

Η θεωρία των ελευθέρων ριζών στην τοξικολογία και ο ρόλος της διατροφής

Αριστείδης Σ. Βεσκούκης

Επίκουρος Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας
Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας
Αργοναυτών 1Γ', 42132
Τρίκαλα
Email: veskoukis@uth.gr
Προσωπική Ιστοσελίδα: <https://veskoukis.weebly.com>

I. Περίληψη

Η θεωρία των ελευθέρων ριζών, στην οποία είναι θεμελιωμένο το επιστημονικό πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την Τοξικολογία. Στο κεφάλαιο αυτό, θα μελετηθεί αρχικά η στρόφη στις αντιλήψεις της σύγχρονης Τοξικολογίας που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία 5 χρόνια, αναφορικά με την ιδέα που έχει ονομαστεί *περίπτωση έκθεσης σε ξενοβιοτικά που προσομοιάζει την πραγματική ζωή*. Στη συνέχεια θα αναφερθούν κάποιες βασικές γνώσεις και ορισμοί γύρω από την Οξειδοαναγωγική Βιολογία που κρίνονται απαραίτητοι για να κατανοήσει ο αναγνώστης τις πληροφορίες του κειμένου αυτού. Επιπρόσθετα, θα γίνει προσπάθεια ενοποίησης των ερευνητικών δεδομένων των δύο προαναφερθέντων επιστημονικών πεδίων και θα πραγματοποιηθεί μία διατροφική προσέγγιση. Η διατροφή είναι αναντίρρητα μία παράμετρος που έχει εύστοχα χαρακτηριστεί ως κοινωνικός δείκτης και σε μεγάλο βαθμό καθορίζει τη επίδραση των ξενοβιοτικών στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του οργανισμού. Τέλος, θα γίνει μία αναφορά, κυρίως με τη μορφή προβληματισμού, σε 4 διαχρονικά ερωτήματα της Βιολογίας που άπτονται των πεδίων, τα οποία προσεγγίζονται σε αυτό το κεφάλαιο. Σημειώνεται ότι, σε όποιους όρους κρίνεται απαραίτητο, αναφέρεται και η ορολογία στην αγγλική γλώσσα καθώς αυτή είναι η γλώσσα στην οποία είναι διαθέσιμη η επιστημονική βιβλιογραφία.

II. Εισαγωγή

Η Τοξικολογία είναι ένας θεμελιώδης επιστημονικός κλάδος, του οποίου οι ιδέες χρονολογούνται από τον 5ο αιώνα π.Χ. (Sykiotis και συν. 2005). Εκείνη την εποχή, ο Ιπποκράτης, που έχει χαρακτηριστεί ως ο πατέρας της σύγχρονης Ιατρικής, εισήγαγε το πείραμα σαν μία κοινή πρακτική για να απαγκιστρωθεί η επιστήμη από τις δεισιδαιμονίες που τότε κυριαρχούσαν. Επιπρόσθετα, αντιλήφθηκε την αρχή της φαρμακογονιδιωματικής σύμφωνα με την οποία η αποτελεσματικότητα ή η πιθανή επιζήμια δράση των φαρμάκων (των ξενοβιοτικών θα λέγαμε σήμερα) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου που τα λαμβάνει (Sykiotis και συν. 2005). Κατά τη διάρκεια του 16ου αιώνα μ.Χ. ο Παράκελσος, που είναι γνωστός και ως ο πατέρας της Τοξικολογίας, ήταν ο πρώτος που εξέφρασε την ιδέα ότι *η δόση κάνει το δηλητήριο (the dose makes the poison)*. Μέσω αυτής της αντίληψης έθεσε στην πραγματικότητα τα θεμέλια για τον όρο που σήμερα γνωρίζουμε ως NOAEL (no observed adverse effect level, το επίπεδο ή η συγκέντρωση ενός ξενοβιοτικού, όπου δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις) (Tsatsakis και συν. 2018).

Με την ιδέα αυτή ως βάση, τα τελευταία χρόνια έχει αναδυθεί μία νέα αντίληψη που έχει περιγραφεί ως *περίπτωση έκθεσης σε ξενοβιοτικά που προσομοιάζει την πραγματική ζωή (real-life exposure scenario)* ή *προσομοίωση κινδύνου σε ρεαλιστικά σενάρια (the real-life risk simulation)* (Tsatsakis και συν. 2016, 2017). Σύμφωνα με αυτή τη σύγχρονη προσέγγιση της Τοξικολογίας, οι άνθρωποι έρχονται σε καθημερινή επαφή με μίγματα ξενοβιοτικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (πολύ χαμηλότερες του NOAEL) που θεωρούνται ακίνδυνες, ωστόσο, πιθανότατα αυτό δεν ισχύει. Πρόσφατες καινοτόμες μελέτες σε ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι η μακροχρόνια χορήγηση μιγμάτων ξενοβιοτικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα και οξειδωτικό στρες (Docea και συν. 2016, 2018, 2019; Fountoucidou και συν. 2019). Τα νέα αυτά ερευνητικά δεδομένα έχουν οδηγήσει σε μία *αλλαγή αντίληψης (perception shift)*, όπως αυτή έχει οριστεί σε προηγούμενη μελέτη, στη μοντέρνα Τοξικολογία (Veskoukis 2020). Καθίσταται, επομένως, σαφές ότι η σύγχρονη έρευνα οφείλει να στοχεύσει στη μελέτη των επιδράσεων στην υγεία της έκθεσης σε μίγματα ξενοβιοτικών συγκέντρωσης πολύ μικρότερης του NOAEL και όχι στο βιολογικό αποτέλεσμα ενός μόνο ξενοβιοτικού που χορηγείται σε μεγάλες, μη ρεαλιστικές συγκεντρώσεις. Οι επιδράσεις αυτού του ιδιότυπου *καθεστώτος μακροχρόνιας έκθεσης σε ξενοβιοτικά χαμηλής δόσης (the long-term low-dose exposure regimen to xenobiotics)* φαίνεται ότι προκαλεί αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του αίματος και των ιστών, οι οποίες μπορούν να εκτιμηθούν μέσω της χρησιμοποίησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγής (Veskoukis συν. 2019; Fountoucidou και συν. 2019; Docea και συν. 2018). Σε αυτό το κεφάλαιο θα προσεγγιστεί η Τοξικολογία μέσω της θεωρίας των ελευθέρων ριζών και θα αναφερθεί ο κομβικός ρόλος της διατροφής στην εμφάνιση των επιδράσεων διαφόρων ερεθισμάτων που είναι ικανά να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση ενός οργανισμού. Στην επόμενη ενότητα αναφέρονται ορισμένοι βασικοί ορισμοί για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των ελευθέρων ριζών από τον αναγνώστη.

III. Ορισμοί και περιγραφές βασικών εννοιών της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας

Στο πλαίσιο αυτό αναφέρονται οι ορισμοί και η περιγραφή ορισμένων απαραίτητων εννοιών για να κατανοήσει ο αναγνώστης τις βασικές αρχές της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας, οι οποίες διέπουν την Τοξικολογία.

Οξείδωση και Αναγωγή (Oxidation and Reduction)

Οξείδωση ορίζεται η απώλεια ηλεκτρονίου, ή η προσθήκη οξυγόνου ή η απώλεια υδρογόνου - Αναγωγή είναι η προσθήκη ηλεκτρονίου, ή η απώλεια οξυγόνου ή η προσθήκη υδρογόνου.

Οξειδοαναγωγή, Οξειδοαναγωγική Βιολογία (Redox Biology)

Μία αντίδραση οξείδωσης ακολουθείται πάντα από μία αντίδραση αναγωγής και το αντίθετο. Ο όρος οξειδοαναγωγή χαρακτηρίζει αυτή την αλληλουχία αντιδράσεων. Η Οξειδοαναγωγική Βιολογία είναι ο κλάδος της Βιολογίας που μελετάει το βιοχημικό υπόβαθρο των αντιδράσεων αυτών και το ρόλο τους στα βιολογικά συστήματα καθώς χαρακτηρίζουν ένα πολύ ευρύ φάσμα βιοχημικών διεργασιών του κυττάρου.

Οξειδωτικός παράγοντας ή Οξειδωτικό (Oxidative agent or Oxidant)

Άτομο, μόριο ή ιόν που οξειδώνει ένα άλλο άτομο ή μόριο άμεσα αποσπώντας ηλεκτρόνια ή υδρογόνο ή προσθέτοντας οξυγόνο.

