

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

# Συσχέτιση επιπέδων αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα και στα ούρα με την ηλικία

**ΣΚΟΠΟΣ** Η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού με την ηλικία έχει γίνει από λίγους ερευνητές και έχει οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, τα οποία εξαρτώνται σημαντικά από το είδος του αντιοξειδωτικού που προσδιορίζεται και την τεχνική που εφαρμόζεται. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη μέτρηση της αναστολής οξειδωσης του 2,2'-αζινοδιδ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS) από το σύστημα ferryl μιοσφαιρίνης-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε διάφορες ηλικιακές ομάδες του πληθυσμού της Θεσσαλονίκης. Ο προσδιορισμός έγινε σε ορό αίματος και ούρα, προκειμένου να αξιολογηθεί το είδος του βιολογικού υγρού που μπορεί να δώσει σαφή εικόνα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού εξετάστηκε σε 118 εθελοντές, κατοίκους του νομού Θεσσαλονίκης. Από όλους τους εθελοντές συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο σχετικά με την ηλικία, το φύλο, τον τρόπο ζωής, τον τόπο κατοικίας, το είδος εργασίας, τις διατροφικές συνήθειες και το κάπνισμα. Οι συστηματικοί καπνιστές εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη. Τα άτομα χωρίστηκαν ηλικιακά ως εξής: Ομάδα 5–17 ετών (5 άτομα), ομάδα 18–35 ετών (55 άτομα), ομάδα 36–60 ετών (30 άτομα) και ομάδα 61–90 ετών (28 άτομα). Σε 87 άτομα που επιλέχθηκαν τυχαία και από τις τέσσερις ομάδες έγινε προσδιορισμός ολικών αντιοξειδωτικών στα ούρα και συσχέτιση των αποτελεσμάτων με εκείνα του ορού. Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και των ούρων προσδιορίστηκε η επίδραση της προσθήκης 10 μL αραιωμένου 1/10 ορού ή 10 μL αραιωμένου 1/15 ούρων στην οξειδωση του ABTS από το σύστημα ferryl μιοσφαιρίνης-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με το kit αντιοξειδωτικής δοκιμασίας της Cayman. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού με το φύλο. Επίσης, δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των μη καπνιστών και εκείνων που δήλωσαν ότι κάπνιζαν έως τρία τσιγάρα την ημέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν σταδιακή αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο του ορού όσο και των ούρων έως την ηλικιακή ομάδα των 36–60 ετών, που ακολουθήθηκε από μικρή μείωση στον ορό, καθώς και μικρή αύξηση στα ούρα στην ομάδα των 61–90 ετών. Σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση ολικών αντιοξειδωτικών τόσο στον ορό (αύξηση 79%, p=0,000) όσο και στα ούρα (αύξηση 83%, p=0,000) παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας 18–35 ετών και της ομάδας 36–60 ετών. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και των ούρων με τη μέθοδο οξειδωσης του ABTS από το σύστημα ferryl μιοσφαιρίνης-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δείχνει αύξηση με την πάροδο της ηλικίας, γεγονός που θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την αποτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικό αποτέλεσμα διαφόρων λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι ο αερόβιος μεταβολισμός. Ωστόσο, μπορεί να

προκύψουν και ως αποτέλεσμα εξωγενών παραγόντων,<sup>1-6</sup> που προέρχονται από τη διατροφή ή την περιβαλλοντική ρύπανση και το κάπνισμα.<sup>7,8</sup> Σχηματίζονται ως ενδιάμεσα

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2010, 27(6):956–962  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2010, 27(6):956–962

Ε. Λυμπεράκη,  
Φ. Ελευθερίου,  
Σ. Μήτκα,  
Γ. Μαυροπούλου,  
Χ. Πέτρου

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή  
Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας,  
Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό  
Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

Correlation of serum and urine  
antioxidants with age

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Αντιοξειδωτικά  
Ηλικία  
Οξειδωτικό stress  
Ορός  
Ούρα

