



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΘΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΑΠΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΒΟΛΙΚΟΥ ΝΑΝΔΡΟΛΟΝΗ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ ΙΜΙΔΑΚΛΟΠΡΙΔΗ



Επιτροπάκη Ζωή
Λάρισα 2016



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αριστείδης Τσατσάκης : Καθηγητής Τοξικολογίας στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	6
1.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	9
• Σουπεροξειδίου ή ανιόν του σουπεροξειδίου($O_2^{\bullet -}$)	9
• Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet})	10
• Υπεροξειδικές ρίζες (ROO^{\bullet})	10
• Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)	10
1.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΧΛΩΡΙΟΥ	11
Ρίζα τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\bullet})	11
1.4 ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	11
1.4.1 Ενδοκυτταρικές πηγές	12
1) Οξειδωτική φωσφορύλιωση	12
2) Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450	13
3) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	13
4) Αιμοσφαιρίνη/Μυοσφαιρίνη	14
5) Φλεγμονή: ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα	14
6) Αντιδράσεις αυτοοξειδωσης	14
1.4.2 Εξωκυτταρικές πηγές	15
Υπεριώδεις και ιονίζουσες ακτινοβολίες	15
1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ROS ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	16
• Αρνητικές επιδράσεις	16
• Θετικές επιδράσεις	18
1.6 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	19
1.7 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	20
1.8.1 ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	21
1.8.2 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ	22
• Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	22
• Καταλάση (CAT)	22
• Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	22
1.8.3 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ	23
Αναγωγή της γλουταθειόνης	23

1.8.4 ΜΗ ENZYMΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	23
• Γλουταθειόνη	23
• Βιταμίνη E	24
• Βιταμίνη C	25
• Β-Καροτένιο	26
• Ουρικό οξύ	26
• Συνένζυμο Q10	26
• Σελήνιο	26
1.9 ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ ΑΝΔΡΟΓΟΝΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ (AAS)	26
1.9.1 Ορμόνη Τεστοστερόνη και μηχανισμός δράσης της	26
1.9.2 Εφαρμογές στον αθλητισμό	29
1.10 ΝΑΝΔΡΟΛΟΝΗ	29
1.10.1 Οφέλιμες δράσεις της νανδρολόνης	30
1.10.2 Ανεπιθύμητες δράσεις της νανδρολόνης	31
1.11 ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ ENTOMOKTONA	31
1.11.1 Ιμιδακλοπρίδη	32
1.11.2 Τρόπος δράσης της	32
1.12 ΝΕΦΡΟΙ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ	33
1.12.1 Ανατομία νεφρών κουνελιών	33
1.12.2 Λειτουργία των νεφρών	36
2. ΣΚΟΠΟΣ	37
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.1 Πρωτόκολλο ζώων και χορήγησης	40
3.2 Κουνέλια ως πειραματόζωα	40
3.2 Χειρισμός αίματος	42
3.3 Πείραμα νανδρολόνης	43
3.3.1 Ομογενοποίηση νεφρών	43
3.3.2 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε νεφρούς κουνελιών	44
• Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)	44
• Προσδιορισμός Καταλάσης	47
• Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	50
• Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	53
• Πρωτεϊνικά καρβονύλια	55
3.4 Πείραμα ιμιδακλοπρίδης	59
Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα κουνελιών	59

• Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)	59
• Δραστηριότητα της καταλάσης	60
• Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	61
• TBARS-Καρβονύλια	61
3.5 Στατιστική ανάλυση	62
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
4.1 Πείραμα νανδρολόνης	62
4.2 Πείραμα ιμιδακλοπρίδης	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
5.1 Πείραμα νανδρολόνης	68
5.2 Πείραμα ιμιδακλοπρίδης	70
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιούνται δύο διαφορετικά, ανεξάρτητα πειράματα, με μετρήσεις των δεικτών οξειδωτικού στρες σε νεφρούς και αίμα κουνελιών μετά από χορήγηση των ουσιών: νανδρολόνης (για το ένα) και ιμιδακλοπρίδης (για το άλλο). Αυτό γίνεται προκειμένου να εξάγουμε συμπεράσματα για την επίδραση αυτών, στον οργανισμό των ζώων και κατ' επέκταση του ανθρώπου.

Η νανδρολόνη είναι ένα από τα πιο δημοφιλή αναβολικά στεροειδή, το οποίο είναι συνθετικό παράγωγο της τεστοστερόνης. Έχει αρκετές ωφέλιμες δράσεις, μία από αυτές είναι η βελτίωση της αθλητικής απόδοσης. Ωστόσο κατάχρηση του στεροειδούς αναβολικού προξενεί δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Η ιμιδακλοπρίδη είναι ένα εντομοκτόνο, που ανήκει στην κατηγορία των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων, συνθετικά ανάλογα της φυσικής νικοτίνης.

Όσον αφορά το πείραμα με τη νανδρολόνη, χορηγήθηκε με τη μορφή δεκανοϊκής νανδρολόνης, προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος ημιζωής της. Τα κουνέλια χωρίστηκαν σε 4 ομάδες. Η πρώτη ήταν η ομάδα ελέγχου (control), για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Στη δεύτερη (HDIM) και τρίτη (LDIM) ομάδα χορηγήθηκε δεκανοϊκή νανδρολόνη ενδομυϊκά σε υψηλή και χαμηλή δόση, αντίστοιχα. Στην τέταρτη ομάδα (HDSC) το αναβολικό χορηγήθηκε υποδορίως σε υψηλή δόση. Μετά από ένα πειραματικό σχέδιο δύο διαδοχικών περιόδων χορήγησης και μη, τα ζώα θανατώθηκαν. Συλλέχθηκαν οι νεφροί τους και έπειτα από ειδικές διεργασίες, προσδιορίστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες στους ομογενοποιημένους ιστούς. Από τα αποτελέσματα που πήραμε παρατηρήσαμε μία σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH στην ομάδα HDIM και μία λιγότερο έντονη μείωση των επιπέδων στην ομάδα HDSC. Αλλαγές παρατηρήθηκαν επίσης και στα επίπεδα TBARS, με ιδιαίτερα σημαντική αύξηση των επιπέδων στις ομάδες HDIM και HDSC. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες, κατά τον προσδιορισμό των υπόλοιπων δεικτών οξειδωτικού στρες.

Στο δεύτερο πείραμα με την ιμιδακλοπρίδη οι ομάδες ήταν 3, κάθε μία από τις οποίες αποτελούνταν από 3 κουνέλια. Η μία ήταν η ομάδα control, η άλλη ήταν η ομάδα IMI, στα ζώα της οποίας χορηγήθηκε ιμιδακλοπρίδη σε δόση που αντιστοιχούσε περίπου στο $\frac{1}{4}$ της σχετικής θανατηφόρας δόσης (LD50) της ιμιδακλοπρίδης. Στα ζώα της τελευταίας ομάδας χορηγήθηκε η ίδια δόση ιμιδακλοπρίδης, σε συνδυασμό με διένυδρο βολφραμικό νάτριο (IMI+ST). Μετά από ένα πειραματικό σχέδιο, το οποίο χαρακτηρίζονταν από εναλλαγή ημερών χορήγησης και μη ανά βδομάδα, τα ζώα θανατώθηκαν και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα τους. Από τα αποτελέσματα που πήραμε, παρατηρήσαμε αλλαγές μόνο στην ομάδα IMI. Συγκεκριμένα, ήταν εμφανής μία σημαντική μείωση της ενεργότητας της καταλάσης και μία σημαντική αύξηση στη μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, σε σχέση πάντα με την ομάδα control. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις ομάδες κατά τον προσδιορισμό των υπόλοιπων δεικτών οξειδωτικού στρες.

ABSTRACT

In the present study we were performed two different, independent experiments. Oxidative stress markers in rabbit's kidney and blood were determined, after administration of substances: Nandrolone (for one study) and imidacloprid (for the other study). The aim was to examine their possible toxic effects on the body of animals and consequently humans.

Nandrolone is one of the most popular anabolic steroids, which is a synthetic derivative of testosterone. It has several beneficial effects, one of them is to improve athletic performance. However abution of anabolic steroid, causing adverse effects in the organism. Imidacloprid is an insecticide belonging to the class of the neonicotinoid insecticides, synthetic analogues of natural nicotine.

Regarding the experiment with the nandrolone, this was administered as nandrolone decanoate in order to increase its half-life. The rabbits were divided into 4 groups. The first was the control group. The second (HDIM) and third (LDIM) groups were intramuscularly treated with nandrolone decanoate at high and low dose, respectively. In the fourth group (HDSC) the anabolic was subcutaneously administered at a high dose. The experimental project consisted of two consecutive periods: administration and wash-out period. At the end of the treatment, the animals were sacrificed. Their kidneys were collected and then oxidative stress markers were determined in tissue homogenates. From the results, we observed a significant reduction in GSH levels in HDIM group and a less pronounced reduction of them in HDSC group. Changes were also observed in the TBARS levels, with a substantial increase in HDIM and HDSC groups. No significant differences were observed in any of the groups in the determination of the other oxidative stress markers.

In the second experiment with the imidacloprid, there were 3 groups. Each of them consisted of three rabbits. The first one was the control group, the second one was the IMI group, that consisted of animals, which were treated with imidacloprid, at a dose about $\frac{1}{4}$ of the relative lethal dose (LD50) of imidacloprid. In the rabbits of the third group the same dose of imidacloprid was given in combination with sodium tungstate dihydrate (IMI + ST). The experimental project consisted of administration and wash-out periods. At the end of the treatment, the animals were sacrificed. Measurements of oxidative stress markers were performed in the blood of the slaughtered rabbits. From the results, changes were observed only in the IMI group compared to control group. It was evident a significant reduction in the activity of catalase and a significant increase in the measurement of protein carbonyls. No significant changes were observed in any of the other groups in the determination of oxidative stress markers.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Σε κάθε άτομο και μόριο υπάρχουν ένας και περισσότεροι ατομικοί πυρήνες αντίστοιχα, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Αυτά κατατάσσονται σε ζεύγη και κινούνται σε καθορισμένες τροχιές γύρω από τον πυρήνα, που ορίζονται ως τροχιακά (ατομικά ή μοριακά). Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό*. Όταν όμως ένα άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους τότε αυτά ορίζονται ως ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και ενεργά καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηριότητά τους, γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος ⁽¹⁾.



Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο, όπως η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}). Συγκαταλέγονται επίσης οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), όπως η ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^{\cdot}) και η ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^{\cdot}), οι δραστικές μορφές θείου (RSS), όπως οι θειυλικές (RS^{\cdot}) και υπερθειυλικές ρίζες (RSS^{\cdot}) και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS), όπως η ρίζα τριχλωρομεθυλίου. Οι συγκεκριμένες ελεύθερες ρίζες απεικονίζονται αναλυτικότερα στον παρακάτω πίνακα:

Όνομα	Μοριακός Τύπος	Σχόλια/Παραδείγματα
Άτομο υδρογόνου	H•	Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα.
Trichloromethyl radical (ρίζα τριχλωρομεθυλίου)	CCl ₃ •	Αποτέλεσμα του μεταβολισμού του CCl ₄ .
Superoxide radical (ρίζα υπεροξειδίου)	O ₂ •-	Ρίζα με κεντρικό άτομο το οξυγόνο.
Hydroxyl radical (Ρίζα υδροξυλίου)	OH•	Πολύ δραστική, αντιδρά με όλα τα βιομόρια.
Thiyl/perthiyl radical (θειλικές/υπερθειλικές ρίζες)	RS• /RSS•	Ρίζες με κεντρικό άτομο το θείο.
Peroxyl (υπεροξυλικές ρίζες), alkoxyl (αλκοξυλικές ρίζες) radicals	RO ₂ • RO•	Δημιουργούνται κατά τη διάσπαση οργανικών υπεροξειδίων και από αντιδράσεις ριζών άνθρακα με O ₂ .
Οξειδία αζώτου	NO• , NO ₂ •	Το NO• παράγεται in vivo από L-αργινίνη, το NO ₂ • από την αντίδραση NO• με O ₂ .
Στοιχεία μεταπτώσεως	Fe, Cu, κ.α.	Ισχυροί καταλύτες αντιδράσεων ελευθέρων ριζών χάρη στην ιδιότητά τους να αλλάζουν αριθμό οξειδωσης.

Πίνακας 1: Παραδείγματα ελευθέρων ριζών

Πώς σχηματίζονται και με ποιους τρόπους μπορούν να αντιδράσουν οι ελεύθερες ρίζες με άτομα ή μόρια;

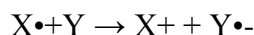
Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται, με τους παρακάτω τρόπους:

1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^{\bullet+}$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^{\bullet+} B^{\bullet-}$

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μόρια ή άτομα με τους εξής τρόπους:

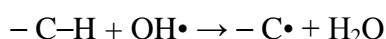
1. **Προσθετικώς**, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με ένα μόριο ή άτομο (π.χ. προσθήκη της ρίζας OH• στη βάση γουανίνη του DNA): $X\cdot + Y \rightarrow [X-Y]\cdot$

2. **Αναγωγικώς**, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτό της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο:



3. **Οξειδωτικώς**, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο ή άτομο : $X\cdot + Y \rightarrow X^- + Y\cdot+$

4. **Αφαιρετικώς**, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης είναι η προσβολή των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων από την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, με την οποία αρχίζει η σειρά αντιδράσεων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, που είναι ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικών βλαβών σε βιολογικές μεμβράνες ⁽²⁾:



1.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου⁽³⁾. Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες (*non-radicals*), όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl), αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών⁽⁴⁾.

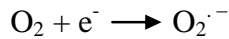
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου (O ₂ ^{•-})	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H ₂ O ₂)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH•)	Υποχλωριώδες Οξύ (HOCl)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO ₂ •)	Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO•)	Όζον (O ₃)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO ₂ •)	Μονήρες Οξυγόνο (¹ O ₂)

Πίνακας 2

- **Σουπεροξειδίο ή ανιόν του σουπεροξειδίου(O₂• -)**

Σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e⁻ σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



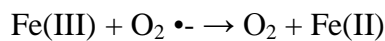
Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο O_2 από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου, μπορεί επίσης να σχηματιστεί από φαγοκύτταρα, κατά τη διάρκεια της δράσης τους, μέσω του ενζύμου NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων, που βρίσκεται στην κυτταρική τους μεμβράνη.

• Ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$)

Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες^{(2),(7),(8)}. Δύο πολύ σημαντικές αντιδράσεις στη βιοχημεία των ελεύθερων ριζών που οδηγούν στην παραγωγή της πολύ δραστικής ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου είναι:

1. Αντίδραση Fenton: $\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$
2. Αντίδραση Haber-Weiss: $\text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$

Το $\text{O}_2^{\cdot -}$ μπορεί επίσης να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή βοηθώντας ουσιαστικά να εξελιχθεί η αντίδραση Fenton:



. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου⁽²⁾.

• Υπεροξειδικές ρίζες ($\text{ROO}\cdot$)

Οι υπεροξειδικές ρίζες ($\text{ROO}\cdot$) εμπλέκονται κυρίως στη διεργασία της λιπιδιακής υπεροξειδωσης και θεωρούνται γενικά ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες. Μετά τη δράση ενός ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα (π.χ., της $\cdot\text{OH}$) σε οργανικές ενώσεις δημιουργούνται νέες ελεύθερες ρίζες, κυρίως σε άτομα άνθρακα. Αυτές, με τη σειρά τους, αντιδρούν με το διάχυτο στα βιολογικά υγρά O_2 σχηματίζοντας υπεροξυ- ρίζες⁽⁵⁾

• Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο (αναγωγή του οξυγόνου) σύμφωνα με την αντίδραση:



Στο μόριο του το H_2O_2 δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10 μ M). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το $OH\cdot$. Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων. Η τοξικότητα του H_2O_2 στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το H_2O_2 .

1.3. Δραστικές Ρίζες Χλωρίου

Ρίζα τριχλωρομεθυλίου ($CCl_3\cdot$)

Ο CCl_4 διασπάται ομολυτικά από το κυτόχρωμα P450 σε ελεύθερη ρίζα τριχλωρομεθυλίου ($Cl_3C\cdot$) και σε ρίζα χλωρίου ($Cl\cdot$). Η $Cl_3C\cdot$ προσβάλλει τα λιπαρά οξέα των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νέες ελεύθερες ρίζες μέσα στα λιπαρά οξέα. Ωστόσο η ελεύθερη ρίζα του τριχλωρομεθυλίου ($Cl_3C\cdot$) δεν είναι τόσο δραστική. Η αντίδραση του O_2 με την $Cl_3C\cdot$ δημιουργεί την περισσότερο δραστική ρίζα $Cl_3COO\cdot$ η οποία αντιδρά με τα ακόρεστα λιπίδια της μεμβράνης, προκαλώντας υπεροξείδωση των λιπιδίων.

1.4. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Μπορεί να παράγονται από ενδοκυτταρικές πηγές, δηλαδή μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος, καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου. Μπορεί επίσης να παράγονται από εξωκυτταρικές πηγές, όταν το σώμα εκτίθεται σε τοξικό για αυτό περιβάλλον.

Σε γενικές γραμμές, δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά:

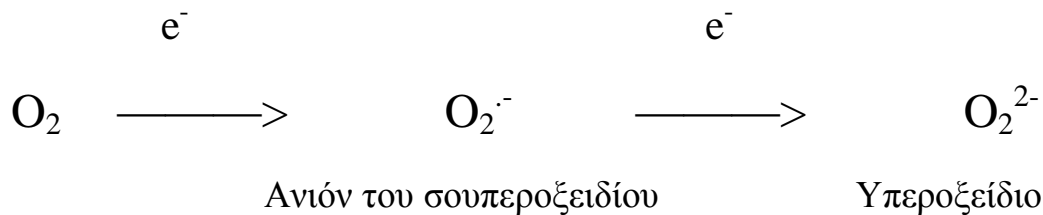
- τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας,
- τα προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- τη λιπιδική οξείδωση,
- την ακτινοβολία,
- τη φλεγμονή,
- το κάπνισμα
- τη μολυσμένη ατμόσφαιρα

1.4.1. Ενδοκυτταρικές πηγές

1) Οξειδωτική φωσφορυλίωση

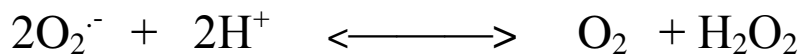
Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ATP που συνθέτουν οι περισσότεροι οργανισμοί. Λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και περιέχονται όλα τα ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αμινοξέων, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος. Περιλαμβάνει αναγωγή του O_2 σε H_2O με ηλεκτρόνια που προκύπτουν από το NADH και $FADH_2$ και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 ⁽⁶⁾. Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο ελλοχεύει κινδύνους. Συγκεκριμένα, η μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων οδηγεί σε ασφαλή προϊόντα (δύο μόρια ύδατος), αλλά η μερική αναγωγή παράγει επικίνδυνες ενώσεις. Ιδιαίτερα, η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο O_2 σχηματίζει το ανιόν του σουπεροξειδίου, ενώ η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων οδηγεί σε υπεροξείδιο:



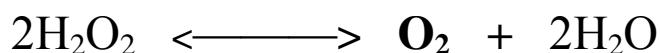
Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες κυτταρικές στρατηγικές άμυνας μπροστά στην οξειδωτική βλάβη από τις ROS. Συγκεκριμένα το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Mn-SOD).

Δισμουτάση του σουπεροξειδίου



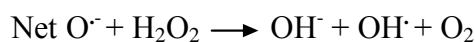
Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που σχηματίζεται από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου περισυλλέγεται από την καταλάση, η οποία καταλύει την αυτοοξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

Καταλάση



Επιπροσθέτως να πούμε ότι μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} :

Αντίδραση Haber-Weiss:

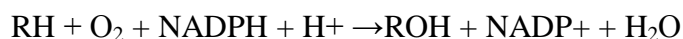


Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$)⁽⁹⁾. Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} .

2) Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό. Τα ένζυμα του συστήματος αυτού αποτελούνται από αιμοπρωτείνες, βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Κύριος μηχανισμός λειτουργίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα ξενοβιοτικό RH είναι η ακόλουθη:



Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, κάποιες φορές όμως η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει σε τοξικές ουσίες.

3) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών^{(10),(11)}. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα σε $O_2^{\cdot-}$.

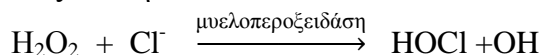
και H_2O_2 ⁽¹²⁾. Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής. ⁽¹³⁾.

4) Αιμοσφαιρίνη/Μυοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS ^{(14),(15)} και συγκεκριμένα σε $O_2^{\bullet-}$. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 ⁽¹⁶⁾.

5) Φλεγμονή: ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα

Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών. Για παράδειγμα τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια ⁽¹⁷⁾. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς. Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\bullet-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες, ενώ το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση.



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξειδωση των λιπιδίων ⁽¹⁸⁾.

6) Αντιδράσεις αυτοοξειδωσης

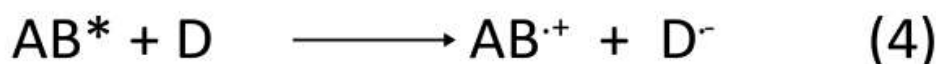
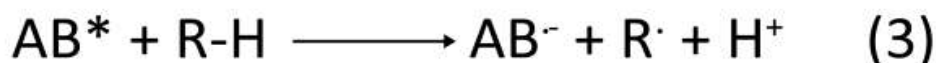
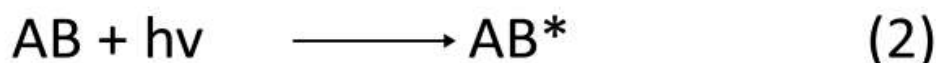
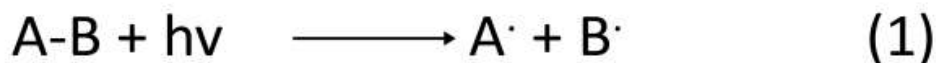
Πολλά μόρια με σημαντικούς βιολογικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα οι τετραϋδροπτερίνες, οι θειολικές ενώσεις (περιέχουν μια $-SH$ ομάδα), ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη, οι ορμόνες αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και L-DOPA

(διυδροξυφαινυλαλανίνη), οι ανηγμένες φλαβοενώσεις (FMNH₂ και FADH₂) και πολλές άλλες, παρουσία O₂, έχουν την ικανότητα αυτοοξειδωσης, σχηματίζοντας O₂·-. Το σχηματιζόμενο O₂·-, στη συνέχεια, συμβάλλει στην περαιτέρω οξείδωση των εν λόγω ενώσεων σε μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές ευνοούνται παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης, κυρίως σιδήρου, ενώ είναι πολύ πιθανόν όλες οι αντιδράσεις αυτοοξειδωσης να απαιτούν την ύπαρξη ιόντων μετάλλων μετάπτωσης.

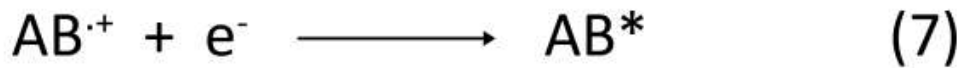
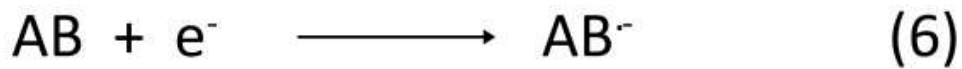
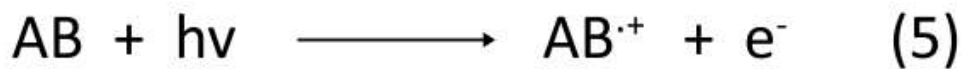
1.4.2. Εξωκυτταρικές πηγές

Υπεριώδεις και ιονίζουσες ακτινοβολίες

Οι υπεριώδεις ακτινοβολίες (200-400 nm) μπορούν να προκαλέσουν είτε τη φωτολυτική διάσπαση ευαίσθητων ομοιοπολικών δεσμών (A-B), προκαλώντας τη δημιουργία δύο ελευθέρων ριζών (αντίδραση 1), είτε τη διέγερση ορισμένων ενώσεων (AB*), οι οποίες, στη συνέχεια, έχουν την ικανότητα να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις (αντιδράσεις 2-4):



Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες περιλαμβάνουν τις ακτινοβολίες υψηλών συχνοτήτων (από υπεριώδεις έως γ-ακτινοβολίες) και υψηλής ενέργειας σωματίδια (νετρόνια, ηλεκτρόνια, πρωτόνια ή α-σωματίδια). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αρχική σύγκρουση προκαλεί την έξωση ενός ηλεκτρονίου, το οποίο όμως έχει αρκετά υψηλή ενέργεια και μπορεί να προκαλέσει μια νέα έξωση από ένα άλλο μόριο (αντιδράσεις 5-7):



Στην αντίδραση 7 δημιουργείται συνήθως ένα μόριο σε κατάσταση διέγερσης (AB^*), το οποίο μπορεί να υποστεί ομολυτική σχάση (αντίδραση 8):



ή να αποδώσει την ενέργειά του είτε ως θερμότητα είτε σε ένα άλλο μόριο επιστρέφοντας στην αρχική του κατάσταση.

Ακόμα το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες⁽¹⁹⁾. Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων^{(20),(21)} και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ^{(22),(23),(24),(25)}. Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή^{(26),(27),(28)}.

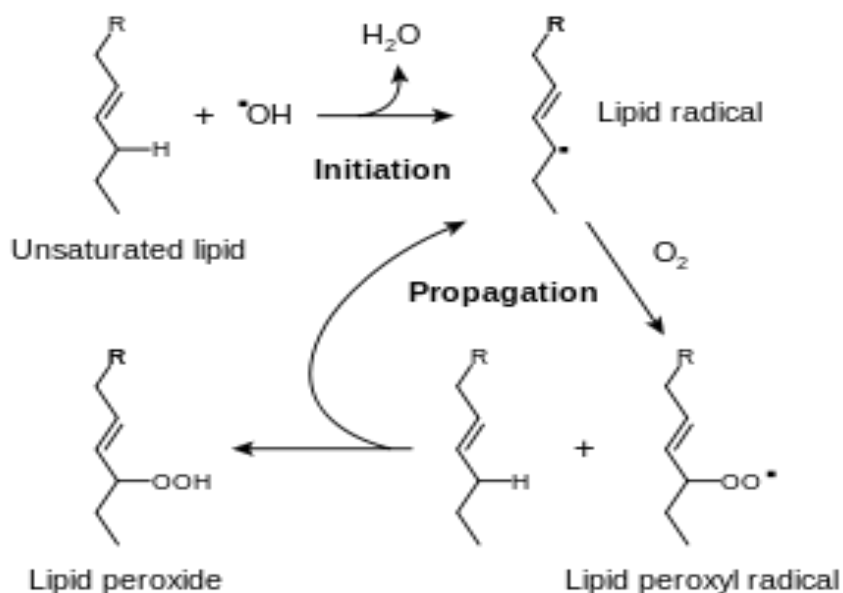
1.5. Επιδράσεις των ROS στον οργανισμό

Αρνητικές επιδράσεις

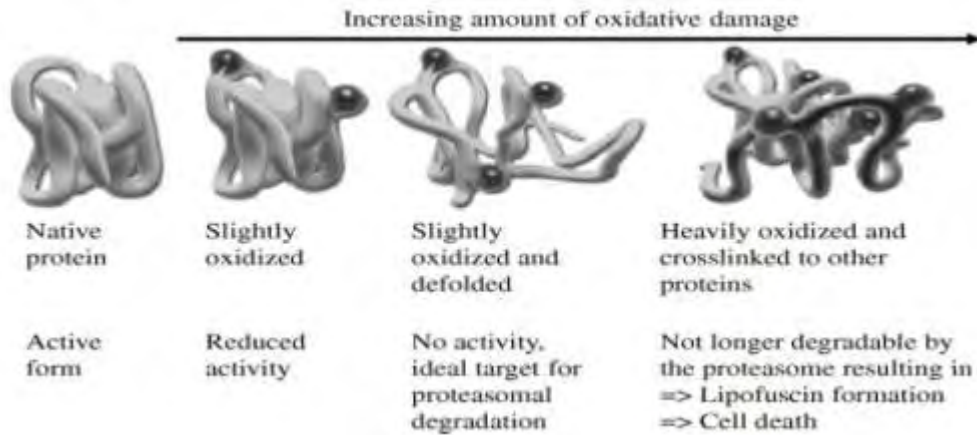
Οι ελεύθερες ρίζες έχουν κυρίως αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό, καθώς προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Συγκεκριμένα οι επιβλαβείς επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών για κάθε ένα από τα βιολογικά μακρομόρια είναι οι εξής:

Λιπίδια: Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ

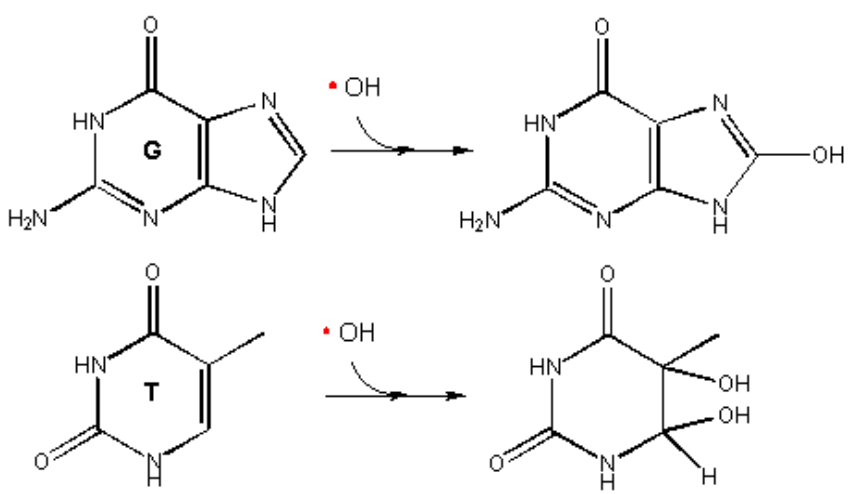
διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO· κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο ⁽²⁾.



Πρωτεΐνες: Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί αλλοιώσεις και τροποποιήσεις στην δομή τους με αποτέλεσμα την αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Τα αμινοξέα αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, όμως όταν ελεύθερες ρίζες [κυρίως υδροξυλικές ρίζες ($\text{OH}\cdot$)] αντιδρούν με τα αμινοξέα παράγονται οξειδωμένα αμινοξέα και πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία χρησιμοποιούνται και ως δείκτες οξειδωτικού στρες καθώς και ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής καταστροφής. Τα αμινοξέα που είναι ευαίσθητα στην οξείδωση είναι η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη, η θρεονίνη. Επίσης, η αλβουμίνη, ανευρίσκεται στο πλάσμα, και αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες μιας και δέχεται πολλές διαφορετικές τροποποιήσεις λόγω της οξείδωσης.



DNA: Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου($\text{OH}\cdot$) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων ^{(2),(4),(26),(29),(30),(31)}.



Εικόνα: Επίδραση της ρίζας υδροξυλίου στις βάσεις γουανίνη και θυμίνη

Θετικές επιδράσεις

Αξίζει να σημειωθεί πως οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά συμβάλλουν και στην ομαλή λειτουργία αυτού, καθώς συμμετέχουν σε διεργασίες απαραίτητες για τη σωστή του λειτουργία. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού

συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής⁽³²⁾. Επιπλέον οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά^{(33),(34),(35),(36)}. Για παράδειγμα, η προσθήκη υπεροξειδίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μια ποικιλία καλλιεργημένων κυττάρων οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό αντιγραφής του DNA τους και στον πολλαπλασιασμό αυτών, με άλλα λόγια, αυτές οι ρίζες λειτουργούν ως μιτογόνα. Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή^{(35),(36)}. Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για τη στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

1.6. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μία διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- ❖ **Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.** Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- ❖ **Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS).** Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

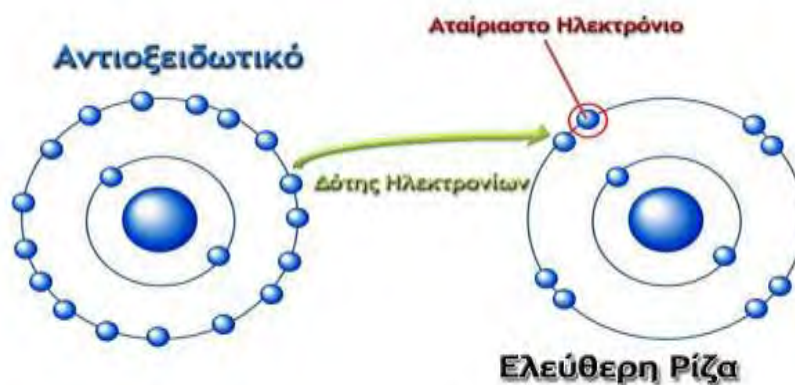
Το οξειδωτικό στρες έχει δείχθει ότι σχετίζεται με την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, ενώ επιπλέον, συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης⁽³⁷⁾. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παθολογικών καταστάσεων αποτελούν:

1. ορισμένες μορφές καρκίνου
2. η αθηροσκλήρυνση

3. οι φλεγμονώδεις ασθένειες (αρθρίτιδα, αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, ερυθματώδη λύκο)
4. ισχαιμικές ασθένειες (καρδιοπάθειες, εγκεφαλικό επεισόδιο, εντερική ισχαιμία)
5. αιμοχρωμάτωση
6. σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας
7. το εμφύσημα
8. η ηπατίτιδα
9. νευρολογικές διαταραχές (νόσος του Alzheimer, νόσος του Parkinson, μυϊκή δυστροφία)
10. ο αλκοολισμός
11. οι ασθένειες σχετίζονται με το κάπνισμα ⁽³⁸⁾

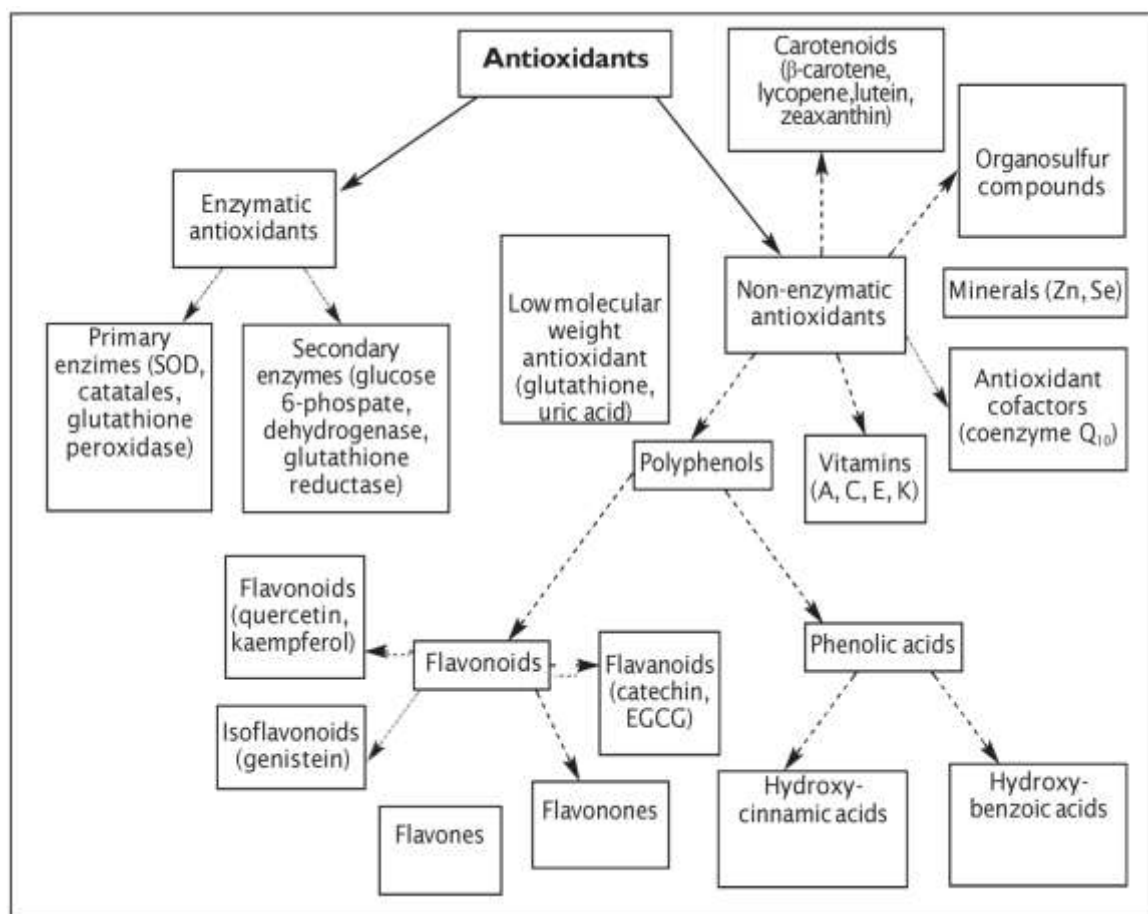
1.7. Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Ένα αντιοξειδωτικό είναι ένα μόριο αρκετά σταθερό για να δωρίσει ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα και να την εξουδετερώσει, μειώνοντας έτσι την ικανότητά της να προκαλέσει βλάβη.



Εικόνα 2: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

Κατάταξη των αντιοξειδωτικών ουσιών



Σχήμα 1: Κατάταξη αντιοξειδωτικών

1.8. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή ένζυμα, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χαρακτηρίζονται ως τριτογενή αντιοξειδωτικά, εξαιτίας του τρόπου δράσης τους, ο οποίος θα δούμε στη συνέχεια ποιος είναι.⁽³⁹⁾

1.8.1. Ενζυμικοί Μηχανισμοί

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε:

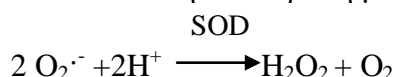
1. **Πρωτογενή**, των οποίων ο ρόλος είναι να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
2. **Δευτερογενή**, όπου ο ρόλος τους είναι να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια⁽⁴⁰⁾

1.8.2. Πρωτογενή

Η πρωτογενής άμυνα αποτελείται από τρία σημαντικά ένζυμα που εμποδίζουν το σχηματισμό ή εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Αυτά είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

❖ Σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν και άλλες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

❖ Καταλάση (CAT)

Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Η καταλάση καταλύει την διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .

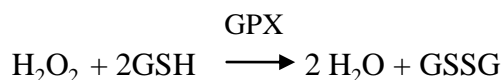


Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 ⁽¹⁾. Αποτελεί σημαντικό ένζυμο για τον οργανισμό καθώς προστατεύει από τις ROS.

❖ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Όπως και η καταλάση, έτσι

και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂ χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται ⁽⁴¹⁾



1.8.3. Δευτερογενή

Αναγωγή της γλουταθειόνης

Η αναγωγή της γλουταθειόνης αποτελεί το κύριο ένζυμο της δευτερογενούς άμυνας. Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.

1.8.4. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

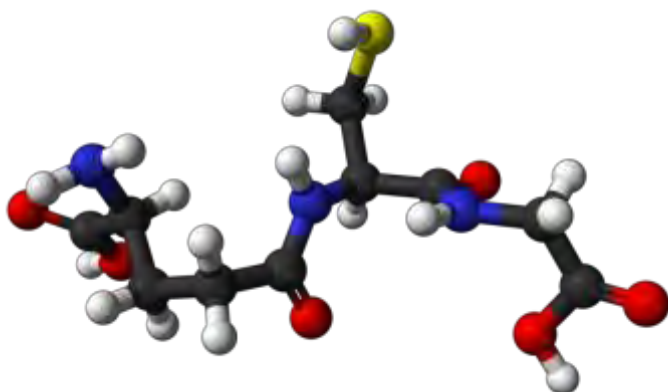
Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά αποτελούν τριτογενής μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού έναντι των ελεύθερων ριζών. Ο ρόλος τους έγκειται στο γεγονός ότι βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη βιταμίνη E, τη βιταμίνη C, το β-καροτένιο, τη γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

❖ Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος.

Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη.⁽⁴²⁾ Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται

διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω⁽¹⁾. Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 3. Δομή γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ($\text{ROOH}, \text{H}_2\text{O}_2$) και τις εξωγενείς ηλεκτρονιόφιλες (πχ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών⁽⁴³⁾.

❖ Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξείδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση⁽¹⁾.

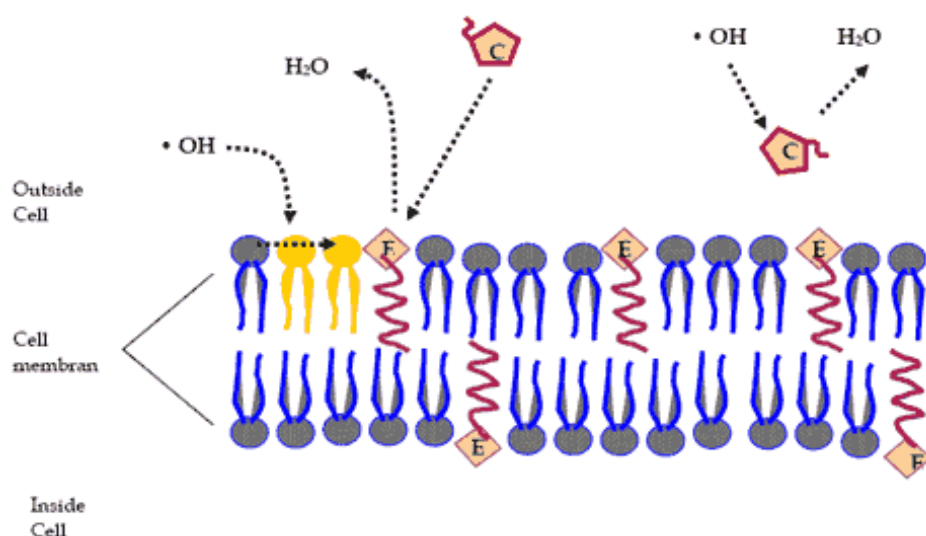
❖ Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS ⁽¹⁾. Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C. Είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο, ο οποίος δε μπορεί να τη βιοσυνθέσει, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη απουσιάζει.

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα συμπαράγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αυτές αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι άκρως απαραίτητες στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα επινεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών.

Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμο όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα.

Στο κυτόπλασμα το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. Εκτός του κυττάρου, το ασκορβικό οξύ πιθανώς να δρα σε σύζευξη με τη βιταμίνη E, η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξείδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών ⁽⁴³⁾.



Εικόνα 4: Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τις βιταμίνες E και C

❖ Β-Καροτένιο

Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και με το σελήνιο. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης.

❖ Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος ⁽⁴⁴⁾. Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από τις ROS.

❖ Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη) αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξειδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης ⁽¹⁾.

❖ Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ⁽¹⁾.

1.9. Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (AAS)

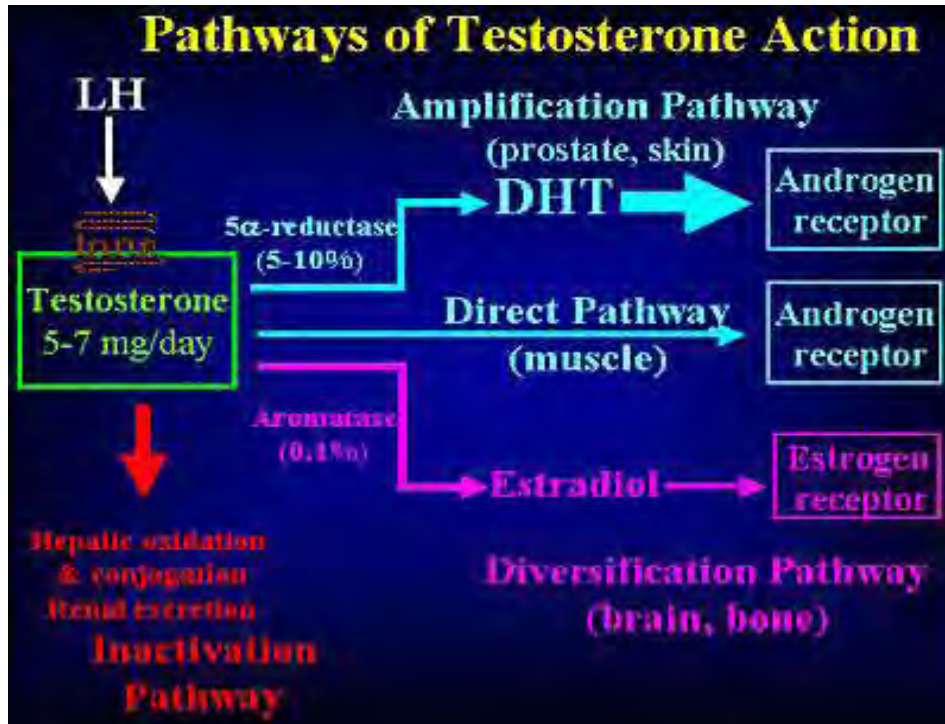
Τα αναβολικά στεροειδή είναι μια κατηγορία φυσικών και συνθετικών στεροειδών ορμονών, που επάγουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση, επηρεάζουν την ανάπτυξη του μυϊκού ιστού και μερικές φορές το μέγεθος και τη δύναμη των οστών ⁽⁴⁵⁾. Τα περισσότερα από τα ανδρογόνα στεροειδή δρουν ενεργοποιώντας τους υποδοχείς ανδρογόνων, παράγοντας αναβολική και ανδρογονική επίδραση ⁽⁴⁵⁾. Παραδείγματα αναβολικής επίδρασης είναι η αύξηση της πρωτεϊνολύσης από αμινοξέα, η αύξηση της μυϊκής μάζας, η επιτάχυνση της ανακατασκευής και μεγέθυνσης των οστών, η αύξηση της όρεξης για πρόσληψη τροφής, η διέγερση του

μυελού των οστών με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων. Παραδείγματα ανδρογονικής επίδρασης είναι η υπερτροφία της κλειτορίδας στα θηλυκά και υπερμεγέθυνση του πέους στους εφήβους. Επίσης παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη των ανδρογόνο-εξαρτώμενων τριχών (στο εφηβείο, στο πρόσωπο, στο στήθος και στα άκρα). Παράλληλα επιμηκύνονται οι φωνητικές χορδές που οδηγούν στη βάθυνση της χροιάς της φωνής. Ταυτόχρονα καταστέλλεται η παραγωγή των ενδογενών φυλοκαθοριστικών ορμονών, μειώνεται η σπερματογένεση, ενώ αυξάνεται η λίμπιντο. Πολλά ανδρογόνα μεταβολίζονται σε συστατικά που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς οιστρογόνων, επάγοντας επιπλέον αρνητικές επιδράσεις όπως επιτάχυνση της ωρίμανσης των οστών στην παιδική ηλικία και γυναικομαστία στους άντρες ⁽⁴⁵⁾.

1.9.1.Ορμόνη Τεστοστερόνη και μηχανισμός δράσης της

Η ορμόνη τεστοστερόνη είναι το πιο γνωστό αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές, συντίθεται από τη χοληστερόλη, στα κύτταρα του Leydig των όρχεων στα αρσενικά και στο ωχρό σωματίο στα θηλυκά άτομα και έχει ανδρογονική και αναβολική δράση. Παραγωγή της εμφανίζεται επίσης και στο φλοιό των επινεφριδίων και στα δύο φύλα ^{(46),(47)}. Η τεστοστερόνη υφίσταται μεταβολισμό και φάσης I και φάσης II, που οδηγεί στο σχηματισμό διαφόρων μεταβολιτών. Οι αντιδράσεις της Φάσης I περιλαμβάνουν οξείδωση, αναγωγή ή υδροξυλίωση, αποδίδοντας περισσότερο πολικά μόρια. Ο μεταβολισμός φάσης II οδηγεί σε γλυκουρονίδια ή θειικά άλατα, τα οποία επιτρέπουν την απομάκρυνση μέσω των ούρων.

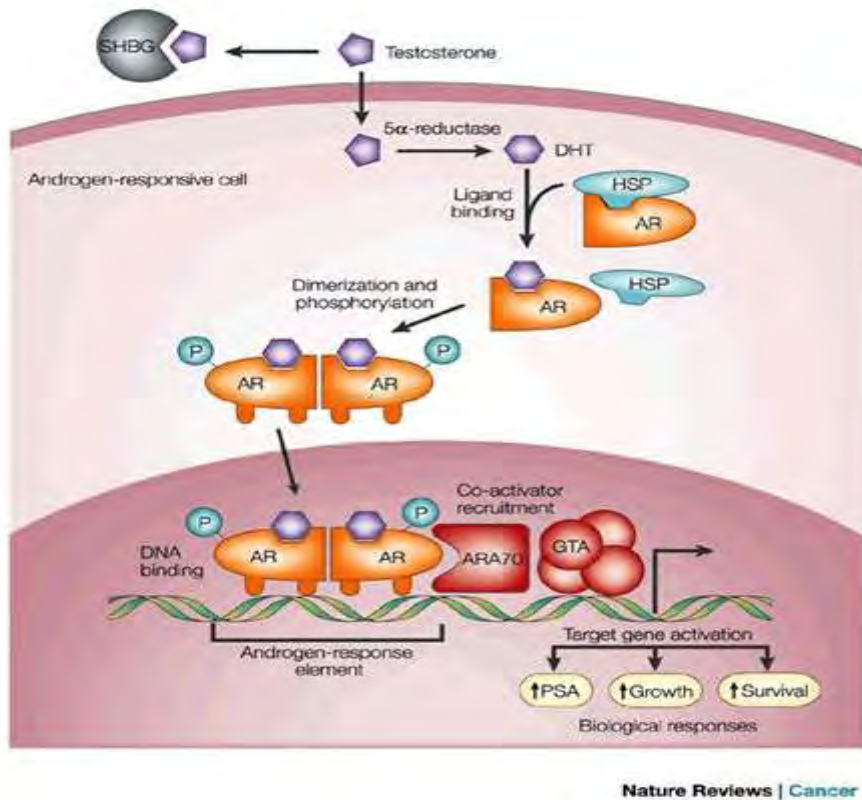
Δύο βιοδραστικοί μεταβολίτες της τεστοστερόνης έχουν μεγάλο ενδιαφέρον, η διυδροτεστοστερόνη (DHT) και η οιστραδιόλη, που παράγονται από τα ένζυμα 5α-αναγωγή και αρωματάση, αντίστοιχα (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μονοπάτια δράσης της τεστοστερόνης

Το ένζυμο αρωματάση εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και καταλύει τη μετατροπή των AAS σε θηλυκές φυλετικές ορμόνες, οιστραδιόλη και οιστρόνη. Οι θηλυκές φυλετικές ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και σχηματίζουν το αντίστοιχο σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό δρα στα κύτταρα των Leyding και Sertoli, στο λιπώδη ιστό και σε ορισμένους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται μόνο όταν το σύστημα των ανδρογονικών υποδοχέων κορεστεί από τα αναβολικά και ανδρογονικά στεροειδή που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Η πλεονάζουσα ποσότητα ανδρογονικών αναβολικών στεροειδών συνδέεται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και επάγει την εμφάνιση θηλυκών χαρακτηριστικών, χωρίς όμως να είναι απόλυτα προβλέψιμα τα αποτελέσματα ⁽⁴⁵⁾.

Ιδιαίτερα σημαντική δράση έχει και το ένζυμο 5^α αναγωγή, που μεταβολίζει την ορμόνη σε διδροτεστοστερόνη (DHT). Η τεστοστερόνη ή η διδροτεστοστερόνη συνδέονται με εξειδικευμένους ανδρογονικούς υποδοχείς (AR), που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα περιφερικά της πυρηνικής μεμβράνης. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα διαπερνά την πυρηνική μεμβράνη και εισέρχεται στο πυρήνιο. Εκεί τα σύμπλοκα ενώνονται ως ομοδιμερή σε τμήματα DNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδιώματος (εικόνα 6). Είναι ενδιαφέρον ότι η DHT εμφανίζει πολύ περισσότερο ανδρογόνο δράση από τη τεστοστερόνη λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας δέσμευσης ⁽⁴⁸⁾ και της περισσότερο αποτελεσματικής ενεργοποίησης του υποδοχέα των ανδρογόνων ^{(49),(50)}.



Εικόνα 6: Μονοπάτι δράσης της διυδροτεστοστερόνης (DHT)

1.9.2. Εφαρμογές στον αθλητισμό

Οι αθλητές χρησιμοποιούν τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή για να βελτιώσουν την αθλητική τους επίδοση και πιο συγκεκριμένα για να αυξήσουν το μέγεθος και την ισχύ των μυών τους ⁽⁴⁵⁾. Αποκτούν ικανότητα εντονότερης προπόνησης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Μπορεί δηλαδή να αυξηθεί η αντοχή τους και να μειωθεί η προκαλούμενη κόπωση, να αυξηθεί η επιθετικότητά τους και η ανταγωνιστικότητά τους και να προκληθεί ήπιου βαθμού ευφορία. Τα αναβολικά στεροειδή βοηθούν τον αθλητή να προπονηθεί σκληρότερα και να ανακάμπτει ταχύτερα με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ενδυνάμωσή του. Πέρα από τους bodybuilders, τα AAS χρησιμοποιούνται από επαγγελματίες αθλητές μιας μεγάλης ποικιλίας αγωνισμάτων, όπως άρση βαρών, baseball, ποδηλασία, στίβος και κολύμβηση. Τα τελευταία χρόνια έχει εξαπλωθεί η χρήση τους σε χώρους μαζικής άθλησης, ιδιαίτερα στα γυμναστήρια σωματικής ανάπτυξης ⁽⁴⁵⁾.

1.10. Νανδρολόνη

Η νανδρολόνη (19-νορτεστοστερόνη ή 19 nor) είναι ένα από τα πιο δημοφιλή αναβολικά στεροειδή, το οποίο είναι συνθετικό παράγωγο της τεστοστερόνης. Συντέθηκε για πρώτη φορά το έτος 1950 ⁽⁵¹⁾ και η ονομασία της 19-nor σημαίνει μια

δομική αλλαγή στην ορμόνη τεστοστερόνη, συγκεκριμένα στην ορμόνη τεστοστερόνη λείπει το άτομο C στη 19^η θέση. Αυτή η έλλειψη της ομάδας μεθυλίου στη 19^η θέση είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη ανδρογονική δράση της νανδρολόνης σε σχέση με τη τεστοστερόνη. Η νανδρολόνη συνήθως εστεροποιείται με δεκανοϊκό οξύ, το οποίο καθιστά το φάρμακο κατάλληλο για ενδομυικές ενέσεις, καθώς αυξάνει το χρόνο ημιζωής του.

Ο μηχανισμός δράσης της νανδρολόνης είναι παρόμοιος με αυτόν της τεστοστερόνης μόνο που το ένζυμο 5α αναγωγάση, όπως και στην περίπτωση της τεστοστερόνης, μετατρέπει τη νανδρολόνη στο βιοδραστικό μεταβολίτη διυδρονανδρολόνη (DHN). Η DHN έχει μικρότερη ανδρογόνο δράση από τη νανδρολόνη, σε αντίθεση με τη σχέση μεταξύ DHT και τεστοστερόνης. Επίσης, η νανδρολόνη υφίσταται αρωματοποίηση, μέσω του ενζύμου αρωματάση και μετατρέπεται σε οιστρογόνα, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι η τεστοστερόνη^{(46),(47)}. Συμπερασματικά η νανδρολόνη, είναι ένα από τα πιο δημοφιλή AAS σήμερα, λόγω του γεγονότος ότι η αναβολική της δράση είναι μεγαλύτερη από αυτή της τεστοστερόνης, ωστόσο εμφανίζει χαμηλότερη ανδρογονική δράση από τη τεστοστερόνη, σε συνδυασμό με τη μειωμένη δυνατότητα για μετατροπή σε οιστρογόνα⁽⁵²⁾.

1.10.1. Οφέλιμες δράσεις της νανδρολόνης

Η φυσιολογική λειτουργία της νανδρολόνης είναι να βελτιώνει την αθλητική απόδοση μέσω αύξησης της μάζας του σώματος, του μεγέθους των μυών⁽⁵³⁾ της δύναμης και της αντοχής^{(54),(55)}. Αυτό το επιτυγχάνει αρχικά με τη σύνδεση της ίδιας ή των παραγώνων της με τους ARs και στη συνέχεια η δράση του συμπλέγματος στον πυρήνα πυροδοτεί την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης σε αναβολική κατάσταση με θετικό ισοζύγιο αζώτου. Πέρα όμως από τη μυοτροφική της δράση, η νανδρολόνη έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για θεραπευτικούς σκοπούς στην αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Τα οφέλη από τη χρήση της καταδεικνύονται κυρίως σε σύνδρομα με έλλειμμα αζώτου, καθώς και σε σύνδρομα με ορμονικές διαταραχές⁽⁵⁶⁾. Συγκεκριμένα, ενδείξεις θεραπευτικής χορήγησης της νανδρολόνης αποτελούν ο υπογοναδισμός⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ το σύνδρομο καχεξίας συνδυαζόμενο με λοίμωξη από τον HIV⁽⁶⁰⁻⁶²⁾, εγκαύματα⁽⁶³⁾, απλαστική αναιμία⁽⁶⁴⁾, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια⁽⁶⁵⁾, αλκοολική ηπατοπάθεια⁽⁶⁶⁾. Η νανδρολόνη χρησιμοποιείται επίσης, με σκοπό τη βελτίωση του μνήμης και την αντιμετώπιση της κατάθλιψης. Επιπρόσθετα, η δράση που ασκεί η νανδρολόνη στους ηλικιωμένους μπορεί να είναι διπλή, καθώς, εκτός από τη μυοτροφική της δράση, ασκεί και ευεργετική επίδραση στην οστική πυκνότητα μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τους οστεοβλάστες. Με αυτόν τον τρόπο το στεροειδές θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο πεδίο της πρόληψης και της θεραπείας της οστεοπόρωσης. Υπάρχουν επίσης αναφορές για θετικές δράσεις στην επούλωση καταγμάτων, καθώς και στη ρήξη τενόντων και συνδέσμων⁽⁶⁷⁾ και μυϊκών τραυματισμών.⁽⁶⁸⁾

1.10.2. Ανεπιθύμητες δράσεις της νανδρολόνης

Ιδιαίτερα συχνά σε περίπτωση όπου γίνεται κατάχρηση του στεροειδούς, παρατηρούνται στους χρήστες ανεπιθύμητες ενέργειες. Κάποιες από αυτές τις δυσμενείς επιπτώσεις είναι η εμφάνιση φαλάκρας και δερματικών προβλημάτων, όπως ακμή και ραγάδες ⁽⁶⁹⁾. Επιπλέον η χορήγηση υψηλών δόσεων νανδρολόνης, οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα LH και FSH. Αυτό διαδοχικά οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ενδογενούς τεστοστερόνης και μπορεί να καταλήξει σε μειωμένη σπερματογένεση και ατροφία των όρχεων ⁽⁷⁰⁾. Μετατροπή των ανδρογόνων σε υποστρώματα με οιστρογονική δραστηριότητα δύναται να οδηγήσει σε γυναικομαστία. Στις γυναίκες κατάχρηση του στεροειδούς επιφέρει αποτελέσματα αρρενοποίησης, όπως εμβάθυνση της φωνής, χαρακτηριστική ανδρική φαλάκρα και υπερτροφία της κλειτορίδας ⁽⁷¹⁾.