Προοξειδωτικός παράγοντας ή Προοξειδωτικό (Prooxidant agent or Prooxidant)

Άτομο, μόριο ή ιόν που μέσω χημικών αντιδράσεων οδηγεί στη δημιουργία ενός οξειδωτικού, το οποίο μπορεί να οξειδώσει άμεσα άτομα ή μόρια αποσπώντας ηλεκτρόνια ή υδρογόνο ή προσθέτοντας οξυγόνο.

Αναγωγικός παράγοντας ή Αναγωγικό (Reducing agent or Reductant)

Άτομο, μόριο ή ιόν που ανάγει ένα άλλο άτομο ή μόριο προσθέτοντας ηλεκτρόνια ή υδρογόνο ή αποσπώντας οξυγόνο.

Ελεύθερη ρίζα (Free radical)

Άτομο, μόριο ή ιόν που φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και είναι ικανό για αυθύπαρκτη ύπαρξη. Ασύζευκτο είναι το ηλεκτρόνιο που καταλαμβάνει μόνο του ένα τροχιακό. Παράδειγμα τέτοιου ατόμου είναι το ατομικό υδρογόνο (H^{\bullet}), μορίου είναι η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}) και ιόντος είναι το ανιόν (ή ρίζα) σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$). Το σύμβολο « \bullet » έχει καθιερωθεί για την απεικόνιση μίας ελεύθερης ρίζας.

- Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δομές, καθώς η παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων τις οδηγεί στην απόσπαση ηλεκτρονίων από το (μακρο)μόριο με τη μεγαλύτερη εγγύτητα σε αυτές χωρίς τη διαδικασία επιλογής. Σαν αποτέλεσμα, οι ελεύθερες ρίζες ανάγονται και προκαλούν οξείδωση των μορίων, από τα οποία αποσπών ηλεκτρόνια
- Η αντίληψη που επικρατούσε στην επιστημονική κοινότητα μέχρι πριν περίπου δύο δεκαετίες ήταν ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι αποκλειστικά επιβλαβείς βιολογικές οντότητες για το κύτταρο και κατ' επέκταση για έναν οργανισμό. Η αντίληψη, όμως, αυτή έχει αλλάξει καθώς σήμερα είναι γνωστό ότι υπακούουν στο φαινόμενο της όρμησης. Σύμφωνα με αυτό, σε υψηλές ή χαμηλές συγκεντρώσεις είναι επιβλαβείς για το κύτταρο, ενώ σε μία βέλτιστη συγκέντρωση είναι απαραίτητες διότι συμμετέχουν σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως η οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (redox signaling), η έκφραση γονιδίων και η θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών.

Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

Ένας συλλογικός όρος που περιγράφει άτομα, μόρια ή ιόντα, τα οποία προκύπτουν από το οξυγόνο και είναι πιο δραστικά από αυτό (**Εικόνα 1**).

- Οι δραστικές μορφές συχνά ταυτίζονται λανθασμένα με τις ελεύθερες ρίζες, ωστόσο στις ROS ανήκουν τόσο ελεύθερες ρίζες όσο και μη ρίζες. Όλες οι ελεύθερες ρίζες είναι δραστικές μορφές, δε συνεπάγεται, όμως, ότι όλες οι δραστικές μορφές είναι ελεύθερες ρίζες (π.χ. το υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2 , είναι μία ROS αλλά δεν είναι ελεύθερη ρίζα). Εκτός από τις ROS, υπάρχουν και οι λιγότερο μελετημένες δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) και δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS).

Αντιοξειδωτικό (Antioxidant)

Κάθε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή προλαμβάνει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος.

Οξειδωτικό στρες (Oxidative stress)

Η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και του ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη.

Εικόνα 1 εδώ

IV. Βιοδείκτες οξειδοαναγωγής (redox biomarkers) και το ζήτημα των βιοδεικτών (the biomarker issue)

Οι βιοδείκτες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μελέτη των σύγχρονων ιδεών στην Τοξικολογία. Ο όρος *βιοδείκτης (biomarker)* προέρχεται από το συνδυασμό των λέξεων *βιολογικός δείκτης (biological marker)* και έχει οριστεί ως *ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά σαν δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθολογικών καταστάσεων ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μία θεραπευτική παρέμβαση* (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Ο ορισμός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ερεθίσματα που είναι ικανά να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία, όπως η άσκηση, η χορήγηση διατροφικών αντιοξειδωτικών και διάφορες τοξικολογικές παρεμβάσεις (π.χ. έκθεση οργανισμών σε ξеноβιοτικά). Ο *βιοδείκτης* στο πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας ονομάζεται *βιοδείκτης οξειδοαναγωγής (redox biomarker)* και έχει οριστεί *sensu stricto* ως ακολούθως: *i) ένα αντιοξειδωτικό μόριο (π.χ. γλουταθειόνη, καταλάση), του οποίου η συγκέντρωση, η ενεργότητα ή/και η δομή τροποποιείται μετά από την αλληλεπίδρασή του με τις δραστικές μορφές, ii) τα προϊόντα της επιζήμιας επίδρασης των δραστικών μορφών στα βιομόρια και συγκεκριμένα στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες και τα νουκλεϊκά οξέα (π.χ. πρωτεϊνικά καρβονύλια, μηλονική διαλδεΰδη), iii) οι δραστικές μορφές per se (π.χ. OH^\bullet , H_2O_2)* (Veskoukis και συν. 2019).

Επιπλέον, το ζήτημα των βιοδεικτών (*the biomarker issue*) έχει οριστεί ως η λογική υιοθέτηση βιοδεικτών για την προσέγγιση επιστημονικών ερωτημάτων (Veskoukis και συν. 2019). Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμοι δεκάδες βιοδείκτες αναφορικά με την εκτίμηση του οξειδοαναγωγικού προφίλ σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα/συστήματα. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν κάποιες προϋποθέσεις για τη χρήση τους ώστε να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατό καλύτερη μεταφραστική τους ικανότητα (η ικανότητά τους να δίνουν απαντήσεις σε διάφορα επιστημονικά ερωτήματα). Είναι, λοιπόν, προτιμητέο να μετρώνται οι κατάλληλοι βιοδείκτες και, συγκεκριμένα, εκείνοι των οποίων η μεταβολή της συγκέντρωσης (αν πρόκειται για μεταβολίτες) ή της δραστηρότητάς τους (αν πρόκειται για ένζυμα) μπορεί να συνδεθεί με συγκεκριμένες αλλαγές σε κυτταρικό ή ιστικό επίπεδο. Επιπρόσθετα, η επιλογή των βιοδεικτών ανάλογα με το βιολογικό τους ρόλο έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να προσφέρει μηχανιστικές απαντήσεις. Συγκεκριμένα, οι βιοδείκτες που επιλέγονται για την απεικόνιση της μεταβολής της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης είναι πιο πιθανό να έχουν μεγαλύτερη μεταφραστική ικανότητα εάν "γεινιάζουν" λειτουργικά (Veskoukis και συν. 2016a, 2018a, 2018b). Επί παραδείγματι, βιοδείκτες που ανήκουν στο ευρύ μονοπάτι της γλουταθειόνης, όπως αυτό απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**, αναμένεται να τροποποιηθούν μετά την εφαρμογή μίας παρέμβασης με τρόπο κατά τον οποίο είναι δυνατή η αξιολόγηση του βιολογικού ρόλου της παρέμβασης αυτής και η εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων.

Εικόνα 2 εδώ

Η χρησιμοποίηση των βιοδεικτών θα μπορούσε να θεωρηθεί μία πρακτική με αναδρομικό χαρακτήρα, μία δηλαδή επιστροφή σε προσφάτως παρελθούσες εποχές της έρευνας στη Βιολογία και την Τοξικολογία (Margaritelis και συν. 2016). Εντούτοις, προσφέρει σημαντικά οφέλη δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά κύριο λόγο εργαλεία χωρίς υψηλό κόστος και να δώσουν μετρήσεις με υψηλή ακρίβεια και αξιοπιστία. Ταυτόχρονα, η υιοθέτηση βιοδεικτών δίνει και ένα σημαντικό ηθικό πλεονέκτημα. Σε αυτή την κατεύθυνση, δεν είναι, παραδείγματος χάρη, ηθικά αποδεκτό να αναμένονται ενδείξεις ηπατικών βλαβών στον άνθρωπο λόγω της τοξικής επίδρασης της υπερδοσολογίας παρακεταμόλης ώστε να χορηγηθεί η κατάλληλη φαρμακευτική θεραπεία. Το πρόβλημα αυτό παρακάμπτεται με τη μέτρηση βιοδεικτών τοξικότητας, όπως η συγκέντρωση της παρακεταμόλης στο αίμα. Αναπλαισιώνοντας στο πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας, η δράση ενός υποτιθέμενου φαρμάκου απέναντι στη χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή που παρατηρείται κατά τη γήρανση θα μπορούσε να προσδιοριστεί με τη μέτρηση συγκεκριμένων βιοδεικτών σε ανθρώπους. Ειδάλλως, απουσία βιοδεικτών θα απαιτούνταν μία μακροχρόνια διαδικασία ώστε να γίνουν αντιληπτά τα πιθανά ευεργετικά αποτελέσματα αυτού του φαρμάκου στο φαινότυπο των ηλικιωμένων ανθρώπων (Veskoukis 2020).

