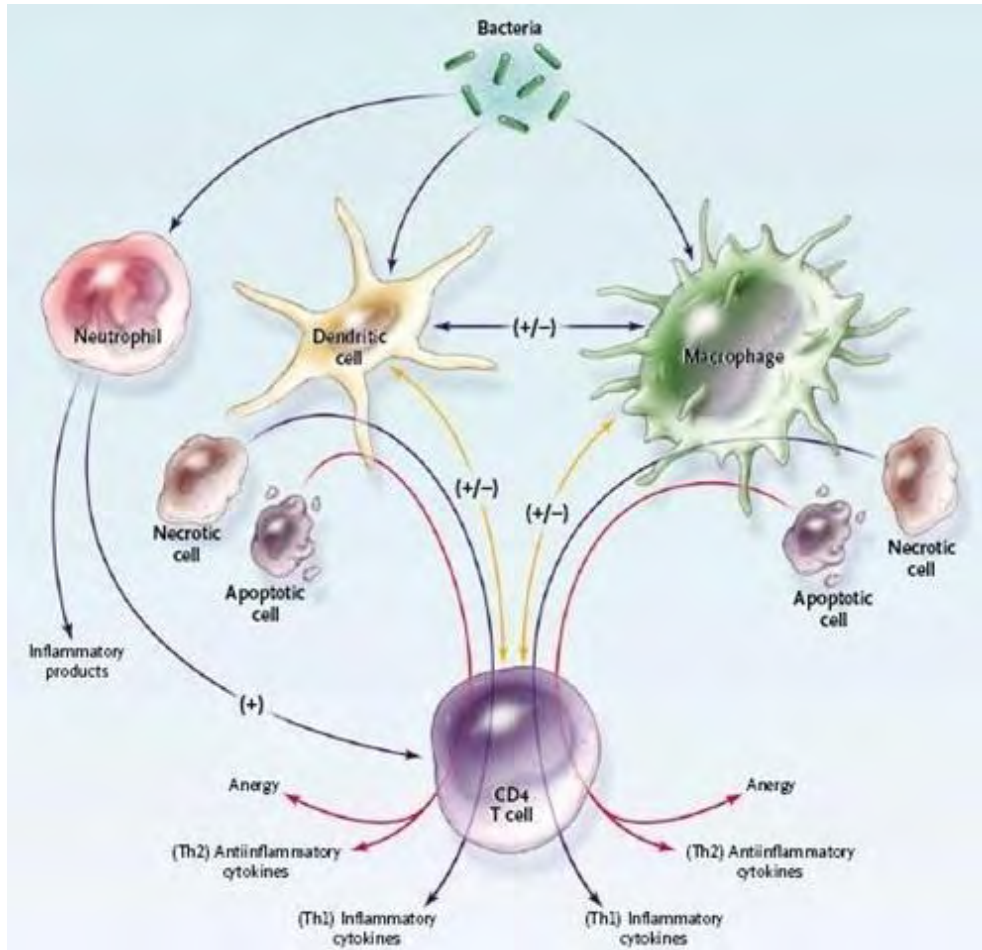


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΚΟΡΔΑΛΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

"ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΣΗΠΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ"

2014

Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε σηπτικούς
ασθενείς με παχυσαρκία

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1.ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

2.ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ(ΛΕΚΤΟΡΑΣ)

3.ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ(ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεκπεραιώσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με αυτή την ανάθεση.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάσκοντα κ. Στάγκο Δημήτριο για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος, τη συγγραφή και για την ευχάριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ του υποψήφιο διδάκτορα κ. Γκουτζουρελα Νικόλαο για την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ δικαιωματικά το αφιερώνω στην οικογένειά μου. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλα όσα έχουν κάνει ώστε να μου δώσουν τη δυνατότητα να ασχοληθώ με την αναζήτηση της γνώσης. Ευχαριστώ.

Περιεχόμενα	
Περίληψη	7
Abstract	8
1.Εισαγωγή	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου	9
1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	10
1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	12
1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	14
1.5 Οξειδωτικό στρες	17
1.6 Παχυσαρκία	21
1.6.1 Ορισμός	23
1.6.2 Δείκτης Σωματικής Μάζας(BMI – Body Mass Index)	23
1.7 Σήψη	23
1.7.1 SIRS	24
1.7.2 MODS	25
1.7.3 Σήψη Και Παχυσαρκία	26
2.Σκοπός	27
3.Υλικά και Μέθοδοι	28
3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες	28
3.1.1 TBARS	28
3.1.2 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	31
3.1.3 TAC	35
3.1.4 Στατιστική Ανάλυση	38

4.Αποτελέσματα	39
4.1 TAC	39
4.2 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια	40
4.3 TBARS	41
5. Συζήτηση	42
6.Βιβλιογραφία	43
Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	12
Εικόνα 2 Οξειδωτικό στρες	18
Εικόνα 3 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών	19
Εικόνα 4 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες	20
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες	20
Σχήμα 1. Η διαφοροποίηση στην τιμή της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας	39
Σχήμα 2. Η διαφοροποίηση στην τιμή της μέτρησης των καρβονυλίων	40
Σχήμα 3. Η διαφοροποίηση στην τιμή της μέτρησης των TBARS	41
Διάγραμμα 1 . Ποσοστό Υπέρβαρων-Παχύσαρκων στην Ευρώπη 2011	22
Διάγραμμα 2. Παχυσαρκία σε παιδιά 10-16 χρονών από 2001 έως το 2011	22
Διάγραμμα 3. Η αύξηση της θνησιμότητας σε ασθενείς διαφόρων ηλικιών που παρουσίασαν σήψη	25
Διάγραμμα 4. Ο χρόνος παραμονής ασθενών σε νοσοκομειακές μονάδες που παρουσίασαν σήψη σε σχέση με άλλες ασθένειες	26

Περίληψη

Η παχυσαρκία αποτελεί επιδημία ειδικά στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ανάμεσα στους ενήλικες ο δείκτης παχυσαρκίας ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) έχει διπλασιαστεί τα τελευταία 20 χρόνια, από το 15% στο 31%. Στα παιδιά και στους εφήβους η παρουσία αυξημένου βάρους τριπλασιάστηκε από το 5% στο 15%. Παρόλο που υπήρχαν διαφορές ως προς την επίρεια της παχυσαρκίας σε καρδιαγγειακά προβλήματα, προκαλεί επιδείνωση επιβλαβών παραγόντων που αυξάνουν την εμφάνιση τέτοιων προβλημάτων καθώς και τη θνησιμότητα αυτών των περιστατικών

Η σήψη με θνησιμότητα γύρω στο 25% για μη περίπλοκα περιστατικά αυξάνεται στο 40% σε ασθενείς που παρουσιάζουν πολλαπλή ρήξη οργάνων. Η σήψη αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας και δυστυχώς τα ποσοστά αυξάνονται. Κατά την διάρκεια της ρήξης ζωτικών οργάνων η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες διαφοροποιούν τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία τους και την θανάτωση των κυττάρων.