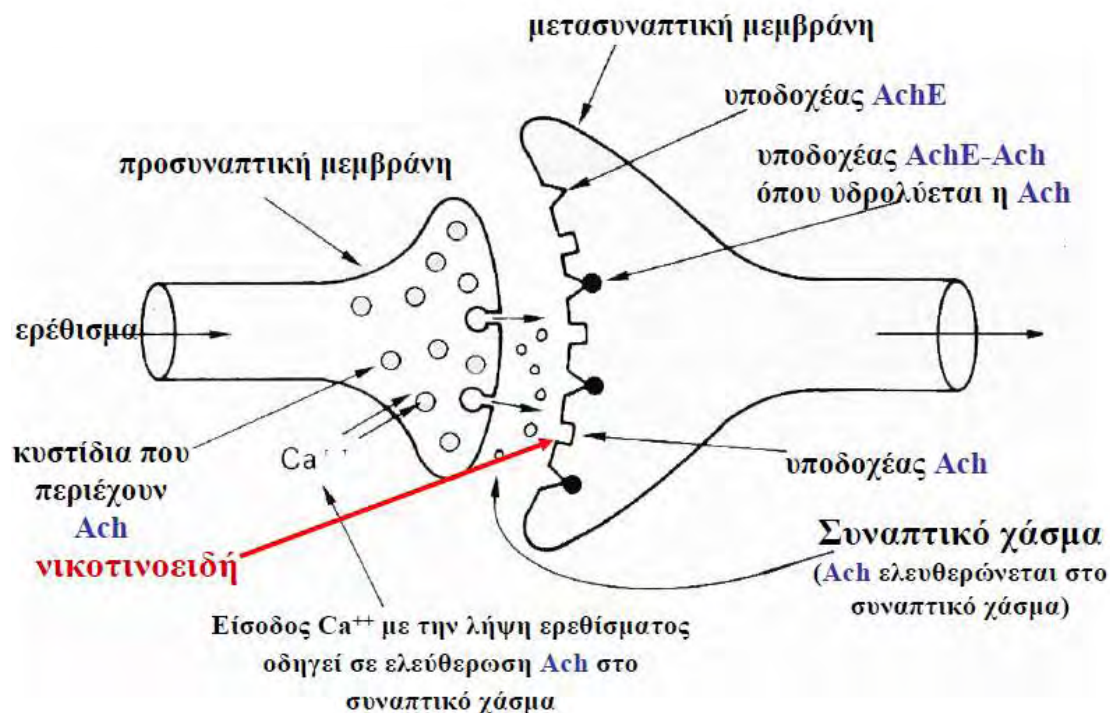
Περισσότερες φυσιολογικές επιδράσεις της κατάχρησης της νανδρολόνης αφορούν καρδιαγγειακές επιπλοκές, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιακή δυσρυθμία, καρδιακή υπερτροφία και εγκεφαλικά επεισόδια ⁽⁷²⁻⁷⁶⁾. Επιπλέον αρκετές μελέτες έχουν δείξει αύξηση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και μείωση της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης HDL, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο αθηροσκληρωτικής καρδιοπάθειας ⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾.

1.11. Νεονικοτινοειδή Εντομοκτόνα

Τα νεονικοτινοειδή ή χλωρονικοτινύλια είναι νέα διασυστηματικά εντομοκτόνα, συνθετικά ανάλογα της φυσικής νικοτίνης που παράγεται από τον καπνό, τα οποία είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση ημιπτέρων, λεπιδοπτέρων, θυσανοπτέρων και κολεοπτέρων σε πολλές καλλιέργειες. Τα νεονικοτινοειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχουν διασυστηματικές ιδιότητες, δηλαδή απορροφώνται από ολόκληρο το σύστημα των φυτών, ενώ τα υπολείμματά τους εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της γύρης και του νέκταρ. Χρησιμοποιούνται σε επεμβάσεις φυλλώματος και σε επενδύσεις σπόρων. Στην ομάδα αυτή ανήκει η ένωση ιμιδακλοπρίδη, που μελετάμε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των νεονικοτινοειδών είναι διαφορετικός από τον μηχανισμό δράσης των οργανοχλωριωμένων, των οργανοφωσφορικών, των καρβαμιδικών και των πυρεθρινοειδών. Συγκεκριμένα η δράση τους οφείλεται στη δέσμευση των μετασυναπτικών (νικοτινικών) υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο περιφερειακό νευρικό σύστημα των εντόμων. Σε αντίθεση δηλαδή με τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, τα νεονικοτινοειδή δεν παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, η οποία είναι να υδρολύει την ακετυλοχολίνη (ACh) σε οξικό οξύ και χολίνη. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων

μεταξύ των νευρικών κυττάρων, η διαρκής υπερδιέγερση, η πρόκληση νευρικών σπασμών, η παράλυση και τελικά ο θάνατος του εντόμου ^{(85),(86)}



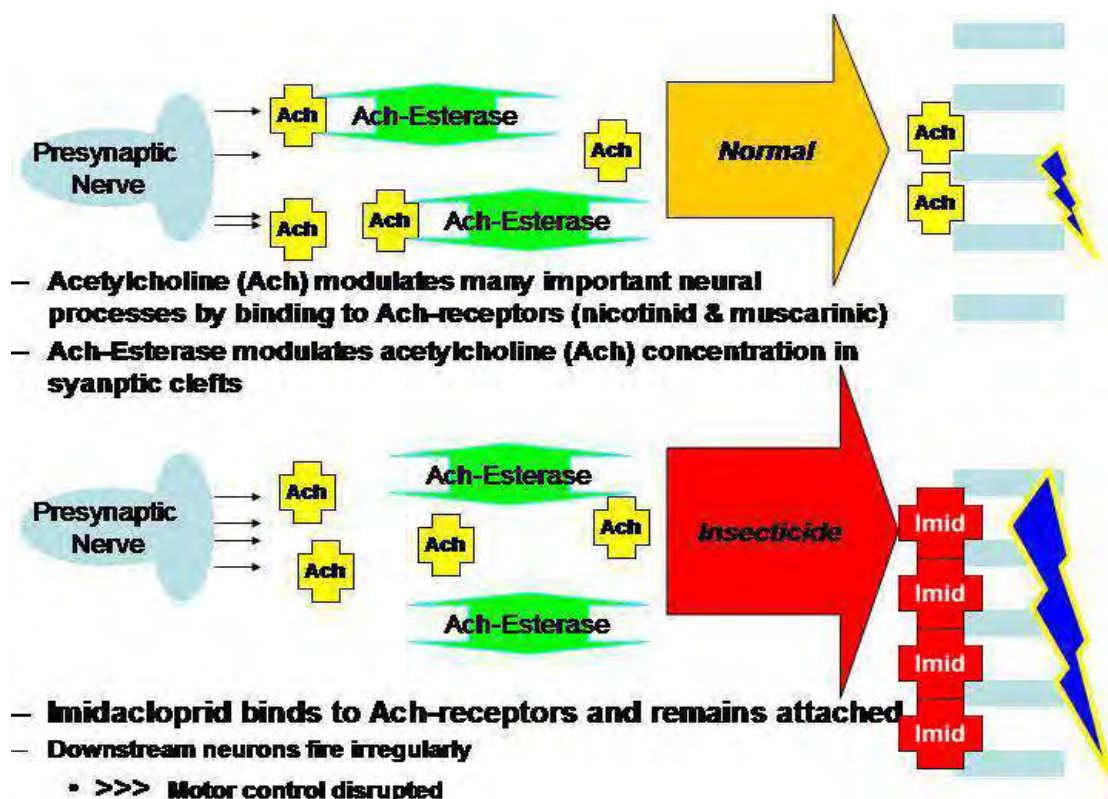
1.11.1. Ιμιδακλοπρίδη

Η ιμιδακλοπρίδη αποτελεί το πρώτο νεονικοτινοειδές που έφθασε στην αγορά το 1991 από την εταιρεία Bayer ⁽⁸⁷⁾. Αυτή τη στιγμή καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας αγοράς εντομοκτόνων. Εφαρμόζεται σε φύλλωμα, έδαφος αλλά και ως επικαλυπτικό σπόρων για την καταπολέμηση μυζητικών εντόμων σε καλλιέργειες λαχανικών, βαμβακιού και καλλωπιστικών φυτών.

1.11.2. Τρόπος δράσης της

Η ιμιδακλοπρίδη, όπως φαίνεται στην εικόνα 7 ανταγωνίζεται την ακετυλοχολίνη για την πρόσδεση στους μετασυναπτικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (νικοτινικούς), στο περιφερειακό νευρικό σύστημα των εντόμων. Σε αντίθεση με άλλα εντομοκτόνα δεν παρεμποδίζει την ακετυλοχολινεστεράση, η οποία ελέγχει τη συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, αποτέλεσμα της δέσμευσης της ιμιδακλοπρίδης στους

υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων, η διαρκής υπερδιέγερση, η πρόκληση νευρικών σπασμών, η παράλυση και τελικά ο θάνατος του εντόμου ^{(85),(86)}



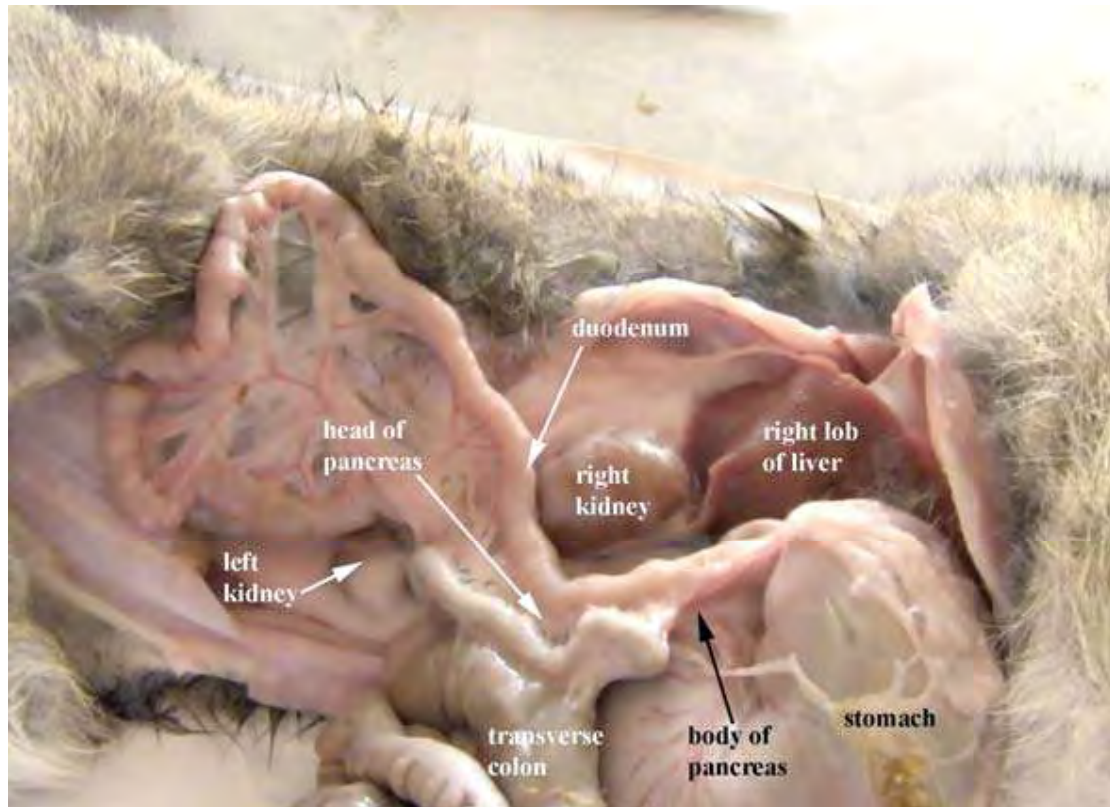
Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης της ιμιδακλοπρίδης

1.12. Νεφροί κουνελιών

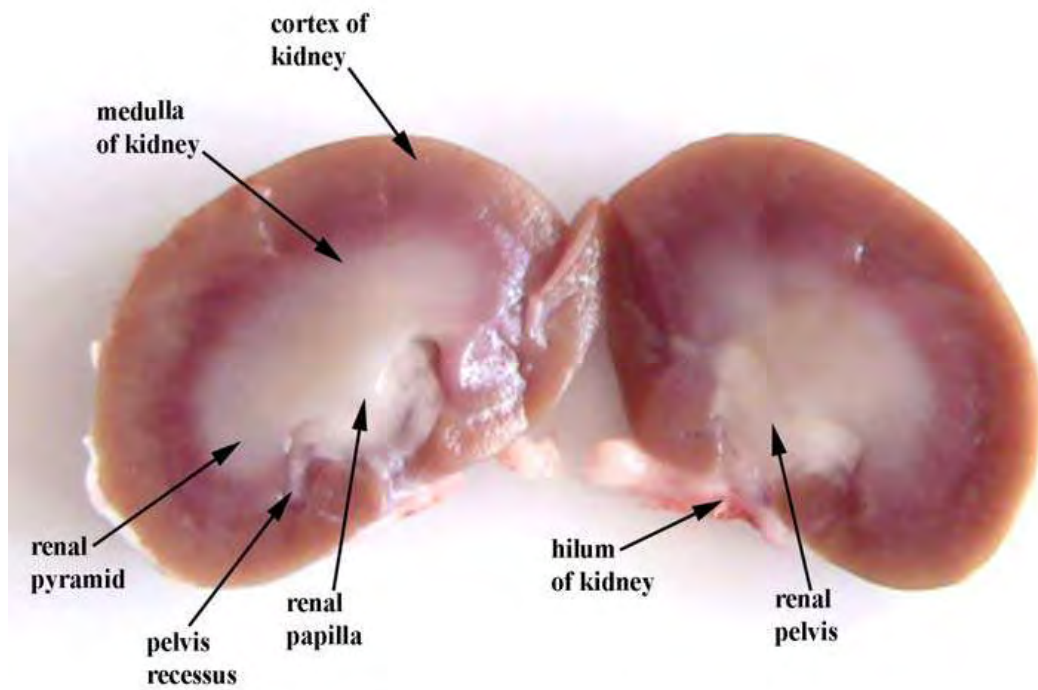
1.12.1. Ανατομία νεφρών κουνελιών

Οι νεφροί στο κουνέλι, όπως και στα υπόλοιπα θηλαστικά είναι δύο (δεξιός και αριστερός νεφρός), είναι δύο όργανα που έχουν σχήμα φασολιού και βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης. Ο δεξιός νεφρός βρίσκεται στο ύψος μεταξύ του 11^{ου} και 12^{ου} θωρακικού σπονδύλου μέχρι τον 2^ο οσφυϊκό σπόνδυλο. Ο αριστερός νεφρός εντοπίζεται μεταξύ του 2^{ου} και 4^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου (πιο κάτω από το δεξιό νεφρό), αντίθετα με τα νεφρά του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών, όπου το αριστερό νεφρό βρίσκεται περίπου 2,5 εκατοστά πιο

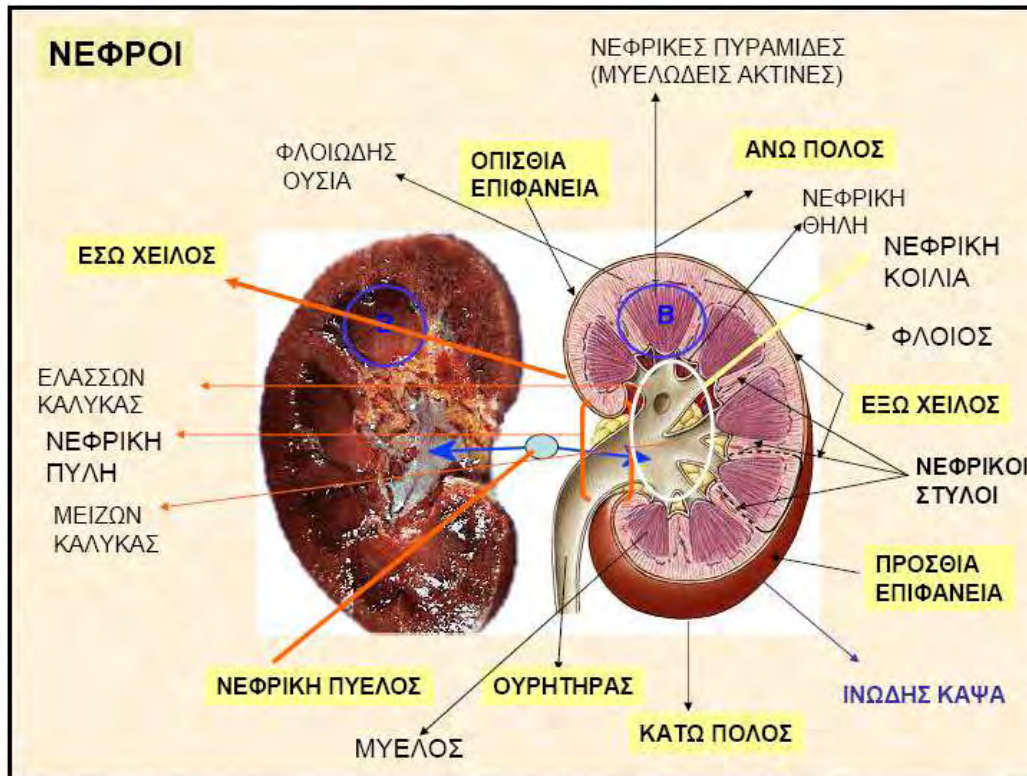
πάνω από το δεξί νεφρό. Κάθε νεφρός έχει άνω και κάτω πόλο, πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια, έξω και έσω χείλος (πύλη). Ο δεξιός νεφρός γειτονεύει μέσω του άνω πόλου του με το ήπαρ και μέσω του κάτω πόλου του με την κατιούσα μοίρα του δωδεκαδακτύλου. Όσον αφορά τον αριστερό νεφρό, επάνω από αυτόν βρίσκονται η ουρά του παγκρέατος, το στομάχι και η σπλήνα και κάτω από αυτόν το αριστερό τμήμα του κόλου.⁽⁸⁰⁾



Εικόνα 8: Ανατομία των νεφρών των κουνελιών



Εικόνα 9: Διαμήκης διατομή νεφρού κουνελιού



Εικόνα 10: Διαμήκης διατομή νεφρού ανθρώπου

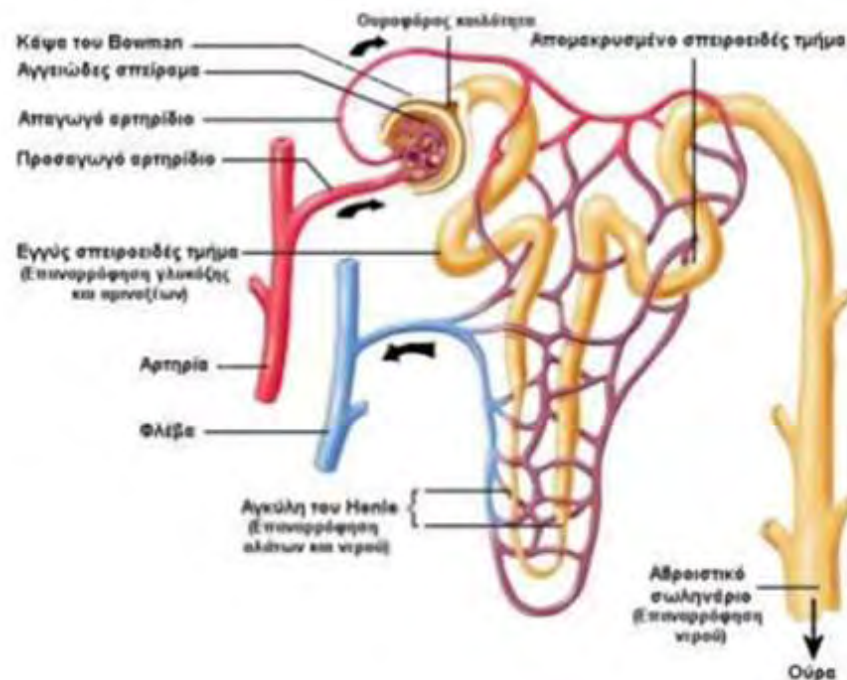
Στη διαμήκη διατομή του νεφρού διακρίνονται εύκολα μακροσκοπικά δυο περιοχές, από το έξω προς το έσω χείλος: Η φλοιώδης μοίρα (με κοκκινωπό χρώμα), η ωχρότερη μυελώδης μοίρα, που στον άνθρωπο αποτελείται από 8-18 νεφρικές πυραμίδες (πολυπυραμιδικά νεφρά) με την κορυφή τους στραμμένη προς την νεφρική πύελο (δημιουργώντας αντίστοιχο αριθμό θηλών), και την βάση τους προς το σύνορο μεταξύ φλοιού και μυελού^(81,82,83). Αντίθετα τα νεφρά των κουνελιών είναι μονοπυραμιδικά, δηλαδή αποτελούνται από μία πυραμίδα (renal pyramid) όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Η κορυφή της πυραμίδας απολήγει στη θηλή (renal papilla), η οποία έχει έντονο τοξωτό άκρο, το οποίο προεξέχει προς την είσοδο της νεφρικής αρτηρίας (hilum of kidney). Η νεφρική πύελος (renal pelvis) είναι αντίστοιχα κοίλη προς το ελεύθερο άκρο της θηλής, το οποίο σχηματίζει δύο εσοχές. Είναι το μέρος του νεφρού που επικοινωνεί με τον ουρητήρα. Συγκεκριμένα αποτελεί έναν υποδοχέα, στον οποίο βρίσκονται συγκεντρωμένοι μικροί ασκοί που ονομάζονται κάλυκες, οι οποίοι συγκεντρώνουν τα ούρα που εκκρίνονται από τις θηλές.

