

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία

Οι δραστικές ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού, είναι γνωστές ως προοξειδωτικά και παίζουν διττό ρόλο, άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές. Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου ασκούνται στα βιομόρια, στις πρωτεΐνες, στα νουκλεϊνικά οξέα, στα λιπίδια και μπορεί να προκαλέσουν κυτταρική/ιστική βλάβη, από την οποία ο οργανισμός προστατεύεται με μια σειρά αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παράγονται ενδογενώς ή προέρχονται από εξωτερικές πηγές και περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μέταλλα όπως το Se, το Mn, ο Cu και ο Zn, βιταμίνες όπως οι A, C και E, καθώς και άλλες ουσίες όπως η γλουταθειόνη. Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό stress ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό stress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν από τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershan et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικές αναθεϊσες μορφές οξυγόνου.¹ Η παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου στα βιολογικά υλικά περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 50 χρόνια περίπου.²

Λίγο αργότερα, ο Denham Harman διατύπωσε την υπόθεση ότι οι ρίζες οξυγόνου μπορεί να παράγονται *in vivo* ως παραπροϊόντα των βιολογικών αντιδράσεων. Το 1956, περιέγραψε τις δραστικές ρίζες ως το κακό περιεχόμενο του κουτιού της Πανδώρας, το υπεύθυνο για την κυτταρική βλάβη, τη μεταλλαξιογένεση, τον καρκίνο, τις εκφυλιστικές διεργασίες βιολογικής γήρανσης.^{3,4}

Η ανακάλυψη του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου από τους McCord και Fridovich το 1969 αποτέλεσε την απαρχή μιας νέας εποχής για τη διερεύνηση των δράσεων των δραστικών ριζών οξυγόνου στους ζώντες οργανισμούς.⁵ Ακολούθησαν εκτεταμένες έρευνες για τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τις δραστικές ρίζες στο DNA, στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες, καθώς και σε άλλους κυτταρικούς στόχους.⁶

Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου ξεκίνησε όταν εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν ευεργετικές βιολογικές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου. Οι Mittal και Murard ανέφεραν ότι το ανιόν του υπεροξειδίου (O₂⁻), διά της ρίζας υδροξυλίου που παράγεται από αυτό, διεγείρει την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και το σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου cGMP.⁷

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(1):23–35
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(1):23–35

Ε. Γιαννακοπούλου

Τμήμα Βασικών Ιατρικών Μαθημάτων,
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και
Πρόνοιας, ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα

Oxidative stress – antioxidant
mechanisms: Clinical implications

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Αντιοξειδωτικές ουσίες
Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
Οξειδωτικό stress
Προοξειδωτικά

Υποβλήθηκε 13.11.2007
Εγκρίθηκε 21.12.2007

Παρόμοιες δράσεις αναφέρθηκαν για το υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έγινε γνωστός ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στη χάλαση των λείων μυϊκών ινών και στην αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.^{8,9} Οι Roth και Dröge ανέφεραν ότι στα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα το ανιόν υπεροξειδίου ή οι χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνουν την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα των Τ κυττάρων, ιντερλευκίνη-2.¹⁰ Οι Storz et al ανέφεραν την επαγωγή γονιδίων στα βακτήρια από το υπεροξειδίου του υδρογόνου και οι Schreck και Baeuerle ανέφεραν την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα NFκΒ από το υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα των θηλαστικών.^{11,12}

Στις αρχές του 21ου αιώνα έχει γίνει πλέον σαφές όχι μόνον ότι οι ζώντες οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στα αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αλλά και ότι έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών.

Είναι πλέον γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές.¹³ Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από τις μιτοχονδριακές και τις μικροσωμιακές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, η φαγοκυττάρωση και τα ενδογενή ενζυμικά συστήματα.¹⁴

Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση.¹⁵⁻¹⁷

Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν βιολογική βλάβη, είναι γνωστές ως οξειδωτικό stress και stress αζώτου, αντίστοιχα.¹⁸⁻²⁰ Το οξειδωτικό stress συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα, όταν από τη μια πλευρά υπάρχει υπερπαραγωγή δραστικών ριζών ενώ από την άλλη πλευρά ανεπάρκεια των ενζυμικών και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Με άλλα λόγια, ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.²¹

Η περίσσεια των δραστικών ριζών προκαλεί βλάβες στα

κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τους. Κατά συνέπεια, το οξειδωτικό stress ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης. Η λεπτή ισορροπία ανάμεσα στις ευεργετικές και τις βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών έχει ιδιαίτερη σημασία για τους ζώντες οργανισμούς και διαφυλάσσεται με μηχανισμούς γνωστούς ως «οξειδοαναγωγική ρύθμιση» (redox regulation).

Η οξειδοαναγωγική ρύθμιση διατηρεί την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και προστατεύει τους ζώντες οργανισμούς από το οξειδωτικό stress.²² Σύμφωνα μάλιστα με ένα νέο ορισμό, που έχει πρόσφατα προταθεί, το οξειδωτικό stress μπορεί να οριστεί ως η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης.²³

2. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως ένα άτομο ή μόριο με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.²⁴ Η έννοια του ασύζευκτου ηλεκτρονίου υποδηλώνει ότι ένα ηλεκτρόνιο κινείται μόνο του σε μία τροχιά, γύρω από τον πυρήνα του ατόμου, σε αντίθεση με το σύνθετο φαινόμενο της ύπαρξης δύο ηλεκτρονίων, σε κάθε τροχιά, τα οποία παρουσιάζουν αντίθετη στροφορμή ή spin (μαγνητική ροπή που δημιουργείται από την περιστροφή του ηλεκτρονίου γύρω από τον άξονά του).

Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ρίζες οξυγόνου ιδιαίτερη δραστικότητα και μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να λάβουν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως οξειδωτικές ή αναγωγικές ουσίες.

Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς.²⁵ Υπάρχουν όμως και κάποιες ενώσεις του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου και το μοριακό οξυγόνο, οι οποίες αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες συμπεριφέρονται όπως αυτές, επειδή χημικά είναι πολύ δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

2.1. Μοριακό οξυγόνο

Στο μοριακό οξυγόνο παρατηρείται μια μοναδική ηλεκτρονική διαμόρφωση, η οποία το καθιστά ελεύθερη ρίζα. Συγκεκριμένα, ο ατομικός αριθμός (Z) του οξυγόνου είναι οκτώ, γεγονός που σημαίνει ότι διαθέτει οκτώ πρωτόνια και οκτώ ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια είναι κατανομημένα, γύρω από τον πυρήνα, σε δύο στιβάδες, τη στιβάδα K και

τη στιβάδα L. Η στιβάδα K περιέχει δύο ηλεκτρόνια, ενώ η στιβάδα L περιέχει έξι ηλεκτρόνια.

Τα έξι ηλεκτρόνια της στιβάδας L του ατόμου του οξυγόνου διατάσσονται ως εξής: τα δύο σε τροχιά που χαρακτηρίζεται ως 2s, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα διατάσσονται σε τρεις τροχιές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως 2p. Τα δύο από τα τέσσερα αυτά ηλεκτρόνια παρουσιάζουν αντίθετη στροφορμή και καταλαμβάνουν το πρώτο τροχιακό, ενώ τα υπόλοιπα δύο παρουσιάζουν την ίδια στροφορμή και καταλαμβάνουν από ένα τροχιακό το καθένα. Επειδή τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια του μοριακού οξυγόνου έχουν την ίδια στροφορμή, το μοριακό οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα μόνο ηλεκτρόνιο κάθε φορά, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η δραστηριότητά του. Εάν όμως ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια διεγερθεί και αλλάξει στροφορμή, προκύπτει το μονήρες οξυγόνο, το οποίο είναι ιδιαίτερα δραστικό, αφού τα δύο ηλεκτρόνια με αντίθετη στροφορμή μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα με άλλα ζεύγη ηλεκτρονίων.

2.2. Ανιόν του υπεροξειδίου

Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο δημιουργεί την ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου (O_2^-).²⁵ *In vivo*, το O_2^- παράγεται τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να αποτελούν την κύρια κυτταρική πηγή O_2^- .

Στις ενζυμικές πηγές συμπεριλαμβάνονται οι NADPH οξειδάσες που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των πολυμορφοπυρήνων, των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και οι εξαρτώμενες από το κυτόχρωμα P₄₅₀ οξυγενάσες. Μια άλλη ενζυμική πηγή O_2^- και H₂O₂ (και κατά συνέπεια αποτελεί πηγή και του ·OH) αποτελεί η πρωτεολυτική μετατροπή της αναγωγάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης.

Η μη ενζυμική παραγωγή του O_2^- γίνεται όταν μονήρες ηλεκτρόνιο μεταφέρεται άμεσα στο οξυγόνο είτε από αναχθέντα συνένζυμα είτε από προσθετικές ομάδες (π.χ. ομάδες σιδήρου, θείου) ή από ξενοβιοτικά, τα οποία προηγουμένως έχουν αναχθεί από ορισμένα ένζυμα. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων διαθέτει πολλά οξειδοαναγωγικά κέντρα, από τα οποία μπορούν να διαφύγουν ηλεκτρόνια προς το οξυγόνο συνιστώντας έτσι την κύρια πηγή O_2^- για τους περισσότερους ιστούς.

Ο ρυθμός παραγωγής O_2^- ρυθμίζεται από τη δράση των μαζών και έτσι αυξάνεται όταν μειώνεται η ροή των ηλεκτρονίων (και κατά συνέπεια αυξάνονται οι διαθέσιμοι δότες ηλεκτρονίων) αλλά και όταν αυξάνεται η συγκέντρωση οξυγόνου.

Αντικείμενο έρευνας αποτελούν τα βιομόρια των μιτοχονδρίων, τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή O_2^- , οι μηχανισμοί παραγωγής O_2^- στα μιτοχόνδρια και η ρύθμιση αυτής της παραγωγής. Ως πιθανές μιτοχονδριακές πηγές του O_2^- έχουν προταθεί συστατικά των αναπνευστικών συμπλόκων αλλά και μεμονωμένα ένζυμα. Το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στη θεμέλια ουσία αλλά και στις δύο πλευρές της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων.

Το ανιόν του υπεροξειδίου, το οποίο παράγεται είτε από τις μεταβολικές διεργασίες είτε από την ενεργοποίηση του οξυγόνου διά της φυσικής ακτινοβολίας, θεωρείται η κύρια ελεύθερη ρίζα οξυγόνου και μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με άλλα μόρια και να οδηγήσει στη γένεση δευτερογενών δραστικών ριζών οξυγόνου είτε άμεσα, είτε κυρίως μέσω διεργασιών που καταλύονται από μέταλλα και ένζυμα.²⁶

2.3. Ρίζα υδροξυλίου (·OH)

Η ρίζα υδροξυλίου (·OH) είναι ιδιαίτερα δραστική, με χρόνο ημιζωής *in vivo* περίπου 10⁻⁷ s.²⁷ Συνεπώς, όταν παράγεται *in vivo*, αντιδρά πλησίον της θέσης σχηματισμού της. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου συνδέεται στενά με τα οξειδοαναγωγικά ζεύγη σιδήρου και χαλκού. Η ρύθμιση του σιδήρου έχει ως στόχο την απουσία ελεύθερου σιδήρου στον ενδοκυττάριο χώρο. Παρόλα αυτά, υπό συνθήκες stress, η περίσσεια O_2^- ελευθερώνει σίδηρο από τις πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο.²⁸ Συνεπώς, υπό συνθήκες stress το O_2^- δρα ως οξειδωτική ουσία για τα μεταλλοένζυμα και διευκολύνει την παραγωγή ·OH από το H₂O₂, παρέχοντας ιόντα σιδήρου για την αντίδραση Fenton.^{26,29} Το O_2^- συμμετέχει στην αντίδραση Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$), η οποία συνδυάζει την αντίδραση Fenton με την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου από το O_2^- προς δισθενή σίδηρο και μοριακό οξυγόνο ($Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$).³⁰

Ο απελευθερούμενος σίδηρος μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ αντίδραση μεταξύ του H₂O₂ και των αλάτων σιδήρου), η οποία οδηγεί στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ριζών υδροξυλίου, ικανών να οξειδώσουν μεγάλο αριθμό οργανικών υποστρωμάτων.

Πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι η αντίδραση Fenton είναι γνωστό ότι συμβαίνει *in vitro*. Η σπουδαιότητά της υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι σαφής, ιδιαίτερα εάν ληφθεί υπόψη η αμελητέα ποσότητα ελευθέρων ιόντων μετάλλων, τα οποία μπορούν να δράσουν καταλυτικά λόγω της επιτυχούς δέσμευσής τους από τις μεταλλοπρωτεΐνες.³¹

2.4. Άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου

Άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου που μπορούν να παραχθούν στους ζώντες οργανισμούς είναι οι ρίζες υπεροξειδίου $\text{ROO}\cdot$. Η απλούστερη ρίζα υπεροξειδίου είναι η $\text{HOO}\cdot$, η οποία είναι η πρωτονιωμένη μορφή του O_2^- (συζευγμένο οξύ $\text{pKa} \sim 4,8$) και είναι γνωστή ως ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Με αυτή την pKa μόνο 0,3% του υπεροξειδίου που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου βρίσκεται στην πρωτονιωμένη του μορφή.³² Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου είναι υπεύθυνη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.³³

Τα υπεροξεισώματα υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν H_2O_2 αλλά όχι O_2^- .³⁴ Τα υπεροξεισώματα είναι κύρια οργανίδια, τα οποία καταναλώνουν οξυγόνο στο κύτταρο και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες που χρησιμοποιούν οξυγόνο. Η κατανάλωση οξυγόνου στα υπεροξεισώματα οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 , το οποίο, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για την οξειδωση μεγάλου αριθμού μορίων.

3. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) αποτελεί ένα μικρό μόριο, το οποίο περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Συντίθεται κατά την οξειδωση της L-αργινίνης προς κιτρουλίνη, με μια διεργασία που καταλύεται από τις συνθετάσες του NO (NOSs).^{35,36}

Το NO αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών, όπως η νευρομεταβίβαση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η χάλαση των λείων μυϊκών ινών, η ανοσία.³⁷ Μπορεί να μετατραπεί σε πολλές άλλες δραστικές ρίζες αζώτου, όπως NO^+ , (NO^-) και υπεροξεινιτρώδες (ONOO^-). Το ONOO^- παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το ανιόν υπεροξειδίου $\text{NO}\cdot + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$.

4. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΣΤΑ ΒΙΟΜΟΡΙΑ

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνητικά βλαπτικές για τα συστατικά του κυττάρου. Ενοχοποιούνται για εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων των μεμβρανών, του DNA, των πρωτεϊνών, καθώς και για υπεροξειδωση των λιποπρωτεϊνών.^{13,21} Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με όλα τα συστατικά του μορίου του DNA, προκαλεί βλάβες στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, αλλά και στο σκελετό δεοξυριβόζης. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού από αυτή την οξειδωτική βλάβη αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και τη γήρανση.

Ιδιαίτερα ευάλωτα στην επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου είναι τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία στην οξειδωση. Μόλις σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να μετατραπούν μέσω διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξειδία (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΐδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής αποτελεί η μαλονδιαλδεΐδη (MDA).³⁸⁻⁴²

Εκτός από τη μαλονδιαλδεΐδη, το άλλο κύριο προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων είναι η αλδεΐδη 4-υδροξυ-2-νονενάλη (HNE). Η MDA έχει μεταλλαξιογόνο δράση στα κύτταρα των βακτηρίων και των θηλαστικών, ενώ είναι καρκινογόνος ουσία για τους επίμυες. Η HNE έχει ήπια μεταλλαξιογόνο δράση, αλλά φαίνεται να είναι το κύριο τοξικό προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην οξειδωση των πρωτεϊνών από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου έχουν γίνει γνωστοί από μελέτες στις οποίες αμινοξέα, απλά πεπτίδια και πρωτεΐνες εκτέθηκαν σε ιονίζουσα ακτινοβολία υπό συνθήκες που οδήγησαν στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ή μείγματος ριζών υδροξυλίου/ανιόντος υπεροξειδίου.⁴³ Οι πλάγιες αλυσίδες των αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στην οξειδωση από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου/αζώτου.⁴³ Η οξειδωση των υπολειμμάτων κυστεΐνης μπορεί να οδηγήσει σε αναστρέψιμο σχηματισμό μεικτών δισουλφιδίων ανάμεσα στις ομάδεςθειόλης των πρωτεϊνών ($-\text{SH}$) και τις μικρού μοριακού βάρουςθειόλες, ιδιαίτερα τη γλουταθειόνη.

Η συγκέντρωση των ομάδων καρβονυλίων, που παράγονται με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, αποτελούν καλό μέτρο της προκαλούμενης από τις ελεύθερες ρίζες οξειδωσής των πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα ευαίσθητες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση των ομάδων καρβονυλίων των πρωτεϊνών.^{44,45}

5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξειδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από

τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιότητας.

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

5.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Καταλύουν τη διάσπαση των ROS στο ενδοκυττάριο περιβάλλον.

5.1.1. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η οποία καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($2O_2^- + 2H^+ = O_2 + H_2O_2$), αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Αν και το ένζυμο αυτό απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1939, μόλις το 1969 οι McCord και Fridovich απέδειξαν την αντιοξειδωτική δράση της SOD.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπαραγόντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZn-SOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Η SOD καταστρέφει τις O_2^- με απίστευτα υψηλές ταχύτητες αντίδρασης με τη διαδοχική οξειδωση και την αναγωγή του μετάλλου του ενεργού κέντρου.

Η CuZnSOD είναι ένα ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 32 kDa, το οποίο αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Φέρει στο ενεργό κέντρο ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου και η ενζυμική της δραστηριότητα είναι σχετικά ανεξάρτητη από το pH στο εύρος 5–9,5. Εκτός από το κυτταρόπλασμα απαντά και στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων.

Η MnSOD είναι ένα ομοτετραμερές, με μοριακό βάρος 95 kDa, το οποίο περιέχει από ένα άτομο μαγγανίου στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Απαντά στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων, όπου και απομακρύνει τις ρίζες O_2^- που σχηματίζονται τόσο στη θεμέλια ουσία όσο και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Η εξωκυττάρια SOD είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία φέρει χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο και έχει υψηλή συγγένεια για ορισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες, όπως η ηπαρίνη και η θειική ηπαράνη. Η ρύθμισή

της στους ιστούς των θηλαστικών φαίνεται να διενεργείται από τις κυτταροκίνες και όχι από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου.