Η εργασία είχε ως σκοπό την ανάλυση της σχέσης μεταξύ του οξειδωτικού στρες ομάδας ατόμων παχύσαρκων και ομάδα ατόμων παχύσαρκων σηπτικών. Γι' αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήθηκε πλάσμα 58 ατόμων που ανήκουν στις παραπάνω ομάδες με την πολύτιμη βοήθεια του νοσοκομείου Πατρών. Στα δείγματα αυτά μετρήθηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες παρουσιάζοντας αποτελέσματα που εμφανίζουν σημαντική αλληλεπίδραση της σήψης και της παχυσαρκίας. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Πρωτεϊνικά Καρβονύλια (PC) που αποτελούν δείκτη πρωτεϊνικής οξείδωσης, η Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) του πλάσματος καθώς και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS) που αποτελούν δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι σηπτικοί παχύσαρκοι εμφάνισαν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σχέση με τους μη σηπτικούς παχύσαρκους καθώς η TAC ήταν σημαντικά μειωμένη, ενώ τα TBARS και τα PC σημαντικά αυξημένα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι σηπτικοί ασθενείς είναι εκτεθειμένοι σε αυξημένο οξειδωτικό στρες.

Abstract

Obesity is epidemic in the United States. Among adults, the age-adjusted prevalence of obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) has doubled in the past 20 years, from approximately 15% to 31%. In children and adolescents, the prevalence of overweight has tripled from 5% to 15%. Although it has been argued that the independent effect of obesity on CVD risk is small, obesity promotes clusters of risk factors that greatly increase CVD risk, and obese individuals experience substantially elevated morbidity and mortality from nearly all forms of CVD.

With a mortality rate of around 25% for uncomplicated sepsis, rising to 40% in those patients who go on to develop multiple organ failure, sepsis is the most common cause of mortality in an intensive care unit and the incidence is increasing. During sepsis-induced organ failure, the inflammatory response and ensuing oxidative stress induce changes in mitochondria which result in mitochondrial dysfunction and cell death.

The aim of the present study was to evaluate the relationship of the oxidative stress between two groups of patients, obese and septic obese. For this reason 58 patients' plasma was used along with Patra's hospital valuable help. In these samples we assessed oxidative stress markers in order to investigate the interaction between obesity and sepsis. The oxidative stress markers used were TAC, TBARS and protein carbonyls (PC). The results indicate that septic obese patients had increased oxidative stress in comparison with obese patients, because of a decreased TAC and increased TBARS and PC values. We conclude that septic patients are susceptible to an increased oxidative stress.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002). Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντιούνται συνηθέστερα είναι οι ROS. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και οι μη ρίζες υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες υξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

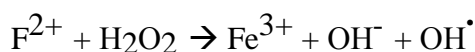
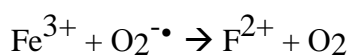
1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti, 2001). Ο μηχανισμός παραγωγής τους βασίζεται στο γεγονός ότι κατά την παραγωγή του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες δραστικές ουσίες είναι ROS.

Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .



Εκτός από τις ROS στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου από τη συνθάση του NO. Πέρα από τα μιτοχόνδρια, μια άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδισώματα. Τα υπεροξειδισώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του

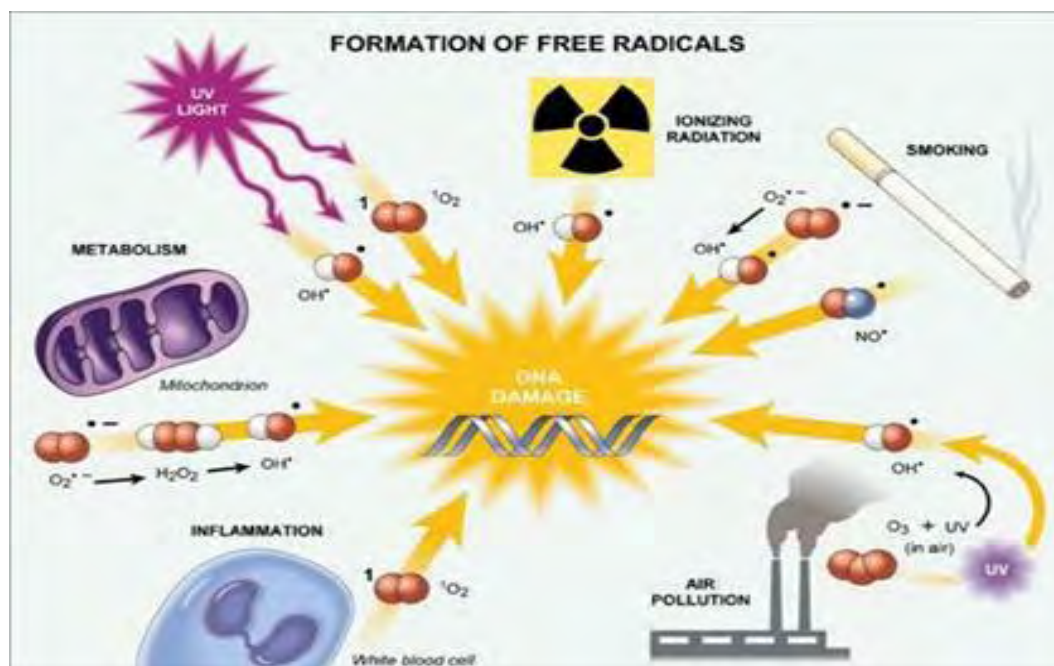
κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames et al., 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα O_2 (Cooper et al., 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brandley et al., 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Εξωγενείς πηγές

Εδώ περιλαμβάνονται διάφοροι και ετερογενείς παράγοντες όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο (Ames, 1981; (Halliwell & Gutteridge 1998).



Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης. Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό. Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες

έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O₂) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχειδειχτεί ότι η διαρροή ελεύθερων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ. Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Λιπίδια

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO[•], συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΐδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα.

Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002).

DNA

Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

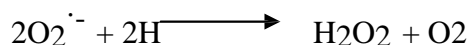
A) Ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:

SOD

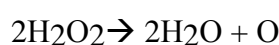


Το $\text{O}_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .

