RIJKSINSTITUUT VOOR DE VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIËNE
BILTHOVEN

Rapport nr. 441120002

Oxydatieve stress, antioxydanten en gezondheid: biologische relevantie en metingen in het lichaam

M.G.L. Hertog

Maart 1995

Dit literatuuronderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat-Generaal van de Volksgezondheid, Directie PAO.

VERZENDLIJST

1-3	Directie Preventie, Algemene Gezondheidszorg en Opleidingen van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn, en Sport
4	Directeur-generaal van de Volksgezondheid, Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn, en Sport
5-6	Hoofdinspectie voor de preventieve en curatieve Gezondheidszorg
7	Hoofdinspecteur Gezondheidsbescheming
8	Depôt van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
9	Directie Onderzoekschool NIHES
10	Prof. Dr. Ir. F. Kok, LUW, Wageningen
11	Prof. Dr. A. Bast, VU, Amsterdam
12	Ir. P.C.H. Hollman, DLO-RIKILT, Wageningen
13.	Dr. Ir. G. van Poppel, TNO Voeding, Zeist
14	Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
15	Prof . Dr. G. Elzinga
16	Dr. G. de Mik
17	Prof . Dr. G. Mohn
18	Prof. Dr. Ir. D. Kromhout
19	Dr. W.H. Köneman
20	Dr. Ir. E.H.J.M. Jansen
21	Dr. J.T. Poolman
22	Dr. M.J.W. Sprenger
23	Ir. J. Jansen
24	Dr.Ir. J.C. Seidell
25	Dr. C. F. van Kreijl
26	Dr. Ir. E.J.M. Feskens
27	Dr. Ir. H.A. Smit
28	Dr. H.B. Bueno de Mesquita
29	Ir. P. Fischer
30	Dr. L. Launer
31	Drs. H. Houweling
32	Drs. A.E.M. de Hollander
33	Ir. L. Wiessing
34	Auteur
35	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations RIVM
36-37	Bibliotheek RIVM
38	Bureau projecten- en rapportenregistratie
39-50	Reserve-exemplaren

INHOUDSOPGAVE

VERZENDLIJST II

INHOUDSOPGAVE III

WOORD VOORAF V

SUMMARY VI

SAMENVATTING VII

1. INLEIDING 1

2. REACTIEVE ZUURSTOFSPECIES (RZS) 3
- 2.1 Vorming van RZS 3
- 2.2 Schade door RZS 4
- 2.3 Oxydatieve stress 5
- 2.4 Antioxydante afweer 5
  - 2.4.1 RZS scavengers 6
  - 2.4.2 Componenten die de vorming van RZS verhinderen 8
  - 2.4.3 Reparatie van door RZS geïnduceerde schade 8

3. RZS, ANTIOXYDANTEN EN CHRONISCHE ZIEKTEN 11
- 3.1 RZS en veroudering 11
  - 3.1.1 Mechanismen 11
  - 3.1.2 Antioxydanten en veroudering 12
- 3.2 RZS en kanker 12
  - 3.2.1 Mechanismen 12
  - 3.2.2 Antioxydanten en kanker 13
- 3.3 RZS en hart- en vaatziekten 15
  - 3.3.1 Mechanismen 15
  - 3.3.2 Antioxydanten en hart- en vaatziekten 16
- 3.4 RZS en diabetes 17
  - 3.4.1 Mechanismen 17
  - 3.4.2 Antioxydanten en diabetes 18
- 3.5 RZS en luchtwegontstekingen 18
  - 3.5.1 Mechanismen 19
  - 3.5.2 Antioxydanten en luchtwegontstekingen 19
- 3.6 RZS, HIV en AIDS 20
  - 3.6.1 Mechanismen 20
  - 3.6.2 Antioxydanten, HIV en AIDS 21
- 3.7 RZS en neurologische aandoeningen 21
  - 3.7.1 Mechanismen 21
  - 3.7.2 Antioxydanten en neurologische aandoeningen 22
- 3.8 Conclusie 23

4. METINGEN VAN RZS 25
4.1 Oxydatie van vetten 25
4.2 Oxydatie van eiwitten 26
4.3 Oxydatieve DNA beschadigingen 27
4.4 Antioxydant status 27
4.5 Conclusie 29

5. ALGEMENE CONCLUSIE 31

6. LITERATUUR 33

BIJLAGE
Tabel RZS metingen 37

WOORD VOORAF

Dit rapport is geschreven in het kader van mijn post-doc aanstelling bij de Netherlands Institute of Health Sciences (NIHES), de onderzoekschool waarin de Erasmus Universiteit Rotterdam, de Landbouwuniversiteit Wageningen en het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne participeren. Doel van dit rapport is het beschrijven van de stand van zaken en de mogelijkheden voor (toekomstig) onderzoek naar de rol van oxydatieve stress en antioxydanten op de ontwikkeling van een aantal belangrijke chronische aandoeningen. Ik wil Prof. Dr. Ir. D. Kromhout, Dr. H.B. Bueno de Mesquita, Dr.Ir. E.J.M. Feskens, Dr. L.Launer, Ir. P.Fischer en Drs. H. Houweling voor hun hulp en kritisch commentaar op de verschillende hoofdstukken bedanken.

Dr. Michaël G.L. Hertog

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) are believed to be involved in the aetiology of a large number of chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases, lung diseases, and other diseases associated with ageing such as dementia. These diseases are important causes of illness and death in the Netherlands and other Western countries and are therefore a heavy burden on social and medical care services. The human body has developed a number of defence systems against ROS which include the antioxidant enzymes such as superoxyde dismutase and glutathion peroxydase, and dietary antioxidants such as the vitamins C, E, ß-carotene, and flavonoids. Evidence for an important role of ROS in the pathogenesis of diseases is mainly provided from *in vitro* studies and a small number of animal experiments. Not much is known about the true role of ROS in the aetiology of human disease and about the potential protective effect of (dietary) antioxidants. Epidemiological evidence suggests that the consumption of antioxidant-rich foods such as fruits and vegetables protects against various types of cancer and that the intake of (dietary) antioxidants may prevent cardiovascular diseases. However, for most other diseases this information is lacking. Most studies conducted so far were cross-sectional in which no clear cause- and effect relation can be established. More prospective epidemiological studies on the relation between oxidative stress, antioxidants and disease occurrence are therefore needed. An important aspect of future research in this area will be the development and validation of biomarkers of oxidative stress, antioxidant intake, and oxidative damage.

SAMENVATTING

Reactieve zuurstofverbindingen (RZS) worden ervan verdacht betrokken te zijn bij de ontwikkeling van o.a. kanker, cardiovasculaire ziekten, chronische aspecifieke respiratoire aandoeningen (CARA) en algemene verouderingsverschijnselen zoals bijvoorbeeld dementie. Deze ziekten leveren een belangrijke bijdrage aan de morbiditeit en mortaliteit in Nederland en leggen daarmee een zware belasting op de medische en sociale zorg. Het lichaam wordt beschermd tegen de schadelijke effecten van RZS door een complex antioxydatief afweersysteem waaronder de enzymen glutathion peroxydase, superoxyde dismutase en antioxydanten uit de voeding zoals vitamine E, vitamine C, beta-caroteen, en flavonoïden. Aanwijzingen voor een oorzakelijke rol van RZS in de etiologie van bovengenoemde aandoeningen komt voornamelijk uit *in vitro* onderzoek en enkele onderzoeken bij dieren. Tot op heden is over de daadwerkelijke rol van vrije radicalen en de mogelijkheden van antioxydante preventie bij de mens weinig bekend. Voorlopig wijst epidemiologisch onderzoek vooral op een beschermende rol van de consumptie van antioxydant-rijke voedingsmiddelen zoals groenten en fruit tegen de ontwikkeling van kanker, en wijzen enkele onderzoeken op een beschermend effect van voedingsantioxydanten op hart- en vaatziekten. Voor de meeste andere aandoeningen ontbreekt deze informatie. Tot op heden zijn de onderzoeken hiernaar vooral cross-sectioneel van aard geweest waardoor geen duidelijke oorzaak-gevolg relatie aangetoond kon worden. In de toekomst zijn daarom vooral prospectieve epidemiologische onderzoeken nodig naar de relatie tussen RZS, antioxydanten en chronische ziekten. Hierbij dient vooral veel aandacht besteed te worden aan de ontwikkeling en validering van biomerkers voor oxydatieve stress, antioxydanten inname en oxydatieve schade.

1. INLEIDING

Kanker, hart- en vaatziekten, CARA en diabetes vormen in Nederland, en in een groot gedeelte van de rest van de wereld, de belangrijkste oorzaak van ziekte en sterfte van de ouderen en leggen daarmee een groot beslag op de medische en sociale zorg. Door een toenemende vergrijzing van de Nederlandse bevolking zal het totaal aantal personen met chronische aandoeningen waaronder kanker, hart- en vaatziekten, diabetes en CARA met ca. 25-40 % zijn gestegen in het jaar 2010 (Volksgezondheid Toekomst Verkenningen, 1993). In de laatste jaren staat de rol van reactieve zuurstofspecies (RZS) bij het ontstaan en de ontwikkeling van deze aandoeningen steeds meer in de wetenschappelijke belangstelling. De door reactieve zuurstofspecies veroorzaakte schade aan cellen en weefsels, de zogenoemde oxydatieve schade, wordt geacht bij de veroudering van de mens en met ziekten en aandoeningen die daarmee verband houden zoals kanker en hart- en vaatziekten, maar ook bijvoorbeeld dementie een belangrijke rol te spelen (Ames et al., 1993). Recentelijk is oxydatieve schade ook in verband gebracht met de progressie van HIV infecties naar AIDS (Greenspan en Aruoma, 1994). De preventieve mogelijkheden door antioxydanten uit o.a. de voeding, die de door reactieve zuurstofverbindingen veroorzaakte oxydatieve schade kunnen verminderen, heeft daarom in de reguliere en alternatieve geneeskunde toenemend meer aandacht gekregen.

Ondanks deze toenemende aandacht is tot op heden onze kennis en inzicht over de daadwerkelijke rol van RZS bij de ontwikkeling van deze ziekten, en de beschermende werkingen van antioxydanten uit de voeding beperkt gebleven. Onderzoek naar oxydatieve schade, de werkingsmechanismen en bescherming door (voedings)antioxydanten is daarom van groot belang voor een op preventie van chronische ziekten gericht overheidsbeleid. Vooral door de rol die oxydatieve schade kan spelen als mogelijke gemeenschappelijke etiologische factor bij het ontstaan van verschillende chronische ziekten. Het RIVM heeft preventie van chronische ziekten als een van haar speerpunten gedefinieerd en heeft door de aanwezige expertise op zowel epidemiologisch als moleculair biologisch gebied uitstekende mogelijkheden voor onderzoek op dit gebied.

In dit rapport zal een overzicht gegeven worden van de literatuur over oxydatieve stress en gezondheid waarbij tevens huidige leemtes in kennis en inzicht genoemd worden. Hiervoor zal eerst in het kort het ontstaan van reactieve zuurstofspecies (RZS) en de effecten van antioxydanten beschreven worden. De meting van oxydatieve stress, of door oxydatieve stress veroorzaakte schade in het menselijk lichaam komt in het laatste hoofdstuk aan bod.

2. REACTIEVE ZUURSTOF SPECIES (RZS)

Zuurstof (O_2) is een gasvormige verbinding die essentieel is voor het leven van mens, dier en plant. Zuurstof wordt in het lichaam samen met de voedingsstoffen gebruikt voor het leveren van energie aan de lichaamscellen. Hierbij wordt moleculair zuurstof stapsgewijs gereduceerd tot water. De hierbij vrijkomende energie wordt in het lichaam gebruikt om adenosinedifosfaat (ADP) om te zetten in adenosinetrifosfaat (ATP), de energiedragers van het lichaam (Guyton, 1980). De energie uit ATP wordt vervolgens voor allerlei processen, zoals celgroei, hersen- en spieractiviteit enz. in het lichaam gebruikt. Men schat dat ongeveer 5 - 10 % van het zuurstof *niet* stapsgewijs gereduceerd wordt, maar in een eenwaardige reductie, waarbij verschillende reactieve zuurstofspecies gevormd worden (Esterbauer, 1993). Onder de reactieve zuurstofspecies, of, in het Engels, "reactive oxygen species" vallen vrije radicalen en niet radicale reactieve verbindingen, zoals bijvoorbeeld singulet zuurstof ($^1O_2$). Vrije radicalen hebben een of meerdere ongepaarde elektronen in de buitenste schil van het molecuul. Deze worden aangegeven door een stip • naast de formule. Singulet zuurstof ($^1O_2$) is ook een reactieve zuurstof verbinding, maar heeft geen ongepaard elektron en is daarom geen radicaal. Het is reactief omdat het een elektron bevat dat door energietoevoer in een hogere baan gebracht is. Singulet zuurstof kan leiden tot of ontstaan uit vrije radicalen reacties, maar ook door bijvoorbeeld UV-straling (Halliwell, 1993).

2.1 Vorming van RZS

RZS kunnen op drie manieren gevormd worden, i.e. door de homolytische scheiding van een covalente binding van een normaal molecuul, elk fragment houdt dan een ongepaard elektron; door het verlies van een elektron van een normaal molecuul; en door toevoeging van een elektron aan een molecuul. Elektron transfer komt veel vaker voor dan de homolytische splitsing aangezien deze laatste alleen door hoge energietoevoer tot stand komt. RZS kunnen positief, negatief of elektrisch neutraal geladen zijn (Cheeseman en Slater, 1993). De belangrijkste RZS in biologische systemen zijn radicalen die van zuurstof afkomstig zijn zoals het superoxyde radicaal (O_2•). Superoxyde kan samen met een ander superoxyde waterstofperoxyde H_2O_2 vormen (dismutase reactie). Superoxyde is niet erg schadelijk omdat het vooral een reducerende stof is. Waterstofperoxyde is weliswaar een oxyderende verbinding maar geen radicaal en niet erg reactief. Superoxyde en waterstofperoxyde kunnen wel in de aanwezigheid van gereduceerde metaal ionen (ijzer, koper), via de FENTON-reactie het hydroxyl radicaal (OH•) vormen (Cheeseman en Slater, 1993).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ ----> } Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$$

Daarnaast is de HABER-WEISS reactie een belangrijk proces waarbij ijzerionen, superoxyde anionen en waterstofperoxyde betrokken zijn bij de vorming van hydroxylradicalen (Bankson et al., 1993).

$$O^-_2\bullet + H_2O_2 + Fe^{2+} \text{ ----> } O_2 + OH\bullet + OH^-$$

Het hydroxyl radicaal is extreem reactief en reageert met bijna alle moleculen in zijn directe omgeving (Halliwell, 1990). Daardoor heeft het maar een beperkte actieradius, weinig doordringend vermogen en een korte levensduur. Het hydroxyl-radicaal is waarschijnlijk het meest

schadelijke radicaal in het lichaam en het is verantwoordelijk is voor de meeste door RZS geïnduceerde schade aan cellen en weefsels. Andere vrije radicalen zijn koolstof radicalen, die ontstaan door een reactie met een zuurstof radicaal en een vetzuur, koolhydraat of eiwit. Hierbij wordt het schadelijke peroxyl radicaal gevormd (ROO•). Die kunnen wederom andere vetzuren oxyderen waardoor een kettingreactie ontstaat (zie 2.2). Daarnaast kunnen peroxyl radicalen ook nog de zeer reactive alkoxyl radicalen vormen. In tabel 1 staan een aantal biologisch belangrijke RZS, met respectievelijke halfwaardetijden en fysische eigenschappen.