Υποβλήθηκε 23.2.2010  
Εγκρίθηκε 10.3.2010

ή τελικά προϊόντα ενζυμικών, χημικών, φωτοχημικών αντιδράσεων ή λόγω της επίδρασης ακτινοβολιών.<sup>9,10</sup> Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού και της απέκκρισης ξενοβιοτικών, ενώ αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών παρατηρείται κατά τη φυσική άσκηση.<sup>11-14</sup> Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται είναι ανιόντα υπεροξειδίου  $O_2^-$ , υπεροξειδίου του υδρογόνου  $H_2O_2$ , ρίζα υδροξυλίου  $OH^-$  κ.λπ., ενώ μπορούν να προκαλέσουν λιπιδική υπεροξειδωση, οξειδωση DNA και οξειδωση πρωτεϊνών. Οι αντιδράσεις οξειδωσης είναι σημαντικές, ωστόσο ενδέχεται να θεωρηθούν υπεύθυνες για την εμφάνιση μεταλλάξεων, καρκίνου,<sup>15,16</sup> εκφυλιστικών νόσων, όπως είναι η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, ο διαβήτης,<sup>17-19</sup> η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η υπέρταση,<sup>20</sup> οι καρδιοπάθειες,<sup>21-24</sup> η γήρανση<sup>25-27</sup> και η ανδρική στειρότητα, όταν δεν υπάρχει ισορροπία στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και στα επίπεδα αντιοξειδωτικών. Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να συνδέσουν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Δεν είναι σαφές αν τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών που παρατηρούνται σε ορισμένες νόσους αποτελούν παράγοντα έναρξης και εξέλιξης της νόσου ή είναι αποτέλεσμα αυτής.

Ο οργανισμός προστατεύεται από τις ελεύθερες ρίζες μέσω ενός συστήματος που περιλαμβάνει έναν αριθμό ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων και ενζύμων. Ένας αριθμός εξωγενών αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως είναι οι βιταμίνες και άλλες ενώσεις, εισάγονται στον οργανισμό μέσω της διατροφής.<sup>28</sup> Τα επίπεδα ολικών αντιοξειδωτικών στο αίμα μπορούν να θεωρηθούν ως μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού.<sup>29</sup> Παράλληλα, διάφοροι ερευνητές προσπαθούν να συσχετίσουν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών σε άλλα βιολογικά υγρά, μεταξύ των οποίων και στα ούρα, με τη γενικότερη φυσική κατάσταση του οργανισμού, καθώς και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.<sup>30-32</sup> Έχει διαπιστωθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού<sup>33,34</sup> έναντι ορισμένων νόσων, ενώ η χορήγηση αντιοξειδωτικών προτείνεται ως τμήμα της θεραπείας κάποιων νόσων.<sup>35-39</sup> Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένας επιπλέον δείκτης για την πρόγνωση και τη διάγνωση ορισμένων παθολογικών καταστάσεων.<sup>40-42</sup>

Στην προσπάθεια συσχέτισης των ελευθέρων ριζών με τη διαδικασία της γήρανσης έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά ερευνών, με αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα. Μεταξύ των παραγόντων που μετρήθηκαν από διάφορους ερευνητές για τη διερεύνηση της ύπαρξης οξειδωτικού stress ήταν ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση, όπως η καταλάση, η οξειδάση του υπεροξειδίου, οι βιταμίνες με

