



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ, ΣΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ**

**OXIDATIVE STRESS DETERMINATION IN PATIENTS WITH DIABETES
MELITUS, SEPSIS AND SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE**

ΓΑΛΑΤΟΥΛΑΣ ΑΔΑΜ-ΠΑΝΤΕΛΗΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δημήτριος Στάγκος : Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κώστα Γερασόπουλο για την καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συγγενείς και φίλους που με στήριξαν και ειδικά την οικογένεια μου που ήταν μαζί μου σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Σήψη	10
1.1.1. Ιστορική αναδρομή για τον όρο σήψη	10
1.1.2. Ο όρος σήψη.	11
1.1.3. Παθοφυσιολογία	14
1.1.3.1. Παθοφυσιολογία έκλυσης φλεγμονώδους αντίδρασης	15
1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια	26
1.1.4.1. Η Ηλικία.	26
1.1.4.2. Το φύλο.	27
1.1.4.3. Συνυπάρχουσες Παθήσεις	27
1.1.5. Διακυμάνσεις της θνησιμότητας και των διαφόρων τύπων σήψης	27
1.1.6. Θεραπεία	30
1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης.	31
1.2.1. Ορισμός	31
1.2.2. Είδη σακχαρώδη διαβήτη	31
1.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία	33
1.2.4. Ινσουλίνη	34

1.2.5. Λοιμώξεις σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη	35
1.2.6. Ιστορική αναδρομή	38
1.2.7. Συσχετισμός Συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης και Σήψης με Σακχαρώδη Διαβήτη	40
1.3. Οξειδωτικό Στρες	41
1.3.1. Ορισμός.	41
1.3.2. Ιστορική αναδρομή	41
1.3.3. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου	42
1.3.4. Πώς παράγονται οι ελεύθερες ρίζες	45
1.3.5. Επιπτώσεις	46
1.3.6. Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες	50
1.3.7. Αντιοξειδωτικά.	50
2. ΣΚΟΠΟΣ.	53
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
3.1. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες	54
3.1.1. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα.	54
3.1.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα (PC)	58
3.1.3. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) του πλάσματος	62
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	65
4.1.1. Επίπεδα TAC σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.	65
4.1.2. Επίπεδα TAC σε φυσιολογικούς ασθενείς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.	66
4.2.1. Επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	67
4.2.2. Επίπεδα TBARS σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	68
4.3.1. Επίπεδα Καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.	69
4.3.2. Επίπεδα καρβονυλίων σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	70
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του όρου σήψη	13
Εικόνα 2. Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων.	13
Εικόνα 3. Ενεργοποίηση αιμοστατικής και φλεγμονώδους απάντησης.. . . .	16
Εικόνα 4. Ενεργοποίηση μακροφάγων μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων.	17
Εικόνα 5. Ρυθμιστικοί παράγοντες των καταρρακτοειδών συστημάτων. Αντιθρομβίνη. (1). .	17
Εικόνα 6. Ρυθμιστικοί παράγοντες των καταρρακτοειδών συστημάτων. Αντιθρομβίνη. (2) . .	18
Εικόνα 7. Μηχανισμός ενεργοποίησης των μακροφάγων.	19
Εικόνα 8. Μηχανισμός ρύθμισης μέσω της οδού NF-kB.. . . .	20
Εικόνα 9. Δράση ενεργοποιημένων μακροφάγων.. . . .	21
Εικόνα 10. Παραγωγή οξειδωτικών προϊόντων.. . . .	22
Εικόνα 11. Ρυθμιστικός ρόλος της απόπτωσης.	24
Εικόνα 12. Ρυθμιστικός ρόλος της απόπτωσης.	25
Εικόνα 13. Κύρια συμπτώματα του διαβήτη	33
Εικόνα 14. Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας	43
Εικόνα 15. Δημιουργία ελεύθερης ρίζας.	44
Εικόνα 16. Δραστικές μορφές οξυγόνου.	45
Εικόνα 17. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.	45
Εικόνα 18. Μεταβολισμός οξυγόνου	46
Εικόνα 19. Στόχοι ROS.	48
Εικόνα 20. Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.	49
Εικόνα 21. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών	51
Εικόνα 22. Κατάταξη με βάση τη σημαντικότητα αντιοξειδωτικών	52
Εικόνα 23. Παραγωγή MDA	72
Εικόνα 24. Επίπεδα MDA του ορού σε επιζώντες και μή ασθενείς με σήψη. Τα επίπεδα MDA του ορού είναι μεγαλύτερα στους σηπτικούς ασθενείς την 1 ^η , 4 ^η και 8 ^η ημέρα (Lorente et al, 2013	74