Tabel 1. Eigenschappen en geschatte halfwaardetijden voor een aantal biologisch relevante RZS (naar Yu, 1994)

Reactieve zuurstof species	Halfwaardetijd (sec)	Eigenschappen
HO• hydroxyl radicaal	10^{-9}	erg reactief, kleine diffusieafstand
RO• alkoxyl radicaal	10^{-6}	reactieve verbinding
ROO• peroxyl radicaal	7	weinig reactief, grote diffusieafstand
H_2O_2 waterstof peroxyde	enzymatisch	oxiderend, maar met lage reactiviteit
$O_2•^-$ superoxyde anion radicaal	enzymatisch	goede reducerende stof
$^1O_2$ singulet zuurstof	10^{-5}	sterk oxiderende verbinding
NO• stikstofoxide radicaal	1-10	weinig reactief, grote diffusieafstand

2.2 Schade door RZS

Alle moleculen in het lichaam kunnen in principe beschadigd worden door vrije radicalen. Waarschijnlijk zijn lipiden echter het meest gevoelig hiervoor. Celmembranen bevatten veel meervoudig onverzadigde vetzuren (MOV) die, vooral in de aanwezigheid van transitie metaal ionen zoals ijzer en koper, aangevallen worden door oxiderende vrije radicalen, de lipidperoxydatie. Lipidperoxydatie is gevaarlijk omdat er een zelf-onderhoudende kettingreactie optreedt. Oxydatie van MOV levert een vetzuur radicaal (L•) dat zuurstof bindt tot een vetperoxyl radicaal (LOO•). Deze peroxyl radicalen kunnen andere MOV's oxyderen, waardoor een zelf-onderhoudende kettingreactie ontstaat. Hierbij worden hydroperoxides (LOOH) gevormd die weer kunnen uiteenvallen in nog reactievere verbindingen zoals o.a. aldehydes. Aldehydes, vooral 4-hydroxynonenal, kunnen ook verdere diffunderen van de plaats van de eerste aanval en zo de schade naar andere plaatsen van de cel brengen (Cheeseman en Slater, 1993).

$$LH + R• \text{---->} L• + RH$$
$$L• + O_2 \text{---->} LOO•$$
$$LOO• + L'H \text{---->} LOOH + L'•$$
$$LOOH \text{---->} LO•, LOO•, \text{aldehyden}$$

Eiwitten kunnen eveneens door RZS beschadigd worden. Oxydatie van de aminozuren in eiwitten leidt tot structurele veranderingen van het eiwit, nl. fragmentatie, aggregatie en verhoogde gevoeligheid voor proteolitische enzymatische afbraak (Stadtman, 1991). Deze beschadigingen zijn

fysiologisch van belang omdat geoxydeerde eiwitresiduen in enzymen de activiteit van het betrokken enzym kan verminderen. Ook glucose en andere saccharidenkunnen eveneens door RZS beschadigd worden. Zo ontstaan uit monosaccharidenkunnen door auto-oxydatie dicarbonyl componenten en waterstofperoxyde. Deze geactiveerde moleculen kunnen door een interactie met o.a. eiwitten nieuwe componenten vormen (niet-enzymatische glycosilering), die weer de enzymatische activiteit van de betrokken eiwitten kunnen remmen (Stadtman, 1992). RZS (vooral OH•) kunnen ook schade aan het erfelijk materiaal, het DNA, veroorzaken. Men schat dat bij mensen het DNA van een cel per dag ongeveer 10,000 beschadigd wordt door RZS (Ames et al., 1993). Hierbij kunnen DNA addukten ontstaan waarvan de meesten weer door reparatie enzymen verwijderd worden. De rol van door RZS geïnduceerde schade aan cellen en weefsels bij de ontwikkeling van diverse ziektes wordt verder in 3.2 t/m 3.8 besproken.

2.3 Oxydatieve stress

De produktie van RZS in het lichaam komt zoals al eerder besproken vooral bij in elektron transfer reacties van de ademhalingsketen in het mitochondrium voor waarbij moleculair zuurstof gereduceerd wordt tot water. De produktie van RZS is dus een normaal fysiologisch proces en de cel wordt beschermd tegen de schadelijke effecten van RZS door een complex antioxydatief afweersysteem (Halliwell, 1993). In eerste instantie zijn dit de enzymen superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) en gluthation-peroxydase (GSH-PX). Daarnaast zijn o.a. de antioxydanten vitamine E, vitamine C, ß-caroteen, urinezuur, glutathion van groot belang als bescherming tegen RZS geïnduceerde weefselschade. Alleen als de balans tussen de produktie van RZS en bescherming door antioxydanten verstoord is, staat het lichaam (of de cel) onder zogenoemde "oxydatieve stress" (Halliwell, 1993b). Dit kan gebeuren als de antioxydantreserves in het lichaam verlaagd zijn, bijvoorbeeld door een onjuiste voeding, of door een verhoogde produktie van RZS bijvoorbeeld door het blootstaan aan sigaretterook (of andere zogenoemde pro-oxydatieve stoffen) of door chronische ontstekingen. Het is van belang te beseffen dat de produktie van RZS in sommige gevallen ook nodig is, bijvoorbeeld voor de activiteit van o.a. het immuunsysteem. Geactiveerde fagocyten produceren superoxydes voor hun anti-bacteriële activiteit (Halliwell, 1994). Het radicaal stikstofoxide (NO•), dat wordt geproduceerd bij de conversie van het eiwit arginine naar citrulline, is waarschijnlijk identiek aan het zogenoemde "endothelial derived relaxing factor (EDRF)" dat nodig is voor de regulatie van de dikte van de bloedvaten (Anggård, 1994). Deze diverse functies onderstrepen ook de fysiologisch belangrijke functies van RZS in het lichaam.

2.4 Antioxydante afweer

Een antioxydant wordt door Halliwell en medewerkers als volgt gedefinieerd "... any substance that, when present at low concentrations compared to that of an oxidizable substrate, significantly delays or inhibits oxidation of that substrate" (Halliwell, 1990). Antioxydanten kunnen grofweg op drie verschillende manieren werkzaam zijn. Ze kunnen direct actief zijn door het wegvangen van RZS zoals OH• en O_2• (scavengers). Antioxydanten kunnen ook de vorming van RZS verhinderen. Tenslotte zijn sommige antioxydanten actief door het repareren van oxydatieve schade. In tabel 2 staan enkele belangrijke antioxydanten en hun werkingsmechanismen (Sies, 1994).

Een andere structurele indeling die veel gehanteerd wordt is de indeling in primaire en secundaire verdedigingslijnen (Bankson et al., 1993). De antioxydanten vitamines E en C, urinezuur en gluthation en de direct werkende enzymen superoxyde dismutase (SOD), catalase en gluthation peroxydase (GSH-PX) vallen onder de primaire lijn. Enzymen die bij de reparatie van oxydatieve

schade betrokken zijn vormen de tweede defensielijn. In dit overzicht zal een combinatie van deze indelingen gehanteerd worden.

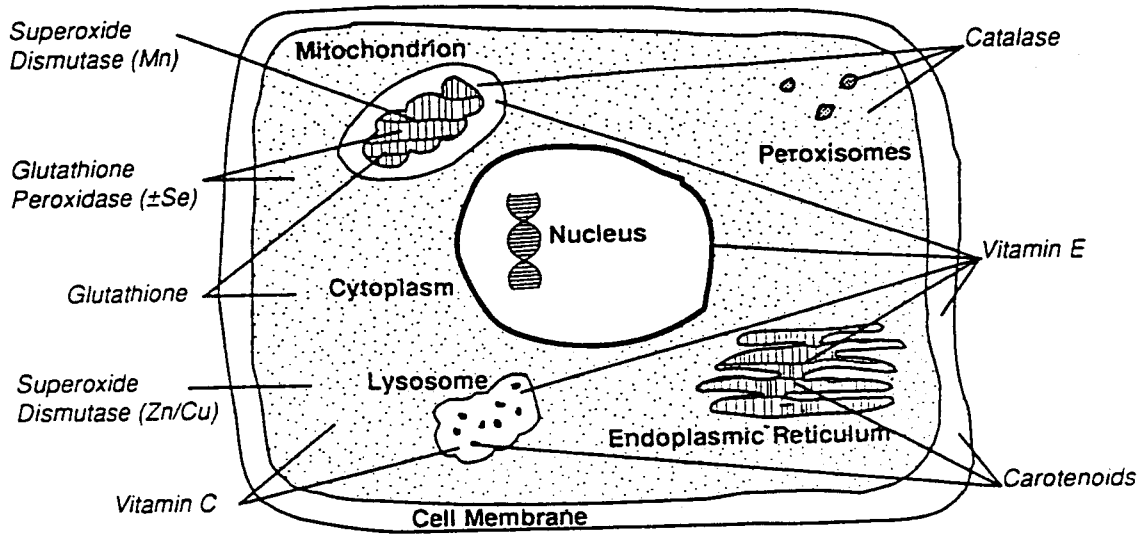
Het is van belang te beseffen dat een aantal antioxydanten (met name vitamine C) in de aanwezigheid van vrije metaal-ionen ook pro-oxydatief kunnen werken. Vitamine C reduceert Fe^{3+} tot Fe^{2+} waardoor dit ijzerion beschikbaar wordt voor de FENTON of HABER-WEISS reacties waaruit hydroxylradicalen gevormd worden. De uiteindelijke effecten van deze antioxydanten worden dus bepaald door hun locatie, concentratie en de beschikbaarheid van vrije metaal-ionen (Halliwell, 1994).

Tabel 2: Geselecteerde antioxydant afweersystemen in het lichaam (naar Sies, 1993)

Soort	Systemen	Opmerkingen
Niet-enzymatisch	α-tocopherol	kettingreactie onderbrekend
	ß-caroteen	singulet zuurstof quencher
	lycopeen	singulet zuurstof quencher
	urinezuur	radicaal vanger
	vitamine C	diverse AO functies
	glutathion (GSH)	diverse AO functies
	quercetine (flavonoiden)	diverse AO functies
	plasma eiwitten	bindingen met metalen
Enzymatisch	superoxyde dismutase (SOD)	CuZn enzymen, Fe enzymen
(direct)	glutathion peroxydase (GSH-PX)	diverse AO functies
	catalase (CAT)	haem eiwitten
Enzymatisch	conjugatie enzymen	glutathion-S-transferases
(indirect)	reductases	twee elektron reducties
	repair systemen	DNA repair

2.4.1 RZS scavengers

De meeste antioxydanten zijn werkzaam door het wegvangen van RZS, bijvoorbeeld door het wegvangen van het OH• radicaal. Gezien de extreem hoge reactiviteit van OH• zal dit echter met elk molecuul in zijn directe omgeving reageren. Daardoor hangt de hydroxyl-radicaal vangende capaciteit van een stof voornamelijk af van zijn: 1. door de diffusie gecontroleerde reactiesnelheid met OH• 2. hogere concentratie dan andere moleculaire doelwitten 3. aanwezigheid dichtbij de plaats waar OH• geproduceerd wordt. De locatie van de verschillende antioxydanten in de cel, zoals weergegeven in figuur 1, bepaalt daarmee in belangrijke mate de werkzaamheid en functie van een antioxydant (Bankson et al., 1993).



Figuur 1: Belangrijke intracellulaire antioxydanten (uit: Bankson et al., 1993)

Dit komt omdat de halfwaardetijden van de meeste RZS erg kort zijn en daarmee de diffusieafstand klein. Door het wegvangen van RZS wordt de antioxydant zelf ook een radicaal, die echter over het algemeen minder reactief en schadelijk is. Dit antioxydant-radicaal kan weer door andere antioxydanten geregenereerd worden tot de oorspronkelijke werkzame antioxydant. Door de verdeling van de diverse antioxydanten over de verschillende compartimenten van de cel en het lichaam kan zodoende de radicaalactiviteit uit de cel getransporteerd worden. Hierdoor wordt de schade aan belangrijke cel bestanddelen beperkt. Men maakt onderscheid tussen enzymatische en niet-enzymatische werkzame RZS scavengers.

Niet-enyzmatische antioxydanten

Niet-enzymatische antioxydanten zoals bijvoorbeeld vitamine E en vitamine C worden door het wegvangen van RZS zelf ook een radicaal, zij het dat deze over het algemeen veel minder reactief zijn. Vitamine E (bv. α-tocopherol) is een vetoplosbare antioxydant die in staat is door een verbinding met lipidperoxylradicalen in te gaan, de kettingreactie van de lipidperoxydatie te stoppen (Halliwell, 1990). Vitamine E bevindt zich in de cel vooral in de celmembraan, in de celkernmembraan, en in de mitochondriën. Door oxydatie van α-tocopherol ontstaat het α-tocopheryl radicaal dat weer door ascorbinezuur (vitamine C) geregenereerd kan worden tot α-tocopherol. Zodoende "spaart" vitamine C in cellen en weefsels de hoeveelheid benodigde vitamine E voor het onderbreken van de lipidperoxydatie kettingreactie. Het geoxydeerde vitamine C (dehydroascorbinezuur) wordt weer door een glutathion afhankelijk systeem gereduceerd tot ascorbinezuur. Vitamine C is wateroplosbaar en bevindt zich vooral in het cytoplasma, in de lysosomen en in de extracellulaire vloeistoffen. Vitamine C is daarnaast zelf ook een goede "vanger" (scavenger) van O_2•, H_2O_2 en van OH• (Halliwell, 1994). Ook de polyfenolen waaronder de flavonoiden en met name de flavonol quercetine, is een goede vrije radicaal vanger (Hertog, 1994). Sommige antioxydanten zoals bijvoorbeeld ß-caroteen, maar ook andere carotenoïden en vitamine C kunnen het geëxiteerde singulet zuurstof molecuul, dat een elektron op een hogere

energieniveau heeft, weer terug brengen naar de normale staat waarbij deze energie in de vorm van warmte vrij komt. Dit noemt men singlet oxygen "quenching" (doven) (Halliwell, 1990).