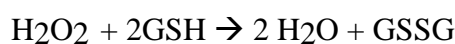
CAT



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

GPX



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί

σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

B) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

B-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

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 (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα

και τα προστατεύει από τις ROS.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαραγόντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

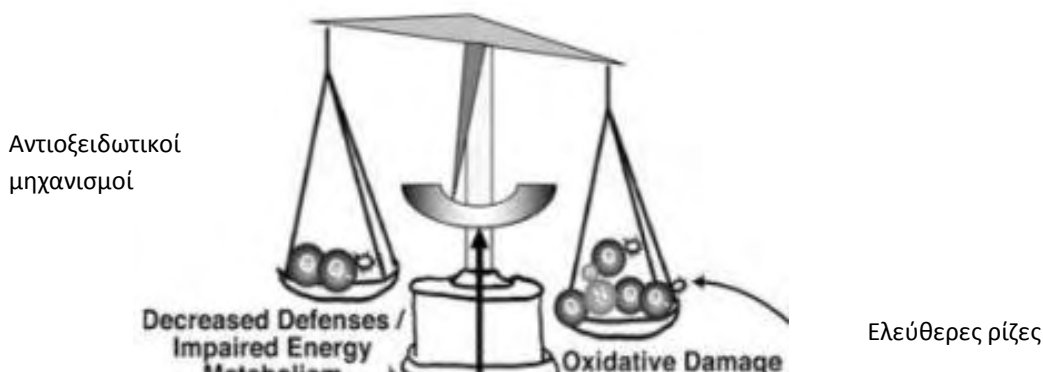
1.5 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 3) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

A) Εξωγενείς παράγοντες:

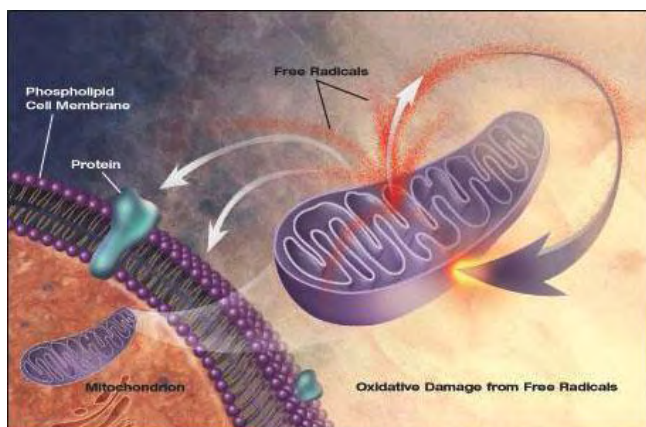
- B) Ξενοβιοτικές ουσίες
 - Γ) Παθογόνα βακτήρια και ιοί
 - Δ) Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
 - Ε) Ακτινοβολία
 - ΣΤ) Διατροφή
 - Ζ) Κάπνισμα
 - Η) Φάρμακα
- B) Ενδογενείς παράγοντες:
- A) Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
 - B) Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχονδρίων
 - Γ) Λευκοκύτταρα



Εικόνα 2 Οξειδωτικό στρες

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις και κατά συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος (Εικόνα 4). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη,

τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται . Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D –ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



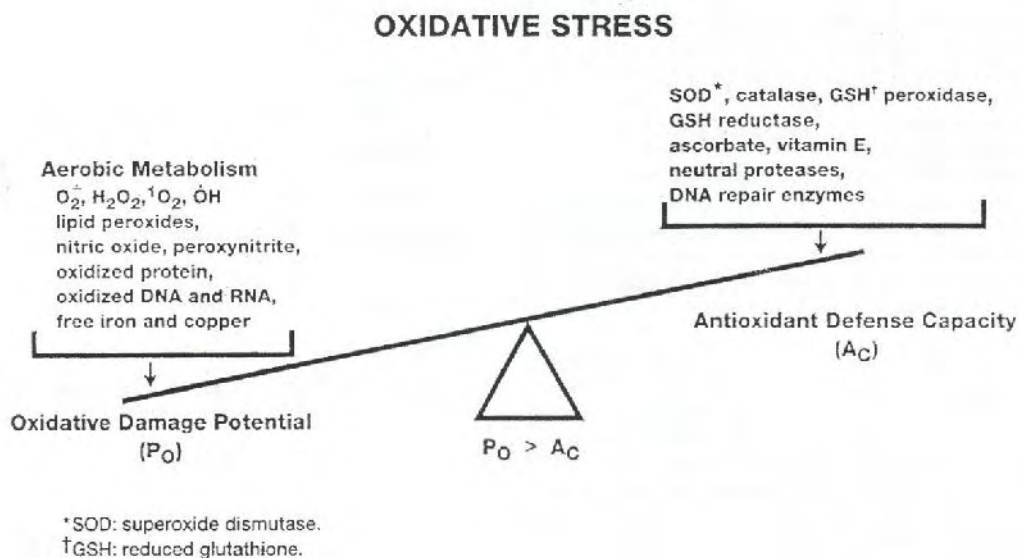
Εικόνα 3 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) (Εικόνα 5), για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις , τον καρκίνο), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS , την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) κ.ά.



Εικόνα 4 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών - αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

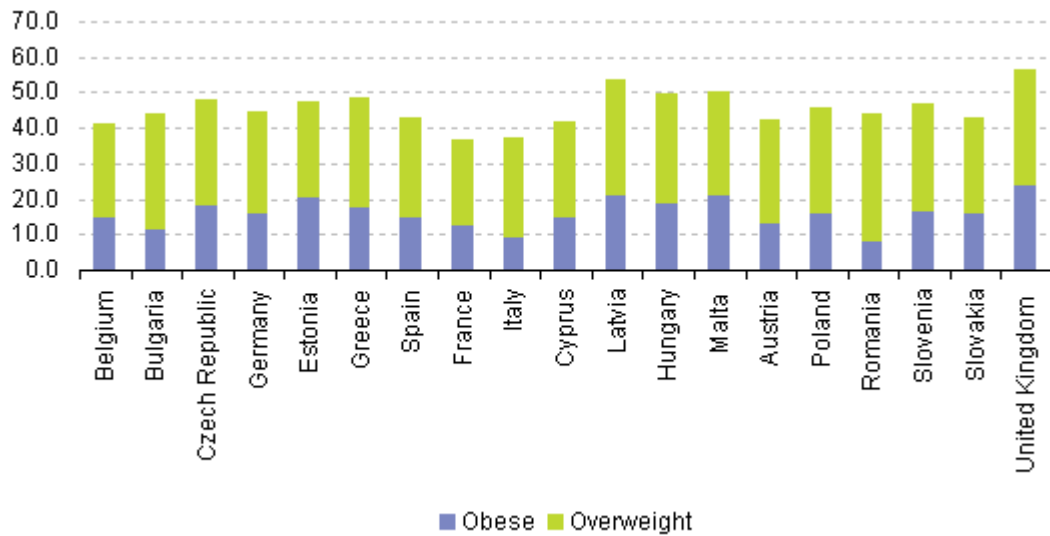
Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