V. Ο ρόλος των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής στην ερμηνεία των αλλαγών της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας: τοξικολογική και διατροφική προσέγγιση

Στην Ιατρική, παράμετροι που μετρώνται στο αίμα, όπως η αλανινική και η ασπартική τρανσαμινάση, αποτελούν βιοδείκτες που σχετίζονται με βλάβες του ήπατος (Giboney 2005). Στο πεδίο της Βιοχημείας της Άσκησης, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος αυξάνονται μετά από έντονη άσκηση με πιθανό επιβλαβή ρόλο στην αθλητική απόδοση (Cairns 2006),

ενώ στο πεδίο της Διατροφής, η αυξημένη συγκέντρωση καροτενοειδών και βιταμίνης C στο αίμα έχει συσχετιστεί με την επαρκή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (Pisó και συν. 2019). Είναι αντιληπτό ότι τα προαναφερθέντα χημικά μόρια έχουν την έννοια των βιοδεικτών. Στο πεδίο της Τοξικολογίας, υπάρχουν δύο ορισμοί του όρου *βιοδείκτης*. Σύμφωνα με τον πρώτο που έχει δοθεί από την Εθνική Ακαδημία Επιστημών των Η.Π.Α. (ENTOX/TIWET, 1996), ο βιοδείκτης είναι *μία αλλαγή των κυτταρικών ή των βιοχημικών συστατικών ή διεργασιών, δομών ή λειτουργιών που προκαλείται από ξеноβιοτικά και μπορεί να μετρηθεί σε ένα βιολογικό σύστημα ή δείγμα*. Ο δεύτερος ορίζει τον βιοδείκτη ως *ένα φυσιολογικό σήμα που αντανακλά την έκθεση, την κυτταρική απόκριση ή την εγγενή ή επίκτητη ευπάθεια και παρέχει μία νέα στρατηγική για την επίλυση προβλημάτων στο χώρο της Τοξικολογίας* (Silbergeld 1994). Σε αυτή τη λογική, η τροπονίνη T και η ελαφριά αλυσίδα 3 της μυοσίνης είναι βιοδείκτες τοξικότητας για το σκελετικό μυ (Campiron και συν. 2013). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι εφόσον τα ξеноβιοτικά προκαλούν διαταραχές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία, οι βιοδείκτες οξειδοαναγωγής είναι αξιόπιστοι δείκτες για την ανίχνευση των πιθανών τοξικών/οξειδωτικών τους δράσεων στο αίμα και τους ιστούς (Docea και συν. 2018; Fountoucidou και συν. 2019).

Η οξειδοαναγωγική ισορροπία τόσο σε *in vitro* μοντέλα κυτταροκαλλιιεργειών όσο και σε ζωικά μοντέλα και στον άνθρωπο (*in vivo*) τροποποιείται μετά από την εφαρμογή συγκεκριμένων ερεθισμάτων (Veskoukis και συν. 2019). Ένα από τα κύρια και αρκετά μελετημένα είναι η διατροφή είτε με τη μορφή κατανάλωσης τροφών είτε με τη χορήγηση διατροφικών αντιοξειδωτικών. Τα ερευνητικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα στη βιβλιογραφία καταδεικνύουν ότι δεν είναι σαφές εάν η διατροφή τροποποιεί την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση αποκλειστικά προς μία κατεύθυνση του *οξειδοαναγωγικού συνεχούς (redox continuum, του ορίζοντα δηλαδή από την οξειδωτική ως την αντιοξειδωτική δράση)* με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός της ως αντιοξειδωτικού ή προοξειδωτικού ερεθίσματος (Veskoukis και συν. 2020). Είναι σήμερα γνωστό ότι οι διατροφικές παρεμβάσεις, και ειδικότερα τα αντιοξειδωτικά, έχουν πολύπλευρη δράση δεδομένου ότι μπορεί να μην προκαλέσουν καμία μεταβολή στην οξειδοαναγωγική ισορροπία, να είναι ακίνδυνα αλλά ακόμα και επιβλαβή, ιδιαίτερα αν χρησιμοποιηθεί ένα επιπλέον ερέθισμα, όπως η άσκηση, που μπορεί να τροποποιήσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία (Margaritelis και συν. 2018; Veskoukis και συν. 2008, 2009, 2010, 2012a, 2016b, Kerasioti και συν. 2012). Με βάση αυτά τα ερευνητικά δεδομένα, έχει αναδειχθεί η σύγχρονη προσέγγιση ενίσχυσης του αντιοξειδωτικού οπλοστασίου του οργανισμού μέσω των συστατικών των τροφών, η οποία αναφέρεται ως *εξατομικευμένη διατροφή (personalized nutrition)*. Σύμφωνα με αυτή, ένα διατροφικό (ή και εξωγενώς χορηγούμενο) αντιοξειδωτικό αναμένεται να έχει ωφέλιμη δράση σε έναν άνθρωπο αν οι τιμές ηρεμίας ορισμένων βασικών αντιοξειδωτικών του αίματος του ανθρώπου αυτού είναι χαμηλές, ή αν έχει κάποια έλλειψη σε μία βιταμίνη, αν η συγκεκριμένη βιταμίνη είναι το χορηγούμενο αντιοξειδωτικό. Η ανάγκη, δηλαδή, του οργανισμού σε ένα συγκεκριμένο διατροφικό αντιοξειδωτικό υπαγορεύει την αυξημένη πιθανότητα αυτό να δράσει ευεργετικά (Margaritelis και συν. 2018, Spanidis και συν. 2018). Με την ίδια λογική, ένα αντιοξειδωτικό που λαμβάνεται από τη διατροφή ή ως συμπλήρωμα θα μπορούσε να ασκήσει την ευεργετική του δράση και να αντιστρέψει τις δυσμενείς επιδράσεις που προκάλεσε σε έναν οργανισμό η έκθεση σε κάποιο ξеноβιοτικό. Μελέτες δείχνουν ότι η διατροφή που είναι

πλούσια σε αντιοξειδωτικά και έχει ως βάση τη Μεσογειακή διατροφή μπορεί να προμηθεύσει τον οργανισμό με συστατικά ικανά να τον θωρακίσουν απέναντι σε ερεθίσματα που μπορούν να αλλάξουν την οξειδοαναγωγική του ομοιόσταση. Έτσι, φαίνεται τελικά ότι η διατροφή είναι ένας καθοριστικός παράγοντας που σε μεγάλο βαθμό καθορίζει την επίδραση της χορήγησης μιγμάτων ξενοβιοτικών στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του οργανισμού (**Εικόνα 3**). Αναμφίβολα η διατροφή αποτελεί μία θεμελιώδη παράμετρο της ανθρώπινης ύπαρξης και γι' αυτό το λόγο μπορεί εύστοχα να χαρακτηριστεί ως *κοινωνικός δείκτης (sociomarker)* αποτελώντας το σύνδεσμο μεταξύ επιστήμης και κοινωνίας.

