

Διπλωματική Εργασία

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΙΣΤΩΝ
ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΓΟΝΑΤΟΣ
ΚΑΙ ΙΣΧΙΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ
ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ**

**EVALUATING THE REDOX STATUS OF TISSUES FROM
VARIOUS KNEE AND HIP PARTS IN PATIENTS WITH
DIFFERENT TYPES OF OSTEOARTHRITIS**



Κρουστάλλη Κυριακή του Χρήστου
Λάρισα, 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σκαπέρδα Ζωή – Βασιλική (Επιβλέπουσα)

*Εντεταλμένη Διδάσκουσα Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Κουρέτας Δημήτριος

*Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Καραχάλιος Θεόφιλος

*Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας κατά το Εαρινό εξάμηνο 2024.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά ένα προς ένα τα άτομα που συνέβαλαν στη προσπάθειά μου.

Αρχικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα της τριμελούς επιτροπής μου, κυρία Σκαπέρδα Ζωή - Βασιλική για την πολύτιμη συνδρομή της στην πτυχιακή μου εργασία και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την πραγματοποιήσω στο εργαστήριο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Κουρέτα Δημήτριο και τον κύριο Καραχάλιο Θεόφιλο που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω, ως μέλος του εργαστηρίου, την κ. Μακρή Σωτηρία, που με εμπιστεύτηκε να εργαστώ μαζί της και με βοήθησε σε κάθε βήμα της διπλωματικής μου εργασίας, από την αρχή έως το τέλος. Της οφείλω πολλά τόσο στο πειραματικό, όσο και στο γνωσιακό κομμάτι.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το εξαιρετικό κλίμα που δημιουργήσαν και τη βοήθειά τους αυτό το χρονικό διάστημα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου που πάντα με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα για να πραγματοποιώ τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<i>Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή</i>	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η ιστορία του οξυγόνου ως το πιο σημαντικό στοιχείο του αέρα	9
1.2 Ελεύθερες ρίζες	10
1.2.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	11
1.2.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	15
1.2.3 Φυσιολογικές και ωφέλιμες λειτουργίες ελευθέρων ριζών	19
1.2.4 Παθολογικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών σε επίπεδο κυττάρου	21
1.3 Το οξειδωτικό στρες	22
1.3.1 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες	24
1.4 Αντιοξειδωτικά	24
1.4.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά	25
1.4.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά	27
1.5 Αρθρίτιδα	29
1.5.1 Η νόσος της Οστεοαρθρίτιδας (Osteoarthritis)	29
1.5.2 Επιδημιολογία νόσου	30
1.5.3 Παθοφυσιολογία της νόσου	32
1.5.4 Τα στάδια της νόσου	35
1.5.6 Συσχέτιση οξειδωτικού στρες και οστεοαρθρίτιδας	37
1.5.6.1 Οξειδωτικό στρες και αρθρικός χόνδρος	38

1.5.6.2 Οξειδωτικό στρες και υποχόνδριο οστό.....	40
1.5.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις και η χρήση αντιοξειδωτικών στην Οστεοαρθρίτιδα	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1 Γενικά.....	45
3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και τύποι δειγμάτων	45
3.3 Συνθήκες αποθήκευσης δειγμάτων	46
3.4 Ομογενοποίηση ιστών.....	46
3.5 Μέθοδος μέτρησης ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	47
3.6 Μέθοδος μέτρησης ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity).....	49
3.7 Ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω μέτρησης της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT)	51
3.8 Μέθοδος μέτρησης πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	53
3.9 Μέθοδος εκτίμησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	56
3.10 Μέθοδος προσδιορισμού συνολικής ποσότητας πρωτεΐνη (Μέθοδος Bradford).....	58
3.11 Στατιστική Ανάλυση.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
4.1 Αποτελέσματα δειγμάτων ιστών στο ισχίο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα	60
4.1.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	60
4.1.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	61
4.1.3 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της δράσης του ενζύμου της καταλάσης.....	62

4.1.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	63
4.1.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων	64
4.2 Αποτελέσματα δεικτών στα δείγματα ιστών που προήλθαν από το γόνατο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα	65
4.2.1 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	65
4.2.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	66
4.2.3 Προσδιορισμός ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂) μέσω της δράσης του ενζύμου της καταλάσης	67
4.2.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	68
4.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος της Οστεοαρθρίτιδας αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο αρθρίτιδας, με ολοένα και περισσότερα περιστατικά ασθενών ανά τον κόσμο. Αφορά πολλές διαφορετικές αρθρώσεις και η παθοφυσιολογία της νόσου σχετίζεται με γεγονότα αποικοδόμησης των ιστών της, όπως στο χόνδρο, στον υμένα και στο υποχόνδριο οστό, αλλά και με τη δημιουργία νέων οστικών δομών, όπως τα οστεόφυτα. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γύρω από τη σχέση της νόσου και του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες στην περιοχή της άρθρωσης συνδέεται άμεσα με γεγονότα φλεγμονής και γήρατος των αρθρικών κυττάρων, όμως δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη η επίδρασή του στην εξέλιξη της νόσου. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση πέντε οξειδοαναγωγικών δεικτών σε δείγματα ιστών που προέρχονται είτε από γόνατο, είτε από το ισχίο, ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα. Οι βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν: τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), του πιο σημαντικού ενδογενούς αντιοξειδωτικού, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Activity, TAC), ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι μετρήσεις έγιναν σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους ιστών της παθολογικής άρθρωσης από κάθε ασθενή (υμένας, οστεόφυτο, χόνδρος, υποχόνδριο οστό) και συνολικά μελετήθηκαν 40 άτομα, τα οποία εισήχθησαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) για αρthroπλαστική. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκείνος ο ιστός που επηρεάζεται πρώτος και περισσότερο σε σχέση με τους υπόλοιπους, είναι ο χόνδρος και ακολουθεί το υποχόνδριο οστό, τόσο στα δείγματα από το γόνατο, όσο και στα δείγματα του ισχίου, αφού εκεί παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής και λιπιδικής οξείδωσης με ταυτόχρονη αύξηση επιπέδων των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μελέτη αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση για τη συσχέτιση δεικτών οξειδοαναγωγής, ασθενών με οστεοαρθρίτιδα, σε τέσσερις βασικούς ιστούς που επηρεάζονται από τη νόσο. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται στη συνέχεια ώστε να συγκριθεί η μακροσκοπική εικόνα των ασθενών με τους δείκτες οξειδοαναγωγής και

μακροπρόθεσμα να γίνουν πιθανές παρεμβάσεις (πχ. διατροφικές) ώστε να βελτιωθεί τόσο η κλινική τους εικόνα, όσο και το οξειδοαναγωγικό τους προφίλ.

ABSTRACT

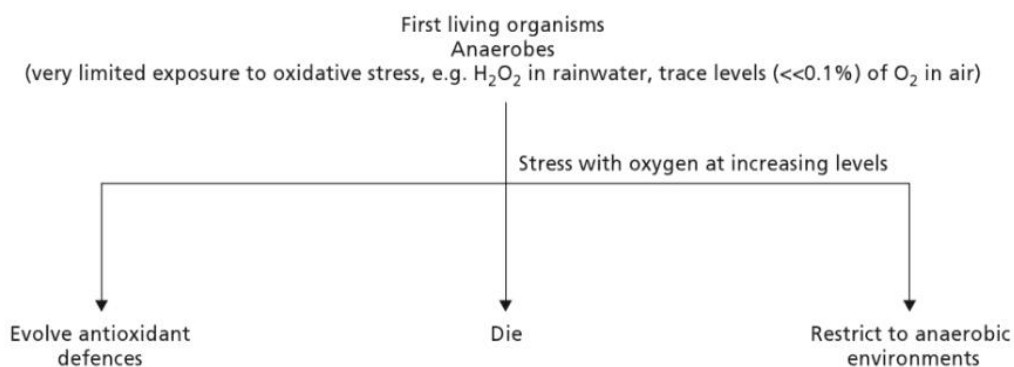
Osteoarthritis (OA) is the most common type of arthritis, with an increasing number of patients worldwide. It affects many different types of joints, and its pathophysiology is related to events that lead to the degradation of joint tissues, such as cartilage, synovium, and subchondral bone, as well as the formation of new bone structures, the osteophytes. Recent years, studies have focused on the relationship between osteoarthritis and oxidative stress. Specifically, oxidative stress in the joint area is directly associated with inflammation and aging of joint cells (Inflammaging), but its impact on the disease progression is not fully described. The aim of this study was to evaluate five crucial redox biomarkers in tissue samples from patients suffering from knee or hip osteoarthritis. These biomarkers include the Reduced form of Glutathione (GSH), Total Antioxidant Capacity (TAC), the rate of Hydrogen Peroxide (H_2O_2) degradation, Protein Carbonyls, and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Assessment was conducted in four different types of pathological joint tissues from each patient (synovium, osteophyte, cartilage and subchondral bone). Overall, 40 patients were studied, after their admission to the Orthopedic Clinic of the University Hospital of Larissa, for total arthroplasty. The results indicated that the most affected tissue is cartilage, followed by subchondral bone, in either knee or hip samples. These tissues showed the highest levels of protein and lipid peroxidation, and simultaneously, high levels of antioxidant biomarkers. This study provides an initial approach to correlate the five redox biomarkers in the four fundamental osteoarthritis tissues. Further research is required, to compare the macroscopic imaging of patients with these redox markers and, possibly some interventions (such as dietary alterations) will be assessed to improve patients' clinical condition and redox status.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ιστορία του οξυγόνου ως το πιο σημαντικό στοιχείο του αέρα

Το οξυγόνο, με χημικό τύπο O_2 , εμφανίστηκε στην ατμόσφαιρα της Γης πριν από περίπου 2,2 δισεκατομμύρια χρόνια, λόγω της ανάγκης των κυανοβακτηρίων για φωτοσύνθεση και παραγωγή ενέργειας. Συσσωρεύτηκε στη Γη ως παραπροϊόν της διαδικασίας αυτής δημιουργώντας μία «δεξαμενή οξυγόνου», η οποία με το πέρασμα των χρόνων προσέφερε στον πλανήτη περεταίρω χημικά μόρια όπως το O_3 , γνωστό ως όζον. Έτσι, δημιουργήθηκε στην ατμόσφαιρα ένα «φίλτρο» προστασίας από επιβλαβείς επιδράσεις, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, και έτσι οι ζωντανοί οργανισμοί εκτός από τα υδάτινα εδάφη αποίκισαν και στη στεριά. Είναι, λοιπόν, ξεκάθαρη η θεμελιώδης θέση του οξυγόνου για την απαρχή της ζωής στον πλανήτη Γη.

Ωστόσο, δεν είναι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αερόβιοι. Κάποιοι είναι αεροανεκτικά αναερόβιοι οργανισμοί, δηλαδή το οξυγόνο δεν είναι απαραίτητο συστατικό για την ανάπτυξή τους, αλλά αυτή ευνοείται από την παρουσία του, ενώ άλλοι είναι προαιρετικά ή και υποχρεωτικά αναερόβιοι οργανισμοί, δηλαδή αναπτύσσονται μόνο σε πλήρως ανοξικά περιβάλλοντα. Συνεπώς, παρουσία της δεξαμενής οξυγόνου στην ατμόσφαιρα του πλανήτη και τη συνεχή αύξηση των ποσοτήτων του με την πάροδο του χρόνου, τα διαφορετικά είδη οργανισμών ανταποκρίθηκαν με ξεχωριστούς τρόπους για την επιβίωσή τους, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 1.



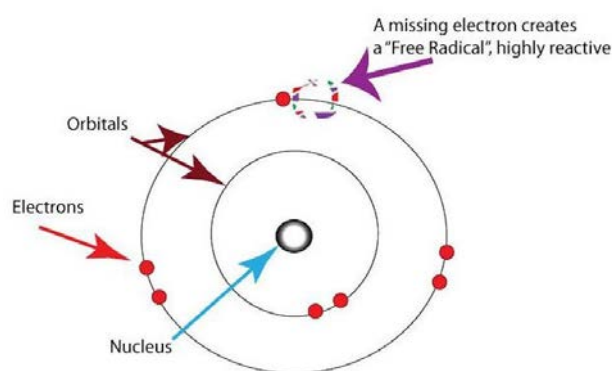
Εικόνα 1. Οι τρόποι αντίδρασης των πρώτων οργανισμών στην αύξηση του οξυγόνου
(Halliwell & Gutteridge, 2015)

Αρχικά, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί ήταν αναερόβιοι, συνεπώς με την συνεχή συσσώρευση του οξυγόνου υπέστησαν σημαντικό στρες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα κάποιοι να πεθάνουν, ενώ άλλοι να περιοριστούν σε περιβάλλοντα με ελάχιστη παρουσία οξυγόνου. Τέλος, η πλειονότητα αυτών κατάφερε να αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, χρησιμοποιώντας το ατμοσφαιρικό οξυγόνο ως υπόστρωμα αντιδράσεων καθοριστικών για την επαρκή παραγωγή ενέργειας και συνεπώς, το εκμεταλλεύτηκαν για την επιβίωσή τους. Αυτοί αποτελούν τους σημερινούς αερόβιους οργανισμούς. Είναι γεγονός, λοιπόν, πως το οξυγόνο (O_2) είναι το χημικό στοιχείο με τον πιο καθοριστικό ρόλο για την επιβίωση των οργανισμών στον πλανήτη.

Αντίθετα, αξίζει να σημειωθεί πως το οξυγόνο μπορεί να αποτελέσει και πηγή παραγωγής επιβλαβών μορίων, όπως είναι οι ελεύθερες δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), των οποίων η ανεξέλεγκτη παραγωγή συνδυαστικά με την αδυναμία αντιμετώπισής τους από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο του και να αποβεί τοξική για αυτόν. (Halliwell & Gutteridge, 2015)

1.2 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται άτομα ή μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια σθένους στα τροχιακά τους και μπορούν να υπάρχουν ως ανεξάρτητα στοιχεία μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 2). Είναι ασταθείς, εξαιρετικά δραστικές ενώσεις και έχουν μικρό χρόνο ζωής. Συνήθως, για να ανακτήσουν τη σταθερότητά τους προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια του κυττάρου και έτσι, προκαλείται μία αλυσιδωτή αντίδραση δημιουργίας νέων ελευθέρων ριζών. (Di Meo & Venditti, 2020)



Εικόνα 2. Η δομή μίας ελεύθερης ρίζας

(Helmenstine, Anne Marie, Ph.D. "Free Radical Definition." ThoughtCo, Aug. 28, 2020, [thoughtco.com/definition-of-free-radical-604468.](https://www.thoughtco.com/definition-of-free-radical-604468/))

Τα τελευταία χρόνια είναι όλο και μεγαλύτερο το ενδιαφέρον των ερευνητών γύρω από τις ελεύθερες ρίζες, λόγω της εμπλοκής τους τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η πρώτη αναφορά έγινε από το 1900 μ.Χ., από τον Καθηγητή Χημείας Moses Gomberg, ο οποίος επισήμανε την ύπαρξη της οργανικής ελεύθερης ρίζας του τρι-φαίνυλο-μεθυλίου ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$). Αργότερα, το 1954 ο Gershaman πρότεινε μία σχέση ανάμεσα στην ικανότητα του οξυγόνου να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες και στον τοξικό του χαρακτήρα, ενώ την ίδια χρονιά επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ελευθέρων ριζών στο περιβάλλον. Πολύ σύντομα, ολοένα και περισσότερες πληροφορίες επί του θέματος συλλέχθηκαν, με αποτέλεσμα το 1971 να ανακαλυφθεί, από τον Loschen, πως πηγή δημιουργίας των ελευθέρων ριζών, και κυρίως των ROS, αποτελεί η αναπνευστική αλυσίδα, μια μεταβολική διαδικασία παραγωγής ενέργειας των κυττάρων. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1977, οι ελεύθερες ρίζες συσχετίστηκαν άμεσα ακόμα και με την μεταγωγή σημάτων εντός των κυττάρων και συνεπώς, επιβεβαιώθηκε πως ενώ συμβάλλουν σε φυσιολογικές διαδικασίες των κυττάρων, ευθύνονται και για πολλές παθολογικές καταστάσεις.

Υπάρχουν πολλά είδη ελευθέρων ριζών, με πιο διαδεδομένες τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species- RNS). Σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα, η συμβολή τους στο κύτταρο είναι φυσιολογική και ωφέλιμη, αφού συμμετέχουν τόσο στην μεταγωγή σημάτων εντός και μεταξύ των κυττάρων, όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα σε επίπεδο οργανισμού. Ωστόσο, η υπέρμετρη παραγωγή ROS και RNS οδηγεί σε Οξειδωτικό και Νιτρικό στρες, αντίστοιχα, μία κατάσταση καταπόνησης για τα κύτταρα και συνεπώς, για όλον τον οργανισμό. (Phaniendra et al., 2015)

1.2.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Οι δραστικές ρίζες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες βάσει της δομής τους, τις ρίζες (radicals) και τις μη ρίζες (non-radicals). Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται βάσει της παρουσίας ή μη ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου στο άτομο.

Οι ελεύθερες ρίζες διαθέτουν τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στις τροχιές γύρω από τον πυρήνα. Το γεγονός αυτό τις κάνει και εξαιρετικά δραστικές,

αφού τείνουν να αποκτήσουν ή να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο σε κάποιο άλλο μόριο, ώστε να σταθεροποιήσουν τη δομή τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ενδεικτικά η ρίζα υδροξυλίου και αλκοξυλίου.

Οι χημικές δομές των ριζών οξυγόνου και αζώτου με την ονομασία τους απεικονίζονται στον επόμενο Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ονομασία και Χημικοί τύποι ριζών οξυγόνου και αζώτου

ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ		ΡΙΖΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Ονομασία	Χημική δομή	Ονομασία	Χημική δομή
Ρίζα σουπεροξειδίου	$O_2 \bullet-$	Μονοξειδίο του αζώτου	$NO\bullet$
Ρίζα υδροξυλίου	$OH\bullet$	Διοξειδίο του αζώτου	NO_2
Ρίζα αλκοξυλίου	$RO\bullet$		
Ρίζα περοξυλίου	$ROO\bullet$		

Οι μη ρίζες είναι άτομα τα οποία δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όμως μπορούν εύκολα να προκαλέσουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς. Η απουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τις καθιστά πιο σταθερές ενώσεις, με συνεπώς μεγαλύτερο χρόνο ζωής στο κύτταρο. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το όζον, ενώ περεταίρω παραδείγματα μαζί με τις χημικές τους δομές, υπάρχουν στον επόμενο Πίνακα 2. (Di Meo & Venditti, 2020)

Πίνακας 2. Ονομασία και Χημικοί τύποι μη ριζών οξυγόνου και αζώτου

ΜΗ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ		ΜΗ ΡΙΖΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2	Υπεροξενιτρίτης	$ONOO-$
Μοριακό οξυγόνο	O_2	Κατιόν νιτροξυλίου	NO
Όζον	O_3	Ανιόν νιτροξυλίου	$NO-$
Οργανικό υπεροξειδίο	$ROOH$	Τριοξειδίο του αζώτου	N_2O_3

Υποχλωριώδες οξύ	HOCl	Τετροξειδίο του αζώτου	N ₂ O ₄
Υποβρωμιώδες οξύ	HOBr	Νιτρώδες οξύ	HNO ₂
		Υπεροξεινιτρικό οξύ	ONOOH

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι πιο συχνές ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο κύτταρο είναι οι δραστικές μορφές με κεντρικό άτομο το οξυγόνο (ROS). Πιο συγκεκριμένα, από το οξυγόνο που διατίθεται στο κύτταρο, περίπου το 95% παράγει την απαραίτητη για αυτό ενέργεια μέσω της διαδικασίας της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ το 5% ανάγεται ατελώς δημιουργώντας δραστικές ρίζες.

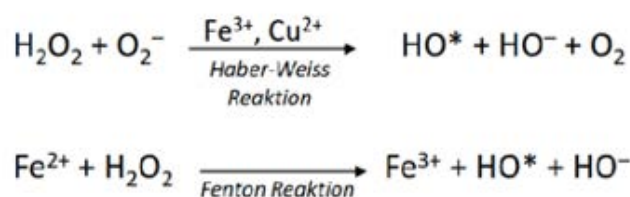
Διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι οι εξής:

Σουπεροξειδίο O₂^{•-}

Το σουπεροξειδίο είναι ανιονική ρίζα που έχει ως βάση το οξυγόνο. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή ROS και παράγεται ενδογενώς στα μιτοχόνδρια, είτε παρουσία ενζύμων (όπως η οξειδάση της ξανθίνης ή η λιποξυγενάση), είτε απουσία τους, μέσω φυσιολογικών διαδικασιών του κυττάρου (όπως απλή μεταφορά ηλεκτρονίων σε μοριακό οξυγόνο). (Phaniendra et al., 2015)

Ρίζα υδροξυλίου OH[•]

Η ρίζα υδροξυλίου είναι η πιο βλαβερή ενδογενώς παραγόμενη ρίζα οξυγόνου στα κύτταρα. Έχει υψηλή δραστικότητα και αντιδρά ισχυρά με οργανικά βιομόρια, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, δημιουργώντας μη αντιστρεπτές καταστροφές στα



Εικόνα 3. Αντίδραση Fenton και αντίδραση Haber-Weiss (Ionescu & Constantinescu, 2021)

κύτταρα. Παράγεται στα κύτταρα κυρίως μέσω της αντίδρασης Fenton, κατά την οποία το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με πρωτεΐνες πλούσιες σε μέταλλα (π.χ. Fe), όπως η φερριτίνη στο αίμα. Παράλληλα, μπορεί να συντεθεί και μέσω της αντίδρασης

Haber-Weiss, κατά την οποία το σουπεροξειδίο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρούν μεταξύ τους, παράγοντας τη ρίζα αυτή ως προϊόν της αντίδρασης (Εικόνα 3). (Lobo et al., 2010)

Υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ενώ δεν θεωρείται ελεύθερη ρίζα στο κύτταρο, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία της βλαβερής ρίζας υδροξυλίου, παρουσία μετάλλων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (αντίδραση Fenton). Συνεπώς, ενώ δεν



Εικόνα 4. Η διάσπαση του H₂O₂ από το ένζυμο της καταλάσης (LibreTexts)

«απειλεί» άμεσα τα βιομόρια, είναι δυνητικά επικίνδυνο για τη λειτουργία του κυττάρου. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του περιορίζονται μέσω της δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση (Εικόνα 4). (Di Meo & Venditti, 2020)

Όζον O₃

Το όζον έχει ισχυρό οξειδωτικό χαρακτήρα, αφού μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, βλαβερών για τα βιομόρια. Πιο συγκεκριμένα, ευθύνεται για οξειδώσεις λιπιδίων, σακχάρων, αλκοολών και ειδικότερα σε σουλφυδρικές ομάδες πρωτεϊνών. (Halliwell & Gutteridge, 2015)

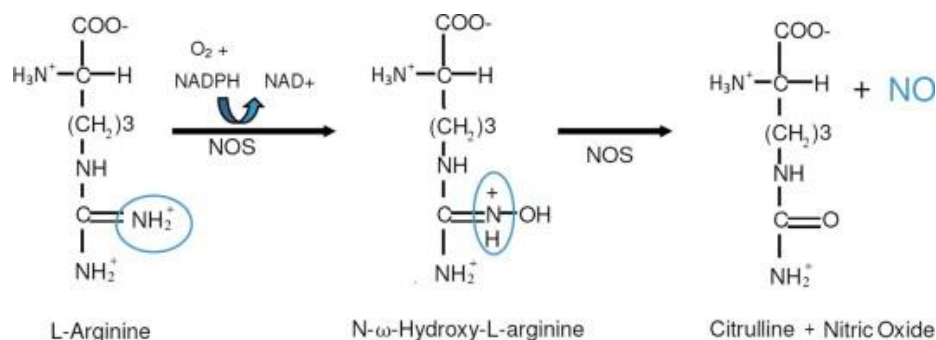
Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Μονοξειδίο του αζώτου NO[•]

Η πρώτη αναφορά στο μονοξειδίο του αζώτου έγινε το 1922 μ.Χ., έτος κατά το οποίο θεωρήθηκε ως το μόριο της χρονιάς.