1.6 Παχυσαρκία

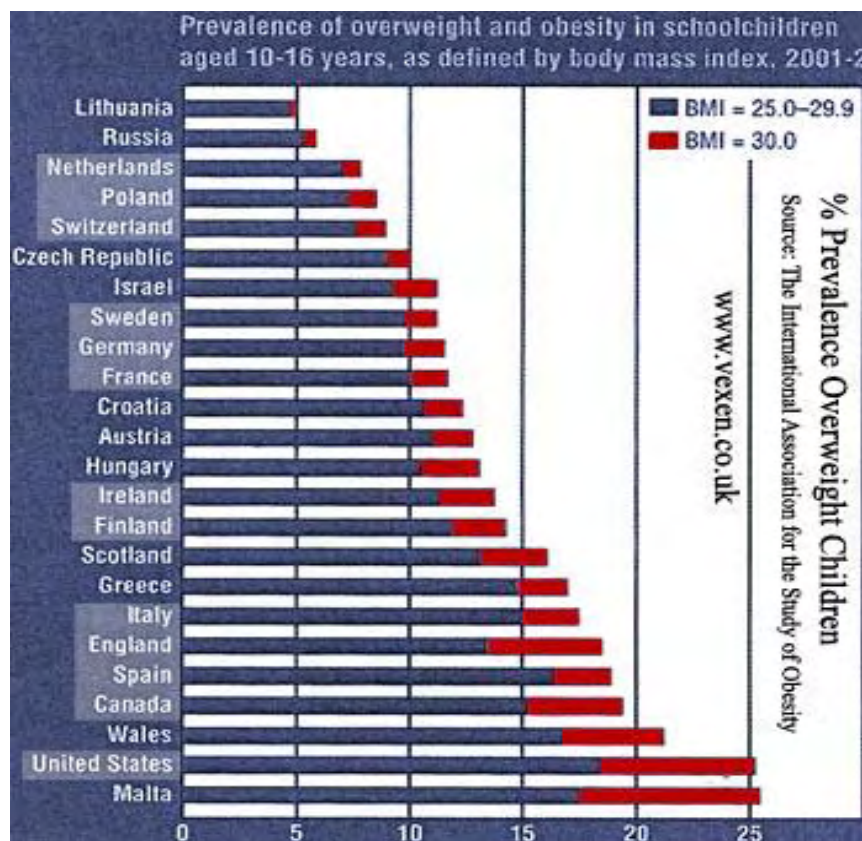
Το διαρκώς αυξανόμενο παγκοσμίως φαινόμενο της παχυσαρκίας αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες μάστιγες της τελευταίας δεκαετίας. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας (WHO - World Health Organization) ως ασθένεια και ως τέτοια αντιμετωπίζεται πλέον. Η μεταβολική κατάσταση στην οποία υποκύπτουν οι παχύσαρκοι ασθενείς δημιουργούν επιπλέον προβλήματα σε πολλά συστήματα του ανθρωπίνου οργανισμού όπως στο:

- α) αναπνευστικό σύστημα
- β) καρδιαγγειακό σύστημα
- γ) εκφυλίσεις μεγάλων αρθρώσεων
- δ) αύξηση χοληστερίνης, σακχάρου, χολολιθίαση, λιπώδη διήθηση ήπατος.
- ε) γυναικολογικά προβλήματα
- στ) αυξημένη συχνότητα σε καρκίνο
- ζ) αυξημένος κίνδυνος επιπλοκών μετά από εγχειρήσεις
- η) ψυχολογικά προβλήματα που δημιουργούνται από την κοινωνική απόρριψη και απομόνωση.
- θ) επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη

Η θεραπεία της παχυσαρκίας διακρίνεται σε συντηρητική και χειρουργική. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η συστηματική και ελεγχόμενη από τον διατροφολόγο σωστή διατροφή, το ενδογαστρικό μπαλόνι και τα φάρμακα (Acomplia, Reductil Xenical), σε συνδυασμό με σωστή και συστηματική σωματική άσκηση.(Freedman 2011)



Διάγραμμα 1 . Ποσοστό Υπέρβαρων-Παχύσαρκων στην Ευρώπη 2011



Διάγραμμα 2. Παχυσαρκία σε παιδιά 10-16 χρονών από 2001 έως το 2011

1.6.1 Ορισμός

Ο όρος αναφέρεται στην αύξηση του σωματικού λίπους που έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση του σωματικού βάρους. Η μειωμένη άσκηση καθώς και τα αυξημένα σε θερμιδική αξία τρόφιμα που καταναλώνονται είναι τα κύρια αίτια ανάπτυξης της. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως γενετική, νευροχημεία και ψυχολογία, και τα αίτια που την προκαλούν είναι ενδογενή και εξωγενή (Bocker 2006, Freedman 2011)

1.6.2 Δείκτης Σωματικής Μάζας(BMI – Body Mass Index)

Για την αντιμετώπιση της αναπτύχθηκαν τρόποι προσδιορισμού της. Ο πρώτος τρόπος είναι πολύ απλός χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο, που προσδιορίζει τον Δείκτη Σωματικής Μάζας (ΔΣΜ) και καθορίζει την κατηγορία της παχυσαρκίας, ο οποίος είναι το πηλίκο του βάρους σε κιλά δια του ύψους σε μέτρα στο τετράγωνο.

$$\Delta\Sigma\text{M (BMI – Body Mass Index)} = \text{Βάρος (kgr)}/\text{Υψος}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

Οι άνθρωποι με ΔΣΜ μεγαλύτερο του 25 θεωρούνται υπέρβαροι, άνω του 30 παχύσαρκοι, ενώ οι άνθρωποι με δείκτη ΔΣΜ άνω των 40 βαθμών βρίσκονται στην θανάσιμα επικίνδυνη περιοχή της παχυσαρκίας. (WHO 2011, Bocker 2006)

Αναφορικά υπάρχουν και οι δείκτες Περιμέτρου Μέσης (Waist Circumference) και η αναλογία Μέσης και Ισχίων (Waist to Hip Ratio) αλλά είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στον γενικό σωματότυπο του κάθε εξεταζόμενου και δεν ξεφεύγουν από την ιδανική αξιοπιστία. (Bocker 2006, Haslam 2005)

1.7 Σήψη

Ορισμός

Συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση έναντι λοίμωξης κατά την οποία αναπτύσσεται πυρετός ή υποθερμία, ταχυκαρδία, ταχύπνοια, και ένδειξη ανεπαρκούς ροή αίματος στα εσωτερικά όργανα. Το σύνδρομο αποτελεί κοινό αίτιο θανάτου ασθενών σε κρίσιμη κατάσταση. Περίπου το 40% των ασθενών με σήψη πεθαίνουν στις ΗΠΑ παρατηρούνται περίπου 200.000 έως 400.000 θάνατοι λόγω σήψης, ετησίως. Παθογόνοι οργανισμοί όπως βακτήρια, μυκοβακτηρίδια, μύκητες,

πρωτόζωα και ιοί ενδέχεται να πυροδοτούν την έναρξη των φλεγμονωδών αντιδράσεων που συνιστούν τη σήψη. Ο αριθμός ασθενών με σήψη έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 20 χρόνια ως το αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων περιλαμβανομένου της γήρανσης του πληθυσμού, του αυξημένου αριθμού ασθενών με ανοσοκατασταλτικές παθήσεις (λ.χ. λόγω μεταμόσχευσης οργάνων), του αυξημένου αριθμού ασθενών με πολλαπλές παθήσεις και της αυξημένης χρήσης επεμβατικών ή εσωτερικά εγκατεστημένων συσκευών ιατρικής μέριμνας, οι οποίες λειτουργούν ως πύλες εισόδου της μόλυνσης (WHO 2011, Bone R et al 1992).