Ένα νέο συνένζυμο SOD, το οποίο περιέχει νικέλιο στο ενεργό κέντρο (Ni-SOD), απομονώθηκε πρόσφατα στο *Streptomyces* και στα κυανοβακτήρια. Η Ni-SOD είναι μια μικρή πρωτεΐνη, που αποτελείται από 117 αμινοξέα και δεν εμφανίζει ομολογία με τις άλλες SOD.

5.1.2. Καταλάση. Η καταλάση απαντά στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξειδώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Δεν ανευρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο σε δύο στάδια ($2H_2O_2 = \dots = O_2 + 2H_2O$). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε min.

5.1.3. Ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης. Καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια πηγή της NADPH.

5.1.4. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH.

5.1.5. Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs). Η δραστηριότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αναγνωρίστηκε από τον Mills το 1957 και αποδόθηκε το 1973 σε ένα σεληνοένζυμο από τους Flohe et al και Rotruck et al. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης: η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο GPxs, ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (glutathione S-transferase GST). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο, καθώς και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης. Σήμερα είναι πλέον γνωστές τέσσερις διαφορετικές GPxs (GPxs1-4) στα θηλαστικά, φέρουν όλες στην ενεργό θέση κυστεΐνη συνδεδεμένη

με σελήνιο και συνεπώς η δράση τους εξαρτάται από την επάρκεια της τροφής σε σελήνιο.

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη ($2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$).⁴⁶ Αν και η αναγωγή του H_2O_2 γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων.

5.1.6. Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης. Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH.⁴⁷⁻⁴⁹

5.1.7. Συνένζυμο Q. Αποτελεί πηγή O_2^- όταν είναι μερικώς αναχθέν υπό τη μορφή της ημικινόνης, ενώ έχει αντιοξειδωτική δράση όταν έχει αναχθεί πλήρως.

5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση

Όταν μια δραστική ρίζα αντιδρά με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλους στόχους προς παραγωγή ακόμη περισσότερων ριζών. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία συνεχίζεται έως ότου δύο ρίζες ενωθούν προς σταθερό προϊόν ή εξουδετερωθούν από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Τα λιποδιαλυτά και τα υδατοδιαλυτά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση είναι μικρά μόρια, π.χ. γλουταθειόνη, βιταμίνη E, που μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Η αντίδραση οδηγεί σε οξειδωση του αντιοξειδωτικού, το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Εξορισμού, η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια.

5.2.1. Γλουταθειόνη. Η ιστορία της γλουταθειόνης αρχίζει το 1888, όταν ο de Ray Pailhand ανακάλυψε την ουσία "hydrogenant de souffre", η οποία είχε την ιδιότητα να ανάγει το στοιχειακό θείο, και την οποία ονόμασε "philothion".⁵⁰ Αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από το χημικό Hopkins και ονομάστηκε γλουταθειόνη.⁵¹ Τέλος, η ανακάλυψη της γλουταθειονυλοσπερμιδίνης από τους Tabor και

Tabor το 1975 και της τρυπανοθειόνης από τους Fairlamb et al το 1985 αποτέλεσε την αρχή των μελετών για τις αντιοξειδωτικές δράσεις της γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτιδίο με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.⁵² Απαντά είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξειδωσης της ενεργού θειόλης της.⁴⁶ Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού.^{53,54}

Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε stress, το μεγαλύτερο μέρος (99%) αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε αναχθείσα μορφή. Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα αμινοξέα L-γλουταμικό, L-κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο διαδοχικά βήματα, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη (Gsh1) και συνθετάση της γλουταθειόνης (Gsh1).

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και απαντά σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα (0,5–11 mM), στον πυρήνα (3–15 mM) και στα μιτοχόνδρια (5–11 mM), όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία.⁵⁵ Στον πυρήνα, η γλουταθειόνη διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA.

Οι κύριες προστατευτικές δράσεις της γλουταθειόνης στο οξειδωτικό stress είναι οι εξής:⁵²

- Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεΐδης, γλουξαλάση I⁵⁵
- Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων διά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης
- Δεσμεύει άμεσα τη ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης
- Έχει την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό μορφή τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες, βιταμίνη C και βιταμίνη E, άμεσα ή έμμεσα. Η ικανότητα αυτή της γλουταθειόνης καθορίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ζεύγους GSH/2GSSG.⁵⁶

5.2.2. Θειοαναγωγάσες TRX. Οι θειοαναγωγάσες είναι μικρές, πλειοτρόπες σουλφυδρυλικές πρωτεΐνες με δραστηριότητα οξειδοαναγωγάσης. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί τρία γονίδια θειοροδοξίνης (TRX1, TRX2 και sr TRX, η οποία παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα σπερματοζώαρια). Οι TRX όλων των οργανισμών διαθέτουν ένα εξελικτικά συντηρητικό ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Cys-Gly-Pro-Cys. Ειδικοί πρωτεϊνικοί δισουλφιδικοί στόχοι αναγωγής από την ομάδα των TRX είναι πρωτεΐνες όπως η ριβονουκλεοτιδική αναγωγάση, η δισουλφιδική ισομεράση και αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των p53, NF-κB και AP-1. Επιπλέον, οι TRX αποτελούν δότες ηλεκτρονίων για πολλές υπεροξειδοαναγωγάσες, ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγωγή των υπεροξειδίων. Επιπλέον, αυτή η μικρή πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να ανάγει μερικές δραστικές ρίζες οξυγόνου καθώς και να αναδιπλώσει οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίσης, επάγει αυτοκρινείς δράσεις ανάλογες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών.

5.2.3. Βιταμίνη C. Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου. Επίσης, συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη E και το σελήνιο. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι ιδιαίτερα έκδηλη στους πνεύμονες και στο φακό του ματιού.⁵⁷⁻⁵⁹

5.2.4. Βιταμίνη E. Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη E λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση.⁶⁰⁻⁶²

5.2.5. Καροτενοειδή. Πρόκειται για χρωστικές, που απαντούν στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Ευθύνονται για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο.⁶³

5.2.6. Μέταλλα, όπως το σελήνιο, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος.