Παράγεται στους ιστούς από τις συνθάσεις του NO (NOS, nitric oxide synthesis) κατά την παραγωγή L-κιτρουλίνης από L-αργινίνη (Εικόνα 5). Υπάρχουν τρεις

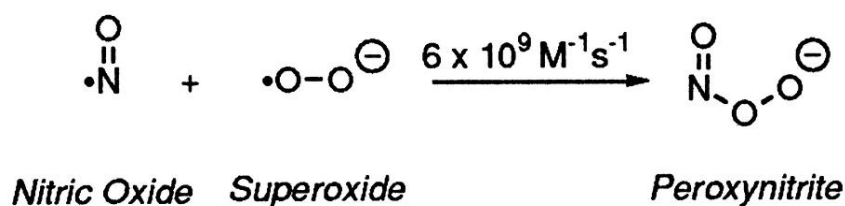
ισομορφές των ενζύμων αυτών, η νευρική NOS (nNOS), η ενδοθηλιακή NOS (eNOS) και η επαγόμενη NOS (iNOS), οι οποίες και οι τρεις συμβάλλουν στην παραγωγή NO.



Εικόνα 5. Η σύνθεση μονοξειδίου το αζώτου ως παραπροϊόν της μετατροπής της Αργινίνης σε Κιτρουλλίνη (Alagem-Shafir et al., 2014)

Υπεροξεινιτρίτης OONO⁻

Ο υπεροξεινιτρίτης είναι μία εξαιρετικά τοξική ελεύθερη ρίζα, τόσο από μόνος του, όσο και τα παράγωγά του, όπως το υπεροξεινιτρικό οξύ, OONO₂H. Προκαλεί εξίσου σημαντικές βλάβες στα βιομόρια των κυττάρων, για παράδειγμα στις πρωτεΐνες, και κυρίως σε κατάλοιπα τυροσίνης, ή στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Συντίθεται από την αντίδραση του σουπεροξειδίου με το μονοξείδιο του αζώτου, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 6. (Phaniendra et al., 2015)



Εικόνα 6. Η σύνθεση του υπεροξεινιτρίτη από μονοξείδιο του αζώτου και σουπεροξείδιο

1.2.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η παραγωγή ROS προκαλείται στους οργανισμούς είτε από ενδογενείς, είτε από εξωγενείς παράγοντες.

Στους ενδογενείς παράγοντες εμπλέκονται οργανίδια όπως μιτοχόνδρια και υπεροξειδοσώματα, ένζυμα σαν την Οξειδάση της Ξανθίνης και διαδικασίες του οργανισμού, όπως η φαγοκυττάρωση και η φλεγμονή.

Στις εξωγενείς αιτίες περιλαμβάνονται οι περιβαλλοντικοί και βιομηχανικοί ρύποι, η ραδιενέργεια, διάφορα φάρμακα και παρασιτοκτόνα και τέλος, ανθυγιεινές συνήθειες των ατόμων, όπως το κάπνισμα. (Cadenas, 2004)

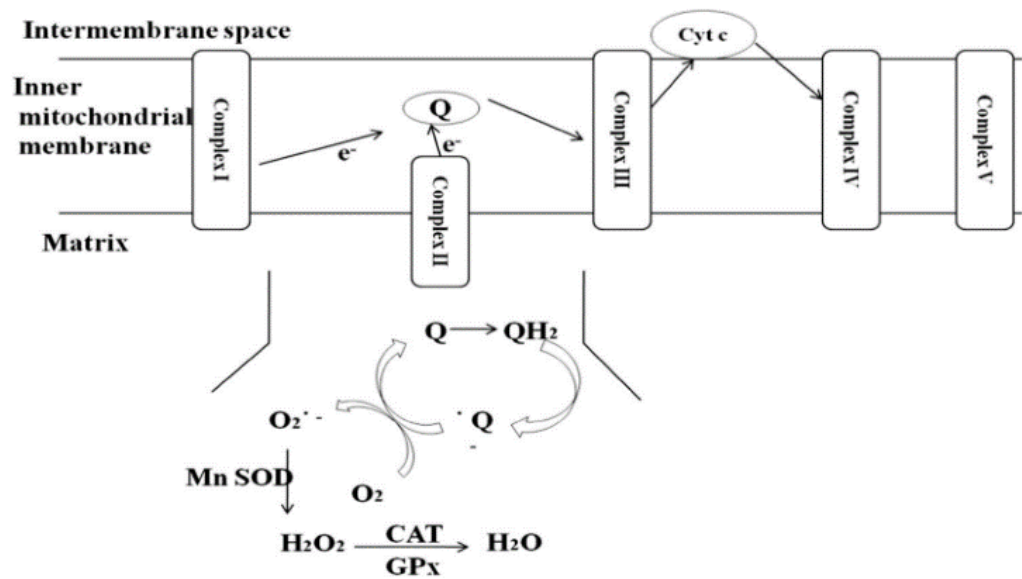
Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια που τροφοδοτούν το κύτταρο με την απαραίτητη ενέργεια για να επιτελέσει όλες τις βασικές του λειτουργίες. Ταυτόχρονα, όμως, αποτελούν και τα πιο σημαντικά υποκυτταρικά οργανίδια για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. (Cadenas, 2004)

Πιο συγκεκριμένα, το σουπεροξειδίο παράγεται από τα σύμπλοκα II και III της αναπνευστικής αλυσίδας με την εξής διαδικασία:

Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τα σύμπλοκα I ή II της αναπνευστικής αλυσίδας προς το συνένζυμο Q (ή την ουβικινόνη) και έτσι, αυτή ανάγεται προς QH₂. Κατά την επαναφορά της φυσιολογικής μορφής της, μέσω του κύκλου Q, δημιουργείται η ασταθής ρίζα Q⁻ (ημικινόνη), η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο, παράγοντας το σουπεροξειδίο, με έναν μη ενζυμικό τρόπο. Παράλληλα, τα μιτοχόνδρια ευθύνονται και για την υψηλή παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Αναλυτικότερα, έχοντας ως υπόστρωμα το σουπεροξειδίο, η μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (MnSOD), συνθέτει H₂O₂.

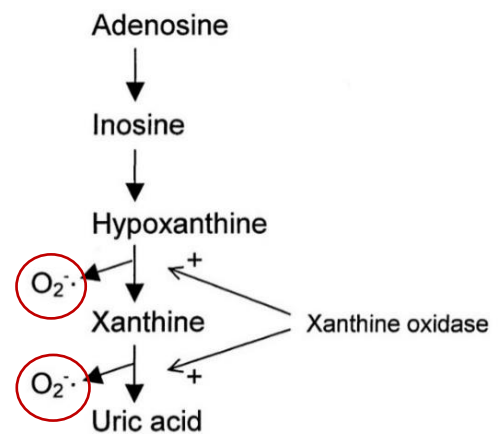
Οι διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών φαίνονται και στην παρακάτω Εικόνα 7. (Phaniendra et al., 2015)



Εικόνα 7. Η δημιουργία ROS μέσω της διαδικασίας της αναπνευστικής αλυσίδας (Phaniendra et al., 2015)

Υπεροξεισώματα και Κυτταρόπλασμα

Στα υπεροξεισώματα, εκτός από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παράγονται και ρίζες όπως το σουπεροξείδιο, η ρίζα υδροξυλίου και η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου. Για την σύνθεση των ελευθέρων ριζών καθοριστικό ρόλο έχουν τόσο διαδικασίες, όπως η ενζυμική β-οξείδωση των λιπαρών οξέων που οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 , όσο και πολλά άλλα ένζυμα των οργανιδίων. Στο κυτταρόπλασμα, η Οξειδάση της Ξανθίνης καταλύει την παραγωγή ουρικού οξέος, έχοντας ως υπόστρωμα την ξανθίνη, κατά τον μεταβολισμό των πουρινών. Ταυτόχρονα, προκαλεί τη σύνθεση ελευθέρων ριζών, όπως το σουπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Εικόνα 8). (Phaniendra et al., 2015)



Εικόνα 8. Η δημιουργία ROS μέσω του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης (Australasian college of sport and exercise physicians)

Φαγοκυττάρωση

Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, ως βασικά στοιχεία της έμφυτης άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος κάθε οργανισμού, στοχεύουν στον περιορισμό και εξαφάνιση κάθε παθογόνου που απειλεί την υγεία. Πολλές φορές, ακόμη, παράγουν ελεύθερες ρίζες για να το πετύχουν αυτό, τόσο ROS, όσο και RNS.

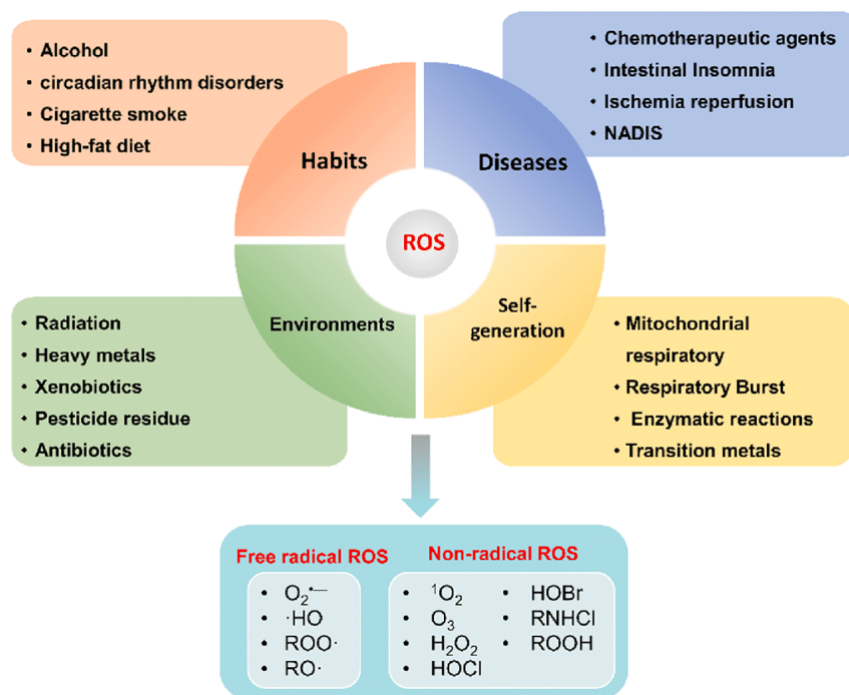
Καθοριστικό ρόλο έχει η παρουσία της Οξειδάσης του NADPH, που υπάρχει φυσιολογικά στα μακροφάγα. Το ένζυμο αυτό, έχοντας ως υπόστρωμα τον αναγωγικό παράγοντα NADPH, ανάγει το μοριακό οξυγόνο προς σουπεροξειδίο, με αποτέλεσμα την καταστροφή των φαγοκυτταρωμένων παθογόνων.

Ταυτόχρονα, τα σουπεροξειδία, αντιδρώντας με τη ρίζα μονοξειδίου του αζώτου, που επίσης υπάρχει άφθονη στα κύτταρα, συνθέτουν ρίζες υπεροξεινιτρίτη, οι οποίες είτε δρουν ως αυτούσιες, λόγω της υψηλής τους δραστηριότητας, είτε αντιδρούν με περεταίρω μόρια (π.χ. διοξείδιο του άνθρακα, CO₂) και παράγουν, εξίσου, δραστικές ενώσεις.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί και συμβολή της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), που λόγω της σύστασής του, μπορεί να διαχέεται, προσεγγίζοντας κάθε παράσιτο. Συνεπώς, είναι κεντρικός ο κυτταροτοξικός του ρόλος για το ανοσοποιητικό σύστημα. (Piacenza et al., 2019)

Εξωγενείς παράγοντες

Όπως γίνεται αντιληπτό και στην Εικόνα 9, υπάρχουν πάρα πολλές εξωτερικές αιτίες οδηγούν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τέτοιες, αφορούν τόσο συνήθειες της καθημερινής ζωής, για παράδειγμα η διατροφή του ανθρώπου ή καταχρήσεις (π.χ. κάπνισμα), όσο και στοιχεία του περιβάλλοντος (π.χ. ακτινοβολία ή βαρέα μέταλλα). Βέβαια, ακόμα πιο έντονο είναι το φαινόμενο σε παθολογικές καταστάσεις ή υπό χορήγηση φαρμακευτικών προϊόντων. (Phaniendra et al., 2015)



Εικόνα 9. Διαγραμματικά οι εξωγενείς παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (Wang et al., 2020)

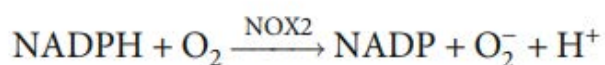
1.2.3 Φυσιολογικές και ωφέλιμες λειτουργίες ελευθέρων ριζών

Παρόλο που ο όρος «ελεύθερες ρίζες» έχει συνδεθεί με τις επιβλαβείς τους επιπτώσεις στους οργανισμούς, πολλές είναι και οι επωφελείς επιπτώσεις τους. Ειδικότερα, η παρουσία τους σε χαμηλά επίπεδα είναι απαραίτητη για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και λειτουργίας. (Ansari et al., 2020)

Φαγοκυττάρωση

Αρχικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα). Ουσιαστικά, τα κύτταρα της έμφυτης άμυνας κατά την φαγοκυττάρωση των παθογόνων, εγκολπώνουν περίσσεια οξυγόνου (Φαινόμενο «Extra respiration of phagocytosis», που περιεγράφηκε στις

αρχές του 20^{ου} αιώνα). Το οξυγόνο αυτό, παρουσία του ενζύμου της Οξειδάσης του NADPH, μετατρέπεται σε σουπεροξειδίο (Εικόνα 10). (Di Meo & Venditti, 2020)

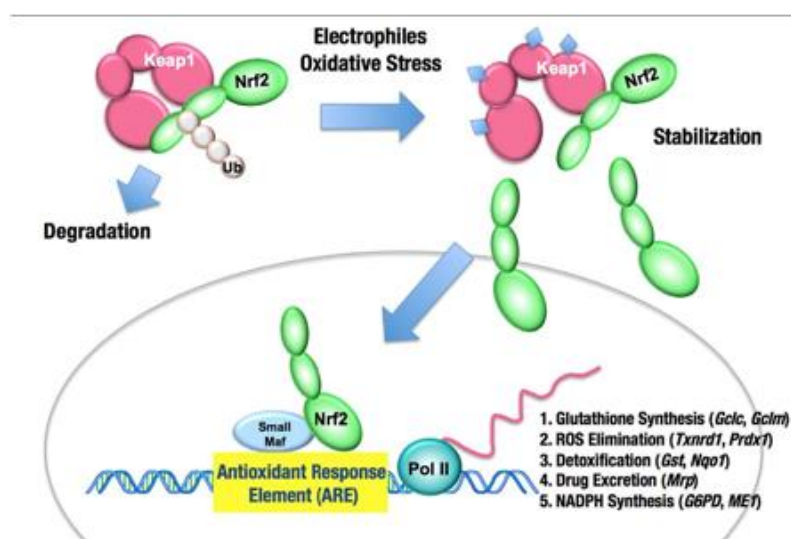


Εικόνα 10. Μετατροπή του οξυγόνου σε σουπεροξειδίο από την οξειδάση του NADPH (Di Meo & Venditti, 2020)

Κυτταρική σηματοδότηση

Σημαντικός είναι ο ρόλος των ελευθέρων ριζών και ως δευτερογενείς διαβιβαστές, κατά την σηματοδότηση εντός και διαμέσου των κυττάρων. Από την δεκαετία του 1970, η ρίζα υδροξυλίου συνδέθηκε άμεσα με την ενεργοποίηση του ενζύμου γουανυλική κυκλάση των κυττάρων, προκαλώντας την παραγωγή του διαβιβαστή cGMP (κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη). Πολύ γρήγορα, ολόένα και περισσότερες ελεύθερες ρίζες συσχετίστηκαν με φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή.

Ταυτόχρονα, αξιοσημείωτος είναι και ο ρόλος τους για την ενεργοποίηση γονιδίων του DNA. Για παράδειγμα, επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων, ρυθμιζόμενα από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Nf-κB. Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν και στη ρύθμιση γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων.



Εικόνα 11. Η αλληλεπίδραση του Nrf2 με το DNA. (Mitsuhishi et al., 2012)

Αναλυτικότερα, η ρύθμιση των γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων γίνεται από την συμβολή των εξής παραγόντων (Εικόνα 11):

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) δημιουργεί σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Keap1 στο κυτταρόπλασμα. Σε φυσιολογικές συνθήκες (απουσία περίσσειας ROS), το σύμπλοκο αυτό είναι ασταθές και πρωτεολύεται. Όμως, παρουσία οξειδωτικού στρες (περίσσεια ελευθέρων ριζών), ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται σε περιοχές του DNA με τα στοιχεία ARE (antioxidant response element) και τις πρωτεΐνες Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma), οδηγώντας στην έκφραση σημαντικών αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων. (Di Meo & Venditti, 2020)

1.2.4 Παθολογικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών σε επίπεδο κυττάρου

Επιδράσεις στα νουκλεϊκά οξέα

Όσο αναφορά το DNA, μεγαλύτερες βλάβες παρατηρούνται στο μιτοχονδριακό DNA, εφόσον βρίσκεται εγγύτερα στο σημείο παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Κύριος τύπος ROS που προσβάλλει τα νουκλεοτίδια είναι η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), που δρώντας τόσο σε πουρίνες, όσο και σε πυριμιδίνες παράγει διαφορετικές ενώσεις, οδηγώντας σε μονόκλωνες ή και δίκλωνες ρήξεις της διπλής έλικας του DNA. Συνεπώς, προωθείται η μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και γήρανση του κυττάρου. Τα ίδια αποτελέσματα φέρει και η δραστική ρίζα του υπεροξεινιτρίτη (RNS) στο γενετικό υλικό, προκαλώντας τη σύνθεση ενώσεων όπως η 8-νίτρο-γουανίνη, που ούσα ασταθής βάση, μπορεί να οδηγήσει σε αβασικές θέσεις του DNA.

Βέβαια, στον άνθρωπο, λόγω της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού αλλά και της προστασίας των πρωτεϊνών, το RNA είναι περισσότερο επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες από ελεύθερες ρίζες. Σε αυτό συντελεί καθοριστικά και ο υποκυτταρικός του εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα, διότι συχνά βρίσκεται σε θέσεις εκτεθειμένες σε υψηλές ποσότητες ROS. (Phaniendra et al., 2015)

Επιδράσεις στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν οξείδωση από την πλειονότητα των ελευθέρων ριζών. Κυρίως, οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών που φέρουν ομάδες θείου (S) στην δομή τους, όπως η μεθειονίνη (Met) και η κυστεΐνη (Cys) είναι πιο ευαίσθητες στην οξείδωση από ROS/RNS. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών δομών των αμινοξέων από τα φυσιολογικά και συνεπώς, επιφέρουν αλλαγές της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, ακόμη και απώλεια στη δραστικότητα ενζύμων. (Lobo et al., 2010) Η αντίδραση των ROS με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών μπορεί να επιφέρει σχάση του πεπτιδικού δεσμού και συνεπώς διάλυση της πρωτεΐνης. (Stadtman, 2001)

Επιδράσεις στα λιπίδια

Η λιπιδική υπεροξείδωση, κυρίως των λιπιδίων της εξωτερικής μεμβρανικής διπλοστοιβάδας των κυττάρων, αποτελεί μία εξαιρετικά βλαπτική διαδικασία που σχετίζεται με την εμφάνιση πολλών παθολογικών καταστάσεων. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών στα φωσφολιπίδια, οδηγεί σε αλλαγή της σύστασης της λιπιδικής μεμβράνης και συνεπώς, σε μεταβολή της διαπεραστικότητας της από άλλα μόρια. Κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση ακολουθεί μία διαδικασία συνεχών αντιδράσεων που καταλήγει στην παραγωγή μαλονδιαλδεϋδης (MDA), βασικός βιοδείκτης εντοπισμού οξειδωτικών βλαβών στα λιπίδια (Phaniendra et al., 2015)

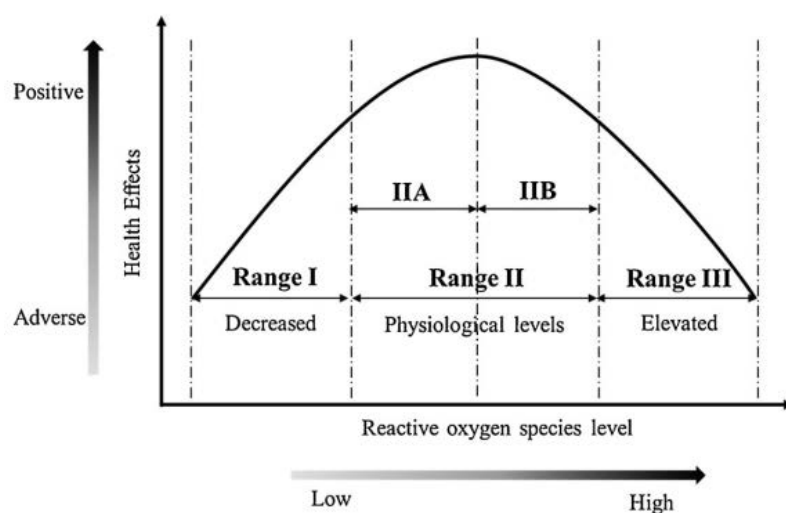
1.3 Το οξειδωτικό στρες

«Κλειδί» για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού και την αποφυγή παθολογικών καταστάσεων αποτελεί η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού.