1.12.2. Λειτουργία των νεφρών

Η κύρια λειτουργία των νεφρών είναι, η διήθηση του αίματος και κατακράτηση νερού και επιβλαβών ουσιών, με τα οποία παράγουν τα ούρα, που απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω του ουροποιητικού συστήματος.

Η φλοιώδης και μυελώδης μοίρα αποτελούνται από τους νεφρώνες (τις λειτουργικές μονάδες νεφρού), αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα.⁽⁸³⁾ Υπάρχουν ένα εκατομμύριο περίπου νεφρώνες σε κάθε νεφρό. Σε κάθε νεφρώνα υπάρχουν πολυάριθμα αιμοφόρα αγγεία, που διακλαδίζονται μέχρι να μετατραπούν σε λεπτότατα τριχοειδή αγγεία. Κάθε δίκτυο τριχοειδών αγγείων περιβάλλει ένα σφαιρικό σωματίδιο, που λέγεται μαλπιγγειανό σωματίδιο, το οποίο καλύπτεται από μια μεμβράνη, το έλυτρο του Bowman.

Το αίμα εισέρχεται στο έλυτρο από μια μικρή αρτηρία και διανέμεται μέσω των τριχοειδών αγγείων του σωματίου. Μέσω των λεπτότατων τοιχωμάτων των τριχοειδών, το αίμα απαλλάσσεται από το νερό και τις βλαβερές ουσίες που περιέχει. Το καθαρό και διηθημένο αίμα συλλέγεται από φλέβες κάθε φορά μεγαλύτερες, μέχρι να φτάσει στη νεφρική φλέβα και από εκεί στην καρδιά μέσω της κάτω κοίλης φλέβας. Το νερό και οι άχρηστες ουσίες περνούν μέσω του λεπτού ελύτρου Bowman και εισέρχονται σε ένα σωλήνα που ξεκινάει από το σωματίο, το εγγύς σπειροειδές σωληνάριο, περνούν από ένα καμπύλο τμήμα, την αγκύλη του Henle και συνεχίζουν προς το ακραίο σπειροειδές σωληνάριο, το οποίο καταλήγει σε ένα μεγαλύτερο σωλήνα, το αθροιστικό σωληνάριο. Τα αθροιστικά σωληνάρια ενώνονται μεταξύ τους στις νεφρικές πυραμίδες, για να σχηματίσουν τους σωλήνες των θηλών και μεταφέρουν τα ούρα στα άκρα των θηλών. Τα άχρηστα προϊόντα συλλέγονται στη νεφρική πύελο, απ' όπου μεταφέρονται στην ουροδόχο κύστη μέσω του ουρητήρα.



Εικόνα 11: Ανατομία νεφρώνα

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά, ανεξάρτητα πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της μακροχρόνιας χορήγησης του αναβολικού δεκανοϊκή νανδρολόνη σε νεφρούς κουνελιών. Η νανδρολόνη είναι ένα αναβολικό ευρείας χρήσης στον αθλητισμό και η μακροχρόνια χρήση του σχετίζεται με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των αθλητών. Σκοπός ήταν ο προσδιορισμός της πιθανής εμφάνισης νεφροτοξικότητας σε κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε το συγκεκριμένο αναβολικό σε διαφορετικές δόσεις και με διαφορετικούς τρόπους, με τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες.

Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της μακροχρόνια λήψης του εντομοκτόνου ιμιδακλοπρίδη σε οξειδωτικού στρες σε αίμα κουνελιών. Η ιμιδακλοπρίδη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο που μπορεί να περάσει στο ανθρώπινο σώμα έπειτα από κατανάλωση αγροτικών προϊόντων που προηγουμένως έχουν ραντιστεί με το συγκεκριμένο φάρμακο. Σκοπός του πειράματος ήταν η πιθανή τοξική δράση του σε κουνέλια που το κατανάλωσαν με τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πρωτόκολλο ζώων και χορήγησης:

Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 14 υγιή αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας βάρους 3,9-5,5 kg και ηλικίας 10-15 μηνών. Τα ζώα στεγάστηκαν σε ατομικά μεταλλικά κλουβιά, στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο. Τα κουνέλια πριν την έναρξη του πειράματος, είχαν αρχικά εγκλιματιστεί στο πλαίσιο ενός κύκλου 12-h σκοτάδι-φως και σε μια σταθερή θερμοκρασία που κυμαινόταν μεταξύ 20-23 °C. Τα ζώα τρέφονταν με εμπορικά πέλετ (σβώλους) κουνελιών και τους παρέχονταν πόσιμο (της βρύσης) νερό. Τα κουνέλια εγκλιματίστηκαν υπό τις συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες για 2 βδομάδες, οπότε και άρχισε η περίοδος αγωγής.

Όσον αφορά το πείραμα με τη νανδρολόνη, τα ζώα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες αγωγής:

ΟΜΑΔΑ 1: Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε ενδομυϊκώς υψηλή δόση (HDIM) δεκανοϊκής νανδρολόνης (10 mg/kg), δύο ημέρες τη βδομάδα για έξι μήνες.

ΟΜΑΔΑ 2: Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε ενδομυϊκώς χαμηλή δόση (LDIM) δεκανοϊκής νανδρολόνης (4 mg/kg), δύο ημέρες τη βδομάδα για έξι μήνες.

ΟΜΑΔΑ 3: Κουνέλια στα οποία χορηγήθηκε υποδορίως μια υψηλή δόση (HDSC) δεκανοϊκής νανδρολόνης (10 mg/kg), δύο ημέρες τη βδομάδα για έξι μήνες.

ΟΜΑΔΑ 4: Χρησίμευσε ως ομάδα ελέγχου (control) και στα ζώα χορηγήθηκε μόνο αλατούχο δ/μα ενδομυϊκά.

Το πειραματικό σχέδιο χορήγησης του αναβολικού στα κουνέλια, ήταν τέτοιο ώστε να μιμηθεί το πρότυπο λήψης των αναβολικών από αθλητές και αποτελούνταν από 2 περιόδους: την περίοδο χορήγησης της δεκανοϊκής νανδρολόνης, που διήρκεσε 6 μήνες και την περίοδο μη χορήγησης, που διήρκεσε 4 μήνες. Ορός συλλέχθηκε, κατά την έναρξη του πειράματος, κάθε 2 μήνες κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης και μη χορήγησης (wash out) και την ημέρα θανάτωσης. Τα ζώα θυσιάστηκαν με ενδοφλέβια ένεση 5 ml πεντοθάλης. Πρόκειται για ένα ισχυρό ταχείας έναρξης και διάρκειας δράσης, αλλά βραδείας αποδέσμευσης ενδοφλέβιο αναισθητικό, το οποίο χορηγήθηκε στα ζώα, σύμφωνα με τους κανόνες βιοηθικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Όσον αφορά το δεύτερο πείραμα με την ιμιδακλοπρίδη, το περιβάλλον και οι συνθήκες εγκλιματισμού των ζώων ήταν οι ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν

παραπάνω, ωστόσο αξίζει να διευκρινίσουμε ότι τα κουνέλια συνολικά σε αριθμό ήταν 9 (3 κουνέλια σε κάθε ομάδα) και βάρους 3 κιλών. Τα ζώα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες αγωγής:

ΟΜΑΔΑ Control

ΟΜΑΔΑ (IMI): Ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μόνο ιμιδακλοπρίδη

ΟΜΑΔΑ (IMI+ST): Ομάδα στην οποία χορηγήθηκε ιμιδακλοπρίδη μαζί με Sodium Tungstate Dihydrate (διένυδρο βολφραμικό νάτριο)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ιμιδακλοπρίδη χορηγήθηκε στα ζώα μέσω του πόσιμου νερού (σε φιάλες των 2 λίτρων) και συγκεκριμένα σε μία δόση 60 mg ανα 500 ml νερού. Μέσω κάποιων υπολογισμών που έγιναν με δεδομένο ότι κάθε κουνέλι έχει βάρος 3 κιλά, βρέθηκε ότι γίνεται χορήγηση $3 \times 60 \text{mg} = 180 \text{mg}$ /κουνέλι ανά ημέρα χορήγησης. Επειδή όμως το πειραματικό σχέδιο χορήγησης διακόπτεται από ημέρες μη χορήγησης, όπου δε χορηγείται ουσία στα ζώα, η τελική δόση αγωγής θα είναι 360mg/κουνέλι ανά ημέρα χορήγησης. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται το πειραματικό σχέδιο χορήγησης και μη που αναφέραμε:

DOSE TIME TABLE						
Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
EXPOSURE	WASH OUT	EXPOSURE	WASH OUT	EXPOSURE	WASH OUT	WASH OUT

Πίνακας 2: Πειραματικό πλάνο χορήγησης και μη, στο πείραμα της ιμιδακλοπρίδης

Στα κουνέλια της ομάδας control χορηγήθηκε σκέτο νερό. Ενώ όσον αφορά την ομάδα IMI+ST, η Sodium tungstate dehydrate χορηγήθηκε σε συνδυασμό με την ιμιδακλοπρίδη σε μία δόση 2mg/ml δηλαδή 1000mg στα 500ml νερού. Το διένυδρο βολφραμικό νάτριο, όπως ονομάζεται, είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο που υπάρχει με τη μορφή ενός λευκού κρυσταλλικού στερεού. Το διένυδρο βολφραμικό νάτριο χρησιμοποιείται συνήθως στη σύνθεση των ανόργανων ενώσεων, όπως των πολυοξομεταλλικών.⁽⁸⁸⁾ Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην οργανική χημεία ως καταλύτης ή πρόδρομος καταλύτης, αφού είναι σε θέση να καταλύει την οξείδωση διαφόρων υποστρωμάτων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, δημιουργώντας μόνο νερό ως παραπροϊόν. Το διένυδρο βολφραμικό νάτριο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης σαν καταλύτης σε πολλές οργανικές αντιδράσεις, όπως η εποξειδωση των αλκενίων⁽⁸⁹⁾ και η οξείδωση των αλκοολών σε αλδεύδες ή κετόνες, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.⁽⁹⁰⁾⁽⁹¹⁾ Ακόμα έχει βρεθεί ότι το διένυδρο βολφραμικό νάτριο έχει αντιδιαβητικές δράσεις, καθώς συμβάλλει στη βελτίωση της παγκρεατικής λειτουργίας και τον πολ/σμό των β κυττάρων, για τη ρύθμιση των επιπέδων ινσουλίνης, που παράγεται από αυτά.⁽⁹²⁾ Στη συγκεκριμένο πείραμα χορηγείται σε συνδυασμό με την ιμιδακλοπρίδη, προκειμένου να παρατηρήσουμε

εάν παρέχει προστασία, έναντι της δυσμενούς δράσης της μιδακλοπρίδης στον οργανισμό των ζώων.

Τελικά οι 3 ομάδες αγωγής ήταν οι εξής:

ΟΜΑΔΑ 1: Ομάδα Control (3 κουνέλια), στα οποία χορηγήθηκε μόνο νερό

ΟΜΑΔΑ 2: Ομάδα IMI (3 κουνέλια), στα οποία χορηγήθηκε μιδακλοπρίδη σε δόση 360mg / 500ml νερό/κουνέλι/ημέρα χορήγησης

ΟΜΑΔΑ 3: Ομάδα IMI+ST (3 κουνέλια), στα οποία χορηγήθηκε 360mg μιδακλοπρίδη σε συνδυασμό με 1000mg Sodium Tungstate Dihydrate / 500ml νερό /κουνέλι/ημέρα χορήγησης

Η μιδακλοπρίδη είναι μία ιδιαίτερα τοξική ουσία με $LD_{50} = 450 \text{ mg/kg}$. Με δεδομένο ότι τα ζώα μας ήταν 3 kg υπολογίζεται ότι το LD_{50} της μιδακλοπρίδης θα είναι 1350 mg/ κουνέλι. Στο συγκεκριμένο πείραμα χορηγήθηκαν 360 mg μιδακλοπρίδης/ κουνέλι/ ανά ημέρα χορήγησης, μία δόση αρκετά υψηλή, με δεδομένο ότι αντιστοιχεί περίπου στο $\frac{1}{4}$ της σχετικής θανατηφόρας δόσης (LD_{50}) της μιδακλοπρίδης, αναμένοντας να παρατηρήσουμε τις επιπτώσεις που θα έχει στον οργανισμό των κουνελιών.

3.2. Κουνέλια ως πειραματόζωα

Τα κουνέλια, είναι μικρά θηλαστικά της οικογένειας των κονικλοειδών της τάξης των λαγόμορφων ⁽⁸⁴⁾, που βρέθηκαν σε διάφορα μέρη του κόσμου. Οι οικότοποι στους οποίους ζουν περιλαμβάνουν λιβάδια, ξύλα, δάση και χορτολιβαδικές εκτάσεις. Μεταξύ των διαφόρων στελεχών, τα λευκά στελέχη κουνελιών από τη Νέα Ζηλανδία χρησιμοποιούνται συνήθως για τις ερευνητικές δραστηριότητες. Αυτά τα στελέχη είναι λιγότερο επιθετικά και έχουν λιγότερα προβλήματα υγείας σε σχέση με άλλες φυλές.

Πλεονεκτήματα από την χρήση κουνελιών ως πειραματικά μοντέλα:

- ❖ Τα κουνέλια είναι πολύ υπάκουα ζώα και μη επιθετικά και ως εκ-τούτου είναι εύκολα στο χειρισμό και στην παρατήρηση.
- ❖ Η εκτροφή τους είναι πολύ πιο οικονομική σε σύγκριση με άλλα μεγαλύτερου βάρους ζώα.
- ❖ Οι ζωτικής σημασίας κύκλοι είναι σύντομοι (κύηση, εφηβεία κ.λ.π.)
- ❖ Δυνατότητα προσαρμογής στο περιβάλλον
- ❖ Ευκολία γενετικής προτυποποίησης
- ❖ Με δεδομένο ότι υπάγονται στην κατηγορία των μικρών ζώων, η άδεια για τη δημιουργία μονάδων εκτροφής κουνελιών χορηγείται σχετικά εύκολα από τις

κατά τόπους ειδικές υπηρεσίες, σε σχέση με τις μονάδες εκτροφής μεγαλύτερων ζώων, των οποίων οι άδειες χορηγούνται από την κεντρική ειδική υπηρεσία.

Μειονεκτήματα από την χρήση κουνελιών ως πειραματικά μοντέλα:

- ❖ Έλλειψη καλά εξοπλισμένων χώρων στέγασης για το συγκεκριμένο ζώο
- ❖ Έλλειψη εξειδικευμένου προσωπικού
- ❖ Μεταφορά τους σε ένα εντελώς τεχνητό περιβάλλον σε σχέση με το φυσικό τους
- ❖ Έχουν συγκεκριμένη διαίτα
- ❖ Ζώα ευαίσθητα σε ασθένειες

3.3. Χειρισμός αίματος

Το πείραμα με την ιμιδακλοπρίδη, που πραγματοποιήθηκε σε αίμα κουνελιών απαιτούσε ειδική επεξεργασία αυτού, προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες μετρήσεις προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες. Αναλυτικότερα, στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελούνταν επεξεργασία των δειγμάτων για τη συλλογή αιμόλυματος και πλάσματος. Το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και το πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Περιγραφή Μεθόδου.

1. Το αίμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ). Το αντιπηκτικό EDTA δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα με χηλίωση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.

2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1.370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.

3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.

3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.

4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4.020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.

5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, που θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).

6. Ένα μέρος του αιμολύματος (500 μL) επεξεργάστηκε με 5% τριχλωροξικό οξύ (TCA 1:1 v/v) σε eppendorf και ανακινούμε στο vortex.

7. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.

8. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε eppendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.

9. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.

10. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της γλουταθειόνης.

3.4. Πείραμα Νανδρολόνης:

3.4.1. Ομογενοποίηση Νεφρών

Προκειμένου να εκτελεστεί μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στους νεφρούς των κουνελιών, έπρεπε προηγουμένως να πραγματοποιηθεί ομογενοποίηση στα δείγματα των νεφρών, που αφαιρέθηκαν χειρουργικά, τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes 2 mL, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι τη βιοχημική τους ανάλυση. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι.

Ο νεφροί ομογενοποιήθηκαν με αναλογία 1/2 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH), όπως:

- Απροτινίνη (10mg/mL), η οποία αναστέλει την θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα.

- Λιουπεπτίνη (1mg/mL), η οποία αναστέλει πεπτιδάσες όπως την κυστεΐνη, την σερίνη και την θρεονίνη.

- PMSF (9mg/mL), κλπ.

Κατά την προετοιμασία για τη βιοχημική ανάλυση του ιστού τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο.



Εικόνα 12: Τα Εργαλεία Που Χρησιμοποιήθηκαν Για Την Ομογενοποίηση Ιστών

Ακολούθως, το ομογενοποίημα υπέστη επεξεργασία με υπερήχους για την απελευθέρωση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας πρωτεΐνης και φυγοκεντρήθηκε.

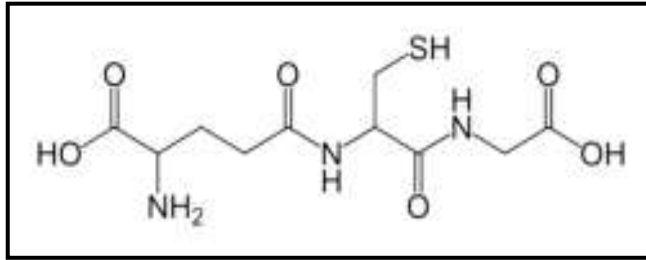
3.4.2. Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε νεφρούς κουνελιών

Γενικά.

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ιστών προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στους ιστούς. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM (Battin et al., 2009). Είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG), με την τελευταία (GSSG) να αποτελεί το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).

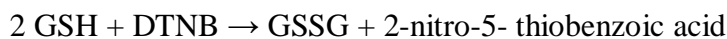


Εικόνα 13 Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης.

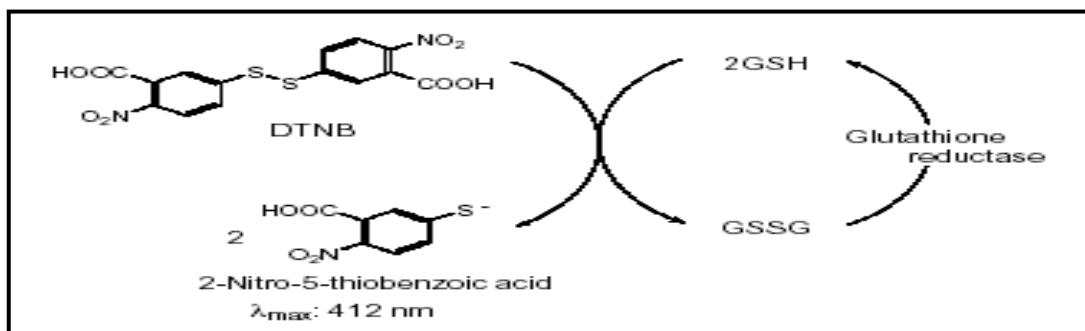
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι, επίσης, ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengupta et al., 2004).

Αρχή της μεθόδου.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε ομογενοποιημένο ιστό. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy et.al., 2004).



Η GSH παράγεται από τη GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 14 :Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια.