5.2.7. Μεταλλοθειονίνες. Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως

του Cu^{2+} και του Zn^{2+} , στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο Cu.

6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress έχει καταστεί πλέον αποδεκτός στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης,^{55,64} της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη,⁶⁴ της αρτηριακής υπέρτασης,^{64,65} της νόσου Alzheimer,^{55,66,67} της νόσου του Parkinson,^{55,66} της παγκρεατίτιδας, του συνδρόμου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης,⁶⁶ της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος,⁶⁸ της προεκλαμψίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS).⁵⁵

Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, σχετίζονται με το οξειδωτικό stress.⁶⁴ Η φλεγμονή,⁶⁹ ορισμένες μορφές καρκίνου⁷⁰ και η διεργασία της γήρανσης⁷¹ έχουν αποδοθεί εν μέρει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Τέλος, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων αποδίδονται στο οξειδωτικό stress.^{18,55,72,73}

Επίσης, η απόκριση στο stress, η οποία εκφράζεται με την επαγωγή των πρωτεϊνών του θερμικού shock (heat shock proteins, HSP), επάγεται ιδιαίτερα σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία, τραύμα ή σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας.^{74,75} Ανωμαλίες στην έκφραση των HSP έχουν παρατηρηθεί σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς.^{76,77}

Δεν είναι σαφές εάν αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ειδικές ενδογενείς προσπάθειες κυτταρικής και ιστικής προστασίας ή μη ειδική απόκριση στο stress. Εντούτοις, δείχνουν ότι η κυτταρική απόκριση στο stress εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της.

Η συσχέτιση μιας νοσολογικής οντότητας με το οξειδωτικό stress προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξειδωσής λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξειδωσής αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού stress στη νόσο.⁷⁸

Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση

των αντιοξειδωτικών εφεδρειών.⁷⁸ Επιπλέον, το οξειδωτικό stress πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη.⁷⁸ Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές οντότητες.

6.1. Οξειδωτικό stress και καρκινογένεση

Σήμερα είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό stress συμμετέχει στην έναρξη του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Ο ακριβής μηχανισμός όμως με τον οποίο το οξειδωτικό stress συνεισφέρει στη διεργασία της καρκινογένεσης παραμένει άγνωστος. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη και στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη γονιδιακή έκφραση. Επιγενετικές δράσεις στην έκφραση γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν σε διέγερση του πολλαπλασιασμού. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επιδρούν στις οδούς μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων αναγκαίων για τον πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα με τον άλλο μηχανισμό, οι δραστικές ρίζες επάγουν γενετικές αλλαγές όπως μεταλλάξεις και χρωμοσωμικούς ανασυνδυασμούς που παίζουν ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης.³⁴

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες όχι μόνο δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, αλλά και συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η τροποποίηση των οδών μεταγωγής σήματος από τις αντιοξειδωτικές ουσίες θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόληψη του καρκίνου με τους ακόλουθους μηχανισμούς: (α) διατήρηση της φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, (β) αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης, (γ) αναστολή της διήθησης και της αγγειογένεσης, (δ) καταστολή της φλεγμονής.⁷⁹ Ο κυτταρικός κύκλος χαρακτηρίζεται από διακυμάνσεις στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου, οι οποίες ρυθμίζονται από τις ενδοκυτταρικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης. Κατά κανόνα, ένα περισσότερο αναγωγικό περιβάλλον διεγείρει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ μετατόπιση προς ήπια οξειδωτικό περιβάλλον αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης. Μετατόπιση προς ένα περισσότερο οξειδωτικό περιβάλλον οδηγεί στην απόπτωση και τη νέκρωση. Συνεπώς, το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον αποτελεί τον κύριο προσδιοριστή για την πυροδότηση της απόπτωσης.

Το αντιοξειδωτικό ένζυμο Mn-SOD έχει θεωρηθεί ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, επειδή διέγερση της έκφρασης της

Mn-SOD φαίνεται να καταστέλλει τον κακοήθη φαινότυπο σε πειραματικά πρότυπα και χαμηλά επίπεδα αυτής έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, όμως, υπερέκφραση της Mn-SOD έχει αναφερθεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και σε δείγματα αίματος πασχόντων από λευχαιμία. Έτσι, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της Mn-SOD παρατηρείται στα πλαίσια της κυτταρικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στο οξειδωτικό stress. Τα αυξημένα επίπεδα της Mn-SOD μειώνουν τη συγκέντρωση ανιόντος του υπεροξειδίου στα κύτταρα και έτσι μειώνουν την επίδραση των δραστικών ριζών στην κυτταρική αύξηση.⁷⁹

Πειραματικές και κλινικές ενδείξεις συσχετίζουν τη θειορεδοξίνη με τον καρκίνο: (α) αυξημένα επίπεδα TRX έχουν αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, των καρκινωμάτων του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, (β) πολλά καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν TRX, (γ) υπερέκφραση της TRX φαίνεται να προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την επαγόμενη από το οξειδωτικό stress απόπτωση, (δ) αυξημένα επίπεδα θειορεδοξίνης σε κακοήθεις όγκους προκαλούν αντίσταση στη χημειοθεραπεία.⁷⁹

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες πρέπει να αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία του καρκίνου, γιατί μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Αφού η απόπτωση προκαλείται από αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών, μειωμένα επίπεδα δραστικών ριζών λόγω της χορήγησης περίσσειας αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν βλάβες στο γενετικό υλικό και έτσι να προάγει αντί να διακόψει τη διεργασία της καρκινογένεσης. Ακόμη, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και οι προοξειδωτικές δράσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους και από το περιβάλλον στο οποίο δρουν. Οι επιδημιολογικές μελέτες και τα *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι η καλύτερη προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου είναι η μείωση των ενδογενών και εξωγενών πηγών οξειδωτικού stress και όχι η αύξηση των αντιοξειδωτικών ουσιών.³⁴

6.2. Οξειδωτικό stress και αθηροσκλήρυνση

Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί παράδειγμα νοσολογικής διεργασίας, στην οποία υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις για τη συμμετοχή του οξειδωτικού stress. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επιδρούν στην αγγειακή λειτουργία με μια σειρά από παθογενετικούς μηχανισμούς. Πρώτον, οι ρίζες υδροξυλίου έχουν άμεση βλαπτική δράση στις κυτταρικές μεμβράνες και στους πυρήνες των κυττάρων. Δεύτερον,

οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επιδρούν στη διεργασία της αθηρογένεσης αλληλεπιδρώντας με ενδογενείς αγγειοδραστικούς μεσολαβητές, που παράγονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τρίτον, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγώντας στο σχηματισμό οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών LDL, οι οποίες αποτελούν μεσολαβητές-κλειδιά στη διεργασία της αθηροσκλήρυνσης.^{79,80} Η οξειδωμένη LDL προκαλεί άθροιση εστέρων χοληστερόλης στα μακροφάγα. Επίσης, έχει ενοχοποιηθεί και σε άλλους μηχανισμούς, που πιθανόν εμπλέκονται στη διεργασία της αθηροσκλήρυνσης, όπως κυτταροτοξικές ή χημειοτακτικές δράσεις στα μονοκύτταρα και αναστολή της κινητικότητας των μακροφάγων, ενώ θεωρείται υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης, η οποία οδηγεί σε προσκόλληση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκυττάρων, μακροφάγων, T-λεμφοκυττάρων) στο ενδοθήλιο. Αυτή η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερλευκινών, ιντερφερόνης και χημειοτακτικών παραγόντων. Το ενδοθήλιο γίνεται διαπερατό στα λιπίδια και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα τα μακροφάγα να φαγοκυτταρώνουν την οξειδωμένη LDL και να μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα. Οι οξειδωτικές βλάβες του αγγειακού τοιχώματος οδηγούν σε αθηροσκλήρυνση, όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών του αγγειακού τοιχώματος.

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον προστατευτικό ρόλο της βιταμίνης C κατά της οξείδωσης της LDL. Σύμφωνα με τον ένα μηχανισμό, το ασκορβικό οξύ δεσμεύει τις δραστικές ρίζες οξυγόνου. Σύμφωνα με τον άλλο μηχανισμό, το δεϋδροασκορβικό οξύ (προϊόν οξείδωσης του ασκορβικού οξέος) τροποποιεί την LDL, έτσι ώστε την καθιστά ανθεκτική στην οξείδωση.³⁴ Παράλληλα, όμως, αναφέρονται και προοξειδωτικές δράσεις της βιταμίνης C. Η πρόσληψη αυξημένων επιπέδων βιταμίνης C αποτελεί αντικείμενο διχογνωμίων για πολλά έτη. Το όφελος μιας τέτοιας παρέμβασης δεν έχει τεκμηριωθεί.^{13,34}

6.3. Οξειδωτικό stress και υπέρταση

Το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθογένεια της υπέρτασης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου και μειωμένες αντιοξειδωτικές εφεδρείες.⁷⁹ Στις περισσότερες μελέτες, τα υπέρτασικά άτομα είχαν κάποιου βαθμού νεφρική δυσλειτουργία. Επίσης, οξειδωτικό stress έχει ανευρεθεί σε ασθενείς με νεφραγγειακή υπέρταση, κακοήγη υπέρταση και προεκλαμψία. Αντίθετα, αύξηση των δεικτών υπεροξειδωσης των λιπιδίων δεν έχει παρατηρηθεί σε άτομα με

ήπια υπέρταση που δεν έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή, ένδειξη που πιθανόν υποδηλώνει ότι το οξειδωτικό stress δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της ήπιας υπέρτασης.⁸¹

Τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως βιταμίνης E, γλουταθειόνης και SOD, καθώς και η αυξημένη ενεργοποίηση της αγγειακής NADPH οξειδάσης, φαίνεται να ευθύνονται για το οξειδωτικό stress που παρατηρείται στα υπέρτασικά άτομα. Η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης έχει προταθεί ως ο κύριος μεσολαβητής της ενεργοποίησης της αγγειακής NADPH οξειδάσης και της παραγωγής δραστικών ριζών στα υπέρτασικά άτομα. Μάλιστα, το θεραπευτικό αποτέλεσμα των αποκλειστών των AT₁ υποδοχέων και των ανασταλτών του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης έχει αποδοθεί εν μέρει στην αναστολή της NADPH οξειδάσης και στη μείωση της παραγωγής δραστικών ριζών.⁸¹

6.4. Οξειδωτικό stress και νευροεκφυλιστικές νόσοι

Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη, επειδή χρησιμοποιεί υψηλά επίπεδα οξυγόνου και χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να οξυγονωθούν, καθώς και οξειδοαναγωγικών ενεργών μετάλλων. Το οξειδωτικό stress αυξάνεται με την ηλικία και έτσι μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας νευροεκφυλιστικών παθήσεων, ιδιαίτερα για τα ηλικιωμένα άτομα. Δεν είναι βέβαιο εάν το οξειδωτικό stress αποτελεί το αρχικό γεγονός που οδηγεί στις νευροεκφυλιστικές διεργασίες, είναι βέβαιο όμως ότι συμμετέχει στην εξέλιξη της κυτταρικής βλάβης.⁷⁹

6.5. Φαρμακολογική τροποποίηση της απόκρισης στο οξειδωτικό stress

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα με αντικείμενο την προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό stress. Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί τη νοσολογική διεργασία, στην οποία έχει μελετηθεί αρκετά η δυνατότητα φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης του οργανισμού στο οξειδωτικό stress.

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι τα σαλικυλικά, η ακεταμινοφαίνη και ουσίες με γνωστή αντιοξειδωτική δράση, όπως η γλουταθειόνη, μπορούν να τροποποιήσουν ευνοϊκά την απόκριση των ευκαρυωτικών οργανισμών στο οξειδωτικό stress με την επαγωγή προστατευτικών και προσαρμοστικών μηχανισμών.⁸²⁻⁸⁸

Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών υποδη-

λώνουν ότι οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες τροποποιούν την απάντηση του οργανισμού στο οξειδωτικό stress,^{89,90} δεν επιβεβαιώνονται όμως από τις κλινικές μελέτες.^{91,92} Η διάσταση των αποτελεσμάτων μεταξύ επιδημιολογικών και κλινικών μελετών μπορεί να οφείλεται σε αδυναμίες στο σχεδιασμό των κλινικών μελετών ή σε συγχυτικούς

παράγοντες, που δεν ελήφθησαν υπόψη στις επιδημιολογικές μελέτες, ή μπορεί να αντανάκλα ανεπάρκεια των βασικών γνώσεων για το ρόλο των ουσιών που μπορούν να τροποποιήσουν την απάντηση του οργανισμού στο οξειδωτικό stress.