Όπως φαίνεται και στο κέντρο του παρακάτω διαγράμματος (Εικόνα 12), τα φυσιολογικά επίπεδα ROS μπορούν να είναι ωφέλιμα για τον οργανισμό, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική κυτταρική σηματοδότηση, για

παράδειγμα μέσω πολλών μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων που πραγματοποιούν. (Sies & Jones, 2020)

Ωστόσο, όπως παρατηρείται στο ίδιο διάγραμμα, δεξιά και αριστερά από την κεντρική κορυφή, οι μειωμένες και αυξημένες συγκεντρώσεις ROS οδηγούν σε περιπτώσεις παθολογικές, βλαβερές για το κύτταρο. (Luo et al., 2020)



Εικόνα 12. Διαγραμματική απεικόνιση των επιδράσεων των ελευθέρων ριζών (y'y άξονας) συγκριτικά με το εύρος ποσότητάς τους στον οργανισμό (xx' άξονας) (Luo et al., 2020)

Οξειδωτικό στρες

Αν και ο όρος «οξειδωτικό στρες» είχε αποδοθεί ήδη από τον Helmut Sies το 1985, ως μία δυσανάλογη υπεροχή του προοξειδωτικού φορτίου, συγκριτικά με το αντιοξειδωτικό φορτίο του οργανισμού, μία πιο σύγχρονη και πλήρης ερμηνεία του όρου, σύμφωνα πάλι με τον ίδιο, αποτελεί η εξής (Sies, 2015):

«Οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση και ρύθμιση του κυττάρου»

Η νέα αυτή διατύπωση του όρου υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της παρουσίας ROS στον οργανισμό, για την ομαλή λειτουργία του, και αποτελεί την μετάβαση σε μία πιο σύγχρονη προσέγγιση του αντικειμένου των ελευθέρων ριζών. (Veskoukis et al., 2019)

Το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα της υπερσυσσώρευσης ROS/RNS στον οργανισμό, σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από όσο η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού μπορεί να αντιμετωπίσει. Συνεπώς, προκαλούνται μη αναστρέψιμες βλάβες, καθοριστικές για την επιβίωση των κυττάρων. (Ansari et al., 2020)

1.3.1 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

Αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες έχουν παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με υγιή, γεγονός που εξηγεί την υψηλή μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση που χαρακτηρίζει τις ελεύθερες ρίζες. Πιο συγκεκριμένα, αυτό είναι αποτέλεσμα τροποποιήσεων του γενετικού υλικού από αυτές, προκαλώντας τόσο μετατροπές σε νουκλεοτιδικές βάσεις (π.χ. δημιουργία 8-OH-G), όσο και μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις του DNA. Συνεπώς, ευνοείται η ανάπτυξη διαφόρων μορφών όγκων, που αντανακλούν σε περιπτώσεις καρκίνων.

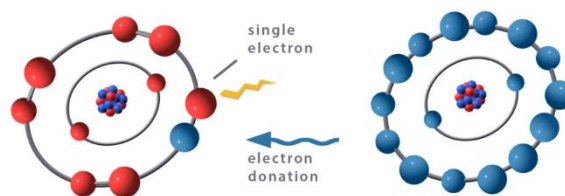
Επίσης, σημαντική είναι η αρνητική επίδραση του οξειδωτικού στρες σε καρδιαγγειακές ασθένειες, στο διαβήτη (Τύπος 1 και 2), στην ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και σε νευρολογικές διαταραχές, όπως το Alzheimer και το Parkinson. (Valko et al., 2007)

1.4 Αντιοξειδωτικά

Σύμφωνα με τους Halliwell και Gutteridge, το 1995, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται:

« Κάθε ουσία, που όταν υπάρχει σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της, εμποδίζει ή αναστέλλει την οξείδωσή του.»

Τα αντιοξειδωτικά διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στον οργανισμό και προστατεύουν τα βιομόρια από τις οξειδωτικές βλάβες, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Η συνεισφορά του αντιοξειδωτικού στην ελεύθερη ρίζα

Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, βάσει της προέλευσής τους, στα ενδογενή και τα εξωγενή αντιοξειδωτικά. (Gulcin, 2020)

1.4.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ενζυμικά και μη-ενζυμικά:

Συνοπτικά παρουσιάζονται στον επόμενο Πίνακα 3:

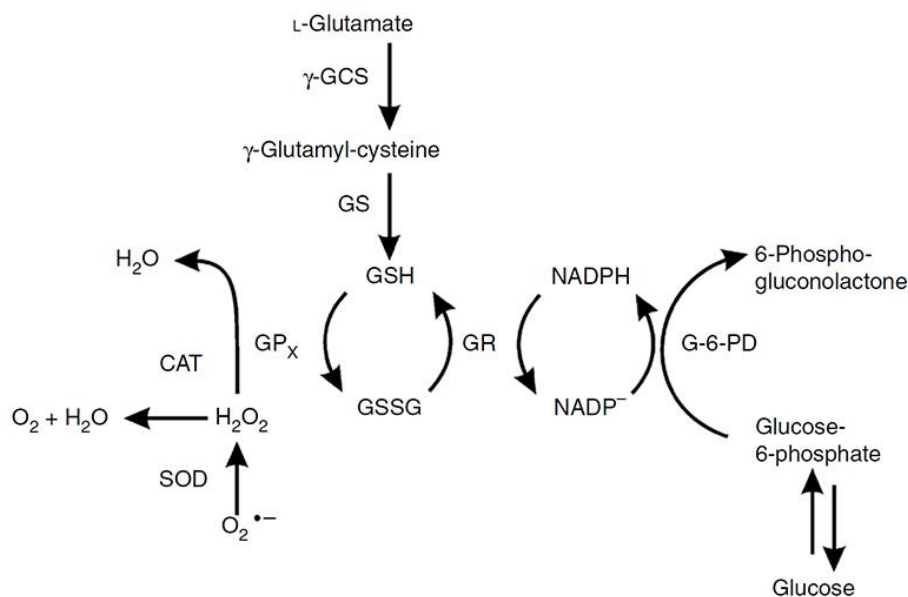
Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή των ενζυμικών και μη ενζυμικών ενδογενών αντιοξειδωτικών του οργανισμού

Ενζυμικά	Μη ενζυμικά
Καταλάση (Catalase, CAT)	Γλουταθειόνη
Υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD)	
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx)	
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GRx)	

Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού αποτελούν η Καταλάση (Catalase, CAT), η Υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx) και η Αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GRx).

Η σχέση των ενζύμων αυτών περιγράφεται στην Εικόνα 14 και είναι η εξής:



Εικόνα 14. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης και αλληλεπίδρασης των βασικών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Weydert & Cullen, 2010)

Η **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)** ανάγει το σουπεροξειδίο ($O_2^{\bullet-}$) προς υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).

Αυτό με τη σειρά του είτε ανάγεται από τη **Καταλάση (CAT)**, παράγοντας οξυγόνο και νερό, είτε χρησιμοποιείται για την οξείδωση της γλουταθειόνης από την **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**, δίνοντας ως παραπροϊόν, επίσης, νερό.

Ακολουθεί αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης από την **Αναγωγάση της Γλουταθειόνης (GRx)**, το οποίο ένζυμο χρησιμοποιεί ως αναγωγικό μέσο το NADPH, που προκύπτει από τη μεταβολική διαδικασία της γλυκόλυσης.

Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Γλουταθειόνη

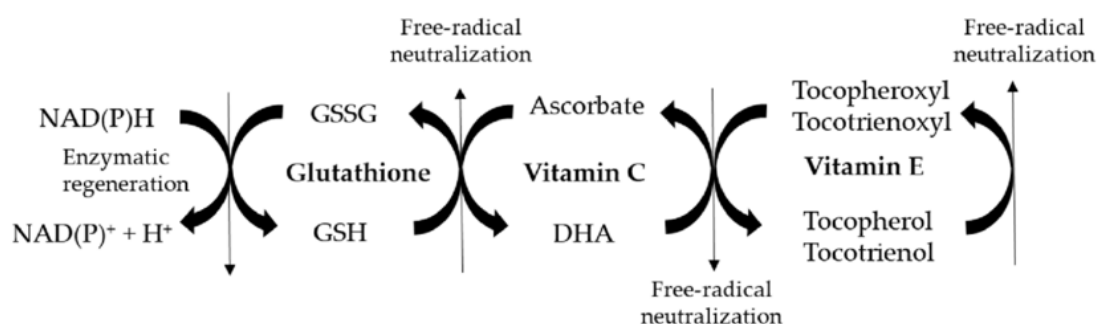
Η γλουταθειόνη έχει τον πιο κεντρικό ρόλο στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του οργανισμού, αποτελώντας ένα τριπεπτίδιο των αμινοξέων Γλυκίνη, Κυστεΐνη και Γλουταμικό οξύ, κατά σειρά. Συντίθεται από τα ίδια τα κύτταρα και η αντιοξειδωτική της ικανότητα στηρίζεται στη θειολική ομάδα του καταλοίπου της

κυστεΐνης. Βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (GSH), στην οποία είναι και δραστική.

1.4.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι ουσίες τις οποίες δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του ο οργανισμός, όμως εισέρχονται στο σώμα μέσω της διατροφής, όπως οι Βιταμίνες (π.χ. Βιταμίνη C και Βιταμίνη E), τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες.

Το **Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)** αποτελεί μία υδατο-διαλυτή βιταμίνη με αναγωγικό χαρακτήρα. Συνεργάζεται με τη γλουταθειόνη, ώστε να διατηρεί την ανηγμένη της μορφή ενώ ταυτόχρονα, αναγεννά την ανηγμένη μορφή της λιποδιαλυτής **Βιταμίνης E (α-τοκοφερόλη)** (Gulcin, 2020). Η σχέση τους περιγράφεται στην παρακάτω Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Διαγραμματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των εξωγενών αντιοξειδωτικών του οργανισμού (Pangrazzi et al., 2020)

Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά, όπως στα φρούτα (σταφύλια, ρόδια, πορτοκάλια), στα λουλούδια, στα βότανα ή στα μπαχαρικά, για να τα προστατεύουν από ανεπιθύμητες καταστάσεις. Έχουν αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, προλαμβάνουν πολλές ασθένειες και συμπεριλαμβάνουν ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή (π.χ. κερκετίνη), τα τερπένια, οι τοκοφερόλες και άλλες οργανικές ενώσεις. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι οι φαινολικοί δακτύλιοι (που έχουν ως βάση τους την φαινυλαλάνη), οι οποίοι μπορεί να συνδέονται με υδροξυλικές ομάδες, αμίνες ή και άλλα οργανικά οξέα. (Pandey & Rizvi, 2009)

Από τη μία πλευρά, η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να ουδετεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, ενώ ταυτόχρονα αυξορρυθμίζουν την έκφραση αντιοξειδωτικών έναντι προ-οξειδωτικών γονιδίων. Από την άλλη, ως αντιφλεγμονώδη, καταστέλλουν την έκφραση φλεγμονωδών ουσιών, όπως ο παράγοντας NF-κΒ.

1.5 Αρθρίτιδα

Η έννοια της αρθρίτιδας έχει αρχαιοελληνικές ρίζες, από τη λέξη «άρθρον» που είναι η άρθρωση, και χρησιμοποιείται για να περιγράψει καταστάσεις φλεγμονής, πόνου και καταστροφής της δομής της άρθρωσης. Υπάρχουν πάνω από εκατό διαφορετικοί τύποι της, είτε φλεγμονώδεις, είτε όχι, όπως η Οστεοαρθρίτιδα, η Ρευματοειδής αρθρίτιδα ή η Ψωριασική αρθρίτιδα. Στην Οστεοαρθρίτιδα, συγκεκριμένα, πρώτος αναφέρθηκε το 1886 ο Dr. John K. Spencer, ενώ τα συμπτώματά της καταγράφονται από την αρχαιότητα. (Senthelal et al., 2024)

1.5.1 Η νόσος της Οστεοαρθρίτιδας (Osteoarthritis)

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ερευνητική Κοινότητα της Οστεοαρθρίτιδας, η νόσος αυτή ορίζεται ως:

«Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία διαταραχή που σχετίζεται με την κίνηση των αρθρώσεων, χαρακτηρίζεται από κυτταρικό στρες και αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας, ξεκινώντας από μικρούς ή και μεγαλύτερους τραυματισμούς που ενεργοποιούν δυσπροσάρμοστες αντιδράσεις επιδιόρθωσης, όπως τα προ-φλεγμονώδη μονοπάτια της έμφυτης ανοσίας. Η νόσος εμφανίζεται αρχικά ως μοριακή διαταραχή (μη φυσιολογικός μεταβολισμός στους ιστούς της άρθρωσης) και ακολουθούν ανατομικές αλλαγές και διαταραχές στη φυσιολογία της άρθρωσης (για παράδειγμα η αποδόμηση του χόνδρου, η αναδόμηση των οστών, η δημιουργία του οστεόφυτου, η φλεγμονή της άρθρωσης και η απώλεια φυσιολογικής της λειτουργίας), που οδηγούν σε ασθένεια.» (Osteoarthritis Research Society International, OARSI)

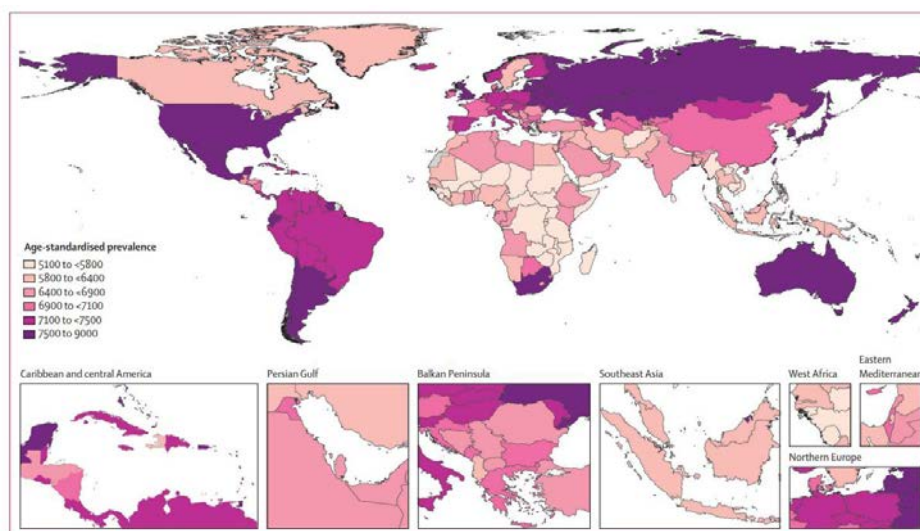
Αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τύπο αρθρίτιδας και αφορά κυρίως την άρθρωση του γονάτου αλλά εμφανίζεται σχεδόν σε όλες, όπως στα χέρια ή στο ισχίο. (Katz et al., 2021) Το 2015, μάλιστα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρθηκε στην οστεοαρθρίτιδα ως την κύρια αιτία δυσκινησίας σε ενήλικες από 65 ετών και άνω. (WHO).

1.5.2 Επιδημιολογία νόσου

Μετά από πρόσφατες έρευνες του 2020, εκτιμήθηκαν περίπου 595 εκατομμύρια ασθενείς με ενεργή νόσο οστεοαρθρίτιδας, αριθμός που αντιστοιχεί σε ποσοστό 7,6% παγκοσμίως. Ωστόσο, υπολογίζεται πως έως το 2050 τα περιστατικά της νόσου θα αυξηθούν κατά περίπου 74-78% για τύπους της ασθένειας όπως το γόνατο και το ισχίο.

Στην Εικόνα 16, βρίσκεται ο χάρτης με την κατανομή των ασθενών ανά χώρα, με διαφορετικές εντάσεις χρωματισμού αναλογικά του αριθμού. Τα δεδομένα αφορούν άτομα και των δύο φύλων, τη χρονολογία 2020 και τα αποτελέσματα έχουν αναχθεί στα 100.000 άτομα ανά περιοχή.

Παρατηρούμε, λοιπόν, πως στη Βόρεια και Νότια Λατινική Αμερική υπάρχουν 7.500-9.000 περιστατικά ανά 100.000 άτομα, ενώ στην Ευρώπη τα ποσοστά είναι ελάχιστα μικρότερα, με έως 7.500 ασθενείς ανά 100.000 άτομα πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, στην Ελλάδα κυμαίνονται από 6.900 έως 7.100 ασθενείς της νόσου ανά 100.00, αριθμός που αντιστοιχεί σε ποσοστό 7.1%.

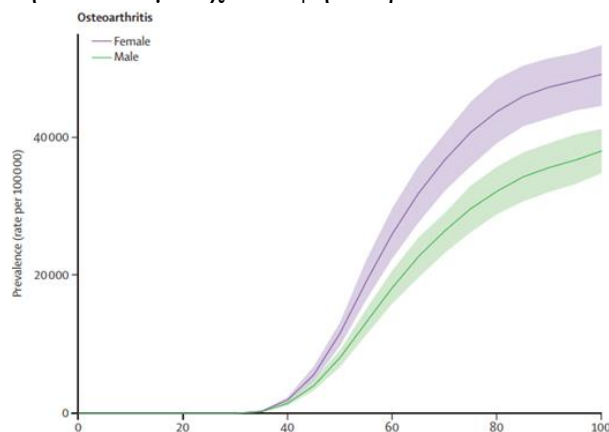


Εικόνα 16. Περιστατικά της ασθένειας ανά χώρα το έτος 2020 (Steinmetz et al., 2023)

Σύμφωνα με δεδομένα του ερευνητικού προγράμματος *Global Burden of Disease Study (GBD)* για το 2020, είναι ξεκάθαρο πως η οστεοαρθρίτιδα που πλήττει την άρθρωση του γονάτου, κυριαρχεί παγκοσμίως. Ακολουθεί η επιρροή των αρθρώσεων του χεριού και του ισχίου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, πως εκτιμάται πως

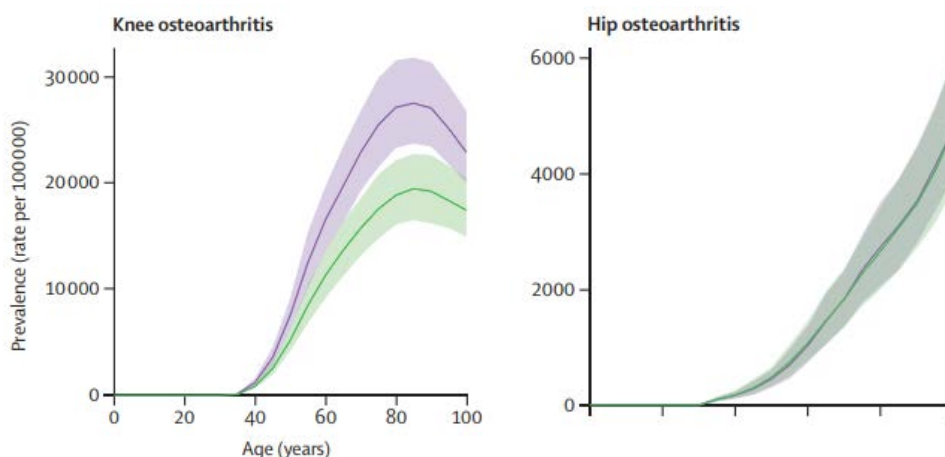
έως το 2050 η οστεοαρθρίτιδα του γονάτου θα αυξηθεί σε συχνότητα κατά περίπου 75%, ενώ η οστεοαρθρίτιδα ισχίου κατά περίπου 79%.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν στατιστικές μελέτες της κατανομής της νόσου στα δύο φύλα. Υποστηρίζεται πως τα θηλυκά άτομα έχουν υψηλότερα ποσοστά και εμφάνισης, αλλά και σοβαρής συμπτωματολογίας της νόσου. Ωστόσο, αυτό ίσως διαφέρει από τύπο σε τύπο οστεοαρθρίτιδας, βάσει δηλαδή, της άρθρωσης που πλήττεται. Στο διάγραμμα (Εικόνα 17) παρατηρείται με μοβ χρώμα η καμπύλη που αφορά την οστεοαρθρίτιδα στα θηλυκά άτομα. Είναι φανερό η μεγαλύτερη κλίση της συγκριτικά με τα αρσενικά άτομα (πράσινη καμπύλη).



Εικόνα 17. Διάγραμμα απεικόνισης της αριθμητικής διαφοράς ασθενών οστεοαρθρίτιδας ανάμεσα στα δύο φύλα (Steinmetz et al., 2023)

Ωστόσο, αυτό διαφέρει όταν πρόκειται για διαχωρισμό των τύπων άρθρωσης που προσβάλλει η νόσος (Εικόνα 18):



Εικόνα 18. Διάγραμμα απεικόνισης της αριθμητικής διαφοράς ασθενών ανάμεσα στα δύο φύλα, συγκεκριμένα στην οστεοαρθρίτιδα γονάτου και ισχίου (Steinmetz et al., 2023)

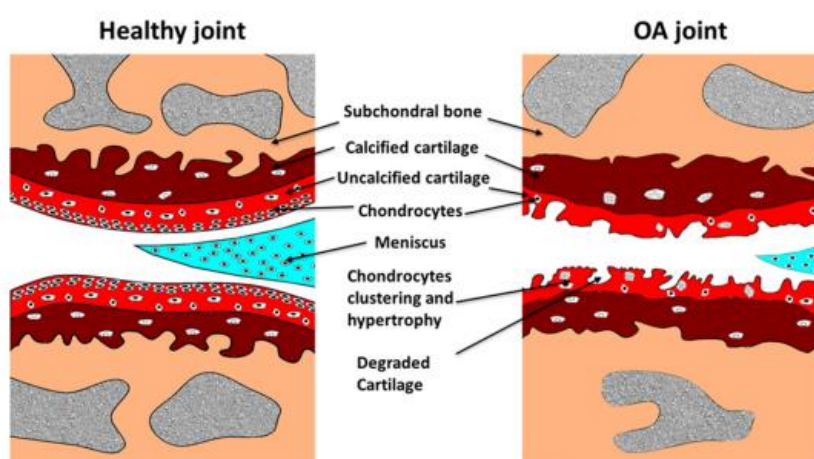
Πιο συγκεκριμένα, ενώ η άρθρωση του γονάτου φαίνεται να συνεχίζει να προσβάλλεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους θηλυκούς ασθενείς, δεν ισχύει το ίδιο για

την άρθρωση του ισχίου, αφού οι δύο καμπύλες φαίνονται να ταυτίζονται. (Steinmetz et al., 2023) Γενικότερα, η νόσος εμφανίζεται και εξελίσσεται γρηγορότερα σε αρθρώσεις που καταπονούνται από το βάρος του σώματος, όπως αποτελεί το γόνατο κατά τη στάση και τη βάρδιση. (Cucchiari et al., 2016)

Επίσης, η διαφοροποίηση αυτή ανάμεσα στα δύο φύλα, υποστηρίζεται ότι σχετίζεται άμεσα με την εμμηνόπαυση των γυναικών, που επιφέρει πολλές ορμονικές μεταβολές στο σώμα τους. Αναλυτικότερα, η μείωση των φυλετικών ορμονών, όπως οιστρογόνων, κατά την περίοδο αυτή καθώς και καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, λόγω του γήρατος, επηρεάζουν και επιδεινώνουν την υγεία των οστών. (Karachalios et al., 2021)

1.5.3 Παθοφυσιολογία της νόσου

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία μη αναστρέψιμη νόσος που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας της παθολογικής άρθρωσης. Αφορά το σύνολο των ιστών της άρθρωσης (whole-joint disease) και κύρια χαρακτηριστικά της αποτελούν η απώλεια του αρθρικού χόνδρου, η σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού και η δημιουργία οστεοφύτων (Εικόνα 19). (Pereira et al., 2014) Πιο συγκεκριμένα, προσβάλλει διαρθρώσεις, δηλαδή τύπους αρθρώσεων που συνδέουν δύο ή περισσότερα οστά.