VI. Μηχανισμοί συνεισφοράς των δραστικών μορφών στην τοξικότητα ξενοβιοτικών

Με βάση τη λογική ενοποίησης των κλάδων της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας και της Τοξικολογίας, διάφορες μελέτες δείχνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές γενικότερα σχετίζονται ή αποτελούν αποκλειστικούς μεσολαβητές στον μηχανισμό δράσης διαφόρων ξενοβιοτικών (Halliwell και Gutteridge 2015). Οι κυριότεροι μηχανισμοί που έχουν προταθεί αναφέρονται παρακάτω.

i) Το ίδιο το ξενοβιοτικό είναι μία δραστική μορφή

Η αρτεμισινίνη (artemisinin) είναι μία χημική ένωση που απομονώθηκε από το φυτό *Artemisia annua*, το οποίο χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική. Είναι ένα προ-φάρμακο του βιολογικά ενεργού μεταβολίτη της, διυδροαρτεμισινίνη, και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ελονοσίας που προκαλείται από το παράσιτο *Plasmodium falciparum*. Πιστεύεται ότι το φάρμακο αυτό προκαλεί το θάνατο του παρασίτου μέσω διαταραχής της οξειδοαναγωγικής του ομοιόστασης. Το *Plasmodium falciparum* μολύνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ξενιστή και καταστρέφει την αιμοσφαιρίνη δημιουργώντας ένα περιβάλλον πλούσιο σε σίδηρο που ήταν δεσμευμένος στην αίμη. Η αίμη ανάγει τον υπεροξειδικό δεσμό της αρτεμισινίνης δημιουργώντας ένα δεσμό σιδήρου με την υπεροξειδική ομάδα και, στη συνέχεια, με διαδοχικές αντιδράσεις παράγονται ελεύθερες ρίζες που προκαλούν οξειδωτικές βλάβες και, τελικά, το θάνατο του παρασίτου.

ii) Το ξενοβιοτικό μεταβολίζεται σε μία δραστική μορφή

Ο τετραχλωράνθρακας (CCl_4) είναι ένα άχρωμο υγρό που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ως διαλυτικό μέσο για λίπη και έλαια καθώς και στους πυροσβεστήρες. Έχει χρησιμοποιηθεί και ως αναισθητικό, ωστόσο η χρήση του αυτή έχει απαγορευθεί διότι προκαλεί ηπατοτοξικότητα. Συγκεκριμένα, προκαλεί βλάβες στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων και επιβραδύνει την πρωτεϊνοσύνθεση καθώς και τη δράση ενζύμων που εντοπίζονται εκεί. Ο CCl_4 δεν ασκεί την τοξική του δράση άμεσα αλλά μεταβολίζεται από τα κυτοχρώματα P450 στη ρίζα του τριχλωρομεθυλίου (trichloromethyl radical, CCl_3^\bullet). Η ρίζα αυτή οξειδώνει τα λιπίδια των μεμβρανών ξεκινώντας τον καταρράκτη αντιδράσεων (reaction cascade) της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

iii) Το ξενοβιοτικό ανακυκλώνεται με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (redox cycling)

Αρχικά, το ξενοβιοτικό ανάγεται από αντιοξειδωτικά μόρια του κυττάρου και το ανηγμένο προϊόν οξειδώνεται εκ νέου από το μοριακό οξυγόνο (O_2) στην αρχική του μορφή

οδηγώντας στην παραγωγή O_2^{\bullet} . Το παρακουάτ (paraquat) είναι ιδιαίτερα τοξικό ζιζανιοκτόνο διπυριδιλίου (περιέχει δύο αρωματικούς δακτυλίους πυριδιλίου). Όταν εισέρθει στους χλωροπλάστες των ζιζανίων (ανεπιθύμητων φυτών που αναπτύσσονται σε μία καλλιεργούμενη έκταση ανάμεσα σε χρήσιμα για τον άνθρωπο φυτά) ανάγεται μέσω πρόσληψης ηλεκτρονίων από ένζυμα και μετατρέπεται στη ρίζα διπυριδιλίου. Στη συνέχεια, παρουσία O_2 η ρίζα αυτή μετατρέπεται πάλι στο παρακουάτ και προκαλεί την παραγωγή O_2^{\bullet} .

iv) Το ξενοβιοτικό επηρεάζει τη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών

Πολλά ξενοβιοτικά μεταβολίζονται και απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω της σύζευξής τους με τη γλουταθειόνη στην ανηγμένη μορφή της (GSH). Η έκθεση σε μεγάλη δόση ενός ξενοβιοτικού, όπως η αιθανόλη (αλκοόλ), μπορεί να προκαλέσει βλάβες λόγω τοξικότητας στο ήπαρ που προμηθεύει τους υπόλοιπους ιστούς του οργανισμού με GSH. Η δυσμενής δράση του ξενοβιοτικού θα προκαλέσει έλλειψη GSH στους ιστούς λόγω ανικανότητας του ήπατος να τους προμηθεύσει με αυτή.

v) Το ξενοβιοτικό διεγείρει την ενδογενή παραγωγή δραστικών μορφών

Διάφορα ξενοβιοτικά είναι αναστολείς της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται περίσσεια ηλεκτρονίων, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ROS. Άλλα, όπως το χλωρομεθάνιο (CH_3Cl) που χρησιμοποιείται ως ζιζανιοκτόνο αλλά και με άλλους, ποικίλους τρόπους στη βιομηχανία, προκαλούν οξεία φλεγμονή. Συγκεκριμένα, στοχεύουν τα μιτοχόνδρια αυξάνοντας τη διαπερατότητα της εξωτερικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα το κυτόχρωμα c να βγαίνει στο κυτταρόπλασμα και μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-9 από το διμερισμό της προ-κασπάσης-9 να προκαλεί απόπτωση.

vi) Το ξενοβιοτικό μπορεί να δράσει με συνδυασμό κάποιων ή όλων των παραπάνω μηχανισμών

Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένα πολύπλοκο μίγμα τοξικών ενώσεων, κάποιες από τις οποίες είναι ελεύθερες ρίζες, άλλες συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και άλλες μειώνουν τη συγκέντρωση της GSH στους ιστούς. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}) και OH^{\bullet} που περιέχονται στον καπνό προκαλούν άμεσα οξειδωτικές τροποποιήσεις στα βιομόρια των κυττάρων, οι αλδεΐδες, και κυρίως η ακρολεΐνη, οδηγούν σε εξάντληση των αποθεμάτων GSH ενώ οι υδροξυκινόνες που εντοπίζονται στην πίσσα υφίστανται ανακύκλωση με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (redox cycling) και παράγουν επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες.

Συμπερασματικά, η παραγωγή δραστικών μορφών είναι ο κύριος, αν όχι ο μοναδικός μηχανισμός που κάποια ξενοβιοτικά όπως το παρακουάτ και ο CCl_4 ασκούν την τοξική τους δράση στους ιστούς, ενώ για άλλα, όπως οι κινόνες είναι ένας από τους κύριους τρόπους πρόκλησης βλαβών στους οργανισμούς.

VII. Διαχρονικά ερωτήματα και προβληματισμοί στα πεδία της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας και της Τοξικολογίας

Σε αυτή την ενότητα, θα γίνει μία αναφορά, κυρίως με τη μορφή προβληματισμού, σε 4 διαχρονικά ερωτήματα της Βιολογίας που άπτονται των πεδίων που προσεγγίζονται σε αυτό το κεφάλαιο και ειδικότερα της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας και της Τοξικολογίας. Η προσέγγιση και τα συμπεράσματα που θα αναφερθούν βασίζονται σε πειραματικά δεδομένα από συγκεκριμένες πειραματικές παρεμβάσεις. Δεν υπάρχει επιθυμία γενικεύσεων, κάτι που δε βοηθάει στην αναζήτηση και τεκμηρίωση της επιστημονικής γνώσης γενικότερα, αλλά προσφοράς τροφής για σκέψη.

Ερώτημα 1ο: Η in vitro αντιοξειδωτική δράση διατροφικών συστατικών, φυτικών εκχυλισμάτων ή σκευασμάτων συνεπάγεται την ίδια θετική δράση in vivo;

