



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

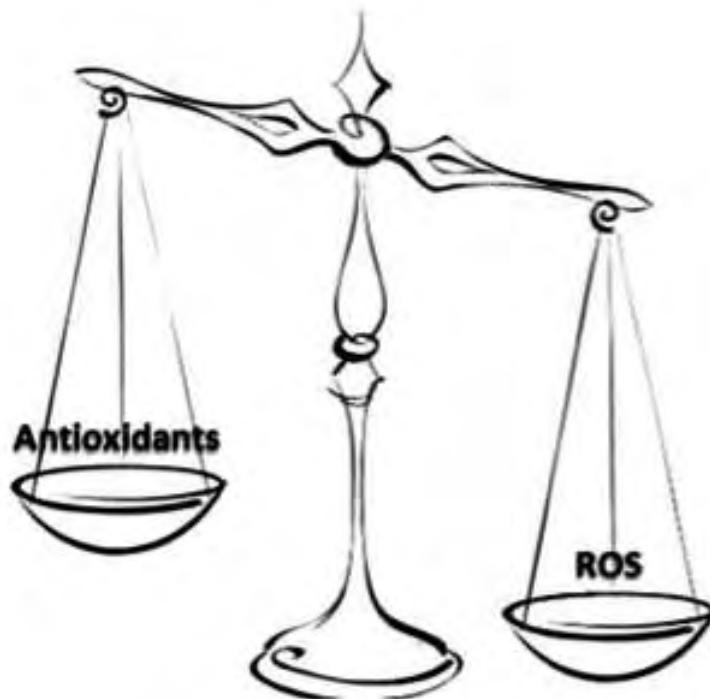
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ**

Oxidative Stress



Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα

Λάρισα 2016

Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

Assessment of oxidative stress levels in patients with multiple trauma and systemic inflammatory response.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Ζακυνθινός Επαμεινώνδας: Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τομέας Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις και για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, που μου έδωσε μια θέση στο εργαστήριο του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον Κ. Γερασόπουλο Κώστα για την πολύτιμη βοήθειά του.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.....	2
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	9
1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	9
1.1.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS).....	10
1.1.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ROS.....	12
1.1.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ROS.....	15
1.1.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.....	17
1.2 ΤΡΑΥΜΑ	23
1.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	23
1.2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ.....	23
1.2.3 ΕΙΔΗ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.....	26
1.3 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	27
1.3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	27
1.3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	28
1.3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ.....	30
1.3.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	30
1.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ, SIRS ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ	35
1.4.1 ΘΕΩΡΙΑ ΔΥΟ ΧΤΥΠΗΜΑΤΩΝ.....	35
1.4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROS ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	35
2 ΣΚΟΠΟΣ.....	41
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
3.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	42
3.1.1 ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC) ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.....	42
3.1.2 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	45
3.1.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ (PC).....	47

4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1	ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΑC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ SIRS ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ	51
4.2	ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΒΑRS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ SIRS ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ.....	52
4.3	ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ SIRS ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ.....	53
4.4	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΑC, ΤΒΑRS ΚΑΙ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ.....	54
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Περίληψη

Οξειδωτικό Στρες ορίζεται ως η ανισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των Δραστικών Ειδών Οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, υπέρ των πρώτων. Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις σύμφωνα με κλινικές μελέτες. Μία από τις πιο συχνές αιτίες πρόκλησης του οξειδωτικού στρες είναι το τραύμα.

Το τραύμα ακόμη παραμένει ένα από τους κυριότερους λόγους θανάτου παγκοσμίως. Η θνησιμότητα που εμφανίζεται σύντομα μετά την βλάβη οφείλεται στο «πρώτο χτύπημα», το οποίο συμπεριλαμβάνει το σοβαρό τραυματισμό οργάνου, την υποξία ή το κρανιοεγκεφαλικό τραύμα. Η βλάβη αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και η πρόωμη φλεγμονώδης ανοσιακή απόκριση μετά το τραύμα ορίζεται ως Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS). Το «δεύτερο χτύπημα», όπως μολύνσεις, ισχαιμία/επαναιμάτωση ή εγχειρήσεις μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την προφλεγμονώδη ανοσιακή απόκριση και έχει συσχετιστεί με την υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα σε μεταγενέστερο χρόνο από τον τραυματισμό. Το τραύμα προκαλεί ενεργοποίηση όλων των τοπικών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εξετάσει πως μεταβάλλεται το οξειδωτικό στρες με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αιμοληψία σε 11 ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και πολλαπλά τραύματα και προσδιορίστηκαν τρεις δείκτες οξειδωτικού στρες: η Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα του πλάσματος (TAC), η υπεροξειδωση των λιπιδίων (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών (CARBONYLS). Η εκτίμηση του οξειδωτικού στρες βασίστηκε στις 7 πρώτες μέρες νοσηλείας καθώς από την 8^η μέρα ο αριθμός των ασθενών μειωνόταν σημαντικά ($n < 3$). Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στην σύγκριση των ασθενών με τους φυσιολογικούς (κατά 48%) κατά την πρώτη μέρα νοσηλείας. Αντιθέτως, σε κανένα από τους άλλους δείκτες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τέλος κατά την σύγκριση των τριών δεικτών με τις τιμές βαρύτητας της ασθένειας, σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II παρατηρήθηκε ότι η βαρύτητα της ασθένειας δεν επηρεάζει τους δείκτες οξειδωτικού στρες.

Abstract

Oxidative Stress is defined as the imbalance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and the antioxidant mechanisms, in favor of the former. Oxidative stress has been associated with many disease conditions according to clinical studies. One of the most common causes of oxidative stress is trauma.

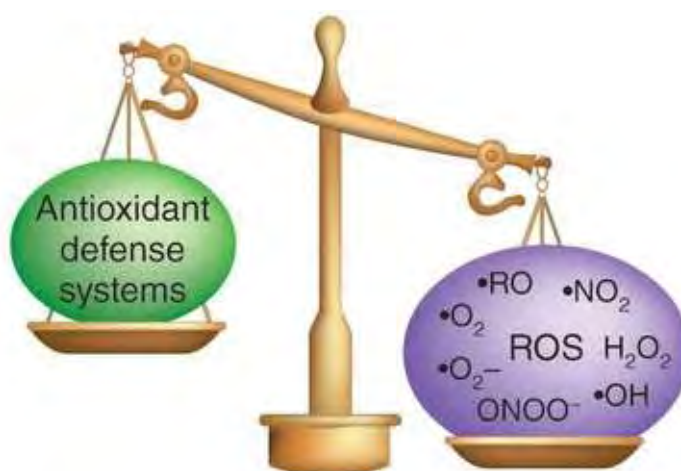
Trauma is still one of the main reasons for death among the population worldwide. Mortality occurring early after injury is due to "first hits", including severe organ injury, hypoxia, or head trauma. Injury leads to activation of the immune system, and the early inflammatory immune response after trauma has been defined as Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). "Second hits" such as infections, ischaemia/reperfusion or operations can further augment the pro-inflammatory immune response and have been correlated with the high morbidity and mortality in the latter times after trauma. Trauma causes activation of nearly all components of the immune system.

The purpose of the present study was to examine how oxidative stress levels vary in patients with multiple trauma and systemic inflammatory response syndrome in relation to time. For this purpose blood sampling was performed daily in 11 patients with systemic inflammatory response and multiple trauma and three oxidative stress markers in plasma were determined; Total Antioxidant Capacity of the plasma (TAC), lipid peroxidation (TBARS) and protein peroxidation (PROTEIN CARBONYLS). The evaluation of oxidative stress based on the first 7 days of hospitalization as well as after the 8th day the number of patients was reduced significantly ($n < 3$). The results exhibited a statistically significant increase by 48% of TBARS levels in the patients compared to control subjects on the first day of hospitalization. On the contrary, none of the other two markers displayed a significant change in any time point after hospitalization. Finally, by comparing the three markers with the disease severity values, according to the APACHE II scoring system, we concluded that the the severity of the disease did not affect the oxidative stress markers.

1. Εισαγωγή

1.1 Οξειδωτικό Στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού, υπέρ των πρώτων.¹ Συγκεκριμένα, έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων.



Εικόνα 1. Η αυξημένη παραγωγή ROS προκαλεί την δημιουργία Οξειδωτικού Στρες

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Το 1775 ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου». Το παράδοξο της αερόβιας ζωής ή «παράδοξο του οξυγόνου» είναι ότι εάν η παροχή οξυγόνου σε ανώτερους ευκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς δεν αντιστοιχεί με τις κανονικές μεταβολικές απαιτήσεις των ιστών, για οποιοδήποτε λόγο, θα προκύψει υποξία των ιστών με αποτέλεσμα τον κυτταρικό τραυματισμό ή/και θάνατο. Ωστόσο το οξυγόνο είναι εγγενώς τοξικό για αυτά τα ίδια κύτταρα και κατά συνέπεια για τους οργανισμούς^{2,3}.

Η παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου στα βιολογικά υλικά περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 50 χρόνια περίπου. Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα

πριν από τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershman et al το 1954⁴, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, το 1956, ο Denham Harman⁵ διατύπωσε την υπόθεση ότι οι ρίζες οξυγόνου μπορεί να παράγονται in vivo ως παραπροϊόντα των βιολογικών αντιδράσεων και περιέγραψε τις δραστικές ρίζες ως το «κακό περιεχόμενο του κουτιού της Πανδώρας», καθώς ήταν υπεύθυνο για την κυτταρική βλάβη, τη μεταλλαξιγένεση, τον καρκίνο και τις εκφυλιστικές διεργασίες βιολογικής γήρανσης⁶.

Έτσι, πριν από 31 χρόνια, το 1985 η έννοια του οξειδωτικού στρες εισήχθη για πρώτη φορά στην έρευνα της οξειδοαναγωγικής βιολογίας και ιατρικής, όπου ορίστηκε ως «*μια διαταραχή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων*»⁷. Το 2006, ο Dean Jones⁸ πρότεινε ότι «*το οξειδωτικό στρες μπορεί να ορισθεί καλύτερα ως διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου*» και το 2007, ο H. Sies⁹ επαναδιατύπωσε τον ορισμό, ορίζοντας το οξειδωτικό στρες ως «*μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, υπέρ των οξειδωτικών που οδηγεί σε διατάραξη της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και μοριακή βλάβη*»^{8,10}.

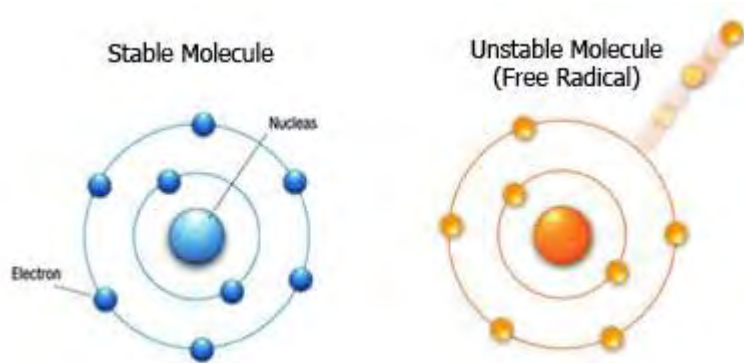
Με την πάροδο των χρόνων, λόγω της συνεχώς καλύτερης κατανόησης των επιβλαβών δράσεων του οξειδωτικού στρες, έγινε γνωστή η συμμετοχή του σε παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των νευρολογικών διαταραχών, της αθηροσκλήρωσης, της ισχαιμίας, του διαβήτη, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) και του άσθματος^{11,12}.

1.1.2 Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

Πριν από περίπου 2,45 δισεκατομμύρια χρόνια το ατμοσφαιρικό οξυγόνο αυξήθηκε απότομα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου που ονομάστηκε «Το Γεγονός της Μεγάλης Οξείδωσης» (*Great Oxidation Event*). Μια δεύτερη σημαντική αύξηση εμφανίστηκε περίπου 600 με 800 εκατομμύρια πριν και συνοδεύτηκε με οξυγόνωση των ωκεανών και ανάδειξη των πολυκύτταρων ζώων. Αυτή η αύξηση στην συγκέντρωση οξυγόνου επέτρεψε την αξιοποίηση των πλούσιων σε οξυγόνο πρωτεϊνών διαμεμβρανικής επικοινωνίας, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πολυκύτταρη ευκαρυωτική ζωή, για τα υψηλά μεταβολικά επίπεδα καθώς και για την ποικιλία νέων μεταβολικών αντιδράσεων. Τα υψηλά επίπεδα οξυγόνου οδήγησαν τελικά στην διαφοροποίηση και στην άνοδο των σύνθετων μορφών ζωής και στην επακόλουθη επίγεια εξάπλωση τους^{6,13}.

Ωστόσο, τα οφέλη που προσφέρει μια ατμόσφαιρα πλούσια σε οξυγόνο στην επίγεια ζωή συνοδεύονται με συνέπειες, από τις οποίες η βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, γνωστές και ως ελεύθερες ρίζες), είναι ίσως η πιο σημαντική. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αντιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών μορίων, προκαλώντας σημαντικές μοριακές βλάβες και παρεμβαίνουν ακόμα και στην κυτταρική λειτουργία¹⁴.

Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο προσδίδοντας στο μόριο σταθερότητα, καθώς εμφανίζουν μικρότερη ενεργειακή κατάσταση και κατά συνέπεια είναι λιγότερο δραστικά. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, και ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, δεν έχουν ζευγάρι, δηλαδή είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.



Εικόνα 2. *Αριστερά*: Σταθερό μόριο - *Δεξιά*: Δημιουργία ελεύθερης ρίζας, λόγω ασύζευκτου ηλεκτρονίου.

Η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλεται στην μοναδική δομή του ατόμου του. Κάθε άτομο οξυγόνου περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα. Επομένως, το στοιχειακό οξυγόνο θεωρείται ελεύθερη ρίζα. Ωστόσο, το οξυγόνο υπάρχει στην ατμόσφαιρα με την μορφή O_2 , και ως εκ τούτου περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα σπιν.

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κυτταρικής αναπνοής, το O_2 ανάγεται σε H_2O μέσω μιας διαδοχικής προσθήκης τεσσάρων ηλεκτρονίων, στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, δημιουργώντας έτσι την απαραίτητη χημική ενέργεια για την παραγωγή 36 μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Μέσω αυτού του μηχανισμού, το 98% του οξυγόνου μετατρέπεται σε νερό, ενώ το υπόλοιπο 2% υφίσταται μερική και ατελή αναγωγή λόγω της διαρροής ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο σχηματισμός των ενδιάμεσων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως είναι το σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})².

1.1.3 Παραγωγή ROS

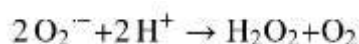
1.1.3.1 Ενδογενείς πηγές ROS

Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οξειδωσης των τροφών στα μιτοχόνδρια, τα οποία αποτελούν για το κύτταρο το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας, και της παραγωγής ενέργειας με την χρήση του οξυγόνου, παράγονται διάφορα υποπροϊόντα ανάμεσα στα οποία είναι και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο.¹²

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου είναι το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}). Η αναγωγή ενός ή δύο ηλεκτρονίων από το οξυγόνο σχηματίζει δύο μορφές ROS, το ανιόν σουπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, αντίστοιχα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να μετατραπούν σε πιο δραστικές μορφές, όπως η ρίζα υδροξυλίου.²

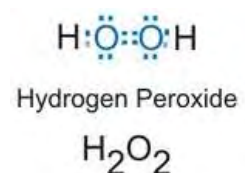
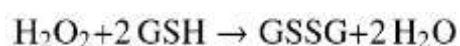
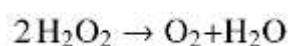
- Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται ύστερα από προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο και είναι, γενικά, η λιγότερο δραστική μορφή ROS. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από την οξειδάση του φωσφορικού νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου [NAD(P)H oxidase] ή την οξειδάση της ξανθίνης ή από το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου αδρανοποιείται ταχέως από το αντιοξειδωτικό ένζυμο δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η οποία το ανάγει σε υπεροξείδιο του υδρογόνου.¹²



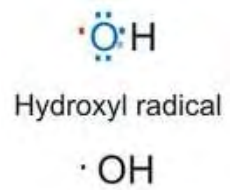
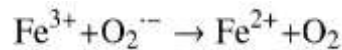
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι λιγότερο δραστικό από το ανιόν του σουπεροξειδίου και μετατρέπεται σε νερό μέσω της δράσης των ενζύμων, καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.²

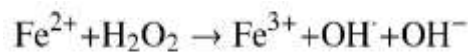


- Ρίζα υδροξυλίου(OH[•])

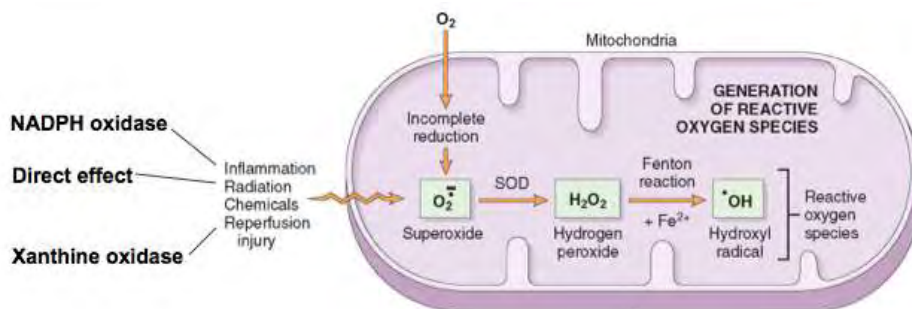
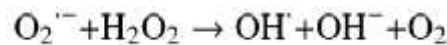
Παρουσία μετάλλων μετάπτωσης (π.χ. χαλκός, σίδηρος) η αντίδραση Haber-Weiss δημιουργεί τη δραστική ρίζα υδροξυλίου, η οποία αποτελεί την πιο δραστική μορφή ROS, και το ανιόν υδροξυλίου από υπεροξειδίο του υδρογόνου και ανιόν σουπεροξειδίου.¹⁵ Το πρώτο βήμα αυτής της αντίδρασης περιλαμβάνει αναγωγή του μετάλλου:



Το δεύτερο βήμα αυτής της αντίδρασης είναι γνωστό ως αντίδραση Fenton:



Η συνολική αντίδραση είναι η εξής:



Εικόνα 3. Διαδικασία δημιουργίας των ROS στο μιτοχόνδριο.