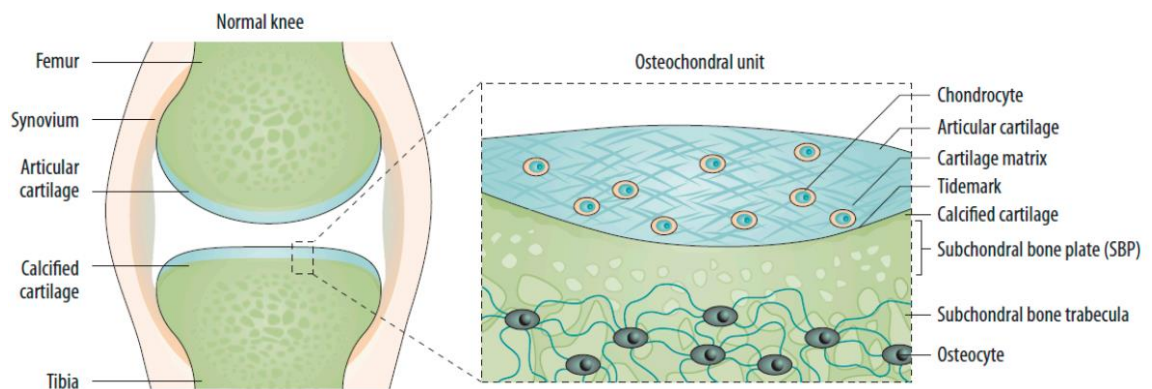


Εικόνα 19. Απεικόνιση της άρθρωσης, αριστερά βρίσκεται η υγιής άρθρωση ενώ δεξιά η παθογενής άρθρωση (Ansari et al., 2020)

Υποχόνδριο οστό

Το υποχόνδριο οστό αποτελεί το οστό που βρίσκεται ακριβώς κάτω από το χόνδρο της άρθρωσης. Ανατομικά χωρίζεται σε δύο οστά, στο υποχόνδριο συμπαγές οστό (Subchondral Bone Plate), που είναι το εξωτερικό τμήμα του οστού και έχει σκληρότερη υφή προσφέροντας αντοχή, και στο υποχόνδριο σπογγώδες οστό (Subchondral Trabecular Bone), που έχει πορώδης φύση. Ο ρόλος του είναι καθοριστικός, αποτελώντας πηγή θρεπτικών ουσιών και στήριξης για ολόκληρη την άρθρωση. Συνεπώς, η παραμικρή αλλαγή στη φυσιολογία του επηρεάζει το σύνολό της.

Στην παρακάτω Εικόνα 20 περιγράφεται η ανατομία της άρθρωσης:



Εικόνα 20. Η ανατομία της άρθρωσης με μεγέθυνση στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους την αποτελούν (Coaccioli et al., 2022)

Σε αρχικά στάδια της νόσου, αναφέρονται Οστικές Βλάβες του Μυελού του υποχόνδριου οστού (Subchondral Bone Marrow Lesions, BMLs). Οι βλάβες αυτές σχετίζονται με τον πόνο που προκαλεί η νόσος και ενεργοποιούν μονοπάτια φλεγμονής στο σημείο. Έτσι, προκαλείται σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού και αύξηση χημικών στοιχείων, όπως το ασβέστιο. (Coaccioli et al., 2022)

Υμένας

Η υμενίτιδα, μία κατάσταση χαμηλού επιπέδου φλεγμονής του υμενικού ιστού, φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη νόσο της οστεοαρθρίτιδας. Λόγω της αύξησης προ-φλεγμονωδών διαβιβαστών, όπως κυτοκινών (IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor TNF- α) ή ROS, που παράγονται από το σύνολο των κυττάρων της άρθρωσης, αναστέλλονται

οι αναβολικές κυτταρικές διαδικασίες, και παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, ο χόνδρος υπόκειται σε βλάβη και μπορεί ακόμη και να καταστραφεί πλήρως.

Η βλάβες που προκαλούνται στο χόνδρινο ιστό και η απόπτωση των χονδροκυττάρων ενεργοποιούν και την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία του οργανισμού, οδηγώντας σε ακόμη πιο έντονη φλεγμονή, μέσω διέγερσης μεμβρανικών υποδοχέων, όπως για παράδειγμα οι Toll-like receptors ή η ενεργοποίηση T και B λεμφοκυττάρων.

Η έντονη, λοιπόν, «επικοινωνία» μεταξύ ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος, είναι η αιτία πρόκλησης του χρόνιου πόνου των ασθενών. (Coaccioli et al., 2022)

Χόνδρος

Ο χόνδρος, αποτελεί τον ιστό που βλάπτεται περισσότερο κατά την εξέλιξη της νόσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λεπύτωση και ευαισθησία του, καθιστώντας τον εύθραυστο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται narrow-joint space (JSN) και η εξέλιξή του οδηγεί σε πλήρη αποικοδόμηση του χόνδρινου συνδετικού ιστού, αφήνοντας, έτσι, απροστάτευτο το υποχόνδριο οστό. (Das & Farooqi, 2008)

Οστεόφυτα

Τα οστεόφυτα είναι νεοσυντιθεμένα τμήματα οστού, που αναπτύσσονται στην περιοχή της παθολογικής άρθρωσης, ως απόκριση της διαταραγμένης ομοιόστασης των ιστών της, και επιχειρούν να αποκαταστήσουν την σταθερότητά της. Ωστόσο, προκαλούν μη φυσιολογικές μηχανικές δυνάμεις, επιφέροντας δυσλειτουργία. Σχετίζονται άρρηκτα και με τη φλεγμονή, αφού στη σύστασή τους περιέχονται ανοσοποιητικά κύτταρα. (Coaccioli et al., 2022)

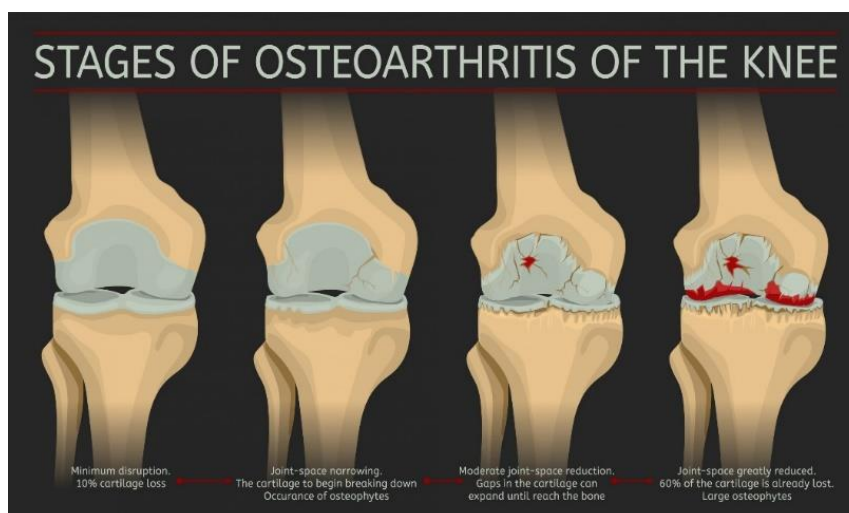
Ως συμπτώματα, λοιπόν, των προαναφερθεισών δυσλειτουργιών, αναφέρονται καταστάσεις έντονου πόνου, δυσκαμψίας και ευαισθησίας της άρθρωσης, που τελικά μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και απώλεια της κίνησης ή και θάνατο του ασθενή, σε πολύ προχωρημένο στάδιο. Άλλωστε η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή ασθένεια που επιφέρει δυσκινησία και έως το 2030 υπολογίζεται το ποσοστό των ασθενών να υπερδιπλασιαστεί. (He et al., 2020)

1.5.4 Τα στάδια της νόσου

Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, η νόσος έχει πέντε διακριτά στάδια:

1. **Στάδιο 0 (Φυσιολογικό - Μη παθολογικό):** Δεν υπάρχουν ενδείξεις της νόσου.
2. **Στάδιο 1 (Ελάσσων στάδιο, minor stage):** Ο ασθενής υφίστανται μικρή απώλεια του χόνδρινου ιστού και δεν έχουν δημιουργηθεί οστεόφυτα. Λόγω της ελάχιστης φθοράς, δεν βιώνει πόνο ή δυσκολία στην κίνηση της άρθρωσης.
3. **Στάδιο 2 (Ηπιο στάδιο, mild stage):** Ο χόνδρος συνεχίζει να βρίσκεται σε υγιής κατάσταση, ωστόσο η δημιουργία οστεόφυτων αυξάνεται. Συνεπώς, η άρθρωση είναι λειτουργική, με τα πρώτα, όμως, συμπτώματα πόνου και δυσκινησίας να εμφανίζονται μετά από κόπωση ή καθιστική ζωή, αντίστοιχα.
4. **Στάδιο 3 (Μέσο στάδιο, moderate stage):** Η καταστροφή χόνδρου είναι πλέον εμφανής και το μεσοδιάστημα ανάμεσα στα δύο οστά της άρθρωσης αρχίζει να στενεύει. Τα προηγούμενα συμπτώματα εξακολουθούν να υπάρχουν πιο έντονα, ενώ παρατηρείται και οίδημα στην περιοχή.
5. **Στάδιο 4 (Προχωρημένο στάδιο, Severe stage):** Κατά το τελευταίο στάδιο τα συμπτώματα του πόνου και της δυσκινησίας είναι στο μέγιστο. Ο χώρος ανάμεσα στα δύο οστά είναι ελάχιστος και η άρθρωση έχει χάσει πλήρως τη λειτουργία της. (Healthline)

Πιο συνοπτικά τα στάδιά της απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 21):



Εικόνα 21. Τα τέσσερα διαφορετικά στάδια της Οστεοαρθρίτιδας, με κόκκινο τονίζεται η φθορά του χόνδρινου ιστού της άρθρωσης (PRP CLININ OSSM)

1.5.5 Αίτια της νόσου

Τα αίτια της νόσου δεν είναι πλήρως ξεκάθαρα, όμως συνδυασμός γενετικών και μη αλλαγών οδηγούν σε αυτή. (Cucchiari et al., 2016) Ακόμη και η διαφορετική ηλικία, άλλοι τρόποι ζωής και καθημερινότητες μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές μορφές και στάδια της ίδιας ασθένειας. Στον επόμενο Πίνακα 4, παρουσιάζονται οι παράγοντες που ανήκουν στη κάθε κατηγορία. Πιο συγκεκριμένα, καθοριστικό ρόλο έχει το πέρας της ηλικίας και το γήρας, ενώ σημαντικός παράγοντας είναι και το φύλο, αφού οι γυναίκες έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζουν πιο έντονα συμπτώματα. Σε νεότερους, από την άλλη, ενήλικες η νόσος, συνήθως, προκαλείται από κάποιο τραυματισμό της άρθρωσης (μετά-τραυματική οστεοαρθρίτιδα). Επίσης, πολύ ισχυρή συσχέτιση υπάρχει και με την παχυσαρκία, αφού έχει αποδειχτεί πως τα παχύσαρκα άτομα έχουν υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης και επιδείνωσης της νόσου. (Das & Farooqi, 2008)

Πίνακας 4. Παράγοντες που οδηγούν σε οστεοαρθρίτιδα

Μη-γενετικοί παράγοντες	Γενετικοί παράγοντες
Ηλικία	Διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού
Φύλο	
Παχυσαρκία	
Τραυματισμός της άρθρωσης	
Καθιστική ζωή	

Παρακάτω αναλύονται περισσότερο δύο από τις βασικότερες αιτίες της:

Γήρας

Το γήρας, μία φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει με το χρόνο σε κάθε κύτταρο και, συνεπώς, οργανισμό, συσχετίζεται άμεσα με χρόνια, χαμηλής έντασης φλεγμονή, οδηγώντας σε μία κατάσταση που περιγράφεται με τον όρο «Inflammaging» (inflammation & aging). Αίτια αυτού είναι φυσιολογικές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά το γήρας, όπως η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, επιγενετικές αλλαγές στο γενετικό υλικό ή αλλαγές στη διακυτταρική επικοινωνία, και, κυρίως, η απόπτωση των κυττάρων. Η κατάσταση αυτή υποστηρίζεται ότι μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη της νόσου. Βέβαια, η άμεση συσχέτιση της οστεοαρθρίτιδας με ένα παράγοντα πρόκλησης του γήρατος είναι εξαιρετικά δύσκολη, αφού το δεύτερο σχετίζεται με

πολλαπλούς κυτταρικούς διαβιβαστές, που διαφέρουν ανάλογα το στάδιο της γήρανσης.

Πιο συγκεκριμένα, τα χονδροκύτταρα, ως τα κύρια κύτταρα που αποτελούν το συνδετικό ιστό του χόνδρου στην άρθρωση, έχουν μελετηθεί ενδελεχώς. Είναι τα πιο επιρρεπή στη συσσώρευση κυτταρικών βλαβών (για παράδειγμα βλάβες στο DNA που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση) κατά την ολοκλήρωση του κυτταρικού τους κύκλου. (Loeser et al., 2016)

Παχυσαρκία

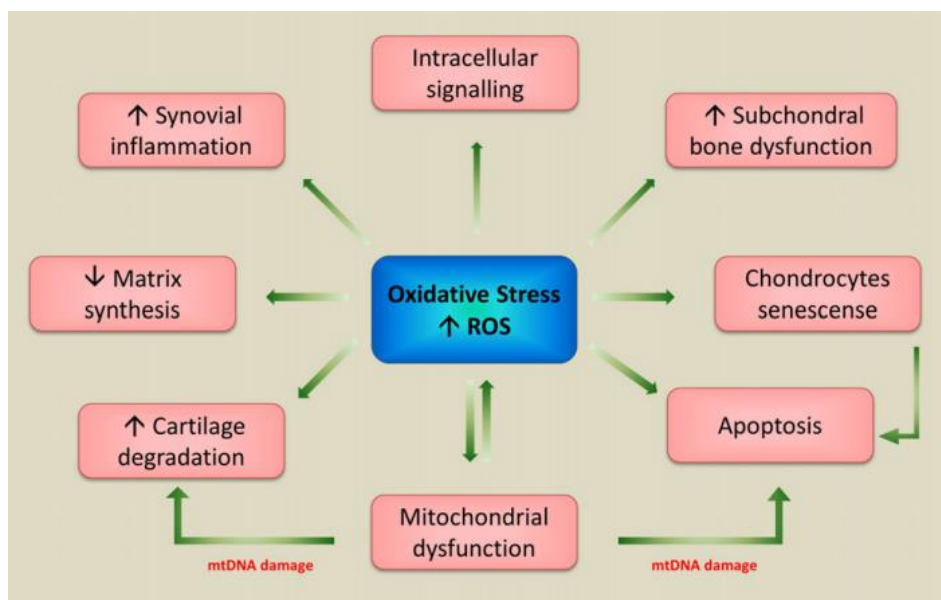
Η παχυσαρκία, αλλά ακόμη και η φυσιολογική αύξηση του λίπους στο σώμα λόγω πέρατος της ηλικίας, αποτελούν καταστάσεις κατά τις οποίες αυξάνεται ο αριθμός των λιποκυττάρων και των προ-φλεγμονωδών μακροφάγων στο σώμα, ενώ η μυϊκή μάζα εξασθενεί. Αυτή, λοιπόν, η αύξηση των κυττάρων του λιπώδους ιστού και των φλεγμονωδών κυτοκινών, αλλά και η αδυναμία των μυών μπορεί να οδηγήσει σε μία ασταθής άρθρωση, επικίνδυνη για την φυσιολογική της λειτουργία, ειδικά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, και συνεπώς σε εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας. (Loeser et al., 2016)

1.5.6 Συσχέτιση οξειδωτικού στρες και οστεοαρθρίτιδας

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο που εμφανίζει διάφορα στάδια εξέλιξης της ασθένειας και οι αιτίες της έγκειται είτε σε μοριακό επίπεδο, είτε σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Από τα τέλη περίπου του 20^{ου} αιώνα, η ενδελεχής μελέτη των ελευθέρων ριζών και η συσχέτισή τους με την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών, οδήγησε στη σύνδεση του οξειδωτικού στρες με νόσους των αρθρώσεων, όπως η οστεοαρθρίτιδα. Τα επόμενα χρόνια (αρχές του 21^{ου} αιώνα) ακολούθησαν περεταίρω μελέτες βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες, αποδεικνύοντας πως όχι μόνο σχετίζεται με την παθογένεια της νόσου, και ειδικότερα με την καταστροφή του αρθρικού χόνδρου, αλλά ακόμη και κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι συμβάλλει καθοριστικά στην εξέλιξη και την σοβαρότητά της. (Gu et al., 2023)

Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη παραγωγή ROS και, συνεπώς, η ύπαρξη οξειδωτικού στρες σχετίζεται άμεσα με σημαντικές αρνητικές συνέπειες στο σύνολο των ιστών της άρθρωσης, ενισχύοντας την νόσο της οστεοαρθρίτιδας. Παρακάτω, στην Εικόνα 22, αναφέρονται πιο συγκεκριμένα οι επιπτώσεις του, οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια. (Lepetsos & Papavassiliou, 2016)



Εικόνα 22. Συνοπτικά οι επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στους διάφορους ιστούς της άρθρωσης (Lepetsos & Papavassiliou, 2016)

1.5.6.1 Οξειδωτικό στρες και αρθρικός χόνδρος

Τα κύτταρα του χόνδρου (χονδροκύτταρα) έχουν αδρανή χαρακτήρα και δεν αυτό-ανανεώνονται συχνά. Σε φυσιολογικές συνθήκες στην άρθρωση, αναπτύσσονται σε περιβάλλον με ελάχιστο οξυγόνο, που υπάρχει, κατά βάση, στις επιφανειακές στρώσεις κυττάρων. Το οξυγόνο που ρέει σε αυτά τα κύτταρα, λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγώντας στην παραγωγή ROS. Έχει αποδειχθεί ότι άτομα που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα έχουν αυξημένα επίπεδα ROS και οξειδωτικού στρες, με την Οξειδάση του NADPH να είναι το κύριο ένζυμο που ευθύνεται για την παραγωγή τους. (Lepetsos & Papavassiliou, 2016)

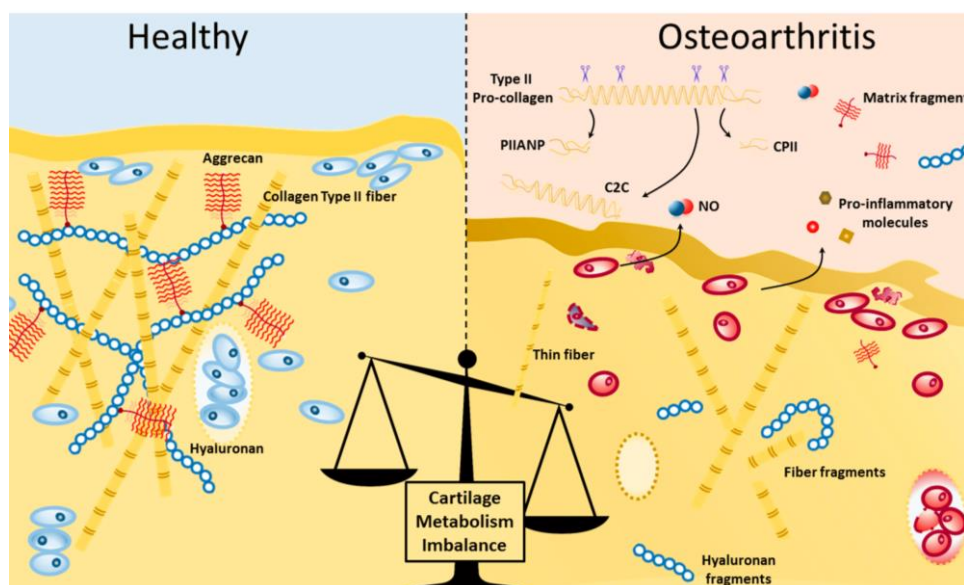
Παθολογική κατάσταση άρθρωσης

Σε καταστάσεις ασθένειας, σημαντικό ρόλο έχει το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Συντίθεται από την ισομορφή iNOS της συνθάσης του NO (επαγόμενη), κυρίως

στα σημεία του χόνδρου που φέρουν περισσότερο οξυγόνο, και προκαλεί την αυξορρύθμιση της έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων στο χόνδρο (π.χ. IL-1 β , TNF- α , LPS). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων όπως, ο παράγοντας NF- κ B, που ενισχύει ακόμη περισσότερο τη φλεγμονή στο σημείο, διεγείροντας αντίστοιχα μοριακά μονοπάτια (π.χ. το μονοπάτι MEK-ERK). (Lepetsos & Papavassiliou, 2016)

Εκτός της φλεγμονής, χαρακτηριστικό των χονδροκυττάρων με υψηλό οξειδωτικό στρες είναι η αυξημένη απόπτωση. Τόσο τα κατάλοιπα 3-νιτροτυροσίνης, όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) που παράγεται, ρυθμίζουν αποπτωτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι PI3K/Akt. Ακόμη, το NO, διεγείρει κινάσες, τις κασπάσες, ή οι παράγοντες Bcl-2 και Bax, που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. (Lepetsos & Papavassiliou, 2016)

Τέλος, άρρηκτα συνδεδεμένα είναι το οξειδωτικό στρες και η γήρανση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η εξωκυττάρια μήτρα των χονδροκυττάρων αποτελείται, κυρίως, από πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο τύπου II. Η συσσώρευση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products, AGEs), λόγω γήρατος και οξειδωτικού στρες, αλλά και τα ίδια τα ROS, αναστέλλουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια σύνθεσης των μορίων της εξωκυττάρια μήτρας (Εικόνα 23), ενώ ταυτόχρονα διεγείρουν μονοπάτια κατασταλτικά για την σύνθεση αυτών. Ως αποτέλεσμα, μειώνονται οι πρωτεογλυκάνες και το κολλαγόνο στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM).



Εικόνα 23. Αριστερά απεικονίζεται οι δομές πρωτεϊνών στην υγιή άρθρωση, ενώ δεξιά η αποδιοργάνωσή τους, λόγω της παρουσίας πρωτεολυτικών ενζύμων στην εξωκυττάρια μήτρα. (Barreto et al., 2020)

Ειδικότερα, ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου, δεσμεύουν τα μόρια κολλαγόνου, εμποδίζοντας τη δημιουργία των ινιδίων του, που είναι η λειτουργική του μορφή του στην άρθρωση. Ταυτόχρονα, η διαταραχή στην εξωκυττάρια μήτρα της άρθρωσης ενισχύεται και από την αυξορρυθμισμένη έκφραση μεταλλοπρωτεασών (π.χ. της οικογένειας ADAMs, ή MMPs), οι οποίες αποικοδομούν τον αρθρικό χόνδρο. (Lepetsos & Papavassiliou, 2016; Loeser et al., 2016)

Δυσλειτουργία μιτοχονδρίων στα χονδροκύτταρα

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελεί χαρακτηριστικό τόσο του κυτταρικού γήρατος, όσο και του οξειδωτικού στρες, αφού τα μιτοχόνδρια, και η αναπνευστική αλυσίδα που διεξάγεται εκεί, αποτελούν κύρια πηγή ROS στο κύτταρο.