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα *in vitro* πειραματικών δοκιμών/βιοδεικτών που χρησιμεύουν σαν το πρώτο βήμα για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης διαφόρων διατροφικών αντιοξειδωτικών μορίων ή σκευασμάτων ή και ξеноβιοτικών με τα οποία ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή καθημερινά. Με τη μέτρηση τέτοιων βιοδεικτών, υπάρχει η δυνατότητα χαρακτηρισμού μίας ουσίας ως αντιοξειδωτικού ή προοξειδωτικού σε ένα πρώτο επίπεδο μελέτης, δηλαδή *in vitro*. Όπως αντιλαμβάνεται κανείς, όμως, αυτό που ενδιαφέρει τους ερευνητές και κατ' επέκταση τους καταναλωτές και την κοινωνία είναι η δράση των προς μελέτη μορίων μέσα σε έναν ζωντανό οργανισμό και κατά προτίμηση στον άνθρωπο. Επομένως, η προεκβολή των δεδομένων που προκύπτουν από *in vitro* δοκιμές, σε έναν οργανισμό είναι ο πρωταρχικός στόχος της επιστήμης της Βιολογίας (Veskoukis και συν. 2018b). Τα σχετικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία είναι αμφιλεγόμενα καθώς δείχνουν ότι αφενός μεν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση *in vitro* μπορεί να έχουν ανάλογη προστατευτική δράση και *in vivo* (Kim και συν. 2005), αφετέρου δε η *in vitro* αντιοξειδωτική δράση τους δεν επιβεβαιώνεται *in vivo*, καθώς όταν χορηγηθούν σε ζωντανούς οργανισμούς δρουν ως προοξειδωτικά (Veskoukis και συν. 2012a, b). Ένας καθοριστικός παράγοντας που δε λαμβάνεται υπόψη κατά τη μέτρηση βιοδεικτών *in vitro* είναι οι μεταβολικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα συστατικά των χορηγούμενων ουσιών ή σκευασμάτων κατά την είσοδό τους στον οργανισμό καθώς και η πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση τους με άλλα συστατικά των σκευασμάτων ή της διατροφής. Αποτέλεσμα είναι να επηρεάζεται η βιοδιαθεσιμότητά τους και τελικά ο τρόπος δράσης τους. Άλλοι παράγοντες είναι η δόση, η οδός και το χρονικό διάστημα χορήγησης, καθώς και οι συγκεντρώσεις βασικών ενδογενών αντιοξειδωτικών στο αίμα σε κατάσταση ηρεμίας. Αυτό σημαίνει ότι ένα χορηγούμενο αντιοξειδωτικό είναι πιο πιθανό να δράσει ευεργετικά σε έναν οργανισμό, ο οποίος έχει αυτό ή άλλα βιολογικά συναφή αντιοξειδωτικά σε έλλειψη ή σε χαμηλή συγκέντρωση ηρεμίας παρά σε κάποιον, που δε φαίνεται να αντιμετωπίζει αυτό το ζήτημα. Εν κατακλείδι, τα *in vitro* πειράματα δίνουν πολλές πληροφορίες για το βιολογικό χαρακτηρισμό μίας ουσίας, ωστόσο, δεν προδιαθέτουν την *in vivo* δράση της ουσίας αυτής.

Ερώτημα 2ο: Αντανακλά η μέτρηση συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής στο αίμα την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών;

Κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων σε πειραματόζωα, λαμβάνονται αίμα και ιστοί ώστε να μετρηθούν βιοδείκτες και να δοθούν στο μέτρο του δυνατού απαντήσεις στα ερωτήματα

που τίθενται. Παρόμοιες μελέτες στον άνθρωπο, όμως, έχουν εξ ορισμού έναν σημαντικό περιορισμό αναφορικά με τη δειγματοληψία. Εκτός από το αίμα, ο μόνος κύριος ιστός που είναι εφικτό να ληφθεί, με όχι ωστόσο ιδιαίτερα εύκολο τρόπο τόσο από την πλευρά του ερευνητή όσο και του συμμετέχοντα, είναι ο μυϊκός ιστός (λήψη μυϊκής βιοψίας). Παρότι οι ερευνητές ενδιαφέρονται για τις επιδράσεις παρεμβάσεων, όπως η χορήγηση διατροφικών αντιοξειδωτικών ή ξενοβιοτικών, σε διαφορετικούς ιστούς (π.χ. ήπαρ, καρδιακός μυς, νεφρός), κάτι τέτοιο δεν μπορεί να διαπιστωθεί πειραματικά με τη μέτρηση βιοδεικτών στους εν λόγω ιστούς στον άνθρωπο. Σε τέτοιου είδους ολιστικές προσεγγίσεις, μελέτη δηλαδή της δράσης μίας χορηγούμενης ουσίας στο αίμα αλλά και σε διάφορους ιστούς, χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, με πιο κοινά τους επίμους, τα ποντίκια και τα κουνέλια. Για τους παραπάνω λόγους, θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό αν μπορούσαν να υιοθετηθούν κάποιοι βιοδείκτες που να μετρώνται στο αίμα και να αντανakλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση κάποιων ιστών, όχι απαραίτητα ποσοτικά αλλά κυρίως ποιοτικά. Το επιστημολογικό παράδειγμα που επικρατούσε στη βιβλιογραφία τις προηγούμενες δεκαετίες θεωρούσε το αίμα έναν αδρανή ιστό, ο οποίος είναι απλά δέκτης των δραστικών μορφών και γενικότερα των μορίων που παράγονται στο σκελετικό μυ και τους άλλους ιστούς. Αυτή η άποψη έχει αλλάξει καθώς όλο και περισσότεροι ερευνητές παύουν να είναι θιασώτες της μυο-κεντρικής (και ιστο-κεντρικής) αυτής αντίληψης. Το αίμα αποτελεί αναμφισβήτητα μεταφορέα διαφόρων μορίων, που παράγονται στους ιστούς. Ταυτόχρονα, όμως, είτε παράγει το ίδιο εν δυνάμει οξειδωτικά μόρια και παράγοντες-βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες, είτε τροποποιεί δομικά και λειτουργικά τα μόρια που δέχεται από τους υπόλοιπους ιστούς ως παράγωγα της οξειδωτικής τους τροποποίησης. Η προεκβολή των πειραματικών συμπερασμάτων από το αίμα στους ιστούς μερικές φορές γίνεται αυθόρμητα, ωστόσο δε φαίνεται να ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα για όλους τους ιστούς. Αναφέρεται ενδεικτικά ότι, σύμφωνα με μελέτες, βιοδείκτες όπως η GSH και η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) αντανakλούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του σκελετικού και του καρδιακού μυός όταν μετρηθούν στο αίμα επιμύων που βρίσκονται σε ηρεμία (Veskoukis και συν. 2009). Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (βιοδείκτης οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών) του αίματος φάνηκε ότι έχουν θετική συσχέτιση με τον καρδιακό μυ σε επίμους που τρέφονται με δίαιτα πλούσια σε σίδηρο (Argüelles και συν. 2004). Συμπερασματικά, η σωστή πειραματική προσέγγιση του ερωτήματος αυτού μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες αναφορικά με τη συσχέτιση των δεδομένων συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής του αίματος με την κατάσταση ιστών του ανθρώπου, στους οποίους τέτοιου είδους μετρήσεις είτε μπορούν να πραγματοποιηθούν έμμεσα είτε καθόλου.

Ερώτημα 3ο: Μπορούν πραγματικά τα ζωικά μοντέλα και κυρίως τα τρωκτικά να προσφέρουν αξιόπιστες απαντήσεις για τη βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού;

Ένα από τα θεμελιώδη ερωτήματα της έρευνας στον κλάδο της Βιολογίας είναι εάν η χρήση ζωικών μοντέλων και κυρίως τρωκτικών (επίμους, ποντίκια) μπορεί να συμβάλει στη μελέτη και την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας των βιολογικών συστημάτων του ανθρώπου. Οι ζωικοί οργανισμοί και κυρίως οι επίμους έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα και στο πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας. Οι λόγοι γίνονται εύκολα κατανοητοί αν αναλογιστεί κανείς τόσο το γεγονός ότι η φυσιολογία τους μοιάζει πολύ με τη φυσιολογία του ανθρώπου όσο και την ευκολία με την οποία μπορούν αφενός να εφαρμοστούν οι

διάφορες ερευνητικές παρεμβάσεις και αφετέρου να γίνει η δειγματοληψία αίματος και κυρίως ιστών. Είναι αυτονόητο ότι τα πειράματα με τη χρήση ζώων πρέπει να υπακούουν σε αυστηρούς κανόνες που έχουν θεσπιστεί από τη νομοθεσία αλλά και από την ίδια την ηθική του ερευνητή, ώστε τα ζώα να μην υποφέρουν από τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Στόχος των μελετών σε ζωικά μοντέλα είναι η προεκβολή των συμπερασμάτων στον ανθρώπινο οργανισμό ώστε να κατανοηθεί ο τρόπος απόκρισής του σε ένα ερέθισμα, όπως είναι η άσκηση, η διατροφή ή η έκθεση σε ξενοβιοτικά, που είναι ικανό να μεταβάλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση. Για να δώσει μία μελέτη πληροφορίες σχετικά με το ερώτημα αυτό, θα πρέπει να είναι πολύ λεπτομερώς σχεδιασμένη ώστε, σε περίπτωση σύγκρισης δύο ειδών (άνθρωπος και τρωκτικό) να εφαρμόζονται οι ίδιες πειραματικές παρεμβάσεις με τον ίδιο, κατά το δυνατό, τρόπο. Σε μία τέτοια μελέτη βρέθηκε ότι ο επίμυς είναι ένα ικανοποιητικό μοντέλο για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του ανθρώπου μετά από άσκηση, αλλά όχι μετά από μία διατροφική παρέμβαση (χορήγηση βιταμίνης C) (Veskoukis και συν. 2016b). Επομένως, στόχος τέτοιων προσεγγίσεων δεν είναι να προσφέρουν γενικευμένα συμπεράσματα αλλά πιο εστιασμένες απαντήσεις για συγκεκριμένες πειραματικές παρεμβάσεις κάτω από δεδομένες συνθήκες.