Εκτός από τα μιτοχόνδρια, παραγωγή ROS έχει παρατηρηθεί κι από ορισμένα κύτταρα που λαμβάνουν μέρος στην ανοσολογική απόκριση.

- Πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα, μονοπύρηννα και μακροφάγα

Κατά τη φαγοκυττάρωση, τα παραπάνω κύτταρα παράγουν μεγάλη ποσότητα σουπεροξειδίου, λόγω παρουσίας και δράσης της NAD(P)H οξειδάσης, το οποίο έχει βακτηριοκτόνο δράση. Στη συνέχεια, το σουπεροξειδίο μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου μέσω της δράσης δισμουτασών σουπεροξειδίου και διαχέεται εύκολα διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης.¹²

- Ουδετερόφιλα

Στα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου καταναλώνεται από την μυελοπεροξειδάση (MPO). Παρουσία ιόντος χλωρίου το H_2O_2 μετατρέπεται σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το οποίο είναι εξαιρετικά οξειδωτικό και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση παθογόνων στους αεραγωγούς.¹²

1.1.3.2 Εξωγενείς πηγές ROS

- Καπνός τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλά οξειδωτικά, ελεύθερες ρίζες και οργανικές ενώσεις, όπως το σουπεροξειδίο και το οξειδίο του αζώτου. Επιπλέον, η εισπνοή του καπνού ενεργοποιεί ορισμένους ενδογενείς μηχανισμούς ένας από τους οποίους είναι η συσσώρευση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, τα οποία αυξάνουν περαιτέρω την οξειδωτική βλάβη.¹²

- Έκθεση στο όζον

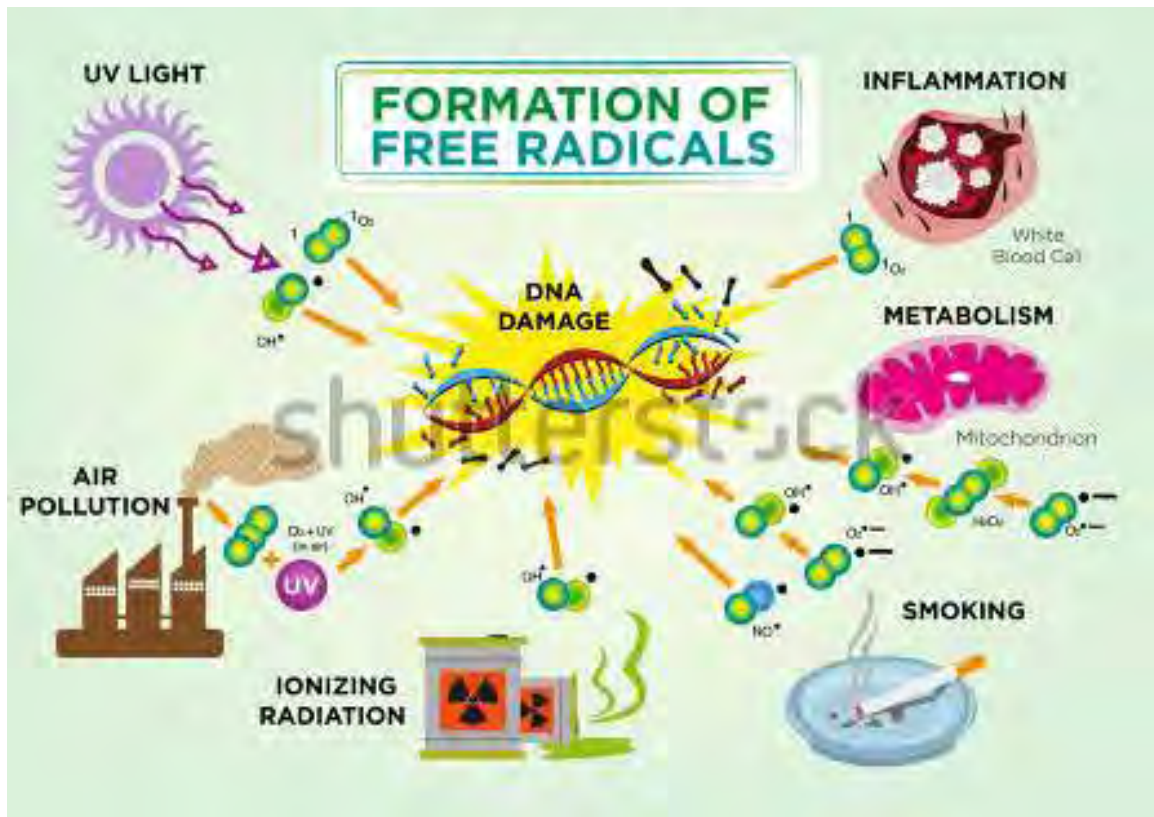
Η έκθεση στο όζον μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση των λιπιδίων και να επάγει την εισροή των ουδετερόφιλων στο επιθήλιο των αεραγωγών. Μικρής διάρκειας έκθεση μπορεί, επίσης, να προκαλέσει απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως η MPO.¹⁶

- Ιονίζουσα ακτινοβολία

Η ιονίζουσα ακτινοβολία παρουσία οξυγόνου μετατρέπει τη ρίζα υδροξυλίου το σουπεροξειδίο και οργανικές ρίζες σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και οργανικά υπεροξειδία. Αυτά τα είδη υπεροξειδίων αντιδρούν με ενεργά οξειδοαναγωγικά ιόντα μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton επάγοντας έτσι το οξειδωτικό στρες.¹²

- Ιόντα βαρέων μετάλλων

Τα ιόντα βαρέων μετάλλων, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, τα κάδμιο, ο υδράργυρος, το νικέλιο και το αρσενικό, μπορούν να επάγουν την παραγωγή δραστικών ριζών και να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη μέσω μείωσης της δράσης των ενζύμων, διαμέσου της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και αντίδρασης με πυρηνικές πρωτεΐνες και DNA.¹²



Εικόνα 4. Οι εξωγενείς και ενδογενείς πηγές δημιουργίας των ROS.

1.1.4 Επιπτώσεις των ROS

1.1.4.1 Θετικές επιπτώσεις

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν σε διαδικασίες σημαντικές για την λειτουργία του οργανισμού και εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά. Συγκεκριμένα, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες-στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες, όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών. Σύμφωνα με έρευνες, οι ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως υποστρώματα ενζύμων, όπως παραδείγματος χάριν η χρήση του H_2O_2 ως υπόστρωμα από τις υπεροξειδάσες της αίμης, που εμπλέκονται στην ιωδίωση των ορμονών του θυρεοειδή αδένου. Επιπλέον, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, καθώς οι δραστικές ρίζες οξυγόνου ενισχύουν την βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων¹⁷. Επιπρόσθετα, ROS που απελευθερώνονται από αιμοπετάλια που βρίσκονται σε

περιοχή που έχει υποστεί πληγή αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση ακόμη περισσότερων αιμοπεταλίων καθώς και λευκοκυττάρων στην συγκεκριμένη περιοχή. Τέλος, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό (ιδιαίτερα το H_2O_2), την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και εμπλέκονται στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

1.1.4.2 Αρνητικές επιπτώσεις

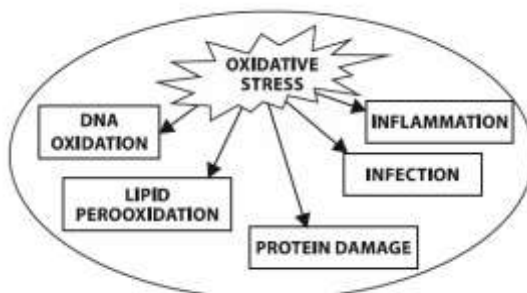
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν τη βλάβη κυτταρικού ιστού είτε μέσω τροποποίησης λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA, τα οποία μπορούν να εκθέσουν σε κίνδυνο την υγεία και τη βιωσιμότητα του κυττάρου, είτε επάγοντας ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις μέσω παραγωγής δευτερευόντων δραστικών ειδών, οδηγώντας τελικά στο κυτταρικό θάνατο λόγω νέκρωσης ή απόπτωσης¹⁸.

Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες στην οξειδωση εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Γι' αυτό το λόγο, η υπεροξειδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τις ROS οδηγεί σε διαταραχή της οργάνωσης της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, γεγονός το οποίο μπορεί να απενεργοποιήσει υποδοχείς και ένζυμα που είναι συνδεδεμένα στην μεμβράνη, καθώς και σε αύξηση της διαπερατότητας των ιστών. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την «επίθεση» της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Κατά το δεύτερο στάδιο, μετά την απόσπαση του υδρογόνου, το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής του δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Στο τρίτο και τελικό στάδιο, όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει $ROO\cdot$ κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο¹⁹.

Όσο αφορά τις πρωτεΐνες, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν θρυμματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας, μεταβολή του ηλεκτρικού φορτίου των πρωτεϊνών, cross-linking των πρωτεϊνών και οξειδωση συγκεκριμένων αμινοξέων που οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας στην πρωτεόλυση

μέσω αποικοδόμησης από συγκεκριμένες πρωτεάσες. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα στην οξείδωση με αποτέλεσμα να αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες. Επομένως, η αλληλεπίδρασή τους με τις ROS προκαλεί αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και αποικοδόμησή τους, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, μεταβολή των κυτταρικών λειτουργιών καθώς και αλλαγές στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών¹⁹⁻²³.

Στην περίπτωση του DNA, οι ROS μπορούν να οδηγήσουν σε τροποποιήσεις του με διάφορους τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν αποικοδόμηση των βάσεων, «σπάσιμο» μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, μεταλλάξεις, ελλείψεις ή μετατοπίσεις και cross-linking με πρωτεΐνες. Οι περισσότερες από αυτές τις μετατροπές σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την καρκινογένεση, την γήρανση και με τις νευροεκφυλιστικές, καρδιαγγειακές και αυτοάνοσες ασθένειες.

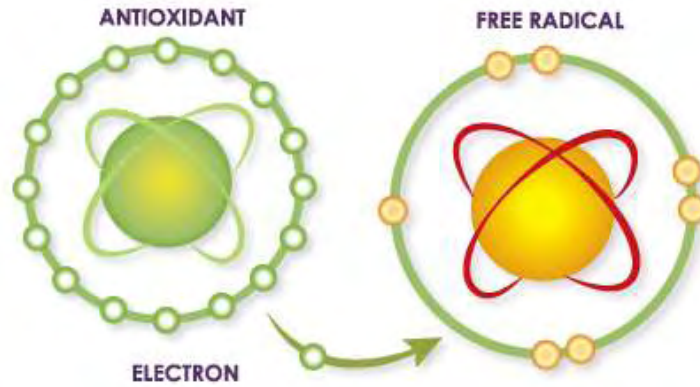


Εικόνα 5. Οι αρνητικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στους ιστούς

Εν κατακλείδι, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην σωστή και ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι έχουν τόσο ευεργετικές όσο και επιβλαβείς συνέπειες για την υγεία. Πρέπει να διατηρείται η ισορροπία των επιπέδων των υπεροξειδίων, καθώς η διατάραξη αυτής θα είχε ως αποτέλεσμα την βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο²⁴.

1.1.5 Αντιοξειδωτικά μόρια

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία, όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Τα αντιοξειδωτικά δρουν δανείζοντας ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παρέχουν μία θωράκιση στο σώμα μας (μία δηλαδή αντιοξειδωτική προστασία).



Εικόνα 6. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Το ανθρώπινο σώμα είναι εφοδιασμένο με ένα πλήθος αντιοξειδωτικών που εξυπηρετούν στην εξισορρόπηση έναντι της δράσης των οξειδωτικών. Οι μηχανισμοί δράσης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τους ενζυμικούς και τους μη-ενζυμικούς.

➤ Ενζυμικοί μηχανισμοί

Τα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η 1-οξυγενάση της αίμης καθώς και οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες.^{12,25}

I. Δισμουτάση του σουπεροξειδίου

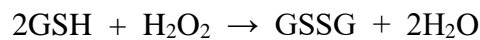
Η δισμουτάση του υπεροξειδίου καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 . Καθώς το σουπεροξειδίο είναι η βασική ROS που παράγεται από ένα πλήθος πηγών η μετατροπή του από τη SOD είναι πρωταρχικής σημασίας για κάθε κύτταρο. Έχουν βρεθεί τρεις μορφές της SOD: η κυτταροπλασματική CuZn- SOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD.

II. Καταλάση

Το H_2O_2 που παράγεται από τη δράση των δισμουτασών του υπεροξειδίου ή από τη δράση των οξειδασών, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, ανάγεται σε νερό και οξυγόνο από την καταλάση. Το μόριο της καταλάσης είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από 4 πανομοιότυπα μονομερή, καθένα από τα οποία περιέχει μία ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο. Επιπλέον, η καταλάση δεσμεύει NADPH ως αναγωγικό ισοδύναμο για να αποτρέψει την οξειδωτική απενεργοποίηση του ενζύμου από το H_2O_2 καθώς αυτό ανάγεται σε νερό.¹²

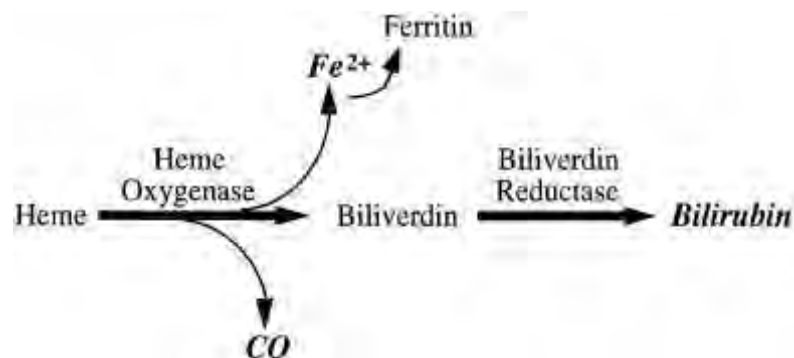
III. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων (που παράγονται από την υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων). Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια τετραμερών ενζύμων που περιέχουν ένα μοναδικό αμινοξύ σελήνιο-κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο και χρησιμοποιούν θειόλες μικρού μοριακού βάρους όπως η γλουταθειόνη για να ανάγουν το H_2O_2 και τα υπεροξείδια των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες.^{12,26} Κατά την διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται:



IV. Οξυγενάση της αίμης

Η οξυγενάση της αίμης (OH) υφίσταται ως μία επαγωγίμη ισομορφή (OH-1) καθώς και δύο δομικές ισομορφές (OH-2, OH-3). Ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών παραγόντων, περιλαμβανομένων λιποπολυσακχαριτών, υπεροξειδίου του υδρογόνου και θερμικού σοκ, μπορούν να οδηγήσουν σε έκφραση της OH-1, με αποτέλεσμα την κατάταξή της στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp 32). Η οξυγενάση της αίμης δημιουργεί χολοπρασίνη (biliverdin), η οποία μετατρέπεται σε χολερυθρίνη (bilirubin), μέσω δράσης της αναγωγάσης της χολοπρασίνης (biliverdin reductase), δρώντας έτσι ως ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό. Επιπλέον δημιουργεί μονοξείδιο του άνθρακα, το οποίο πρόσφατα κέρδισε το ενδιαφέρον ως ένα μοναδικό μόριο σηματοδότησης με αντιφλεγμονώδεις και αντι-αποπτωτικές δράσεις.²



Εικόνα 7. Ενζυμική δράση της οξυγενάσης της αίμης (OH-1)

➤ Μη-ενζυμικοί μηχανισμοί

Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως βιταμίνες, β-καροτένιο, ουρικό οξύ και γλουταθειόνη.^{12,27}

I. Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

Η λιποδιαλυτή βιταμίνη E συγκεντρώνεται στο υδροφοβικό εσωτερικό των κυτταρικών μεμβρανών και αποτελεί κύρια άμυνα κατά βλαβών των μεμβρανών που επάγονται από τα οξειδωτικά. Η βιταμίνη E δίνει ηλεκτρόνια στις ρίζες υπεροξειδίου οι οποίες παράγονται κατά την λιπιδιακή υπεροξείδωση. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης E και το κυριότερο αντιοξειδωτικό που συνδέεται στη μεμβράνη του κυττάρου. Τέλος, η βιταμίνη E πυροδοτεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

II. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C παρέχει ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα υδατικής φάσεως κυρίως μέσω απομάκρυνσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Επίσης, μετατρέπει τις ελεύθερες ρίζες της βιταμίνης E πίσω σε βιταμίνη E. Τέλος συμμετέχει στη σύνθεση του κολλαγόνου, στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών.

III. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι άφθονη σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα και αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον βασικό ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης²⁶. Απαντά σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη μορφή (GSSG) και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω αναστρέψιμης οξείδωσης της θειόλης της.²⁸ Η αναλογία GSH/GSSG είναι ένας σημαντικός καθοριστής του οξειδωτικού στρες. Η GSH δείχνει τις αντιοξειδωτικές δράσεις της με διάφορους τρόπους καθώς αποτοξικοποιεί το H₂O₂ και των λιπιδίων μέσω δράσης της GSH-Px. Η GSH δίνει το ηλεκτρόνιο στο H₂O₂ ώστε να αναχθεί σε H₂O και O₂, ενώ η GSSG ανάγεται ξανά σε GSH από την αναγωγή της GSH η οποία χρησιμοποιεί NAD(P)H ως δότη ηλεκτρονίων. Η GSH είναι ένας συμπαράγοντας για διάφορα αποτοξικοποιητικά ένζυμα όπως η GSH-Px και η GST (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) και παίζει ρόλο στην μετατροπή της βιταμίνης C και E πίσω στην ενεργή τους μορφή. Κλείνοντας, η GSH προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση μέσω αλληλεπίδρασης με προ- και αντί-

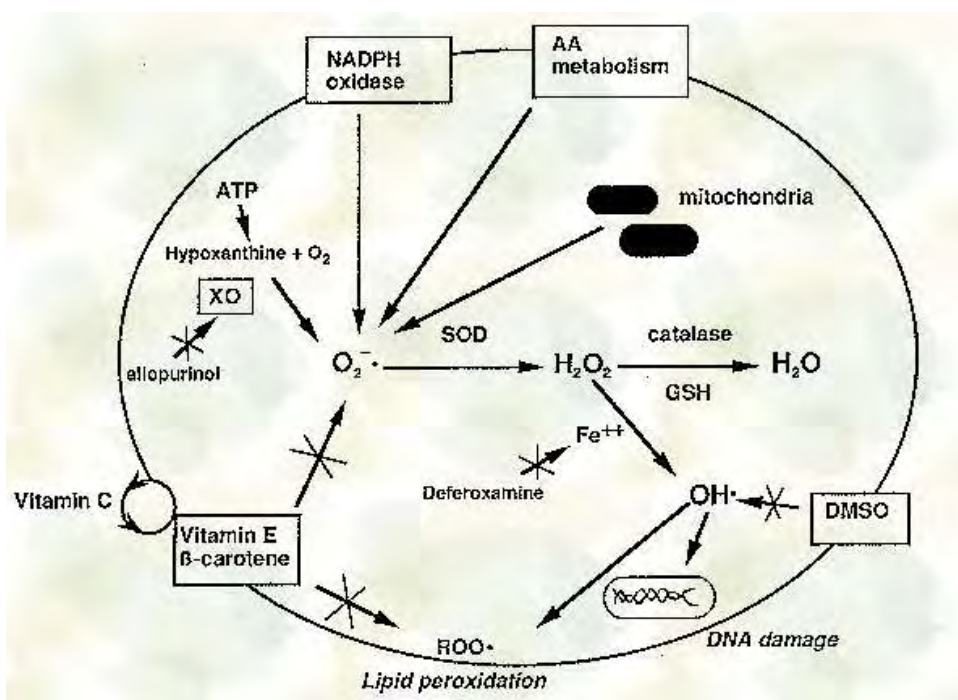
αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμίζει/ενεργοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως AP-1 και NF-kB.²⁹

IV. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή δείχνουν τις αντιοξειδωτικές τους επιδράσεις σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου αλλά μπορεί και να έχουν προ-οξειδωτικές επιδράσεις σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Το β-καροτένιο αναστέλλει την ενεργοποίηση του, την παραγωγή της δ-ιντερλευκίνης και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α που επάγονται από τα οξειδωτικά. Τέλος τα καροτενοειδή έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και να επηρεάζουν την απόπτωση των κυττάρων.

V. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος, το οποίο διαχέεται στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS³⁰.



Εικόνα 8. Δημιουργία ενδοκυτταρικού οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.1.5.1 Ρόλος των αντιοξειδωτικών

- Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.
- Ασκούν αντικαρκινική δράση : Μπλοκάρουν ή εμποδίζουν την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιούν καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα κι επιβραδύνουν τους μηχανισμούς καρκινογένεσης.
- Διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου.
- Προστατεύουν την καρδιά.

1.2 Τραύμα

1.2.1 Ορισμός

Τραύμα (trauma, injury, wound) ορίζεται στην Ιατρική ως η σωματική βλάβη, αιφνίδιας έναρξης και σοβαρότητας και απαιτεί άμεση ιατρική φροντίδα.³¹

Οι τραυματισμοί μπορεί να προκληθούν από ισχυρές φυσικές δυνάμεις, όπως μια πτώση ή ένα αυτοκινητιστικό ατύχημα, από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες, όπως η ζέστη, το κρύο και η ακτινοβολία ή από χημικές ουσίες, όπως τα δηλητήρια και οι διαβρωτικές ουσίες. Ένας άλλος παράγοντας είναι η ηλικία και ο τρόπος ζωής ενός ατόμου τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τον κίνδυνο τραυματισμού του^{32,33}.

Πολλαπλά τραύματα (multitrauma) ορίζονται ως οι φυσικές προσβολές ή τραυματισμοί που συμβαίνουν ταυτόχρονα σε πολλά μέρη του σώματος. Επιπλέον, ο όρος πολυτραύμα (polytrauma) μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα σύνδρομο συνδυασμένων τραυμάτων με Βαθμό Σοβαρότητας Τραυμάτων* μεγαλύτερο του 17.³⁴ Οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από πολλαπλά τραύματα τα οποία επηρεάζουν διάφορα όργανα και συστήματα του σώματος. Συγκεκριμένα, μπορεί να προσδιορισθεί όταν πραγματοποιείται σημαντικός τραυματισμός τουλάχιστον σε δύο από τις παρακάτω περιοχές του σώματος:

- Κεφάλι, λαιμός και αυχένας
- Πρόσωπο
- Στήθος και θώρακας
- Κοιλιά και σφυϊκή μοίρα
- Άκρα και οστά της λεκάνης
- Δέρμα

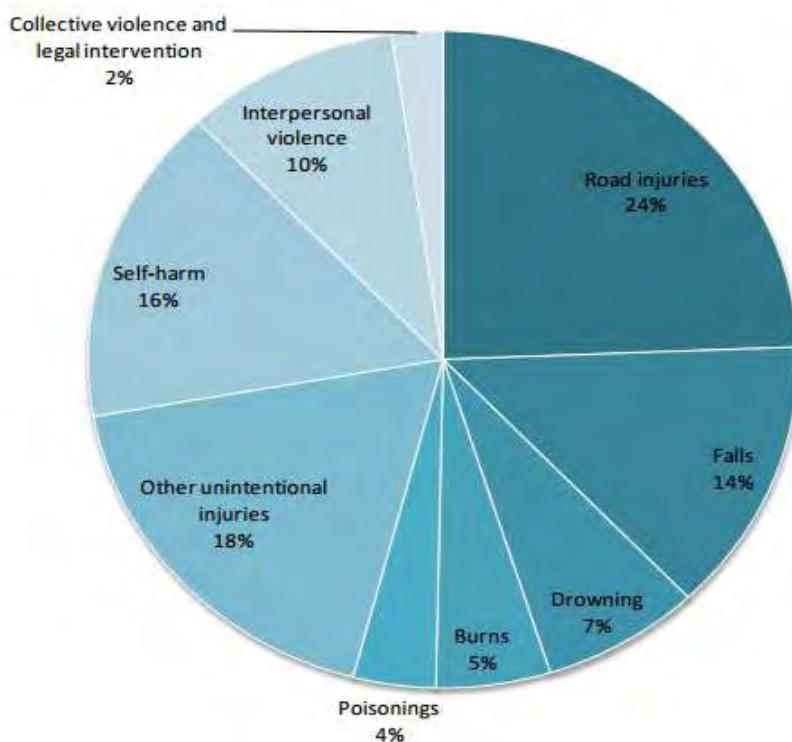
1.2.2 Επιδημιολογία τραύματος

Το τραύμα, το οποίο έχει οριστεί και ως «*παραμελημένη ασθένεια της σύγχρονης κοινωνίας*» είναι μια από τις κύριες αιτίες θανάτου σε όλες τις ηλικίες. Περίπου 16,000 άνθρωποι

* Ο Βαθμός Σοβαρότητας Τραύματος (*Injury Severity Score, ISS*) είναι μια καθιερωμένη ιατρική βαθμολόγηση που αξιολογεί την σοβαρότητα του τραύματος. Συσχετίζεται με την θνησιμότητα, τη νοσηρότητα και το χρόνο νοσηλείας μετά το τραύμα.

ISS score	Severity
1-9	Minor
10-15	Moderate
16-24	Moderate/Severe
≥ 25	Severe/Critical

καθημερινά (δηλαδή περίπου 5.8 εκατομμύρια το χρόνο) πεθαίνουν σε όλο τον κόσμο ως αποτέλεσμα ενός τραύματος και εκτιμάται ότι το 2020 θα αναμένονται 8.4 εκατομμύρια θάνατοι ανά χρόνο³². Καθώς αντιπροσωπεύει το 10% των θανάτων παγκοσμίως, έχει τοποθετηθεί ως αιτία θανάτου πάνω από την ελονοσία, τη φυματίωση και το HIV/AIDS^{35,36}.



Εικόνα 9. Θνησιμότητα λόγω τραυματισμού σε όλο τον κόσμο, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (2012)

Όσον αφορά τα πολλαπλά τραύματα, η θνησιμότητα εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό σε όλες τις ομάδες των ηλικιών με κοιλιακά τραύματα (36.9%, 33.3%, 64.1%). Στα παιδιά-πολύτραυματίες με θωρακικά τραύματα εμφανίζουν το επόμενο υψηλότερο επίπεδο θνησιμότητας (30,3%) ενώ για τους ενήλικες είναι οι πολυτραυματίες με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις (29,3%, 56,2%)³². (Εικ. 10)

Η θνησιμότητα για μεμονωμένα τραύματα και πολύ-τραύματα δεν εμφανίζεται σημαντικά διαφορετική ανάμεσα και παιδιά και ενήλικες που βρίσκονται σε ηλικία εργασίας, αλλά υπάρχει σημαντική αύξηση θνησιμότητας σε ηλικίες άνω των 65 ετών³⁵.

		0-15 years mortality %, No. of deaths	16-65 years mortality %, No. of deaths	>65 years mortality %, No. of deaths
Limb/pelvis (n)Isolated	49,200	0.1%10	0.9%263	6.8%750
Limb/pelvis (n)with polytrauma	18,904	12.2%236	13.1%1878	33.2%885
Head (n)isolated	25,776	6.9%371	12.9%2099	35.4 %1477
Head (n)with polytrauma	12,340	25.5%477	29.3%2579	56.2%941
Thorax (n)isolated	11,730	5.2%24	4.9%442	16%356
Thorax (n)with polytrauma	13,625	30.3%358	25.3%2704	54.9%973
Abdomen (n)isolated	2,625	2.1%10	5.1%104	22%24
Abdomen (n)with polytrauma	4,249	36.9%152	33.3%1152	64.1%239

Εικόνα 10. Ποσοστά θνησιμότητας, σε περιπτώσεις μεμονωμένου και πολλαπλού τραυματισμού, ανά ηλικιακή ομάδα. (1989-2007)

1.2.2.1 Αιτιολογία και Ευάλωτες ομάδες

Παρόλο που τραύματα εμφανίζονται σε ανθρώπους όλων των ηλικιών και στα δύο φύλα, τα περιστατικά είναι υψηλότερα στους νεαρά άτομα και κυρίως άνδρες, σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, λόγω ριψοκίνδυνης συμπεριφοράς όπως οδήγηση υπό επήρεια αλκοόλ και ναρκωτικών ουσιών και βίαιες συγκρούσεις. Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι οι άνδρες, μέχρι την ηλικία των 65 ετών, υπερισχύουν στη νοσηλεία για τραυματισμό. Στους ηλικιωμένους, παρόλο που η ριψοκίνδυνη συμπεριφορά είναι λιγότερο συχνή, τα τραύματα προκαλούνται λόγω δευτερευόντων ιατρικών ασθενειών και μυοσκελετικών παθήσεων, όπως για παράδειγμα η οστεοπόρωση που εμφανίζεται στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας και τις καθιστά πιο ευάλωτες σε τραυματισμούς από πτώσεις.³² Επιπλέον, ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για θανατηφόρο τραυματισμό σε ηλικιωμένους ασθενείς είναι ταυτόχρονη χρήση των αντιθρομβωτικών φαρμάκων, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτες σε αιμορραγία³⁵.

1.2.3 Είδη τραυμάτων

Τα είδη τραυμάτων μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις βασικούς τύπους:

- Αμβλύ τραύμα
Αποτελεί τον πιο συχνό μηχανισμό και οφείλεται συνήθως σε οδικές συγκρούσεις και σε περιστατικά που σχετίζονται με τον τραυματισμό. Τα σοβαρά κρανιακά τραύματα αποτελούν την πιο κοινή αιτία θανάτου και αναπηρίας.
- Διατρητικά τραύματα
Σχετίζονται κυρίως με την χρήση μαχαιριών και όπλων, αλλά εμφανίζονται και σε άλλα είδη ατυχημάτων, όπως οδικά. Στην Ευρώπη, αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% του σοβαρού τραυματισμού, αν και τα ποσοστά είναι υψηλότερα στις μητροπολιτικές περιοχές, ενώ σε μερικές πόλεις των ΗΠΑ και της Νότιας Αφρικής το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να φτάσει και ως το 50%.
- Τραύματα από έκρηξη
Εμφανίζονται συνήθως σε εμπόλεμες ζώνες και κατά τη διάρκεια βομβιστικής επίθεσης. Το κύμα έκρηξης μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον πνεύμονα, διάτρηση εντέρου, διάτρηση της μεμβράνης του τυμπάνου και κατάγματα.
- Θερμικά τραύματα
Προκαλούνται από θερμότητα, χημικά, ηλεκτρικό ρεύμα, το φως του ήλιου και ακτινοβολία. Υπάρχουν τρεις τύποι θερμικών τραυμάτων:
 1. Πρώτου Βαθμού εγκαύματα που προκαλούν ζημιά μόνο στο εξωτερικό στρώμα του δέρματος και προκαλούν πόνο, ερυθρότητα και πρήξιμο.
 2. Δευτέρου Βαθμού εγκαύματα που βλάπτουν και το εξωτερικό και το ακριβώς από κάτω στρώμα και προκαλούν πόνο, ερυθρότητα, πρήξιμο και φλύκταινες.
 3. Τρίτου Βαθμού εγκαύματα τα οποία προκαλούν βλάβη ή καταστρέφουν το βαθύτερο στρώμα του δέρματος και τους ιστούς που βρίσκονται από κάτω.^{31,35}

1.3 Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης

1.3.1 Ορισμός

Η εισαγωγή του όρου Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) από την κοινή σύνοδο της Αμερικανικής Πνευμονολογικής Εταιρίας (American College of Chest Physicians, ACCP) και της Εταιρίας Εντατικής Θεραπείας (Society of Critical Care Medicine, SCCM) το 1991, επιβεβαίωσε την αλλαγή της αντίληψης σχετικά με τη «σήψη», η οποία δεν κατανοείται πλέον ως αποκλειστικά μικροβιακής αιτιολογίας. Το SIRS αποτελεί την κλινική εκδήλωση της δράσης ενδογενών μεταβιαστών που εκκρίνονται ως αντίδραση σε διάφορα εκλυτικά αίτια. Σε αυτά τα αίτια συμπεριλαμβάνονται το βαρύ τραύμα. Εγκαύματα, λοιμώξεις, η παγκρεατίτιδα αλλά και εκλεκτικές χειρουργικές επεμβάσεις.³⁷

Με σκοπό την ικανοποιητική επικοινωνία μεταξύ των ερευνητών αλλά κυρίως την κατανόηση των φαινομένων που σχετίζονται με αυτό το σύνδρομο ήταν πρωταρχικής σημασίας ο ορισμός του SIRS αλλά και των σχετιζόμενων με αυτό εννοιών. Έτσι, λοιπόν, αξίζει να σημειωθούν τα παρακάτω:

Το *Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS)* ορίζεται ως η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση σε μια μεγάλη ποικιλία σοβαρών κλινικών συμβάντων, που εκδηλώνεται με δύο ή περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια³⁸:

- i. Θερμοκρασία μεγαλύτερη από 38°C ή μικρότερη από 36°C
- ii. Καρδιακή συχνότητα μεγαλύτερη από 90 σφίξεις/λεπτό
- iii. Αναπνευστική συχνότητα μεγαλύτερη από 20/λεπτό ή PaCO₂ μικρότερη από 32 mmHg
- iv. Λευκά αιμοσφαίρια περισσότερα από 12.000/mm³ ή λιγότερα από 4.000/mm³ ή περισσότερο από 10% άωρες μορφές

Η *σήψη* ορίζεται ως η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση σε πιθανή ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη, που εκδηλώνεται με δύο ή περισσότερα κριτήρια του SIRS.

