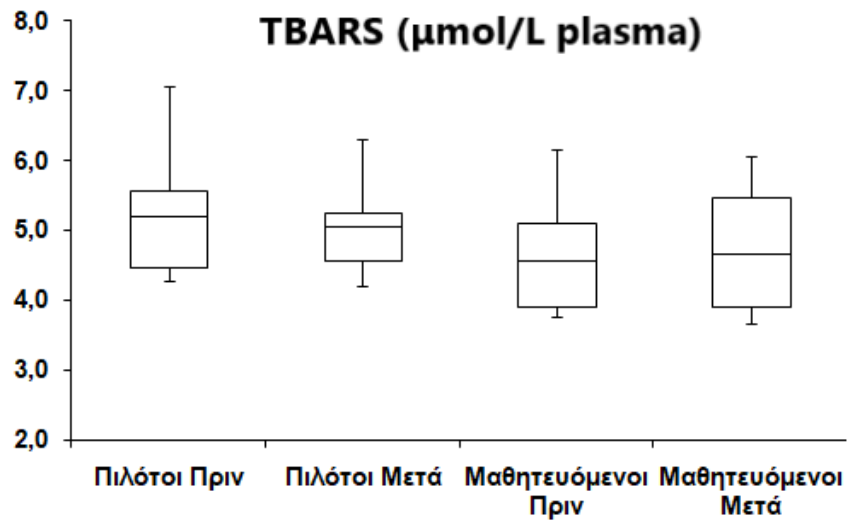


Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων την ίδια χρονική στιγμή.

5.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Δεν βρέθηκε καμιά επίδραση.

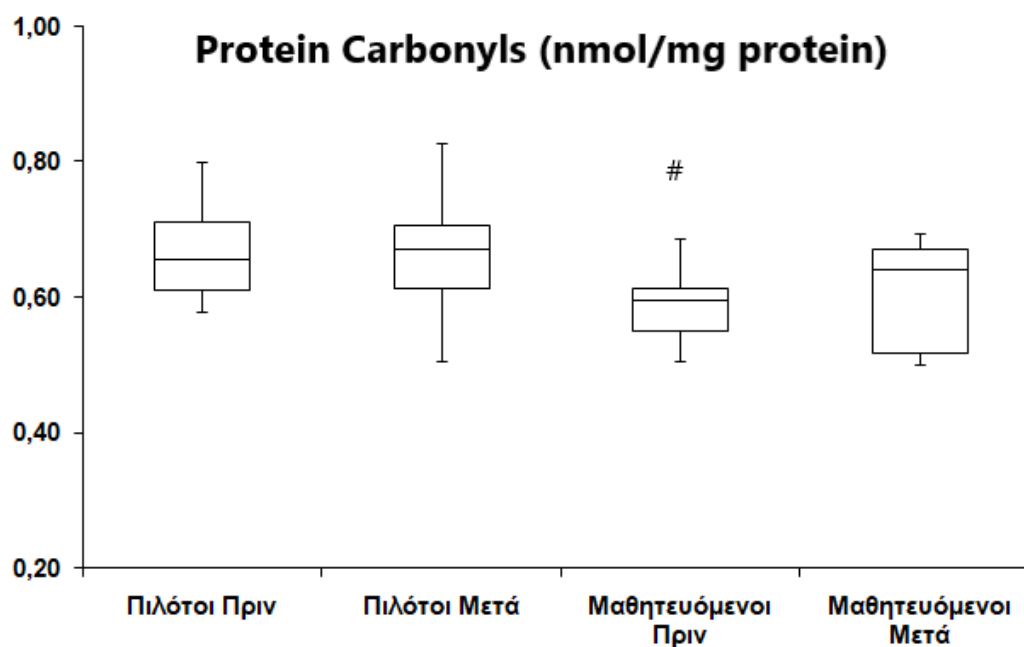
Διάγραμμα 4. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση των TBARS



5.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Δεν βρέθηκε κάποια επίδραση της δοκιμασία υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μειωμένη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα των άπειρων ιπτάμενων πριν την παρέμβαση συγκριτικά με την ομάδα των έμπειρων.

Διάγραμμα 5. Η επίδραση της δοκιμασίας υποξίας στον θάλαμο χαμηλής πίεσης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.



Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες στην ίδια χρονική στιγμή ($P < 0,05$).

Κεφάλαιο 6

Συζήτηση

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση και τη μελέτη του ενδεχόμενου οξειδωτικού stress που σχετίζεται με τις πτήσεις. Για το σκοπό αυτό έμπειροι, αλλά και μαθητευόμενοι πιλότοι, συμμετείχαν ως εθελοντές. Σε κάθε πτήση οι ιπτάμενοι εκτίθενται σε συνθήκες υποξίας για κάποιο διάστημα, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την φυσιολογία του οργανισμού τους. Η μελέτη στηρίχτηκε στην υπόθεση ότι η υποξία, δηλαδή η έλλειψη επαρκούς ποσότητας οξυγόνου, θα μπορούσε επηρεάσει τον αερόβιο μεταβολισμό και να αυξήσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα του ανθρώπου. Αύξηση των ελευθέρων ριζών θα μπορούσε να οδηγήσει σε εμφάνιση οξειδωτικού στρες, δηλαδή σε οξειδωτική βλάβη διαφόρων βιομορίων έπειτα από μια πτήση. Στην βιβλιογραφία μέχρι σήμερα δεν παρουσιάζεται κάποια παρόμοια μελέτη, όσον αφορά τη διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ιπτάμενου προσωπικού σε συνθήκες που προσομοιάζουν με συνθήκες πτήσεως.

Η πρόκληση των συνθηκών υποξίας πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο χαμηλής πίεσης του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής της Πολεμικής Αεροπορίας. Σύμφωνα με την υπόθεση της υποξίας ο επαγωγίμος παράγοντας υποξίας (HIF) είναι ο κύριος αισθητήρας οξυγόνου εντός των κυττάρων και είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων σε διάφορα επίπεδα οξυγόνου (Chen et al., 2018). Η ενεργοποίηση του HIF κατά τη διάρκεια της υποξίας διασφαλίζει τη βέλτιστη παραγωγή ATP και τη λειτουργία των κυττάρων και συνδέεται τόσο άμεσα όσο και έμμεσα με τον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Chan et al., 2016). Η ενεργοποίηση HIF μπορεί είτε να μειώσει τον σχηματισμό ROS καταστέλλοντας τη λειτουργία του μιτοχονδριακού κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (κύκλος TCA) είτε να αυξήσει τον σχηματισμό ROS μέσω της NADPH οξειδάσης (NOX), ενός γονιδίου στόχου του μονοπατιού του HIF (Suski et al., 2012). Τα ROS είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια του αερόβιου μεταβολισμού. Σε κανονικές συνθήκες (δηλαδή, φυσιολογικές ποσότητες οξυγόνου), τα ROS παράγονται σε χαμηλά επίπεδα και δρουν ως σηματοδοτικά μόρια που υπόκειται στην ειδική ισορροπία μεταξύ παραγωγής και εξουδετέρωσης των ROS (Kalogeris et al, 2012; Kalogeris et al., 2014). Οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις οξυγόνου επηρεάζουν το σχηματισμό των ROS. Όταν τα επίπεδα

ROS υπερβαίνουν τους αμυντικούς μηχανισμούς, δηλαδή την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, τότε προκαλούν το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες. Τα αυξημένα επίπεδα ROS μπορούν επίσης να συμβάλουν στη σταθεροποίηση του HIF κατά την υποξία και την επαναζυγόνωση (Semenza et al., 2012).