Ερώτημα 4ο: Υπάρχουν δραστικές μορφές και αντιοξειδωτικά μόρια με κλινική σημασία;

Ορισμένες παθήσεις, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, οδηγούν σε πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω της αύξησης του οξειδωτικού φορτίου των κυττάρων (Halliwell και Gutteridge 2015). Πολλές εργασίες έχουν μετρήσει ως αποτέλεσμα αυτών των παθήσεων στον οργανισμό πασχόντων αυξημένες συγκεντρώσεις κάποιων δραστικών μορφών καθώς και μορίων που καταδεικνύουν οξείδωση μακρομορίων (έχουν οριστεί ως βιοδείκτες οξειδοαναγωγής, όπως αναφέρεται σε προηγούμενη ενότητα του κεφαλαίου αυτού). Το ερώτημα, ωστόσο, που ανακύπτει είναι αν υπάρχουν δραστικές μορφές ή αντιοξειδωτικά μόρια με κλινική σημασία (Veskoukis και συν. 2020, Ghezzi και συν. 2020, Ghezzi 2020). Ο όρος κλινική σημασία αναφέρεται στη σχέση αιτίου-αιτιατού με μία πάθηση. Η επιστημονική κοινότητα γνωρίζει σήμερα ότι υπάρχουν βιοδείκτες οξειδοαναγωγής που αποτελούν αιτιατό (αποτέλεσμα) μίας ασθένειας αλλά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να δείχνουν ότι κάποιοι βιοδείκτες οξειδοαναγωγής έχουν σχέση αιτίου με μία πάθηση, αποτελούν δηλαδή την αιτία εμφάνισης κάποιας ασθένειας. Υπάρχουν συγκεκριμένοι λόγοι για τους οποίους δεν έχει τεκμηριωθεί η κλινική σημασία των δραστικών μορφών. Κάποιοι από αυτούς ενδεικτικά είναι οι εξής: i) η μέτρησή τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη διότι έχουν εξαιρετικά χαμηλό χρόνο ημιζωής (της τάξης ακόμα και των δισεκατομμυριοστών του δευτερολέπτου), ii) παράγονται από θεμελιώδεις φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου, όπως μεταβολισμός, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να διαχωριστεί η παθολογική από τη φυσιολογική παραγωγή τους καθώς δε γίνεται να μετρηθούν, iii) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (άγνωστες και διαφορετικές για κάθε δραστική μορφή) είναι απαραίτητες για το κύτταρο καθώς συμμετέχουν σε πολύ σημαντικές βιολογικές διεργασίες (Veskoukis και συν. 2020). Αποτέλεσμα αυτών των δεδομένων είναι να μην υπάρχουν συγκεντρώσεις αναφοράς μεταξύ παθολογικών και υγιών καταστάσεων για τις δραστικές μορφές ή ακόμα και για βιοδείκτες που μπορούν να μετρηθούν στους ιστούς αξιόπιστα, όπως η γλουταθειόνη.

VIII. Συμπεράσματα

Η Τοξικολογία και η Οξειδοαναγωγική Βιολογία είναι αλληλοσυνδεόμενα ερευνητικά πεδία. Και τα δύο χαρακτηρίζονται από πρόσφατες αλλαγές σε βασικές αντιλήψεις τους (perception shifts). Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση μιγμάτων ξενοβιοτικών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (κάτω από το NOAEL) για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ζωικούς οργανισμούς προκαλεί τοξικότητα και οξειδωτικό στρες. Αντίστοιχα, η άποψη ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι αποκλειστικά επιβλαβείς δομές έχει δώσει τη θέση της στην γνώση ότι σε βέλτιστες συγκεντρώσεις επιτελούν θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες. Η έκθεση των οργανισμών σε ξενοβιοτικά μπορεί να τροποποιήσει την οξειδοαναγωγική τους ομοιόσταση και οι αλλαγές αυτές μπορούν να εκτιμηθούν με την ορθή και προσεκτική χρήση συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής. Πρέπει, ωστόσο, να λαμβάνεται υπόψη και ο ρόλος της διατροφής σε τέτοιες μελέτες καθώς αποτελεί καθοριστικό παράγοντα τροποποίησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του αίματος και των ιστών που προκαλείται από τη δράση των ξενοβιοτικών.

ΙΧ. Βιβλιογραφικές αναφορές

Argüelles, S., García, S., Maldonado, M., Machado, A., Ayala, A., 2004. Do the serum oxidative stress markers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim. Biophys. Acta* 1674: 251–259.

Biomarkers Definitions Working Group., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69 (3), 89-95.

Cairns, S.P., 2006. Lactic acid and exercise performance: culprit or friend? *Sports Med.* 36 (4), 279-91.

Campion, S., Aubrecht, J., Boekelheide, K., Brewster, D.W., Vaidya, V.S., Anderson, L., Burt, D., Dere, E., Hwang, K., Pacheco, S., Saikumar, J., Schomaker, S., Sigman, M., Goodsaid, F., 2013. The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 9 (11), 1391-408.

Docea, A.O., Calina, D., Goumenou, M., Neagu, M., Gofita, E., Tsatsakis, A., 2016. Study design for the determination of toxicity from long-term-low-dose exposure to complex mixtures of pesticides, food additives and lifestyle products. *Toxicol Lett.* 258, S179-S.

Docea, A.O., Gofita, E., Goumenou, M., Calina, D., Rogoveanu, O., Varut, M., Olaru, C., Kerasioti, E., Fountoucidou, P., Taitzoglou, I., Zlatian, O., Rakitskii, V.N., Hernandez, A.F., Kouretas, D., Tsatsakis, A., 2018. Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats. *Food Chem Toxicol.* 115, 470-481.

Docea, A.O., Goumenou, M., Calina, D., Arsene, A.L., Dragoi, C.M., Gofita, E., Pisoschi, C.G., Zlatian, O., Stivaktakis, P.D., Nikolouzakis, T.K., Kalogeraki, A., Izotov, B.N., Galateanu, B., Hudita, A., Calabrese, E.J., Tsatsakis, A., 2019. Adverse and hormetic effects in rats exposed for 12 months to low dose mixture of 13 chemicals: RLRs part III. *Toxicol Lett.* 310, 70-91.

ENTOX/TIWET (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and The Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University). *Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology*. In: Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons. 50 ed. Ed. CD Klaassen. McGraw-Hill, USA, pp. 883-905, 1996.

Fountoucidou, P., Veskoukis, A.S., Kerasioti, E., Docea, A.O., Taitzoglou, I.A., Liesivuori, J., Tsatsakis, A., Kouretas D., 2019. A mixture of routinely encountered xenobiotics induces both redox adaptations and perturbations in blood and tissues of rats after a long-term low-dose exposure regimen: The time and dose issue. *Toxicol Lett.* 317, 24-44.

Ghezzi, P., 2020. Environmental risk factors and their footprints in vivo - A proposal for the classification of oxidative stress biomarkers. *Redox Biol.* 34, 101442.

Ghezzi, P., Ghiara, V., Davies, K. Epistemological challenges of the oxidative stress theory of disease and the problem of biomarkers. *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 13-27, 2020.

Giboney, P.T., 2005. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician*. 71 (6), 1105-10.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free radicals in biology and medicine*, 5th ed. Oxford University Press.

Kerasioti, E., Kiskini, A., Veskoukis, A., Jamurtas, A., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A.M., Koutedakis, Y., Stagos, D., Kouretas, D., Karathanos, V., 2012. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol*. 50 (8), 2805-10.

Kim, S.H., Park, K.S., Chang, M.J., Sung, J.H., 2005. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness*, 45 (2), 178–182.

Margaritelis, N.V., Cobley, J.N., Paschalis, V., Veskoukis, A.S., Theodorou, A.A., Kyparos, S., Nikolaidis, M.G., 2016. Going retro: Oxidative stress biomarkers in modern redox biology. *Free Radic Biol Med*. 98, 2-12.