Οι ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα έχει εκτιμηθεί πως φέρουν μειωμένη μάζα αυτών των οργανιδίων και υψηλά ποσοστά βλαβών στο γενετικό τους υλικό (mtDNA), γεγονός που οδηγεί σε αλλαγή της γονιδιακής τους έκφρασης. Τέτοιες αλλαγές είναι η μειωμένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η μιτοχονδριακή δισμουτάση του σουπεροξειδίου (MnSOD). Είναι, λοιπόν, φανερό πως η οξειδοαναγωγική κατάσταση και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, σχετίζονται άμεσα με την αποικοδόμηση του αρθρικού χόνδρου και την εξέλιξη της νόσου. (Loeser et al., 2016)

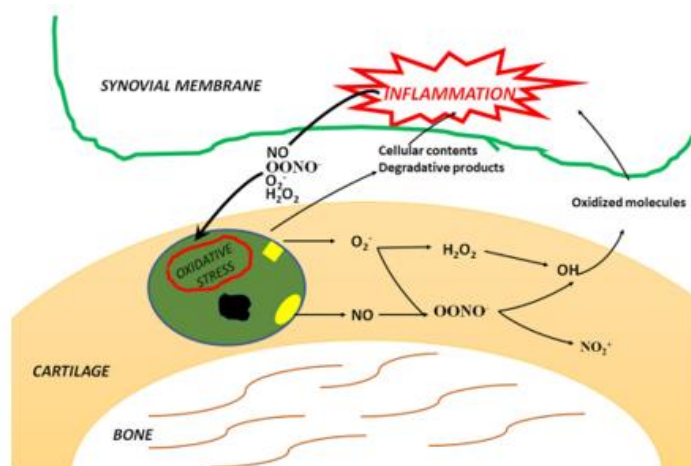
1.5.6.2 Οξειδωτικό στρες και υποχόνδριο οστό

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, το υποχόνδριο οστό υπόκειται σε σκλήρυνση και μορφολογικές αλλαγές σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο. Έχει αποδειχθεί πως συγκεκριμένα, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), είναι αυτό που έχει τον πιο καθοριστικό ρόλο. Σε υψηλά επίπεδα, εμποδίζει την διαφοροποίηση και λειτουργία των οστεοκλαστών του οστού και έτσι προκαλεί έντονο πόνο και σκλήρυνση του οστού (Zahan et al., 2020).

1.5.6.3 Οξειδωτικό στρες και υμενικός ιστός

Στον υμενικό ιστό της άρθρωσης συμβαίνουν, επίσης, γεγονότα φλεγμονής. Αναλυτικότερα, η φλεγμονή προωθείται από κυτοκίνες ή ROS που παράγονται τόσο από τα υμενικά κύτταρα, όσο και από τα χονδροκύτταρα (Εικόνα 24).

Ως αποτέλεσμα, οδηγούνται σε απόπτωση τα υμενικά κύτταρα, λόγω, δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων τους ή ενεργοποίησης ενζύμων, όπως οι κασπάσες και οι κυκλοξυγενάσες που συνδέονται άμεσα με τέτοια γεγονότα. Καθοριστικό ρόλο έχουν συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες του σουπεροξειδίου και του μονοξειδίου του αζώτου. (Zahan et al., 2020)



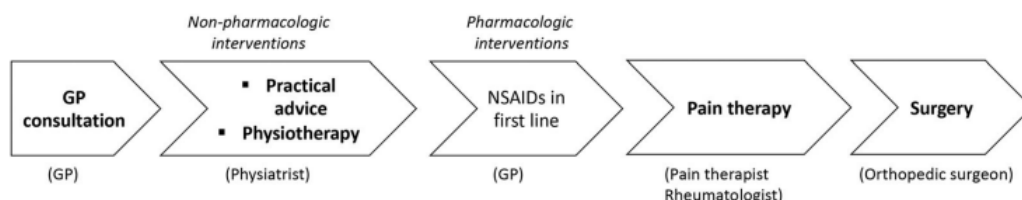
Εικόνα 24. Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή στον υμενικό ιστό της άρθρωσης (Zahan et al., 2020)

1.5.7 Θεραπευτικές προσεγγίσεις και η χρήση αντιοξειδωτικών στην Οστεοαρθρίτιδα

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη θεραπεία για τη νόσο, χρησιμοποιούνται εναλλακτικοί μέθοδοι είτε φαρμακευτικοί, είτε που αφορούν τη φυσική κατάσταση του ατόμου, ώστε να προληφθεί ή να βελτιωθεί η εξέλιξή της. Οι θεραπείες είναι εξατομικευμένες σε κάθε ασθενή και σχετίζονται με τον τύπο της άρθρωσης που νοσεί, το στάδιο της νόσου και χαρακτηριστικά της υγείας του ασθενή (π.χ. το βάρος). Υπάρχει, δηλαδή, κλιμάκωση της θεραπείας ανάλογη της κλιμάκωσης της νόσου (Εικόνα 25).

Για ασθενείς που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα του γόνατος και του ισχίου, σε αρχικό στάδιο, κύριο προληπτικό και θεραπευτικό μέσο αποτελεί η άσκηση (κατά βάση αερόβια, π.χ. περπάτημα ή διάδρομος). Συνδυαστικά με αυτό σημαντική είναι και η απώλεια βάρους, περισσότερο στα υπέρβαρα άτομα, διότι αρθρώσεις όπως αυτές, δέχονται μηχανικές πιέσεις που ενισχύουν την παθογένειά τους. Ακόμη, η χρήση

νάρθηκα ή επιγονατίδας μπορεί να βοηθήσει την κίνηση, προσφέροντας σταθερότητα. Γενικότερα, λοιπόν, στόχο αποτελεί η ενδυνάμωση και σωστή στάση του σώματος για την αποφυγή των αρθρικών καταπονήσεων.



Εικόνα 25. Η κλιμάκωση των θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι ανάλογη της κλιμάκωσης της ασθένειας (Magni et al., 2021)

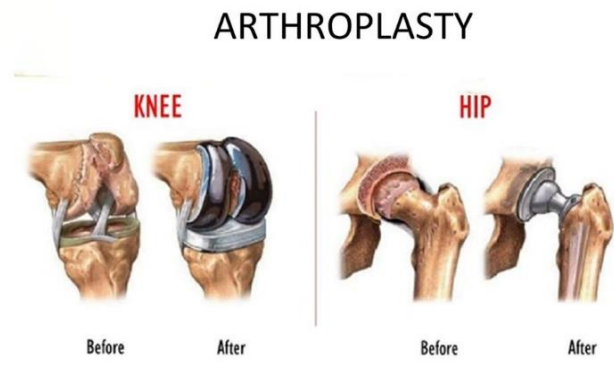
Με την εξέλιξη της νόσου σε πιο προχωρημένα στάδιο, αναπόφευκτη είναι η λήψη φαρμακευτικής αγωγής, πάντα, όμως, σε συνδυασμό με τη βελτίωση των φυσικών παραμέτρων. Συγκεκριμένα, χορηγούνται μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), κυρίως τοπικά (ενέσιμα ή ως αλοιφή). Η στοματική χρήση αποφεύγεται λόγω πιθανών ανεπιθύμητων παρενεργειών. Επίσης, στην οστεοαρθρίτιδα γονάτου, συχνά, χρησιμοποιείται τοπικά καψαϊκίνη ή ενδοαρθρική ένεση γλυκοκορτικοειδών ουσιών, που βελτιώνουν την απώλεια του αρθρικού χόνδρου. (Kolasinski et al., 2020)

Αξιοσημείωτος είναι, επίσης, ο ρόλος των πολυφαινολών ως θεραπευτικό μέσο της νόσου, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων που έχουν. Για παράδειγμα, η Κερκετίνη (φλαβονοειδές) ρυθμίζει θετικά την έκφραση του γονιδίου της γλουταθειόνης και της υπεροξειδάσης της, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει την έκφραση του μονοξειδίου του αζώτου και των κυκλοξυγενασών, που είναι αυξημένα λόγω της φλεγμονής. Στην παθολογική άρθρωση χορηγείται ενέσιμα και επιφέρει την μείωση της αποικοδόμησης του χόνδρου της, καθυστερώντας την εξέλιξη της νόσου. Τα ίδια αποτελέσματα έχει και η Ρεσβερατόλη (φυτοαλεξίνη), η οποία χορηγείται, επίσης, ενέσιμα, και υπάρχει στην φλούδα των κόκκινων σταφυλιών. (Ansari et al., 2020)

Τέλος, σε πολύ προχωρημένα στάδια της νόσου, είναι αναγκαία η αρθροπλαστική (Εικόνα 26), δηλαδή η ολική αντικατάσταση της άρθρωσης, με σκοπό την ανάκτηση της λειτουργίας της και απαλοιφή του πόνου.

Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια, γίνεται όλο και περισσότερη προσπάθεια ώστε να βελτιωθεί τόσο αποτελεσματικότητα της εγχείρησης, όσο και η μετεγχειρητική κατάσταση του ασθενή (αποφυγή μολύνσεων ή επίμονου πόνου). (Karachalios

& Berstock, 2022) (Johns Hopkins Medicine)



Εικόνα 26. Η αρθροπλαστική ως θεραπευτική προσέγγιση σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις της νόσου (SPOT Hospital)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ

Η νόσος της Οστεοαρθρίτιδας αποτελεί τον πιο κοινό τύπο αρθρίτιδας, με εκατομμύρια ασθενείς να υποφέρουν από τα συμπτώματά της. Μπορεί να επηρεάσει δραματικά την ζωή του ατόμου που πάσχει, λόγω του έντονου πόνου και της δυσκολίας στην κίνηση που επιφέρει, ενώ οι αιτιολογικοί της παράγοντες είναι συνδυασμός γεγονότων.

Βέβαια, φαίνεται, πως καθοριστικό ρόλο στη νόσο έχει η αλληλεπίδραση του γήρατος και του οξειδωτικού στρες, δύο καταστάσεις που συνδέονται μεταξύ τους. Το οξειδωτικό στρες και η συσσώρευση χρόνιων βλαβών στα βιολογικά μακρομόρια, σχετίζεται με την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου, επηρεάζοντας τη λειτουργία των αρθρικών ιστών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η εκτίμηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ιστούς από τέσσερα διαφορετικά σημεία (υμένας, οστεόφυτο, χόνδρος, υποχόνδριο οστό) της άρθρωσης είτε του γόνατος είτε του ισχίου ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα, ώστε μακροπρόθεσμα να συσχετιστεί το οξειδοαναγωγικό τους προφίλ με την παθογένεια της νόσου.

Για το σκοπό αυτό, σε καθένα από τους τέσσερις ιστούς που συλλέχθηκαν από ασθενείς με διαφορετικούς τύπους οστεοαρθρίτιδας, εκτιμήθηκαν πέντε βασικοί βιοδείκτες: ο προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω την εκτίμησης της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ως δείκτες πρωτεϊνικής και λιπιδικής οξείδωσης, αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

Σε αυτήν την ενότητα ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των πειραματικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν. Αναλύεται κάθε μέθοδος τόσο σε θεωρητικό, όσο και σε πειραματικό υπόβαθρο.

Οι δείκτες οξειδοαναγωγής που εκτιμήθηκαν είναι:

1. Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)
2. Ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου/Δραστικότητα ενζύμου Καταλάσης (CAT)
3. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)
4. Πρωτεϊνικά καρβονύλια
5. Ουσίες που αφορούν το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και τύποι δειγμάτων

Τα δείγματα προήλθαν από την Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα, που υποβλήθηκαν σε ολική αρthroπλαστική ισχίου και γόνατος.

Κατά τη διάρκεια του χειρουργείου λήφθηκαν, από 40 ασθενείς, τέσσερις διαφορετικοί τύποι ιστού από το σημείο της άρθρωσης (Α: υμένας, Β: οστεόφυτο, Γ: χόνδρος, Δ: υποχόνδριο οστό). Από τα δείγματα των 40 ασθενών, τα 28 προήλθαν από το γόνατο και τα υπόλοιπα 12 από το ισχίο.

Επιπλέον, τα δείγματα με βάση τη μακροσκοπική τους εικόνα (ακτινογραφία) χαρακτηρίστηκαν ανάλογα με (α) τον τύπο υμένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 και (β) τον τύπο της οστεοαρθρίτιδας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6:

Πίνακας 5. Χαρακτηρισμός δειγμάτων βάσει του τύπου υμένα τους

Αριθμός	Τύπος υμένα
I	Στεγνός, Χωρίς υμενίτιδα

II	Ερυθρός, Ενδιάμεση υμενίτιδα
III	Πολύ ερυθρός, Τύπου ρευματοειδής αρθρίτιδα, Έντονη υμενίτιδα

Πίνακας 6. Χαρακτηρισμός δειγμάτων βάσει του τύπου της οστεοαρθρίτιδας

Αριθμός	Τύπος οστεοαρθρίτιδας
1	Υπερτροφική
2	Ενδιάμεση
3	Ατροφική

3.3 Συνθήκες αποθήκευσης δειγμάτων

Οι ιστοί, αμέσως μετά τη λήψη τους από το χειρουργείο, φυλάσσονταν σε δοχείο υγρού αζώτου και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στους -80 °C σε βαθιά κατάψυξη, ώστε να ανασταλεί κάθε βιολογική μεταβολή των δειγμάτων, που θα επηρέαζε τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

3.4 Ομογενοποίηση ιστών

Για την υλοποίηση των πειραματικών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστών (Α, Β, Γ, Δ). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιητή.

Αρχικά, έγινε τεμαχισμός και ζύγιση των ιστών. Ο τεμαχισμός πραγματοποιήθηκε είτε με τη χρήση νυστεριού, είτε με τη χρήση ειδικού ορθοπαιδικού ψαλιδιού. Από κάθε ιστό ζυγίζονταν κάθε φορά ποσότητα περίπου ίση με 0,250 γραμμάρια.

Η ομογενοποίηση των ιστών πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffer Saline) που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (cOmplete Tablets, Roche, Sigma Aldrich), σε αναλογία ιστός:PBS, 1:4. Έγινε με

χρήση ομογενοποιητή (Bertin, Minilys) για 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα, δυο φορές για κάθε δείγμα (2 x 30 sec για κάθε δείγμα).

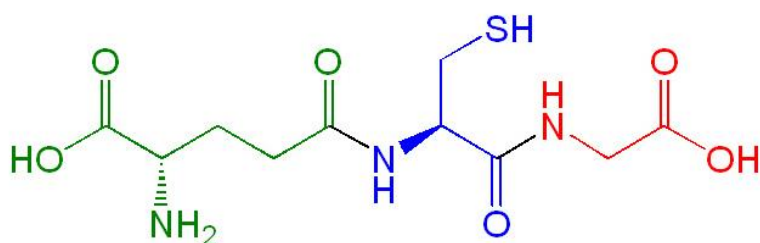
Σημείωση: Όλη η διαδικασία της ομογενοποίησης των ιστών πραγματοποιούνται μέσα σε πάγο.

Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 5 λεπτά, στα 15.000 g, στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε eppendorf tubes 1,5 ml και αποθηκεύτηκε στους -80 °C για την εφαρμογή των ακολούθων πειραματικών πρωτοκόλλων.

3.5 Μέθοδος μέτρησης ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Θεωρητικό υπόβαθρο

Η γλουταθειόνη είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από τρία αμινοξέα (τριπεπτίδιο), την γλυκίνη (Gly, G), την κυστεΐνη (Cys, C) και το γλουταμινικό οξύ (Glu, E), κατά σειρά, όπως φαίνονται στον χημικό της τύπο στην Εικόνα 27.



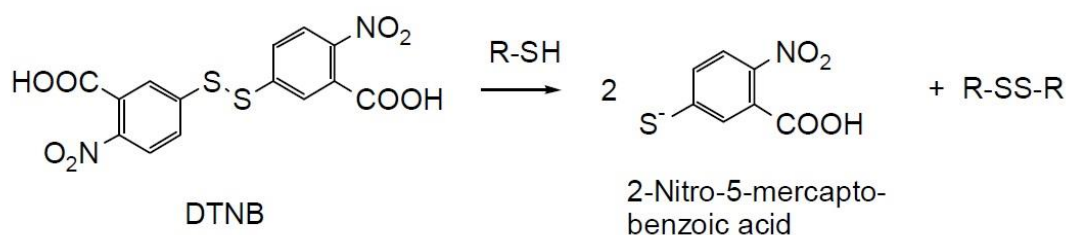
Στους ιστούς των ζωικών οργανισμών βρίσκεται σε άφθονη συγκέντρωση και αποτελεί σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό, λόγω των αναγωγικών της ιδιοτήτων.

Εικόνα 27. Η δομή του τριπεπτιδίου της Γλουταθειόνης

Κατά κανόνα, η γλουταθειόνη επιτελεί την απομάκρυνση βλαβερών ουσιών από τον οργανισμό, όπως ελευθέρων ριζών και ξενοβιοτικών ουσιών, συμβάλλοντας έτσι στην εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων, και γενικότερα τους οργανισμού. Εντοπίζεται σε δύο μορφές: την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG) της μορφή.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) μετά από αντίδραση με το αντιδραστήριο δι-θειο-δυο-

νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η αντίδραση που πραγματοποιείται περιγράφεται παρακάτω (Εικόνα 28):



Εικόνα 28. Η αντίδραση της Γλουταθειόνης με το αντιδραστήριο δι-θειό-δνο-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) (Thermofisher.com)

Η GSH αντιδρώντας με το αντιδραστήριο DTNB μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) και, ταυτόχρονα, παράγεται το προϊόν 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, που είναι έγχρωμο και απορροφά στα 412 nm. Συνεπώς, μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. (Rahman et al., 2006)

Πειραματική διαδικασία

Κατά την έναρξη της μεθόδου πρέπει να γίνει ένας καθαρισμός του ομογενοποιήματος των δειγμάτων ιστών. Συγκεκριμένα, προστίθενται 50 μL δείγματος και 50 μL TCA 5% και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το TCA χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση κυτταρικών βιομορίων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, συλλέγεται το υπερκείμενο σε σωληνάρια των 1,5 ml.

Ακολούθως, προστίθενται οι εξής ποσότητες διαλυμάτων (Πίνακας 7):

Πίνακας 7. Τα αντιδραστήρια που προστίθενται στη μέθοδο προσδιορισμού ανηγμένης γλουταθειόνης κατά σειρά

	Ποσότητες
Ρυθμιστικό διάλυμα 67mM με pH 7,95	660 μL
Δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή PBS για το τυφλό δείγμα	20 μL
Αντιδραστήριο DTNB	330 μL

Έπειτα ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση σε σκοτεινό περιβάλλον για 15 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση του DTNB με την ανηγμένη γλουταθειόνη. Αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του χρώματος των δειγμάτων σε υποκίτρινο, το οποίο τελικά μετράται στα 412 nm με χρήση πλαστικής κυψελίδας.

Υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στους ιστούς πραγματοποιήθηκαν οι εξής υπολογισμοί:

$$GSH \left(\frac{\mu mol}{mg \text{ total protein}} \right) = \frac{(Abs_{\text{Δείγματος}} - Abs_{\text{Τυφλού}})}{13,6} \times 2 \times 50,5 \times 4$$

Ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος

Όπου ισχύουν οι εξής ερμηνείες:

1. Abs δείγματος: Ο μέσος όρος των τιμών των απορροφήσεων των δειγμάτων.
2. Abs τυφλό: Ο μέσος όρος των απορροφήσεων των τυφλών δειγμάτων.
3. Επί 13,6: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του αντιδραστηρίου DTNB.
4. Επί 2: Λόγω του καθαρισμού με το TCA 5% (1:1)
5. Επί 50,5: Λόγω της διαίρεσης του συνολικού όγκου (1.010 μl) με τον όγκο δείγματος που προστέθηκε (20 μl).
6. Επί 4: Λόγω της αρχικής αραίωσης του ιστού ¼ κατά την ομογενοποίηση.

Εκφράζεται σε μmol GSH/mg συνολικής πρωτεΐνης.

3.6 Μέθοδος μέτρησης ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Capacity)

Θεωρητικό υπόβαθρο

Η εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος αποτελεί «καθρέφτη» της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Ουσιαστικά, κάθε συστατικό με αντιοξειδωτική δράση συμβάλλει με διαφορετικό

τρόπο στον οργανισμό (π.χ. ουρικό οξύ στο αίμα ή Βιταμίνη C/Ασκορβικό οξύ). Ο προσδιορισμός κάθε συστατικού τέτοιας φύσης ξεχωριστά αποτελεί έναν εξαιρετικά δύσκολο τρόπο. Συνεπώς, συνηθίζεται να υπολογίζεται η TAC ως σύνολο.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην τεχνητή ρίζα DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), η οποία παρουσία δότη υδρογόνων (ιστός) ανάγεται, δίνοντας το προϊόν 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine, που μετράται φασματοφωτομετρικά στα 520 nm. (Munteanu & Apetrei, 2021)

Πειραματική διαδικασία

Αραίωση δειγμάτων

Πριν την εκτέλεση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:2 του ομογενοποιήματος των ιστών και για τα τέσσερα διαφορετικά σημεία γόνατος ή ισχίου που εξετάστηκαν (Α: υμένας, Β: οστεόφυτο, Γ: χόνδρος, Δ: υποχόνδριο οστό).

Εκτέλεση μεθόδου

Σε σωληνάκια 1,5 ml προστίθενται, κατά σειρά, οι εξής ποσότητες (Πίνακας 8):

Πίνακας 8. Τα αντιδραστήρια που προστίθενται κατά σειρά στη μέθοδο προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

	Δείγμα	Τυφλό δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM, pH 7,4	460 μ l	500 μ l
Αραιωμένο ομογενοποιήμα ιστού (1/2)	40 μ l	-
DPPH 0,1 mM	500 μ l	500 μ l

Στη συνέχεια, τα σωληνάκια αναδεύονται με vortex και επωάζονται σε σκοτεινό περιβάλλον για 60 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η αναγωγή της τεχνητής ρίζας DPPH προς την αντίστοιχη υδραζίνη.

Μετά το πέρας της επώασης, φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά σε συνθήκες 12.000 g, 25 °C και φωτομετρούνται με πλαστική κυψελίδα στα 520 nm.

Υπολογισμοί

Η μείωση της απορρόφησης σε σχέση με το τυφλό υπολογίζεται ως εξής:

$$\frac{\text{nmol DPPH (που εξουδετερώθηκαν)}}{\text{mg total protein}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ Abs (μείωση)}}{100} \times 50 \times 25 \times 4 \times 2 \right)}{\frac{1000}{\text{ολική πρωτεΐνη (mg)}}}$$

Όπου:

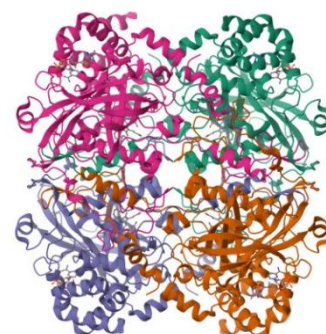
1. % Abs: Η ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης των δειγμάτων.
2. Διά 100: για να μετατραπεί το ποσοστό σε απλή μείωση απορρόφησης.
3. Επί 50: Λόγω της συγκέντρωσης 50 $\mu\text{mol/L}$ DPPH στην κυψελίδα.
4. Επί 25: Λόγω της διαίρεσης του συνολικού όγκου (1000 μL) με τον όγκο του προστιθέμενου δείγματος (40 μL).
5. Επί 4: Λόγω της αρχικής αραίωσης $\frac{1}{4}$ κατά την ομογενοποίηση των ιστών.
6. Επί 2: Λόγω της αραίωσης $\frac{1}{2}$ στην αρχή της μεθόδου.
7. Διά 1000: ώστε να μετατραπούν τα L σε ml.