Enzymatische antioxydanten

De enzymatische antioxydanten omvatten SOD, CAT en GSH-PX. Deze systemen werken met elkaar samen waarbij de afbraak van superoxydes naar zuurstof en water gekatalyseerd wordt (Bankson et al., 1993). Er zijn twee SOD enzymen; het een is mangaan afhankelijk (in mitochondrium) en het ander is het koper/zink-afhankelijke SOD in het cytoplasma. SOD is werkzaam als antioxydant door katalyse van de dismutase reactie van twee superoxydes naar waterstofperoxyde. Dit gaat ongeveer 10^4 sneller dan chemische dismutase. Het zo gevormde waterstofperoxyde wordt weer door catalase en GSH-PX gereduceerd tot water en zuurstof. Er zijn ook twee types GSH-PX enzymen, een selenium afhankelijk en niet-selenium afhankelijke. Het selenium afhankelijke GSH-PX metaboliseert H_2O_2, terwijl het niet-selenium afhankelijke vooral de degradatie van lipidperoxydes katalyseert (Bankson et al., 1993). De activiteiten van bovengenoemde enzymen zijn sterk afhankelijk van de mate van oxydatieve stress. Bij een verhoogde produktie van RZS zal de activiteit van deze enzymen toenemen. Door de locatie van deze enzymen in de cel, nl. in de mitochondrieën, in het cytoplasma en in de peroxysomen kunnen deze enzymen zeer effectief "ontsnapte" superoxydes reduceren tot zuurstof en water (Bankson et al., 1993).

2.4.2 Componenten die de vorming van RZS verhinderen

Verbindingen die metaalionen binden werken antioxydatief omdat vrije transitie metaalionen nodig zijn voor de vorming van het hydroxylradicaal. Metalchelatie is daarom een belangrijke methode om de oxydatieve schade te voorkomen. Ijzer-bindende eiwitten zoals bijvoorbeeld ferritine, transferrine en ceruloplasmine werken daarmee anti-oxydatief (Halliwell, 1994). Transferrine transporteert metalen in het lichaam en ferritine slaat metalen op. Daardoor zijn er over het algemeen maar weinig vrije metaalionen beschikbaar. Gewoonlijk zijn transferrines voor ongeveer 1/3 verzadigd met ijzerionen. Bij bepaalde aandoeningen waarbij een oververzadiging van transferrines met ijzer plaats kan vinden kunnen transferrines, in de afwezigheid van een metaalchelator, metaalionen in het plasma afgeven waardoor de OH• produktie weer gestimuleerd wordt. Hemochromatosis is een genetische aandoening waarbij teveel ijzer opgenomen wordt in het maag-darm kanaal. Patiënten met deze aandoening bleken inderdaad bloot te staan aan een verhoogde mate van oxydatieve stress, en hadden een verhoogd risico op kanker en hartaandoeningen (Ames et al., 1993). Polyfenolen zoals bijvoorbeeld de flavonol quercetine zijn metaalchelatoren, en hebben in *in vitro* onderzoek aangetoond de produktie van OH• te remmen (Takahama, 1985).

2.4.3 Reparatie van RZS geïnduceerde schade.

Het lichaam of de cel kan ook beschermd worden tegen de nadelige gevolgen van oxydatieve schade door reparatie van die schade. De basen van DNA kunnen beschadigd worden door RZS waardoor geoxydeerde basen ontstaan of de DNA helix onderbroken wordt (Ames et al., 1993). Voor reparatie van deze schade is in het lichaam een systeem van zogenoemde reparatieënzymen actief. Het geoxydeerde DNA wordt door polymerase enzymen gerepareerd, waarbij deze enzymen eerst het gebied rond de beschadigde DNA base verwijderen, waarna door andere enzymen de complementaire streng van basen gevormd wordt. De produkten van deze

excisie, in dit geval de geoxydeerde basen van het DNA worden vervolgens in de urine uitgescheiden. Sommige reparatie-enzymen erkennen specifieke typen DNA beschadigingen. De produkten hiervan zijn vrije basen die in urine aangetoond kunnen worden. Niet-specifieke reparatie-enzymen vormen deoxynucleotiden die in urine aangetoond kunnen worden (zie ook 4.2). Het belang van reparatieenzymen blijkt duidelijk uit het feit dat het DNA van mitochondrieën meer dan tien keer zoveel oxydatieve beschadigingen opwijst dan het DNA uit de celkern (Ames et al., 1993). Dit ligt waarschijnlijk aan de afwezigheid van DNA-repair enzymen in mitochondrieën en door de nabijheid van RZS produktie in de mitochondrieën. De cel beschermt zich hiertegen door een constante hoge turn-over van nieuwe mitochondrieën.

3. RZS, ANTIOXYDANTEN EN CHRONISCHE ZIEKTEN

Er zijn zowel epidemiologische, klinische als experimentele aanwijzingen dat oxydatieve stress geassocieerd is met tumorontwikkeling en de processen van atherosclerose en trombose die tot hart- en vaatziekten kunnen leiden. Oxydatieve stress veroorzaakt door sigaretterook wordt bijvoorbeeld (gedeeltelijk) verantwoordelijk geacht voor het sterk verhoogd risico van longkanker en hartklachten bij rokers. Daarnaast worden vrije zuurstofradicalen in verband gebracht met een aantal andere aandoeningen zoals diabetes, CARA en veroudering. De meeste directe aanwijzingen over de rol van oxydatieve stress zijn echter uit *in vitro* onderzoeken en een aantal onderzoeken bij dieren. Er zijn vooralsnog slechts enkele aanwijzingen dat de schade die door oxydatieve stress veroorzaakt wordt ook inderdaad bij de ontwikkeling van deze aandoeningen bij de mens een rol spelen. Vast staat wel dat bij de meeste, zo niet bij alle aandoeningen van de mens een verhoogde produktie van vrije radicalen voorkomt (Halliwell, 1993). Dit betekent echter niet dat vrije radicalen altijd ook de *oorzaak* van deze aandoeningen zijn, maar dat ze ook het *gevolg* kunnen zijn van weefselschade waarmee veel ziekten gepaard gaan (Halliwell, 1993). Hieropvolgend zullen een aantal aandoeningen die in verband gebracht zijn met RZS, en de mogelijke preventieve effecten van antioxydanten besproken worden.

3.1 RZS en veroudering

Veroudering is de progressieve vermindering van fysiologische functies, waarbij de kans op kanker, hart- en vaatziekten en neurologische aandoeningen sterk toeneemt (Nohl, 1993). Reeds in 1956 formuleerde Harman de zogenoemde "free radical theory of ageing". Het idee achter deze theorie was dat veroudering het gevolg is van in de loop van de tijd accumulerende schade aan cellen en weefsels door RZS. Uiteindelijk zou het lichaam bezwijken aan deze ophoping van schade. De symptomen en ziekten die met veroudering gepaard gaan zouden dus het gevolg zijn van een toenemende staat van oxydatieve stress. Hoewel de "free radical theory of ageing" aantrekkelijke aspecten bevat die deels in onderzoek bij dieren bevestigd zijn is er nog weinig overtuigend bewijs aangeleverd voor de relevantie ervan voor de mens, ook wegens de voor de hand liggende praktische moeilijkheden van onderzoeken bij mens. Het is vooral nog onduidelijk of oxydatieve stress de *oorzaak* is van veel verschijnselen die met veroudering te maken hebben is, of dat het een *gevolg* betreft van leeftijdsgerelateerde aandoeningen zoals een verminderde afweer en opneming van (antioxydante) voedingsstoffen.

3.1.1 Mechanismen

Ons huidig inzicht in de rol van RZS bij de veroudering is vooral van onderzoek bij dieren afkomstig, waarin met name met fruitvliegjes gewerkt is (Nohl, 1993). Over het algemeen worden bij deze proeven in de cellen van oudere dieren een verhoogde vrije radicaal produktie gemeten, een lager antioxydantniveau en meer door vrije radicalen veroorzaakte schade, bijvoorbeeld aan het DNA. Deze schade wordt door reparatie-enzymen verwijderd maar dit systeem is niet 100 % efficiënt en daarmee vindt een accumulatie van DNA-schade plaats (Ames, 1993). Ames en medewerkers toonden aan dat in de oude rat ongeveer twee keer zoveel oxydatieve DNA schade gemeten werd als in de jonge rat. Daarnaast is er een positieve relatie gevonden tussen de soort-specifieke DNA repair capaciteit en maximale levensduur bij verschillende diersoorten (Ames, 1993). Toch bleek uit onderzoek bij mensen dat het aantal oxydatieve DNA beschadigingen bij ouderen niet hoger was dan bij jongeren (Sobal, 1993). Uit onderzoek met ratten bleek dat vooral een verminderde opname van energie de ontwikkeling van leeftijdsgerelateerde aandoeningen

vertraagde en de levensduur verlengde (Nohl, 1993). Dit effect wordt gedeeltelijk verklaard uit een verlaging van de vorming van lipidperoxydes en mogelijk een remming van de leeftijdsgerelateerde afname van catalase (Sobal, 1993). Samenvattend kan gesteld worden dat de "free radical theory of ageing" interessante aanknopingspunten biedt om de veroudering te verklaren, maar dat door inconsistente resultaten deze hypothese nu nog erg speculatief is.

3.1.2 Antioxydanten en veroudering

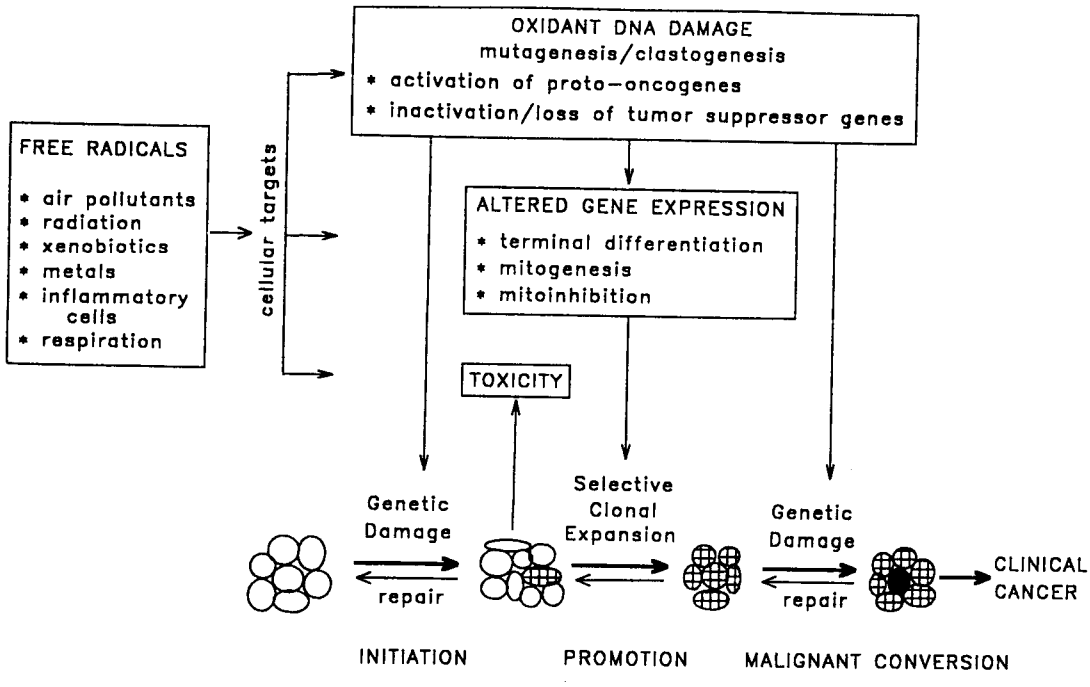
De effecten van antioxydant suppletie op levensduur zijn vooral in studies met fruitvliegjes onderzocht door Baker en medewerkers. Hierbij is o.a. gebruik gemaakt van DNA-repair deficiënte fruitvliegstammen. Toevoeging van vitamine E in de voeding gaf een significant hoger percentage overlevenden, maar de maximale levensduur was niet verlengd t.o.v. de controlegroep (Baker, 1993). Dit experimenteel resultaat wordt ook weerspiegeld in observationeel epidemiologisch onderzoek. Vergelijking van overlevingscurves laat zien dat hoewel steeds meer mensen ouder worden, de maximale totale levensduur (ca. 110 jaar) in de afgelopen eeuwen niet langer geworden is. Onderzoeken naar antioxydanten(suppletie) en veroudering (totale levensduur) bij mensen zijn tot op heden, ook uit praktische overwegingen, niet uitgevoerd. Aanwijzingen voor een beschermend effect kunnen wel uit epidemiologische studies verkregen worden. Zo is bijvoorbeeld in een groot Amerikaans onderzoek aangetoond dat de totale sterfte na 10 jaar follow-up bij personen met een hoge vitamine C consumptie (>50 mg/dag + vitamine C supplementen) lager was dan bij personen met een vitamine C consumptie onder 50 mg/dag. Bij deze analyse is echter geen rekening gehouden met de mogelijke effecten van andere voedingsfactoren. Recent gepubliceerd interventieonderzoek naar de effecten van vitamine E en ß-caroteen suppletie bij zware rokers liet bijvoorbeeld geen verschil zien in de totale sterfte in vergelijking met de controlegroep (ATBC, 1994).

3.2 RZS en kanker

Kanker omvat een verzameling verschillende ziekten die met elkaar gemeen hebben dat cellen ongecontroleerd gaan prolifereren. Hierdoor wordt een normaal functioneren van het orgaan waarin de cellen zich bevinden op den duur onmogelijk. Lopend onderzoek wijst erop dat de ontwikkeling van tumoren een meerstapsproces is bestaande uit initiatie, promotie en progressie (figuur 2). Hierbij wordt o.a. door RZS schade aangebracht aan het genetisch materiaal van de cel, het DNA, waardoor de controle over de groei van de cel verstoord wordt (initiatie). In de promotiefase worden de geïnitieerde cellen selectief gestimuleerd om te delen waardoor de genetische schade vastgelegd kan worden. In de progressie fase treedt uiteindelijk infiltratie in het omliggend weefsel op (Guyton en Kensler, 1993).

3.2.1 Mechanismen

RZS kunnen bij zowel de initiatie, promotie als progressie een belangrijke rol spelen. Reactive zuurstof deeltjes zoals bijvoorbeeld het hydroxylradicaal en singulet zuurstof kunnen direct met DNA reageren en addukten vormen. Als de cel gaat delen kan een niet-gerepareerde DNA-beschadiging leiden tot een mutatie. Als deze mutaties plaats vinden bij een belangrijk gen dat codeert voor cel proliferatie (proto-oncogen) kan hierdoor de cel geïnitieerd worden tot een tumorcel (Guyton en Kensler, 1993).



Figuur 2: Rol van oxydanten in de carcinogenese (uit: Guyton en Kenseler, 1993)

Naast dit direct schadelijke mutagene effect van zuurstofradicalen zijn ook de produkten van de oxydatie van vetzuren bijvoorbeeld in de membraan van de cel mutageen. RZS kunnen ook op een meer indirecte manier de tumorontwikkeling stimuleren. Sommige zogenoemde "pre-carcinogene" verbindingen moeten in het lichaam geactiveerd worden voordat ze hun schadelijke werking kunnen uitoefenen. Het peroxyl-radicaal kan bijvoorbeeld de pre-carcinogenen benzo(a)pyreen, aromatische aminen en N-nitroso verbindingen tot hun respectievelijke carcinogene metabolieten activeren (Trush en Kensler, 1991). In de promotie en progressie fase kunnen RZS de cellulaire metabole processen die de celgroei controleren beïnvloeden. Superoxydes en waterstofperoxydes hebben mogelijk signaal functies bij de regulatie van de celdeling en -groei (Trush en Kensler, 1991). De sterkste aanwijzingen voor de rol van RZS bij promotie en progressie van tumoren komen uit onderzoek bij proefdieren waaruit blijkt dat chemische stoffen die de tumorpromotie stimuleren RZS produceren.