αντιοξειδωτική δράση ή τα προϊόντα οξειδωσης, όπως είναι η μηλονική διαλδεύδη, το ποσοστό οξειδωσης πρωτεϊνών, το ποσοστό οξειδωσης του DNA και η λιπιδική υπεροξειδωση. Μελέτες δείχνουν σταθερή συγκέντρωση, μείωση ή αύξηση μεμονωμένων παραγόντων με την πρόοδο της ηλικίας.<sup>43-49</sup> Στις περισσότερες περιπτώσεις υποστηρίζεται αύξηση του οξειδωτικού stress με την ηλικία. Η προσπάθεια προσδιορισμού ολικών αντιοξειδωτικών στον ορό με διάφορες μεθόδους έχει οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα.<sup>42,44</sup> Μέτρηση με τη μέθοδο FRAP, που αδυνατεί όμως να προσδιορίσει τα αντιοξειδωτικά τα οποία περιέχουν σουλφιδρυλομάδες,<sup>50</sup> έδειξε σημαντική μείωση των ολικών αντιοξειδωτικών με την ηλικία.<sup>42</sup> Παράλληλα, αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού με την ηλικία παρατηρήθηκε, ως δευτερεύον συμπέρασμα, σε λίγες περιπτώσεις άλλων ερευνών που είχαν ως στόχο τη διερεύνηση της επίπτωσης της διατροφής, της άσκησης και ορισμένων τύπων καρκίνου στα επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα.<sup>36</sup>

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο ευρύτερου προγράμματος για να αποτελέσει τη βάση για την εκτίμηση της επίδρασης διατροφικών και λοιπών συνηθειών, καθώς και παθολογικών καταστάσεων στα επίπεδα αντιοξειδωτικών στον ορό και τα ούρα. Στη συγκεκριμένη εργασία προσδιορίστηκε, με τη μέθοδο ABTS, η ολική αντιοξειδωτική δράση στον ορό και στα ούρα κατοίκων της Θεσσαλονίκης που χωρίστηκαν σε τέσσερις ηλικιακές ομάδες και έγινε συσχέτιση των ολικών αντιοξειδωτικών με την ηλικία. Από τα δείγματα αποκλείστηκαν άτομα που δήλωσαν συνήθειες οι οποίες αποδεδειγμένα συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, όπως είναι οι συστηματικοί καπνιστές.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στην εργασία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση ολικών αντιοξειδωτικών στον ορό 118 ατόμων, κατοίκων της Θεσσαλονίκης, οι οποίοι συμμετείχαν εθελοντικά στην έρευνα και συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια σχετικά με την ηλικία, το φύλο, τις διατροφικές τους συνήθειες, το ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα, τον τόπο κατοικίας, το είδος και τον τόπο εργασίας, τον τρόπο ζωής (χρήση υπολογιστή, συνήθειες ώρες και διάρκεια ύπνου κ.λπ.). Τα άτομα χωρίστηκαν σε τέσσερις ηλικιακές ομάδες: 1η ομάδα: 5-17 ετών (n=5), 2η ομάδα: 18-35 ετών (n=55), 3η ομάδα: 36-60 ετών (n=30) και 4η ομάδα: 60-90 ετών (n=28). Σε 87 άτομα που επιλέχθηκαν τυχαία και από τις τέσσερις ομάδες έγινε προσδιορισμός ολικών αντιοξειδωτικών στα ούρα και συσχέτιση των αποτελεσμάτων με αυτά του ορού. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος και ούρων έγινε μεταξύ 8:00 και 9:30 π.μ. Τα δείγματα καταψύχθηκαν αμέσως και συντηρήθηκαν στους -70 °C έως τον προσδιορισμό (2-6 εβδομάδες).

### Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας<sup>57</sup> του ορού και των ούρων προσδιορίστηκε η επίδραση της προσθήκης 10 μL αραιωμένου 1/10 ορού ή 10 μL αραιωμένου 1/15 ούρων στην οξειδωση του 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS) από το σύστημα ferryl μιοσφαιρίνης-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με το kit αντιοξειδωτικής δοκιμασίας (Cayman), που θεωρήθηκε η καλύτερη μέθοδος μέτρησης.<sup>52-58</sup>

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το trolox, το οποίο αποτελεί υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E. Η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών εκφράστηκε ως ισοδύναμα trolox.

### Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του Students' test (t-test) για ανεξάρτητα δείγματα.