Οι εθελοντές που συμμετείχαν ήταν 13 άντρες από τους οποίους ελήφθη αίμα πριν και μετά τη δοκιμασία στον θάλαμο υποξίας με σκοπό να αναλυθούν τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες και τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων. Οι δείκτες οξειδωτικής βλάβης που μελετήθηκαν ήταν η λιπιδική υπεροξείδωση με την μέθοδο των TBARS και τα πρωτεϊνική οξειδωτική βλάβη με την μέθοδο των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB). Οι δυο αυτοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βλάβης βιομορίων, λιπιδίων και πρωτεϊνών αντίστοιχα (Spanidis et al., 2017). Οι υπόλοιποι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη στα ερυθροκύτταρα (GSH), και η δραστηριότητα καταλάσης στα ερυθροκύτταρα (CAT). Πρόκειται για δείκτες που δίνουν πληροφορίες για την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (Spanidis et al., 2016; Goutzourelas et al., 2018). Συγκεκριμένα, η TAC προσδιορίζει το σύνολο των αντιοξειδωτικών μορίων που κυκλοφορούν στο πλάσμα, ενώ η GSH αποτελεί το σημαντικότερο κυτταρικό αντιοξειδωτικό μόριο των κυττάρων, υπεύθυνο για την αδρανοποίηση των ROS (Janaszewska et al., 2002). Η καταλάση αποτελεί ένα βασικό ένζυμο με αντιοξειδωτική δράση, καθώς διασπά το H_2O_2 , το οποίο θεωρείται δραστική μορφή οξυγόνου. Τα συνδυαστικά αποτελέσματα των παραπάνω δεικτών δίνουν σημαντική πληροφορία για την οξειδοαναγωγική κατάσταση των εθελοντών πριν και μετά την δοκιμασία υποξίας.

Κατά τη μελέτη των δεικτών στους εθελοντές πριν και μετά την δοκιμασία υποξίας δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στα επίπεδά τους. Δηλαδή, ως σύνολο κανένας δείκτης δεν μεταβλήθηκε σημαντικά λόγω της παρέμβασης. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε να χωριστούν οι εθελοντές σε δυο ομάδες. Οι ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν οι εθελοντές, ήταν η πρώτη που αποτελούνταν από έμπειρους πιλότους, με πολλές ώρες πτήσεων στο ενεργητικό τους και η δεύτερη που αποτελούνταν από μαθητευόμενους πιλότους που εκτέθηκαν για πρώτη φορά στην ζωή τους σε συνθήκες υποξίας. Επομένως, δημιουργείται η υπόθεση ότι οι δυο ομάδες θα συμπεριφέρονταν διαφορετικά σε συνθήκες υποξίας λόγω των διαφορετικών προσαρμογών που ενδέχεται να έχουν δημιουργηθεί. Επιπλέον, μια βασική διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν η ηλικία, καθώς οι μαθητευόμενοι είχαν σημαντικά μικρότερη ηλικία.

Όταν μελετήθηκαν οι εθελοντές ως δυο ομάδες, παρατηρήθηκαν μια σειρά από

διαφορές μεταξύ των ομάδων πριν και μετά από την παρέμβαση. Όσον αφορά τον δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε μεταξύ των ομάδων πριν και μετά την παρέμβαση ούτε μέσα στην ίδια ομάδα πριν και μετά την παρέμβαση. Τα επίπεδα των TBARS έμειναν αμετάβλητα, δηλαδή δεν επηρεάστηκαν από το πρωτόκολλο υποξίας. Υπάρχουν εργασίες όπου τα TBARS αυξήθηκαν έπειτα από έκθεση σε συνθήκες υποξίας, αλλά και εργασίες όπου τα TBARS δεν επηρεάστηκαν (Xie et al., 2020; Cai et al., 2017). Αυτό εξαρτάται από το πρωτόκολλο υποξίας που πραγματοποιήθηκε, αλλά και από το δείγμα ανθρώπων που μελετήθηκαν.

Επίσης, στα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή των επιπέδων τους μετά την παρέμβαση σε κάποια από τις ομάδες. Ωστόσο, ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν σε υψηλότερα επίπεδα πριν την παρέμβαση στην ομάδα των έμπειρων πιλότων σε σχέση με τους μαθητευόμενους. Αυτό το εύρημα πιθανόν να σχετίζεται με την διαφορά στην ηλικία των εθελοντών στις δυο ομάδες. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την αύξηση της παραγωγής των ROS με την πάροδο της ηλικίας και δεδομένου ότι οι έμπειροι πιλότοι έχουν σχεδόν διπλάσια ηλικία, αυτό μπορεί να θεωρείται αναμενόμενο (Kitaoka et al., 2019; Mendes et al., 2020; Rundzinska et al., 2020). Παρόλα αυτά φάνηκε ότι η δοκιμασία υποξίας δεν επηρέασε τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε καμιά από τις δυο ομάδες.

Όσον αφορά τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, του σημαντικότερου κυτταρικού αντιοξειδωτικού μέσα στο ερυθροκύτταρο, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε μεταξύ των ομάδων πριν και μετά την παρέμβαση ούτε μέσα στην ίδια ομάδα πριν και μετά την παρέμβαση. Τα επίπεδα της GSH έμειναν αμετάβλητα, δηλαδή δεν επηρεάστηκαν από το πρωτόκολλο υποξίας. Η GSH αποτελεί γενικά ένα μόριο που εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται με μια σειρά από ενζυμικούς μηχανισμούς εντός του κυττάρου. Σε πολλές μελέτες, όπου υπάρχει υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών, συνήθως μεταβάλλονται τα επίπεδά της (Porrac et al., 2017).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC) δεν επηρεάστηκε από την παρέμβαση υποξίας σε καμιά από τις δύο ομάδες. Ωστόσο, τα επίπεδά της ήταν σημαντικά μειωμένα στην ομάδα των μαθητευόμενων πιλότων πριν και μετά από την παρέμβαση. Εδώ φαίνεται μια διαφορά του συγκεκριμένου δείκτη μεταξύ των ομάδων υποδηλώνοντας ότι οι έμπειροι πιλότοι έχουν αυξημένη TAC γενικά. Αυτή ενδεχομένως να επηρεάζεται από πιθανές χρόνιες προσαρμογές που έχουν γίνει στους έμπειρους πιλότους με τα χρόνια των πτήσεων, αλλά και λόγω της ηλικίας (Kitaoka et al., 2019; Mendes et al., 2020).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσίασε η δραστικότητα της καταλάσης. Η καταλάση είναι ένα αντιοξειδωτικό μόριο που καταλύει το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι μια δραστική μορφή οξυγόνου που μπορεί να μετατραπεί σε ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και να προκαλέσει βλάβες στα βιομόρια (Zhao et al., 2019). Στη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η δραστικότητα της καταλάσης αυξήθηκε μετά από την παρέμβαση υποξίας στους μαθητευόμενους πιλότους. Αντίθετα η δραστικότητά της δεν επηρεάστηκε από την παρέμβαση στους έμπειρους πιλότους. Επίσης, μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ούτε πριν ούτε μετά την παρέμβαση. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που η δραστικότητά του μπορεί να μεταβληθεί εξαιτίας την παραγωγής των ROS. Αυξημένη παραγωγή των ROS μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του ενζύμου και αυξημένη δραστικότητα, ως μηχανισμό άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών (Lin et al., 2019; Zhao et al., 2019). Πιθανώς στους μαθητευόμενους πιλότους η αυξημένη δραστικότητα καταλάσης να οφείλεται σε παραγωγή ROS. Αντίθετα, στους έμπειρους πιλότους δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο, καθώς ο οργανισμός τους έχει εκτεθεί αρκετές φορές σε συνθήκες πτήσεως, με αποτέλεσμα να έχουν γίνει οι απαραίτητες προσαρμογές στο οξειδοαναγωγικό τους σύστημα.

Στα ισχυρά σημεία της μελέτης συγκαταλέγεται το γεγονός ότι αποτελεί την πρώτη μελέτη στην βιβλιογραφία που εξετάζει ένα διαφορετικό πρωτόκολλο υποξίας σε ανθρώπους, την προκαλούμενη υποξία σε ειδικό θάλαμο προσομοίωσης πτήσης. Έως τώρα, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν χιλιάδες πιλότοι που πραγματοποιούν καθημερινά πτήσεις και εκτίθενται σε υποξία, δεν είχε μελετηθεί αυτό το φαινόμενο σε επίπεδο οξειδωτικού στρες.

Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στην μελέτη. Ένας βασικός περιορισμός είναι το μέγεθος του δείγματος. Σε ένα ευρύτερο δείγμα με μεγαλύτερα εύρη ηλικίας ενδεχομένως να εντοπίζονταν σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των δεικτών που μελετήθηκαν. Επιπλέον, στην μελέτη συμμετείχαν μόνο άντρες. Θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί το πρωτόκολλο υποξίας και στα δυο φύλα. Τέλος, να σημειώσουμε ότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δυο χρονικές στιγμές, πριν και μετά την έκθεση σε συνθήκες υποξίας. Μετρήσεις σε περισσότερες χρονικές στιγμές ίσως να εμπλούτιζαν τα αποτελέσματα με περισσότερα ευρήματα.

Κεφάλαιο 7

Συμπεράσματα - Προτάσεις

Αν και η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα μικρό δείγμα τα αποτελέσματα έχουν ενδιαφέρον και καταλήγουν σε κάποια επιπλέον ερωτήματα για το τρόπο επίδρασης της υποξίας που προκαλείται από μια πτήση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του ανθρώπου.

Το πρωτόκολλο υποξίας επηρέασε διαφορετικά τα επίπεδα δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στους έμπειρους πιλότους και στους μαθητευόμενους. Οι δείκτες CARB, TBARS, TAC και GSH δεν μεταβλήθηκαν σε καμιά ομάδα λόγω της παρέμβασης. Μόνο η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε στην ομάδα των μαθητευόμενων πιλότων μετά την παρέμβαση, καθώς η συγκεκριμένη ομάδα εκτέθηκε για πρώτη φορά σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων στα CARB και στην TAC, οι οποίες δεν σχετίζονται με την παρέμβαση. Οι έμπειροι πιλότοι παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα TAC και CARB πριν την παρέμβαση, γεγονός που υποδηλώνει κάποιες προσαρμογές που πιθανώς οφείλονται στην διαφορετική ηλικία, αλλά και στη συχνή έκθεση σε συνθήκες υποξίας.

Ενδιαφέρον θα έχει να γίνει στο μέλλον μια πιο εκτεταμένη μελέτη με μεγαλύτερο πλήθος συμμετεχόντων με μεγαλύτερος εύρος ηλικίας και άτομα και από τα δύο φύλα, όπου θα μελετώνται κι άλλοι δείκτες, όπως και άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα και επιπρόσθετοι βιοχημικοί δείκτες.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abuja PM & Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306: 1-17.
- Alfrey CP, Udden MM, Leach-Huntoon CS, et al. Control of red blood cell mass in spaceflight. *J App Physiol* 1996; 81: 98-104.
- Altunoglu E, Guntas G, Erdenen F, et al. Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Intern* 2015; 15: 872-880.
- Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004 May 19;43(10):1731-7. doi: 10.1016/j.jacc.2003.12.047. PMID: 15145091.
- Ames BN, Shingenaga MK, Park EM. DNA damage by endogenous oxidants as a cause of ageing and cancer. In.: Davies KJA (ed) *Oxidative damage and repair: Chemical, medical, and biological aspects*. Pergamon Press, New York, 1991:181-187.
- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, et al. Review: glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2013; 425: 64-76.
- Antus B. Oxidative stress markers in sputum. *Oxidative Med Cell Longev* 2016; 2016, Article ID 2930434, 12 pages.
- Arteel GE, Kadiiska MB, Rusyn I, et al. Oxidative stress occurs in perfused rat liver at low oxygen tension by mechanisms involving peroxynitrite. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 708-715.
- Asare GA, Akuffo G, Doku D, et al. Dynamics of urinary oxidative stress biomarkers: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-isoprostane in uterine leiomyomas. *J Mid-Life Health* 2016; 7: 8-14.

- Ashraf JM, Ahmad S, Choi I, et al. Recent advances in detection of AGEs: immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB Life* 2015; 67: 897-913.
- Askew EW. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002; 180: 107-119.
- Babakr AT, Elsheikh OM, Almarzouki AA, et al. Relationship between oxidized low-density lipoprotein antibodies and obesity in different glycemic situations. *Diabetes Metab Syndrome Obes* 2014; 7: 513-520.
- Bailey DM, Davies B, Young I, et al. A potential role for free radical-mediated skeletal muscle soreness in the pathology of acute mountain sickness. *Aviat Space Environ Med* 2001; 72: 513-521.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483-495.
- Balderas FL, Quezada-Larios M, Garcia Latorre EA, et al. Increased uptake of oxidized LDL by macrophages from type 2 diabetics is inhibited by polyamines. *Biomed Pharmacother* 2016; 77: 59-64.
- Bar-Or D, Curtis G, Rao N, et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding aminoacid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. *Eur J Biochem* 2001; 268: 42-47.
- Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med* 2000; 19: 311-315.
- Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, et al. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids* 2007; 32: 501-515.
- Bartsch H & Nair J. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res* 2005; 591: 34-44.
- Beckman KB & Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.

- Berlett BS & Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
- Bin P, Shen M, Li H, et al. Increased levels of urinary biomarkers of lipid peroxidation products among workers occupationally exposed to diesel engine exhaust. *Free Radical Res* 2016; 50: 820-830.
- Böhm F, Edge R, Burke M, Truscott TG. Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide - ROS components from cigarette smoke. *J Photochem Photobiol B*. 2001 Nov 15;64(2-3):176-8. doi: 10.1016/s1011-1344(01)00221-4. PMID: 11744404.
- Bosman GJ, Visser FE, De Man AJ, et al. Erythrocyte membrane changes of individuals with Down's syndrome in various stages of Alzheimer-type dementia. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 223-228.
- Bower A, Marquez S, de Mejia EG. The Health Benefits of Selected Culinary Herbs and Spices Found in the Traditional Mediterranean Diet. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Dec 9;56(16):2728-46. doi: 10.1080/10408398.2013.805713. PMID: 25749238.
- Breusing N & Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp Gerontol* 2010; 45: 733-737.
- Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, et al. Urinary markers of nucleic acid oxidation and cancer in type 2 diabetes. *Redox Biol* 2015; 4: 34-39.
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, et al. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 361-366.
- Buss IH, Senthilmohan R, Darlow BA, et al. 3-Chlorotyrosine as a marker of protein damage by myeloperoxidase in tracheal aspirates from preterm infants: association with adverse respiratory outcome. *Pediatric Res* 2003; 53: 455-462.
- Butterfield DA, Gu L, Di Domenico F, et al. Mass spectrometry and redox proteomics: applications in disease. *Mass Spectrometry Rev* 2014; 33: 277-301.
- Cadet J & Wagner JR. Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: similarities and differences. *Arch Biochem Biophys* 2014; 557: 47-54.

- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, et al. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531: 5-23.
- Cai C, Aranda JV, Valencia GB, Xu J, Beharry KD. Chronic Intermittent Hypoxia Causes Lipid Peroxidation and Altered Phase 1 Drug Metabolizing Enzymes in the Neonatal Rat Liver. *React Oxyg Species (Apex)*. 2017 May;3(9):218-236. Epub 2017 May 1. PMID: 29806035; PMCID: PMC5967640.
- Cao W, Hou FF, Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney Intern* 2014; 4: 102-106.
- Chan, M. C., Holt-Martyn, J. P., Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2016). Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases—A new field in medicine development. *Mol. Aspects Med.* 47-48, 54–75. doi: 10.1016/j.mam.2016.01.001
- Cheeseman KH & Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
- Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Oct 10;6:132. doi: 10.3389/fcell.2018.00132. PMID: 30364203; PMCID: PMC6192379.
- Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Res* 2000; 33: S99-S108.
- Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001; 47: 464-470.
- Cohen A, Klasing K, Ricklefs R. Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007; 147: 110-121.
- Collinson PO & Gaze DC. Ischaemia-modified albumin: clinical utility and pitfalls in measurement. *J Clin Pathol* 2008; 61: 1025-1028.
- Colzani M, Aldini G, Carini M. Mass spectrometric approaches for the identification and quantification of reactive carbonyl species protein adducts. *J Proteomics* 2013; 92: 28-50.