3.2.2 Antioxydanten en kanker

Aanvullende aanwijzingen voor de rol van RZS bij de ontwikkeling van kanker komt uit epidemiologisch onderzoek naar antioxydanten en kanker. In een groot aantal epidemiologische onderzoeken is overtuigend aangetoond dat het eten van veel groenten en fruit geassocieerd is met een verlaagd risico op de meeste kankersoorten, vooral darmkanker, maagkanker en longkanker (Block et al., 1992). Uit dit overzicht bleek dat ca. 80% van alle uitgevoerde onderzoeken een beschermend effect van groenten en fruit consumptie op het ontwikkelen van niet-hormoon

afhankelijke kankersoorten (tabel 3). Hierbij hadden mensen met een lage consumptie gemiddeld meer dan twee keer zo veel kans op het krijgen van kanker dan mensen met een hoge consumptie. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn het voorkomen van de antioxydanten ß-caroteen, vitamine C en flavonoïden in deze voedingsmiddelen (Steinmetz en Potter, 1991a).

Tabel 3. Overzicht epidemiologische studies naar groente en fruitconsumptie en kanker (naar Block et al., 1992)

Tumorsoort	Aantal onderzoeken	Beschermend $p < 0.05$	Schadelijk $p < 0.05$	RR laag vs. hoog (95 % CI)
Alle tumoren, zonder prostaat	156	128	4	
Alle tumoren	170	132	6	
mond	9	9	0	2.0(1.7-2.5)
larynx	4	4	0	2.3 (2.1-2.8)
long	25	24	0	2.2 (1.2-7.0)
slokdarm	16	15	0	2.0 (0.7-4.8)
maag	19	17	1	2.5 (0.5-5.8)
colon/rectum	27	20	3	1.9 (0.3-3.3)
pancreas	11	9	0	2.8 (1.4-6.4)
blaas	5	3	0	2.1 (1.6-2.1)
baarmoederhals	8	7	0	2.0 (1.2-4.7)
ovarium	4	3	0	1.8 (1.1-2.3)
borst	14	8	0	1.3 (1.1-2.8)
prostaat	14	4	2	1.3 (0.6 -3.5)

Deze bevindingen hebben geleid tot een aantal interventieonderzoeken waarin het effect van suppletie met antioxydanten op kankerrisico onderzocht is. Positieve resultaten uit dit soort onderzoeken zouden de oxydatieve stress-antioxydanten-kanker hypothesen sterk ondersteunen. Tot op heden zijn de resultaten uit deze onderzoeken echter niet erg eenduidig. In een recent gepubliceerd interventieonderzoek in Finland bleek dat mannelijke rokers die ß-caroteen supplementen kregen 18 % méér longkanker kregen dan niet-supplement gebruikers (ATBC, 1994). De periode waarin deze mannen gerookt hadden was in dit onderzoek mogelijk te lang (36 jaar) om nog enig effect te zien, maar het verhoogde risico voor longkanker blijft moeilijk verklaarbaar. In een ander interventieonderzoek bleek dat suppletie met ß-caroteen, vitamine C en vitamine E de vorming van nieuwe adenomen in de darm (voorlopers van darmkanker) in patiënten met eerdere adenomen niet te verlagen (Greenberg et al., 1994). In een Chinees interventieonderzoek bleek suppletie met een combinatie van ß-caroteen, vitamine E en selenium wel de totale kankersterfte te verlagen (Blot et al., 1993). Mogelijk kan dit effect verklaard worden uit het feit dat de onderzoekspopulatie aan het begin van de onderzoeksperiode deficiënt was in deze nutriënten. Een omgekeerd verband tussen vitamine C inname en het risiko op diverse kankersoorten, met name maagkanker is ook veelvuldig vastgesteld in epidemiologisch onderzoek. In laboratoriumonderzoek is gevonden dat vitamine C in de maag de vorming van kankerverwekkende nitrosamines uit nitriet en aminen (eiwitten) kan remmen. Dit betekent echter

niet direct dat dit ook bij mens het geval zal zijn. In het eerder genoemde Chinees interventieonderzoek had bijvoorbeeld suppletie met vitamine C geen effect op het maagkankerrisico.

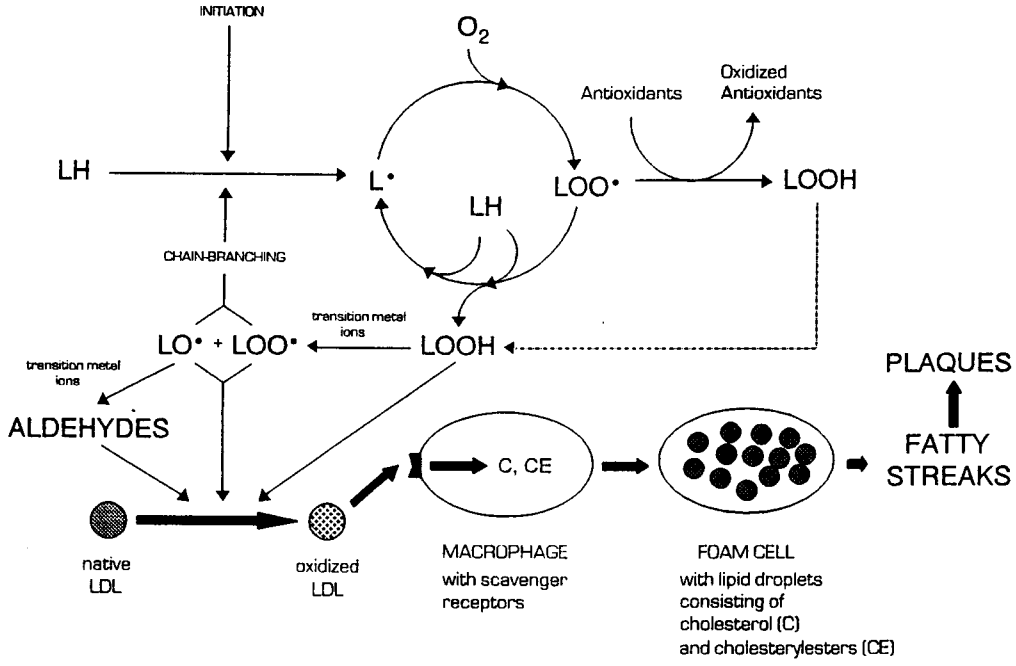
Over de kankerbeschermende effecten van selenium bij de mens bestaat weinig duidelijkheid. In een omvangrijk Nederlands onderzoek is wel gevonden dat een hoog seleniumgehalte in teennagels, als maat voor de seleniuminname, een goede voorspeller was voor een lager risico op longkanker, met name bij personen met een lage vitamine C en ß-caroteen consumptie (vd Brandt en Bausch-Goldbohm, 1990). Verschillende onderzoeken bij dieren wijzen op een kankerremmend effect van de antioxydante flavonoïden dat echter niet in een recent gepubliceerd epidemiologisch onderzoek bij oudere mannen bevestigd kon worden (Hertog et al., 1994).

3.3 RZS en hart- en vaatziekten

Atherosclerose, de vorming van plaques aan de binnenwanden van bloedvaten is waarschijnlijk de belangrijkste oorzaak van hart-en vaatziekten (HVZ). Daarnaast speelt ook trombose, het proces waarin bloedstolsels gevormd worden die de bloedvaten kunnen afsluiten, een belangrijke rol. Coronaire hartziekten (acuut myocardinfarct en angina pectoris) zijn de meest voorkomende aandoeningen die gekenmerkt worden door een ernstige vernauwing van de kransslagaders waarbij in combinatie met een bloedstolsel de hartspier geen zuurstof meer krijgt en een hartinfarct optreedt (Ross, 1993).

3.3.1 Mechanismen

Epidemiologische en klinische onderzoeken hebben aangetoond dat, naast een aantal andere belangrijke risicofactoren zoals hypertensie en overgewicht, een hoge concentratie serum LDL-cholesterol geassocieerd is met een hoog risico voor het ontwikkelen van HVZ (Oliver, 1981). Hoewel de verschillende processen die leiden tot atherosclerose nog niet helemaal opgehelderd zijn, gaat men ervan uit dat de eerste atherosclerotische afwijkingen zgn. "fatty streaks" zijn. Deze bevinden zich in of onder de endotheellaag en bestaan uit macrofagen die cholesterolesters uit LDL opgenomen hebben (schuimcellen), uit lymphocyten en uit gladde spiercellen (Ross, 1993). Macrofagen kunnen LDL-cholesterol heel effectief opnemen via de zogenoemde "scavenger receptor" (apo B receptor) als deze oxydatief gemodificeerd is (zie ook figuur 3) (Steinberg et al., 1989). De peroxydatie van vetzuren en de oxydatieve modificaties in de apo B receptor in LDL-cholesterol door RZS wordt daarom wel beschouwd als een van de sleutelprocessen in de atherosclerose. Aanwijzingen dat LDL inderdaad *in vivo* geoxydeerd kan worden en in atherosclerotische plaques in mensen aangetoond kan worden ondersteunen het belang van deze bevindingen (Yla-Herttuala, 1989; Palinski et al., 1989). Geoxydeerd LDL is daarnaast zelf cytotoxisch en kan direct het endotheel beschadigen. Ook is geoxydeerd LDL-chemotactisch en stimuleert het de bloedplaatjesaggregatie (Steinberg et al., 1989). RZS spelen mogelijk ook een rol bij de bloedplaatjesaggregatie, de binding van bloedplaatjes aan het endotheel en andere trombotische processen, maar over deze processen is nog maar weinig bekend.



Figuur 3: LDL oxydatie en vorming van schuimcellen (uit: Esterbauer et al., 1993)

3.3.2. Antioxydanten en coronaire hartziekten

Epidemiologische en experimentele onderzoeken naar antioxydanten en coronaire hartziekten geven eveneens aanwijzingen over de rol van oxydatieve stress bij de ontwikkeling van atherosclerose. Natuurlijke antioxydanten, zoals o.a. vitamine E, blijken in laboratoriumonderzoeken de oxydatiegevoeligheid van LDL te verlagen (Esterbauer et al., 1991). Tevens resulteerde het supplementeren van vrijwilligers met α-tocopherol in een verlaagde oxydatiegevoeligheid van LDL uit bloed van de vrijwilligers (Reaven et al., 1993). Suppletie met ß-caroteen had echter in dit onderzoek geen effect. Het gemiddelde vitamine E gehalte in het bloed van mannen afkomstig uit 16 verschillende Europese regio's bleek omgekeerd gerelateerd te zijn aan de sterfte aan coronaire hartziekten in die regio's (Gey et al., 1991). In een tweetal andere epidemiologische onderzoeken was echter de vitamine E waarde in bloed geen voorspeller voor de latere sterfte aan coronaire hartziekten. Twee grote prospectieve onderzoeken hebben wel laten zien dat vitamine E supplement gebruikers een lager risico op een hartinfarct hadden (Rimm et al., 1993; Stampfer et al., 1993). De relaties tussen ß-caroteen en vitamine C en hartinfarcten zijn minder uitvoerig onderzocht. In een recent gerapporteerd onderzoek in verschillende Europese landen is aangetoond dat het ß-caroteengehalte in vetweefsel van hartinfarctpatiënten significant lager waren dan bij vergelijkbare controlepersonen (Kardinaal et al., 1993). Dit gold met name voor rokers. In het reeds eerder genoemde Finse interventieonderzoek bleek suppletie met beta-caroteen en vitamine E geen significant effect te hebben op sterfte aan CHD (ATBC, 1994). Met betrekking tot selenium suggereren de resultaten van epidemiologisch onderzoek dat alleen een zeer lage

seleniuminneming, zoals bijvoorbeeld tot voor kort het geval was in Finland, het risico verhoogt (van Poppel, 1994). Voor de flavonoïden en met name de flavonol quercetine is onlangs gevonden dat een hoge flavonoidconsumptie geassocieerd is met een kleinere kans op coronaire hartziekten (Hertog et al., 1993). Dit resultaat ondersteund eerdere onderzoeken waarin gesuggereerd werd dat het verminderd risico op coronaire hartziekten van rode-wijn drinkers gedeeltelijk verklaard kan worden door flavonoiden in rode wijn.

3.4 RZS en diabetes

Ook bij het ontstaan van diabetes mellitus en vooral de daaraan verbonden complicaties wordt een rol aan vrije radicalen toebedacht. Diabetes mellitus is een metabole verstoring van het koolhydraatmetabolisme, meestal veroorzaakt door de afwezigheid of onwerkzaamheid van insuline (Wolff, 1993). Hierdoor kan het glucose in het bloed niet door de cellen opgenomen worden, waardoor het niet beschikbaar wordt voor de energiehuishouding. Glucose in het bloed wordt dan via de urine uitgescheiden, waardoor de naam verklaard wordt. Men maakt onderscheid tussen twee typen diabetes mellitus: type 1 is de insuline afhankelijke diabetes mellitus (IADM) en type 2 diabetes niet-insuline afhankelijke diabetes mellitus (NIADM), ook wel ouderdoms diabetes genoemd. De exacte oorzaak van diabetes is nog onbekend. De destructie van ß-cellen in de pancreas die insuline produceren, mogelijk door auto-immuniteit reacties, virale infecties of omgevingsfactoren is waarschijnlijk de oorzaak voor IADM (Wolff, 1993). NIADM wordt daarentegen gekarakteriseerd door een verstoorde glucoseopname, mogelijk door een verminderde insulinegevoeligheid van het weefsel. Over de oorzaak van NIADM is minder bekend, maar overgewicht en leeftijd lijken wel belangrijke risicofactoren te zijn. Tevens speelt bij diabetes type 2 erfelijke predispositie een belangrijke rol. Veelvuldig voorkomende complicaties bij patiënten met diabetes zijn aantasting aan endotheelcellen van de vaatwanden (angiopathieën), aantasting van ogen (retinopathieën), van het zenuwstelsel (neuropathieën) en van de nieren (nefropathieën).