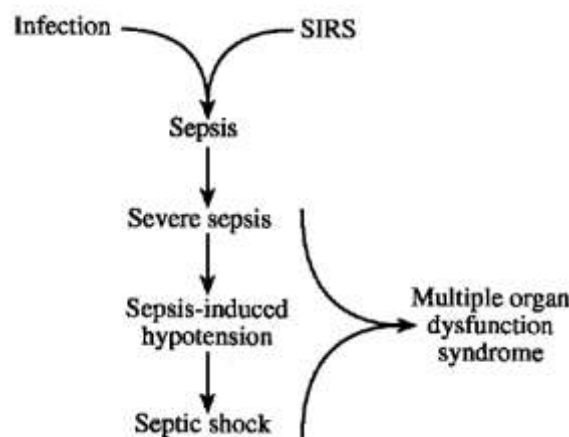
Η *βαριά σήψη* αποτελεί τη σήψη που σχετίζεται με δυσλειτουργία οργάνων, διαταραχές αιμάτωσης (γαλακτική οξέωση, ολιγουρία, υποξία, οξεία αλλαγή σε επίπεδο συνείδησης) ή υπόταση.

SIRS	Sepsis	Severe sepsis
Body temperature < 36°C or > 38°C	SIRS + suspected or confirmed infection	Sepsis + organ dysfunction(s)
HR > 90/min		Oliguria
Respiratory rate > 20/min or Hyperventilation PaCO ₂ < 32 mmHg		Acute alteration of mental status
WBC <4000 or > 12000/mm ³		Acute respiratory distress
Immature granulocytes > 10%		Circulation dysfunction(s)
		Hypotension or hypoperfusion
		Requirement of inotropic or vasopressor agents

Εικόνα 11. Κλινική διάγνωση του SIRS, της σήψης και της σοβαρής σήψης.

Το σηπτικό *shock* είναι υποκατηγορία της σοβαρής σήψης που συνοδεύεται από υπόταση, παρά την επαρκή χορήγηση υγρών, και συνυπάρχουσες διαταραχές της αιμάτωσης.

Το Σύνδρομο Πολλαπλής Οργανικής Ανεπάρκειας (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS*) ορίζεται ως η δυσλειτουργία των οργάνων σε οξείως πάσχοντες ασθενείς σε βαθμό τέτοιο ώστε η ομοιόσταση να μην μπορεί να διατηρηθεί χωρίς εξωτερική παρέμβαση.³⁹

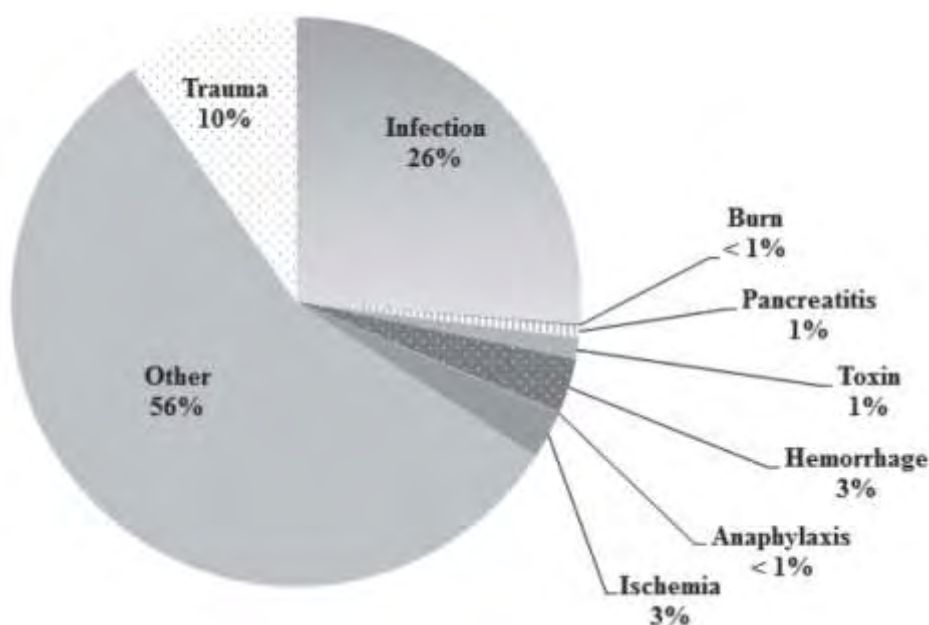


Εικόνα 12. Η εξέλιξη του SIRS σε πιο σοβαρές μορφές σήψης και η ανάπτυξη του MODS.

1.3.2 Επιδημιολογία

Η συχνότητα εμφάνισης του Συνδρόμου Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) είναι υπερβολικά υψηλή. Έχει υπολογιστεί ότι το 30% όλων των

νοσοκομειακών ασθενών, πάνω από το 50% των ασθενών των ΜΕΘ και πάνω από το 80% των χειρουργημένων ασθενών καλύπτουν τα κριτήρια του SIRS. Η φυσική ιστορία του SIRS μελετήθηκε ενδελεχώς από τον Rongel και τον Frausto. Σύμφωνα με αυτήν οι ασθενείς με SIRS είχαν 26% πιθανότητα να αναπτύξουν σήψη, 18% να αναπτύξουν σοβαρή σήψη και 4% να αναπτύξουν σηπτική καταπληξία. Όσα περισσότερα κριτήρια SIRS είχε ένας ασθενής τόσο πιο πιθανό ήταν να αναπτύξει σήψη, οξεία νεφρική ανεπάρκεια και καταπληξία. Επιπλέον, όσοι ασθενείς είχαν δύο κριτήρια SIRS είχαν 50% πιθανότητα να αναπτύξουν και τρίτο κριτήριο μέσα σε 7 μέρες. Η θνητότητα ήταν ανάλογη με την σοβαρότητα του SIRS και με το γεγονός αν αναπτυσσόταν ή όχι σηπτική καταπληξία. Η θνητότητα σε άτομα που δεν είχαν SIRS ήταν 2%, στους ασθενείς με δύο κριτήρια SIRS ήταν 6%, ενώ σε αυτούς με τρία κριτήρια ήταν 9% και στους ασθενείς με τέσσερα κριτήρια 18%. Τα ποσοστά αυτά διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν σήψη ή σοβαρή σήψη και είχαν θνητότητα 16% και 20%, αντίστοιχα. Τα παραπάνω καταδεικνύουν ότι η λοίμωξη που οδηγεί σε SIRS δεν αυξάνει ιδιαίτερα τη θνησιμότητα εκτός βέβαια αν υπάρχει σηπτική καταπληξία οπότε και ανέρχεται σημαντικά.⁴⁰



Εικόνα 13. Ενήλικες με SIRS και επακόλουθη κατηγοριοποίηση της ασθένειας, βασισμένη σε πρόβλεψη παρουσίας ασθενών σε τμήματα επειγόντων περιστατικών στις Ηνωμένες Πολιτείες (αριθμός επισκέψεων N=66.388.686) (2007-2010)

1.3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια

Η σοβαρότητα της ασθένειας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται μολυσματικές και μη μολυσματικές συνθήκες, χειρουργικές επεμβάσεις, τραύματα, χορήγηση φαρμάκων και θεραπείες.⁴¹

Στις μολυσματικές αιτίες του SIRS ανήκουν τα εξής:

- ✓ Βακτηριακή σήψη
- ✓ Λοιμώξεις που προκύπτουν από εγκαύματα
- ✓ Καντιντίαση
- ✓ Γρίπη
- ✓ Μηνιγγίτιδα
- ✓ Σύνδρομο Τοξικού Σοκ
- ✓ Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις
- ✓ Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος

Στις μη μολυσματικές αιτίες του SIRS περιλαμβάνονται τα παρακάτω:

- ✓ Αυτοάνοσα νοσήματα
- ✓ Εγκαύματα
- ✓ Επινεφριδιακή ανεπάρκεια
- ✓ Κίρρωση
- ✓ Αφυδάτωση
- ✓ Αιμορραγικό σοκ
- ✓ Παγκρεατίτιδα
- ✓ Κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών

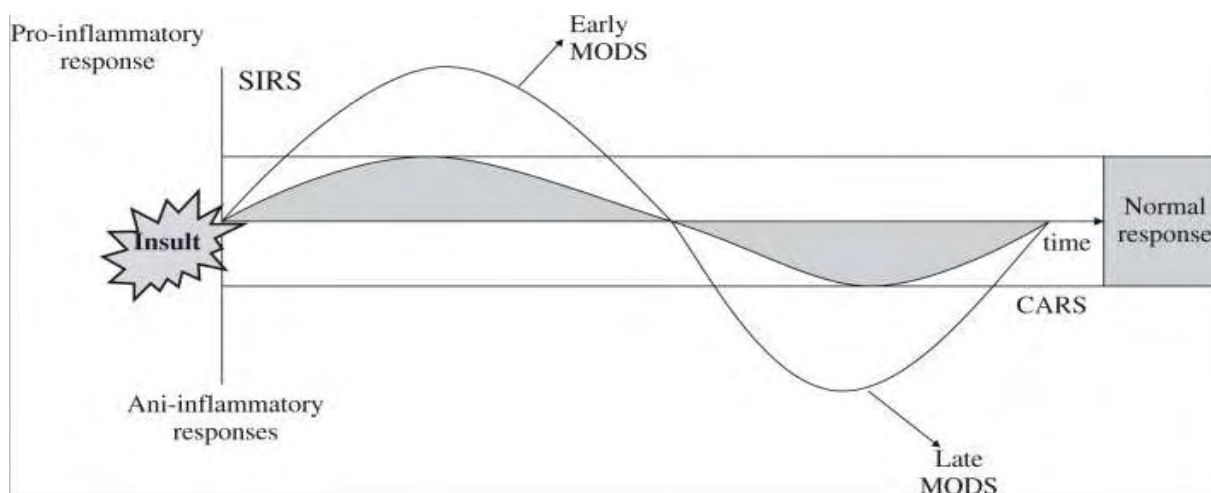
Όσον αφορά την ηλικία, οι ακραίες ηλικίες, δηλαδή νεαροί και ηλικιωμένοι, με ταυτόχρονη παρουσία άλλων νοσημάτων πιθανόν να έχουν μια αρνητική επίδραση στην εμφάνιση του SIRS.⁴¹

1.3.4 Παθοφυσιολογία

Το πρώτο και κύριο εμπόδιο για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του SIRS είναι ότι ο ορισμός δεν είναι συγκεκριμένος και το σύνδρομο είναι αρκετά ασαφές. Ένα ακόμη μεγαλύτερο πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι η έννοια του SIRS ενοποιεί πληθυσμούς ασθενών που έχουν πάνω από δύο κριτήρια της φλεγμονώδους

αντίδρασης. Έτσι οι ασθενείς που έχουν τα κριτήρια της φλεγμονώδους κατάστασης αποτελούν ένα πολύ μικρό ποσοστό από αυτούς που θα πεθάνουν, γιατί το SIRS αναγνωρίζεται μεν ως μία φλεγμονώδης κατάσταση, η οποία όμως στην πορεία της μπορεί να μεταπέσει σε αντιφλεγμονώδη αντίδραση. Αν αυτή η στροφή είναι χαμηλής έντασης οι ασθενείς συνήθως επιβιώνουν, ενώ αν δεν περιοριστεί, οι ασθενείς συνήθως αναπτύσσουν δευτεροπαθείς λοιμώξεις και πεθαίνουν.⁴²

Ο ελλιπής ορισμός του SIRS ως προφλεγμονώδης απάντηση αναγνωρίστηκε γρήγορα, καθώς κάθε προσπάθεια να αποκλεισθούν οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές δεν είχε κλινικό όφελος στους βαρέως πάσχοντες. Αυτό οδήγησε τον Roger Bone, μέλος του συνεδρίου του 1992, να προσδιορίσει το SIRS με την εξής δήλωση: «Πιστεύω ότι το μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε έχει μία βασική ατέλεια, είναι μονόπλευρο. Ο οργανισμός σε απάντηση στη φλεγμονώδη αντίδραση παράγει μία αντιφλεγμονώδη απάντηση». Ο Roger Bone ονόμασε αυτή την αντιφλεγμονώδη αντίδραση ως Σύνδρομο της Αντισταθμικής Αντιφλεγμονώδους Απάντησης (*Compensatory Antiflammatory Response Syndrome, CARS*) και καθόρισε ένα παθοφυσιολογικό μοντέλο που οδηγεί από το SIRS στο MODS.



Εικόνα 14. Η δυναμική των αλλαγών στο SIRS και CARS ως απόκριση στο τραύμα.

Το μοντέλο αυτό χωρίζεται σε πέντε στάδια: την τοπική αντίδραση, την αρχική συστηματική αντίδραση, τη μαζική συστηματική φλεγμονή, την εκτεταμένη ανοσοκαταστολή και την ανοσολογική δυσλειτουργία.⁴²

1. Τοπική Αντίδραση: Το SIRS δεν αναπτύσσεται αυτόματα παρά μόνο με την παρουσία κάποιου βλαπτικού παράγοντα όπως λοίμωξη, παγκρεατίτιδα, τραύμα και

έγκαιμα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες προκαλούν έκλυση διαφόρων προφλεγμονωδών μεταβιβαστών όπως οι κυτοκίνες, τα εικοσανοειδή και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αυτοί οι μεταβιβαστές κυκλοφορούν στην περιφέρεια και καταστρέφουν τους προσβεβλημένους ιστούς, προάγουν την ιστική ανάπτυξη και ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς, τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα ξένα αντιγόνα. Για να αποφευχθούν οι βλαπτικές συνέπειες από τους προφλεγμονώδεις διαβιβαστές ο οργανισμός σύντομα δημιουργεί μία αντιφλεγμονώδη απάντηση στην οποία συμμετέχουν οι IL-4, IL-10, IL-13 και διάφοροι άλλοι παράγοντες. Οι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες τροποποιούν την λειτουργία των μονοκυττάρων, εξασθενούν τη δραστηριότητα των αντιγόνων και μειώνουν την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν κυτταροκίνες. Αν ο αρχικός βλαπτικός παράγοντας είναι μικρός και ο ασθενής είναι υγιής η ομοιόσταση αποκαθίσταται γρήγορα.

2. Αρχική Συστηματική Αντίδραση: Αν ο αρχικός βλαπτικός παράγοντας είναι έντονος, οι προφλεγμονώδεις και αργότερα οι αντιφλεγμονώδεις μεταβιβαστές εμφανίζονται στην συστηματική κυκλοφορία. Ο μηχανισμός που εκλύει το παραπάνω φαινόμενο δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος. Η ύπαρξη αυτών των διαβιβαστών στην κυκλοφορία πρέπει να θεωρηθεί ως μια φυσιολογική απάντηση στην λοίμωξη ή στην βλάβη. Η παρουσία αυτών των παραγόντων καταδεικνύει ότι το μικροπεριβάλλον δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τον βλαπτικό παράγοντα. Οι προφλεγμονώδεις μεταβιβαστές κινητοποιούν τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξεως στο σημείο της βλάβης και ταυτόχρονα όμως ενεργοποιούν μια αντισταθμιστική συστηματική αντιφλεγμονώδη απάντηση για να κατασταλεί η προφλεγμονώδης αντίδραση. Σε κανονικές συνθήκες αυτό επιτυγχάνεται, εξαλείφεται η προφλεγμονώδης αντίδραση και αποκαθίσταται η ομοιόσταση του οργανισμού.