Οι επιπλοκές της σήψης ενδέχεται να περιλαμβάνουν καταπληξία, ανεπάρκεια οργάνων (π.χ. σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων ή οξεία νεφρική ανεπάρκεια), διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, τροποποιημένη πνευματική κατάσταση, ίκτερο, μεταστατικό σχηματισμό αποστημάτων και πολλαπλή ανεπάρκεια οργανικών συστημάτων.

1.7.1 SIRS

Ο όρος Systemic Inflammatory Response Syndrome χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις φλεγμονές ενός συστήματος ανεξαρτήτου τις αιτίες που το προκάλεσε και για πρώτη φορά εμφανίστηκε στο άρθρο των Bone et al. "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis" το 1992.

Η σήψη προέρχεται από συνδυασμένη επίδραση μιας ιογενούς λοίμωξης και μιας ισχυρής απόκρισης του ξενιστή στη λοίμωξη (λ.χ. έκλυση κυτοκινών ή χημειοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, το νιτρικό οξείδιο, οι ιντερλευκίνες και άλλες). Οι λοιμώξεις στους πνεύμονες, στην κοιλιακή χώρα και στην ουρογεννητική οδό εμπλέκονται στη σήψη συχνότερα από ότι οι λοιμώξεις σε άλλες περιοχές του σώματος. (Bone Re et al 1992, Rotstein 2000)

Χαρακτηρίζεται με την παρουσία το λιγότερο 2 εκ των παρακάτω χαρακτηριστικών:

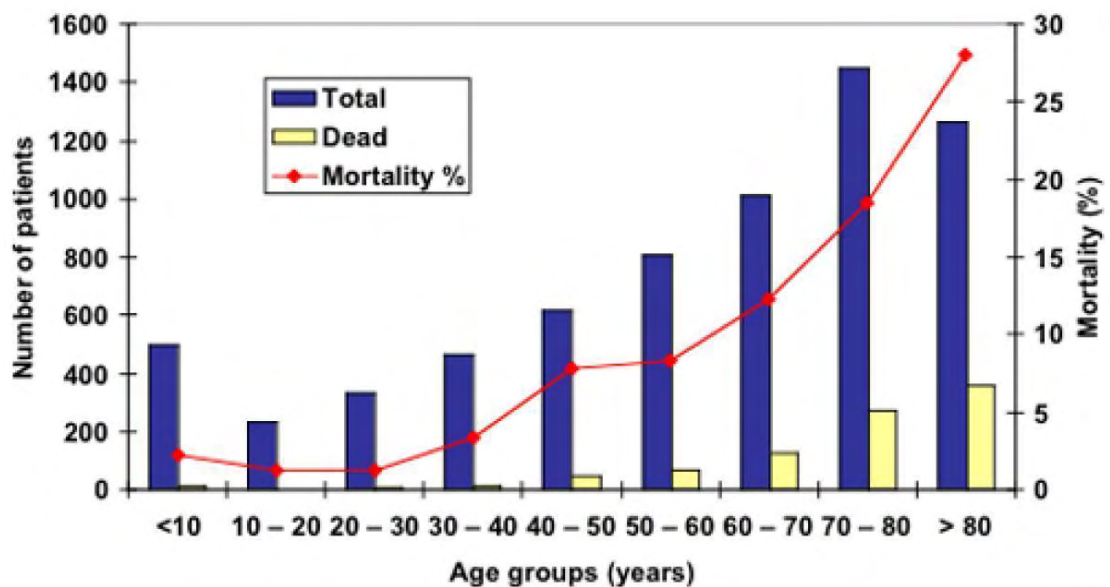
- Θερμοκρασία Σώματος $> 38^{\circ}\text{C}$ or $< 36^{\circ}\text{C}$
- Καρδιακοί Σφυγμοί $> 90/\text{min}$

•ρυθμός Αναπνοής > 20/min or PaCO₂ < 32 mmHg

•Αριθμός Λευκοκυττάρων > 12,000/ μL or < 4000/ μL

1.7.2 MODS

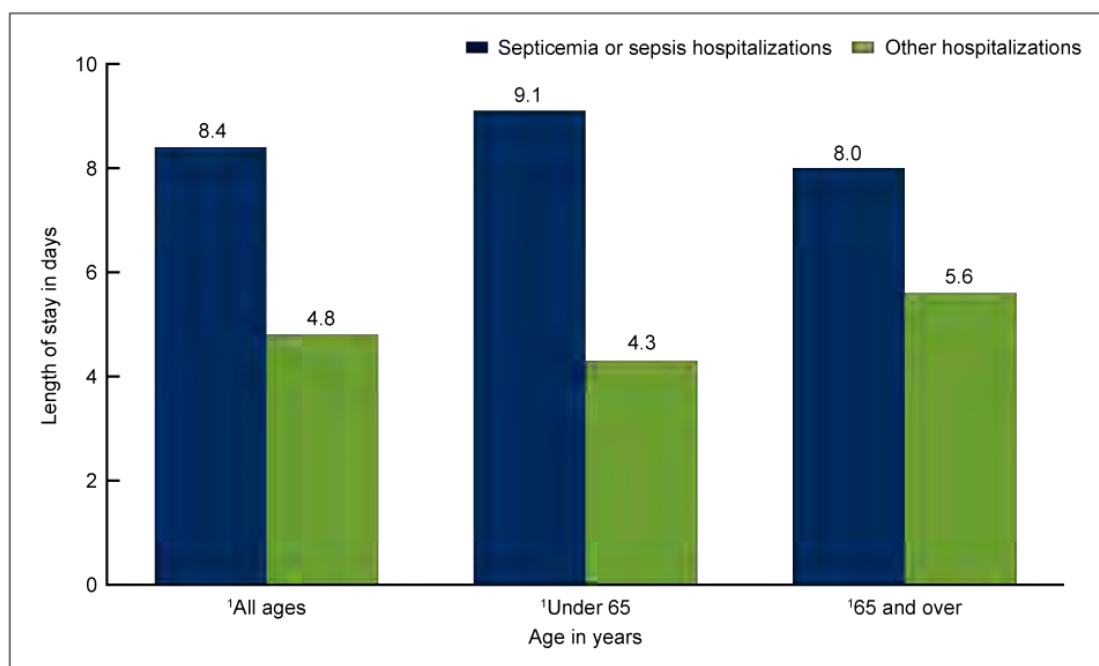
Ο όρος Σύνδρομο Πολλαπλών Δυσλειτουργιών Οργάνων πρώτο εμφανίστηκε στο ίδιο άρθρο με τον όρο SIRS . Οι συγγραφείς του άρθρου χαρακτηρίζουν το MODS με την εύρεση αλλοίωσης στον τρόπο λειτουργίας βασικών οργάνων και την αδυναμία διατήρησης της Ομοιόστασης. Το MODS είναι η νούμερο 1 αιτία θανάτου στις ΜΕΘ(Μονάδες Εντατικής Θεραπείας) με ποσοστά 50% - 80%.(Rotstein 2000)



Critical Care

Διάγραμμα 3. Η αύξηση της θνησιμότητας σε ασθενείς διαφόρων ηλικιών που παρουσίασαν σήψη

Figure 4. Average length of stay for those hospitalized for septicemia or sepsis compared with those hospitalized for other conditions, 2008



¹Difference is statistically significant at the 0.05 level.
SOURCE: CDC/NCHS, National Hospital Discharge Survey, 2008.