3.4.1 Mechanisme

Type 1 diabetes kan in proefdieren geïnduceerd worden door de werking van chemische stoffen of door een immuunreactie tegen de ß-cellen van de pancreas. In beide gevallen worden hierbij RZS geproduceerd (Oberley, 1988). Een belangrijke bevinding is dat deze cellen een relatief lage concentratie antioxydanten bevat. Alloxaan is bijvoorbeeld een chemische stof die veelvuldig gebruikt wordt voor het induceren van type 1 diabetes in proefdieren (Wolff, 1993). De activiteit van alloxaan kon geremd worden door voorbehandeling of toevoeging van hydroxylradicaal vangers, metaalionen chelatoren en door stimulering van SOD, CAT en GSH-PX activiteit in de ß-cellen (Wolff, 1993; Oberley, 1993). Uit deze en andere onderzoeken werd geconcludeerd dat alloxaan diabetes type 1 induceert door ijzer gekatalyseerde hydroxylradicaal produktie. Het is echter nog niet duidelijk of dit mechanisme ook bij de mens een belangrijke rol speelt. Er zijn wel aanwijzingen dat patiënten met diabetes in verhoogde mate blootstaan aan oxydatieve stress. In patiënten met diabetes was de concentratie lipidperoxydes in het serum verhoogd t.o.v. controlepersonen, waarschijnlijk ten gevolge van de hoge glucose concentraties in het serum (Wolff, 1993). Hunt en medewerkers hebben overtuigend aangetoond dat glucose onder fysiologische omstandigheden kan auto-oxyderen waardoor RZS geproduceerd worden (Hunt et al., 1992). Recente onderzoeken hebben eveneens aangetoond dat glucose een door RZS gekatalyseerde interactie kan aangaan met diverse eiwitten in het lichaam waaronder de lever en de nieren (glycering). De betrokken eiwitten verliezen daardoor hun functies waarmee mogelijk

diverse complicaties (angiopathieën, retinopathieën, nephropathieën) die met diabetes gepaard gaan, verklaard worden (Wolff, 1993).

3.4.2 Antioxydanten en diabetes

Onderzoek naar antioxydant status in patiënten met diabetes (type 1 of type 2) heeft uitgewezen dat de antioxydant status (vitamine C, vitamine E en GSH) in deze patiënten over het algemeen verlaagd was t.o.v. gezonde controlepersonen (Oberley, 1988). Asayama en medewerkers vonden echter dat kinderen met IADM hogere serum waarden voor vitamine C en vitamine E hadden dan vergelijkbare gezonde kinderen. Dit effect zou mogelijk verklaard worden door een hogere behoefte aan antioxydanten en daarom een verhoogde absorptie van patiënten met diabetes. De totale radicaal vangende activiteit van het serum van de kinderen met IADM was echter lager dan bij gezonde kinderen (Asayama et al., 1993). In onderzoek met proefdieren dalen de antioxydant niveaus in het serum en in specifieke weefsels na chemisch geïnduceerde diabetes. Door suppletie met vitamine E kon de chemische inductie van diabetes bij ratten vertraagd worden, maar er werd geen effect gevonden voor andere (synthetische) antioxydanten (Oberley, 1988). Suppletie van farmacologische dosis vitamine E aan patiënten met NIADM verbeterde ook de werking van insuline en daarmee de opname van glucose (Paolisso, 1993). Er zijn tot op heden voor zover bekend geen observationele epidemiologische studies uitgevoerd naar de inname van antioxydanten, of antioxydant status en het risico op het ontwikkelen van type 1 of type 2 diabetes.

3.5 RZS en luchtwegontstekingen

Chronische aspecifieke respiratoire aandoeningen (CARA), waaronder astma, chronische bronchitis en emfyseem vallen, gaan o.a. gepaard met ontstekingsreacties in de long waardoor luchtwegvernauwingen kunnen optreden en oedemen ontstaan. Astma wordt gedefinieerd als een reversibele luchtwegobstructie met een niet-specifieke hyperreactiviteit van het luchtwegweefsel (Doelman, 1991). Deze hyperreactiviteit is het gevolg van een ontstekingsreactie die geïnduceerd kan worden door allergenen, chemische (exogene) stoffen (bijvoorbeeld sigaretterook, ozon, SO_2), of fysische prikkels zoals koude lucht en lichaamsbeweging. In tabel 4 staan een aantal voorbeelden van agentia die door RZS geïnduceerde luchtwegontstekingen veroorzaken. De eerste acute reactie op deze stimulus is meestal een luchtwegobstructie die gemiddeld twee uur duurt. Deze wordt gevolgd door een secundaire reactie ongeveer 6-12 uur later, waarbij eveneens luchtwegobstructie plaatsvindt en een hyperreactiviteit voor een groot aantal stimuli (Doelman, 1991).

Tabel 4. Voorbeelden van agentia die met RZS geassocieerde luchtwegontstekingen induceren (naar Ryrfeldt et al., 1993)

Agens	Mediatoren en effecten
Luchtverontreinigingen (NO_2, O_3, SO_2)	lipidperoxydatie, hyperreactiviteit van longepitheel, RZS
Asbest, silica	geactiveerde macrofagen, Fe2+, RZS
Sigaretterook	NO_x, peroxyl radicalen, gestimuleerde macrofagen, RZS
Paraquat (herbicide)	Redox cyclus, beschadiging van alveolaire cellen, RZS

3.5.1 Mechanismen

Bij de pathofysiologie van luchtwegontstekingen spelen RZS een belangrijke rol. Superoxydes, waterstofperoxyde en hydroxylradicalen worden tijdens de ontstekingsreactie door geactiveerde macrofagen, monocyten, eosinofielen en neutrofielen gevormd. Deze cellen nemen, als ze geactiveerd worden, versneld zuurstof op en produceren superoxydes, waarschijnlijk via het membraan-gebonden NADPH enzym (respiratory burst) (Doelman, 1991). De respiratory burst kan leiden tot vaso- en bronchoconstrictie, die op de lange duur tot longoedemen kunnen leiden (Ryrfeldt et al., 1993). Exogene factoren waaronder sigaretterook, stikstofoxyden (NO_2) en ozon (O_3) in de buitenlucht kunnen door het induceren van ontstekingsreacties deze cellen activeren waardoor RZS geproduceerd wordt. Experimenteel kunnen vernauwingen van de luchtwegen bij proefdieren zoals de rat geïnduceerd worden door o.a. waterstofperoxydes (Kramer et al., 1987). Deze vernauwingen konden geremd worden door vooraf de enzymen SOD en CAT toe te dienen. Hyperreactiviteit van de gladde spiercellen die de luchtwegen omgeven speelt bij deze vernauwingen een belangrijke rol. Deze wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een door waterstofperoxyde geïnduceerde disbalans tussen de responsen van contractie bevorderende receptoren en relaxatie bevorderende receptoren in gladde spiercellen, ten gunste van de eerste (Kramer et al., 1987). Er zijn aanwijzingen dat deze effecten gemedieerd worden door het vrijkomen van arachidonzuur en zijn metabolieten, de eicosanoïden. Waarschijnlijk is hier vooral de eicosanoïd thromboxaan A_2 belangrijk (Ryrfeldt et al., 1993).

3.5.2 Antioxydanten en luchtwegontstekingen

Onderzoek naar de antioxydantinhoud van longvloeistof heeft aangetoond dat hierin vooral GSH, CAT, vitamine C en vitamine E voorkomen. Rokers bleken een lagere vitamine E gehalte van het longvloeistof te hebben vergeleken met niet-rokers (Pacht et al., 1986). Deficiënties in een van deze antioxydanten zou in principe de door RZS veroorzaakte schade aan de luchtwegen kunnen vergroten. Inderdaad suggereren resultaten uit dierexperimenteel onderzoek dat een hoge inname van vitamine E t.o.v. een vitamine E deficiënte voeding beschermt tegen longweefselbeschadigingen die door inhalatie van O_3 en NO_2 veroorzaakt worden (Fletcher en Tappel, 1973; Elsayed et al., 1988).

De effecten van suppletie met antioxydanten (vitamine E en C) op enkele longfunctie parameters bij mensen heeft in een aantal onderzoeken waarbij reactiviteit van het longweefsel geïnduceerd werd door o.a. ozoninhalatie, een (lichte) verbetering te zien (Hackney et al., 1981; Mohsenin, 1987; Mohsenin et al., 1991). Hierbij lijkt vooral vitamine C een beschermend effect te hebben terwijl de resultaten voor vitamine E minder consistent zijn. In een ander onderzoek verbeterden de longfuncties van patiënten met astma echter niet door suppletie met 2 gram vitamine C gedurende 3 dagen en 1 gram voorafgaande aan de metingen (Bucca et al., 1992). Al deze onderzoeken waren over het algemeen (te) klein van omvang en laten daarom nog geen harde conclusies toe. Suppletie met *N*-acetylcysteïne, een sterke synthetische antioxydant aan patiënten met astma en excarbaties verlaagde wel de uitscheiding van waterstofperoxyde in de ademlucht, mogelijk een maat voor oxydatieve stress in het longweefsel (A. Bast, persoonlijke mededeling).

Een aantal cross-sectionele epidemiologische onderzoeken suggereren dat personen met een lage longcapaciteit eveneens lage serum antioxydant waarden hebben. De sterkste associaties zijn hierbij gevonden voor vitamine A. Een hoge vitamine A inname bleek, onafhankelijk van rookgewoontes, geassocieerd te zijn met betere longfunctieparameters (Morabia et al., 1989). De biologische verklaring hiervoor is echter nog onduidelijk. Miedema en medewerkers toonden in een

epidemiologisch prospectief onderzoek aan dat bij oudere mannen de consumptie van hard fruit (m.n. appels) invers geassocieerd was met de ontwikkeling van CARA (Miedema et al., 1993). Hard fruit bevat een aantal antioxydanten waaronder vitamine C en flavonoiden. De opname van vitamine C en vitamine E was in dit onderzoek echter niet geassocieerd met risico op CARA. Mogelijk kunnen deze resultaten door de in appels aanwezige flavonoiden verklaard worden.

3.6 RZS, HIV en AIDS

AIDS (Aquired Immune Deficiency Syndrome) wordt gekarakteriseerd door een progressief verlies van met name de cellulaire immuunfuncties. Als gevolg hiervan ontstaan opportunistische infecties (bijvoorbeeld longontstekingen, *Pneumocystis carinii*) of tumoren, bijvoorbeeld Kaposis sarcoom, een tumor van de bloedvaten. Daarnaast ontstaan vaak ontstekingen in de hersenen die gepaard gaan met een verlies van cognitieve functies (AIDS dementie complex). AIDS wordt veroorzaakt door het humaan immunodeficiëntie virus (HIV). HIV behoort tot de groep van retrovirussen. Deze introduceren de genetische informatie van het virus in het DNA van de doelcel via het enzym reverse transcriptase. HIV tast met name de helper T4 lymphocyten aan. Deze lymphocyten spelen een belangrijke rol bij de inductie van immunologische reacties in het gehele lichaam. Daarnaast kunnen ook nog diverse andere lichaamscellen aangetast worden waaronder de macrofagen en monocyten (Houweling en Countinho, 1991). Infectie met HIV wordt gekarakteriseerd door een variabele, maar over het algemeen langdurige, latentie tijd voordat de uiteindelijke symptomen van AIDS zich manifesteren. Een van de stappen die de progressie van de infectie naar AIDS bepalen is de activatie van het latente provirus, en het leeuwedeel van het huidig onderzoek is gericht op het ontdekken van de mechanismen die tot virale activatie leiden. Oxydatieve stress speelt hierbij mogelijk een belangrijke rol (Baruchel en Wainberg, 1992).

3.6.1 Mechanismen

Patiënten met HIV-infectie lijken aan een verhoogde mate van oxydatieve stress bloot te staan. Dit blijkt bijvoorbeeld uit verhoogde concentraties malonaldehydes (afbraakprodukten van vetzuurperoxydaties) in serum van patiënten met HIV (Sappey et al., 1994). Een verhoogde staat van oxydatieve stress, dus een verhoogde produktie van RZS wordt waarschijnlijk veroorzaakt door activatie van de bij de immuunreacties betrokken cytokines (bijvoorbeeld tumor necrosis factor, TNF). Activatie van TNF leidt tot produktie van superoxydes, waterstofperoxyde en hydroxylradicalen (Greenspan, 1993). Door een verlaagde antioxydant status, bijvoorbeeld door een verstoorde absorptie van voedingsstoffen, zouden deze RZS niet effectief weggevangen kunnen worden. Uit *in vitro* onderzoek blijkt dat RZS de expressie van HIV genen kan stimuleren. Dit gebeurt waarschijnlijk door activatie van transcriptie factoren (m.n. NF-*kappa*B) (Paeck et al., 1991). Een aantal antioxydanten, waaronder GSH en N-acetylcysteïne kunnen de activatie van NF-*kappa*B kan remmen (Baruchel en Wainberg, 1992). Het progressieve verlies van immuuncellen waaronder met name de CD4 cellen door HIV wordt door een aantal onderzoekers toegeschreven aan de apoptose (actieve celdood). Greenspan en Aruoma (1993) rapporteren dat de condities waaronder in plantaardige cellen door RZS geïnduceerde apoptose plaatsvindt vergelijkbaar zijn met die van de mens. RZS kunnen bijvoorbeeld door peroxydatie van membraanlipiden de permeabiliteit van de celmembraan aantasten waardoor een verlies van de calcium homeostase ontstaat en de cel opzwelt en lyseert. De auteurs suggereren dat plantaardige antioxydanten waaronder de enzymen SOD, CAT en GSH-PX, vitamine C en vooral de polyfenolen waaronder de flavonoiden een belangrijke rol spelen bij het handhaven en controleren van de apoptose. Antioxydanten zouden dus in principe de apoptose kunnen reguleren en daarmee het progressieve

verlies van immuuncellen remmen, waardoor progressie van de HIV-infectie naar AIDS vertraagd kan worden.

3.6.2 Antioxydanten, HIV en AIDS

Diverse onderzoeken hebben aangetoond dat de antioxydant status bij asymptomatische patiënten met HIV significant lager was dan in een gezonde controlegroep. Dit betreft vooral de GSH-niveaus in longvloeistof, vitamine E en ß-caroteen in plasma (Buhl et al., 1989; Sappey et al., 1994). De antioxydant status nam verder af nadat de patiënten AIDS ontwikkelden, mogelijk veroorzaakt door een verstoorde absorptie van deze micronutriënten. In een gerandomiseerde placebo-gecontroleerde trial waarin de antioxydant N-acetylcysteine (NAC) gegeven werd aan HIV-geïnfecteerde personen zonder tekenen van AIDS bleek o.a. dat het verlies van T4 lymphocyten in de suppletiegroep lager was dan in de placebogroep (Jarstand et al., 1991). Coodley en medewerkers vonden in een placebo-gecontroleerd onderzoek dat ß-caroteen suppletie o.a. het aantal witte bloed cellen, T4 lymphocyten, zij het niet statistisch significant, bij asymptomatische HIV-patiënten verhoogde (Coodley et al., 1993). Uit een prospectief epidemiologisch onderzoek bleek dat de vitamine C- consumptie invers gerelateerd was aan progressiesnelheid van asymptomatische HIV-infectie naar AIDS terwijl de inname van vitamine E geen effect of progressiesnelheid had (Tang et al., 1993). In een ander ondezoek bleek toediening van vitamine C bleek echter geen klinisch gunstige effecten te hebben bij HIV-positieve patiënten (Baruchel en Wainberg, 1992). De synthetische antioxydant dieethyldithiocarbamate (DDTC) is in een drietal gerandomiseerde placebo-gecontroleerde trial onderzocht. DDTC reduceerde in patiënten met AIDS in twee van de drie onderzoeken de snelheid van progressie naar nieuwe opportunistische infecties. Dit effect kon echter in het derde onderzoek niet bevestigd worden (Baruchel en Wainberg, 1992).