3. Μαζική Συστηματική Φλεγμονή: Σε ορισμένους ασθενείς η ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης αποτυγχάνει και ακολουθεί η μαζική συστηματική αντίδραση. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αντίδραση είναι αρχικά προφλεγμονώδης και παράγει τα κλινικά ευρήματα του SIRS. Αρχικά λαμβάνει χώρα δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ενώ αυξάνεται η διαπερατότητα των αγγείων της μικροκυκλοφορίας, η οποία οδηγεί σε οίδημα των οργάνων. Θραύσματα

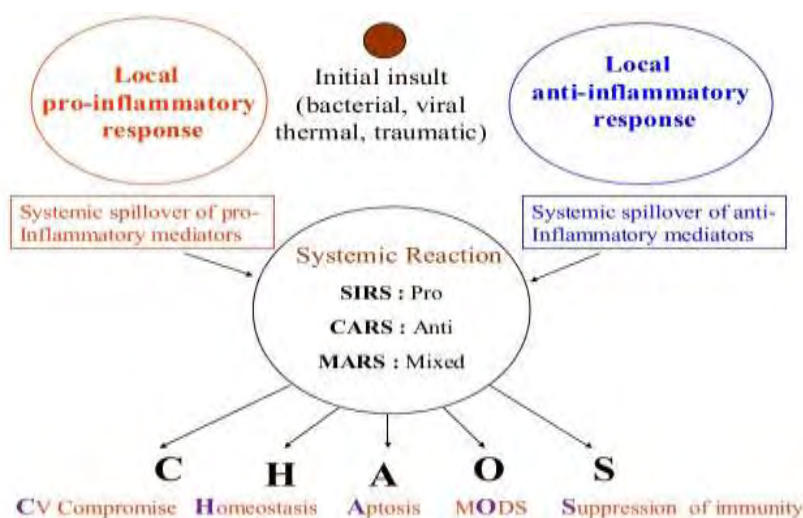
ενδοπεταλίων αποκλείουν την μικροκυκλοφορία και οδηγούν σε ισχαιμία. Η διαδικασία της πήξης ενεργοποιείται, ενώ παρατηρείται δυσλειτουργία των αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών μηχανισμών, η οποία συχνά ακολουθείται από καταπληξία που επιβαρύνει επιπλέον την αιματική ροή στα ζωτικά όργανα. Στο σημείο αυτό, αν δεν υπάρξει τρόπος άρσης όλων των παραπάνω διαδικασιών ακολουθεί δυσλειτουργία και ανεπάρκεια των οργάνων. Όλα αυτά μπορούν να συμβούν με τρεις τρόπους:

- α) η συγκέντρωση των προφλεγμονωδών διαβιβαστών είναι τόσο υψηλή που δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τους αντιφλεγμονώδεις διαβιβαστές.
- β) η συγκέντρωση των προφλεγμονωδών διαβιβαστών δεν είναι μεγάλη αλλά η έκλυση αντιφλεγμονωδών είναι ανεπαρκής.
- γ) αν και η ισορροπία ανάμεσα στους προ- και αντι-φλεγμονώδεις διαβιβαστές αρχικά επιτυγχάνεται, στην συνέχεια, η αλυσίδα των βλαπτικών αντιδράσεων συνεχίζεται είτε γιατί ο αρχικός βλαπτικός παράγοντας δεν μπορεί να ελεγχθεί, είτε γιατί προκύπτει και άλλος.

4. Εκτεταμένη Ανοσοκαταστολή: Πολλοί ασθενείς με εμμένουσα φλεγμονή πεθαίνουν γρήγορα από καταπληξία. Σε αυτούς που επιβιώνουν οι αντιφλεγμονώδεις μηχανισμοί είναι ικανοί να ελέγξουν την φλεγμονή. Σε κάποιους ασθενείς ωστόσο, η αντισταθμιστική αυτή αντίδραση είναι τόσο εκτεταμένη, όσο και η προφλεγμονώδης αντίδραση, με αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή. Αυτό το σύνδρομο εξηγεί την αυξημένη προδιάθεση σε λοιμώξεις στους ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα, αιμορραγία ή τραύμα. Η ανοσοκαταστολή οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Συνήθως έχουμε υψηλό αριθμό μονοκυττάρων αλλά με βασικές λειτουργικές βλάβες. Παρατηρείται μεταβολή της λειτουργίας των T και B λεμφοκυττάρων από την αυξημένη έκκριση γλυκοκορτικοειδών και κατεχολαμινών. Εμφανίζεται μείωση της λειτουργίας των μακροφάγων, ενώ καταστέλλονται τα T λεμφοκύτταρα και η χημειοταξία των ουδετερόφιλων. Ο τρόπος με τον οποίο ανατρέπεται η ανοσοκαταστολή δεν είναι ξεκαθαρισμένος, αλλά σίγουρα συμβάλλει η αναστολή έκκρισης της IL-10, καθώς και η διαφοροποίηση του μυελού των οστών με αυξημένη παραγωγή TNF- α , IL-1 και IL-6. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η εκτεταμένη ανοσοκαταστολή μπορεί να προκαλέσει μια αντισταθμιστική προφλεγμονώδη αντίδραση.

5. Ανοσολογική Δυσλειτουργία: Η ανοσολογική δυσλειτουργία είναι μια παθοφυσιολογική απάντηση του οργανισμού στον βλαπτικό παράγοντα, η οποία όμως προκαλεί πολλαπλές βλάβες. Μπορεί να πάρει διάφορες μορφές και στους περισσότερους ασθενείς είναι αποτέλεσμα της εμμένουσας φλεγμονής. Στην πλειοψηφία των ασθενών η παρατεινόμενη φλεγμονή προκαλεί ανεπάρκεια οργάνων και θάνατο. Σε κάποιους άλλους όμως η ανοσοκαταστολή είναι αυτή που προκαλεί ανοσολογική δυσαρμονία και αυξάνει τον κίνδυνο του θανάτου. Κάποιοι ασθενείς σε αυτό το στάδιο έχουν αυξημένους και τους προ- και τους αντί-φλεγμονώδεις διαβιβαστές. Οι ασθενείς με ανοσολογική δυσαρμονία είναι ικανοί να επανακτήσουν την λειτουργία των οργάνων, αν ο οργανισμός επανακτήσει την ισορροπία του, ενώ σε αντίθετη περίπτωση θα επακολουθήσει ανεπάρκεια οργάνων. Σε αυτό το στάδιο ο θάνατος μπορεί να αποφευχθεί μόνο αν οι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις διαδικασίες καταφέρουν να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση του οργανισμού.

Υπάρχουν τουλάχιστον δυο σενάρια που εξηγούν γιατί η ισορροπία μεταξύ των προ- και αντί-φλεγμονωδών διαδικασιών καταστρέφεται. Το πρώτο βασίζεται στο γεγονός ότι ο αρχικός βλαπτικός παράγοντας είναι τόσο έντονος που επιφέρει άμεσα την ανάπτυξη του SIRS. Το δεύτερο υποστηρίζει ότι πολλοί ασθενείς έχουν αυξημένους προ-διαθεσικούς παράγοντες για να αναπτύξουν SIRS, όπως προϋπάρχουσες παθήσεις σχετιζόμενες με μεταβολικά, νεοπλασματικά και ανοσολογικά νοσήματα, οι ηλικιωμένοι και αυτοί που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Οι περισσότερες από τις παραπάνω καταστάσεις σχετίζονται επιπλέον με παθολογικά επίπεδα κυτοκινών.



Εικόνα 15. Οι επιπτώσεις έκκρισης προ- και αντί-φλεγμονωδών μορίων.

1.4 Συσχέτιση Οξειδωτικού Στρες, SIRS και πολλαπλών τραυμάτων

1.4.1 Θεωρία δύο χτυπημάτων

Ο πολύπλοκος καταρράκτης της αμυντικής απάντησης του ξενιστή διεγείρεται από πρωταρχικές και δευτερεύουσες προσβολές, κάτι το οποίο είναι γνωστό και ως θεωρία δύο χτυπημάτων (*two-hit theory*). Ο τύπος και η σοβαρότητα του τραύματος στα κύρια όργανα ή τους μαλακούς ιστούς, που συνδέεται με μια ενεργοποίηση της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης αποτελεί τον πρωταρχικό τραυματισμό. Επιπλέον, δευτερεύοντες ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την σοβαρότητα των μετά-τραυματικών επιπλοκών. Οι τυπικά ενδογενείς (αντιγονικό φορτίο) δευτερεύοντες τραυματισμοί είναι η αναπνευστική δυσχέρεια με υποξία, επαναλαμβανόμενη καρδιαγγειακή αστάθεια, μεταβολική οξέωση, ισχαιμία/επαναιμάτωση τραυματισμών, νεκροί ιστοί και λοιμώξεις. Οι εξωγενείς δευτερεύοντες τραυματισμοί αντιπροσωπεύονται από χειρουργικές επεμβάσεις με σοβαρές βλάβες ιστών, υποθερμία ή απώλεια αίματος, ανεπαρκή ή καθυστερημένη χειρουργική ή εντατική θεραπεία καθώς και μαζικές μεταγγίσεις.³⁴

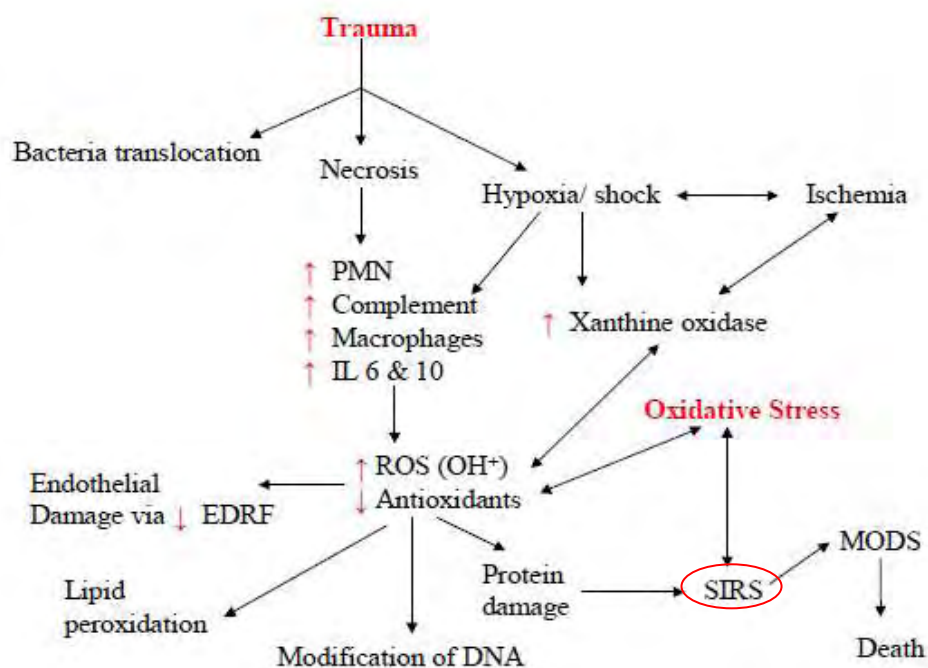
1.4.2 Ο ρόλος των ROS στο ανοσοποιητικό σύστημα

Οι ROS φαίνεται να προκαλούν έμμεση βλάβη του ιστού μέσω ενεργοποίησης των προφλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση των προφλεγμονωδών γονιδίων. Τα δραστικά είδη οξυγόνου προκαλούν αλλαγές σε σημαντικές ομάδες θειολών ή καταλοίπων αμινοξέων των πρωτεϊνικών κινάσων, που ενεργοποιούνται από τα μιτογόνα και των ρυθμιστικών τους φωσφατασών, τα οποία είναι σημαντικά συστατικά ενός εκτεταμένου δικτύου διασυνδεδεμένων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα μεσολαβούν στην μεταγωγή εξωκυτταρικών σημάτων τόσο σε επίπεδο υποδοχέων όσο και σε επίπεδο μεταγραφικών παραγόντων, όπως η AP-2 και ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB). Αυτές οι κινάσες ενεργοποιούν η μία την άλλη μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων, ενώ η απενεργοποίηση τους μεσολαβείτε από τις φωσφατάσες μέσω αποφωσφορυλίωσης.^{2,43,44}

Ο NF-κB εμφανίζεται ως γενικός διακόπτης ή σημείο ελέγχου για την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού προφλεγμονωδών γονιδίων. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μέρος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA ως ομο- ή ετεροδιμερή για να

επάγουν τη σύνθεση κυτοκινών. Ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε σύζευξη με ένα αναστολέα πρωτεϊνών (IκB)ο οποίος εμποδίζει τη μετανάστευσή του στον πυρήνα.

Επιπλέον, μεγάλη παραγωγή των ROS μειώνει την ικανότητα του Nrf2 να μεταφερθεί στον πυρήνα, οδηγώντας σε ανεπάρκειά του στον πυρήνα. Φυσιολογικά ο Nrf2 συνδέεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης στο DNA του πυρήνα με αποτέλεσμα την επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Συνεπώς, μείωση του Nrf2 προκαλεί μια ανισορροπία στο οξειδοαναγωγικό σύστημα, υπέρ της οξειδωτικής κατάστασης.⁴⁵



Εικόνα 16. Ο μηχανισμός με τον οποίο το τραύμα προκαλεί οξειδωτικό στρες και SIRS, μέσω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος.

- Κυτοκίνες

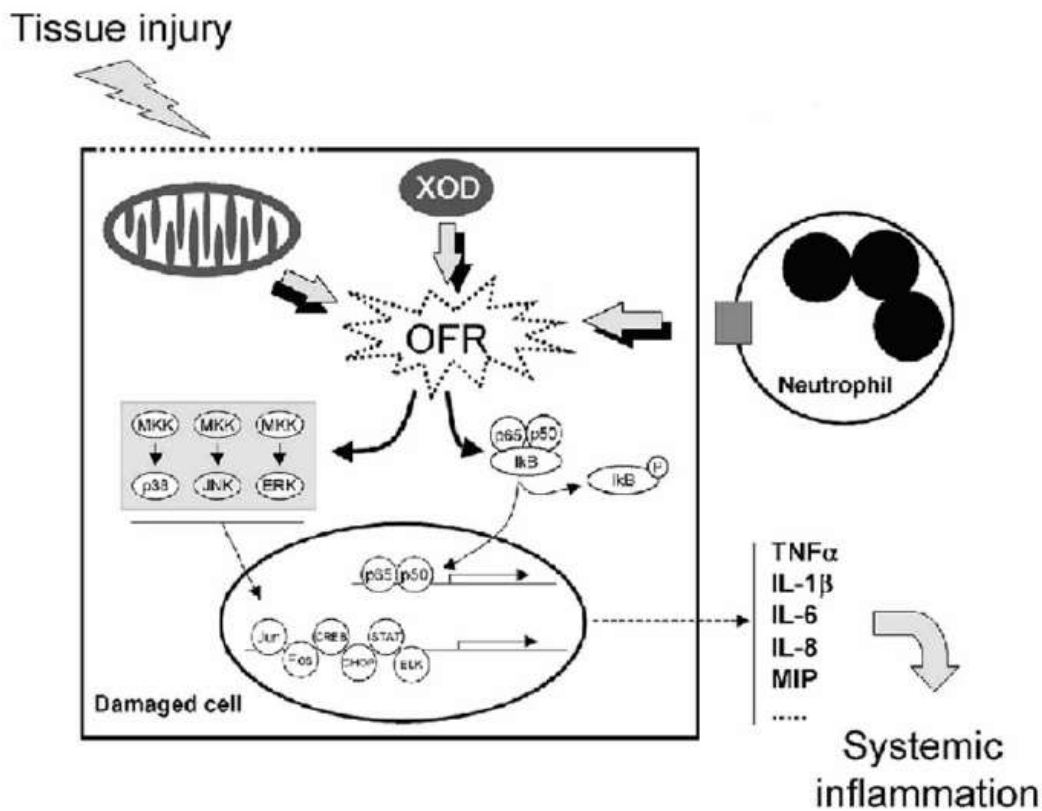
Οι μεταβολές που επέρχονται στις ανοσολογικές απαντήσεις ρυθμίζονται κυρίως από ενδογενείς μεσολαβητές, τις κυτοκίνες, που αποτελούν τη γλώσσα επικοινωνίας μεταξύ των ενεργοποιημένων κυττάρων ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση του οργανισμού. Τα βιολογικά ενεργά αυτά πολυπεπίδια, παράγονται από διάφορα είδη κυττάρων στον τόπο βλάβης και συστηματικά από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

Η παραγωγή κυτοκινών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο γενικά στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ειδικότερα στο SIRS. Ο κύριος ρυθμιστής της επαγωγής κυτοκινών είναι ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB). Η φωσφορυλίωση του αναστολέα IκB και η

επακόλουθη αποικοδόμησή του ως αποτέλεσμα εξωτερικών ερεθισμάτων, επιτρέπει στον NF-kB να μετακινηθεί στον πυρήνα και να προκαλέσει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση. Στους παράγοντες που ενεργοποιούν τον NF-kB ανήκουν οι κυτοκίνες, μιτογόνοι παράγοντες και οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο.

Σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το SIRS, συμπεριλαμβανομένου και του τραύματος, έχει συσχετιστεί ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου με τη βιοσύνθεση κυτοκινών. Πειραματικά δεδομένα, καταδεικνύουν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών (βιταμίνη A, C και E) εμπόδισε τη μετανάστευση του NF-kB στον πυρήνα και επέφερε μείωση της έκκρισης των φλεγμονωδών κυτοκινών.⁴⁶

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου θα μπορούσαν να επάγουν και τη φωσφορυλίωση των MAP κινασών, όπως είναι η ERK, η JNK και η p38. Αναλογικά με τον NF-kB, από τη δραστηριότητα των κινασών αυτών ενεργοποιούνται και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν τη σύνθεση προφλεγμονωδών γονιδίων. Επίσης, η ενεργοποίηση των MAP κινασών μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση διαφόρων γονιδίων μέσω της επιρροής που έχουν στην ακετυλίωση/φωσφορυλίωση ιστονών.