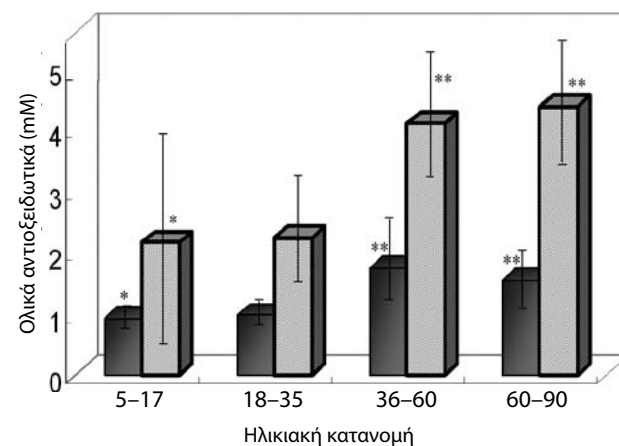
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα δεν προέκυψε διαφορά στη συγκέντρωση ολικών αντιοξειδωτικών μεταξύ των δύο φύλων. Επίσης, δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των μη καπνιστών και εκείνων που δήλωσαν ότι κάπνιζαν έως τρία τσιγάρα την ημέρα και για το λόγο αυτόν ενσωματώθηκαν στην ίδια ομάδα. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην περίπτωση συστηματικών καπνιστών, που εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σταδιακή αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο του ορού όσο και των ούρων έως την ηλικιακή ομάδα των 36–60 ετών, που ακολουθήθηκε από μικρή μείωση των τιμών στον ορό και μικρή αύξηση των τιμών στα ούρα στην ομάδα των 61–90 ετών (πίν. 1, εικ. 1). Οι δύο πρώτες ηλικιακές ομάδες, 5–17 ετών και 18–35 ετών, παρουσίασαν συγκρίσιμα επίπεδα αντιοξειδωτικών, τα οποία χαρακτηρίζονταν από έλλειψη στατιστικώς σημαντικών διαφορών μεταξύ τους ( $p=0,432$  για τον ορό και  $p=0,891$  για τα ούρα). Ανάλογα, συγκρίσιμες τιμές παρουσίασαν οι δύο μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες των 36–60 και 61–90

ετών. Σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση ολικών αντιοξειδωτικών τόσο στον ορό ( $79\%$ ,  $p=0,000$ ) όσο και στα ούρα ( $83\%$ ,  $p=0,000$ ) παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας των 18–35 ετών και της ομάδας των 36–60 ετών.

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα έδειξαν σταδιακή αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), όπως αυτή μετρήθηκε με τη μέθοδο αναστολής οξείδωσης του 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολινο)-6-σουλφονικού οξέος (ABTS) από το σύστημα ferryl μιοσφαιρίνης-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, τόσο στον ορό όσο και στα ούρα, τουλάχιστον μέχρι την ηλικία των 60 ετών, με τη σημαντικότερη αύξηση να παρατηρείται στον ορό ( $79\%$ ) και στα ούρα ( $83\%$ ) ατόμων που ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα των 36–60 ετών σε σύγκριση με την ηλικιακή ομάδα των 18–25 ετών.



\*  $p > 0,400$

\*\*  $p = 0,000$  (αποτελέσματα σύγκρισης των τιμών κάθε ομάδας με την ομάδα 18–35, με εφαρμογή του στατιστικού προγράμματος Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα)

**Εικόνα 1.** Ηλικιακή κατανομή ολικών αντιοξειδωτικών στον ορό και τα ούρα.

**Πίνακας 1.** Μέση συγκέντρωση ολικών αντιοξειδωτικών στον ορό και τα ούρα, καθώς και εκτίμηση ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των τεσσάρων ηλικιακών ομάδων.

Ηλικία	Ορός				Ούρα				TAC ορού/TAC ούρων
	n	TAC (mM) $\pm$ SD	p*	%	n	TAC (mM) $\pm$ SD	p*	%	
5–17	5	0,92 $\pm$ 0,22	0,432	95%	5	2,16 $\pm$ 2,00	0,891	97%	2,35
18–35	55	0,97 $\pm$ 0,14		100%	24	2,23 $\pm$ 0,73		100%	2,30
36–60	30	1,74 $\pm$ 0,51	0,000	179%	30	4,09 $\pm$ 1,13	0,000	183%	2,35
61–90	28	1,55 $\pm$ 0,47	0,000	160%	28	4,37 $\pm$ 1,09	0,000	196%	2,82

\* Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Τα αποτελέσματα κάθε ηλικιακής ομάδας συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ηλικιακής ομάδας των 18–35 ετών

TAC: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα [total antioxidant capacity], SD: Τυπική απόκλιση

Οι προσδιοριζόμενες τιμές στα ούρα ήταν γενικά μεγαλύτερες από αυτές στον ορό, όπως ήταν αναμενόμενο, κυρίως λόγω της ύπαρξης αυξημένων ποσοτήτων ουρικού οξέος στα ούρα. Ο λόγος της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ορό και τα ούρα διατηρήθηκε σταθερός στην τιμή 2,30–2,35 στις τρεις πρώτες ηλικιακές ομάδες, ενώ αυξήθηκε, φθάνοντας την τιμή 2,82, στη μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα. Γενικά, η ηλικιακή μεταβολή ολικών αντιοξειδωτικών στα ούρα ακολουθούσε αυτή στον ορό με εξαίρεση την ηλικιακή ομάδα των 60–90 ετών, όπου παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών στον ορό και αύξηση στα ούρα. Η διαφοροποίηση προφανώς οφειλόταν στην αυξημένη συγκέντρωση ουρικού στα ούρα, που παρατηρήθηκε σε αυτές τις ηλικίες.

Τα ευρήματα, από πρώτη άποψη, φάνηκε ότι βρίσκονταν σε αντίθεση με τη γενικότερη άποψη που συσχετίζει τις ελεύθερες ρίζες με τη διαδικασία του γήρατος. Στις περισσότερες μελέτες που προσδιορίζουν το ποσοστό βλαβών από τη δράση ελευθέρων ριζών, όπως είναι η λιπιδική υπεροξειδωση, η οξειδωση πρωτεϊνών και οι βλάβες στο DNA, αυξημένα ποσοστά βλαβών παρατηρούνται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας.<sup>41,42</sup> Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει αύξηση ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση, όπως είναι η καταλάση και η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD),<sup>41</sup> ενδεχομένως λόγω αυξημένης ανάγκης για

αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών. Η παρουσία χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων και εκφυλιστικών νόσων, είτε αυτές έχουν εκδηλωθεί είτε υπάρχουν σε λανθάνουσα κατάσταση, συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών στα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Από την άλλη πλευρά, τα άτομα μικρότερης ηλικίας, φοιτητές και εργένηδες, κάνουν συνήθως λιγότερο προσεγγμένη διατροφή ενώ εκτίθενται περισσότερο σε ανθυγιεινές συνθήκες διαβίωσης, όπως είναι το παθητικό κάπνισμα, ο ελλιπής και άτακτος ύπνος, το υπερβολικό stress (αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης) και η κατανάλωση οινοπνεύματος. Επίσης, η παρουσία αυξημένων επιπέδων ορμονών φύλου σαφώς επηρεάζει το αντιοξειδωτικό δυναμικό του οργανισμού.<sup>59–63</sup>

Τα επίπεδα ολικών αντιοξειδωτικών αντιπροσωπεύουν την ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό δημιουργίας και απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών και στην αποτελεσματικότητα λειτουργίας των αντιοξειδωτικών συστημάτων, ενώ είναι προφανές ότι η ισορροπία αυτή μεταβάλλεται με την πάροδο της ηλικίας. Κατά συνέπεια, οι φυσιολογικές τιμές ολικών αντιοξειδωτικών μεταβάλλονται με την ηλικία και αυτό πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψη κατά την αποτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

## ABSTRACT

### Correlation of serum and urine antioxidants with age

E. LIMBERAKI, P. ELEFTHERIOU, S. MITKA, G. MAVROPOULOU, C. PETROU

*Department of Medical Laboratory, Faculty of Health and Caring Professions, Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece*