Εκφράζεται σε $\text{nmol}_{\text{DPPH}}/\text{mg}$ συνολικής πρωτεΐνης.

3.7 Ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω μέτρησης της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT)

Θεωρητικό υπόβαθρο

Η καταλάση (E.C. number 1.11.1.6) είναι ένα από τα βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού. Βρίσκεται υποκυτταρικά σε οργανίδια όπως τα υπεροξεισώματα, τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Η δομή της είναι τετραμερής, διότι αποτελείται από 4 μονομερή πεπτίδια περίπου πεντακοσίων (500) αμινοξέων και φέρει τέσσερις πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες είναι καθοριστικές για την λειτουργία της ως ένζυμο.



Εικόνα 29. Η κρυσταλλική δομή της Καταλάσης του ανθρώπου

Στην Εικόνα 29, φαίνεται η δομή της ανθρώπινης καταλάσης σε ηπατικά μιτοχόνδρια (PDB ID 8SGV). Με τα διαφορετικά χρώματα είναι εμφανή τα τέσσερα διαφορετικά μονομερή που την συνθέτουν.

Πιο συγκεκριμένα, καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2), με την ικανότητα να λύει έως και 83.000 μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου ανά δευτερόλεπτο (Εικόνα 30). (Makri et al., 2017)



Εικόνα 30. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από την Καταλάση

Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια προστίθενται οι εξής ποσότητες (Πίνακας 9):

Πίνακας 9. Τα αντιδραστήρια που προστίθενται κατά σειρά στη μέθοδο προσδιορισμού του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου

	Δείγματα
Ρυθμιστικό διάλυμα 67 mM, pH 7,4	2.985 μL
Ομογενοποιημένος ιστός	10 μL

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για αυστηρά 10 λεπτά. Για τη φωτομέτρηση, κάθε δείγμα μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία, όπου προστίθενται 5 μl H_2O_2 , αναδεύεται με τη βοήθεια parafilm και μετράται η απορρόφησή του στα 240 nm για 120 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Η δραστικότητα της καταλάσης ορίζεται ως εξής:

$$\text{Δραστ. καταλάσης} \left(\frac{U}{\text{mg total prot.}} \right) = \frac{\frac{\Delta \text{Abs Δείγματος}}{40} \times 300 \times 1000 \times 4}{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος}}$$

Όπου:

1. ΔAbs δείγματος/min: Ο μέσος όρος των τιμών της δραστηριότητας του ενζύμου, αφού έχει προηγηθεί αναγωγή της τιμής στο 1 λεπτό.
2. Διά 40 (mol/L): Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).
3. Επί 300: η διαίρεση του συνολικού όγκου (3000 μL) με τον όγκο προστιθέμενου δείγματος (10 μL).
4. Επί 1000: για μετατροπή σε μmol/ml.
5. Επί 4: λόγω της αρχικής αραίωσης κατά την ομογενοποίηση (1/4).

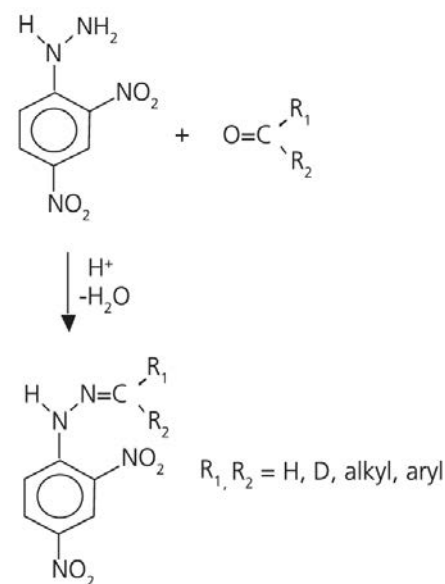
Εκφράζεται σε Units/mg ολικής πρωτεΐνης.

3.8 Μέθοδος μέτρησης πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι πρωτεΐνες αποτελούν βιομόρια που βρίσκονται σε αφθονία στον οργανισμό. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπόκεινται σε σοβαρές, μη αναστρέψιμες βλάβες. Η εκτίμηση, των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστη ένδειξη πρωτεϊνικής οξείδωσης μέσα στο κύτταρο.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να αποβεί μοιραία για τη λειτουργία μίας πρωτεΐνης, ακόμα περισσότερο αν αυτή επιτελεί το ρόλο κάποιου ενζύμου (π.χ. επιδιορθωτικό ένζυμο του DNA). Συμβαίνει κυρίως σε συγκεκριμένα αμινοξέα, όπως προλίνη, λυσίνη, αργινίνη, θρεονίνη, λόγω της αφθονίας τους σε αλδεϋδικές και κετονικές ομάδες (καρβονυλικές ομάδες).



Εικόνα 31. Η αντίδραση δημιουργίας πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με το αντιδραστήριο 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) προς το σχηματισμό του προϊόντος 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου (Εικόνα 31), που μετριέται στα 375 nm. (Herick, 2006)

Πειραματική διαδικασία

Κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό ξεχωριστά. Έτσι, αναφερόμαστε σε θετικά (+) και αρνητικά (-) δείγματα, με τα πρώτα να περιέχουν το αντιδραστήριο DNPH και τα δεύτερα HCl (διαλύτης του αντιδραστήριου), αντί για DNPH.

Αρχικά, σε σωληνάκια των 1,5 ml προστίθενται 50 µl ομογενοποιημένου ιστού και 50 µl TCA 20% (τριχλωροξικό οξύ), ώστε να κατακρημνιστούν βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Γίνεται ανάδευση με vortex, επώαση για 15 λεπτά σε πάγο και τέλος, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε συνθήκες 15.000 g στους 4°C.

Στο επόμενο στάδιο, αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο από όλα τα δείγματα, προστίθενται οι εξής ποσότητες (Πίνακας 10):

Πίνακας 10. Τα αντιδραστήρια που προστίθενται κατά σειρά στη μέθοδο προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

	Θετικά δείγματα (+)	Αρνητικά δείγματα (-)
DNPH 14 mM (διαλυμένο σε 2.5 N HCl)	500 µl	-
HCl 2.5 N	-	500 µl

Πραγματοποιείται ολική διάλυση του ιζήματος, ώστε να γίνει αποτελεσματική αντίδραση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο και ακολουθεί επώαση 60 λεπτών στο σκοτάδι, με ενδιάμεση ανάδευση vortex ανά 15 λεπτά.

Μετά το πέρας της μίας ώρας, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε συνθήκες 15.000 g και 4 °C, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml TCA 10%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.

Σε αυτό το σημείο ξεκινά η πλύση των δειγμάτων, η οποία διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές για τη διασφάλιση της απομάκρυνσης ποσότητας του αντιδραστήριου DNPH που δεν έχει αντιδράσει.

Κατά τις πλύσεις, αρχικά, αφαιρείται το υπερκείμενο (μετά την τελευταία φυγοκέντρωση του TCA) και προστίθεται μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (50:50 v/v). Πραγματοποιείται ανάδευση με vortex και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες (5 λεπτά, 15.000 g και 4 °C).

Να σημειωθεί πως κατά την δεύτερη επανάληψη χρειάζεται ξανά διάλυση του ιζήματος των δειγμάτων.

Μετά το τέλος των τριών πλύσεων, προστίθενται διάλυμα ουρίας 5 M με σταθερό pH ίσο με 2,3. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 37 °C για αυστηρά 15 λεπτά.

Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις ίδιες συνθήκες και τέλος, μεταφέρεται το υπερκείμενο σε κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση στα 375 nm (υπεριώδες φάσμα).

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συγκ. πρωτ. καρβονυλίων} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mg total prot.}} \right) = \frac{(\text{Abs Δείγματος} - \text{Abs Τυφλού})}{0,022} \times \frac{1000}{50} \times 4}{\text{Συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης}}$$

Για τον τύπο ισχύουν τα εξής:

1. Abs δείγματος: Ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του δείγματος.
2. Abs Τυφλού: Ο μέσος όρος των τυφλών δειγμάτων.
3. Διά 0,022: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DPPH που είναι 22 Mm*cm⁻¹.
4. Επί 1000/50: Η διαίρεση του συνολικού όγκου (1000 μl) με τον όγκο προστιθέμενου δείγματος (50 μ).
5. Επί 4: η αραίωση που πραγματοποιήθηκε κατά την ομογενοποίηση των δειγμάτων (1/4).

Εκφράζεται σε mmol/ mg συνολικής πρωτεΐνης.

3.9 Μέθοδος εκτίμησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Θεωρητικό υπόβαθρο

Όπως, αναφέρθηκε και στην προηγούμενη μέθοδο, το οξειδωτικό στρες μπορεί να βλάψει τη φυσιολογική λειτουργία των βιομορίων του οργανισμού. Εκτός από τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια αποτελούν ένα, εξίσου, σημαντικό μακρομόριο του κυττάρου. Ευθύνονται τόσο για δομικές, όσο και για λειτουργικές διαδικασίες με πιο σημαντική την σύνθεση της διπλοστοιβάδας της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου.

Παρουσία οξειδωτικού στρες στο περιβάλλον του κυττάρου, σχηματίζονται ενεργά και ασταθή υπεροξειδία λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία διασπώνται, παράγοντας μαλονδιαλδεϋδη (MDA).

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αντίδραση της μαλονδιαλδεϋδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, σε αναλογία 1:2, δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 530 nm. Τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της MDA και αποτελούν δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. (Mylonas & Kouretas, 1999)

Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη του πειράματος ρυθμίζεται το υδατόλουτρο στην θερμοκρασία των 95 °C. Επίσης, είναι απαραίτητη η παρασκευή του διαλύματος Na₂SO₄ (2M) – TBA (55mM), το οποίο χρειάζεται θέρμανση για να αναδευτεί.

Αρχικά, σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon των 15 ml προστίθενται κατά σειρά τα αντιδραστήρια και γίνεται ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπως φαίνονται στον Πίνακα 11:

Πίνακας 11. Τα αντιδραστήρια που προστίθενται κατά σειρά στη μέθοδο προσδιορισμού των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

	Δείγματα	Τυφλό δείγμα
Ομογενοποιημένος ιστός	100 μl	-
PBS	-	100 μl
TCA 35%	500 μl	500 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 200 mM pH 7,4	500 μl	500 μl

Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται 1 ml του διαλύματος Na₂SO₄ (2M) – TBA (55mM) (το οποίο βρίσκεται, προηγουμένως, σε θερμοκρασία 30-40°C). Ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο (95°C) για 45 λεπτά και, έπειτα, τα δείγματα αφήνονται στον πάγο για 5 λεπτά.

Εν συνεχεία, προστίθεται 1 ml TCA 70%, γίνεται ανάδευση με vortex και μεταφέρεται 1 ml σε Eppendorf των 1,5 ml για να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρηση στα 11.200 g για 3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C).

Τέλος, το υπερκείμενο φωτομετρείται στα 530 nm σε πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση TBARS } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mg total prot.}} \right) = \frac{\frac{(\text{Abs Δείγματος} - \text{Abs Τυφλού})}{0,156} \times 31 \times 4}{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης δείγματος}}$$

Όπου:

1. Abs δείγματος: Ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του δείγματος.
2. Abs Τυφλού: Ο μέσος όρος των τυφλών δειγμάτων.
3. Διά 0,156: ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεΐδης.
4. Επί 31: η διαίρεση του συνολικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο δείγματος που προστέθηκε (100 μl).

5. Επί 4: λόγω της αρχικής αραιώσης κατά την ομογενοποίηση (1/4).

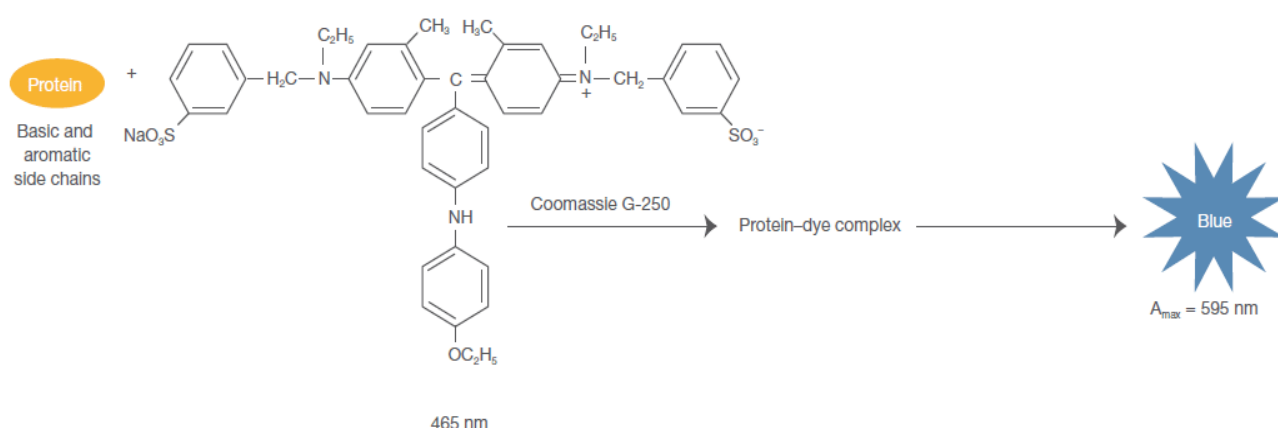
Εκφράζεται σε mmol/mg συνολικής πρωτεΐνης.

3.10 Μέθοδος προσδιορισμού συνολικής ποσότητας πρωτεΐνη (Μέθοδος Bradford)

Τέλος, για την έκφραση των τελικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, όπως αναλύεται παρακάτω:

Θεωρητικό υπόβαθρο

Η αρχή της μεθόδου Bradford στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του δείγματος με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue (Εικόνα 32). Πιο αναλυτικά, η χρωστική αυτή συνδέεται με θετικά φορτισμένα αμινοξέα (π.χ. αργινίνη, ιστιδίνη, λυσίνη) και συνεπώς, μετατοπίζεται το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm, όπου εκτιμάται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Ουσιαστικά, όσο αυξάνεται η παρουσία τέτοιων αμινοξέων στην πρωτεΐνη, τόσο υψηλότερη υπολογίζεται η συγκέντρωσή της. (Kruger, 2009)



Εικόνα 32. Η αντίδραση της πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford. (ThermoFisher Scientific)

Πειραματική διαδικασία

Αραίωση δειγμάτων

Για την εκτέλεση της μεθόδου, στα δείγματα έγιναν διαφορετικές αραιώσεις, ανάλογα με τον τύπο του κάθε ιστού. Η αραιώση των δειγμάτων γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate-buffered saline).

Εκτέλεση μεθόδου

Σε tube 1,5 mL προστίθενται 20 μ l αραιωμένου δείγματος ιστού και 1 mL (1.000 μ l) του αντιδραστηρίου Bradford. Για το τυφλό δείγμα (Blank) τα 20 μ L ιστού αντικαθίστανται με PBS. Στη συνέχεια, γίνεται ανάδευση με vortex και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm σε γυάλινη κυψελίδα και καταγραφή των αποτελεσμάτων.

Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός της ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη μίας πρωτεΐνης γνωστών συγκεντρώσεων, συγκεκριμένα της αλβουμίνης. Βάσει της εξίσωσης της καμπύλης αυτής και των απορροφήσεων των δειγμάτων προκύπτει η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης για κάθε δείγμα.

3.11 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism, έκδοση 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., Boston, MA, USA). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν σημαντικά, όταν οι τιμές p ήταν μικρότερες από 0,05 και έγινε έλεγχος κανονικότητας των αποτελεσμάτων. Για τις μετρήσεις που ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση one-way ANOVA, για πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ιστών (υμένιας, οστεόφυτο, χόνδρος, υποχόνδριο οστό), ενώ για τις μη παραμετρικές, Kruskal-Wallis. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι βιοδείκτες που εκτιμήθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC), ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι οξειδοαναγωγικοί αυτοί δείκτες, μετρήθηκαν σε δείγματα 40 ασθενών, που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα και εισήχθησαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) για εγχείρηση ολικής αρθροπλαστικής. Από κάθε ασθενή, που έπασχε από οστεοαρθρίτιδα είτε γόνατος (28 άτομα), είτε ισχίου (12 άτομα), έγινε δειγματοληψία 4 επιμέρους ιστών (υμένας, οστεόφυτο, χόνδρος και το υποχόνδριο οστό).

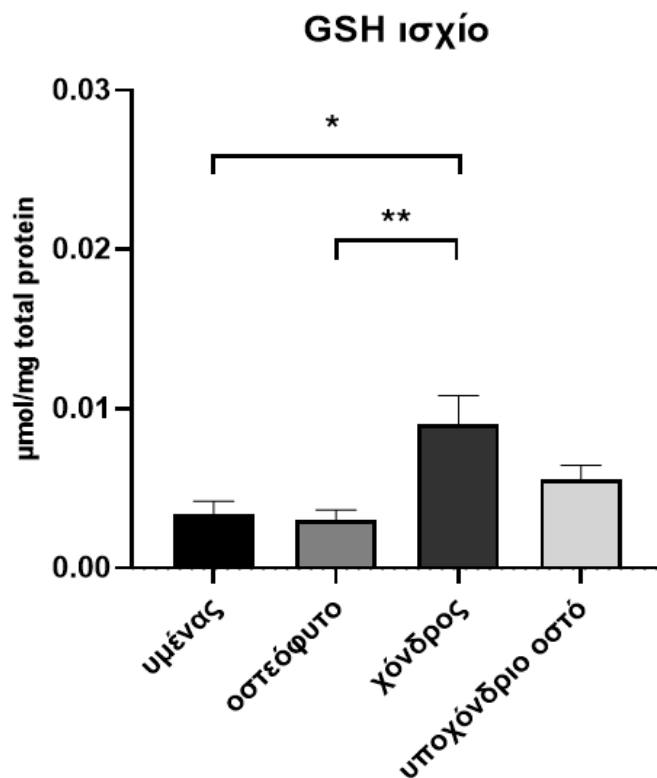
Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων έγινε σύγκριση των τεσσάρων τύπων ιστών, που λήφθηκαν από κάθε ασθενή, για κάθε βιοδείκτη ξεχωριστά. Επίσης, η προέλευση των δειγμάτων των ασθενών, αν δηλαδή προέρχονταν από γόνατο ή ισχίο θεωρήθηκαν δύο τελείως διαφορετικές καταστάσεις και δεν συγχέονται τα αποτελέσματα μεταξύ τους. Σε όλα τα διαγράμματα στον άξονα y'y απεικονίζεται η ποσότητα του βιοδείκτη ανά mg ολικής πρωτεΐνης, ενώ στον άξονα xx' καταγράφονται τα τέσσερα διαφορετικά είδη ιστών που μελετήθηκαν.

4.1 Αποτελέσματα δειγμάτων ιστών στο ισχίο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα

Παρακάτω ακολουθεί παράθεση των αποτελεσμάτων των βιοδεικτών, που αφορούν τα δείγματα ασθενών που προήλθαν από το ισχίο τους (n=12).

4.1.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

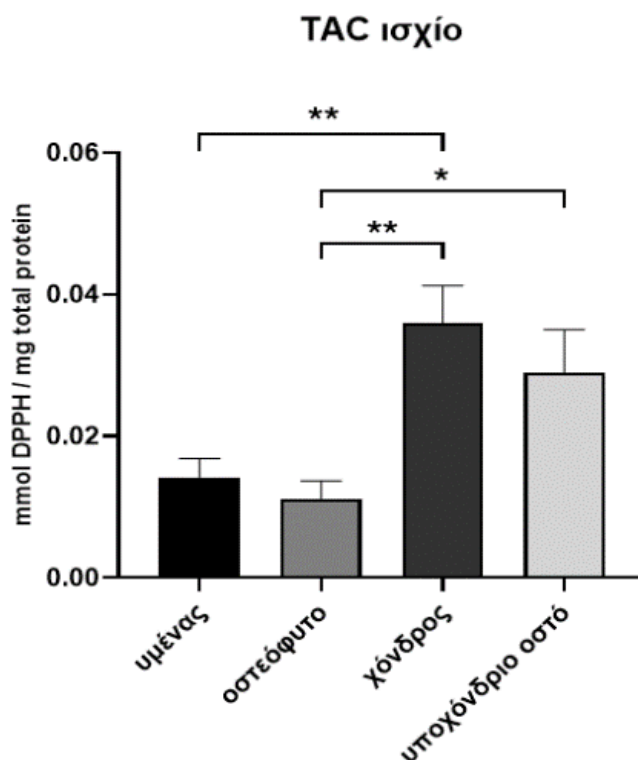
Στο **Διάγραμμα 1** παρατηρείται η μεταβολή των επιπέδων της Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH) στα δείγματα που προήλθαν από το ισχίο των ασθενών. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ υμένα – χόνδρου ($p < 0.05$) και οστεόφυτου - χόνδρου ($p < 0.01$).



Διάγραμμα 1. Η μεταβολή των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών στους ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ισχίου. * Στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.05$, ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά, $p < 0.01$.

4.1.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

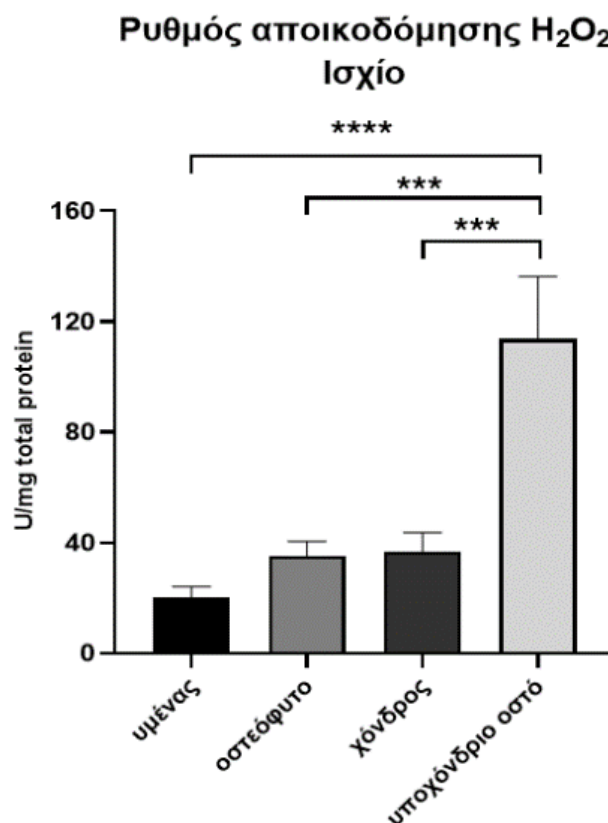
Στο **Διάγραμμα 2** σημειώνεται η μεταβολή της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC), ανάμεσα στους 4 διαφορετικούς τύπους ιστών στο ισχίο των ασθενών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της TAC στο χόνδρο σε σχέση με τον υμένα και το οστεόφυτο ($p < 0.01$), καθώς και σημαντική αύξηση στο υποχόνδριο οστό, σε σχέση με το οστεόφυτο ($p < 0.05$).