Εικόνα 17. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ως τοπικοί ενεργοποιητές των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα της καταστροφής του ιστού, ενεργοποιούνται διάφορες πηγές ενεργών μορφών οξυγόνου.

- Φαγοκύτταρα/ ουδετερόφιλα

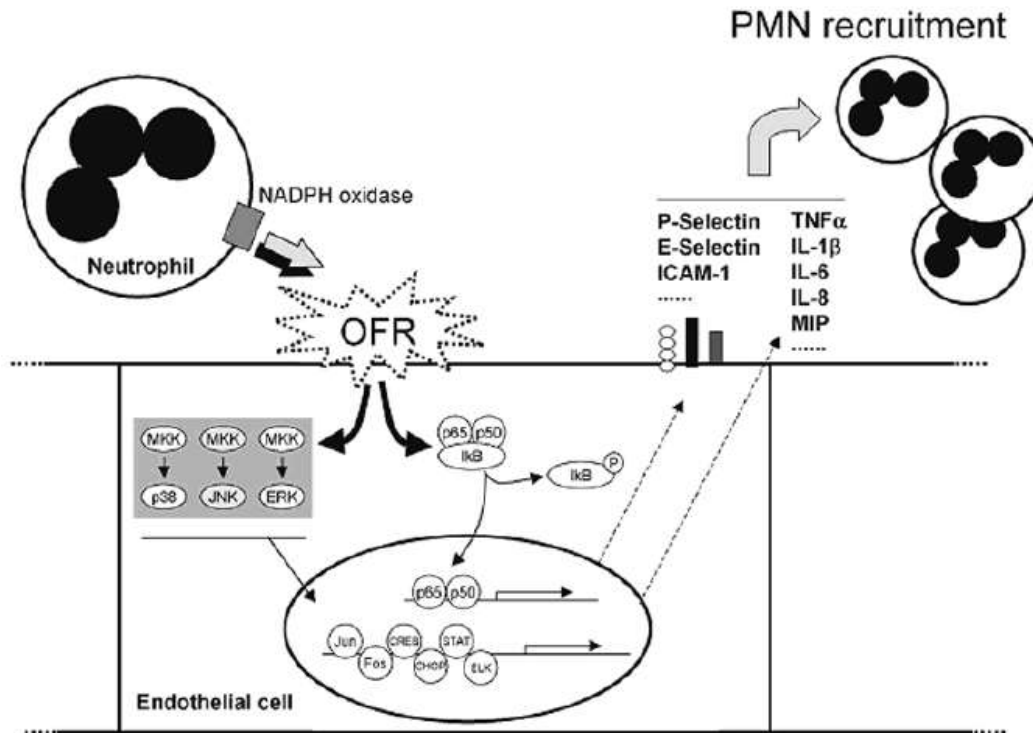
Είναι γνωστό ότι τα ουδετερόφιλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση βλάβης στον ιστό, σε ένα μεγάλο εύρος των φλεγμονωδών ασθενειών. Στην πραγματικότητα, τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μπορούν να απελευθερώσουν ROS, πρωτεΐνες και πρωτεάσες, όπως η κοκκιοκυτταρική ελαστάση και η κολλαγενάση, τα οποία δρουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής και επάγουν την ιστική βλάβη.^{47,48} Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης, τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μακροφάγα δημιουργούν πολύ μεγάλες ποσότητες ROS (και σε ορισμένες περιπτώσεις και RNS).⁴⁵ Συγκεκριμένα, η φαγοκύτωση διεγείρει διάφορες ανεξάρτητες διαδικασίες μία από τις οποίες είναι και η λεγόμενη «αναπνευστική έκρηξη», η οποία είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της οξειδάσης της NADPH, ένα ένζυμο που φυσιολογικά είναι ανενεργό σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία. Επίσης, σε αυτές τις διαδικασίες περιλαμβάνονται και μερικές σημαντικές μεταβολικές διαδικασίες όπως η γλυκογονόλυση και η αυξημένη οξείδωση της γλυκόζης. Η δημιουργία των ROS ξεκινάει με την ταχεία πρόσληψη και ενεργοποίηση της οξειδάσης της NADPH και την παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου το οποίο μετατρέπεται γρήγορα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου από την δισμουτάση του σουπεροξειδίου.^{44,49,50}

Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορούν να δράσουν με έναν από τους 2 μηχανισμούς που εξαρτώνται από οξυγόνο για την καταστροφή των μικροοργανισμών ή άλλων ξένων υλικών⁴⁹:

- 1) Τα κυτταροπλασματικά κοκκία των ουδετερόφιλων περιέχουν το ένζυμο μυελοπεροξειδάση. Παρουσία του ιόντος χλωριδίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου μετατρέπεται σε υποχλωριώδες οξύ.
- 2) Ο μηχανισμός που είναι ανεξάρτητος από την μυελοπεροξειδάση, ο οποίος παρόλο που δεν είναι τόσο σημαντικός όσο ο προηγούμενος, είναι απαραίτητος και μερικώς σχετικός με την ωρίμανση των μακροφάγων (τα οποία εμφανίζουν έλλειψη μυελοπεροξειδάσης) και απαιτεί επίσης οξυγόνο.

Επιπροσθέτως, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας τους, έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιήσει ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία, με τη σειρά τους, εκφράζουν μόρια προσκόλλησης και κυτταρικούς υποδοχείς καθιστώντας τα κύτταρα αυτά περισσότερο

ευαίσθητα στην επίδραση κυτοκινών. Έτσι προκαλείται όχι μόνο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και σύνθεση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια εγχειρήσεων.



Εικόνα 18. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (OFR) αυξάνουν την φλεγμονώδη απόκριση: τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα παράγουν OFR μέσω της αντίδρασης της οξειδάσης του NADPH και προκαλούν την έκφραση μορίων προσκόλλησης και κυτοκινών.

Επιπλέον είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και η οξυγενάση της αίμης εμπλέκεται στην άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες καθώς έχει βρεθεί ότι μειώνει την σύνθεση του mRNA του TNF-α και τα επίπεδα του TNF-α στο πλάσμα, μειώνοντας έτσι την βλάβη στους πνεύμονες και βελτιώνοντας την αιμάτωση των οργάνων.⁵¹

Επίσης, μια από τις επιπλοκές που είναι άμεσα συνδεδεμένες με τις ελεύθερες ρίζες είναι και η μεταβολή της ισορροπίας πρωτεασών/αντί-πρωτεασών. Ορισμένοι αναστολείς των πρωτεασών απενεργοποιούνται από ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από τα ουδετερόφιλα. Αυτή η απενεργοποίηση δημιουργεί ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας μέσω δράσης των κολλαγενασών και της ελαστάσης. Σε αυτές τις συνθήκες, η πρόοδος και η επιδείνωση της φλεγμονώδους διαδικασίας είναι εξαιρετικά αυξημένη.⁵²

Τέλος, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2004, τα αποτελέσματα έδειξαν κυμαινόμενα επίπεδα οξειδωτικών στο πλάσμα μετά το τραύμα. Συγκεκριμένα τα επίπεδα ήταν υψηλότερα μέσα στις πρώτες 6 ώρες και έπειτα έγινε μια μείωση 25% μεταξύ 6 με 12 ωρών. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε μια αύξηση κατά 30% στο διάστημα μεταξύ 12-18 ωρών που ακολουθείται από μια σταθερή μείωση κατά την επόμενη 48 ώρες. Μια αύξηση κατά 10% μεταξύ 72 ωρών και 7 ημερών που παρατηρήθηκε, πιθανόν να οφειλόταν σε επιπλοκές σε ασθενείς μετά από το τραύμα.⁴⁴(Εικ. 19)

Time in hr	0-6 hr	6-12 hr	12-18 hr	24-30 hr	72 hr	168 hr
Mean oxidants (peroxide equivalent)	755.71	471.5	797.5	649.4	532.12	639.3
SEM	55.55	79.58	46.01	60.47	75.23	90.27
95% CI	619 -891	283 -659	688.7 - 906.3	512.6 - 786.2	354.2 - 710	407.2 - 871

Εικόνα 19. Μεταβολές των οξειδωτικών του πλάσματος μετά το τραύμα.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για τον σκοπό αυτό έγιναν αιμοληψίες σε 11 ασθενείς με SIRS και τραύματα και μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (CARBONYLS). Τέλος πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της βαρύτητας της ασθένειας των ατόμων, σύμφωνα με τιμές που προέκυψαν από το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II⁵³ και των δεικτών οξειδωτικού στρες TAC, TBARS και CARBONYLS.

* Η κλίμακα APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμολόγησης που περιλαμβάνει: α) 12 φυσιολογικές παραμέτρους (που λαμβάνονται από το φάκελο του ασθενή κατά το πρώτο 24ωρο νοσηλείας του στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας), β) την ηλικία και γ) την προηγούμενη γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς, με στόχο να παρέχει μια γενική αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου. Η μέγιστη τιμή που μπορεί να λάβει είναι 71 βαθμοί. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα (μπορεί να προβλέψει την επιβίωση σε ποσοστό 90%), αλλά χαμηλή σχετικά ευαισθησία (μικρότερη ακρίβεια στην πρόβλεψη της θνητότητας).

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

Για την διεξαγωγή της έρευνας χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από 11 ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και τραύματα, οι οποίοι νοσηλεύονταν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Επίσης, για περαιτέρω σύγκριση, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες τιμές από 24 φυσιολογικά άτομα. Η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων αξιολογήθηκε με το t-test με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

3.1.1 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) του πλάσματος

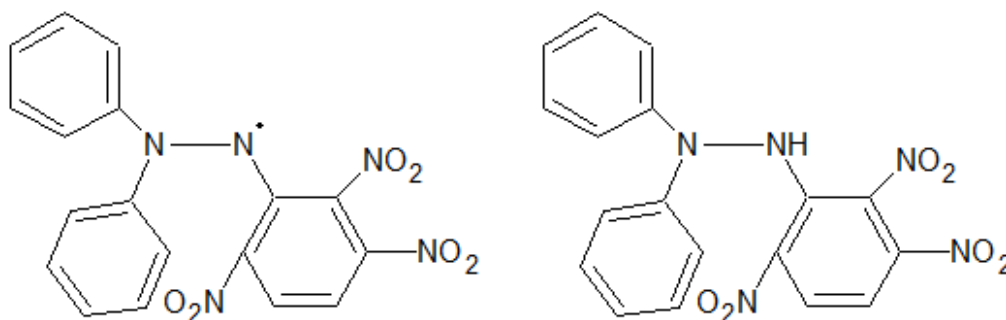
Αρχή της μεθόδου

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

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

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.



Εικόνα 20. **Αριστερά:** Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•). **Δεξιά:** Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

Αντιδραστήρια

- Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)
- MB (KH₂PO₄): 136
- MB (Na₂HPO₄): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0,712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,4.

- DPPH 0,1 mM, MB: 394,32

Διαλύουμε 0,02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνήτη (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19,8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματος, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- Ασκορβικό οξύ 10 mM

Είναι έτοιμο προς χρήση.

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μ L	660 μL
DTNB 1 mM	330 μ L	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μ L	—
Αιμόλυμα	—	20 μL

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη.

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια ($1000 \mu\text{L στην κυψελίδα} / 20 \mu\text{L πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα} = 50$).

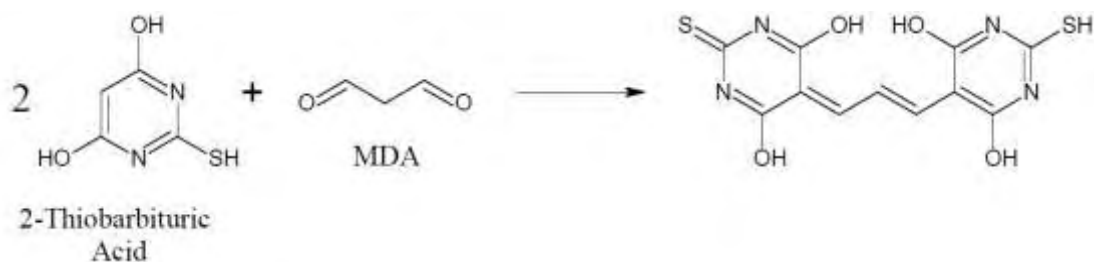
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0,5 \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος}$ ή $0,5 \text{ mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή $0,5 \text{ mmol DPPH/L}$.

3.1.2 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

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



Εικόνα 21. Η αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέως με την μαλονδιαλδεύδη.

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Αντιδραστήρια

- *Tris-HCl 200 mM (pH7,4)*

MB (Tris): 121,14

MB (HCl): 36,46 (stock 37%) [10,1 N]

Για να φτιάξουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0,1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0,61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0,42 mL του stock 37% HCl (10,1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7,4.*

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

- *Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)*

MB (TBA): 144,1

MB (Na₂SO₄): 142,04

[Οδηγίες για την παρασκευή 10 mL διαλύματος. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος]. Ζυγίζουμε 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως.

- *TCA 35%*: Ζυγίζουμε 35 gTCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).
- *TCA 70%*: Ζυγίζουμε 70 gTCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μLTCA 35% και 500 μLTris-HCl και αναδεύουμε. Το TCA προστίθεται στον ορό ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κτλ).
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 mLNa₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °Cγια 45 min στο υδατόλουτρο. Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας σε οργανικά διαλύματα.
5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mLTCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 mL σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυβελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 × 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to μmol/L.

3.1.3 Πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα (PC)

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr) και αποτελούν αξιόπιστο δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμερείς βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα.

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με τη 2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) προς σχηματισμό του 2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου (DNPH-hydrazone).

Αντιδραστήρια

- *Διάλυμα HCl 2,5 N*
- HCl: MB 36,46 stock 37% (10,1 N)

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24,6 mL του 37% HCl (ίσο με 10,1 N HCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- *DNPH 14 mM (MB: 198,1)*

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0,2833 g DNPH σε 100 mL 2,5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0,5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- Ουρία 5 M (pH 2,3) (MB: 6,.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2,3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 50 μ L πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0,5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0,5 mL HCL 2,5 N
2. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως για την κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.
3. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
5. Προσθέτουμε στο ίζημα 0,5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2,5 NHCL) για τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 NHCL για τα τυφλά, διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
6. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
7. Προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
8. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
9. Προσθέτουμε 0,5 mL αιθανόλης και 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
10. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.

11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
12. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2,3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
13. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
14. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος – Ατυφλού / 0.022 × 1000/50.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹.

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

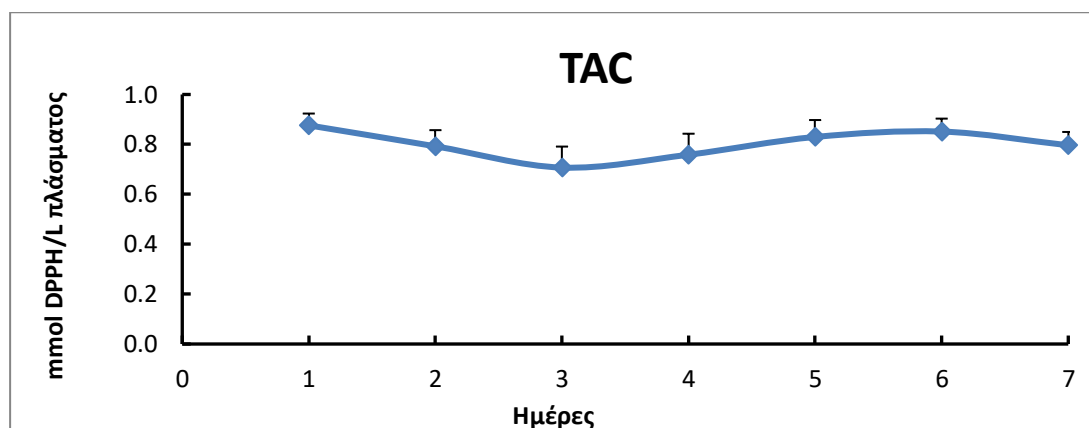
Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ mg/mL

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL.