- Cooke MS, Olinski R, Loft S, et al. Committee on urinary lesion, measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3-14.
- Corsi MM, Massaccesi L, Dogliotti G, et al. O-Beta-Nacetyl-D-glucosaminidase in erythrocytes of Italian Air Force acrobatic pilots. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 213-216.
- Cristani M, Speciale A, Saija A, et al. Circulating advanced oxidation protein products as oxidative stress biomarkers and progression mediators in pathological conditions related to inflammation and immune dysregulation. *Curr Med Chem* 2016; 23: 3862-3882.
- Cui S, Li H, Wang S, et al. Ultrasensitive UPLC-MS-MS method for the quantitation of etheno-DNA adducts in human urine. *Intern J Environ Res Public Health* 2014; 11: 10902-10914.
- Cymerman A, 1996. The physiology of high-altitude exposure. In: Marriott BM, Carlson SJ (Eds.), *Nutritional Needs in Cold and High-Altitude Environments*. National Academy Press, Washington, DC, pp. 295-317.
- Da Moura Smedo C, Webb M, Waller H, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgrad Med J* 2017; 93: 289-294.
- Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* 2016; 473: 805-826.
- Del Rio D, Steward AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 316-328.
- Delgado-Andrade C. Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food Function* 2016; 7: 46-57.
- Di Domenico F, Pupo G, Tramutola A, et al. Redox proteomics analysis of HNE-modified proteins in Down syndrome brain: clues for understanding the development of Alzheimer disease. *Free Radical Biol Med* 2014; 71: 270-280.
- Dizdaroglu M & Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Res* 2012; 46: 382-419.

- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biol Med* 2002; 32: 1102-1115.
- Dogliotti G, Dozio E, Agrifoglio M, et al. Italian air force acrobatic pilots are protected against flight-induced oxidative stress. *In vivo* 2011; 25: 1013-1018.
- Domijan AM, Ralic J, Radic Brkanac S, et al. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromatography* 2015; 29: 41-46.
- D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013 Jun 7;14(6):12222-48. doi: 10.3390/ijms140612222. PMID: 23749111; PMCID: PMC3709783.
- Dreissigacker U, Suchy MT, Maassen N, et al. Human plasma concentrations of malondialdehyde (MDA) and the F2-isoprostane 15(S)-8-iso-PGF(2alpha) may be markedly compromised by hemolysis: evidence by GC-MS/MS and potential analytical and biological ramifications. *Clin Biochem* 2010; 43: 159-167.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Du SL, Zeng XZ, Tian JW, et al. Advanced oxidation protein products in predicting acute kidney injury following cardiac surgery. *Biomarkers* 2015; 20: 206-211.
- European Standards Committee on Urinary Lesion, Evans AMD, Olinski R, Loft S, et al. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J* 2010; 24: 1249-1260.
- Falnes PO, Klungland A, Alseth I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* 2007; 145: 1222-1232.
- Finkel T & Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 2000; 408: 239-247.
- Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antiox Redox Signalling* 2015; 23: 1144-1170.

- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, et al. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 9982-9986.
- Gaut JP, Byun J, Tran HD, et al. Artifact free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2002; 300: 252-259.
- Gaze DC. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 333-341.
- Gedik CM, Collins A, Escodd B. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J* 2005; 19: 82-84.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Res* 2006; 40: 495-505.
- Goi G, Bairati C, Massaccesi L, et al. Membrane anchoring and surface distribution of glycohydrolases of human erythrocyte membranes. *FEBS Lett* 2000; 473: 89-94.
- Goi G, Cazzola R, Tringali C, et al. Erythrocyte membrane alterations during ageing affect beta-D-glucuronidase and neutral sialidase in elderly healthy subjects. *Exp Gerontol* 2005; 40: 219-225.
- Goldring C, Casini AF, Maellaro E, et al. Determination of 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Lipids* 1993; 28: 141-145.
- Goutzourelas N, Orfanou M, Charizanis I, Leon G, Spandidos DA, Kouretas D. GSH levels affect weight loss in individuals with metabolic syndrome and obesity following dietary therapy. *Exp Ther Med.* 2018 Aug;16(2):635-642. doi: 10.3892/etm.2018.6204.
- Grigoriev AI, Maksimov GV, Morukov BV, et al. Investigation of erythrocyte shape, plasma membrane fluidity and conformation of haemoglobin haemoporphyrin under the influence of long-term space flight. *J Gravit Physiol* 2004; 11: 79-80.

- Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, et al. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 2008; 283: 21837-21841.
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharmaceut Biomed Analysis* 2007; 43: 619-624.
- Gu W, Xu Z, Qi F, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intern J Clin Exp Med* 2014; 7: 5558-5562
- Guetens G, De Boeck G, Highley M, et al. Oxidative DNA damage: Biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39: 331-457.
- Gunduz A, Turedi S, Mentese A, et al. Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. *Am J Emerg Med* 2008; 26: 874-878.
- Halliwell B & Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999: 246-350.
- Hand SC & Hardewig I. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 539-563.
- Handelman GJ. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*. 2001 Oct;17(10):818-22. doi: 10.1016/s0899-9007(01)00640-2. PMID: 11684387.
- Hartley A, Haskard D, Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis - Novel insights and future directions in diagnosis and therapy. *Trends Cardiovasc Med*. 2019 Jan;29(1):22-26. doi: 10.1016/j.tcm.2018.05.010. Epub 2018 Jun 4. PMID: 29934015.
- Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biol Med* 2009; 46: 965-988.
- Hazen SL & Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997; 99: 2075-2081.

- Hazen SL, Crowley JR, Mueller DM, et al. Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 909-916.
- Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998; 2: 324-336.
- Hohn A, Jung T, Grune T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radical Biol Med* 2014; 71: 70-89.
- Hohn A, Konig J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics* 2013; 92: 132-159.
- Holvoet P, De Keyser D, Jacobs Jr DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 2008; 3: 637-649.
- Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, et al. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1299-1306.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R. et al. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1175-1213.
- Ilavazhagan G, Bansai A, Prasad D, et al. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviat Space Environ Med* 2001; 72: 899-903.
- Il'yasova D, Morrow JD, Ivanova A, et al. Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-isoprostane. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 793-797.
- Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: Comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62: 231-236, 2002.
- Jayakumari NR, Reghuvaran AC, Rajendran RS, et al. Are nitric oxide-mediated protein modifications of functional significance in diabetic heart? ye'S, -NO', wh'Y-NO't? *Nitric Oxide* 2014; 43: 35-44.

- Jenny-Eiermann S, Jenni L, Smith S, et al. Oxidative stress in endurance flight: An unconsidered factor in bird migration. *PLOS ONE* 2014; 9: e97650-e97655.
- Joanny P, Steinberg J, Robach P, et al. Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on blood lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise. *Resuscitation* 2001; 49: 307-314.
- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 87-95.
- Juranek JK, Daffu GK, Wojtkiewicz J, et al. Receptor for advanced glycation end products and its inflammatory ligands are upregulated in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers Cell Neurosc* 2015; 9: 485-496.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., and Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 229–317. doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
- Kalogeris, T., Bao, Y., and Korthuis, R. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2, 702–714. doi: 10.1016/j.redox.2014.05.006
- Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
- Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, et al. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromat B, Biomed Appl* 1996; 685: 343-347.
- Kant M, Akis M, Calan M, et al. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2alpha as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair (Amst)* 2016; 48: 1-7.
- Kasab S Al, Cassarly C, Le NA, et al. Postprandial clearance of oxidized low-density lipoprotein in patients with stroke due to atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2017; 26: 488-493.