Διάγραμμα 4. Ο χρόνος παραμονής ασθενών σε νοσοκομειακές μονάδες που παρουσίασαν σήψη σε σχέση με άλλες ασθένειες

1.7.3 Σήψη Και Παχυσαρκία

Η παρουσία και των δύο εμφανίζεται ολοένα και περισσότερο. Μελέτες αποδεικνύουν την άμεση σχέση της παχυσαρκίας στην εξέλιξη και την κατάληξη σηπτικών ασθενών. Άτομα με ΔΣΜ άνω των 40 μονάδων παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα και παρατεταμένο χρόνο παραμονής υπό την βοήθεια μηχανημάτων υποστήριξης αναπνοής. Στις ίδιες μελέτες τα στοιχεία δείχνουν τεράστιες διαφορές σε άτομα που έχουν χαμηλότερο των 40 μονάδων ΔΣΜ καθώς και διαφορές στην εμφάνιση επιπλοκών κατά την διάρκεια παραμονής τους στις ΜΕΘ. (Rotstein 2000, El-Solh 2001). Το παράδοξο είναι ότι σύμφωνα με την έρευνα του Ethan F Kuperman φαίνεται ότι τα παχύσαρκα άτομα εμφανίζουν σε μεγάλο ποσοστό ανθεκτικότητα στην σήψη λόγω της ανοχής στην ινσουλίνη και τον διαβήτη. Η πιο πιθανή απάντηση είναι η ορμόνη λευκίνη, η παραγωγή της οποίας αυξάνεται σε παχύσαρκα άτομα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η σήψη και η παχυσαρκία αποτελούν δύο από τις σημαντικότερες παθολογικές καταστάσεις της εποχής μας. Διαρκώς αυξανόμενα ποσοστά ανθρώπων συγκαταλέγονται στην κατηγορία των παχύσαρκων ενώ η σήψη αποτελεί το νούμερο ένα αίτιο θνησιμότητας στις εντατικές των νοσοκομείων της Αμερικής. Ο σκοπός αυτής της έρευνας ήταν να μελετήσει τους δείκτες οξειδωτικού στρες, παχύσαρκων σηπτικών (Ομάδα 1) και μη σηπτικών παχύσαρκων ατόμων (Ομάδα 2) και να τους συγκρίνει. Με την πολύτιμη βοήθεια του νοσοκομείου Πατρών συγκεντρώθηκαν 58 δείγματα από πλάσμα ατόμων των παραπάνω ομάδων με δείκτη BMI>30.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

Για την πραγματοποίηση της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν 58 άτομα και διαχωρίστηκαν σε 2 κατηγορίες, i) Παχύσαρκοι και ii) Παχύσαρκοι σηπτικοί.

3.1.1 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

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 μαλονδιαλδεύδη. Η μαλονδιαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεύδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της αλονδιαλδεύδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

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

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

MB (Tris): 121.14

MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]

Για να 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 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 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

TCA 70%: Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό 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 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.

5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 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 κυψελίδα 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 το μmol/L.

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

Χρήσιμες πληροφορίες

Το TCA προστίθεται στον ορό ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κτλ).

Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας σε οργανικά διαλύματα.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Η ποσότητα αιμόλυματος που χρησιμοποιείται είναι όση και αυτή του πλάσματος (100 μL). Τα βήματα της μεθόδου παραμένουν ίδια. Η μόνη διαφοροποίηση είναι στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των TBARS στα ερυθροκύτταρα. Οι υπολογισμοί είναι οι ακόλουθοι:

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31 \times 2$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$) και το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό. 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 $\mu\text{mol/L}$.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των TBARS εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ($\mu\text{mol/L}$). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL . Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

3.1.2 ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

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). Είναι αξιόπιστης 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 δριμείες 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 το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

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: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 50 μL πλάματος προσθέτουμε 50 μL 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
4. Προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. 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.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (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.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
11. 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.

12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.

13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$.

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

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι στην ποσότητα του αιμόλυματος που χρησιμοποιείται (50 μL αραιωμένα 1/10 σε αντίθεση με το πλάσμα που δεν υπάρχει αραίωση) και στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα. Οι υπολογισμοί είναι οι ακόλουθοι:

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50 \times 2 \times 10$.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μ L στην κυψελίδα /50 μ L δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 10 για να συνυπολογίσουμε την 1:10 αραίωση του δείγματος.

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

Συγκέντρωση καρβονυλίων ανά mg αιμοσφαιρίνης

Protein carbonyls (nmol/ mg Hb)

3.1.3 ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC) ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

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 επίπονος τρόπος επειδή 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.

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 μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό

έλεγχου). Εξαιτίας της αραίωσης, 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 μ L
DTNB 1 mM	330 μ L	330 μ L
Απεσταγμένο νερό	20 μ L	—
Αιμόλυμα	—	20 μ L

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 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του

χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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 μL στην κυψελίδα / 20 μL 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 mmol DPPH/L .

3.1.4 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση \times χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν με bonferroni t-test. Για τα δεδομένα της απόδοσης χρησιμοποιήθηκε t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

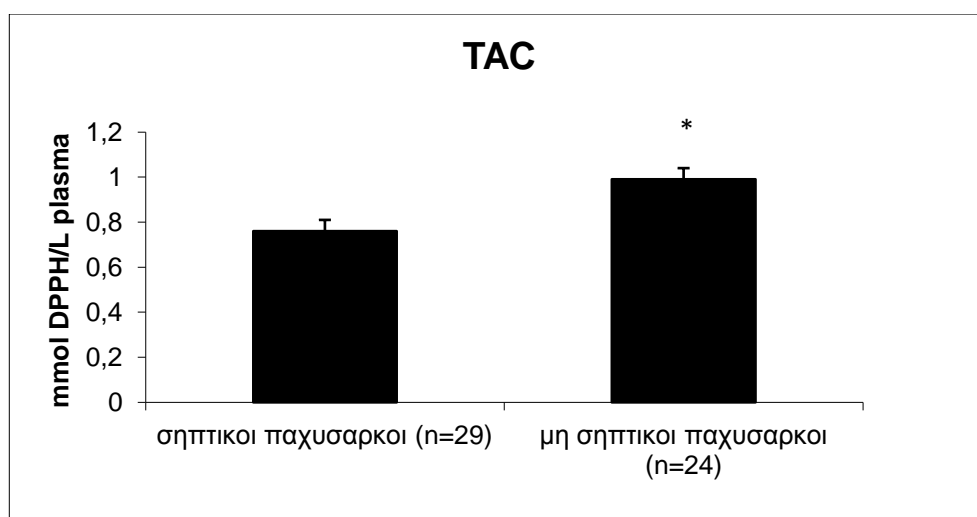
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 TAC

Μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας: η ομάδα 1 είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές από την ομάδα 2 (Σχήμα 1 - Πίνακας 1)