4 Αποτελέσματα

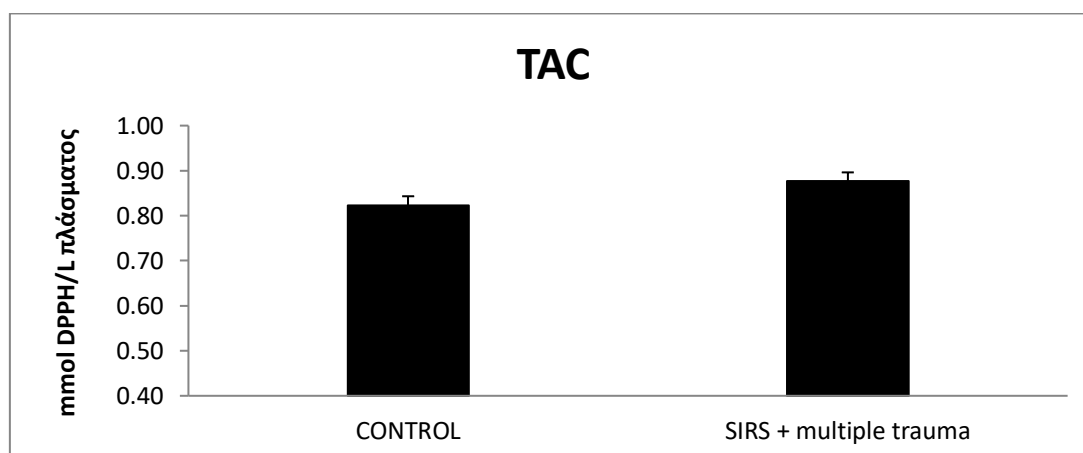
Στην παρούσα μελέτη έγινε αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, η οποία βασίστηκε στις 7 πρώτες ημέρες νοσηλείας, καθώς από την 8η ημέρα μειωνόταν σημαντικά ο αριθμός των ασθενών ($n < 3$). Ο αριθμός των ασθενών κυμαινόταν: $7 \leq n \leq 11$. Η σύγκριση των επιπέδων σε φυσιολογικούς και ασθενείς με πολλαπλά τραύματα έγιναν σύμφωνα με την πρώτη ημέρα νοσηλείας. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM και εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA). Η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων αξιολογήθηκε με το t-test με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

4.1 Επίπεδα TAC σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα



Διάγραμμα 1. Ημερήσια επίπεδα TAC σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

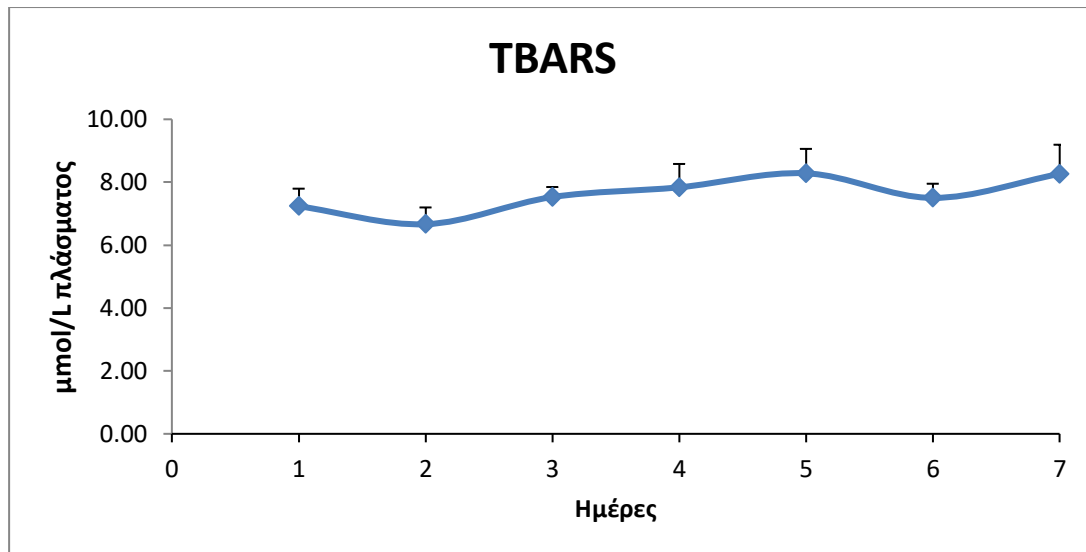
Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα TAC.



Διάγραμμα 2. Σύγκριση επιπέδων TAC σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

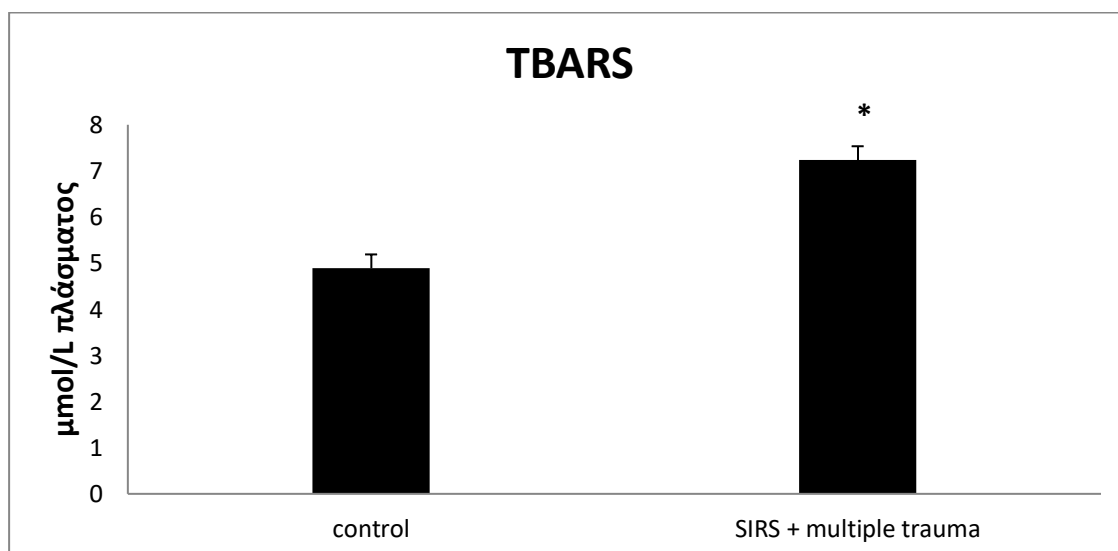
Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα επίπεδα της TAC σε ασθενείς με SIRS (πρώτη ημέρα νοσηλείας) και πολλαπλά τραύματα, και σε φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων ($p > 0,05$), συνεπώς οι ασθενείς είχαν τα ίδια επίπεδα TAC με τους φυσιολογικούς.

4.2 Επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.



Διάγραμμα 3. Ημερήσια επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

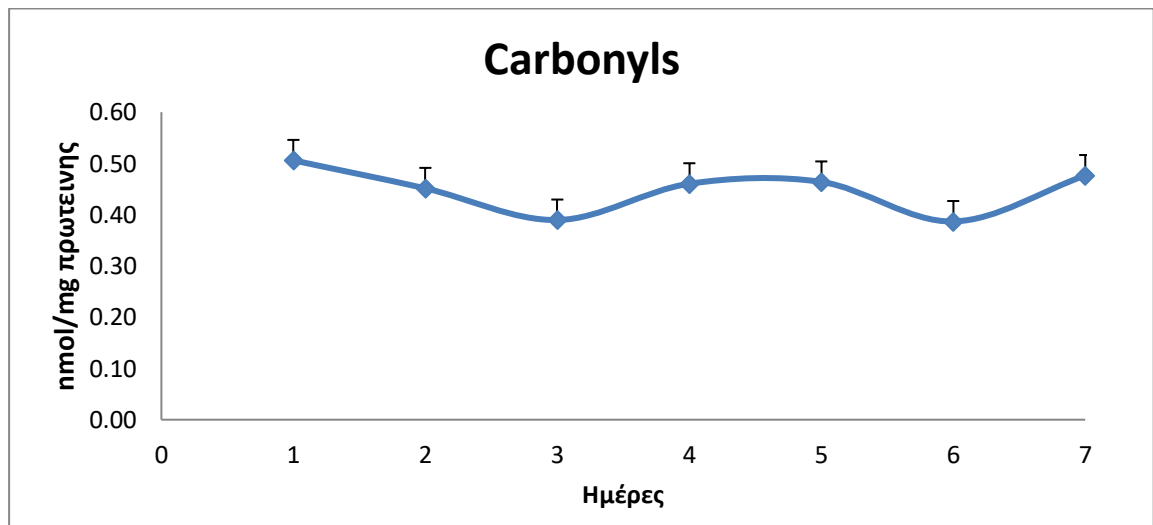
Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS.



Διάγραμμα 4. Σύγκριση επιπέδων TBARS σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

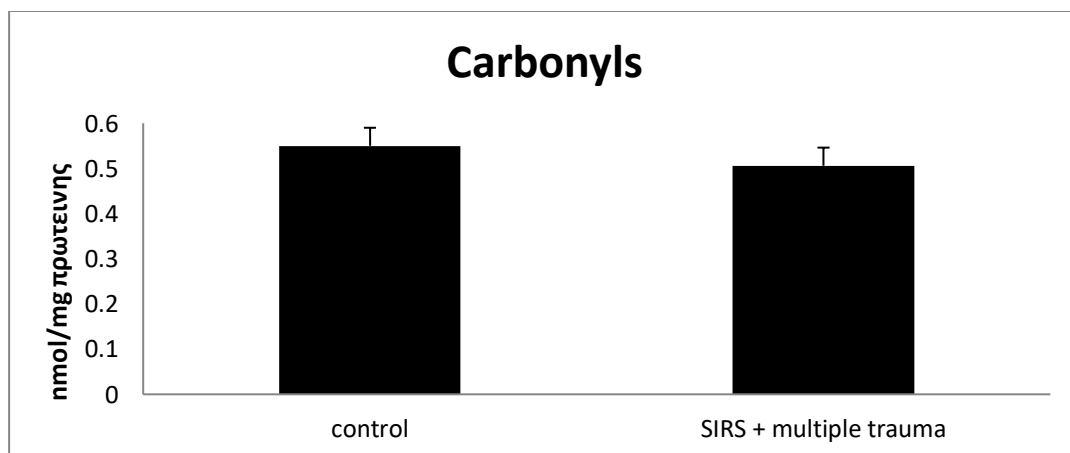
Στο διάγραμμα 4 γίνεται σύγκριση των τιμών TBARS μεταξύ φυσιολογικών ατόμων (ομάδα control) και των τιμών της 1^η ημέρας νοσηλείας των ασθενών με SIRS και τραύματα. Παρατηρούμε ότι κατά την πρώτη μέρα νοσηλείας οι ασθενείς με SIRS και τραύματα, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα TBARS ($p < 0,05$) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα με ποσοστό 48%.

4.3 Επίπεδα καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.



Διάγραμμα 5. Ημερήσια επίπεδα καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

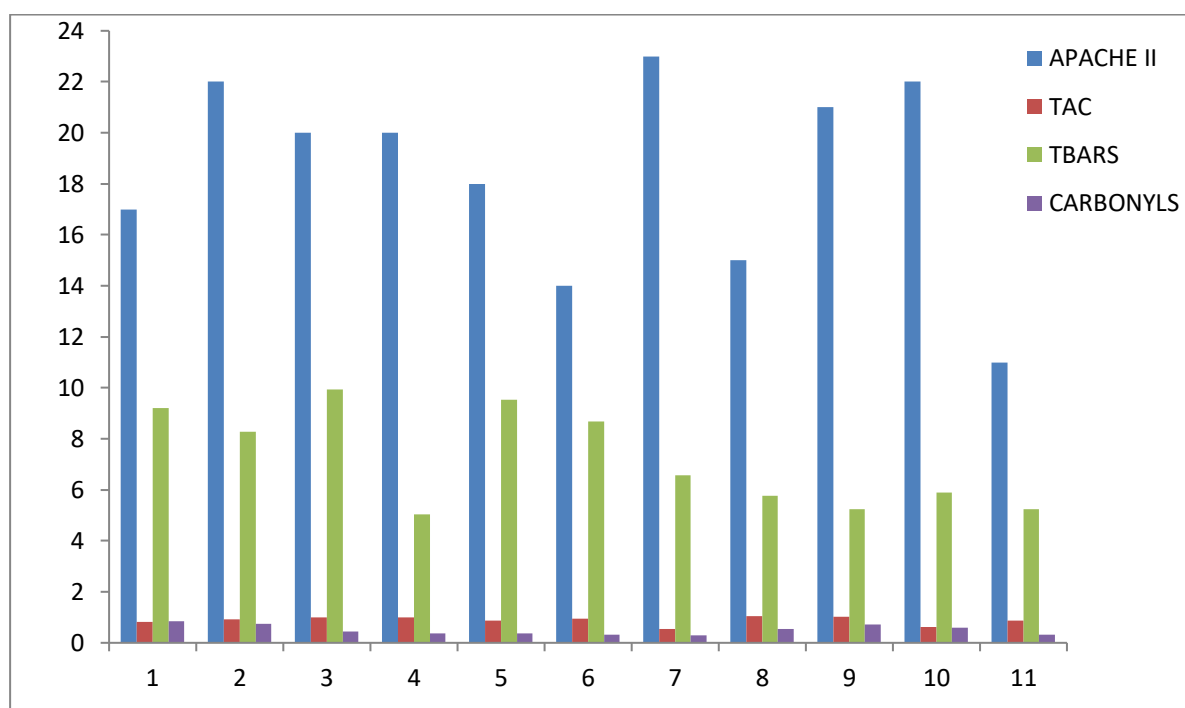
Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των καρβονυλίων.



Διάγραμμα 6. Σύγκριση επιπέδων καρβονυλίων σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα.

Στο διάγραμμα 6 γίνεται μια σύγκριση μεταξύ ατόμων με SIRS και τραύματα, κατά την πρώτη ημέρα νοσηλείας στη ΜΕΘ και φυσιολογικών ατόμων. Οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές με $p > 0,05$. Συνεπώς, οι ασθενείς κατά την 1^η μέρα νοσηλείας εμφάνισαν ίδια επίπεδα καρβονυλίων με τους φυσιολογικούς.

4.4 Συσχέτιση της βαρύτητας ασθένειας και των δεικτών οξειδωτικού στρες TAC, TBARS και καρβονύλια.



Διάγραμμα 7. Σύγκριση βαρύτητας ασθένειας με τους δείκτες TAC, TBARS και CARBONYLS.

Στο διάγραμμα 7 εμφανίζονται οι τιμές βαρύτητας ασθένειας των ατόμων με SIRS και τραύματα σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II σε σύγκριση με τις τιμές TAC, TBARS και CARBONYLS κατά την πρώτη μέρα νοσηλείας των ασθενών. Κατά την συσχέτιση των τιμών APACHE II με τις τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες με την μέθοδο Spearman προέκυψαν οι τιμές $r = 0.360$ (TAC), $r = 0.29$ (TBARS) και $r = 0.063$ (CARBONYLS). Συμπεραίνουμε ότι οι τιμές των δεικτών του οξειδωτικού στρες δεν επηρεάζουν τις τιμές βαρύτητας της ασθένειας και η αυξημένη τιμή που εμφανίζεται σε ορισμένους ασθενείς πιθανόν οφείλεται σε άλλους παράγοντες.

5 Συζήτηση

Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στις διάφορες ασθένειες παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες έχουν βλαπτικές επιδράσεις στα κύτταρα περιλαμβάνουν το ανιόν σουπεροξειδίου, την ρίζα υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Υπό κανονικές συνθήκες, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στο ανθρώπινο σώμα σε μικρές ποσότητες και η δραστηριότητά τους ελαχιστοποιείται μέσω αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού, όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση, η γλουταθειόνη και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Σε ασθενείς κρίσιμης κατάστασης, σοβαρές φυσιολογικές και βιοχημικές ανισορροπίες μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, διαταράσσοντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία.

Το τραύμα αποτελεί ένα από τα πιο ουσιώδη προβλήματα υγείας καθώς είναι υπεύθυνο για το 10% των θανάτων παγκοσμίως και βιώνεται συνήθως από νεαρούς άνδρες.⁵⁴ Από την άλλη, ο όρος Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) δημιουργήθηκε για να συμπεριλάβει τον *«κοινό παθογόνο σύνδεσμο που πιστεύεται ότι είναι παρών σε έναν αριθμό διαταραχών»*. Όμως, η έννοια SIRS δεν περιορίστηκε σε μολυσματικές παθήσεις, αλλά αντιθέτως χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει μια φυσιολογική απόκριση σε ένα πλήθος οξέων προσβολών, όπως παγκρεατίτιδα, ισχαιμία, τραύμα, αιμορραγία και βλάβη οργάνων λόγω μεσολάβησης του ανοσοποιητικού συστήματος.⁵⁵

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με τραύματα και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για τον σκοπό αυτό έγιναν καθημερινές αιμοληψίες σε 11 ασθενείς με SIRS και τραύματα και μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (CARBONYLS). Επίσης, έγινε μια σύγκριση αυτών των τιμών, κατά την 1η ημέρα νοσηλείας, με αντίστοιχες τιμές φυσιολογικών ατόμων.

Οι ασθενείς που έχουν, αρχικά, πολλαπλά τραύματα εμφανίζουν δευτερεύουσες επιπλοκές. Συγκεκριμένα λίγο μετά το αρχικό τραύμα, στους ασθενείς με πολλαπλά τραύματα, προκαλείται οξειδωτικό στρες. Σε μοριακό επίπεδο το οξειδωτικό στρες

είναι ενισχυμένο και αυτοσυντηρούμενο, δημιουργώντας ένα δεύτερο κύμα βλάβης, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) καθώς και για την υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών.⁵⁶ Έτσι ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων μικροβίων, η ανοσοκαταστολή και τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών μορίων οδηγούν συχνά σε σήψη η οποία, παρά την εντατική θεραπεία, εξελίσσεται σε Σύνδρομο Πολλαπλής Οργανικής Ανεπάρκειας (MODS) και σε θάνατο.