- Kastan MB & Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432: 316-323.
- Kaur J, Politis C, Jacobs R. Salivary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action. *Clin Oral Invest* 2016; 20: 315-319.
- Kettle AJ, Chan T, Osberg I, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1317-1323.
- Khan J, Brennand DM, Bradley N, et al. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* 1998; 332: 807-808.
- Kitaoka Y, Tamura Y, Takahashi K, Takeda K, Takemasa T, Hatta H. Effects of Nrf2 deficiency on mitochondrial oxidative stress in aged skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2019 Feb;7(3):e13998. doi: 10.14814/phy2.13998. PMID: 30756520; PMCID: PMC6372533.
- Knaapen AM, Gungor N, Schins RP, et al. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* 2006; 21: 225-236.
- Knasmuller S, Nersesyan A, Misik M, et al. Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *Br J Nutr* 2008; 99: ES3-E52.
- Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem* 1988; 34: 2433-2438.
- Koppenol WH, Bounds PL, Nauser T, et al. Peroxynitrous acid: controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. *Dalton Trans* 2012; 41: 13779-13787.
- Kumar A. Ischemia-modified albumin: its diagnostic implications and shortfalls. *J Biomed Sci* 2012; 1: 2-4.
- Lam MA, Maghzal GJ, Khademi M, et al. Absence of systemic oxidative stress and increased CSF prostaglandin F2alpha in progressive MS. *Neuroimmunol Neuroinfl* 2016; 3: e256.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346-357.

- Li H, Cui S, Wang S, et al. Ultrasensitive UPLC-MS/MS method for analysis of etheno-DNA adducts in human white blood cells. *Free Radical Res* 2015; 49: 1049-1054.
- Li LH, Lee JC, Leung HH, Lam WC, Fu Z, Lo ACY. Lutein Supplementation for Eye Diseases. *Nutrients*. 2020 Jun 9;12(6):1721. doi: 10.3390/nu12061721. PMID: 32526861; PMCID: PMC7352796.
- Lin X, Bai D, Wei Z, Zhang Y, Huang Y, Deng H, Huang X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One*. 2019 May 21;14(5):e0216711. doi: 10.1371/journal.pone.0216711. PMID: 31112588; PMCID: PMC6528975.
- Liu CY, Huang QF, Cheng YB, et al. A comparative study on skin and plasma advanced glycation end products and their associations with arterial stiffness. *Pulse (Basel, Switzerland)* 2017; 4: 208-218.
- Liu Q, Smith MA, Avila J, et al. Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radical Biol Med* 2005; 38: 746-754.
- Lobo JPJ, Brescansin CP, Santos-Weiss IC, et al. Serum fluorescent advanced glycation end (F-AGE) products in gestational diabetes patients. *Arch Endocrinol Metab* 2017; 13: 0.
- Loft S, Svoboda P, Kasai H, et al. Prospective study of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1245-1250.
- Lohou E, Sasaki NA, Boullier A, et al. Multifunctional diamine AGE/ALE inhibitors with potential therapeutical properties against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 2016; 122: 702-722.
- Loomis SJ, Chen Y, Sacks DB, et al. Cross-sectional analysis of AGE-CML, sRAGE, and esRAGE with diabetes and Cardiometabolic risk factors in a community-based cohort. *Clin Chem* 2017; 63: 980-989.
- Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019 Dec;70(6). doi: 10.26402/jpp.2019.6.01. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32084643.

- Luczaj W, Gindzienska-Sieskiewicz E, Jarocka-Karpowicz I, et al. The onset of lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: consequences and monitoring. *Free Radical Res* 2016; 50: 304-313.
- Ma SG, Jin Y, Hu W, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin and C-reactive protein in type 2 diabetics with and without ketosis. *Biomarker Insights* 2012; 7: 19-26.
- Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, et al. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflammation* 2013; 2013: article 714653.
- Marcos R & Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007; 30: 175-191.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 1-32.
- Marx G & Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochem J* 1986; 236: 397-400.
- Massaccesi L, Corsi MM, Baquero-Herrera CJ, et al. Erythrocyte glycohydrolases in subjects with trisomy 21: could Down's syndrome be a model of accelerated ageing? *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 324-331.
- Mateu-Jimenez M, Sanchez-Font A, Rodriguez-Fuster A, et al. Redox imbalance in lung cancer of patients with underlying chronic respiratory conditions. *Mol Med* 2016; 22: 85-98.
- Mendes S, Timóteo-Ferreira F, Soares AI, Rodrigues AR, Silva AMN, Silveira S, Matos L, Saraiva J, Guedes-Martins L, Almeida H, Silva E. Age-related oxidative modifications to uterine albumin impair extravillous trophoblast cells function. *Free Radic Biol Med*. 2020 May 20;152:313-322. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.020. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224083.
- Meredith S, Parekh G, Towler J, et al. Mapping nitrotyrosine modifications in fibrinogen by mass spectrometry as a biomarker for inflammatory disease. *Free Radical Biol Med* 2014; 75: S50-S58.

- Moller P, Loft S, Lundby C, et al. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative damage in humans. *FASEB J* 2001; 15: 1181-1186.
- Monboisse JC & Borel JP. Oxidative damage to collagen. *EXS* 1992; 62: 323-327.
- Monnier VM & Sell DR. Prevention and repair of protein damage by the Maillard reaction in vivo. *Rejuvenation Res* 2006; 9: 264-273.
- Mothes E & Faller P. Evidence that the principal CoIIbinding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. *Biochem* 2007; 46: 2267-2274.
- Muhamed PK, Vadstrup S. [Zinc is the most important trace element]. *Ugeskr Laeger*. 2014 Mar 3;176(5):V11120654. Danish. PMID: 25096007.
- Nair J, Gansauge F, Beger H, et al. Increased etheno-DNA adducts in affected tissues of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis, and chronic pancreatitis. *Antiox Redox Signal* 2006; 8: 1003-1010.
- Natarajan K, Mathialagan GD, Raghavan S, et al. The advanced Lipoxidation end product precursor malondialdehyde induces IL-17E expression and skews lymphocytes to the th17 subset. *Cell Mol Biol Lett* 2015; 20: 647-662.
- Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Rad Res* 2010; 44: 1125-1171.
- Neubauer JA: Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1593-1599.
- Osawa S, Natakami N, Kuroda A, et al. Skin Autofluorescence is associated with early-stage atherosclerosis in patients with type 1 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2017; 24: 312-326.
- Ott C & Grune T. Protein oxidation and proteolytic signalling in aging. *Curr Pharm Design* 2014; 20: 3040-3051.
- Ozbay I, Kucur C, Kocak FE, et al. Advanced oxidation protein product levels as a marker of oxidative stress in paediatric patients with chronic tonsillitis. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2016; 36: 381-385.

- Peltonen JE, Tikkanen HO, Ritola JJ, et al. Oxygen uptake response during maximal cycling in hypoxia, nonoxia and hypoxia. *Aviat Space Environ Med* 2001; 72: 904-911.
- Peluffo G & Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 291-302.
- Peluso I, Morabito G, Urban L, et al. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr Metab Immune Dis Drug Targets* 2012; 12: 351-360.
- Perluigi M, Coccia R, Butterfield DA. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antiox Redox Signal* 2012; 17: 1590-1609.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Jul;38(7):592-607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005. Epub 2017 May 24. PMID: 28551354.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Jul;38(7):592-607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005. Epub 2017 May 24. PMID: 28551354.
- Proudfoot J, Barden A, Mori TA, et al. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-a comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 272: 209-215.
- Rabbani N & Thornalley PJ. Assay of 3-nitrotyrosine in tissues and body fluids by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Methods Enzymol* 2008; 440: 337-359.
- Rahsepar AA, Mirzaee A, Moodi F, et al. Malondialdehyde-modified LDL IgG antibody levels and indices of cardiac function in valvular heart and coronary artery disease patients. *Med Principles Practice* 2015; 24: 424-431.
- Ravanat JL, Cadet J, Douki T. Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr Mol Med* 2012; 12: 655-671.