3.7 RZS en neurologische aandoeningen

Er zijn toenemende aanwijzingen dat RZS betrokken zijn bij een groot aantal neurologische aandoeningen zoals de ziekte van Parkinson, Alzheimer dementie, syndroom van Down, en hersenischemieën (Evans, 1993). Deze aandoeningen hebben over het algemeen verschillende pathologieën, en het voert te ver om deze hier afzonderlijk te bespreken. Over het algemeen houden deze pathologieën een selectieve en progressieve aantasting van neuronen in het centrale zenuwstelsel, met als gevolg een toenemend verlies van cognitieve en/of motorische functies. Hoewel er aanwijzingen zijn voor de betrokkenheid van RZS bij deze pathologieën is tot op heden slechts indirect bewijs voor een daadwerkelijke oorzakelijke rol van RZS verzameld. Dit zijn o.a. verhoogde concentratie lipidperoxydes, veranderde antioxydantniveaus in hersenen en zenuwstelsels, en de remmende effecten van lokaal toegediende antioxydanten in o.a. proefdieronderzoeken (Evans, 1993). Onderzoek bij mensen is moeilijk omdat oxydatieve stress of antioxydant niveaus niet of nauwelijks in hersenen zelf gemeten kunnen worden. Aangezien oxydatieve schade, die tot neurologische storingen zoals bijvoorbeeld de ziekte van Parkinson kan leiden, vooral lokaal van aard zijn, is dit echter wel belangrijk.

3.7.1. Mechanismen

In vergelijking met andere weefsels in het lichaam is het zenuwstelsel extra gevoelig voor de schadelijke effecten van RZS. Dit omdat een hoge oxydatieve metabole activiteit plaatsvindt, een hoge concentratie snel oxydeerbaar materiaal (m.n. MOV's), en een lage concentratie antioxydant

enzymen, vooral CAT en GSH-PX (Evans, 1993). RZS hebben diverse effecten op de werking van neuronen in het centrale zenuwstelsel. Er zijn aanwijzingen dat door RZS de permeabiliteit van de bloed-hersen barrière verhoogd wordt, waardoor de hersenen in verhoogde mate aan schadelijke (oxydatieve) stoffen blootgesteld kunnen worden. Daarnaast kunnen RZS mogelijk direct de synaptische transmissie van signalen verstoren. De sterkste aanwijzingen voor een belangrijke rol van RZS bij de ontwikkeling van neurologische aandoeningen blijkt uit de associatie tussen familiale amyotrope laterale sclerose en mutaties in de genen die coderen voor het antioxydatieve koper/zink superoxyde dismutase enzym (Ames et al., 1993). Deze associatie suggereert dat RZS verantwoordelijk zijn voor de selectieve degeneratie van motorneuronen bij deze fatale ziekte. Aanwijzingen voor de rol van RZS bij de ziekte van Parkinson komt uit post-mortem hersenonderzoek bij patiënten met deze ziekte. In de substantia nigra is, in vergelijking met andere gebieden, een verlaagde concentratie GSH gevonden en een verhoogde concentratie vrij ijzer (Jenner, 1994). Beide factoren zorgen voor de produktie van de zeer schadelijke hydroxylradicalen via o.a. de FENTON-reactie. Deze hydroxylradicalen zijn wellicht verantwoordelijk voor de schade die in deze specifieke hersengebieden aangebracht is, en daarmee voor de ontwikkeling van de ziekte van Parkinson.

3.7.2 Antioxydanten en neurologische aandoeningen.

Abbott en medewerkers hebben de antioxydant status van patiënten met de ziekte van Parkinson onderzocht. Zij rapporteren een verlaagde vitamine E en zink status in patiënten ten opzichte van gezonde controlepersonen. Mogelijk kunnen deze verschillen door een algemene verstoorde voedingsconsumptie verklaard worden; de gemiddelde energie en eiwitinname bleek echter niet af te wijkenvan de dagelijks aanbevolen hoeveelheden (Abbott et al., 1992). Vitamine E status was eveneens verlaagd in patiënten met de ziekte van Alzheimer (Jackson et al., 1988). De klinische effecten van antioxydanten op neurologische aandoeningen zijn tot op heden voornamelijk in een klein aantal studies onderzocht. In een multi-centre gecontroleerde interventieonderzoek is gevonden dat suppletie met deprenyl een zwak remmend effect had op de progressie van de ziekte van Parkinson (Parkinson Study Group, 1989). Vitamine E had echter in dit onderzoek geen effect. Eerste resultaten zijn ook geboekt bij de remming van de progressie van dementie bij kinderen met het Down syndroom door suppletie met antioxydanten vitamine E, vitamine C, selenium en zink (Evans, 1993). Huidig klinisch onderzoek richt zich vooral op de remmende effecten van de antioxydant *N*-acetylcysteine (NAC) op de progressie van een aantal neurologische aandoeningen. Hierbij zijn ook positieve resultaten geboekt door lokale toediening van NAC bij beperking van schade door traumatisch hersenletsel en hersenischemieën (A. Bast, persoonlijke mededeling). Daarnaast is in een klein aantal epidemiologische studies een beschermend effect gerapporteerd van de consumptie van groenten en fruit en/of antioxydanten op de ontwikkeling van o.a. ziekte van Parkinson en hersenischemieën (Ames et al., 1993).

3.8 Conclusie

De resultaten uit voornamelijk (dier)experimenteel onderzoek en uit een beperkt aantal epidemiologische en klinische studies suggereren dat oxydatieve stress in de pathologie van een groot aantal chronische aandoeningen betrokken is. Toch is er voor geen enkele bovengenoemde aandoeningen daadwerkelijk aangetoond dat een verhoogde produktie van RZS en/of een verlaagde antioxydant status de oorzaak van de aandoening vormt. De duidelijkste aanwijzingen tot op heden voor de betrokkenheid van vrije radicalen bij een ziekteproces zijn de effecten van RZS op de LDL oxydatie en daarmee op de ontwikkeling van atherosclerotische plaques die tot hart- en vaatziekten kunnen leiden. Dit resultaat wordt ondersteund door een aantal epidemiologische onderzoeken waarin een beschermend effect van antioxydanten uit de voeding op het risico op coronaire hartziekten gerapporteerd wordt. Voor wat betreft de rol van kanker heeft voornamelijk dierexperimenteel onderzoek aanwijzingen geleverd voor de betrokkenheid van vrije radicalen bij de ontwikkeling en groei van tumoren (vooral in de promotiefase). Sterke aanwijzingen voor een beschermende rol van de consumptie van groenten en fruit op het kankerrisico komen voort uit epidemiologisch onderzoek. Deze resultaten zijn over het algemeen geïnterpreteerd als bewijs voor de beschermende rol van o.a. de antioxydanten vitamine C en ß-caroteen in deze voedingsmiddelen. In een aantal interventieonderzoeken konden de beschermende effecten van deze antioxydanten echter niet bevestigd worden. Het is daarom niet uitgesloten dat andere stoffen in deze voedingsmiddelen via andere mechanismen (bijvoorbeeld via inductie van ontgiftigingsenzymen) het beschermend effect van groenten en fruit (mede) kunnen verklaren. Over de rol van RZS bij het merendeel van de andere hiergenoemde aandoeningen is over het algemeen nog maar weinig bekend. De hypothesen over een causaal verband tussen RZS en deze pathologieën en de mogelijke preventieve effecten van antioxydanten zijn tot op heden daarom vooral speculatief van aard. De meeste humane onderzoeken waren cross-sectioneel van aard, waarbij een verhoogde oxydant status, respectievelijk een verlaagde antioxydant status, gerapporteerd werden bij patiënten in vergelijking met gezonde controles. Gezien het feit dat RZS ook het gevolg van de ziekte kan zijn, eerder dan de oorzaak, is deze onderzoeksopzet niet geschikt voor onderzoek naar een mogelijke causale relatie tussen RZS en ziekte. In de toekomst dient daarom vooral prospectief epidemiologisch onderzoek uitgevoerd te worden waarbij de expositie vóór de ontwikkeling van de aandoening gemeten is. Een belangrijk aspect van het meten van de expositie status is meting van antioxydant status, RZS, of door RZS geïnduceerde schade in het lichaam. In het volgend hoofdstuk wordt hier op ingegaan.

4. METINGEN VAN RZS

RZS zijn door hun hoge reactiviteit en vaak extreem korte levensduur over het algemeen zeer moeilijk zelf te meten. Elektron spin resonantie meters (ESR) kunnen wel RZS zelf meten. De kortlevende vrije radicaal wordt hiervoor eerst gecombineerd met een diamagnetisch molecuul (bv. nitroso verbinding) waardoor een stabiele radicaal ontstaat. Hierbij wordt het ongepaarde elektron in de vrije radicaal spectroscopisch gedetecteerd (Holley en Cheeseman, 1993). Deze methode is echter zeer duur en moeilijk uit te voeren. Daarom worden bij de meeste methoden de *produkten* van oxydatieve stress gemeten. Dit zijn bijvoorbeeld peroxydes van lipiden, geoxydeerde DNA basen of DNA addukten. Indirect kan ook de antioxydant status informatie geven over de mate van oxydatieve stress en de bescherming daartegen. Tabel 5 bevat een overzicht van een aantal veel gebruikte methoden om de mate van oxydatieve stress in het menselijk lichaam te bepalen. De verschillende methoden om oxydant status bij mensen te meten en vooral de analytisch-chemische aspecten ervan zijn onlangs door Hageman en medewerkers samengevat (Hageman et al., 1992). Daarom wordt hier maar een relatief beknopt overzicht gegeven.

4.1 Oxydatie van vetten

Een van meest gebruikte methodes om de mate van oxydatieve stress te bepalen is het meten van de gevolgen van lipidperoxydatie in urine, bloed of uitademingslucht. Meten van lipidperoxydes is om twee redenen belangrijk. Oxydatie ven vetzuren is een reactie die zeer waarschijnlijk optreedt omdat MOV's in de meeste weefsels voorkomen, en het is een belangrijke reactie omdat lipdperoxydatie erg schadelijk is voor de cellen en het weefsel waarin het plaatsvindt. Meervoudig onverzadigde vetzuren worden door een reactie met zuurstof tot lipidperoxydes (LOOH) gevormd. Hierbij worden geconjugeerde dienen gevormd die uiteen kunnen vallen in alkenalen, verschillende aldehydes waaronder malonaldehydes (MDA) en vluchtige alkanen waaronder pentaan en ethaan (Holley en Cheeseman, 1993).

<u>TBA test</u>

De meest bekende en gebruikte methode om lipidperoxydatie te meten is de TBA test in bloed of urine. Hierbij wordt een produkt van vetzuuroxydatie malonaldehyde (MDA) gemeten. MDA reageert onder zure condities en bij hoge temperatuur met TBA waardoor een MDA-TBA addukt ontstaat dat direct spectrofotometrisch bij 535 nm bepaald kan worden (Holley en Cheeseman, 1993). MDA niveaus in bloed correleerden ook goed met verschillende manifestaties van ziekten. Zo is bijvoorbeeld serum MDA bij patiënten met diabetes verhoogd ten opzichte van gezonde populatie (Wolff, 1993). De TBA-MDA test is een eenvoudig en goedkoop uit te voeren test, maar heeft ook een aantal nadelen. Het belangrijkste nadeel is dat TBA niet altijd specifiek met MDA reageert, maar ook met andere oxydatie produkten. Daarom wordt de methode ook wel metingen van TBARS genoemd, naar "TBA-reactive substances". Produkten van lipidperoxydatie worden daarnaast tijdens de meting zelf gevormd en de spectrofotometrische meting zelf is niet erg specifiek. Door gebruik van antioxydanten in het onderzoeksmedium tegen ex-vivo produktie van o.a. MDA en betere HPLC scheidingstechnieken zijn een aantal van deze problemen opgelost. Esterbauer en medewerkers hebben een test ontwikkeld voor de bepaling van diverse soorten aldehyden die uit vetzuurperoxydatie ontstaan. Hierbij worden de aldehydes gederivatiseerd met di-nitrofenyl hydrazine, vervolgens gescheiden door dunne laag chromatografie (TLC) en de individuele aldehyden bepaald met HPLC en UV detectie. Hydroxyalkenalen, zoals 4-hydroxyalkenal (HNE) is waarschijnlijk het belangrijkste eindprodukt van de lipidperoxydatie en is met deze methode goed te bepalen (Esterbauer en Cheeseman, 1990).

Geconjugeerde dienen

Geconjugeerde dienen zijn de primaire produkten die ontstaan door de aanvallen van RZS op MOV's. Zo ontstaat bijvoorbeeld uit de MOV 9,12 linoleenzuur door diverse vrije radicalen, het dieën 9,11 linoleenzuur. Aangezien geconjugeerde dienen normaliter niet in levende cellen voorkomen wordt de meting ervan wel beschouwd als een specifieke merker voor beschadiging van MOV's door RZS. Een nadeel is echter dat de gebruikte spectrofotometrische methode niet erg specifiek is. Door het gebruik van HPLC scheidingstechnieken kon de specificiteit wel verbeterd worden (Hageman et al., 1992). Daarnaast wordt door andere onderzoeksgroepen wel betwijfeld of 9,11 linoleenzuur alleen uit de oxydatie van 9,12 linoleenzuur kan ontstaan, waardoor de specificiteit van de metingen van geconjugeerde dienen recentelijk in twijfel getrokken is. Het is dus niet duidelijk of deze test wel vetzuurperoxydatie meet en het gebruik ervan in humane studies wordt door sommige onderzoekers afgewezen (Holley en Cheeseman, 1993)

Alkanen in uitademingslucht

Tijdens de peroxydatie van de meervoudig onverzadigde vetzuren wordt de alkaanfractie afgesplitst. De alkaanfractie is het stuk tussen het methyl uiteinde van de vetzuur tot aan de dubbele binding. Bij een ω-6 MOV komt dus pentaan vrij, terwijl bij een ω-3 MOV ethaan vrij komt. Deze koolwaterstoffen verdelen zich in het lichaam, worden gedeeltelijk gemetaboliseerd en vervolgens in de uitademingslucht uitgescheiden (Holley en Cheeseman, 1993). Pentaan en ethaan excretie in de uitademingslucht vormen dus merkers voor lipidperoxydatie in het lichaam. De analytische bepalingen worden vooral met capillaire gaschromatografie uitgevoerd. Voordeel van deze methode is dat het een gemakkelijke, niet invasieve methode is die bij een grote groep deelnemers uitgevoerd kan worden. Een aantal nadelen bij deze methode zijn de hoge kosten en uitvoerige chemische analyses. Daarnaast geeft de methode geen informatie geeft over de plek in het lichaam waar lipidperoxydatie plaatsvindt en is de methode gevoelig voor contaminatie door andere bronnen van alkanen, o.a. in de omgevingslucht en ten gevolge van fermentatie in de darmen (Hageman et al., 1992). In een onderzoek bij parenteral gevoede patiënten bleek vitamine E status in serum invers gecorreleerd te zijn met pentaan excretie in de uitademingslucht. Ook verlaagde vitamine E suppletie de pentaan excretie (Jeejeebhoy, 1991).