ABSTRACT

Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications

E. YIANNAKOPOULOU

Department of Basic Medical Science, Faculty of Health and Caring Professions, Technological Educational Institute, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(1):23–35

Several types of reactive species are generated in the body in the form of free radicals or non-radicals as a result of metabolic reactions. These species may be either oxygen derived or nitrogen derived and are called pro-oxidants. They attack macro-molecules, including protein, DNA and lipid etc., causing cellular/tissue damage. To counteract their effect, the body is endowed with another category of compounds called antioxidants. These antioxidants are either produced endogenously or come from exogenous sources, and they include enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, minerals such as Se, Mn, Cu and Zn, and vitamins such as vitamin A, C and E, and other compounds with antioxidant activity such as glutathione. In a healthy body, the pro-oxidants and antioxidants maintain a ratio, and a shift in this ratio towards pro-oxidants gives rise to oxidative stress. This oxidative stress may be either mild or severe depending on the extent of the shift, and constitutes the cause of several diseases such as cardiovascular diseases, neurological diseases, malignancies, renal diseases, diabetes, inflammatory problems, skin diseases, aging, respiratory diseases, liver diseases and different types of viral infection. As more and more reports are published, a wealth of information is being produced about oxidative stress in relation to several other diseases. The pharmacological modulation of the oxidative stress response is a hot topic of current research.

Key words: Antioxidants, Oxidative stress, Oxygen free radicals, Pro-oxidants

Βιβλιογραφία

1. GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoning and x-irradiation – A mechanism in common. *Science* 1954, 119:623–626
2. COMMONER B, TOWNSEND J, PAKE GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954, 174:689–691
3. HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956, 11:298–300
4. HARMAN D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:7124–7128
5. McCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244:6049–6055
6. BECKMAN KB, AMES BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998, 78:547–581
7. MITTAL CK, MURAD F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: A physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74:4360–4364
8. IGNARRO LJ, KADOWITZ PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Pharmacol Toxicol* 1985, 25:171–191
9. RADOMSKI MW, PALMER RMJ, MONCADA S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987, 92:639–646
10. ROTH S, DROGE W. Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 1987, 108:417–424
11. STORZ G, TARTAGLIA LA, AMES BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation. *Science* 1990, 248:189–194
12. SCHRECK R, BAEUERLE PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF-κB transcription factor and HIV-1. *Trends Cell Biol* 1991, 1:39–42

13. VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160:1–40
14. LACHANCE P, NAKAT Z, JEONG W. Antioxidants: An integrated approach. *Nutrition* 2001, 17:835–838
15. KIRLIN WG, CAI J, THOMPSON SA, DIAZ D, KAVANAGH TJ, JONES DP. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:1208–1218
16. LEE J, GODON C, LAGNIEL G, SPECTOR D, GARIN J, LABARRE J ET AL. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 1999, 274:16040–16046
17. SUH YA, ARNOLD RS, LASSEGUE B, SHI J, XU J, SORESCU D ET AL. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature (London)* 1999, 401:79–82
18. KOVACIC P, JACINTHO JD. Reproductive toxins: Pervasive theme of oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 2001, 7:863–892
19. RIDNOUR LA, ISENBERG JS, ESPEY MG, THOMAS DD, ROBERTS DD, WINK DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:13147–13152
20. VALKO M, MORRIS H, MAZUR M, RAPTA P, BILTON RF. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semi-quinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta* 2001, 1527:161–166
21. KLATT P, LAMAS S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000, 267:4928–4944
22. DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002, 82:47–95
23. JOHNS DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006, 8:1865–1879
24. HALLIWELL B. Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J* 1987, 1:358
25. MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 1990, 8:95–108
26. VALKO M, MORRIS H, CRONIN MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005, 12:1161–1208
27. PASTOR N, WEINSTEIN H, JAMISON E, BRENOWITZ M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* 2000, 304:55–68
28. LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. The role of O₂ in the production of HO•: *In vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:29–33
29. LEONARD SS, HARRIS GK, SHI X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004, 37:1921–1942
30. LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. The Haber-Weiss cycle – 70 years later: An alternative view. *Redox Rep* 2002, 7:55–57
31. KAKHLON O, CABANTCHIK ZI. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:1037–1046
32. De GREY ADNJ. HO₂•: The forgotten radical. *DNA Cell Biol* 2002, 21:251–257
33. AIKENS J, DIXTA. Peroxyhydroxyl radical (HOO•). Initiated lipid-peroxidation. The role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 1991, 266:15091–15098
34. VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004, 266:37–56
35. PALMER RMJ, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 153:1251–1256
36. GHAFOURIFAR P, CADENAS E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005, 26:190–195
37. BERGENDI L, BENES L, DURACKOVA Z, FERENCIK M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999, 65:1865–1874
38. FEDTKE N, BOUCHERON JA, WALKER VE, SWENBERG JA. Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and N², 3-ethenoguanine in rat-tissue DNA. *Carcinogenesis* 1990, 11:1287–1292
39. FINK SP, REDDY GR, MARNETT LJ. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:8652–8657
40. MAO H, SCHNETZ-BOUTAUD NC, WEISENSEEL JP, MARNETT LJ, STONE MP. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:6615–6620
41. MARNETT LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res Fund Mol Mech Mutagen* 1999, 424:83–95
42. WANG MY, DHINGRA K, HITTELMAN WN, LIEHR JG, DE ANDRADE M, LI DH. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996, 5:705–710
43. STADTMAN ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 2004, 11:1105–1112
44. DALLE-DONNE I, GIUSTARINI D, COLOMBO R, ROSSI R, MILZANI A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003, 9:169–176
45. DALLE-DONNE I, SCALONI A, GIUSTARINI D, CAVARRA E, TELL G, LUNGARELLA G ET AL. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005, 24:55–99
46. JAMIESON DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998, 14:1511–1527
47. CHAE HZ, CHUNG SJ, RHEE SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994, 269:27670–27678
48. KWON SJ, PARK JW, CHOI WK, KIM IH, KIM K. Inhibition of metal-catalysed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 201:8–15
49. NETTO LES, CHAE HZ, KANG SW, STADTMAN ER. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific anti-oxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J Biol Chem* 1996, 271:15315–15321
50. SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:916–921
51. MEISTER A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem*