	TAC	SD	SEM
σηπτικοί παχυσαρκοί (n=29)	0,76	0,25	0,05
μη σηπτικοί παχυσαρκοί (n=24)	0,99	0,25	0,05

Πίνακας 1



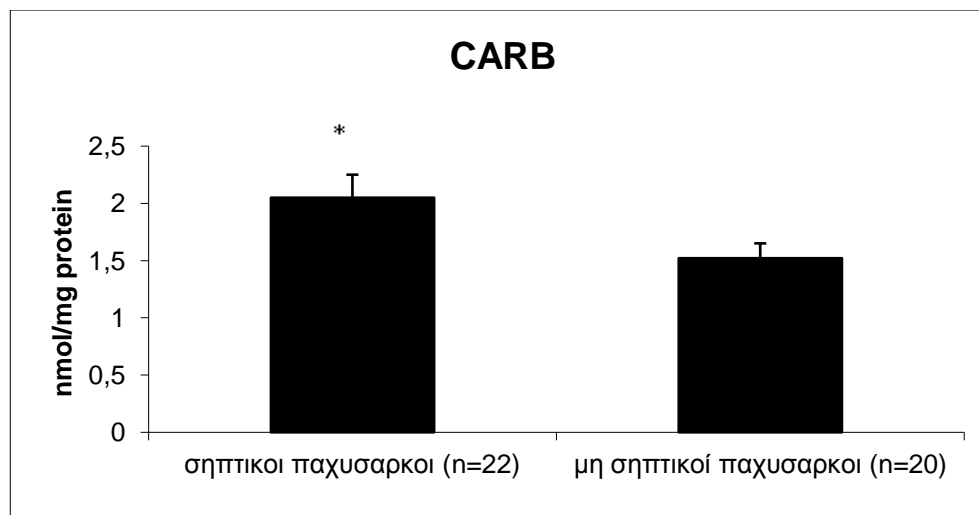
Σχήμα 1. Η διαφοροποίηση στην τιμή της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας * Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των παχύσαρκων σηπτικών και στην ομάδα των μη σηπτικών παχύσαρκων ($P < 0,05$).

4.2 Καρβονύλια

Η Ομάδα 1 εμφανίζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια σε σχέση με την ομάδα 2 (Σχήμα 2 - Πίνακας 2).

	CARB	sd	sem
σηπτικοί παχυσαρκοί (n=22)	2,05	1,01	0,2
μη σηπτικοί παχυσαρκοί (n=20)	1,52	0,59	0,13

Πίνακας 2



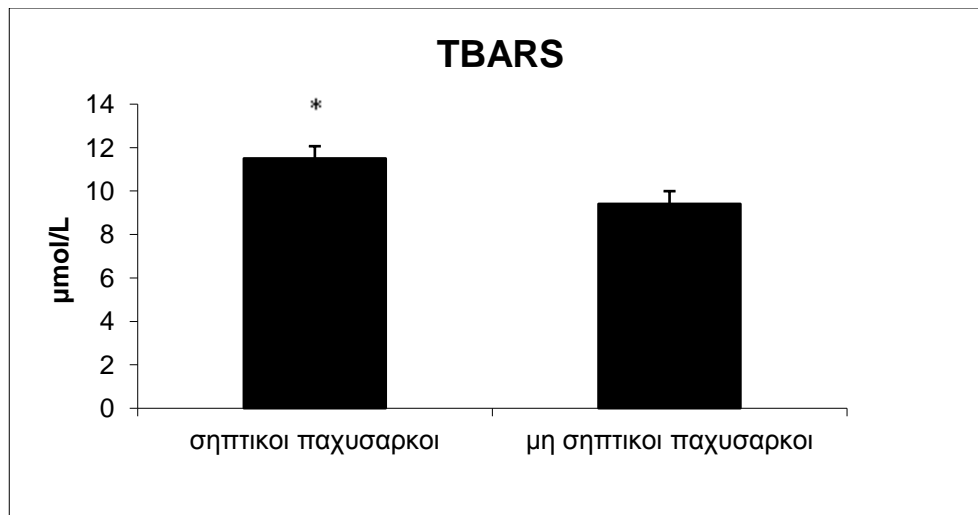
Σχήμα 2. Η διαφοροποίηση στην τιμή της μέτρησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων *
Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$)

4.3 TBARS

Η Ομάδα 1 εμφανίζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα TBARS σε σχέση με την ομάδα 2 (Σχήμα 2 - Πίνακας 2).

	TBARS	SD	SEM
σηπτικοί παχυσαρκοί	11,5	2,96	0,56
μη σηπτικοί παχυσαρκοί	9,4	3,12	0,59

Πίνακας 3



Σχήμα 3. Η διαφοροποίηση στην τιμή της μέτρησης των TBARS * Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

5. Συζήτηση

Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή της εργασίας, η παχυσαρκία και η σήψη αποτελούν κορυφαίες σε επικινδυνότητα και θνησιμότητα ασθένειες παγκοσμίως. Και οι δύο συνδέονται μέσω της κατάστασης φλεγμονής από την οποία χαρακτηρίζονται οι ασθενείς (WHO Organization, Abilles et all 2006).

Η φλεγμονή είναι πηγή οξειδωτικού στρες. Ανεβασμένα επίπεδα ισοπροστανίων που αποτελούν δείκτη οξειδωτικού στρες, έχουν βρεθεί σε πλάσμα και ούρα σε αρκετές φλεγμονώδεις ασθένειες. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών αυξάνει την φλεγμονώδη αντίδραση ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο AP-1 και ο NF-κB. Οι παράγοντες αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων που συνδέονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και την καταπολέμηση της φλεγμονής, περιλαμβάνοντας τις κυτοκίνες και τη NO συνθετάση (Vachharajani 2011).

Ο λιπώδης ιστός εκτός από αποθηκευτικός χώρος ενεργειακών μορίων, είναι και ένα μεταβολικά ενεργό ενδοκρινές όργανο. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας TNF-a (Tumor Necrosis factor) εκφράζονται στο ανθρώπινο λιπώδη ιστό. Σε υγιή άτομα, η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης-6 αυξάνεται με την αύξηση του αποθηκευμένου λίπους (Hsu A et all 2007, Shapiro NI et all 2010). Η ηπατική σύνθεση της πρωτεΐνης C (C Reactive Protein) ρυθμίζεται από την IL6. Αυξημένη παρουσία CRP έχει άμεση σχέση με την αύξηση πιθανότητας εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών και καθώς η παχυσαρκία στην βάση της είναι μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής, έτσι εξηγείται η σχέση μεταξύ της παχυσαρκίας και των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Vachharajani 2011).