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Η εμφάνιση σήψης επηρεάζεται από την ηλικία του ασθενή.	26
Διάγραμμα 2. Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ.	28
Διάγραμμα 3. Εξέλιξη της ποσοστιαίας κατανομής των κυριότερων ομάδων αιτιών θανάτου για τα έτη 1938, 1956, 1972, 1992 και 2012	29
Διάγραμμα 4. Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών.	29
Διάγραμμα 5. Τιμές apache των ασθενών που δείχνουν τη σοβαρότητα της σήψης για κάθε ασθενή του δείγματος μας.	54
Διάγραμμα 6. Ημερήσια επίπεδα Tac σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.	65
Διάγραμμα 7. Σύγκριση επιπέδων TAC σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	66
Διάγραμμα 8. Ημερήσια επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη . . .	67
Διάγραμμα 9 Σύγκριση τιμών TBARS σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	68
Διάγραμμα 10 Επίπεδα Καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.	69
Διάγραμμα 11 Επίπεδα καρβονυλίων σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος στο σακχαρώδη διαβήτη	39
Πίνακας 2. Συσχέτιση της παρουσίας SIRS και έκβασης της υγείας των ασθενών	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως **Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS)** ορίζεται η αντίδραση του οργανισμού σε διάφορους λοιμώδεις παράγοντες, αλλά και μη λοιμώδεις όπως για παράδειγμα κάποιο τραύμα, έγκαυμα ή και παγκρεατίτιδα. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο ή περισσότερων εκ των παρακάτω κριτηρίων: Θερμοκρασία σώματος $> 38^{\circ} \text{C}$ ή $< 36^{\circ} \text{C}$, Καρδιακή Συχνότητα (ΚΣ) > 90 σφύξεις/min, Αναπνευστική συχνότητα : αναπνοές > 20 /min, Λευκά αιμοσφαίρια > 12000 ή $< 4000/\text{mm}^3$ ή 10% άωρες μορφές. Ενώ ως **Σήψη (sepsis)** ορίζεται η ταυτόχρονη παρουσία λοίμωξης και SIRS (τουλάχιστον 2 κριτήρια SIRS).

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια με χρόνια πορεία, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης.

Το **οξειδωτικό στρες** αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να καταδείξει το πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, σήψη και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, οι οποίοι βρίσκονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε καθημερινή αιμοληψία σε 15 ασθενείς, με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και μετρήθηκαν α) η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), β) η υπεροξειδωση των λιπιδίων (TBARS) και γ) η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών (PROTEIN CARBONYLS). Στα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

ABSTRACT

As Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is defined the body's response to various infectious agents, and non-infectious such as trauma, burn or pancreatitis. The aforementioned, is characterized by the presence of two or more of the following criteria: body temperature > 38 ° C or <36th C, Heart rate (HR) > 90 beats / min, Respiratory rate: breathing > 20 / min, White Blood Cells > 12000 or <4000 / mm³ or 10% pupae. On the other hand, sepsis is defined by the simultaneous presence of infection and SIRS (SIRS criteria at least 2).

Diabetes mellitus (DM), commonly referred to as diabetes, is a group of metabolic diseases in which there are high blood sugar levels over a prolonged period due to either the pancreas not producing enough insulin or the cells of the body not responding properly to the insulin produced. There are three main types of diabetes mellitus: Type 1 Diabetes, Type 2 Diabetes and gestational diabetes.

Finally, as Oxidative stress is defined the imbalance between the production of ROS (Reactive Oxygen Species, ROS) and the capacity of a biological system to inactivate such toxic molecules and to repair the damage caused.

The purpose of the present study was to examine how oxidative stress levels vary in patients with diabetes, sepsis and systemic inflammatory response depending the time. For this purpose blood sampling was performed daily in 15 patients with systemic inflammatory response and three oxidative stress markers in plasma were determined: a) total antioxidant capacity of the plasma (TAC), b) lipid peroxidation (TBARS) and c) protein peroxidation (PROTEIN CARBONYLS). The results did not display a significant change in any time point after hospitalization.