*Archives of Hellenic Medicine 2010, 27(6):956–962*

**OBJECTIVE** Free radicals are produced in the human organism during normal metabolism, or as a result of the effect of certain food ingredients or pollutants. Free radicals can cause damage to lipids, proteins and DNA, by which they are thought to be involved in the pathogenesis of various diseases and in the process of aging. As blood antioxidant levels reflect the antioxidant capacity of the organism, many investigators have tried to correlate these levels with certain diseases. The effect of age on the total antioxidant capacity (TAC) of the human organism remains unclear, although molecules damaged by free radical activity, such as lipid peroxides, increase with age. If TAC is to be used for estimating the effect of certain diseases on antioxidant capacity, or as a prognosis/diagnosis indicator, the effect of age on the TAC values of normal individuals needs to be estimated for each specific method used. In the present study, TAC was measured via the inhibition of oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) by the ferryl myoglobin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system in blood and urine samples of residents of Thessaloniki, and the values were correlated with age. **METHOD** Serum samples of 118 residents of Thessaloniki were used. A questionnaire concerning age, sex, district of residence, type of occupation, dietary behavior and special habits such as smoking was completed, and regular smokers were excluded from the study. The samples were divided into four groups according to age: 5–17, 18–35, 36–60 and 61–90 years. In addition, total urine antioxidants were measured in 87 samples from participants in all age groups. Antioxidant activity was estimated using the Cayman antioxidant assay kit and expressed as

trolox equivalents. **RESULTS** No correlation was observed between TAC values and sex. An increased concentration of total serum antioxidants was found in the older age groups. An increase with age in total blood and urine antioxidant activity was observed up to 36–60 years, followed by a small decrease in blood levels and a small increase in urine levels in the 61–90 years group. The greatest increase (79% in serum,  $p=0.000$ , 83% in urine,  $p=0.000$ ) was observed between the 18–35 years and the 36–60 years groups. **CONCLUSIONS** The differences recorded in the literature concerning the effect of age on TAC may be explained by the differences in specificity and sensitivity of the methods used. Malnutrition, stress, passive smoking, reduced and unstable sleep, in combination with high levels of sex hormones may explain the lower TAC observed in the 18–35 years age group.

**Key words:** Age, Antioxidants, Oxidative stress, Serum, Urine

## Βιβλιογραφία

- KOSTKA T, DRAI J, BERTHOUBE SE, LACOUR JR, BONNEFOY M. Physical activity, aerobic capacity and selected markers of oxidative stress and the anti-oxidant defense system in healthy active elderly men. *Clin Physiol* 2000, 20:185–190
- KOSTKA T, DRAI J, BERTHOUBE SE, LACOUR JR, BONNEFOY M. Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. *Int J Sports Med* 1998, 19:462–467
- KRETZSCHMAR M, MÜLLER D, HÜBSCHER J, MARIN E, KLINGER W. Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int J Sports Med* 1991, 12:218–222
- MARANGON K, HERBETH B, LECOMTE E, PAUL-DAUPHIN A, GROLIER P, CHANCERELLEY ET AL. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr* 1998, 67:231–239
- MARZATICO F, PANSARASA O, BERTORELLI L, SOMENZINI L, DELLA VALLE G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997, 37:235–239
- LESGARDS JF, DURAND P, LASSARRE M, STOCKER P, LESGARDS G, LANTEAUME A ET AL. Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ Health Perspect* 2002, 110:479–486
- LAPENNA D, MEZZETTI A, DE GIOIA S, PIERDOMENICO SD, DANIELE F, CUCCURULLO F. Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radic Biol Med* 1995, 19:849–852
- CHURCH DF, PRYOR WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985, 64:111–126
- GUTTERIDGE JM, MAIDT L, POYER L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron (II). *Biochem J* 1990, 269:169–174
- HALIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: Haliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, 1999:24–27
- EVELO CT, PALMEN NG, ARTURY, JANSSEN GM. Changes in blood glutathione concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1992, 64:354–358
- TANABE K, MASUDA K, SUGAWARA J, AJISAKA R, MATSUDA M, KONO I ET AL. Effects of daily physical activity on oxidative stress in middle-aged and elderly people. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 2002, 51:325–336
- TANABE K, MASUDA K, SUGAWARA J, AJISAKA R, MATSUDA M, KONO I ET AL. Effects of different type of training on blood antioxidant capacity and redox balance in middle-aged and elderly women. *J Exerc Sports Physiol* 2003, 10:65–76
- PAMUK ER, BYERS T, COATES RJ, VANN JW, SOWELL AL, GUNTER EW ET AL. Effect of smoking on serum nutrient concentrations in African-American women. *Am J Clin Nutr* 1994, 59:891–895
- KLAUNIG JE, KAMENDULIS LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, 44:239–267
- OMENN GS, GOODMAN GE, THORNQUIST MD, ROSENSTOCKL, BARNHART S, GYLYS-COLLWELL I ET AL. The carotene and retinol efficacy trial (CARET) to prevent lung cancer in high-risk populations: Pilot study with asbestos-exposed workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993, 2:381–387
- DIERCKX N, HORVATH G, VAN GILS C, VERTOMMEN J, VAN DE VLIET J, DE LEEUW I ET AL. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: Relationship to diet. *Eur J Clin Nutr* 2003, 57:999–1008
- MORIEL P, PLAVNIK FL, ZANELLA MT, BERTOLAMI MC, ABDALLA DS. Lipid peroxidation and antioxidants in hyperlipidemia and hypertension. *Biol Res* 2000, 33:105–112
- CERIELLO A, BORTOLOTTI N, FALLETTI E, TABOGA C, TONUTTI L, CRESCENTINI A ET AL. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997, 20:194–197
- PARSLOW RA, SACHDEV P, SALONIKAS C, LUX O, JORM AF, NAIDOO D. Associations between plasma antioxidants and hypertension in a community-based sample of 415 Australians aged 60–64. *J Hum Hypertens* 2005, 19:219–226
- TRIBBLE DL. AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: Emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999, 99:591–595
- EVANS MD, DIZDAROGLU M, COOKE MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutat*