• **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH₂PO₄): 136 MB (Na₂HPO₄): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL

KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

• **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39.6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

• **Κιτρικό Νάτριο**. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

100μl ιστού προστέθηκαν σε 100μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μl ιστού αραιωμένου ½ αναμίχθηκαν με 660 μl ρυθμιστικού δ/τος 67mM (pH 8.0) και 330μl DTNB. Για το αίμα 500μl αιμολύματος προστέθηκαν σε 500μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Στη συνέχεια 300μl του υπερκειμένου προστέθηκαν σε 90μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μl αναμίχθηκαν με 660 μl ρυθμιστικού δ/τος 67mM (pH 8.0) και 330μl DTNB.

Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 Mm	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Ομογενοποιημένος ιστός	-	20 μL

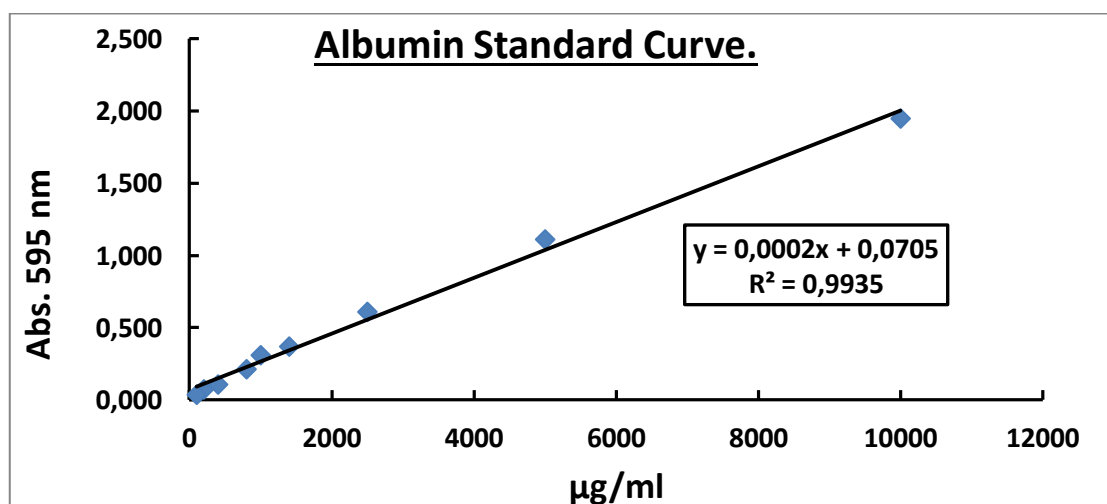
Πίνακας 3: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της GSH.

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Beers and Sizer, 1952)

Υπολογισμοί.

Δραστικότητα της GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) \times 2 \times 3 ή 4 (λόγω αραιώσεων) \times 50.5/ Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml), όπου το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του ιστού (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζουμε με το 2 και την πρώτη αραιώση που έγινε με το TCA 5% (1:1), πολ/ζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, με εξίσωση $y=0,0002x + 0,0705$ και $R^2= 0,9935$, όπου ο άξονας $y = \text{Abs}$ στα 595 nm και ο $x = \text{Συγκέντρωση}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Κατόπιν, με το Bradford test, λαμβάνονταν η τιμή της απορρόφησης και υπολογίζονταν αντίστοιχα η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Η δραστικότητα της GSH στο νεφρό, εκφράστηκε σε $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein.

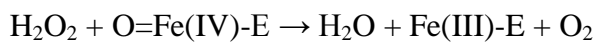
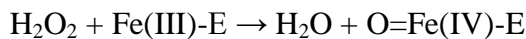


Προσδιορισμός Καταλάσης.

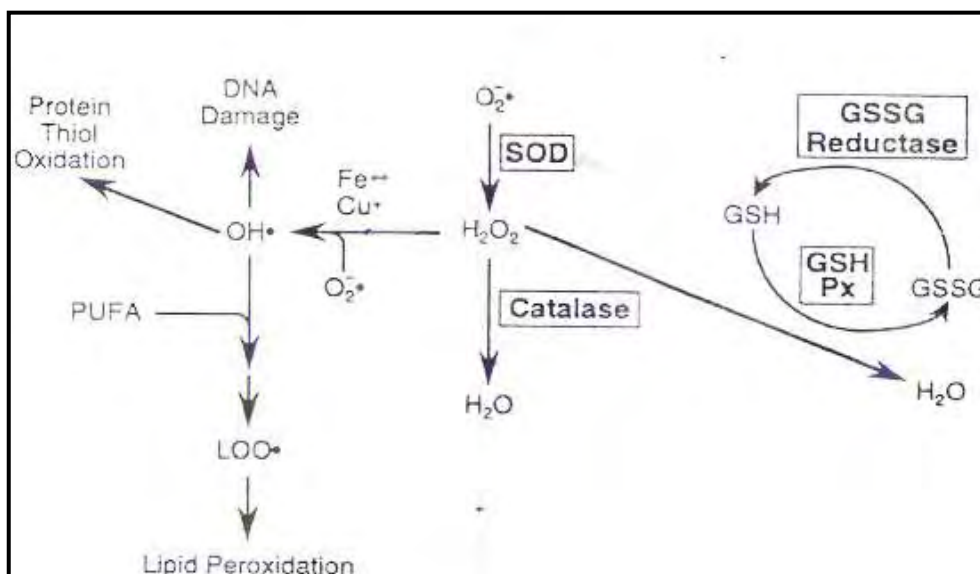
Αρχή της μεθόδου.

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon et. al., 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



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



Εικόνα 15: Μονοπάτι Αναγωγής Του H_2O_2 Σε H_2O

Επίσης, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της Καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al., (1984).

Αντιδραστήρια.

- **Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)** MB (KH_2PO_4): 136 και MB (Na_2HPO_4): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl 1 N, ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)**. Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2.955 μL
Ομογενοποιημένος ιστός	40 μL

Πίνακας 4: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5 μ L 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις

φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg ολικής πρωτεΐνης) = ($\Delta Abs_{\text{sample}}$ per min / 40) x (75 x 1.000 x 3 ή 4 x2) / Conc. Protein (mg/mL).

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1.000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3.000 μL) με τον όγκο του δείγματος (40 μL) (3.000 / 40 = 75). Πολ/ζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

ΔAbs (min) = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H₂O₂ στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

U = μmol/min. $\Delta Abs_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού

Ολική Αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Αρχή της μεθόδου

Η TAC των ιστών στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- **DPPH 0.1 mM.** MB: 394.32. Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Θετικός control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	460 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μL	-
Ιστός (Αραίωση 1/5)	-	-	40 μL (20μL)

Πίνακας 5: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης Και Οι Ποσότητες Των Αντιδραστηρίων Για Τη Μέτρηση Της TAC.

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20.000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί.

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

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

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραίωση του ιστού στην κυψελίδα είναι 25-πλάσια (1.000 μL στην κυψελίδα / 40 μL ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

δ) Πολλζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό ιστό-ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/5 κατά τη μέτρηση

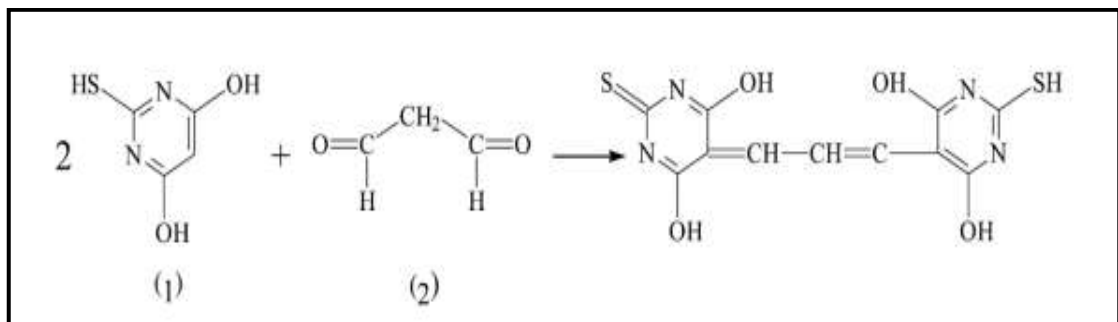
ε) Διαιρούμε με το 1.000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL .

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: mmol DPPH/mg total prot.

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου.

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 16: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), Που Οδηγεί Στην Παραγωγή Του Μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Αντιδραστήρια.

• **Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxy-methylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

• **Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na₂SO₄): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

• **TCA 35%:** Ζυγίζουμε 35 g TCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

• **TCA 70%:** Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL ομογενοποιημένου ιστού (για τα δείγματα) ή 100 μL πλάσματος ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί.

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 2 ή 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 μL) με τον όγκο του ομογενοποιημένου ιστού (100 μL) (3.100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L. Πολ/ζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό ιστό-ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραίωση που έγινε

κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 3 επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση

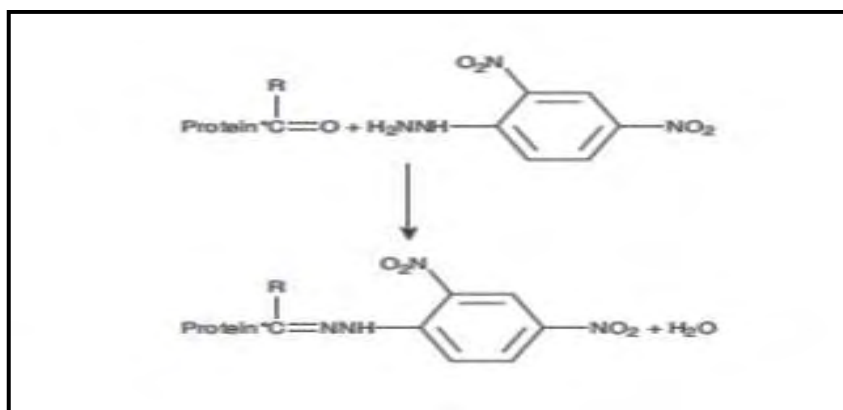
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Αρχή της μεθόδου.

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεύδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $-C=O$, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της αργινίνης (Arg), της λυσίνης (Lys) και της θρεονίνης (Thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμύεις βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.



Εικόνα 1: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη

πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).

Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα HCl 2.5 N.** HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in ≈ 70 mL αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Σε 50 μ L ομογενοποιημένου ιστού ή πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του ιστού. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPΗ που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυβελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPΗ, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί.

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1.000/50 \times 2 \text{ ή } 3 \times 2 / \text{Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)}$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Το 1.000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1.000 μL στην κυβελίδα /50 μL δείγματος). . Πολ/ζουμε με 3 για τον μυϊκό και με 4 για καρδιακό ιστό-ηπατικό ιστό, για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford M.M. 1976 A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. Anal Biochem 72:248–254).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL, ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 κλπ .. μg/mL.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, 20 μL διαλύματος αλβουμίνης (1) με τις παραπάνω συγκεντρώσεις, προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

Τα δείγματα ανακινούνται απαλά, και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα.

Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm.

Ως τυφλό, χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

3.4 Πείραμα Ιμιδακλοπρίδης

Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Σε Αίμα Κουνελιών

Γενικά, οι μέθοδοι προσδιορισμού των δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα, είναι παρόμοιες με εκείνες που εφαρμόζονται στους ιστούς, πέρα από κάποιες μικρές αλλά σημαντικές διαφορές. Συγκεκριμένα, στην προκειμένη περίπτωση “μιλάμε” για **ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα** όταν πρόκειται για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης **και για πλάσμα**, για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, αντί για τον όρο “**ομογενοποιημένος ιστός**” που χρησιμοποιούσαμε μέχρι τώρα. Διαφορές υπάρχουν επίσης στις ποσότητες των δ/των που χρησιμοποιήσαμε, σε σχέση με αυτές που αναφέραμε νωρίτερα για τον ομογενοποιημένο ιστό. Τέλος, μία ιδιαίτερα σημαντική διαφορά είναι ότι τα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, εκφράζονται ως προς την αιμοσφαιρίνη και όχι ως προς τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης, που χρησιμοποιούσαμε μέχρι τώρα.

Αναλυτικότερα οι μέθοδοι προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα κουνελιών:

Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια που περιγράφηκε παραπάνω, με την διαφορά πως κατά την διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων προς μέτρηση, εκτελούνται 2 φυγοκεντρήσεις του ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος, αφού προστεθεί ίση ποσότητα TCA 5%, αντί για δύο 1 που απαιτείται στον ομογενοποιημένο ιστό.

Υπολογισμοί.

$\Delta\text{ραστικότητα της GSH (mmol/L)} = (\text{Absδείγματος} - \Delta\text{Abstυφλού} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

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

Δραστηριότητα της Καταλάσης.

Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτή του ομογενοποιημένου ιστού, αντί όμως για 40 μL ομογενοποιημένου ιστού, προσθέτουμε αιμόλυμα 4 μL αραιωμένου 1/10. Αντί για 2.955 μL Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4, προσθέτουμε σε κάθε δείγμα προς μέτρηση 2.991 μL buffer.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1.000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1.000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3.000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3.000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{ Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$. $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC).

Ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με αυτήν του ομογενοποιημένου ιστού, με τη διαφορά όμως ότι αντί για 40 μl ομογενοποιημένου ιστού, τοποθετούμε στα προς μέτρηση δείγματα 20 μl πλάσματος.

TBARS – Καρβονύλια.

Οι μετρήσεις των δύο αυτών δεικτών στο πλάσμα, εκτελέστηκαν ακριβώς όπως και στις μετρήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον ομογενοποιημένο ιστό.

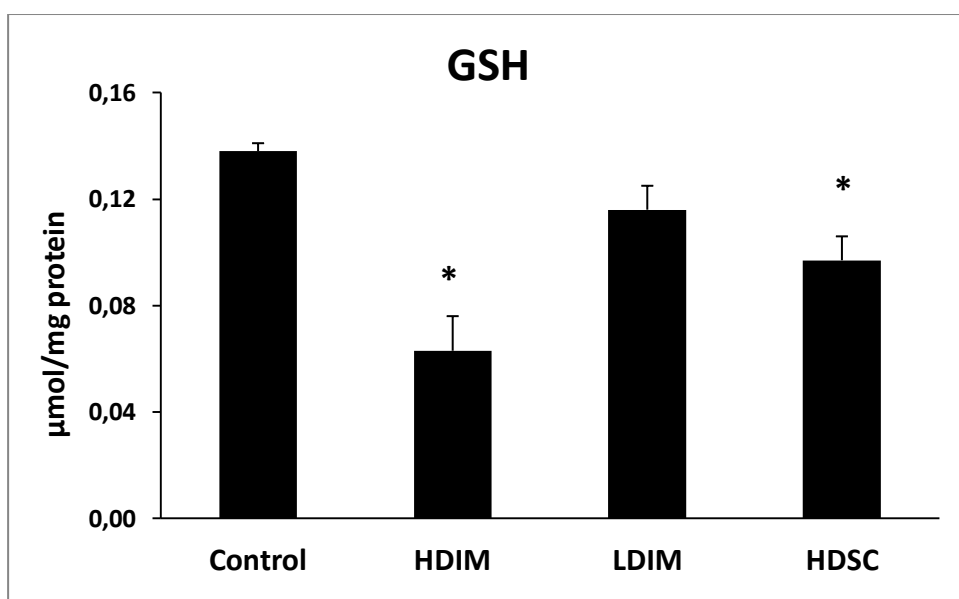
3.5 Στατιστική ανάλυση

Η χημική δραστηριότητα και οι μελετημένοι παράμετροι του οξειδωτικού στρες παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm$ τυπική απόκλιση (SD). Χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και έπειτα σύγκριση ζευγών χρησιμοποιώντας LSD post-hoc τεστ. Για την στατιστική ανάλυση και την γραφική αναπαράσταση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

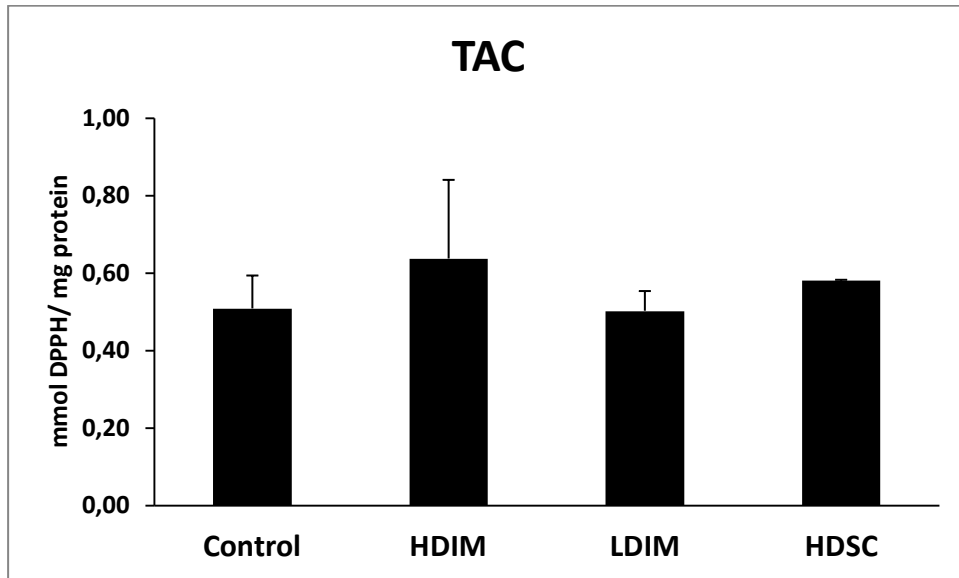
4.1. Πείραμα νανδρολόνης

Τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες για όλες τις ομάδες του πρώτου πειράματος, που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



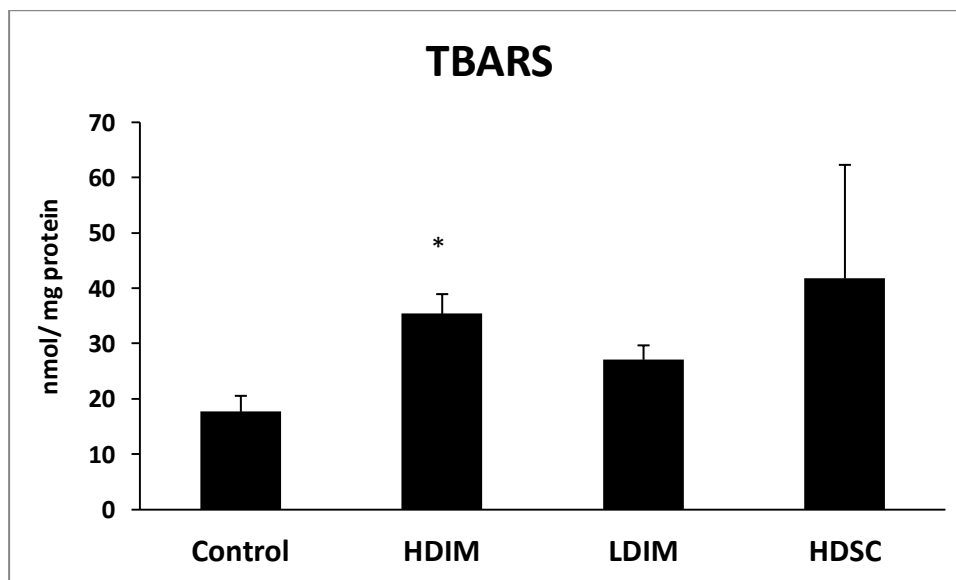
Διάγραμμα 1 : Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειώνης

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH στην ομάδα HDIM (περισσότερο από 50% μείωση, $p=0,018$). Μικρότερη στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην ομάδα HDSC (29%, $p=0,046$). Ενώ στην ομάδα LDIM δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ($p=0,10$)