- Reznick AZ & Parker L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.
- Richer T & von Zglinicki T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 2007; 42: 1039-1042.
- Risby TH, Long L, Stoll S, et al. Breath ethane as a marker of reactive oxygen species during manipulation of diet and oxygen tension in rats. *J Appl Physiol* 1999; 86: 617-622.
- Rizzo AM, Corsetto PA, Montorfano G, et al. Effects of long-term flight on erythrocytes and oxidative stress of rodents. *PLoS ONE* 2012; 7: e32361-e32369.
- Roy D, Quiles J, Gaze DC, et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 2006; 92: 113-114.
- Rudzińska M, Parodi A, Balakireva AV, Chepikova OE, Venanzi FM, Zamyatnin AA Jr. Cellular Aging Characteristics and Their Association with Age-Related Disorders. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jan 22;9(2):94. doi: 10.3390/antiox9020094. PMID: 31979201; PMCID: PMC7071036.
- Sanchez E, Betriu A, Arroyo D, et al. Skin autofluorescence and subclinical atherosclerosis in mild to moderate chronic kidney disease: a case-control study. *PLoS One* 2017; 12: article e0170778.
- Sawikr Y, Sastry Yarla N, Peluso I, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: the preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2017; 108: 33-57.
- Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 177-184.
- Scheijen JL, van de Waarenburg MP, Stehouwer CD, et al. Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J Chromat B Anal Tech Biomed Life Sci* 2009; 877: 610-614.
- Schleicher E & Wieland OH. Specific quantitation by HPLC of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981; 19: 81-87.

- Schmidt MC, Askew EW, Roberts DE, et al. Oxidative stress in individuals training in a cold moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wild Environ Med* 2002; 13: 94-105.
- Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 646-654.
- Schumer EM, Black MC, Bousamra M 2nd, et al. Normalization of exhaled carbonyl compounds after lung cancer resection. *Ann Thor Surg* 2016; 102: 1095-1100.
- Schumer EM, Trivedi JR, van Berkel V, et al. High sensitivity for lung cancer detection using analysis of exhaled carbonyl compounds. *J Thor Cardiovasc Surg* 2015; 150: 1517-1522.
- Selman C, McLaren JS, Collins AR, et al. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: The effects of short term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 2002; 401: 255-261.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 149, 399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021
- Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, et al. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J Chromat B Analytical Technologies in Biomed Life Sci* 2003; 785: 337-344.
- Simon-Schnass I, Pabst H. Influence of vitamin E on performance. *Internat J Vit Nutr Res* 1988; 58: 49-54.
- Smith KA, Shepherd J, Wakil A, et al. A comparison of methods for the measurement of 8-iso-PGF(2alpha): a marker of oxidative stress. *Ann Clin Biochem* 2011; 48: 147-154.
- Smith SM. Red blood cell and iron metabolism during space flight. *Nutrition* 2002; 18: 864-866.
- Smriti K, Pai KM, Ravindranath V, et al. Role of salivary malondialdehyde in assessment of oxidative stress among diabetics. *J Oral Biol Craniofacial Res* 2016; 6: 41-44.

- Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, et al. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007; 28: R41-R55.
- Sousa BC, Pitt AR, Spickett CM. Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. *Free Radical Biol Med* 2017; 111: 294-308.
- Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biol Med* 2008; 45: 357-366.
- Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102: 1018-1023.
- Spanidis Y, Mpesios A, Stagos D, Goutzourelas N, Bar-Or D, Karapetsa M, Zakynthinos E, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Leon G, Kouretas D. Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations. *Exp Ther Med*. 2016 Mar;11(3):895-903. doi: 10.3892/etm.2016.2968.
- Spanidis Y, Stagos D, Orfanou M, Goutzourelas N, Bar-Or D, Spandidos D, Kouretas D. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *J Strength Cond Res*. 2017 Mar;31(3):582-594. doi: 10.1519/JSC.0000000000001584. PMID: 28212265.
- Stadtman ER & Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-218.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radical Res* 2006; 40: 1250-1258.
- Suehiro A, Uchida K, Nakanishi M, et al. Measurement of urinary advanced glycation end-products (AGEs) using a fluorescence assay for metabolic syndrome-related screening tests. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 2016; 10: S110-S113.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antiox Redox Signal* 2006; 8: 2021-2037.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, et al. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 76-87.

- Surai OF. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2002: 233-304.
- Suski, J., Lebiezinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., and Wieckowski, M. (2012). Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol. Biol.* 810, 183–205. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_12
- Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, et al. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2007-2013.
- Taylor EL, Armstrong KR, Perret D, et al. Optimisation of an advanced oxidation protein products assay: its application to studies of oxidative stress in diabetes mellitus. *Oxidat Med Cell Longev* 2015; 2015: article 496271.
- Tsikas D & Duncan MW. Mass spectrometry and 3- nitrotyrosine: strategies, controversies, and our current perspective. *Mass Spectrometry Rev* 2014; 33: 237-276.
- Turk N, Mornar A, Mrzljak V, et al. Urinary excretion of advanced glycation endproducts in patients with type 2 diabetes and various stages of proteinuria. *Diabetes Metabolism* 2004; 30: 187-192.
- Turk Z, Sesto M, Skodlar J, et al. Products of advanced glycation in patients with type 2 diabetes and vascular disease. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 552-559.
- Ueno A, Ghosh A, Hung D, et al. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 12283-12295.
- Vanhooren V, Navarrete Santos A, Voutetakis K, et al. Protein modification and maintenance systems as biomarkers of ageing. *Mechanisms Ageing Dev* 2015; 151: 71-84.
- Verhoye E, Langlois MR, Asklepios I. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 128-137.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Res* 2013; 47: 3-27.

- Voulgaridou GP, Anestopoulos I, Franco R, et al. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. *Mutat Res* 2001; 711: 13-27.
- Wang N, Dai R, Wang W, et al. Simultaneous profiling of eicosanoid metabolome in plasma by UPLC-MS/MS method: application to identify potential makers for rheumatoid arthritis. *Talanta* 2016; 161: 157-164.
- Wang N, Zhao X, Wang W, et al. Targeted profiling of arachidonic acid and eicosanoids in rat tissue by UFLC-MS/MS: application to identify potential markers for rheumatoid arthritis. *Talanta* 2017; 162: 479-487.
- Wing SL, Askew EW, Luetkemeier ML, et al. Oxygen-promoting dietary supplements, hypoxia and oxidative stress during simulated attitude exposure. *Wild Environ. Med.* 2002; 13: 74-78.
- Wiseman H & Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 1-9.
- Wu SM & Pizzo SV. α 2-Macroglobulin from rheumatoid arthritis synovial fluid: functional analysis defines a role for oxidation in inflammation. *Arch Biochem Biophys* 2001; 391: 119-126.
- Xie Z, Hou H, Luo D, An R, Zhao Y, Qiu C. ROS-Dependent Lipid Peroxidation and Reliant Antioxidant Ferroptosis-Suppressor-Protein 1 in Rheumatoid Arthritis: a Covert Clue for Potential Therapy. *Inflammation*. 2021 Feb;44(1):35-47. doi: 10.1007/s10753-020-01338-2. Epub 2020 Sep 12. PMID: 32920707.
- Xu S, Ying J, Jiang B, et al. Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol, Heart Circulatory Physiol* 2006; 290: H2220-H2227.