Prostanoïden

Recent onderzoek heeft gewezen op de vorming van prostaglandine F_2-achtige componenten bij de door RZS geïnduceerde peroxydatie van arachidonzuur. De vorming van deze prostaglandine-achtige componenten is onafhankelijk van cyclo-oxygenases, de gebruikelijke *in vivo* bronnen van prostaglandines. De prostaglandine F_2-achtige verbindingen konden met behulp van dunne laag chromatografie en massa spectrometrie (TLC/MS) in humaan plasma en urine aangetoond worden (Morrow en Roberts, 1991). Uit onderzoek met proefdieren bleek de produktie van deze componenten onder oxydatieve stress verhoogd te zijn. Alhoewel de eerste resultaten veelbelovend zijn moet verder onderzoek uitwijzen in hoeverre deze componenten een bruikbare merker vormen voor lipidperoxydatie bij mensen.

4.2 Oxydatie van eiwitten

Oxydatieve schade aan eiwitten is minder onderzocht als schade door lipidperoxydatie. Dit vooral door het grote aantal potentiële eiwitten dat door RZS beschadigd kunnen worden. Daarnaast worden beschadigde eiwitten snel door proteases weggevangen waardoor de hoeveelheid meetbare geoxydeerde eiwitten laag is. De meest gebruikte methode om eiwitoxydatie

te meten is de bepaling van carbonyl-groepen, die ontstaan door de reactie van hydroxyl radicalen met bijvoorbeeld het eiwit lysine. Deze bepalingen kunnen o.a in humane erytrocyten spectrofotometrisch uitgevoerd worden (Holley en Cheeseman, 1993). De lipidperoxydatie en vervolgens eiwitoxydatie van lipoproteinen heeft in de laatste jaren veel aandacht gekregen. Hierbij is vooral veel onderzoek uitgevoerd naar de oxydatieve modificatie van de apo B eiwit die de receptorfunctie in lage-dichtheids lipoproteinen (LDL) heeft. Mogelijk speelt de oxydatieve van LDL een belangrijke rol bij de vorming van atherosclerotische plaques. Voor de meting van geoxydeerd LDL in weefsels zijn immunohistochemische methoden ontwikkeld (Esterbauer et al., 1993). Daarnaast wordt ook de gevoeligheid van LDL voor oxydatie als maat gebruikt voor oxydatieve stress in vivo. Hierbij wordt de vorming van geconjugeerde dienen gemeten na incubatie van humaan LDL met kopersulfaat (Kleinveld et al., 1992). Het is vooralsnog onduidelijk in hoeverre de zo gemeten gevoeligheid van LDL een maat is voor oxydatieve stress en antioxydant status in mensen.

4.3 Oxydatieve DNA beschadigingen

Een belangrijke oorzaak voor DNA beschadigingen door RZS zijn DNA hydroxyleringen. Geoxydeerde nucleotiden worden over het algemeen verwijdert van de DNA helix door reparatie-enzymen. Een belangrijke produkt van DNA modificaties is 8-hydroxy-guanine, het reactieprodukt van OH• met de base guanine (Shigenaga en Ames, 1991). Dit DNA addukt wordt door repair enzymen verwijderd en uitgescheiden in de urine. Niet specifieke DNA repair-enzymen verwijderen DNA addukten en vormen daarbij deoxynucleotiden, in dit geval dus 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG). Specifieke DNA repair glycosilasen vormen vrije basen. 8OHdG kan in urine aangetoond worden met behulp van HPLC gevolgd door electrochemische detectie. De voordelen van deze methode zijn dat het een sensitieve en selectieve methode betreft voor de bepaling oxydatieve DNA schade. Nadelen betreffen vooral dat niet duidelijk is waar de oxydatie van het DNA plaatsgevonden heeft (Holley en Cheeseman, 1993). Recent onderzoek heeft aangetoond dat rokers ongeveer 50 % meer 8OHdG uitscheiden dan niet rokers. Er was echter geen verband tussen vitamine (C, E retinol equivalenten) inname en 8OHdG uitscheiding (Loft et al., 1992).

Oxydatieve DNA schade kan ook direct gemeten worden in DNA uit bijvoorbeeld lymphocyten. De meeste aandacht gaat hierbij uit naar produkten die resulteren uit reacties tussen hydroxylradicalen met de vier basen en naar cross-links tussen DNA en eiwitten die door hydroxylradicalen gevormd worden. De bepalingen worden verricht met behulp van gaschromatograaf en massa spectrometrie (GC/MS). Behalve de bewerkelijkheid van de analysemethode is de klinische relevantie van de produkten uit de reactie tussen hydroxylradicalen en DNA-basen nog niet aangetoond (Hageman et al., 1992).

4.4 Antioxydant status

Een indirecte merker voor oxydatieve stress is de bepaling van de antioxydant status. Door de complexe interactie tussen oxydanten, RZS, en antioxydanten is echter de antioxydant status eerder een maat voor de gevoeligheid van een individu voor oxydatieve stress, dan voor de schade die door RZS aangebracht wordt. Zoals al eerder besproken bestaat de antioxydatieve afweer uit enzymatische en niet-enzymatische antioxydanten. De belangrijkste antioxydatieve enzymen zijn SOD, GSHpx en CAT. Voor de bepaling van deze enzymen zijn een groot aantal gevoelige en specifieke meetmethoden ontwikkeld. Deze berusten over het algemeen op spectrofotometrische metingen na een reactie met specifieke enzymen. In tabel 4 staan de gemiddelde enzymniveaus in humane erytrocyten (Hageman et al., 1992). De belangrijkste niet-enzymatische antioxydanten zijn

vitamine E, vitamine C, ß-caroteen en urinezuur (tabel 4). Metingen van antioxydatieve vitaminen in humaan weefsel zijn meestal gebaseerd op HPLC technieken, gevolgd door fluorimetrische of UV detectie (Holley en Cheeseman, 1993). Voor de validiteit van de metingen is een belangrijk aspect de monsterafname, bewaring en opslag. Uit de resultaten van een aantal ringonderzoeken blijkt wel dat meer standaardisaties van deze metingen nodig is. Uit een recent uitgevoerd FLAIR onderzoek bleek bijvoorbeeld dat de tussen laboratorium variatie coëfficiënt voor ß-caroteen in serum tussen de 20 en 70% lag (K. Pietzrik, persoonlijke mededeling).

Tabel 4. Gemiddelde concentraties van antioxydanten in erytrocyten en plasma (naar Hageman et al., 1992)

Antioxydant	Concentratie
SOD (erytrocyten)	155 ± 15 eenheden/ml bloed
CAT(erytrocyten)	511 ± 85 ug/ml bloed
GSHpx (erytrocyten)	0.70 ± 0.18 umol NADPH/min per ml bloed
Ascorbaat (plasma)	50 ± 20 uM
Vitamine E (plasma)	10-40 uM
Urinezuur (plasma)	160-450 uM
Carotenoïden (plasma)	2.0 ± 0.3 uM

Naast analyse van de individuele antioxydanten wordt ook de totale antioxydant capaciteit van plasma gemeten met de TRAP (Total peroxyl Radical-trapping Antioxydant Parameter) analyse (Wayner et al., 1987). Deze wordt bepaald door de tijd gedurende een plasmamonster lipidperoxydatie kan weerstaan. Hierbij wordt de zuurstofopname van plasma dat aan peroxyl radicalen blootgesteld wordt bepaald. Experimenteel is vastgesteld dat urinezuur ongeveer 35-65% bijdraagt aan de TRAP, plasma eiwitten 10-50%, ascorbinezuur 0-24% en vitamine E (5-10%).

4.5 Conclusie

De genoemde meetmethodes hebben voor- en nadelen. Zo is de specificiteit vaak laag, d.w.z. dat niet goed vast te stellen is wáár in het lichaam de oorsprong van de oxydatieve schade gezocht moet worden. Vaak wordt alleen de totale mate van oxydatieve stress gemeten, en die is moeilijk in termen van biologische relevantie te interpreteren. Aandoeningen die met oxydatieve stress in verband gebracht worden vooral door lokale beschadigingen van specifieke weefsels of cellen veroorzaakt, bijvoorbeeld oxydatie van LDL in de vaatwand en het ontstaan van hartinfarcten, auto-immunreacties in de ß-cellen van de pancreas en diabetes, beschadiging van de substantia nigra en de ziekte van Parkinson...enz. Daardoor is het voor deze aandoeningen vooral van belang de oxydant of antioxydant status in het doelwitwefsel zelf te bepalen. De plasmawaarden van vitamine E blijkt bijvoorbeeld niet goed te correleren met waarden die in specifieke weefsels (o.a. LDL-cholesterol) gevonden worden waar ze mogelijk een belangrijkste anti-atherosclerotische functie vervullen. De relevantie van de metingen van alleen plasma antioxydantwaarden is daardoor onduidelijk. Mogelijk vormt kanker hierop een uitzondering aangezien tumoren in diverse weefsels in het lichaam kunnen ontstaan en daardoor algemene (systemische) effecten van oxydanten en/of antioxydanten verwacht kunnen worden. Veel meetmethoden zijn vaak niet ook erg sensitief, d.w.z. door een hoge achtergrondruis is het moeilijk om kleine verschillen te meten. Een ander probleem vormt het feit dat veel meetmethoden erg arbeidsintensief zijn, daardoor erg duur en niet zo goed geschikt om in grootschalige epidemiologische onderzoeken toegepast te worden. Vaak moet erg veel zorg besteed worden aan de opwerking en bewaring van het monstermateriaal. Ook voor wat betreft de validiteit van de metingen in termen van biologische relevantie geldt voor bijna alle meetmethoden dat nog niet of nauwelijks onderzocht is, in hoeverre de gevonden waarden verband hebben met bepaalde ziekten of aandoeningen, of het risico hierop kunnen voorspellen. De totale antioxydant capaciteit gemeten via de TRAP assay of via het bepalen van de verschillende antioxydanten niveaus in het plasma kan een aantrekkelijk alternatief vormen voor het onderzoek naar de gezondheidseffecten van oxydatieve stress, doordat TRAP mogelijk als maat gebruikt kan worden voor de gevoeligheid van individuen voor de door RZS veroorzaakte schade.

In de toekomst dienen vooral prospectieve studies uitgevoerd te worden waarbij de validiteit, reproduceerbaarheid en vooral de relevantie van diverse oxydatieve stress metingen onderzocht worden. Zoals al eerder besproken dient daarbij dient ook aandacht besteedt moeten worden aan het probleem dat een verhoogde staat van oxydatieve stress ook een *gevolg* kan zijn van bepaalde ziekten, en niet zozeer de *oorzaak* ervan. Onderzoek naar de volgende oxydatieve stress metingen lijken hierbij het meeste perspectief te bieden: het meten van lipidperoxydes als algemene maat voor blootstelling aan oxydatieve stress (TBARS) en TRAP metingen voor het bepalen van de antioxydant status. Hierbij dient opgemerkt te worden dat recentelijk door de lage specificiteit en gevoeligheid voor *ex-vivo* produktie de zin van het meten van TBARS door sommige onderzoekers in toenemende mate in twijfel getrokken wordt. Als eindprodukten kan het voorkomen van geoxydeerde DNA basen aan kanker gerelateerd worden, en de gevoeligheid van LDL voor oxydatie aan hart- en vaatziekten. Mogelijk bied een combinatie van twee of meerdere merkers het meeste perspectief om voor bepaalde aandoeningen relevante oxydatieve stress metingen uit te voeren.

5. ALGEMENE CONCLUSIE

In dit rapport is een overzicht gegeven over de rol van reactieve zuurstofspecies (RZS) en de mogelijke beschermende effecten van antioxydanten uit de voeding bij het ontstaan en de ontwikkeling van diverse aandoeningen waaronder kanker, hart- en vaatziekten, CARA en diabetes. Tevens zijn een aantal veel gebruikte meetmethoden voor het vaststellen van de oxydatieve stress status besproken.

De betrokkenheid van RZS bij een groot aantal, zo niet bij alle, aandoeningen van de mens is indrukwekkend en heeft vooral in de laatste jaren gezorgd voor een toenemend interesse in dit onderwerp vanuit zowel de klinische, farmacologische, biologische en epidemiologische wetenschappen. Het is belangrijk om in dit verband te wijzen op het feit dat, alhoewel de aanwezigheid van RZS of door RZS geïnduceerde schade in bijna alle ziekten van de mens aangetoond kan worden dat dit nog niet betekent dat RZS ook bij de etiologie van al deze aandoeningen een (belangrijke) rol speelt. Een tweede aspect dat vooral voor preventiedoeleinden belangrijk is, is de onduidelijkheid over de beschermende rol van antioxydanten uit o.a. de voeding op het ontstaan en de ontwikkeling van deze aandoeningen. De kortdurende toepassing van een hoge concentratie (synthetische) antioxydanten heeft weliswaar in de klinische praktijk in een aantal gevallen zijn nut bewezen, maar het is vooralsnog onduidelijk of een (langdurige) hoge antioxydant status inderdaad bescherming biedt tegen bovengenoemde aandoeningen. Vooral voor wat betreft kanker en hart- en vaatziekten suggeren een aantal onderzoeken wel een beschermend effect van antioxydanten. Het is van belang te beseffen dat hoewel RZS over het algemeen schadelijk zijn in het lichaam, dat RZS ook belangrijke fysiologische functies uitoefenen, onder meer als signaalfunctie binnen de cel en tussen cellen en als afweerfuncties in het immuunsysteem. Het is vooralsnog onbekend wat de langdurige effecten van een (te) hoge antioxydant status op deze fysiologisch belangrijke processen zijn. Daarnaast bezitten een aantal antioxydanten (zoals bijvoorbeeld vitamine C) ook pro-oxydatieve werkingen waarmee eveneens, bijvoorbeeld bij langdurige suppletie rekening gehouden dient te worden.

Toekomstig onderzoek zou zich moeten richten op het causale verband tussen RZS en de diverse hiergenoemde ziekten. Hierbij lijkt vooral prospectief epidemiologisch onderzoek het meeste perspectief te bieden. Het ontwikkelen en valideren van goede meetmethodes van het bepalen van oxydatieve stress en de antioxydant status, en onderzoek naar de mogelijke preventieve rol van voedingsantioxydanten zijn hierbij van groot belang (zie ook conclusies 3.8 en 4.5). Onderzoek hiernaar kan een belangrijke bijdrage leveren aan de inzicht en kennis over de etiologie van deze aandoeningen. Gezien de grote diversiteit aan betrokken ziekten en RZS als mogelijke gemeenschappelijke etiologische factoren zijn de potentiële preventieve mogelijkheden door (voedings)interventies en daarmee de gezondheidswinst in Nederland aanzienlijk. Geconcludeerd kan worden dat RIVM-onderzoek naar (de meting van) oxydatieve stress en bescherming door antioxydanten een belangrijke bijdrage zou kunnen leveren aan een op *preventie* van chronische ziekten gericht volksgezondheidsbeleid.