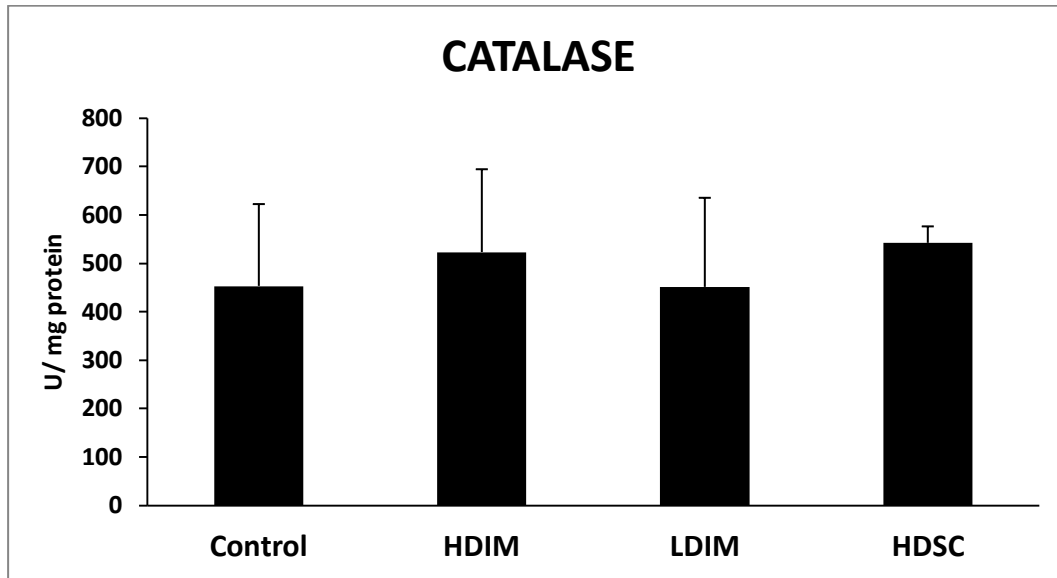
Διάγραμμα 2 : Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες



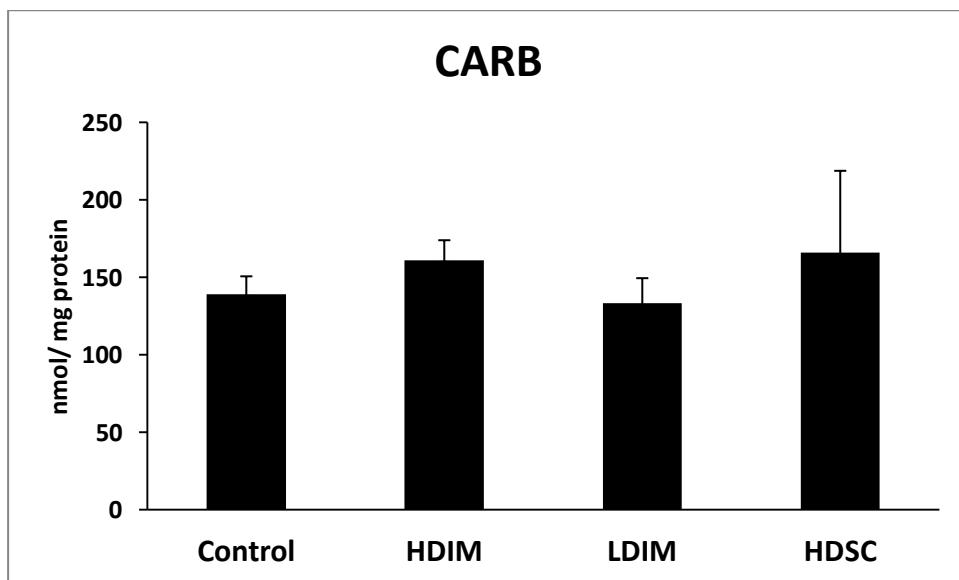
Διάγραμμα 3 : Μέτρηση συγκέντρωσης TBARS

Μια διπλάσια αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα TBARS του ιστού ($p=0,050$) στην HDIM ομάδα, ενώ η αύξηση που παρατηρήθηκε στην ομάδα HDSC έφτασε ακόμα και 252% σε μερικά ζώα, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,14$). Στην ομάδα LDIM, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή.



Διάγραμμα 4: Μέτρηση ενεργότητας καταλάσης

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες.



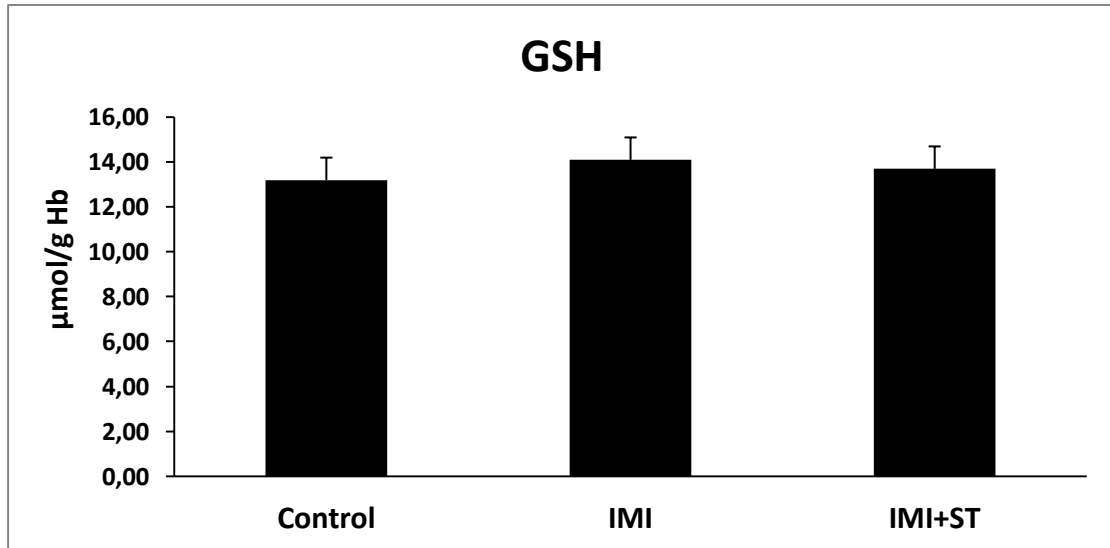
Διαγραμμα 5: Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες.

4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

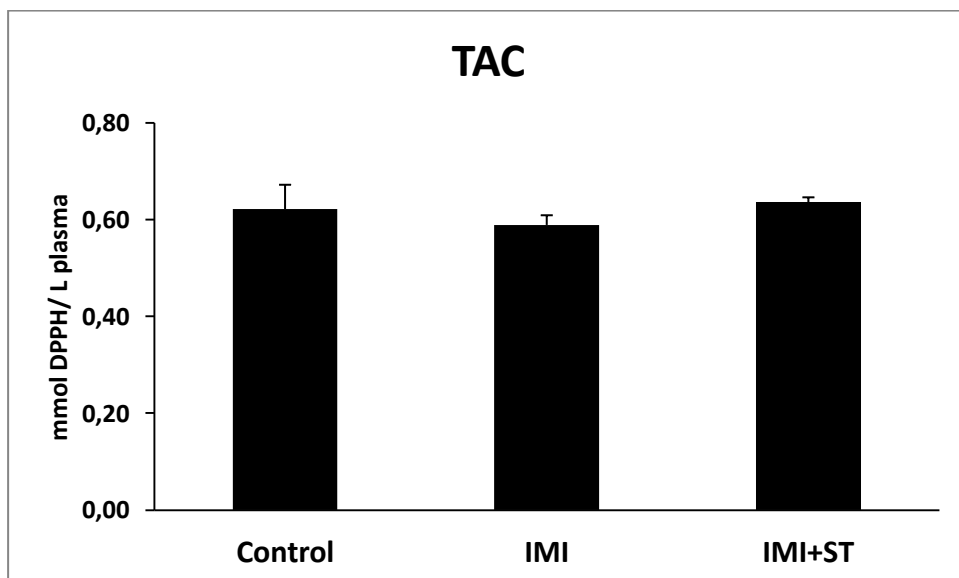
Πείραμα ιμιδακλοπρίδης

Τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες για όλες τις ομάδες του δεύτερου πειράματος, που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



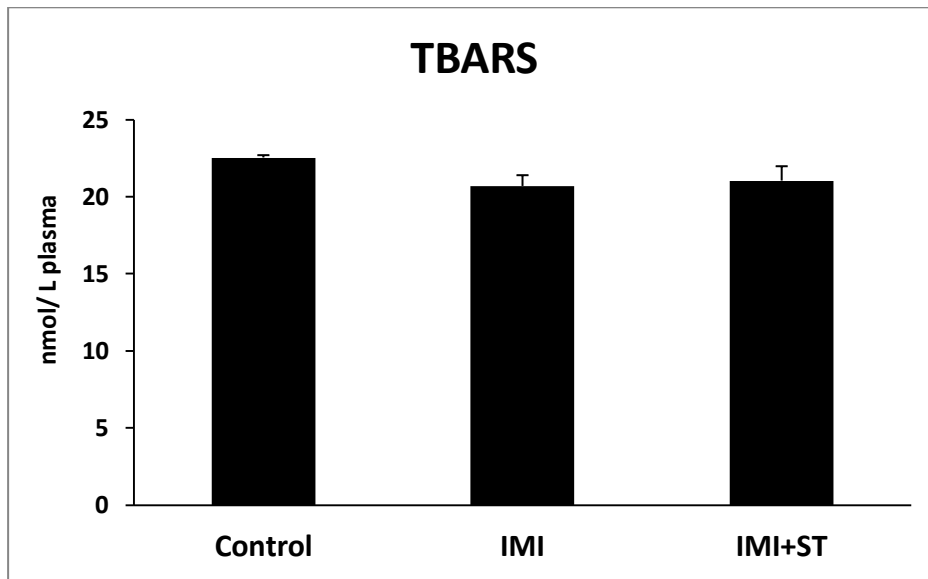
Διάγραμμα 1 : Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες.



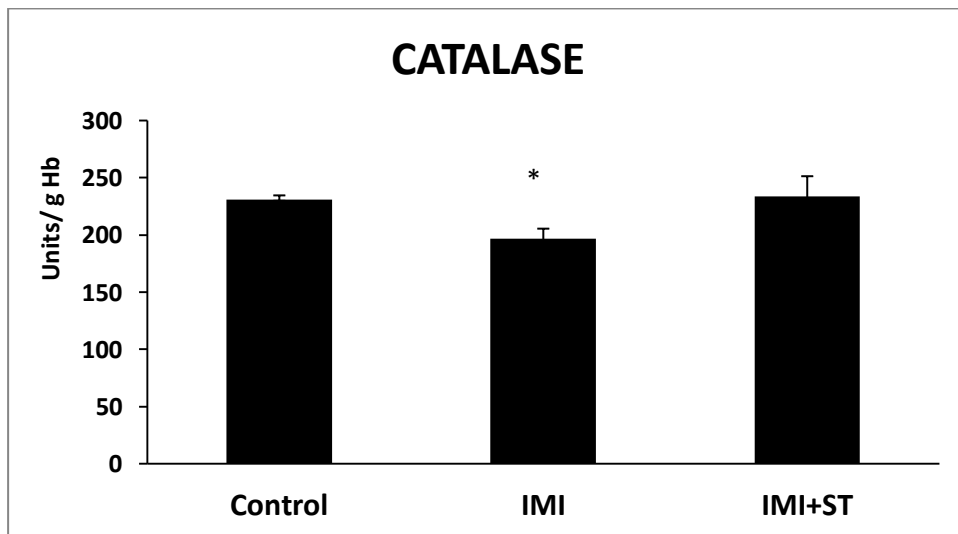
Διάγραμμα 2 : Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες.



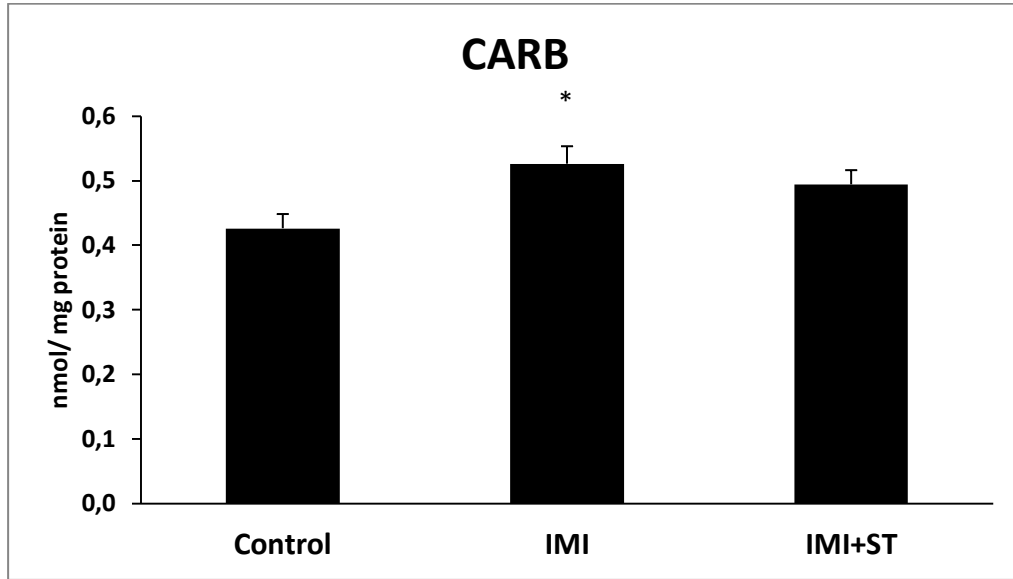
Διάγραμμα 3 : Μέτρηση συγκέντρωσης TBARS

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες.



Διάγραμμα 4: Μέτρηση ενεργότητας καταλάσης

Παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης στην ομάδα IMI (με 17% μείωση, $p=0,046$). Ενώ στην ομάδα IMI+ST δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή ($p=0,91$)



Διάγραμμα 5: Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντική αύξηση την ομάδα IMI (19%, $p=0,048$).

Ενώ στην ομάδα IMI+ST δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή ($p=0,1$)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Πείραμα Νανδρολόνης

Η νανδρολόνη ή 19-νορτεστοστερόνη είναι ένα ανδρογόνο αναβολικό στεροειδές, παράγωγο της τεστοστερόνης. Διαθέτει τόσο ανδρογόνες ιδιότητες, όπως την ανάπτυξη ανδρικών χαρακτηριστικών φύλου, όσο και αναβολικές ιδιότητες, όπως αύξηση του μυϊκού ιστού.^{(54),(55)} Χορηγείται κυρίως μέσω του στόματος σε μορφή χαπιού και παρεντερικά με ενδομυϊκή και υποδόρια ένεση. Λήψη της νανδρολόνης από το στόμα αποτελεί την πρώτη επιλογή για τους αθλητές, που θέλουν να βελτιώσουν σύντομα την απόδοσή τους, γιατί έχει ισχυρή δράση και να αποφύγουν παράλληλα θετικό αποτέλεσμα κατά τον έλεγχο anti-doping, γιατί απομακρύνεται από το σώμα σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (συνήθως μέσα σε βδομάδες), εξαιτίας του σχετικά μικρού χρόνου ημιζωής. Ωστόσο είναι γνωστό ότι η από του στόματος χορηγούμενη νανδρολόνη, εμφανίζει περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με τη χορήγησή της παρεντερικά. Αυτό συμβαίνει γιατί στην πρώτη περίπτωση υφίσταται μεταβολισμός πρώτης διόδου στο ήπαρ, από τις μονοοξυγονάσες του κυτοχρώματος P450, με αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά η παραγωγή των ROS (οξειδωτικό στρες) και να προκληθεί ηπατοτοξικότητα.

Τοξικότητα από τη νανδρολόνη επίσης μπορεί να προκληθεί και στους νεφρούς, δεδομένου ότι είναι το βασικό όργανο απομάκρυνσης του αναβολικού και γενικότερα των φαρμάκων και ουσιών. Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να εξετάσουμε, κατά πόσο η παρεντερική χορήγηση υψηλών και χαμηλών δόσεων δεκανοϊκής νανδρολόνης, επηρεάζει την οξειδωτική κατάσταση νεφρών των κουνελιών. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες σε νεφρούς κουνελιών, μετά από χορήγηση της δεκανοϊκής νανδρολόνης ενδομυϊκώς σε υψηλές (HDIM) και χαμηλές (LDIM) δόσεις και υποδορίως σε υψηλές δόσεις (HDSC).

Το μοντέλο του κουνελιού (με μέσο χρόνο ζωής 4-8 χρόνια) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει στον άνθρωπο η κατάχρηση του αναβολικού. Η δεκανοϊκή νανδρολόνη δρα σχετικά αργά, έτσι οι αθλητές συμβουλευόνται να τη χρησιμοποιούν για 10-12 βδομάδες. Το πειραματικό σχέδιο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη ήταν παρόμοιο με το σύστημα χορήγησης και μη που ακολουθούν οι αθλητές που κάνουν κατάχρηση του συγκεκριμένου αναβολικού.

Για τον προσδιορισμό λοιπόν του οξειδωτικού στρες, μετρήθηκαν στον ομογενοποιημένο νεφρό των ζώων οι παρακάτω δείκτες:

Η γλουταθειόνη GSH, είναι συνήθως το πρώτο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο, το οποίο θυσιάζεται για να αντισταθμίσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της GSH στο συγκεκριμένο πείραμα,

παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα HDIM, με σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH στα ζώα όπου χορηγήθηκε υψηλή δόση δεκανοϊκής νανδρολόνης ενδομυϊκά (περισσότερο από 50% μείωση, $p=0,018$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα GSH των ζώων, που κατεργάστηκαν με χαμηλές δόσεις δεκανοϊκής νανδρολόνης ενδομυϊκά. Στην ομάδα HDSC, όπου χορηγήθηκε η δεκανοϊκή νανδρολόνη υποδορίως, η μείωση των επιπέδων της GSH ήταν λιγότερο έντονη (29%, $p=0,046$). Η μεγάλη μείωση των επιπέδων της GSH στην ομάδα HDIM (>50%), πιθανόν να σχετίζεται με την υψηλή, στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στην ομάδα HDIM. Ανάλογα, η λιγότερο έντονη μείωση των επιπέδων GSH στην ομάδα HDSC, σχετίζεται με τη μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στη συγκεκριμένη ομάδα.

Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν την οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων προκαλώντας την παραγωγή δραστικών και ασταθών υπεροξειδίων τους. Μια διαδικασία αποικοδόμησης αυτών των ασταθών μορίων (κυρίως ο σχηματισμός μηλονικής διαλδεϋδης) οδηγεί στο σχηματισμό των TBARS. Έτσι υψηλά επίπεδα σε TBARS σημαίνει αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση. Στη μελέτη μας μια διπλάσια αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα TBARS του ιστού ($p=0,050$) στην HDIM ομάδα, ενώ η αύξηση που παρατηρήθηκε στην ομάδα HDSC έφτασε ακόμα και 252% σε μερικά ζώα, αλλά και η ατομική διακύμανση ήταν επίσης υψηλή. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα TBARS των ζώων, που κατεργάστηκαν με χαμηλές δόσεις δεκανοϊκής νανδρολόνης ενδομυϊκά (HDSC). Η αύξηση των επιπέδων των TBARS συσχετίζεται σημαντικά με την παρατηρούμενη μείωση της GSH στους νεφρούς, προτείνοντας ότι η GSH χρησιμοποιείται για να μειώσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων.

Η χρήση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως βιοδείκτη οξειδωτικού στρες, έχει κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με την μέτρηση άλλων προϊόντων οξείδωσης εξαιτίας του σχετικά πρώιμου σχηματισμού τους και τη σχετική σταθερότητα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο νεφρό υποδείκνυαν ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών, δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη χορήγηση της δεκανοϊκής νανδρολόνης σε οποιαδήποτε δόση.

Τα αντιοξειδωτικά, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του σχηματισμού καθώς και στην δέσμευση των ελευθέρων ριζών και άλλων δυνητικά τοξικών οξειδωτικών μορίων. Με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν, έγινε μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) η οποία δίνει πληροφορίες για τις αρνητικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες. Όσον αφορά λοιπόν τα επίπεδα TAC στα νεφρά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Τα επίπεδα της TAC, σε αντίθεση με της GSH δεν παρουσίασαν μείωση. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η GSH αποτελεί ένα μικρό ποσοστό, μέσα σε ένα πλήθος αρκετών άλλων αντιοξειδωτικών μορίων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC και γι αυτό το λόγο δεν αντικατοπτρίζει τη μεταβολή της TAC.