Margaritelis, N.V., Paschalis, V., Theodorou, A.A., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., 2018. Antioxidants in Personalized Nutrition and Exercise. *Adv Nutr*. 9 (6), 813-823.

Picó, C., Serra, F., Rodríguez, A.M., Keijer, J., Palou, A., 2019. Biomarkers of Nutrition and Health: New Tools for New Approaches. *Nutrients* 11 (5), 1092.

Silbergeld, E.K., Davis, D.L., 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem*. 40 (7), 1363-1367.

Spanidis, Y., Veskoukis, A.S., Papanikolaou, C., Stagos, D., Priftis, A., Deli, C.K., Jamurtas, A.Z., Kouretas, D., 2018. Exercise-Induced Reductive Stress Is a Protective Mechanism against Oxidative Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, 3053704.

Sykiotis, G.P., Kalliolias, G.D., Papavassiliou, A.G., 2005. Pharmacogenetic principles in the Hippocratic writings. *J Clin Pharmacol*. 45 (11), 1218-20.

Tsatsakis, A.M., Docea, A.O., Tsitsimpikou, C., 2016. New challenges in risk assessment of chemicals when simulating real exposure scenarios; simultaneous multi-chemicals' low dose exposure. *Food Chem Toxicol*. 96, 174-6.

Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., Tzatzarakis, M.N., Stivaktakis, P., Tsarouhas, K., Golokhvast, K.S., Rakitskii, V.N., Tutelyan, V.A., Hernandez, A.F., Rezaee, R., Chung, G., Fenga, C., Engin,

A.B., Neagu, M., Arsene, A.L., Docea, A.O., Gofita, E., Calina, D., Taitzoglou, I., Liesivuori, J., Hayes, A.W., Gutnikov, S., Tsitsimpikou, C., 2017. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. *Hum Exp Toxicol*. 36 (6), 554-564.

Tsatsakis, A.M., Vassilopoulou, L., Kovatsi, L., Tsitsimpikou, C., Karamanou, M., Leon, G., Liesivuori, J., Hayes, A.W., Spandidos, D.A., 2018. The dose response principle from philosophy to modern toxicology: The impact of ancient philosophy and medicine in modern toxicology science. *Toxicol Rep*. 5, 1107-1113.

Veskoukis, A.S., 2020. Redox signalling and antioxidant defence in pathogenic microorganisms: a link to disease and putative therapy. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press, San Diego, pp. 87-95.

Veskoukis, A.S., Goutianos, G., Paschalis, V., Margaritelis, N.V., Tzioura, A., Dipla, K., Zafeiridis, A., Vrabas, I.S., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., 2016b. The rat closely mimics oxidative stress and inflammation in humans after exercise but not after exercise combined with vitamin C administration. *Eur J Appl Physiol*. 116 (4), 791-804.

Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., Kouretas, D., 2019. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Curr Opin Toxicol*. 13, 99-109.

Veskoukis, A.S., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., Stagos, D., Aligiannis, N., Halabalaki, M., Chronis, K., Goutzourelas, N., Skaltsounis, L., Kouretas, D., 2012a. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev*. 2012, 185867.

Veskoukis, A.S., Kyparos, A., Paschalis, V., Nikolaidis, M.G., 2016a. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers* 21 (3), 208-17.

Veskoukis, A.S., Kyparos, A., Stagos, D., Kouretas, D., 2010. Differential effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on albumin concentration in rat tissues. *Appl Physiol Nutr Metab*. 35 (3), 244-50.

Veskoukis, A.S., Margaritelis, N.V., Kyparos, A., Paschalis, V., Nikolaidis, M.G., 2018a. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network. *Redox Rep*. 23 (1), 47-56.

Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., Kouretas, D., 2008. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 33 (6), 1140-54.

Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Kouretas, D., 2009. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med.* 47 (10), 1371-4.

Veskoukis, A.S., Paschalis, V., Kyparos, A., Nikolaidis, M.G., 2018b. Administration of exercise-conditioned plasma alters muscle catalase kinetics in rat: An argument for in vivo-like K_m instead of in vitro-like V_{max} . *Redox Biol.* 15, 375-379.

Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A., Kouretas D., 2012b. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* 17 (1), 11-21.

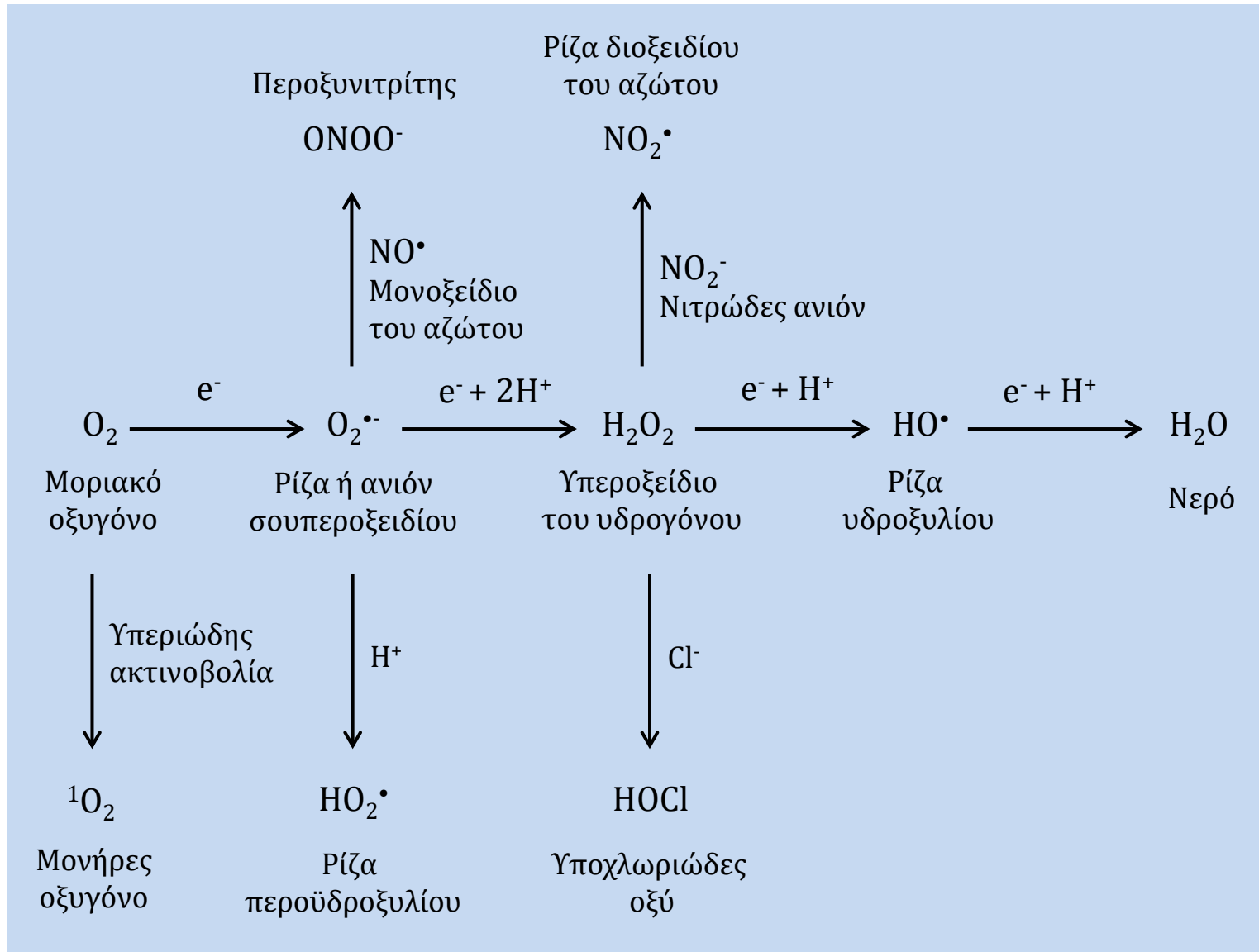
Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A., Kouretas D., 2020. Approaching reactive species in the frame of their clinical significance: A toxicological appraisal. *Food Chem Toxicol.* 138, 111206.