- Xu XB, Ma F, Yu J, et al. Simultaneous analysis of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, reducing sugars, and lysine during the dairy thermal process. *J Dairy Sci* 2013; 96: 5487-5493.
- Yamada M, Iwata M, Warabi E, Oishi H, Lira VA, Okutsu M. p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. *FASEB J.* 2019 Jul;33(7):8022-8032. doi: 10.1096/fj.201900133R. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30913396.
- Yeo WS, Kim YJ, Kabir MH, et al. Mass spectrometric analysis of protein tyrosine nitration in aging and neurodegenerative diseases. *Mass Spectrometry Rev* 2015; 34: 166-183.
- Yildirim Z, Bozkurt B, Ozol D, et al. Increased exhaled 8-isoprostane and interleukin-6 in patients with Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2016; 21: 389-394.
- Zawadzka-Bartczak E, Kopka L, Gancarz A. Antioxidative enzyme profiles in fighter pilots. *Aviation Space Environ Med* 2003; 74: 654-658.
- Zelzer S, Mangge H, Oberreither R, et al. Oxidative stress: determination of 4-hydroxy-2-nonenal by gas chromatography/mass spectrometry in human and rat plasma. *Free Radical Res* 2015; 49: 1233-1238.
- Zhao MX, Wen JL, Wang L, Wang XP, Chen TS. Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. *Cell Stress Chaperones.* 2019 May;24(3):609-619. doi: 10.1007/s12192-019-00993-1. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30989612; PMCID: PMC6527626.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βαλαβανίδης Α. Ελεύθερες ρίζες και ο ρόλος τους στα βιολογικά συστήματα. Βιοχημικές λειτουργίες και μεταβολισμός, αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, οξειδωτικό stress, γήρανση και ασθένειες φθοράς. Αθήνα: Βήτα Medical Arts, 2006: 49-76.
- Γαλάρης Δ, Μητρογιάννη Ζ, Σιαμόπουλος ΚΧ. Οξειδωτικό stress στην αιμοκάθαρση. Ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Θεραπευτικές στρατηγικές. *Ελλην Νεφρολ* 2002; 14: 27-31. Παράρτημα.
- Ντουνούση ΕΧ, Τσελέπης Α, Σιαμόπουλος ΚΧ. Οξειδωτικό stress, μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος τους στη χρόνια νεφρική νόσο. *Ελλην Νεφρολ* 2009; 21: 34-45.

1. Έγκριση Επιστημονικού Συμβολίου 251 ΓΝΑ

ΑΔΙΑΒΑΘΜΗΤΟ

ΠΡΟΣ: Κύριο Διοικητή 251 ΓΝΑ

ΚΟΙΝ: Γραμ. Επιστημονικού Συμβ.

ΚΟΙΝΟ

251 ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΕΡΟΠΟΡΙΑΣ
ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ

Τηλ. (εσωτ.): 4419

Φ.076/ΑΔ. 657

Σ. 226

Αθήνα, 22 Ιανουαρίου 2020

Συνημμένα: Φύλλα δεκατρία (13)

ΘΕΜΑ: Πρακτικό Σύσκεψης Επιστημονικού Συμβουλίου 251 ΓΝΑ

ΣΧΕΤ : α. Φ.400/11/408168/Σ.374/Αποφ.ΑΝΥΕΘΑ (ΦΕΚ 2855/Β/5-7-2019)
β. Φ.076/ΑΔ.235/Σ.60/10.01.20/251 ΓΝΑ/Γρ.Επιστ.Συμβ.

1. Την Πέμπτη 16 Ιανουαρίου 2020 και ώρα 12:00 συνεκλήθη Σύσκεψη θέματος σύμφωνα με ανωτέρω (β) σχετικό.

2. Η Επιτροπή αφού άκουσε τις σχετικές εισηγήσεις, μελέτησε τα θέματα που ετέθησαν και αποφάσισε όπως αναλυτικά περιγράφεται στο συνημμένο Πρακτικό Σύσκεψης του παρόντος.

3. Ακολούθως τα Μέλη εξουσιοδότησαν τον Πρόεδρο για την υπογραφή του Πρακτικού και την εισήγηση προς το Δκτή του Νοσοκομείου.



Ακριβές Αντίγραφο

Ταχχος (ΥΙ) Παναγιώτης Κωστόπουλος
Υποδιοικητής Α' 251 ΓΝΑ

Μ.Υ. ΓΡΗΓ. με Α' Βαθμό Φωτεινή Κεραμιδά
Γραμ. Κεντρικής Γραμματείας 251 ΓΝΑ

in τον επισυνδεδεμένο Προσαρτημένο
ΔΥΠ/Κεντρικής Γραμματ., 251 ΓΝΑ
Μ.Υ. ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΚΑΛΛΩΦΗ

13. Αίτηση έγκρισης στην Επγό (ΥΝ) Κωνσταντίνα Πετράκη διεξαγωγής μελέτης με θέμα: «Μέτρηση δεικτών του οξειδωτικού stress σε συνθήκες που προσομοιάζουν συνθήκες πίεσεων».

Η παρούσα μελέτη θα πραγματοποιηθεί στα πλαίσια διπλωματικής εργασίας της ανωτέρω Αξκού, στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης στη Δημόσια Υγεία του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αναμένεται να οδηγήσει σε υποβολή νέων προτάσεων για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τη βελτίωση και ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού των ιπταμένων, δεδομένου ότι δεν έχει εκπονηθεί αντίστοιχη μελέτη θέματος.

Επισημαίνεται ότι οι μετρήσεις των συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού stress θα πραγματοποιηθούν σε εθελοντές υγιείς Ιπταμένους κατά τη δοκιμασία υποξίας στο θάλαμο χαμηλής πίεσης του Κέντρου Αεροπορικής Ιατρικής και δε θα βαρύνουν τα εργαστήρια του 251 ΓΝΑ.

Κανένα κόστος δεν θα πρακώσει για την Υπηρεσία καθώς υπάρχει συνεργασία με εξειδικευμένο εργαστήριο στη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress σε βιολογικά υγρά.

Αποφάσεις που λήφθηκαν:

Το Επιστημονικό Συμβούλιο ενέκρινε το αίτημα. Η Εισηγήτρια προσκόμισε την έγγραφη έγκριση του Διοικητή

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΓΙΑ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ
Επγόσ (ΥΝ) Κωνσταντίνα
Πετράκη

του Κ.Α.Ι. καθώς και το έντυπο έγγραφης συγκατάθεσης των εθελοντών Ιπταμένων.

2. Έγκριση Διοικητή Κ.Α.Ι

ΑΔΙΑΒΑΘΜΗΤΟ

ΠΡΟΣ : 251ΓΝΑ

ΚΟΙΝ. : Κ.Α.Ι./ΓΡ. ΠΡΣ.

ΕΞ. ΕΠΕΙΓΟΝ

ΚΕΝΤΡΟ ΑΕΡΟΠΟΡΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΓΡΑΦΕΙΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ
Τηλ. (εσωτ.) 4750
Φ.300/ΑΔ.20
Σ. 5
Αθήνα 15 Ιαν 20

ΘΕΜΑ : Πρωτόκολλο Ερευνητικής Εργασίας

ΣΧΕΤ : Φ.300/ΑΔ.213/Σ.48/10-1-20/251ΓΝΑ/ΔΝΤ

1. Σε συνέχεια ανωτέρω σχετικού, σας γνωρίζουμε ότι εγκρίνεται η διενέργεια ερευνητικού πρωτοκόλλου εργασίας της Επγαύ (ΥΝ) Πετράκη Κων/νας (61978) με θέμα «Μέτρηση Δεικτών Οξειδωτικού Stress σε συνθήκες που προσομοιάζουν συνθήκες πτήσεων».

2. Παρακαλούμε για τις ενέργειές σας.



Ακριβές Αντίγραφο
Η Γραμματέας Κ.Α.Ι.

Μ.Υ. Ευανθ. Παπαγεωργίου

Σμχος (ΥΙ) Κων/νος Τσιώνος
Διοικητής Κ.Α.Ι.

3. Έγκριση Διενέργειας Αιμοληψιών

ΠΡΟΣ : Κ.Α.Ι./Τμ.Παθολογικού

ΚΕΝΤΡΟ ΑΕΡΟΠΟΡΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΥΠΑΣΠΙΣΤΗΡΙΟ

ΚΟΙΝ : Κ.Α.Ι/ΤΜ. ΠΡΣ.

Τηλ. (εσωτ.): 4721
Αθήνα, 10 Μαρ 20

ΥΠΗΡΕΣΙΑΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΘΕΜΑ: Αιμοληψίες στα Πλαίσια Διενέργειας Ερευνητικής Εργασίας

1. Επιτρέπεται στην Επγό (ΥΝ) Κωνίνα Πετράκη, όπως διενεργεί αιμοληψίες στο Μικροβιολογικό Τμήμα του Κ.Α.Ι., στα πλαίσια διενέργειας ερευνητικής εργασίας της, η οποία έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή του 251ΓΝΑ και τη Δκση του Κ.Α.Ι.