Διάγραμμα 2. . Η μεταβολή των επιπέδων ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ισχίου. * Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.05$, ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.01$.

4.1.3 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της δράσης του ενζύμου της καταλάσης

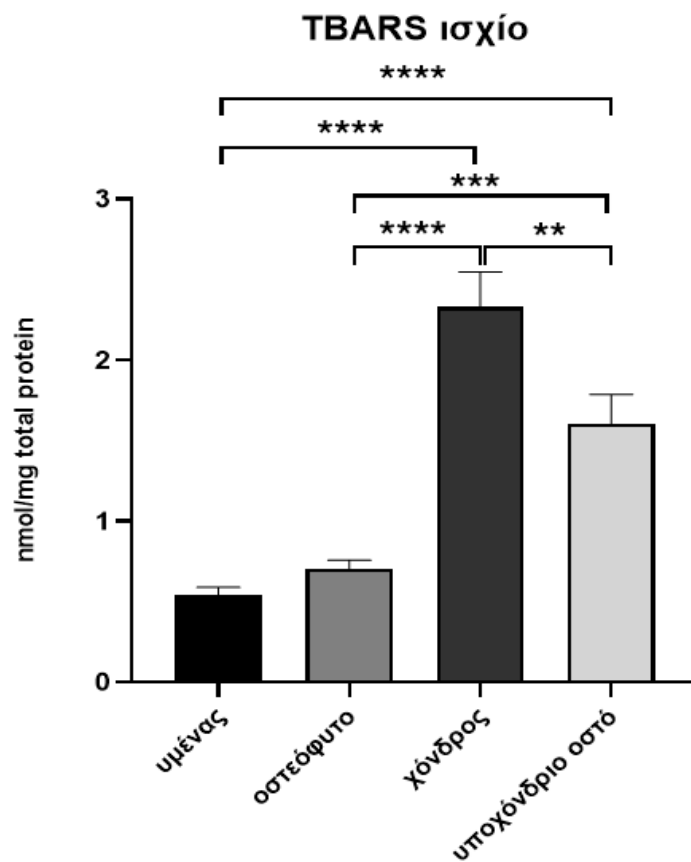
Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 3**, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 . Πιο αναλυτικά ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στο υποχόνδριο οστό, σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους ιστούς ($p < 0.001$, $p < 0.0001$).



Διάγραμμα 3. Η μεταβολή των επιπέδων του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών που προήλθαν από ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ισχίου. *** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.001$, **** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.0001$.

4.1.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

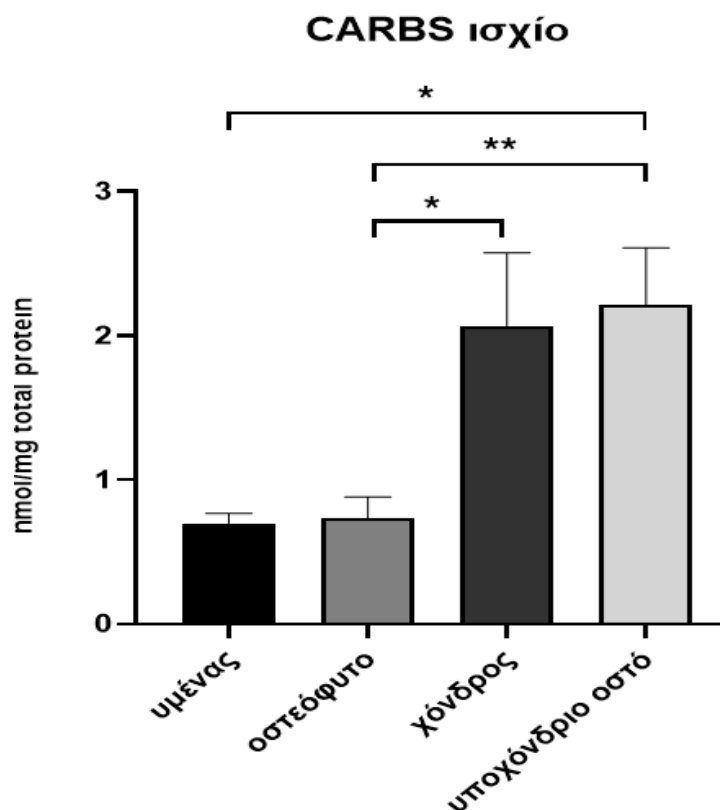
Στο **Διάγραμμα 4** παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσίας (TBARS), μεταξύ των ιστών: υμένα-χόνδρου ($p < 0.0001$), υμένα-υποχόνδριου οστού ($p < 0.0001$), οστεόφυτου-χόνδρου ($p < 0.0001$), οστεόφυτου-υποχόνδριου οστού ($p < 0.001$) και χόνδρου-υποχόνδριου οστού ($p < 0.01$). Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας παρατηρήθηκε κυρίως στο χόνδρο και στο υποχόνδριο οστό, σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς.



Διάγραμμα 4. Η μεταβολή των επιπέδων ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ισχίου. ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.01$, *** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.001$, **** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.0001$.

4.1.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Στο επόμενο **Διάγραμμα 5** παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της πρωτεϊνικής οξειδωσης, στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με τον υμένα ($p < 0.05$) και το οστεόφυτο ($p < 0.01$) και στο χόνδρο σε σχέση με το οστεόφυτο ($p < 0.05$).



Διάγραμμα 5. Η μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα ισχίου. * Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.05$, ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.01$.

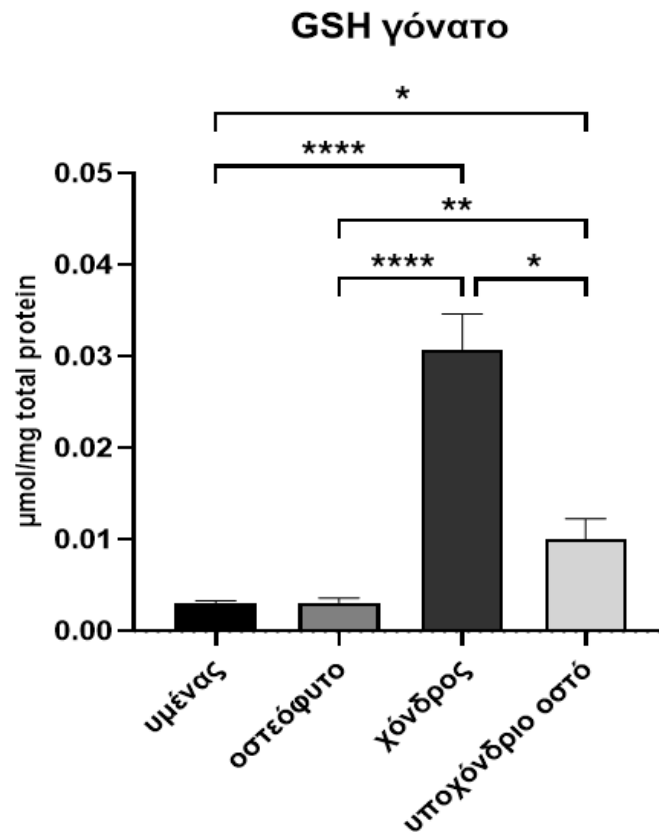
4.2 Αποτελέσματα δεικτών στα δείγματα ιστών που προήλθαν από το γόνατο των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα

Στη συνέχεια ακολουθεί παράθεση των αποτελεσμάτων των βιοδεικτών που αφορούν τα δείγματα ασθενών που προήλθαν από το γόνατό τους ($n=28$).

4.2.1 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Στο **Διάγραμμα 6**, απεικονίζονται τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης μεταξύ των τεσσάρων σημείων του γονάτου που αναλύθηκαν. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH παρατηρήθηκε στο

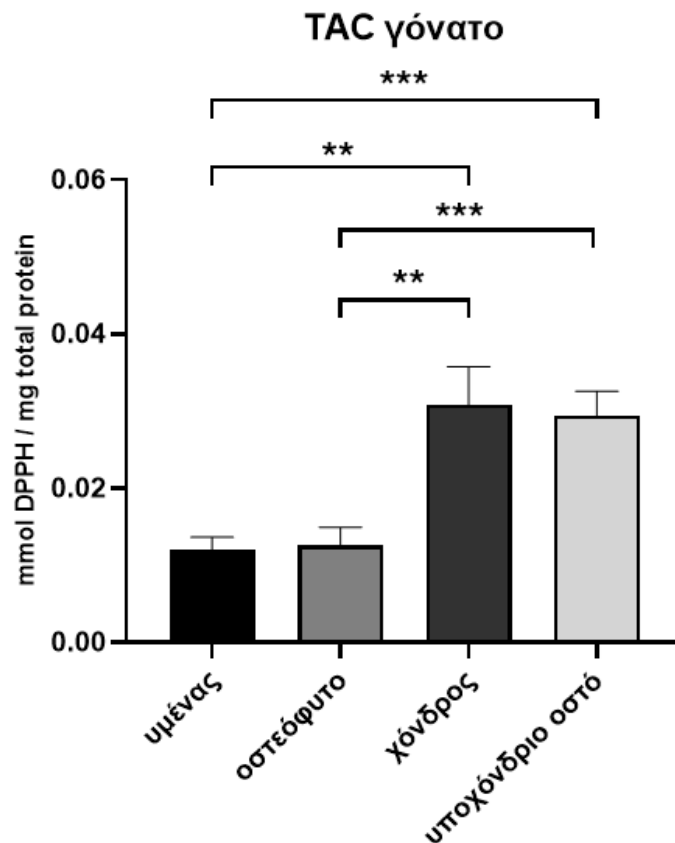
χόνδρο συγκριτικά με τους υπόλοιπους ιστούς. Επίσης, σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε και στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με το οστεόφυτο ($p < 0.01$), τον υμένα ($p < 0.05$).



Διάγραμμα 6. . Η μεταβολή των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γόνατος. * Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.05$, ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.01$, **** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.0001$.

4.2.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

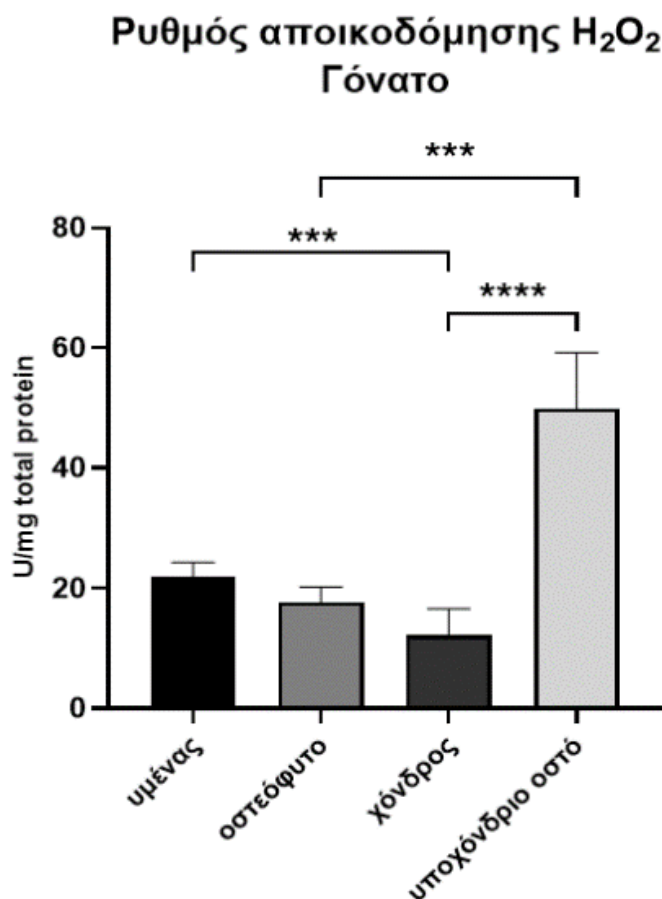
Συνεχίζοντας με τον επόμενο βιοδείκτη της αντιοξειδωτικής άμυνας, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), στο **Διάγραμμα 7**, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση στον χόνδρο και στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς. Αναλυτικά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε σημαντικά στο χόνδρο σε σχέση με τον υμένα και το οστεόφυτο ($p < 0.01$) και στο υποχόνδριο οστό σε σχέση πάλι με τον υμένα και το οστεόφυτο ($p < 0.001$).



Διάγραμμα 7. Η μεταβολή των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γόνατος. ** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.01$, *** Στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0.001$.

4.2.3 Προσδιορισμός ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της δράσης του ενζύμου της καταλάσης

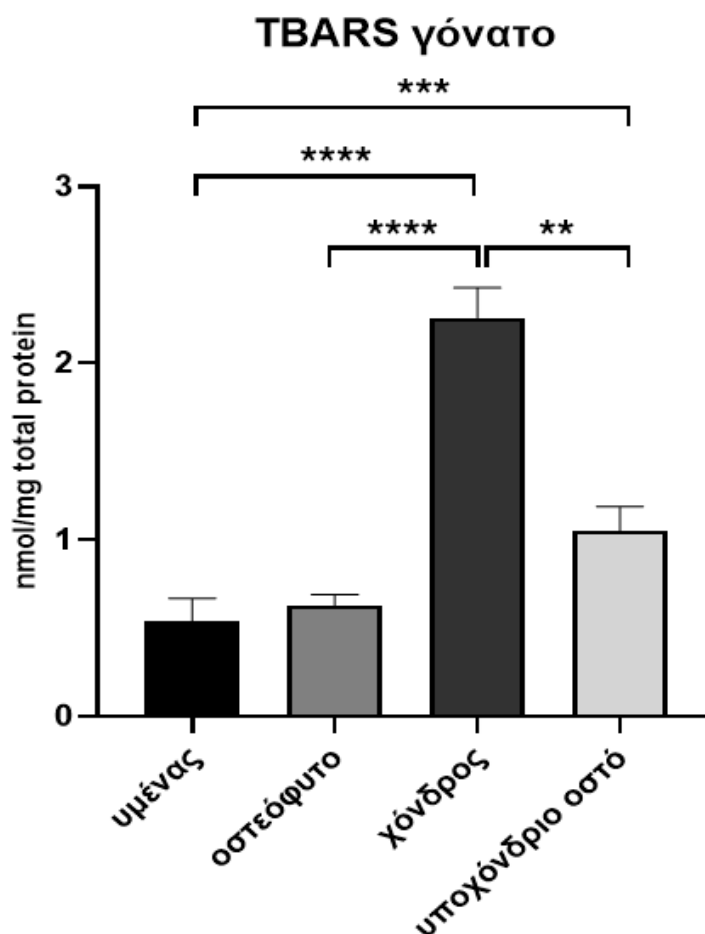
Στο **Διάγραμμα 8**, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με το χόνδρο ($p < 0.0001$) και το οστεόφυτο ($p < 0.001$). Αντίθετα, στατιστικώς σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στο χόνδρο σε σχέση με τον υμένα ($p < 0.001$).



Διάγραμμα 8. Η μεταβολή των επιπέδων του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂ μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γόνατος. *** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.001$, **** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.0001$.

4.2.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

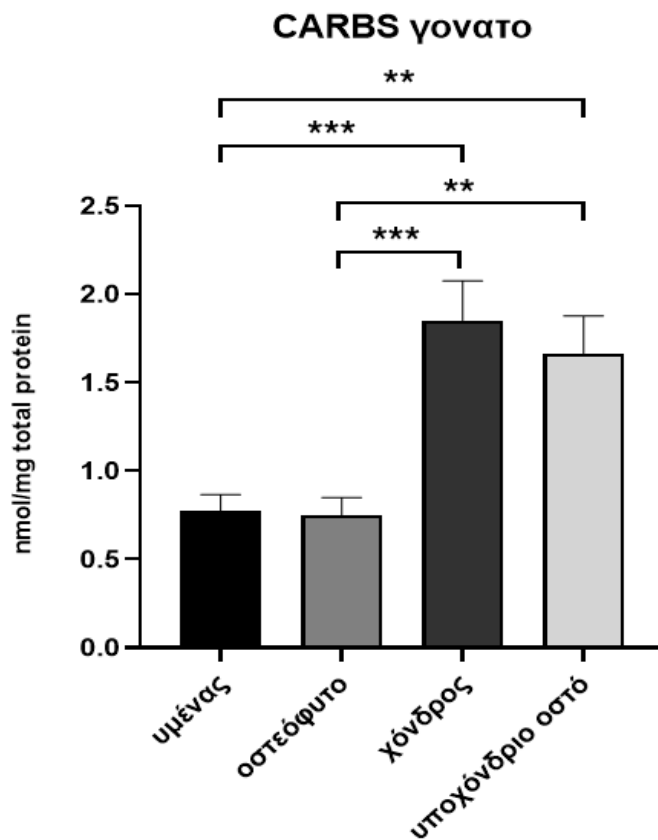
Στο Διάγραμμα 9, παρουσιάζονται οι στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική αύξηση των TBARS παρατηρήθηκε στο χόνδρο σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς. Επίσης, στατιστικώς σημαντική αύξηση των TBARS παρατηρήθηκε και στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με τον υμένα ($p < 0.001$).



Διάγραμμα 9. Η μεταβολή των επιπέδων TBARS μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γόνατος. ** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.01$, *** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.001$, **** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.0001$.

4.2.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Στο τελευταίο **Διάγραμμα 10**, απεικονίζεται η στατιστικώς σημαντική μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους ιστούς του γόνατος των ασθενών. Αναλυτικά, στατιστικώς σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο χόνδρο, σε σχέση με τον υμένα και το οστεόφυτο ($p < 0.001$), καθώς και στο υποχόνδριο οστό σε σχέση με τους δυο προηγούμενους ιστούς ($p < 0.01$).



Διάγραμμα 10. Η μεταβολή των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταξύ των τεσσάρων τύπων ιστών σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γόνατος. ** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.01$, *** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή $p < 0.001$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ), ένας εκ των πολλών τύπων αρθρίτιδας, είναι η πιο συχνή, χρόνια νόσος των αρθρώσεων και εμφανίζεται, συνηθέστερα, σε μεγαλύτερες ηλικίες, μεταξύ 55-64 ετών. Προσβάλλει διάφορους τύπους άρθρωσης, όπως το γόνατο, το ισχίο ή τον καρπό του χεριού και οδηγεί σε ανεπιθύμητες καταστάσεις δυσκαμψίας, ευαισθησίας και πόνου στους ασθενείς, ειδικότερα σε πιο προχωρημένα στάδιά της. (Xia et al., 2014) Αποτελεί μία πολύπλοκη και ετερογενή νόσο, που επηρεάζει συνολικά την παθοφυσιολογία των ιστών της άρθρωσης, όπως ο χόνδρος, ο υμένας και το υποχόνδριο οστό, ενώ τα ακριβή αίτια της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένα. Υποστηρίζεται ότι βασίζεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως το γήρας, η παχυσαρκία, το φύλο ή σε κάποιον τραυματισμό, αλλά μπορεί να έχει και γενετικό υπόβαθρο. Δεν υπάρχει κάποια θεραπεία για την ίασή της, παρά μόνο η χορήγηση φαρμάκων για την διαχείριση του πόνου, ενώ σε σοβαρές περιπτώσεις, το χειρουργείο είναι αναπόφευκτο. (Tong et al., 2022) Δεδομένου ότι, ήδη, πολύ μεγάλο μέρος του ενήλικου πληθυσμού υποφέρει στην καθημερινότητά του από συμπτώματα οστεοαρθρίτιδας και εκτιμάται η ραγδαία αύξηση των περιστατικών τα επόμενα χρόνια, σημαντική είναι η αναφορά τόσο στον κοινωνικό αποκλεισμό που βιώνει το άτομο, αφού αδυνατεί να πραγματοποιήσει βασικές συνήθειες, όσο στην οικονομική επιβάρυνση που βιώνουν τα κράτη. Οι οικονομικές επιπτώσεις της νόσου δεν περιορίζονται μόνο σε έξοδα διαχείρισής της, όπως φάρμακα εξάλειψης πόνου ή χειρουργεία, αλλά αφορούν και τη μειωμένη εργασία και παραγωγικότητα του ασθενούς, που ειδικά σε προχωρημένα στάδια, δεν μπορεί να ζήσει φυσιολογικά. Είναι, λοιπόν, προφανές πως απαιτείται πιο εντατική ερευνητική μελέτη σχετικά με την ακριβή προέλευση και τον περιορισμό της νόσου. (Bitton, 2009)

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερη συζήτηση γίνεται γύρω από την εξέλιξη και τη συσχέτιση της οστεοαρθρίτιδας και του οξειδωτικού στρες. Έχει αποδειχθεί η ύπαρξή του στην περιοχή των ιστών της άρθρωσης, που προκαλείται, κατά βάση, από το γήρας και τη χρόνια φλεγμονή (Inflammaging), μία φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού με το πέρασμα των χρόνων. (Loeser et al., 2016) Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενισχύει καταβολικές διαδικασίες και προκαλεί οξειδωτικές βλάβες στα μακρομόρια των κυττάρων. Οι

κυτταρικές λειτουργίες διαταράσσονται και πολλές φορές, ειδικά τα χονδροκύτταρα, οδηγούνται σε απόπτωση. Συνεπώς, επηρεάζεται αρνητικά το σύνολο της άρθρωσης, αφού η αποικοδόμηση των επιμέρους ιστών της την καθιστά ασταθής και ευαίσθητη στην κίνηση, εμποδίζοντας την να είναι λειτουργική για τον ασθενή. (Yui et al., 2016)

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση οξειδοαναγωγικών δεικτών σε ιστούς ασθενών που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα γόνατος ή ισχίου. Ειδικότερα, μελετώνται τέσσερις διαφορετικοί τύποι ιστών, ο υμένας, ο χόνδρος, το υποχόνδριο οστό και το οστεόφυτο, είτε από γόνατο, είτε από ισχίο, ιστοί που έχουν καθοριστικό ρόλο στην παθολογική άρθρωση. Οι τρεις πρώτοι συμβάλλουν στην κίνηση και τη λειτουργία της υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ ο τέταρτος ιστός, το οστεόφυτο, δημιουργείται κατά την εξέλιξη της νόσου.