Χ. Λεζάντες εικόνων

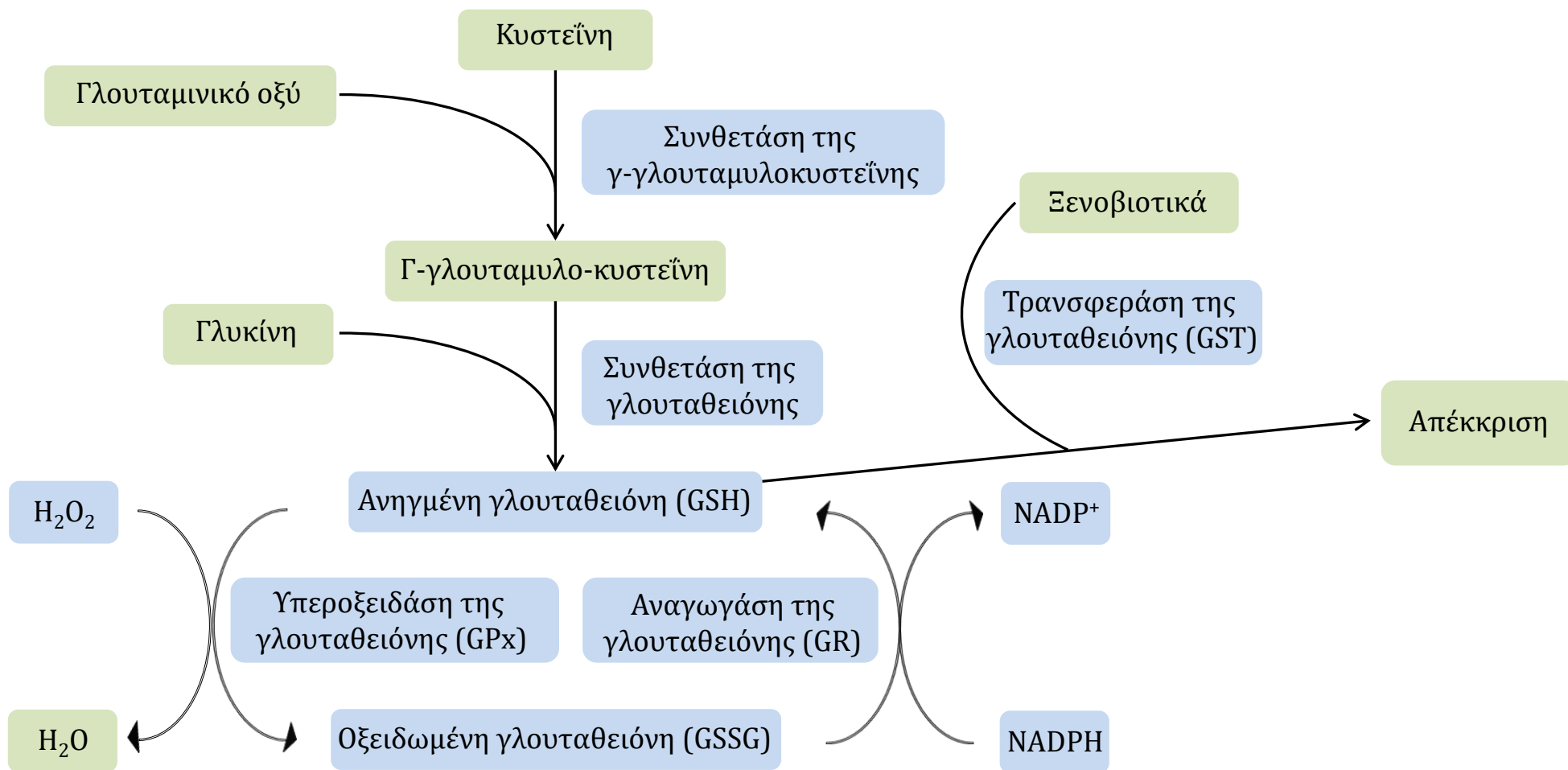
Εικόνα 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου ως προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου.

Εικόνα 2. Το μονοπάτι σύνθεσης της γλουταθειόνης και ορισμένες βασικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με τη συμμετοχή της μαζί με τα ένζυμα που τις καταλύουν. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που συντίθεται από τρία αμινοξέα, την κυστεΐνη, το γλουταμινικό οξύ και τη γλυκίνη. Είναι πολύ σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο με πολυσχιδή δράση. Οι δράσεις του αυτές οφείλονται εν πολλοίς στη σουλφυδρυλομάδα (-SH) της κυστεΐνης. Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ανάγει ελεύθερες ρίζες άμεσα καθώς και υπεροξείδια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx) και, ταυτόχρονα, η ίδια οξειδώνεται μετατρέπόμενη σε ένα δισουλφίδιο (GSSG) που προέρχεται από την ένωση δύο μορίων GSH μετά από την αποβολή του υδρογόνου της σουλφυδρυλομάδας. Η GSSG μετατρέπεται ξανά στη βιολογικά χρήσιμη GSH με τη δράση του ενζύμου αναγωγής της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) με ταυτόχρονη μετατροπή της ανηγμένης μορφής του νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτιδίου (NADPH) στην οξειδωμένη του μορφή (NADP⁺). Η γλουταθειόνη παίζει αποφασιστικό ρόλο και στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών από τον οργανισμό. Με την καταλυτική δράση του ενζύμου μεταφοράς της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase, GST), το οποίο αποτελεί βασικό ένζυμο των αντιδράσεων της φάσης II του μεταβολισμού, συζευγνύεται με διάφορα ξενοβιοτικά μόρια συμβάλλοντας στην απέκκρισή τους. Τα μόρια που βρίσκονται σε μπλε φόντο αποτελούν βιοδείκτες οξειδοαναγωγής του μονοπατιού της γλουταθειόνης.

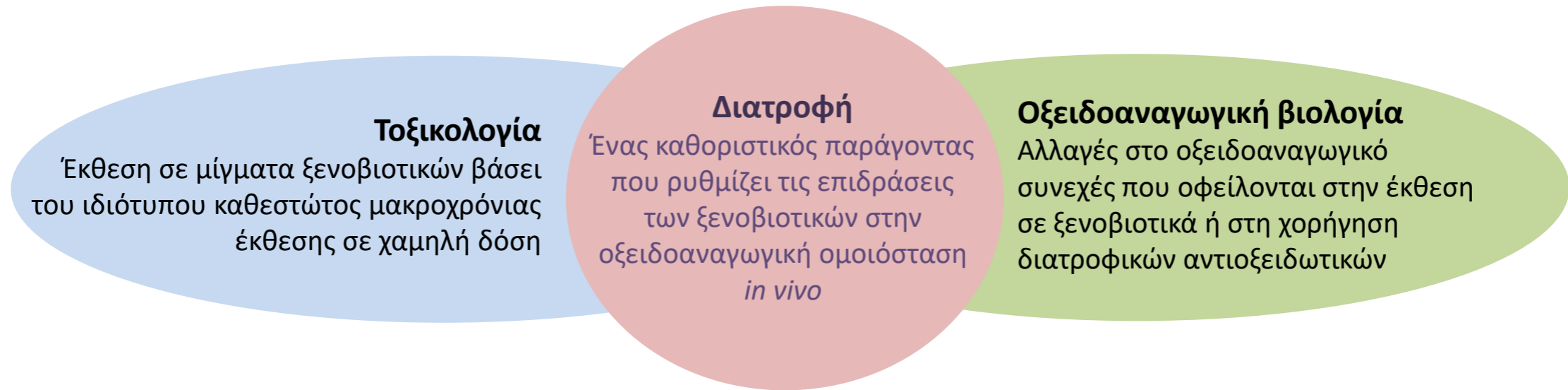
Εικόνα 3. Η διατροφή είναι ένας παράγοντας που σε μεγάλο βαθμό καθορίζει την επίδραση μιγμάτων ξενοβιοτικών στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του οργανισμού.



Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3

Ο Αριστείδης Βεσκούκης είναι Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης στο Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα Τρίκαλα. Πήρε το πτυχίο του (2005) και το διδακτορικό του (2010) από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα. Κατόπιν, εργάστηκε ως Μεταδιδακτορικός Ερευνητής στο ίδιο Τμήμα καθώς και στο Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού Σερρών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Έχει δημοσιεύσει 4 κεφάλαια σε βιβλία και 60 άρθρα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με το σύστημα των κριτών. Το έργο του έχει περισσότερες από 1.400 αναφορές (citations) με h-index 21. Τα ερευνητικά του ενδιαφέροντα περιλαμβάνουν τη μελέτη της επίδρασης διατροφικών αντιοξειδωτικών και ξενοβιοτικών καθώς και της άσκησης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό (ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών) *in vitro* και *in vivo*. Επίσης, μελετάει την επιστημολογία και την ιστορική εξέλιξη της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας και της Τοξικολογίας.