- Res* 2004, 567:1–61
23. OCHI H, SAKAI K. Oxidative stress profile: OSP. *Rinsho Byori* 2003, 51:115–125
  24. PRYOR WA. Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:141–164
  25. ERDEN-INAL M, SUNAL E, KANBAK G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002, 20:61–66
  26. LENA Z G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1366:53–67
  27. WEI Y H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998, 217:53–63
  28. WINKLHOFER-ROOB BM, ROCK E, RIBALTA J, SHMERLING DH, ROOB JM. Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Mol Aspects Med* 2003, 24:391–402
  29. BIERI JG. Effect of excessive vitamins C and E on vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 1973, 26:382–383
  30. KIRSCHBAUM B. Total urine antioxidant capacity. *Clin Chim Acta* 2001, 305:167–173
  31. CIFTCI H, VERIT A, YENI E, SAVAS M. Decreased oxidative stress index of urine in patients with urinary tract infection. *Urol Int* 2008, 81:312–315
  32. DE VRIES JH, HOLLMAN PK, MEYBOOM S, BUYSMAN MN, ZOCK PL, VAN STAVEREN WA ET AL. Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr* 1998, 68:60–65
  33. WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004, 134:489–492
  34. YAGI K. Micro-determination of lipoperoxide in blood plasma or serum. *Vitamins* 1975, 49:403–405
  35. ABUDU N, MILLER JJ, ATTAELMANNAN M, LEVINSON SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta* 2004, 339:11–25
  36. MARUSIN AV, SALLYUKOV VB, BRAGINA EY. Antioxidant activity of blood plasma in individuals with neoplasms. *Bull Exp Biol Med* 2002, 133:481–483
  37. BLOCK G, PATTERSON BH, SUBAR A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992, 18:1–29
  38. BOAZ M, SMETANA S, WEINSTEIN T, MATAS Z, GAFTER U, IAINA A ET AL. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): Randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000, 356:1213–1218
  39. BOLTON-SMITH C, WOODWARD M, TUNSTALL-PEDOE H. The Scottish Heart Health Study. Dietary intake by food frequency questionnaire and ratios for coronary heart disease risk. II. The antioxidant vitamins and fibre. *Eur J Clin Nutr* 1992, 46:85–93
  40. ANDERSEN HR, NIELSEN JB, NIELSEN F, GRANSDJEAN P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997, 43:562–568
  41. GUEMOURI L, ARTUR Y, HERBETH B, JEANDEL C, CUNY G, SIEST G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991, 37:1932–1937
  42. MECOCCHI P, POLIDORI MC, TROIANO L, CHERUBINI A, CECCHETTI R, PINI G ET AL. Plasma antioxidants and longevity: A study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000, 28:1243–1248
  43. FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000, 408:239–247
  44. KASAPOGLU M, OZBEN T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001, 36:209–220
  45. MUTLU-TÜRKOĞLU U, ILHAN E, OZTEZCAN S, KURU A, AYKAÇ-TOKER G, UYSAL M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem* 2003, 36:397–400