1.Εισαγωγή

1.1 Σήψη

1.1.1 Ιστορική αναδρομή της σήψης

Ο όρος σήψη προέρχεται από τον ιατρό Ιπποκράτη, ο οποίος ήταν πιθανώς ο πρώτος που κλήθηκε να περιγράψει το φαινόμενο του σηπτικού σοκ («παρουσία υψηλού πυρετού, αν το εξωτερικό μέρος είναι κρύο ωστόσο αν το εσωτερικό μέρος έχει αυξημένη θερμοκρασία, τότε είναι επικίνδυνο»). Η φιλόσοφος Niccolò Machiavelli (1469-1527) περιέγραψε την δυσκολία στην διάγνωση και την θεραπεία της σήψης ως εξής: «όπως οι γιατροί λένε ότι συμβαίνει σε καταστάσεις έντονου πυρετού, στην αρχή της ασθένειας είναι εύκολο να θεραπευτεί αλλά δύσκολο να διαγνωσθεί, ωστόσο με την πάροδο του χρόνου το γεγονός ότι δεν έγινε η διάγνωση και η θεραπεία στα αρχικά στάδια της σήψης έχει ως αποτέλεσμα να γίνεται εύκολη η διάγνωση της ασθένειας αλλά να είναι δύσκολη η θεραπεία». Το 1546, ο Ιταλός γιατρός Girolamo Fracastoro διατύπωσε την έννοια της μετάδοσης τονίζοντας ότι οι επιδημικές ασθένειες μεταδίδονται από άμεση ή έμμεση επαφή και εξ αποστάσεως μέσω του αέρα και ότι πιθανώς οι υπαίτιοι παράγοντες είναι ορατά σπόρια ή μικρόβια (Spink WW. 1978). Στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, η θεωρία περί μικροβίων επιβεβαιώθηκε από τους Robert Koch και Louis Pasteur και το 1879 ο Louis Pasteur ανακοίνωσε στην Γαλλική Ακαδημία ότι ο στρεπτόκοκκος προκαλεί επιλόχεια σηψαιμία. Επίσης, πρότεινε τρόπους για να αποτρέψει την είσοδο μικροοργανισμών στο ανθρώπινο σώμα, προτρέποντας έτσι τον Joseph Lister να αναπτύξει και να καθιερώσει αντισηπτικές μεθόδους σε χειρουργικές επεμβάσεις.

Τον προηγούμενο αιώνα γνωστοποιήθηκε ότι ο «Μαύρος Θάνατος», μία από τις πιο καταστροφικές πανδημίες στην ανθρώπινη ιστορία, προκλήθηκε από σηψαιμία εξαιτίας του βακτηρίου *Yersinia pestis* (το οποίο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια πανώλη (Drancourt M et al.1998). Το 1909, ο L. Jacob δημοσίευσε τις πρώτες 12 δημοσιεύσεις ασθενών με σήψη, που είχε προκληθεί από Gram αρνητικά βακτήρια *Esherichia Coli*, από τους οποίους το 50% είχε πεθάνει. Το 1914, ο Hugo Schottmuller έδωσε τον πρώτο επιστημονικό ορισμό της σήψης : “Η σήψη είναι μία κατάσταση που

προκαλείται από την είσοδο μικροβίων από μία τοπική πηγή φλεγμονής στην κυκλοφορία του αίματος το οποίο οδηγεί σε διαδοχική μόλυνση σε απομακρυσμένα όργανα” (Schottmueller H. 1914) . Ωστόσο, λιγότεροι από το ήμισυ των ασθενών που έχουν συμπτώματα σήψης έχουν θετικές καλλιέργειες αίματος ή άλλες υποδείξεις μικροβιακής λοίμωξης. Ο William Osler (1849-1919) ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε τον σημαντικό ρόλο της απάντησης του ξενιστή στην σήψη : “Εξαιρουμένων μερικών περιπτώσεων, οι ασθενείς πεθαίνουν λόγω της απάντησης του οργανισμού τους στην μόλυνση και όχι εξαιτίας της μόλυνσης”. Αυτή η αντίληψη ήταν ορόσημο για την κατανόηση του ρόλου της ανοσοαπάντησης του ξενιστή σε μία λοίμωξη (Konrad Reinhart et al. , 2012).

1.1.2 Ο όρος σήψη

Η σήψη ορίζεται ως συστηματική φλεγμονώδης απάντηση του οργανισμού που λαμβάνει μέρος κατά την διάρκεια σοβαρής λοίμωξης. Μπορεί να εξαπλωθεί σταδιακά στο σώμα και να οδηγήσει σε οργανική ανεπάρκεια και σε θάνατο αν δεν γίνει έγκαιρη διάγνωση και δεν χορηγηθεί θεραπεία (Lee P. Skrupky et al., 2011). Είναι μια από τις πιο συνήθεις αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς που νοσηλεύονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Η σήψη είναι το συχνότερο νόσημα, πιο συχνή από τα εγκεφαλικά, τους καρκίνους, τις καρδιοπάθειες και το AIDS.