Η σήψη σε οποιαδήποτε μορφή της συνοδεύεται από έντονη φλεγμονή και αναλογιζόμενοι ότι η φλεγμονή είναι πηγή οξειδωτικού στρες συνειδητοποιούμε την άμεση σύνδεση της με την παχυσαρκία. Η παρουσία αυξημένης CRP λόγω αυξημένου λιπώδη ιστού λειτουργεί συνεργικά με τη σήψη όπως φαίνεται στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν αυξάνοντας σημαντικά το οξειδωτικό στρες σε σπητικούς παχύσαρκους ασθενείς σε σχέση με τους απλά παχύσαρκους ασθενείς (Hsu et al 2007, Shapiro et al 2010, Faggioni et al 2000).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αυξημένη τιμή των TBARS ουσιαστικά δηλαδή των οξειδωμένων λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα οι τιμές των TBARS στους σηπτικούς παχύσαρκους ήταν αυξημένη κατά 22,3% σε σχέση με τους μη σηπτικούς παχύσαρκους. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε αύξηση κατά 34,8% στους σηπτικούς παχύσαρκους σε σχέση με τους μη σηπτικούς παχύσαρκους που δείχνει ότι οι πρωτεΐνες του πλάσματος έχουν οξειδωθεί σημαντικά. Τέλος στη TAC παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στους σηπτικούς παχύσαρκους κατά 23,2% που υποδηλώνει ότι το γενικό αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος είναι μειωμένο.

Σε παράλληλη εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών όπου μετρήθηκαν οι παραπάνω δείκτες σε σηπτικούς και μη σηπτικούς ασθενείς, όσον αφορά την TAC παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωσή της στους σηπτικούς σε σχέση με τους μη σηπτικούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στατιστικά σημαντική μείωση στην TAC παρατηρήθηκε μεταξύ των σηπτικών παχύσαρκων και μη σηπτικών παχύσαρκων. Μεταξύ όμως μη σηπτικών και μη σηπτικών παχύσαρκων δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην TAC παρά το γεγονός ότι σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι η παχυσαρκία μειώνει την TAC. Ωστόσο οι σηπτικοί παχύσαρκοι παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένες τιμές σε σχέση με τους σηπτικούς.

Στα TBARS δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ μη σηπτικών και σηπτικών. Παρατηρήθηκε όμως όπως αναφέρθηκε σημαντική αύξησή τους στους σηπτικούς παχύσαρκους σε σχέση με τους μη σηπτικούς παχύσαρκους. Επίσης οι παχύσαρκοι έχουν σημαντικά αυξημένες τιμές σε σχέση με τους μη παχύσαρκους.

Στα Πρωτεϊνικά Καρβονύλια δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ μη σηπτικών και σηπτικών. Παρατηρήθηκε όμως σημαντική αύξησή τους όπως ανφέρθηκε στους σηπτικούς παχύσαρκους σε σχέση με τους μη σηπτικούς παχύσαρκους. Επίσης οι παχύσαρκοι έχουν σημαντικά αυξημένες τιμές σε σχέση με τους μη παχύσαρκους.

Η παραπάνω σύγκριση επιβεβαιώνει την συνεργιστική σχέση της παχυσαρκίας και της σήψης. Άρα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν πως η μείωση του οξειδωτικού στρες και στις δύο καταστάσεις μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή και κατά συνέπεια τις επιπτώσεις τους στην εξέλιξη της υγείας των ασθενών.

6.Βιβλιογραφία

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. [cited 2011 Mai 8];Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
2. Freedman DS, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Obesity --- United States, 1988--2008. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2011 Jan 14;(Vol. 60):73–7.
3. Bocker W. Pathologie : mit 164 Tabellen [Online-Zugang interaktive Extras]. 3. Aufl. Munchen [u.a.]: Elsevier Urban und Fischer; 2006.
4. Haslam DW, James WPT. Obesity. The Lancet. 2005 Okt;366(9492):1197–209.
5. Bickley L. Bates' guide to physical examination and history taking. 10. Edition Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2009
6. Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein A, Knaus W, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 June;101(6):1644–55.
7. Rotstein OD. Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction Syndrome: Gut Origin, Protection, and Decontamination. Surgical Infections. 2000 Sep;1(3):217–25.
8. El-Solh A. Morbid Obesity in the Medical ICU. Chest. 2001 Dez;120(6):1989–97.
9. The impact of obesity on sepsis mortality:a retrospective review. Ethan F Kuperman^{1*}, John W Showalter², Erik B Lehman³, Amy E Leib³ and Jennifer L Kraschnewski
10. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.

11. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84(1): 1-7.
12. Ajmani, R.S., Fleg. J.L., Demehin, A.A., Wright, J.G., O'Connor, F., Heim, J.M., Tarien, E., and Rifkind, J.M. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2003; 28: 29-40.
13. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.
14. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
15. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
16. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 1998; 77(6): 498-502.
17. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2004; 170:1179-1184.
18. Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
19. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
21. Chevion S, Moran DS, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(9): 5119-23.
22. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 29 (suppl. 1), 531.

23. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
24. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1198-205.
25. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress.
26. Ferrando A, Vila L, Voces JA, Cabral AC, Alvarez AI, Prieto JG. Effects of a standardized *Panax ginseng* extract on the skeletal muscle of the rat: a comparative study in animals at rest and under exercise. *Planta Med.* 1999; Apr;65(3):239-44.
27. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.
28. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567:113-120; 2005.
29. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
30. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2007. 39:1107-1113.
31. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.
32. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 2006. 38: 1443-1450.

33. Veskokakis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008. Dec;33(6):1140-54.
34. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J: Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res* 2003, 11(4):525-531.
35. Coppack SW: Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001, 60(3):349-356.
36. Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR: The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg* 2004, 14(5):589-600.
37. Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT: Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutri metabol* 2006, 3(Journal Article):28.
38. Vachharajani V, Cunningham C, Yoza B, Carson J Jr, Vachharajani TJ, McCall C: Adiponectin-Deficiency Exaggerates Sepsis-Induced Microvascular Dysfunction in the Mouse Brain. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2011, 20(3):498-504.
39. Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P: Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clin Exp Immunol* 2007, 150(2):332-339
40. Shapiro NI, Khankin EV, Van Meurs M, Shih SC, Lu S, Yano M, Castro PR, Maratos-Flier E, Parikh SM, Karumanchi SA, et al.: Leptin exacerbates sepsis-mediated morbidity and mortality. *J immunol (Baltimore, Md: 1950)* 2010, 185(1):517-524
41. Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C: Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock. *Am J Pathol* 2000, 156(5):1781-1787

42. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
43. Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
44. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504; 2003.
45. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
46. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
47. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry.* New York: Oxford Science Publications.
48. Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 89-95.
49. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33(4):564-7.
50. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002 62: 231 236.
51. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156 70.
52. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
53. Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on

- oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002;87(2):141-4.
54. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2001; 28: 141-143.
55. Kim SH, Park KS, Chang MJ, Sung JH. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness.* 2005 Jun;45(2):178-82.
56. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996, 334(5):292-295.
57. Bornstein SR, Licinio J, Tauchnitz R, Engelmann L, Negrao AB, Gold P, Chrousos GP: Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83(1):280-283.
58. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
59. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo*. 13: 295-309.
60. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.
61. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
62. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.

63. Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
64. Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
65. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
66. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
67. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*. 2003; 89: 100-107.