Τέλος, η καταλάση (CAT) είναι μια αιμοπρωτεΐνη καθώς και ένα σημαντικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Η βασική λειτουργία της CAT είναι να προστατεύει το κύτταρο από τις τοξικές επιδράσεις των μεγάλων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Αυτό το επιτυγχάνει καταλύοντας τη διάσπαση του H_2O_2 σε μοριακό οξυγόνο και νερό, χωρίς την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Όσον αφορά λοιπόν τη δραστηριότητα της καταλάσης, δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση της δεκανοϊκής νανδρολόνης σε οποιαδήποτε δόση, υποδεικνύοντας ότι η επαγωγή του οξειδωτικού στρες δεν επηρέασε αυτό το αντιοξειδωτικό ένζυμο.

Συμπερασματικά, σε γενικές γραμμές, από τα αποτελέσματα που πήραμε, οξειδωτικό στρες παρατηρήθηκε σε όλα τα ζώα που υπέστησαν αγωγή. Σημαντικές αλλαγές όμως παρατηρήθηκαν μόνο στην κατάσταση οξειδωτικού στρες των ζώων που κατεργάστηκαν με υψηλές δόσεις δεκανοϊκής νανδρολόνης και όχι σε εκείνα που χορηγήθηκαν χαμηλές δόσεις του αναβολικού. Τελικά, λοιπόν, η παρεντερική χορήγηση της νανδρολόνης σε υψηλές δόσεις, συμπεραίνουμε ότι προξενεί οξειδωτικό στρες, ωστόσο όμως ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό παραμένει άγνωστος προς το παρόν και χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω μελέτες.

Από τη βιβλιογραφία έχει βρεθεί μία παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κουνέλια Νέας Ζηλανδίας στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο, τα οποία εγκλιματίστηκαν σε ακριβώς ίδιες συνθήκες με αυτές που αναφέρθηκαν για το παρών πείραμα. Η μελέτη αυτή έγινε με σκοπό να καταδειχθεί η πιθανή τοξικότητα που προκαλείται στον καρδιακό μυ των κουνελιών, έπειτα από μακροχρόνια χορήγηση δεκανοϊκής νανδρολόνης.⁽⁹⁸⁾ Οι ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν τα ζώα, η δοσολογία καθώς και η περίοδος χορήγησης και μη του αναβολικού, ήταν ακριβώς οι ίδιες με το πείραμα που μελετάμε. Προσδιορίστηκαν όλοι οι δείκτες οξειδωτικού στρες, εκτός από τη γλουταθειόνη GSH (πιθανόν λόγω ανεπαρκούς ποσότητας δειγμάτων). Από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στις ομάδες HDIM και HDSC ($p < 0,05$). Τα επίπεδα της TAC, όπως και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές. Τέλος τα επίπεδα της καταλάσης παρουσίασαν μία μη στατιστικά σημαντική μείωση στις ομάδες HDIM ($p = 0,237$) και HDSC ($p = 0,238$). Στην ομάδα LDIM, τα επίπεδα όλων των δεικτών οξειδωτικού στρες παρέμειναν αμετάβλητα. Από τα αποτελέσματα αυτά λοιπόν συμπεραίνουμε ότι η μακροχρόνια χορήγηση δεκανοϊκής νανδρολόνης προκαλεί οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια τοξικότητα στον καρδιακό μυ, όπως συμβαίνει και με την περίπτωση του νεφρού, που μελετάμε στο συγκεκριμένο πείραμα. Παρόμοιες μελέτες σε άλλους ιστούς δεν έχουν πραγματοποιηθεί, προκειμένου να μπορέσουμε να πούμε με βεβαιότητα ότι η δεκανοϊκή νανδρολόνη προκαλεί βλάβες σε όλους τους ιστούς.

5.2 Πείραμα Ιμιδακλοπρίδης

Η ιμιδακλοπρίδη, ανήκει στην κατηγορία των νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων και σήμερα καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας αγοράς εντομοκτόνων. Είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα έντομα, καθώς δρα στο περιφερειακό νευρικό τους σύστημα, παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική μετάδοση των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων, επιφέροντας τελικά τον θάνατο των εντόμων. Στην περίπτωση των θηλαστικών έχει χαρακτηριστεί ως μέτρια τοξικό σε περίπτωση κατάποσης ⁽⁹³⁾. Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια υπολογίστηκε ότι το LD50 της ιμιδακλοπρίδης είναι 450 mg/kg (και για τα δύο φύλα) σε περίπτωση χορήγησης από το στόμα. ^{(94),(95)} Τα ζώα μπορεί επίσης να εκτεθούν στην ουσία, μέσω του επιδερμικού και του αναπνευστικού συστήματος. Η ιμιδακλοπρίδη εμφανίζει πολύ μικρή τοξικότητα όταν γίνεται έκθεση μέσω δέρματος. ⁽⁹³⁾ Συγκεκριμένα, από μελέτες που έγιναν σε ποντίκια υπολογίστηκε ότι το LD50 της ιμιδακλοπρίδης είναι άνω των 5000 mg/kg, όταν γίνεται έκθεση μέσω του δέρματος. Η ιμιδακλοπρίδη έχει μεταβλητή τοξικότητα σε περίπτωση εισπνοής της. Εισπνοή της, όταν είναι σε μορφή σκόνης, έδειξε ελαφρά τοξικότητα, καθώς το LD50 της ιμιδακλοπρίδης είναι άνω των 5323 mg/m³ (από πειράματα που έγιναν σε ποντίκια). Ενώ είναι ιδιαίτερα τοξική όταν είναι σε μορφή αεροζόλ με LD50 69 mg/m³ (από πειράματα που έγιναν σε ποντίκια). ^{(93),(94)} Δεν είναι ιδιαίτερα τοξική στον άνθρωπο, καθώς έχουν αναφερθεί λίγες περιπτώσεις ανθρώπινης τοξικότητας που οφείλονται στην ιμιδακλοπρίδη, με ήπια συμπτώματα σε γαστρεντερικό και αναπνευστικό σύστημα. ^{(96),(97)}

Η από του στόματος χορήγηση της ιμιδακλοπρίδης προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες στον οργανισμό. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι υφίσταται μεταβολισμός πρώτης διόδου στο ήπαρ, μέσω του κυτοχρώματος P450, με αποτέλεσμα να αυξηθεί σημαντικά η παραγωγή των ROS (οξειδωτικό στρες).

Στο συγκεκριμένο πείραμα θέλαμε να εξετάσουμε κατά πόσο ισχύει η υπόθεση, ότι η από του στόματος χορήγηση της ιμιδακλοπρίδης προκαλεί την εκδήλωση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δεικτών οξειδωτικού στρες σε αίμα κουνελιών, μετά από χορήγηση ιμιδακλοπρίδης (μέσω κατάποσης) στη μία ομάδα (IMI) και ιμιδακλοπρίδης σε συνδυασμό με διένυδρο βολφραμικό νάτριο στην άλλη ομάδα (IMI+ST). Το διένυδρο βολφραμικό νάτριο χορηγείται σε συνδυασμό με την ιμιδακλοπρίδη, προκειμένου να παρατηρήσουμε εάν παρέχει προστασία, έναντι της δυσμενούς δράσης της ιμιδακλοπρίδης στον οργανισμό των ζώων.

Για τον προσδιορισμό λοιπόν του οξειδωτικού στρες, μετρήθηκαν στο πλάσμα των ζώων οι δείκτες: Γλουταθειόνη (GSH), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), λιπιδική υπεροξειδωση (TBARS), δραστηριότητα καταλάσης και μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Από τα αποτελέσματα παρατηρήσαμε μία στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης στην ομάδα IMI (με 17% μείωση, $p=0,046$). Η άλλη αλλαγή που παρατηρήσαμε ήταν κατά τη μέτρηση των

πρωτεϊνικών καρβονυλίων, με μία στατιστικά σημαντική αύξηση την ομάδα IMI (19%, $p=0,048$). Στην ομάδα IMI+ST, για όλους τους δείκτες οξειδωτικού στρες, οι αλλαγές ήταν ελάχιστες σε σχέση με την ομάδα control, σε αντίθεση με την ομάδα IMI. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το διένυδρο βολφραμικό νάτριο ασκούσε μια προστατευτική δράση έναντι της οξειδωτικής δράσης της ιμιδακλοπρίδης, όταν χορηγούνταν σε συνδυασμό με αυτήν.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.
2. Halliwell B and Gutteridge JM, (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.

3. Cheeseman KH, Slater TF, 1993. "An introduction to free radical biochemistry" : Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93.
4. Halliwell B., 2001, Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Encyclopedia of Life Science.
5. Thannickal, J. V. and Fanburg, L. B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: 1005-L1028.
6. *Chance B, Sies H, Boveris A 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605.*
7. Bielski BHJ and Cabelli DE 1995. Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active Oxygen in Chemistry.*
8. Von Sonntag C 1987. *The Chemical Basis of radiation Biology.* Taylor & Francis, London.
9. Koppenol WH. *Free Radic Biol Med.* 1998 Sep; The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite.
10. Downey JM, 1990. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52: 487-504.
11. Kuppasamy P and Zweier JL, 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264: 9880-9884.
12. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
13. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292
14. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
15. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8):716 8.
16. Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010
17. Pyne DB .*Sports Med.* 1994 Apr; Regulation of neutrophil function during exercise.
18. Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364

19. Victoria CR. *Arq Gastroenterol*. 1994. Jejunal electrogenic transport of glucose in rats with niacin deficiency.
20. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M, 1998. *Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury*. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
21. Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK 2001. *Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics*. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.
22. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr, 1992. *Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection*. *Toxicology* 72:153-165.
23. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P, 2000. *Redox state of glutathione in human plasma*. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.
24. Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Oreland L, 2001. *Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation*. *Brain Res* 906:170-175.
25. Wormser U, Brodsky B, Green BS, Arad-Yellin R, Nyska A. *J Appl Toxicol*. 2000 Dec; [Protective effect of povidone iodine ointment against skin lesions induced by chemical and thermal stimuli.](#)
26. Ames BN 1986. *Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens*. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
27. Kanner J and Lapidot T, 2001. *The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants*. *Free Radic Biol Med* 31: 1388-1395.
28. Lijinsky W, 1999. *N-Nitroso compounds in the diet*. *Mutat Res* 443: 129-138.
29. Beckman JS, Koppenol WH. *Am J Physiol*. 1996 Nov; [Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.](#)
30. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H, 2002. *Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement*. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115.
31. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN, 1999. *8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage*. *Methods Enzymol* 300:156-166
32. Finaud J, Lac G, Filaire E. *Sports Med*. 2006; Oxidative stress: relationship with exercise and training.

33. Sen' VD, Golubev VA, Volkova LM, Konovalova NP. *J Inorg Biochem.* 1996. Synthesis and antitumor activity of platinum(II) complexes with trans-3,4-diamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl.
34. Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. *Arch Tierernähr.* 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems.
35. Reid MB, 2001. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*; 90: 724-31.
36. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr; Human aging and global function of coenzyme Q10.
37. ASHOK BT, ALI R. The aging paradox: Free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999, 34:293–303
38. Stefanis L, Burke RE, Greene LA. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol.*1997;10:299–305.
39. Singh RP, Khanna R, Kaw JL, Khanna SK, Das M. Comparative effect of benzanthrone and 3-bromobenzanthrone on hepatic xenobiotic metabolism and anti-oxidative defense system in guinea pigs. *Arch Toxicol* 2003; 77:94–99.
40. Noguchi N, Watanabe A, Shi HL. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* 2000; 33:809–817.
41. Antunes F, Derick H, Cadenas E, 2002. *Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 33 (9): 1260-7.*
42. Scholz RW, Graham KS, Gumprich E, Reddy CC, 1989. *Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. Ann NY Acad Sci:570:514-7.*
43. Παπαγεωργίου, Γεώργιος, 2005. *Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση. Θεσσαλονίκη: university studio press.*
44. Green HJ, Fraser IG. *Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
45. Hartgens F. And Kuipers H., *Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes, Sports Med,* 2004

46. Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14 (1):55-69.
47. Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin Chem* 1996;42 (7):1001-20
48. Kumar N, Crozat A, Li F, Catterall JF, Bardin CW, Sundaram K. (1999) 7 α -methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen with high potency: structure-activity comparisons with other androgens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:213-22
49. Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. (1992) Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 88:15-22
50. Zhou ZX, Lane MV, Kempainen JA, French FS, Wilson EM. (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 9:208-18].
51. Birch JA. Hydroaromatic steroid hormones. I 10-nortestosterone. *J Chem Soc* 1950:367-8.
52. Eklof AC, Thurelius AM, Garle M, Rane A, Sjoqvist F. The anti-doping hot-line, a means to capture the abuse of doping agents in the Swedish society and a new service function in clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59 (8-9):571-7.
53. Van Marken Lichtenbelt WD, Hartgens F, Vollaard NB, Ebbing S, Kuipers H. Bodybuilders' body composition: Effect of nandrolone decanoate. *Med Sci Sports Exerc* 2004, 36:484– 489
54. Tamaki T, Uchiyama S, Uchiyama Y, Akatsuka A, Roy RR, Edgerton VR. Anabolic steroids increase exercise tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280:E973–E981
55. Van Zyl CG, Noakes TD, Lambert MI. Anabolic-androgenic steroid increases running endurance in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1995, 27:1385–1389
56. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:5108–5117

57. Rogol AD. Pubertal androgen therapy in boys. *Pediatr Endocrinol Rev* 2005, 2:383–390
58. Rabkin JG, Wagner GJ, Rabkin R. A double-blind, placebo-controlled trial of testosterone therapy for HIV-positive men with hypogonadal symptoms. *Arch Gen Psychiatry* 2000, 57:141– 1477; discussion 55–56
59. Hengge UR. Testosterone replacement for hypogonadism: Clinical findings and best practices. *AIDS Read* 2003, 13(Suppl 12):S15–S21
60. Yesalis CE. Use of steroids for self-enhancement: An epidemiologic/societal perspective. *AIDS Read* 2001, 11:157–160
61. Grinspoon S, Corcoran C, Askari H, Schoenfeld D, Wolf L, Burrows B et al. Effects of androgen administration in men with the AIDS wasting syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998, 129:18–26
62. Strawford A, Barbieri T, Van Loan M, Parks E, Catlin D, Barton N et al. Resistance exercise and supraphysiologic androgen therapy in eugonadal men with HIV-related weight loss: Ανδροβολικά Στεροειδή 609 A randomized controlled trial. *JAMA* 1999, 281:1282–1290
63. Orr R, Fiatarone Singh M. The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders: Review of efficacy and safety. *Drugs* 2004, 64:725–750
64. Gardner FH. Anabolic steroids in aplastic anemia. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1985, 271:87–96
65. Johansen KL. Treatment of hypogonadism in men with chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2004, 11:348–356
66. Rambaldi A, Gluud C. Anabolic-androgenic steroids for alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD003045
67. Triantafillopoulos IK, Banes AJ, Bowman KF Jr, Maloney M, Garrett WE Jr, Karas SG. Nandrolone decanoate and load increase remodeling and strength in human supraspinatus bioartificial tendons. *Am J Sports Med* 2004, 32:934–943
68. Taylor DC, Brooks DE, Ryan JB. Anabolic-androgenic steroid administration causes hypertrophy of immobilized and nonimmobilized skeletal muscle in a sedentary rabbit model. *Am J Sports Med* 1999, 27:718–727

69. Scott MJ, 3rd, Scott AM. Effects of anabolic-androgenic steroids on the pilosebaceous unit. *Cutis* 1992;50 (2):113-6.
70. Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World J Urol* 2003;21 (5):341-5.
71. Gruber AJ, Pope HG, Jr. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother Psychosom* 2000;69 (1):19-26.
72. Akhter J, Hyder S, Ahmed M. Cerebrovascular accident associated with anabolic steroid use in a young man. *Neurology* 1994;44 (12):2405-6.
73. Kennedy MC, Corrigan AB, Pilbeam ST. Myocardial infarction and cerebral haemorrhage in a young body builder taking anabolic steroids. *Aust N Z J Med* 1993;23 (6):713.
74. Kennedy MC, Lawrence C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust* 1993;158 (5):346-8.
75. Kennedy C. Myocardial infarction in association with misuse of anabolic steroids. *Ulster Med J* 1993;62 (2):174-6.
76. Dickerman RD, Schaller F, Prather I, McConathy WJ. Sudden cardiac death in a 20- year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology* 1995;86 (2):172-3.
77. Hartgens F, Rietjens G, Keizer HA, Kuipers H, Wolffenbuttel BH. Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). *Br J Sports Med* 2004;38 (3):253-9.
78. Cheever K, House MA. Cardiovascular implications of anabolic steroid abuse. *J Cardiovasc Nurs* 1992;6 (2):19-30.
79. Bagatell CJ, Heiman JR, Matsumoto AM, Rivier JE, Bremner WJ. Metabolic and behavioral effects of high-dose, exogenous testosterone in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79 (2):561-7.
80. Hristov, H., Kostov, D., Vladova, D., Topographical anatomy of some abdominal organs in rabbits. *Trakia Journal of Sciences*, 4: 7-10, 2006
81. Gohary, Z., Ibrahim, H., Amer, T., Darwisch, S., Phylogenetic studies on the architectural features of amphibian (*Bufo regularis*) and mammalian (*Oryctolagus cuniculus*) kidneys. *Qatar University Science Journal*, 14: 324-337, 1994.

82. Bolat, D., Bahar, S., Selcuk, M., Tipirdamaz, S., Morphometric investigations of fresh and fixed rabbit kidney. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 27: 149-154, 2011.
83. Wu, J., Ge, X., Fany, G., Ultrarapid nonsuture mated cuff technique for renal transplantation in rabbits. *Microsurgery*, 23: 369-373, 2003.
84. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater*. 2007;13:1–10.
85. Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [(3)H]imidacloprid binding site. Zhang A1, Kayser H, Maienfisch P, Casida JE. 2000 Sep;75(3):1294-303
86. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). Nauen R1, Stumpf N, Elbert A. 2002 Sep;58(9):868-75
87. Therapy and prevention of parasitic insects in veterinary medicine using imidacloprid. Mencke N1, Jeschke P. 2002 Jul;2(7):701-15
88. Tourné, C. M.; Tourné, G. F.; Malik, S. A.; Weakley, T. J. R. J. *Inorg. Nucl. Chem*. 1970, 32, 3875; [CrossRef])
89. Payne, G. B.; Williams P. H. J. *Org. Chem*. 1959, 24, 54. [CrossRef] και Jorgensen, K. A. *Chem. Rev*. 1989, 89, 431. [CrossRef])
90. (Noyori, R.; Aoki, M.; Sato, K. *Chem. Commun*. 2003, 1977. [CrossRef])
91. Sato, K.; Aoki, M.; Takagi, J.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc*. 1997, 119, 12386. [CrossRef]).
92. [The Antidiabetic Agent Sodium Tungstate Activates Glycogen Synthesis through an Insulin Receptor-independent Pathway](#). *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 44, Issue of October 31, pp. 42785–42794, 2003
93. Label Review Manual; U.S Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs. <http://www.epa.gov/oppfead1/labeling/lrm/chap-07.pdf> (accessed June 2009), updated Aug 2007.
94. Tomlin, C. D. S. *The Pesticide Manual, A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Surry, England, 2006; pp 598-599.

95. Toxicological Evaluations: Imidacloprid; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization.
<http://www.inchem.org/jmpr/jmprmono/2001pr07.htm> (accessed Oct 2008), updated Feb 2004.
96. Zwart, Ruud, Marga, Oortgiesen, and Henk PM. Nitromethylene heterocycles: selective agonists of nicotinic receptors in locust neurons compared to mouse N1E-115 and BC3H1 cells. *Pest. Biochem. Physiol* 1994;48:202-213.
97. Mohamed F, Gawarammana I, Robertson TA, Roberts MS, Palangasinghe C, et al. Acute Human Self-Poisoning with Imidacloprid Compound: A Neonicotinoid Insecticide. *PLoS ONE* 2009;4:e5127.
98. Cardiotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. Vasilaki F1, Tsitsimpikou C2, Tsarouhas K3, Germanakis I4, Tzardi M5, Kavvalakis M1, Ozcagli E6, Kouretas D7, Tsatsakis AM8 2016 Jan 22;241:143-51. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.10.026. Epub 2015 Nov 2.