2. Παρακαλείσθε όπως συνδράμετε στις υπόψη αιμοληψίες την ανωτέρω Αξκό, στα πλαίσια της εύρυθμης λειτουργίας του Τμήματός σας.

Σμχος (ΥΙ) Κωνίνας Τσιώνος
Δκτής Κ.Α.Ι.

ΠΑΡΕΛΗΦΘΗ: Τμ. Παθολογικό

Τμήμα Χειρουργικής Παιθολογίας - Ημερολόγιό

ΕΠΙΣΤ. ΤΜ. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΕΠΙΣΤ. ΤΜ. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΠΑΙΘΟΛΟΓΙΑΣ Κ.Α.Ι.
ΑΝΚΑ-ΣΥΝΕΣΤΑΣΕΙΣ

4. Έντυπο Έγγραφης Συγκατάθεσης και Ενημέρωσης
Εθελοντών

ΚΕΝΤΡΟ ΑΕΡΟΠΟΡΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (Κ.Α.Ι.)

Σε Συνεργασία με το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

**ΕΝΤΥΠΟ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ
ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΘΕΜΑ:**

**« ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS ΣΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΥ
ΠΡΟΣΟΜΟΙΑΖΟΥΝ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΤΗΣΕΩΝ»**

ΚΥΡΙΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ:.....

ΤΗΛΕΦΩΝΟ:.....

Παρακαλούμε διαβάστε προσεκτικά το έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης και ρωτήστε για όποια απορία σας δημιουργηθεί σχετικά με την εν λόγω μελέτη.

ΓΙΑ ΠΟΙΟ ΛΟΓΟ ΔΙΕΞΑΓΕΤΑΙ ΑΥΤΗ Η ΜΕΛΕΤΗ;

Βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του οξειδωτικού stress που σχετίζεται με τις πτήσεις και η απόκτηση μια λεπτομερούς εικόνας για τις αλλαγές που συμβαίνουν στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιπταμένων σε σχέση με τις πτήσεις. Μέχρι τώρα δεν έχουν αναφερθεί παρόμοιες μελέτες, όσον αφορά τη διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ιπτάμενου προσωπικού σε συνθήκες που προσομοιάζουν με συνθήκες πτήσεως, επομένως η συμμετοχή σας είναι σημαντική.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την παρούσα μελέτη θα πραγματοποιηθούν και θα συγκριθούν τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού stress σε δείγματα αίματος τα οποία θα συλλεχθούν από εσάς πριν και μετά την έκθεσή σας στη δοκιμασία υποξίας στο θάλαμο χαμηλής πίεσης που βρίσκεται στο Κέντρο Αεροπορικής Ιατρικής (Κ.Α.Ι.) της Π.Α.

Συγκεκριμένα, θα πραγματοποιηθούν 2 αιμοληψίες σε κάθε εθελοντή. Μία πριν την είσοδό σας στο θάλαμο και μία μετά την έξοδό σας από αυτόν. Η κάθε αιμοληψία θα γίνει με απόλυτα ασφαλή τρόπο και δεν αναμένονται ανεπιθύμητες ενέργειες, πέραν αυτών που δύναται να υπάρχουν σε κάθε αιμοληψία.

ΤΙ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ;

Τα δείγματα του αίματος θα σταλούν σε εξειδικευμένο εργαστήριο το οποίο έχει διαμορφωθεί βάση του εργαστηρίου φυσιολογίας και τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Βιοχημίας και Βιοτεχνολογίας και εξειδικεύεται στη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες.

Σημειώνεται ότι ενώ η εκτίμηση του οξειδωτικού στρες απαιτεί κοστοβόρες δοκιμασίες, δεν υπάρχει καμμία οικονομική επιβάρυνση σας.

ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΥΤΗ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ;

Αν λάβετε μέρος σε αυτή τη μελέτη, συμβάλετε ουσιαστικά στην έναρξη ενός νέου πεδίου έρευνας που αναμένεται να οδηγήσει σε πιθανές προτάσεις για περαιτέρω βελτίωση και ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού των ιπταμένων, έτσι ώστε να αντιπροπούν βέλτιστα το οξειδωτικό stress των πτήσεων.

Επιπλέον, στο τέλος των μετρήσεων μπορείτε εάν το επιθυμείτε να λάβετε εγγράφως και τα σχετικά αποτελέσματα καθώς και την αξιολόγησή τους από την κύρια ερευνήτρια.

ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ

Η συμμετοχή σας στη μέτρηση είναι απολύτως εθελοντική και μπορείτε να αρνηθείτε ή να διακόψετε τη συμμετοχή σας σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

ΣΕ ΠΟΙΟΝ ΜΠΟΡΕΙΤΕ ΝΑ ΜΙΛΗΣΕΤΕ ΕΑΝ ΕΧΕΤΕ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΕΡΩΤΗΣΗ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ;

Για ερωτήσεις σχετικά με τη μελέτη, την αποθήκευση ή την χρήση των δειγμάτων σας, επικοινωνήστε με την κύρια ερευνήτρια :

Εργος (ΥΝ) Κωνσταντίνα Πετράκη
Κλινική Διαιτολόγος – Διατροφολόγος Msc
6972287572

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ

Με την παρούσα δήλωση παρέχω ρητά, κατηγορηματικά και χωρίς καμία επιφύλαξη τη συγκατάθεσή μου για συμμετοχή μου στην εν λόγω έρευνα και για την επεξεργασία από το Κέντρο Αεροπορικής Ιατρικής (Κ.Α.Ι), των προσωπικών μου δεδομένων που θα συλλεγούν στο πλαίσιο διενέργειας της μελέτης, καθώς και των αποτελεσμάτων – δεδομένων που θα προκύψουν από την εν λόγω διαδικασία , **αποκλειστικά και μόνο για σκοπούς έρευνας και στατιστικής.**

Νομική βάση της ανωτέρω επεξεργασίας θα είναι το άρθρο 6 παράγραφος 1 (α) του Γενικού Κανονισμού Προστασίας Δεδομένων (ΕΕ) 2016/679 (ΓΚΠΔ), σε συνδυασμό με το άρθρο 9 παράγραφος 2 (α) του ΓΚΠΔ για τις ειδικές κατηγορίες δεδομένων.

Με την παρούσα δηλώνω επίσης ότι ενημερώθηκα πως επί των ανωτέρω δεδομένων , που τυχόν θα διατηρήσει το Κ.Α.Ι. για σκοπούς έρευνας και στατιστικής, έχω δικαίωμα πρόσβασης, διόρθωσης, διαγραφής, περιορισμού, επεξεργασίας, εναντίωσης, καθώς και το δικαίωμα ανάκλησης με ρητό και κατηγορηματικό τρόπο της παρούσας συγκατάθεσης. Η ανάκληση της συγκατάθεσης δεν θίγει τη νομιμότητα της επεξεργασίας που βασίστηκε στη συγκατάθεση πρό της ανάκλησής της.

Τόπος.....,

Ημερομηνία

(Όνοματεπώνυμο, Πατρώνυμο, ΑΔΤ, κινητό τηλέφωνο)

-Ο/Η- ΔΗΛΩΝ-ΟΥΣΑ
(Υπογραφή)

Προσωπικά Δεδομένα - Ερωτηματολόγιο

Ηλικία

Παρόν Σωματικό Βάρος

Σωματικό Ύψος

Φαρμακευτική Αγωγή

Κάπνισμα

Κυκλώστε μία από τις παρακάτω επιλογές

Πόσες φορές την εβδομάδα κάνετε κάποια οργανωμένη Φυσική Δραστηριότητα (άσκηση);

0	1-2	3-4	≥ 5
---	-----	-----	----------

Πόσους καφέδες καταναλώνετε ανά ημέρα;

0	1-2	3-4	≥ 5
---	-----	-----	----------

Πόσες μερίδες φρούτων και λαχανικών (μαζί) καταναλώνετε ανά ημέρα;

0	1-2	3-4	≥ 5
---	-----	-----	----------

Με άριστα το 10 σε μια κλίμακα από 0-10 τί βαθμολογία θα δίνετε στον ύπνο σας το τελευταίο 24ωρο ;