6. LITERATUUR

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxydants, and the degenerative disease of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7915-22

Anggård, E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet 1994;343:1199-1206

Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxydants. Fd Chem Toxic 1994;32:671-83

Asayama, K., Uchida, N., Nakane, T. Hayashibe, H., Dobashi, K., Amemiya, S., Kato, K., Nakazawa, S. Antioxydants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. Free Rad Biol Med 1993;15:597-602

Baker, G.T. Effects of various antioxydants on aging in *Drosophila*. Tox Ind Health 1993;9:163-186

Bankson, D.D., Kestin, M., Rifai, N. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. Clinics in Laboratory Medicine 1993;13:463-480.

Baruchel, S., Wainberg, M.A. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. J Leuk Biol 1992;52:111-114

Block, G., Patterson, B., Subar, A. Fruit, Vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. Nutrition and Cancer 17 (1992) 1-29

Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China; supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. Journal of National Cancer Institute 85 (1993) 1483-1492

Bucca, C., Rolla, G., Farina, J.C. Effects of vitamin C on transient increase of bronchial responsiveness in conditions affecting airways. Ann New York Acad Science 1992;669:175-187

Buhl, R., Jaffe, H.A., Holroyd, K.J., Wells, F.B., Mastrangeli, A., Saltini, C., Cantin, A.M., Crystal, R.G. Systemic glutathione deficiency in symtom-free HIV-seropositive individuals. Lancet, 1989;1294-98

Chandra, R.K. Effect of vitamin and trace-element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. Lancet 1992;340:1124-27

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993;49:481-93

Coodley, G.O., Nelson, H.D., Loveless, M.O., Folk, C. ß-carotene in HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr 1993;6:272-276

Doelman, C.J.A. Reactive oxygen species and airway hyperreactivity. Thesis, 1991, the University of Amsterdam, the Netherlands.

Elsayed, N.M., Kass, R., Mustafa, M.G., Hacker, A.D., Ospital, J.J., Chow, C.K., Cross, C.E. Effect of dietary vitamin E on the biochemical response of rat lung to ozone inhalation. Dru-Nutrient Interactions 1988;5:373-386

Esterbauer, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid peroxidation products. Am J Clin Nutr 1993;57(suppl):779s-86s

Esterbauer, H., Cheeseman, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde adn 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990;186:407-21

Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br Med Bull 1993;49:566-76

Evans, P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. Br Med Bull 1993;49:577-87

Fletcher, B.L., Tappel, A.L. Protective effects of dietary alpha-tocopherol in rats exposed to toxic levels of ozone an nitrogen dioxide. Environ res 1973;6:165-175

Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P., Moser, U.K. Inverse correlation between plasma vitamine E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. American Journal of Clinical Nutrition 1991);53:326s-334s.

Greenberg, E.R., Baron, J.A., Tosteson, T.D. et al. A clinical trial of antioxydant vitamins to prevent colorectal adenoma. New Engl J Med 1994;331:141-7

Greenspan, H.C., Aruoma, O.I. Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxydant activity. Immunology Today 1994;15:209-213

Greenspan, H.C. The role of reactive oxygen species, antioxydants and phytopharmaceuticals in human immunodeficiency virus activity. Med Hyp 1993;40:85-92

Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. Br Med Bull 1993;49:523-544

Hackney, J.D., Linn, W.S., Buckley, R.D., Jones M.P., Wightman, L.H., Karuza, S.K. Vitamin E supplementation and respiratory effects of ozone in humans. J Toxicol Environ Health 1981;7:383-390

Hageman, J.J., Bast, A., Vermeulen, N.P.E. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects Chem Biol Intercations 1992;82:243-293

Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. Haemostasis 1993b;23(suppl):118-126

Halliwell, B. How to characterize a biological antioxydant. Free Rad Res Comms 1990;9:1-32

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. The antioxydants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280:1-8

Herbert, V. The antioxydant supplement myth. Am J Clin Nutr 1994;60:157-8

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxydant flavonoids and cancer risk in The Zutphen Elderly Study. Nutrition and Cancer 1994;22:175-184

Hertog, M.G.L. Flavonols and flavones in foods and their relation with cancer and coronary heart disease risk. Thesis Wageningen, the Netherlands, 1994.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxydant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. The Lancet 342 (1993) 1007-11

Holley, A.E., Cheeseman, K.H. Measuring free radical reactions in vivo. Br Med Bull 1993;49:494-505

Houweling, H., Coutinho, R.A. Acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: Oxford textbook of public health, chapter 22, second edition, vol 3. Oxford University Press, 1991.

Jeejeebhoy, K.N. In vivo breath alkane as an index of lipid peroxidation. Free Rad Biol Med 1991;10:191-3

Jenner, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet 1994;344:796-798

Kardinaal, A.F.M., Kok, F.J., Ringstad, J. et al. Antioxydants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC Study. Lancet 1993;342:1379-84

Kleinveld, H.A., Hak-Lemmers, H.L.M., Stalenhoef, A.F.H., Demacker, P.N.M. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation:application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. Clin Chem 1992;38:2066-72

Kramer, K., Doelman, C.J.A., Timmerman, H., Bast, A. A disbalance between ß-adrenergic and muscarine responses caused by hydrogen peroxide in rat airways in vitro. Biochem Biophys Res Commm 1987;145:357-362

Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjonneland, Overvad, K., Poulsen, H.E. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. Carcinogenesis 1992;13:2241-7

Miedema, I. Feskens, E.J.M., Heederik, D., Kromhout, D. Dietary determinants of lon-term incidence of chronic nonsoecific lung diseases. the Zutphen Study. Am J Epidemiol 1993;138:37-45

Mohsenin, V.. Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress; role of antioxydant defenses. J Appl Physiol 1991;70:1456-62

Mohsenin, V. Effect of vitamin C on NO_2-induced airway hyperresponsiveness in normal subjects. Am Rev Respir Dis 1987;136:1408-11

Morabia, A., Sorenson, A., Kumanyika, S.K., Abbey, H., Cohen, B.H., Chee, E. Vitamin A, cigarette soking and airway obstruction. Am J Epidem 1990;132:77-82

Morrow, J.D., Roberts, L.J. Quantification of noncyclooxygenase dervied prostanoids as a marker of oxidative stress. Free Rad Biol Med 1991;10:195-200

Namiki, M. Antioxydants/antimutagens in foods. Critical reviews in food science and Nutrition 1990;29:273-300

Nohl, H. Involvement of free radicals in ageing. a consequence or cause of senescence. Br Med Bull 1993;49:653-7

Oberley, L.W. Free radicals and diabetes. Free Rad Biol Med 1988;5:113-124

Oliver, M.F. Serum cholesterol-the knave of hearts and joker. Lancet 1981;2:1090-95

Pacht, E.R., Kaseki, H., Mohammed, J.R., Cornwell, D.G., Davis, W.B. Deficiency of vitamin E in the alveolar fluid of cigarette smokers. J Clin Invest 1986;77:789-96.

Paeck, R., Rubin, P., Bauerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-*kappa*B transcription factor and HIV. EMBO, 1991;10:2247-2258

Palinski W, Rosenberg ME, Yla-Herttuala S, et al. LDL undergoes oxidative modification in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:1372-6

Paolisso, G., D'Amore, A., Giugliano, D., Ceriello, A., Varricchio, M., D'Onofrio, F. Pharmacological doses of vitamin El improve insulin action in healthy subjects and non-insulin dependent diabetic patients. Am J Clin Nutr 19934;57:650-656

Reaven, P.D., Khouw, A., Beltz, W.F., Parthasarathy, S., Witzum., J.L. Effect of dietary antioxydant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by ß-carotene. Arteriosclerosis and Thrombosis 1993;13:590-600

Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med 1993;328:1450-6

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. Nature 1993;362:801-9

Ryrfeldt, Å., Bannenberg, G., Moldéus, P. Free radicals and lung disease. Br Med Bull 1993;49:588-603

Sappey, C., Leclercq, P., Coudray, C., Faure, P., Micoud, M., Favier, A. Vitamin, trace elements and peroxide status in HIV seropositive patients: asymptomatic patients present a severe ß-carotene deficiency. Clin Chim Acta 1994;230:35-42

Shigenaga, M.K., Ames, B.N. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. Free Rad Biol Med 1991;10:211-6

Sies, H. Strategies of antioxydant defense. Eur J Biochem 1993;215:213-219

Sohal, R.S. The free radical theory of aging. An appraisal of the current status. Aging Clin Exp Res 1993;5:3-17

Stadtman, E.R. Protein oxidation and Aging. Science, 1992;257:1220-24

Stadtman, E.R. Metal-ion catalyzed oxidtaion of proteins. biochemical mechanisms and phyisological consequences. Free Radic Biol Med 1990;9:315-25

Stampfer, M.J., Hennekens, H., Manson, J.E., et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1993;328:1444-9

Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE, Khoo, JC, Witztum, JL. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989;320:915-24.

Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruits, and cancer. I. Mechanisms. Cancer Causes and Control 1991;2:325-357.

Tang, A.M., Graham, N.M.H., Kirby, A.J., McCall, L.D., Willet, W.C., Saah, A.J. Dietary micronutrient intake and risk of progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected homosexual men. Am J Epidemiol 1993;138:937-51

The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. New England Journal of Medicine 330 (1994) 1029-35

Trush, M.A., Kensler, T.W. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. Free Rad Biol Med 1991;10:201-9

Van Poppel, G., Kardinaal, A.F.M., Princen, H.M.G. Antioxydanten en coronaire hartziekten. Hart Bulletin 25 (1994) 132-136

Van den Brandt, P.A., en Bausch-Goldbohm, R.A. A prospective study on diet and cancer in the Netherlands, Proefschrift, Rijksuniversiteit Limburg, Maastricht, 1993

Volksgezondheid Toekomst Verkenning. De gezondheidstoestand van de Nederlandse bevoling in de periode 1950-1990. Ruwaard D en Kramers PGN (eds). Den Haag: SDU uitgeverij, 1993

Wang, Y., Watson, R.R. Potential therapeutics of vitamin E (tocopherol) in AIDS and HIV. Drugs 1994;48:327-338

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C., Locke, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxydant activity of human blood plasma. Biochem Biophys Acta 1987;924:40819

Wolff, S.P. Diabetes mellitus and free radicals. Br Med Bull 1993;49:642-652

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. J Clin Invest 1989;84:1086-95

Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Phys Reviews 1994;74:139-162

BIJLAGE

Tabel 5: Overzicht verschillende meetmethoden voor oxydatieve stress in biologisch monstermateriaal met enkele voor- en nadelen (naar Holley en Cheeseman, 1993 e.a.)

	Analysetechniek	Wat wordt gemeten ?	Monstermateriaal	methode	voordelen	nadelen
	Electronen spin resonantie	vrije radicalen	plasma	Vorming van stabiel radicaal met diamagnetisch molecuul	vrije radicalen worden zelf gemeten	duur, moeilijke opwerking
Lipidoxydatie						
	GC/MS	LOOH	plasma	reductie LOOH tot hydroxyzuren met triphenylphosphine	sensitief/specifiek	duur, moeilijke opwerking
	Spetrofotometer	LOOH of complexen hiermee	plasma	samen met haem wordt methyleen blauw geproduceerd en gemeten	snel, simpel m.b.v. comerciele kit	alleen totale hydroperoxides
	HPLC + chemiluminescence	LOOH of complexen hiermee	plasma	Scheiding van verschillende hydroperoxides m.b.v. Folch extractie	sensitief, verschillende hydroperoxides	duur, arbeidsintensief, snelle opwerking, niet alle standaarden aanwezig
	spectrofotometer bij 234 nm+ eventueel HPLC	geconjugeerde dienen	plasma/urine	Reagens toevoegen en detecteren	snel, eenvoudig	niet specifiek, veel ruis door o.a. haem, MOV's
	spectrofotometer bij 532 nm of fluorescentie. Eventueel HPLC	TBARS	plasma/urine	TBA reageert met MDA, een aldhyde produkt van vetzuuroxydatie	relatief snel en simpel	niet altijd specifiek voor MDA. HPLC is tijdrovend, snelle opwerking nodig
	TLC gevolgd door HPLC	Aldeydes uit vetzuuroxydatie (malonaldehydes)	plasma/urine	Scheiding d.m.v. TLC en detectie door HPLC met UV	verschillende aldehydes .	tijdrovend, duur niet routinematig
	HPLC/UV of GC-MS	4-hydroxynonenal	plasma/urine	scheiding en detectie bij specifieke golflengte	biologisch relevante alkenyl	duur/tijdrovend

	Analysetechniek	Wat wordt gemeten ?	Monstermateriaal	methode	voordelen	nadelen
	GC-ionisator detector	Vluchtige koolwaterstoffen i.e. ethaan/penthaan	uitademingslucht	lucht wordt door absorbent gebracht (-100 °C) en met GC gedetecteerd	niet invasief, meerdere monsters, sensitief	niet specifiek door achtergrond, alleen algemene vetzuuroxydatie
	HPLC	Fluorescentie produkten van vetzuuroxydatie	plasma/urine	Cross-linking met proteinen en meting in Folch extracten	sensitief	alleen late fase in vetzuuroxydatie
Eiwitoxydatie	HPLC	methionine sulfoxide	plasma	geoxydeerde methionine	sensitief	relevantie ?
DNA schade	HPLC met electrochemische detectie of GC-MS	8-hydroxydeoxyguanosine of thymidine glycol	urine	reactie van •**OH** met thymine of guanine	sensitief	weinig specifiek, geen informatie over weefsel waaruit DNA komt
Antioxydanten	zuurstofgebruik meter	Total Radical trapping Antioxydant Parameter (TRAP)	plasma	meet tijd dat plasma lipidperoxydatie kan weerstaan	geeft gevoeligheid voor oxydatieve stress	geen informatie over vrije radicaal productie
	HPLC	α-tocopherol,ß-caroteen, ascorbinezuur	plasma	UV/flurorescentie	geeft gevoeligheid, eenvoudig, goedkoop	relevantie van plasmawaarde t.o.v. weefselwaarden
	Spectrofotometrie	Catalase of superoxyde dismutase concentraties	plasma/erytrocyten	reactie met diverse enzymen	zie boven	zie boven
Diversen	HPLC	Prostaglandine F2 componenten	plasma/urine e.a.	UV/fluorescentie	sensitief/specifiek	duur/gevoelig voor ex-vivo productie
	Spectrofotometer	Gevoeligheid LDL voor oxydatie (ex-vivo)	plasma	Door toevoeging van oxidant (Fe, Cu) lagtime meten	biologisch relevante schade, eenvoudig	toevoeging van koper oxydant mogelijk niet relevant in de mens
	HPLC	Eicosanoïden	urine	Directe detectie bij specifieke golflengte	specifieke/sensitief	relevantie ?