- Sci* 1988, 13:185–188
52. MASELLA R, DI BENEDETTO R, VARI R, FILESI C, GIOVANNINI C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577–586
 53. NOGUEIRA CW, ZENI G, ROCHA JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004, 104:6255–6285
 54. DICKINSON D, FORMAN H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002, 64:1019–1026
 55. ARRIGO AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:936–944
 56. PASTORE A, FEDERICI G, BERTINI E, PIEMONTE F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003, 333:19–39
 57. GRIFFITHS HR, LUNEC J. Ascorbic acid in the 21st century – More than a simple antioxidant. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001, 10:173–182
 58. FANG YZ, YANG S, WU GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002, 18:872–879
 59. HALLIWELL B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? *Free Rad Res* 1996, 25:439–454
 60. BUETTNER GR. The pecking order of free-radicals and antioxidants – Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300:535–543
 61. RICHTER C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987, 44:175–189
 62. GUTTERIDGE JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995, 41:1819–1828
 63. EDGE R, MCGARVEY DJ, TRUSCOTT TG. The carotenoids as antioxidants – A review. *J Photochem Photobiol B* 1997, 41:189–200
 64. KOJODA G, HARRISON DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999, 43:562–567
 65. TOUYZ RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: Role of angiotensin II: Editorial review. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005, 14:125–131
 66. REITER RJ, TAN DX, PAPPOLA MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementia. *Ann NY Acad Sci* 2004, 1035:179–196
 67. BUTTERFIELD DA, BOYD-KMBALL D. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1703:149–156
 68. GAWRIEH S, OPARA EC, KOCH TR. Oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and antioxidant therapies. *J Invest Med* 2004, 52:506–514
 69. HECHT SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:1194–1210
 70. ROSENFELD ME. Inflammation, lipids and free radicals: Lessons learned from the atherogenic process. *Semin Reprod Endocrinol* 1998, 16:249–261
 71. ASHOK BT, ALI R. The aging paradox: Free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999, 34:293–303
 72. SUBRAHMANYAM VV, MCGIRR LG, O'BRIEN LG. Oxygen activation during drug metabolism. *Pharmacol Ther* 1987, 33:63–72
 73. GALATI G, TAFAZOLI S, SABZEVARI O, CHAN T, O'BREIN P. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. *Chem Biol Interact* 2002, 142:25–41
 74. KINDAS-MUGGE I, POHL WR, FROHLICH I, OISMULLER C, MICKSCHE M, TRAUTINGER F. Granulocytes of critically ill patients spontaneously express the 72 kD heat shock protein. *Circ Shock* 1993, 39:247–252
 75. KINDAS-MUGGE I, POHL WR, ZAVADOVA E, KOHN HD, FITZAL S, KUMMER F ET AL. Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA. *Shock* 1996, 5:184–189
 76. SCHROEDER S, LINDERMANN C, HOEFER A, PUTENSEN C, DECKER D, VON RUECKER AA ET AL. Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1999, 27:1080–1084
 77. DURAND P, BACHELET M, BRUNET F, RICHARD MJ, DHAINAUT JF, DALLAVA J ET AL. Inducibility of the 70 Kd heat shock protein in peripheral blood monocytes is decreased in human acute respiratory distress syndrome and recovers over time. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161:286–292
 78. YOUNG IS, WOODSIDE JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001, 54:176–186
 79. VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M, MAZUR M, TELSNER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39:44–84
 80. WITZTUM JL, HORKKO S. The role of oxidized LDL in atherogenesis: Immunological response and antiphospholipid antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1997, 811:88–99
 81. TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004, 122:339–352
 82. GIANNAKOPOULOU EC, TILIGADA E. Pharmacological preconditioning in the oxidative stress response of eukaryotic cells: In process method validation. Greek edition. *Rev Clin Pharmacol Pharmacokinet* 2007, 25:30–32
 83. GIANNAKOPOULOU EC, TILIGADA E. Acetaminophen modulates the oxidative stress response in eucaryotic cells. *Rev Clin Pharmacol Pharmacokinet* 2006, 20:125–127
 84. GIANNAKOPOULOU EC, DELITHEOS A, TILIGADA E. Dose-dependent effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on the cellular stress response. Greek edition. *Rev Clin Pharmacol Pharmacokinet* 2005, 23:39–41
 85. GIANNAKOPOULOU EC, TILIGADA E. Preconditioning effect of salicylates in an alternative experimental model of oxidative stress. Possible implications for laparoscopic surgery. 15th International Congress of the European Association for Endoscopic surgery, Athens, 2007:11 (Abstract Book)
 86. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ε. Μηχανισμοί προσαρμογής στο οξειδωτικό και θερμικό stress στον *S. cerevisiae*: Επίδραση αντιοξειδωτικών ουσιών. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή, Αθήνα, 2005
 87. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ε, ΤΥΛΙΓΑΔΑ Α. Προστατευτική δράση των

- σαλικυλικών κατά το οξειδωτικό stress. 4ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο Ιατρικής Σχολής, Αθήνα, 2007:225 (Βιβλίο Περιλήψεων)
88. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ε. Διερεύνηση του ρόλου των σαλικυλικών στο preconditioning κατά το οξειδωτικό stress. Τελική έκθεση πεπραγμένων Μεταδιδακτορικής Έρευνας (Υποτροφία ΙΚΥ 15109/07.10.2005), Αθήνα, 2007
89. RIMM EB, STAMPFER MJ, ASCHERIO A. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993, 328:450–456
90. STAMPFER MJ, HENNEKENS CH, MANSON JE. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1993, 328:1444–1449
91. ALPHA-TOCOPHEROL, BETA-CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994, 330:1029–1035
92. RAPOLA JM, VIRTAMO J, RIPATTI S. Randomized trial of α -tocopherol and β -carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997, 349:1715–1720

Corresponding author:

E. Yiannakopoulou, 82 Manjagriotaki street, GR-176 76 Kallithea, Greece
e-mail: ninayiannak@hotmail.com, egian@med.uoa.gr

.....