Στη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, προκύπτει μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, και προκαλείται η οξειδωτική τροποποίηση κυτταρικών μακρομορίων, επαγωγή κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης και δομική βλάβη του ιστού. Το οξειδωτικό στρες έχει τεκμηριωθεί ως ένας μηχανισμός δυσλειτουργίας των οργάνων, και επομένως ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Ο Hohl ανέφερε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων βιοδεικτών του πλάσματος που προκαλούν οξειδωτική βλάβη με έναν αριθμό κλινικών μεταβλητών, στην μελέτη τους στο οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με τραυματική εγκεφαλική βλάβη. Συγκεκριμένα στην μελέτη του παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα MDA σε δείγματα που λήφθηκαν μετά από 12 (n= 79) ώρες και μετά από 30 ώρες (n= 69), ύστερα από την τραυματική εγκεφαλική βλάβη. Εκτός του ότι εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου ($p \leq 0,003$), σημαντικά στατιστική διαφορά υπήρχε και μεταξύ των δειγμάτων των 12 και 30 ωρών ($p < 0,001$).⁵⁷ Η μαλονδιαλδεΐδη (MDA) είναι ένα τελικό προϊόν που σχηματίζεται κατά το οξειδωτικό στρες, συγκεκριμένα λόγω της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Το αραχιδονικό οξύ (AA) απελευθερώνεται λόγω της δράσης της φωσφολιπάσης-A2 (PL -A2). Ακολούθως, το AA δέχεται επίθεση από τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (κυρίως από τη ρίζα υδροξυλίου OH^{*}) που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια και έτσι σχηματίζονται λιπιδιακά ενδοϋπεροξειδία. Αυτά τα λιπιδιακά ενδοϋπεροξειδία υποβάλλονται σε αυθόρμητη διάσπαση και σχηματίζεται στο ενδοκυτταρικό χώρο η MDA. Η MDA απελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο και τελικά στο αίμα. Η MDA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένας αποτελεσματικός βιοδείκτης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων για περισσότερα από 30 χρόνια. Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) μεταξύ φυσιολογικών ατόμων (ομάδα control) και των ασθενών της

1^η ημέρας νοσηλείας παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα ($p < 0,05$) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα με ποσοστό 48%.

Η SIRS συνδέεται και με την πρόωμη οξειδωση των πρωτεϊνών, από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η οξειδωση των πρωτεϊνών στις ασθένειες, συνοδεύεται από την εισαγωγή ομάδων καρβονυλίου στις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών και η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων καθορίζει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης.⁵⁸ Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια παράγονται μέσω διαφόρων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν το υποχλωριώδες οξύ που προέρχεται από τα ουδετερόφιλα, από αντιδράσεις που καταλύονται από μέταλλα, και τη σύζευξη με προϊόντα αλδεϋδης των λιπιδίων. Στην μελέτη του Winterbourn et al. οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνικών καρβονυλίων βρέθηκαν αρχικά αυξημένες σε ασθενείς ($n=8$) με σοβαρό τραυματισμό (ISS 26-50) σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Τα επίπεδα αυτά έπεσαν μέσα στις πρώτες μέρες, αλλά παρέμειναν υψηλότερα από τις φυσιολογικές τιμές.⁵⁹ Επίσης, ο Hohl στην μελέτη του σχετικά με τα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με τραυματική εγκεφαλική βλάβη, παρατήρησε υψηλά επίπεδα καρβονυλίων στην σύγκριση μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων. Συγκεκριμένα, υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά κατά την σύγκριση των φυσιολογικών ($p < 0,001$) με τους ασθενείς ύστερα από 12 και από 30 ώρες μετά την τραυματική εγκεφαλική βλάβη.⁵⁷ Στην παρούσα μελέτη έγινε σύγκριση μεταξύ ατόμων με SIRS και τραύματα, κατά την πρώτη ημέρα νοσηλείας και φυσιολογικών ατόμων. Οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές με $p > 0,05$. Συνεπώς, οι ασθενείς κατά την 1^η μέρα νοσηλείας εμφάνισαν ίδια επίπεδα καρβονυλίων με τους φυσιολογικούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό τους δείγματος ή/και στη βαρύτητα του τραύματος.

Ο αριθμός των διαφορετικών αντιοξειδωτικών στο πλάσμα καθιστά δύσκολη την μέτρηση του κάθε αντιοξειδωτικού ξεχωριστά.⁶⁰ Έτσι μετρήσεις των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έδειξαν να παρέχουν έναν ολοκληρωμένο δείκτη. Η ενδογενής δυνατότητα εκκαθάρισης των ριζών περοξυλίου στο πλάσμα ασθενών με SIRS, βρέθηκε να είναι αυξημένη σε μη επιζώντες, μία αύξηση η οποία ήταν κυρίως αποτέλεσμα συνεισφοράς της χολερυθρίνης.⁵⁸ Ωστόσο τα υψηλότερα επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν σχετίστηκαν με την σοβαρότητα του SIRS.⁶¹ Παρατεταμένα υψηλότερα επίπεδα TAC, όπως σημειώνονται στους μη επιζώντες, μπορεί να οφείλονται σε μια απόκριση του ξενιστή

στο οξειδωτικό στρες ή σε ένα μηχανισμό αντιστάθμισης στα εξαντλημένα αντιοξειδωτικά συστατικά. Συγκεκριμένα, ο MacKinnon⁶² και οι συνεργάτες του, σε μια μελέτη που διεξήχθη σε 50 ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση, ανέφεραν ότι η συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση και τα επίπεδα του ουρικού οξέος, ήταν υψηλότερα στους μη επιζήσαντες (n=14) από ό, τι στους επιζώντες (n=36), και πιθανολογείται ότι η υψηλότερη συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση θα μπορούσε να αντανakλά τα υψηλότερα επίπεδα του ουρικού οξέος που προκαλούνται από τη νεφρική δυσλειτουργία. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος στους μη επιζώντες ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη στους επιζώντες μεταξύ των ασθενών σε όλα τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν ($p < 0,05$).⁶³ Η διαφορά στα ευρήματα από τις μελέτες αυτές μπορεί κυρίως να οφείλεται σε διαφορές στις μεθόδους μέτρησης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κυρίως για την αποτίμηση της TAC είναι, η φασματοφωτομετρική μέθοδος, και η μέθοδος TRAP. Στην παρούσα εργασία, τα επίπεδα της TAC σε ασθενείς με SIRS (πρώτη ημέρα νοσηλείας) και πολλαπλά τραύματα, και σε φυσιολογικά άτομα. έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγείων ατόμων ($p > 0,05$), συνεπώς οι ασθενείς είχαν τα ίδια επίπεδα TAC με τους φυσιολογικούς. Και στην περίπτωση αυτή, η απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό τους δείγματος ή/και στη βαρύτητα του τραύματος.

ONathens⁶⁴, σε μία μελέτη μέτρησης του οξειδωτικού στρες, ανέφερε μια σειρά στατιστικά σημαντικών συσχετισμών που αφορούσαν το οξειδωτικό στρες με το πνευμονικό τραύμα και τονίστηκε ιδιαίτερος η μείωση της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης στους ασθενείς, ύστερα από χορήγηση ουσιών με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Βιταμίνη E και C). Οι Rana και Pal⁶⁵ ωστόσο, σε μία μελέτη μέτρησης του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με κοιλιακά τραύματα παρατήρησαν ότι το οξειδωτικό στρες και τα αντιοξειδωτικά επίπεδα δεν είχαν σχέση με την σοβαρότητα του τραυματισμού.

Ένα σημαντικό εμπόδιο στην κλινική αντιμετώπιση της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, καθώς και της σοβαρής σήψης στην οποία μπορεί να εξελιχθεί, είναι η έλλειψη αποτελεσματικής θεραπείας. Η σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής παθοφυσιολογίας του SIRS θα παρέχει θεωρητικές και πειραματικές βάσεις για την ανάπτυξη μιας νέας θεραπευτικής στρατηγικής. Ένα

κεντρικό χαρακτηριστικό αυτής της παθοφυσιολογίας είναι η επαγωγή της υπερέκφρασης πολλαπλών προφλεγμονωδών γονιδίων και των προϊόντων τους, τα περισσότερα από τα οποία μπορούν να ξεκινήσουν την διαδικασία της φλεγμονής και μπορεί να εμπλέκονται στην δυσλειτουργία και ανεπάρκεια των οργάνων. Επειδή οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-kB και AP-1 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση αυτών των προφλεγμονωδών γονιδίων, πιθανόν να είναι κατάλληλοι στόχοι για την θεραπεία του SIRS. Έτσι η γενετική απενεργοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική επιλογή. Ωστόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι επαγωγίμοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-kB είναι βασικό στοιχείο για τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, διατηρώντας τους φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας.⁶⁶ Σε ασθενείς που βρίσκονται σε κρίσιμη κατάσταση, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει συστηματική φλεγμονώδη ανοσοαπάντηση και καταστροφή των κυττάρων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα θνησιμότητας.

Εν κατακλείδι, η γενική ιδέα ότι οι ROS, ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στην SIRS, είναι σημαντικοί τόσο για την επιστημονική έρευνα όσο και για την θεραπευτική πρακτική. Στην συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα των TBARS βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με SIRS και πολλαπλά τραύματα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα κατά 48%. Ωστόσο, ούτε τα επίπεδα της TAC ούτε τα επίπεδα των καρβονυλίων μεταβλήθηκαν ιδιαίτερα και κατά την ημερήσια σύγκριση των ασθενών και κατά την σύγκρισή τους με φυσιολογικά άτομα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το αν οι δείκτες του οξειδωτικού στρες μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και τραύματα. Πιθανόν το αποτέλεσμα να οφείλεται στον αρκετά μικρό του δείγματος, οπότε απαιτούνται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

6 Βιβλιογραφία

1. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**, 291–295 (1997).
2. Wheeler, D. S. Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis. *Open Inflamm. J.* **4**, 74–81 (2011).
3. Davies, K. J. A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **61**, 1–31 (1995).
4. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623–626 (1954).
5. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
6. Costantini, D. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology. A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches.* (2014).
7. Sies, H. in *Oxidative Stress* (Academic Press Inc., 1985).
8. Jones, D. P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1865–1879 (2006).
9. Sies, H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **64**, 2181–2188 (2007).
10. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **4**, 180–183 (2015).
11. Yoshikawa, T. & Naito, Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ* **45**, 271–276 (2002).
12. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
13. Baudouin-Cornu, P. & Thomas, D. Evolutionary biology: Oxygen at life's boundaries. *Nature* **445**, 35–36 (2007).
14. Boardman, L., Sørensen, J. G., Johnson, S. A. & Terblanche, J. S. Interactions between Controlled Atmospheres and Low Temperature Tolerance: A Review of Biochemical Mechanisms. *Front. Physiol.* **2**, (2011).

15. Leonard, S. S., Harris, G. K. & Shi, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1921–1942 (2004).
16. Palmieri, B. & Sblendorio, V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **11**, 383–399 (2007).
17. Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. Oxidative Stress. *Sports Med.* **36**, 327–358 (2006).
18. Palmieri, B. & Sblendorio, V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **11**, 309–342 (2007).
19. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1454 (1999).
20. Davies, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* **262**, 9895–9901 (1987).
21. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**, 526–534 (1997).
22. Levine, R. L., Moskowitz, J. & Stadtman, E. R. Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life* **50**, 301–307 (2000).
23. Stadtman, E. R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 11–12 (1986).
24. Morrell, C. N. Reactive Oxygen Species Finding the Right Balance. *Circ. Res.* **103**, 571–572 (2008).
25. Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 247–254 (2003).
26. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesì, C. & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577–586 (2005).

27. Gomes, E. C., Silva, A. N. & Oliveira, M. R. de. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, (2012).
28. Jamieson, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511–1527 (1998).
29. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
30. Green, H. & Fraser, I. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med. Sci. Sports Exerc.* **20**, 55–59 (1988).
31. Traumatic Injury. *UF Health, University of Florida Health* Available at: <https://ufhealth.org/traumatic-injury>.
32. Lecky, F. E., Bouamra, O., Woodford, M., Alexandrescu, R. & O'Brien, S. J. in *Damage Control Management in the Polytrauma Patient* (eds. Pape, H.-C., Peitzman, A., Schwab, C. W. & Giannoudis, P. V.) 13–24 (Springer New York, 2010).
33. Gokdemir, M. T. *et al.* Role of Oxidative Stress in the Clinical Outcome of Patients with Multiple Blunt Trauma. *J. Int. Med. Res.* **40**, 167–173 (2012).
34. Keel, M. & Trentz, O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* **36**, 691–709 (2005).
35. Dünser, M., Duranteau, J., Geeraerts, T., Oakley, P. & Stricker, K. Severe and Multiple trauma. (2013).
36. Lord, J. M. *et al.* The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet* **384**, 1455–1465 (2014).
37. Χ.Α. Γώγος, Α. Λ. Η παθογένεια του συνδρόμου της σήψης και ο ρόλος της ανοσοπαρέμβασης. (2002).
38. Binkowska, A. M., Michalak, G. & \lotwiński, R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent.-Eur. J. Immunol.* **40**, 206 (2015).

39. Κωνσταντίνου Θ. Πανούση. Συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση σε πειραματικό μοντέλο πολυτραυματία-η θέση της θαλιδομιδης. (2012).
40. Nyström, P.-O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 1–7 (1998).
41. Burdette, S. D., Parilo, M. A., Kaplan, L. J. & Bailey, H. Systemic inflammatory response syndrome. *Medscape EMedicine* (2010).
42. Αναστασίου Κ. Παπαδοπούλου. Πειραματική μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης σε ανοσοκατεσταλμένους επιμύες, μετά από σήψη με Gram- ενδοσκομειακό στέλεχος. (2008).
43. Isaksson, C., Sheldon, B. C. & Uller, T. The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *Bioscience* **61**, 194–202 (2011).
44. Obayan, A. O. E. Oxidative stress: natural history and modulation in surgery and trauma patients. (2004).
45. Bosmann, M. & Ward, P. A. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* **34**, 129–136 (2013).
46. Horton, J. W. *et al.* Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J. Trauma* **50**, 397-406-408 (2001).
47. Elyoussoufi, Z., Mounaji, K., Cadi, R., Habti, N. & Motaouakkil, S. Induction of oxidative stress and apoptosis in human neutrophils by p-phenylenediamine. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* **5**, 142–149 (2013).
48. Tanaka, H. *et al.* Acceleration of superoxide production from leukocytes in trauma patients. *Ann. Surg.* **214**, 187 (1991).
49. Knight, J. A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**, 145–158 (2000).

50. Lenz, A., Franklin, G. A. & Cheadle, W. G. Systemic inflammation after trauma. *Injury* **38**, 1336–1345 (2007).
51. Jaffer, U., Wade, R. G. & Gourlay, T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth.* **2**, 161–175 (2010).
52. Closa, D. & Folch-Puy, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* **56**, 185–191 (2004).
53. Κλίμακες Εκτίμησης Βαρέως Πασχόντων Ασθενών, Τσαούση Γεωργία.PDF.
54. Gokdemir, M. T. *et al.* Role of oxidative stress in the clinical outcome of patients with multiple blunt trauma. *J. Int. Med. Res.* **40**, 167–173 (2012).
55. Horeczko, T., Green, J. P. & Panacek, E. A. Epidemiology of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in the emergency department. *West. J. Emerg. Med.* **15**, 329 (2014).
56. Săndesc, D. Oxidative Stress in the Critically Ill Polytrauma Patient. *J. Crit. Care Med.* **1**, 81–82 (2015).
57. Hohl, A. *et al.* Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: A multivariate analysis. *J. Crit. Care* **27**, 523.e11-523.e19 (2012).
58. Gladstone, I. M. & Levine, R. L. Oxidation of Proteins in Neonatal Lungs. *Pediatrics* **93**, 764–768 (1994).
59. Winterbourn, C. C. *et al.* Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **28**, 143–149 (2000).
60. Roth, E., Manhart, N. & Wessner, B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 161–168 (2004).
61. Tsai, K., Hsu, T., Kong, C., Lin, K. & Lu, F. Is the endogenous peroxy-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 926–933 (2000).

62. MacKinnon, K. L., Molnar, Z., Lowe, D., Watson, I. D. & Shearer, E. Measures of total free radical activity in critically ill patients. *Clin. Biochem.* **32**, 263–268 (1999).
63. Cowley, H. C. *et al.* Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit. Care Med.* **24**, 1179–1183 (1996).
64. Nathens, A. B. *et al.* Randomized, Prospective Trial of Antioxidant Supplementation in Critically Ill Surgical Patients. *Ann. Surg.* **236**, 814–822 (2002).
65. Rana, S. V., Kashinath, D., Singh, G., Pal, R. & Singh, R. Study on oxidative stress in patients with abdominal trauma. *Mol. Cell. Biochem.* **291**, 161–166 (2006).
66. Matsuda, N. & Hattori, Y. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 189–198 (2006).