  46. OLINESCU R, TALABAN D, NITĂ S, MIHĂESCU G. Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. *Rom J Intern Med* 1995, 33:47–54
  47. JUNQUEIRA VB, BARROS SB, CHAN SS, RODRIGUES L, GIAVAROTTI L, ABUD RL ET AL. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004, 25:5–16
  48. TANABE K, MASUDA K, AJISAKA R, MATSUDA M, HIRAYAMA A, NAGASE S ET AL. Relationships between age, daily physical activity, antioxidant capacity and oxidative stress among middle-aged and elderly people. *International Journal of Sport and Health Science* 2006, 4:515–527
  49. HIRANO R, ITAKURA H, KONDO K. Effects of aging on oxidisability of low density lipoprotein. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2001, 38:372–376
  50. GUPTA R, SHARMA M, LAKSHMY R, PRABHAKARAN D, REDDY KS. Improved method of total antioxidant assay. *Indian J Biochem Biophys* 2009, 46:126–129
  51. IHARA H, HASHIZUME N, HASEGAWA T, YOSHIDA M. Antioxidant capacities of ascorbic acid, uric acid, alpha-tocopherol, and bilirubin can be measured in the presence of another antioxidant, serum albumin. *J Clin Lab Anal* 2004, 18:45–49
  52. CAO G, PRIOR RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998, 44:1309–1315
  53. EREL O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004, 37:277–285
  54. EREL O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004, 37:112–119
  55. JANASZEWSKA A, BARTOSZ G. Assay of total antioxidant capacity: Comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2002, 62:231–236
  56. RICE-EVANS CA. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: Procedures and limitations. *Free Radic Res* 2000, 33(Suppl):S59–S66
  57. PRIOR RL. Plasma antioxidant measurements. *J Nutr* 2004, 134:3184S–3185S
  58. SCHLESIER K, HARWAT M, BÖHM V, BITSCH R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic Res* 2002, 36:177–187
  59. BEHL C, HOLSBOER F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci* 1999, 20:441–444

60. TSAI CL, CHANG LY, CHOW KC, CHAN WK, CHEN YL, LU FJ. Catalase prevents estradiol-induced chondrocyte cytotoxicity. *Life Sci* 1998, 62:1147–1152
61. JULIET PA, HAYASHI T, DAIGO S, MATSUI-HIRAI H, MIYAZAKI A, FUKATSU A ET AL. Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1693:185–191
62. LANE HA, SMITH J, RATHBONE N, MORRIS K, THOMAS A, SCANLON MF ET AL. Testosterone reduces free radical release from human monocytes. 22nd Joint Meeting of the British Endocrine Societies, Glasgow, UK, 2003:5P246 (Endocrine Abstracts)
63. ALONSO-ALVAREZ C, BERTRAND S, FAIVRE B, CHASTEL O, SORCIG. Testosterone and oxidative stress: The oxidation handicap hypothesis. *Proc Biol Sci* 2007, 274:819–825

*Corresponding author:*

P. Eleftheriou, Department of Medical Laboratory Studies, Faculty of Health and Caring Professions, Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki, GR-547 00 Thessaloniki, Greece  
e-mail: felefthe@pharm.auth.gr; elfther@mls.teithe.gr