Οι βιοδείκτες που μελετήθηκαν για το σκοπό αυτό είναι ο *in vivo* προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Activity, TAC), ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 μέσω της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης, ως δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών, καθώς και τα επίπεδα της πρωτεϊνικής (πρωτεϊνικά καρβονύλια) και λιπιδικής (TBARS) οξείδωσης, δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με οξειδωτική καταστροφή δομικών κυτταρικών μορίων. Οι βιοδείκτες αυτοί, υπολογισμένοι σε ομογενοποιημένο ιστό, αντανακλούν στις οξειδωτικές βλάβες του κυττάρου και στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών του μορίων. (Veskoukis et al., 2019)

Στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μία γενική εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς οστεοαρθρίτιδας. Τα μέχρι τώρα πειράματα αφορούν κυρίως την προσπάθεια των ερευνητών να επιβεβαιώσουν την παρουσία του στους ασθενείς, να αποσαφηνίσουν την πηγή του στα κύτταρα του χόνδρου, καθώς και να δοκιμάσουν διάφορα μόρια που πιθανόν να έχουν θεραπευτικό χαρακτήρα. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα υπό Osteoarthritis-like συνθήκες, με σκοπό τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης και τη δοκιμή ενός πιθανού θεραπευτικού μορίου (Zhu et al., 2020) ή, επίσης, έρευνες σχετικά με την μείωση αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη, σε άτομα νεαρά και μεγαλύτερα ηλικιακά, ώστε να επιβεβαιωθεί η μείωσή της με το πέρασμα του χρόνου (Carlo & Loeser, 2003). Τέλος, τα περισσότερα πειράματα έχουν γίνει σε δείγματα από το υγρό

του υμενικού ιστού, μετά από αρθροκέντηση, και, συνήθως, σκοπό αποτελούσε η σύγκριση ανάμεσα σε πρώιμα και πιο προχωρημένα στάδια της νόσου. (Ostalsowska et al., 2006)

Αξίζει, λοιπόν, να υπογραμμιστεί πως η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη διαφέρει από τις βιβλιογραφικά παλαιότερες, στα παρακάτω σημεία. Αρχικά, για πρώτη φορά μελετώνται ταυτόχρονα, και συγκρίνονται μεταξύ τους, και οι τέσσερις βασικοί ιστοί της παθολογικής, από οστεοαρθρίτιδα, άρθρωσης. Η αναφορά γίνεται για τον υμένα, το χόνδρο, το υποχόνδριο οστό και το οστεόφυτο. Η επιρροή και δυσλειτουργία του καθένα ξεχωριστά, αλλά και των τεσσάρων στο σύνολό τους, αποτελεί το βασικότερο γνώρισμα της νόσου, αφού, ακόμη και βάσει της Διεθνούς Ερευνητικής Κοινότητας της Οστεοαρθρίτιδας, η παθογένεια των ιστών αυτών ορίζει την διάγνωσή της (OARSI). Προφανής είναι, λοιπόν, η σημασία της μελέτης τους, αφού, έτσι, θα συσχετιστεί το οξειδωτικό στρες, μία κατάσταση αναπόφευκτη και επιβεβαιωμένα υπαρκτή στην οστεοαρθρίτιδα, με τους ιστούς που πλήττονται από τη νόσο. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως η συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, αφορά ιστούς ασθενών, αφού η δειγματοληψία έγινε κατά την εγχείρησή τους. Αυτό σημαίνει, πως οι μελέτες έγιναν σε ανθρώπινους ιστούς, δηλαδή δείγματα που αντικατοπτρίζουν την πραγματική κατάσταση μίας παθολογικής άρθρωσης στον άνθρωπο. Τέλος, τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν, αφορούσαν βιοδείκτες που επιβεβαιωμένα συσχετίζονται άρρηκτα με τα επίπεδα τόσο του οξειδωτικού στρες, όσο των αντιοξειδωτικών μορίων των κυττάρων. (Veskoukis et al., 2019)

Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, τέσσερις διαφορετικοί τύποι ιστών (υμένας, οστεόφυτο, χόνδρος, υποχόνδριο οστό) λήφθηκαν από σαράντα (n=40) ασθενείς που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα γόνατος ή ισχίου, ώστε να μελετηθούν οι πέντε βιοδείκτες που αναφέρονται παραπάνω. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν ξεχωριστά για τους ιστούς του γόνατος και του ισχίου.

Ξεκινώντας από τους ασθενείς που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα ισχίου (n=12), αξίζει να γίνει αναφορά στον προσδιορισμό του πιο σημαντικού ενδογενούς αντιοξειδωτικού του οργανισμού, την γλουταθειόνη. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης των δειγμάτων, και βάσει του **Διαγράμματος 1** παρατηρήθηκε η στατιστικώς σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης στον ιστό του χόνδρου, συγκριτικά με τον ιστό του υμένα, και του οστεόφυτου. Μέχρι

σήμερα, τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία που σχετίζονται με τα επίπεδα της γλουταθειόνης, σε ασθενείς που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα, αναφέρουν τα παρακάτω. Η γλουταθειόνη, έχει εκτιμηθεί σε κύτταρα χόνδρου (καλλιέργεια κυττάρων, *ex vivo*) υπό OA-like συνθήκες (π.χ. συνθήκες γήρατος κυττάρων), και ο προσδιορισμός της έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography, HPLC). Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα και ταυτόχρονη αύξηση της οξειδωμένης μορφής (GSSG). (Zhu et al., 2020). Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί εκτίμησή της σε καλλιέργειες χόνδρινου ιστού, από ασθενείς οστεοαρθρίτιδας αστραγάλου, και παρουσιάστηκε μείωση της GSH, ανάλογη με το πέρας της ηλικίας των ασθενών. Ουσιαστικά, στόχος ήταν, μετά την προσθήκη ενός προοξειδωτικού παράγοντα, να παρατηρηθεί η επιβίωση ή η απόπτωση των κυττάρων και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων βάσει του ηλικιακού διαχωρισμού των ασθενών (Carlo & Loeser, 2003).

Ο επόμενος βιοδείκτης που εκτιμήθηκε είναι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (TAC), η οποία αντανακλά στο συνολικό επίπεδο των αντιοξειδωτικών του. Σύμφωνα με το **Διάγραμμα 2**, εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική αύξηση στο χόνδρο σε σχέση με τους ιστούς του υμένα και του οστεόφυτου, και μεταξύ του οστεόφυτου και του υποχόνδριου οστού. Επιπλέον, είναι σημαντική και η εκτίμηση της δραστηριότητας κρίσιμων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Στην παρούσα διπλωματική, προσδιορίστηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω της ικανότητας του ενζύμου της Καταλάσης (CAT) να διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Στους ιστούς, στη διαδικασία αυτή, εκτός από το ένζυμο της καταλάσης, συμμετέχουν και άλλα ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειρεδοξίνες (Halliwell et al., 2000) (Makri et al., 2017). Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3**, παρατηρήθηκε αύξηση του βιοδείκτη στο υποχόνδριο οστό συγκριτικά με του υπόλοιπους τρεις ιστούς.

Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση δεικτών που σχετίζονται με οξειδωτικές βλάβες των κυττάρων, όπως τα TBARS, τα οποία αντανακλούν στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), στο **Διάγραμμα 4**, προέκυψε στατιστικώς σημαντική αύξηση των υπεροξειδωμένων λιπιδίων στο χόνδρο,

συγκριτικά με τους υπόλοιπους τρεις ιστούς. Τέλος, μετρώντας τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, δείκτης που αφορά την οξειδωση των πρωτεϊνών στο κύτταρο, στο **Διάγραμμα 5**, αξίζει να αναφερθεί πως ιδιαίτερα αυξημένα παρατηρούνται στο υποχόνδριο οστό, με το χόνδρο να ακολουθεί.

Συμπερασματικά, αξιολογώντας συνολικά τα στατιστικά αποτελέσματα των δειγμάτων ισχίου, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των περισσότερων ιστών για κάθε βιοδείκτη. Αυτό επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο του οξειδωτικού στρες για την παθογένεια της άρθρωσης, στην οστεοαρθρίτιδα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ιστός του χόνδρου. Φαίνεται να φέρει τα υψηλότερα ποσοστά ανηγμένης γλουταθειόνης (**Διάγραμμα 1**) και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (**Διάγραμμα 2**), βιοδεικτών που «καθρεπτίζουν» τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Ωστόσο, ταυτόχρονα, παρουσιάζει και τα υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένων λιπιδίων (**Διάγραμμα 4**), αλλά και αρκετά αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια (**Διάγραμμα 5**). Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αυτών οδηγεί στο εξής συμπέρασμα: Ο ιστός του χόνδρου επηρεάζεται περισσότερο και εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών στα βιομόριά του, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στην περιοχή. Ωστόσο, ταυτόχρονα, ο ίδιος, παρουσιάζει και τα υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών δεικτών (**Διάγραμμα 1 & 2**). Παρόμοια κατάσταση παρατηρείται και στο υποχόνδριο οστό, όπου τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων είναι τα υψηλότερα, αλλά και των TBARS εξίσου αυξημένα (**Διάγραμμα 4 & 5**), ενώ παράλληλα έχουν ενισχυμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων (**Διάγραμμα 1 & 2**), και ειδικά αντιοξειδωτικών ενζύμων, αφού εμφανίζουν το μέγιστο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 από ένζυμα, όπως η καταλάση (**Διάγραμμα 3**). Προκύπτει λοιπόν ότι, παρόλο που οι ιστοί του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού είναι εκείνοι που επηρεάζονται περισσότερο, αφού φαίνεται να έχουν αυξημένα τα επίπεδα των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (GSH, CAT), αυτή η αύξηση δεν είναι επαρκής ώστε να προστατεύσει αυτούς τους δύο ιστούς από τις οξειδωτικές βλάβες, που φαίνεται να προκαλεί η νόσος. Αυτό συμπεραίνεται από τα αυξημένα επίπεδα λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξειδωσης σε αυτούς τους δύο ιστούς, σε σχέση με τους άλλους δύο (υμένας και οστεόφυτο).

Όσον αφορά τον ιστό του γονάτου, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον. Υπολογίζοντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, στο **Διάγραμμα 6**, ο ιστός του χόνδρου παρουσίασε αύξηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας συγκριτικά με τους υπόλοιπους. Ακολουθεί το υποχόνδριο οστό, όμως, με αρκετά μικρότερη τιμή. Συνεχίζοντας με τη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών, στο **Διάγραμμα 7**, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών στους ιστούς του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού. Βιβλιογραφικά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα γονάτου, έχει εκτιμηθεί παλαιότερα, χωρίς να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδά της (Altay et al., 2015). Ο τελευταίος δείκτης αντιοξειδωτικής άμυνας των ιστών, στο **Διάγραμμα 8**, ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 , εμφανίστηκε υψηλότερος στο υποχόνδριο οστό συγκριτικά με τους υπόλοιπους τρεις. Στη συνέχεια, εκτιμώντας τις οξειδωτικές βλάβες των βιομορίων των ιστών, σημειώνεται ότι ο χόνδρος, και εδώ, εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά υπεροξειδωμένων λιπιδίων, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 9**, σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους ιστού της άρθρωσης, όπως, επίσης, τη μεγαλύτερη τιμή είχε και σε επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, όπως αυτό απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 10**. Σχετικά με την εκτίμηση των υπεροξειδωμένων λιπιδίων, παλαιότερες βιβλιογραφικά έρευνες υποδεικνύουν αυξημένα επίπεδα TBARS σε ασθενείς οστεοαρθρίτιδας, ωστόσο οι έρευνες αφορούσαν συγκρίσεις μεταξύ αρχικών και μεταγενέστερων σταδίων της νόσου, ή σε σχέση με ασθενείς ρευματοειδούς αρθρίτιδας. (Ostalowska et al., 2006) (Grigolo et al., 2003)

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των δειγμάτων του γονάτου, φάνηκε ότι από την εκτίμηση των πέντε βιοδεικτών παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους ιστών. Ωστόσο, όπως και στο ισχίο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ιστοί του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού. Από την μία πλευρά, ο χόνδρος, εμφανίζει υψηλές τιμές στους δείκτες που σχετίζονται με τις οξειδωτικές βλάβες (**Διάγραμμα 9 & 10**), αναφορικά τόσο στα TBARS, όσο και στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, ενώ την ίδια στιγμή έχει και τα υψηλότερα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (**Διάγραμμα 6**) και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (**Διάγραμμα 7**). Επίσης, και το υποχόνδριο οστό, παρουσίασε παρόμοιο μοτίβο. Δηλαδή, παρόλο που τα επίπεδα των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν υψηλά, ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν και αυξημένα επίπεδα στην οξείδωση των πρωτεϊνών και

των λιπιδίων τους (**Διάγραμμα 9 & 10**), (**Διάγραμμα 6 & 7 & 8**). Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν αυτές τις παρατηρήσεις, συμπεραίνεται, και πάλι, ό,τι προέκυψε και από τα αποτελέσματα στο ισχίο. Οι ιστοί του χόνδρου και του υποχόνδριου οστού επηρεάζονται περισσότερο, γεγονός που αποδεικνύεται από τα αυξημένα τα επίπεδα των δεικτών που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (GSH, CAT). Ωστόσο, η αύξηση αυτή δεν επαρκεί ώστε να τους προστατέψει από τις οξειδωτικές βλάβες, που επιφέρει η νόσος. Αυτό τεκμηριώνεται από την εμφάνιση υψηλών επιπέδων λιπιδικής και πρωτεϊνικής οξείδωσης, σε σχέση με τους άλλους δύο ιστούς, τον υμένα και το οστεόφυτο.

Ολοκληρώνοντας, αξίζει να επισημανθεί η καθοριστική σημασία της μελέτης των οξειδοαναγωγικών, αυτών, δεικτών, σε ιστούς ασθενών οστεοαρθρίτιδας, γόνατος ή ισχίου. Τόσο οι ίδιοι οι βιοδείκτες που μετρήθηκαν, όσο και οι τύποι ιστών που επιλέχθηκαν για έρευνα, είναι επιλεγμένοι στοχευμένα, καθώς χαρακτηρίζουν το προφίλ της άρθρωσης ενός ασθενούς. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία ισχυρή, πρώτη εικόνα του επιπέδου οξειδωτικού στρες κάθε ασθενή συνολικά, αλλά και της κατάστασης στην οποία βρίσκεται η παθολογική του άρθρωση. Θα μπορούσαν να είναι ένα σημαντικό θεμέλιο προς την μετέπειτα αποσαφήνιση τόσο πιο συγκεκριμένων αιτιών της νόσου, όσο και τη διερεύνηση νέων, πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτελούν μια πρώτη εκτίμηση κρίσιμων βιοδεικτών που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων, που πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα, αφού πάνω σε αυτό, δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία που να συσχετίζει τους δείκτες αυτούς με την παρουσία της νόσου.

Πιθανό μελλοντικό ερευνητικό βήμα θα μπορούσε να αποτελέσει η συσχέτιση των επιπέδων των βιοδεικτών με τον τύπο υμένα κάθε ασθενούς, δηλαδή παρουσία υμενίτιδας ή όχι, γεγονός που θα συσχετίσει την παρουσία έντονης φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες, ή, ακόμη, σύνδεση της εξατομικευμένης μακροσκοπικής εικόνας των ιστών (ακτινογραφία) με τα επίπεδα οξειδωτικού στρες του και τον τύπο της νόσου. Σε αυτό το σημείο θα μπορούσε, ίσως, να γίνει και κάποια διατροφική παρέμβαση, προκειμένου να ενισχυθεί περαιτέρω η αντιοξειδωτική άμυνα των ασθενών, ώστε να μειωθούν οι βλάβες που προκαλούνται από τη νόσο σε κρίσιμα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες). Επίσης, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε μία σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα,

αφού υποστηρίζεται πως τα θηλυκά άτομα εμφανίζουν συχνότερα τη νόσο, με πιο βαριά συμπτώματα, ή, ακόμη, και ηλικιακός διαχωρισμός των ασθενών, ώστε να εκτιμηθούν οι διαφορές στα επίπεδα των βιοδεικτών σε άτομα μικρότερης και μεγαλύτερης ηλικίας.

Σε κάθε περίπτωση, η διερεύνηση της νόσου της Οστεοαρθρίτιδας χρήζει υψίστης σημασίας, καθώς τα περιστατικά ασθενών της αυξάνονται ραγδαία τα τελευταία χρόνια και προβλέπεται να κορυφωθούν τα επόμενα. Η συστηματική έρευνα επί της νόσου θα βοηθήσει τόσο στην αποτελεσματική και έγκαιρη πρόληψή της, όσο και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των χρόνιων ασθενών της.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alagem-Shafir, M., Kivovich, E., Tzchori, I., Lanir, N., Falah, M., Flugelman, M. Y., Dinnar, U., Beyar, R., Lotan, N., & Sivan, S. S. (2014). The formation of an anti-restenotic/anti-thrombotic surface by immobilization of nitric oxide synthase on a metallic carrier. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 2304–2312. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.043>
- Altay, M. A., Ertürk, C., Bilge, A., Yaptı, M., Levent, A., & Aksoy, N. (2015). Evaluation of prolidase activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis: relationships with radiographic severity and clinical parameters. *Rheumatology International*, 35(10), 1725–1731. <https://doi.org/10.1007/s00296-015-3290-5>
- Ansari, M. Y., Ahmad, N., & Haqqi, T. M. (2020). Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110452>
- Barreto, G., Manninen, M., & K. Eklund, K. (2020). Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. *Biology*, 9(4), 65. <https://doi.org/10.3390/biology9040065>
- Bitton, R. (2009). The economic burden of osteoarthritis. *The American Journal of Managed Care*, 15(8 Suppl), S230-5.
- Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1–2), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.005>
- Carlo, M. Del, & Loeser, R. F. (2003). Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: Correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis & Rheumatism*, 48(12), 3419–3430. <https://doi.org/10.1002/art.11338>
- Coaccioli, S., Sarzi-Puttini, P., Zis, P., Rinonapoli, G., & Varrassi, G. (2022). Osteoarthritis: New Insight on Its Pathophysiology. *Journal of Clinical Medicine*, 11(20), 6013. <https://doi.org/10.3390/jcm11206013>
- Cucchiari, M., de Girolamo, L., Filardo, G., Oliveira, J. M., Orth, P., Pape, D., & Reboul, P. (2016). Basic science of osteoarthritis. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40634-016-0060-6>
- Das, S. K., & Farooqi, A. (2008). Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22(4), 657–675. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.07.002>
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

- Grigolo, B., Roseti, L., Fiorini, M., & Facchini, A. (2003). Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, 30(2), 345–347.
- Gu, J.-Y., Han, F., Chen, S.-Y., & Zhang, Q. (2023). Research progress and hot spot analysis related to oxidative stress and osteoarthritis: a bibliometric analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 24(1), 411. <https://doi.org/10.1186/s12891-023-06324-x>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- He, Y., Li, Z., Alexander, P. G., Ocasio-Nieves, B. D., Yocum, L., Lin, H., & Tuan, R. S. (2020). Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. *Biology*, 9(8), 194. <https://doi.org/10.3390/biology9080194>
- Herick, K. (2006). Columna de RP-HPLC universal RP-amida Ascentis. La primera elección para las separaciones por HPLC, ya sean rutinarias o especialmente difíciles. *The Reporter*, 5. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:169447138>
- Karachalios, T., & Berstock, J. R. (2022). Innovations in hip surgery: over the last 30 years. *HIP International*, 32(6), 708–710. <https://doi.org/10.1177/11207000221135386>
- Karachalios, T., Paridis, D., Tekos, F., Skaperda, Z., Veskoukis, A. S., & Kouretas, D. (2021). Patients Undergoing Surgery for Hip Fractures Suffer from Severe Oxidative Stress as Compared to Patients with Hip Osteoarthritis Undergoing Total Hip Arthroplasty. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/5542634>
- Katz, J. N., Arant, K. R., & Loeser, R. F. (2021). Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis. *JAMA*, 325(6), 568. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22171>
- Kolasinski, S. L., Neogi, T., Hochberg, M. C., Oatis, C., Guyatt, G., Block, J., Callahan, L., Copenhaver, C., Dodge, C., Felson, D., Gellar, K., Harvey, W. F., Hawker, G., Herzig, E., Kwoh, C. K., Nelson, A. E., Samuels, J., Scanzello, C., White, D., ... Reston, J. (2020). 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care & Research*, 72(2), 149–162. <https://doi.org/10.1002/acr.24131>
- Kruger, N. J. (2009). *The Bradford Method For Protein Quantitation* (pp. 17–24). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Lepetsos, P., & Papavassiliou, A. G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(4), 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.003>

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Loeser, R. F., Collins, J. A., & Diekman, B. O. (2016). Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(7), 412–420. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.65>
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., & van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Research Reviews*, 57, 100982. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100982>
- Magni, A., Agostoni, P., Bonezzi, C., Massazza, G., Menè, P., Savarino, V., & Fornasari, D. (2021). Management of Osteoarthritis: Expert Opinion on NSAIDs. *Pain and Therapy*, 10(2), 783–808. <https://doi.org/10.1007/s40122-021-00260-1>
- Makri, S., Kafantaris, I., Stagos, D., Chamokeridou, T., Petrotos, K., Gerasopoulos, K., Mpesios, A., Goutzourelas, N., Kokkas, S., Goulas, P., Komiotis, D., & Kouretas, D. (2017). Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.019>
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012). The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00200>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295–309.
- Ostalowska, A., Birkner, E., Wiecha, M., Kasperczyk, S., Kasperczyk, A., Kapolka, D., & Zon-Giebel, A. (2006). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.08.009>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pangrazzi, L., Balasco, L., & Bozzi, Y. (2020). Natural Antioxidants: A Novel Therapeutic Approach to Autism Spectrum Disorders? *Antioxidants*, 9(12), 1186. <https://doi.org/10.3390/antiox9121186>

- Pereira, D., Ramos, E., & Branco, J. (2014). Osteoarthritis. *Acta Médica Portuguesa*, 28(1), 99–106. <https://doi.org/10.20344/amp.5477>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Piacenza, L., Trujillo, M., & Radi, R. (2019). Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, 216(3), 501–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20181886>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Senthelal, S., Li, J., Ardeshirzadeh, S., & Thomas, M. A. (2024). *Arthritis*.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Stadtman, E. R. (2001). Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928(1), 22–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05632.x>
- Steinmetz, J. D., Culbreth, G. T., Haile, L. M., Rafferty, Q., Lo, J., Fukutaki, K. G., Cruz, J. A., Smith, A. E., Vollset, S. E., Brooks, P. M., Cross, M., Woolf, A. D., Hagins, H., Abbasi-Kangevari, M., Abedi, A., Ackerman, I. N., Amu, H., Antony, B., Arabloo, J., ... Kopec, J. A. (2023). Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*, 5(9), e508–e522. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00163-7)
- Tong, L., Yu, H., Huang, X., Shen, J., Xiao, G., Chen, L., Wang, H., Xing, L., & Chen, D. (2022). Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches. *Bone Research*, 10(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00226-9>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action

- of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., & Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
- Xia, B., Di Chen, Zhang, J., Hu, S., Jin, H., & Tong, P. (2014). Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. *Calcified Tissue International*, 95(6), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9917-9>
- Yui, N., Yudoh, K., Fujiya, H., & Musha, H. (2016). Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 5(1), 81–86. <https://doi.org/10.7600/jpfsm.5.81>
- Zahan, O.-M., Serban, O., Gherman, C., & Fodor, D. (2020). The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and Pharmacy Reports*. <https://doi.org/10.15386/mpr-1422>
- Zhu, S., Makosa, D., Miller, B., & Griffin, T. M. (2020). Glutathione as a mediator of cartilage oxidative stress resistance and resilience during aging and osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 61(1), 34–47. <https://doi.org/10.1080/03008207.2019.1665035>