Η σήψη είναι η πιο κοινή αιτία πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας. Είναι ένα σύνδρομο που προέκυψε μέσα από τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), οι οποίες παρείχαν υπηρεσίες απαραίτητες για την ανθρώπινη ζωή, όπως υποστήριξη ζωτικών οργάνων, μηχανική υποστήριξη καθώς και αναπνευστική υποστήριξη. Πριν την εγκαθίδρυση των ΜΕΘ, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με οξεία σήψη και σηπτικό σοκ πέθαιναν σε μικρό χρονικό διάστημα λόγω των ανεπανόρθωτων ζημιών που προκαλούσε το σοκ στον οργανισμό τους και στα ζωτικά τους όργανα. Το 1975, ένα άρθρο από τον A. Baue, με τίτλο *Multiple, Progressive or Sequential Systems Failure, a Syndrome of the 1970s*, περιγράφει ένα σύνδρομο κλινικής φύσεως το οποίο δεν ήταν μέχρι τότε γνωστό. Χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι όροι για να περιγραφούν οι συνέπειες αυτού του εξελισσόμενου κλινικού συνδρόμου που οδηγούσαν στην αδικαιολόγητη ανεπάρκεια ανεξάρτητων οργανικών συστημάτων. Πρόσφατα,

εδραιώθηκε η χρήση του όρου σύνδρομο πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας (multiple-organ dysfunction syndrome, MODS) (*Marshall JC., 2000*).

Το 1989, ο R.C Bone et al. , οδηγούμενος από την ανάγκη να προσδιορίσει τον πληθυσμό των πραγματικών σηπτικών ασθενών έτσι ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος των κορτικοστεροειδών ως φάρμακο (*Bone RC et al., 1989*) πρότεινε τον όρο **σηπτικό σοκ** για ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση με κλινικές και εργαστηριακές ενδείξεις σοβαρής λοίμωξης, ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα καλλιέργειας αίματος και τις μικροβιακές ενδείξεις μόλυνσης. Ο όρος **σηπτικό σύνδρομο** ήταν έγκυρος όταν η συστηματική φλεγμονή ακολουθούνταν από τουλάχιστον 2 εκ των παρακάτω συμπτωμάτων:

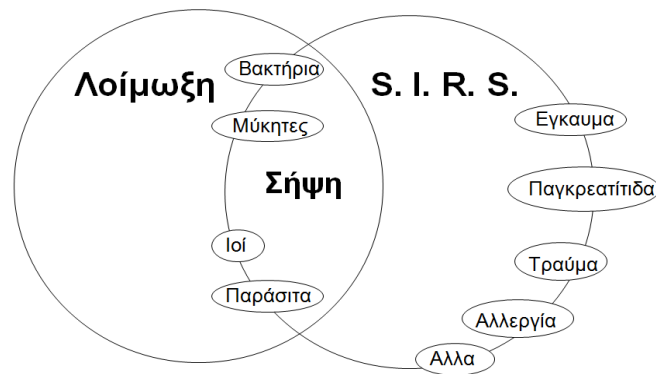
- υψηλός καρδιακός ρυθμός
- υψηλός ρυθμός αναπνοής
- χαμηλά επίπεδα αρτηριακής πίεσης
- έντονος πυρετός ή υποθερμία
- λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία.

Με βάση αυτά τα κριτήρια ορίστηκε αργότερα ο όρος «**σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης**» (**systemic inflammatory response syndrome, SIRS**). Ο R.C Bone et al. απέδειξε ότι ο κλινικός φαινότυπος και τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν παρόμοια σε ομάδες ασθενών με αποδεδειγμένη μικροβιακή λοίμωξη και θετικές καλλιέργειες αίματος, καθώς και σε ομάδες ασθενών με κλινική υποψία παρουσίας σήψης ή σηπτικής λοίμωξης (*Bone RC et al., 1992*).

Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) : πρόκειται για την αντίδραση του οργανισμού σε διάφορους λοιμώδεις παράγοντες, αλλά και μη λοιμώδεις όπως για παράδειγμα κάποιο τραύμα, έγκαυμα ή και παγκρεατίτιδα. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο (2) ή περισσότερων εκ των παρακάτω κριτηρίων (*Kendra N et al., 2013*) :

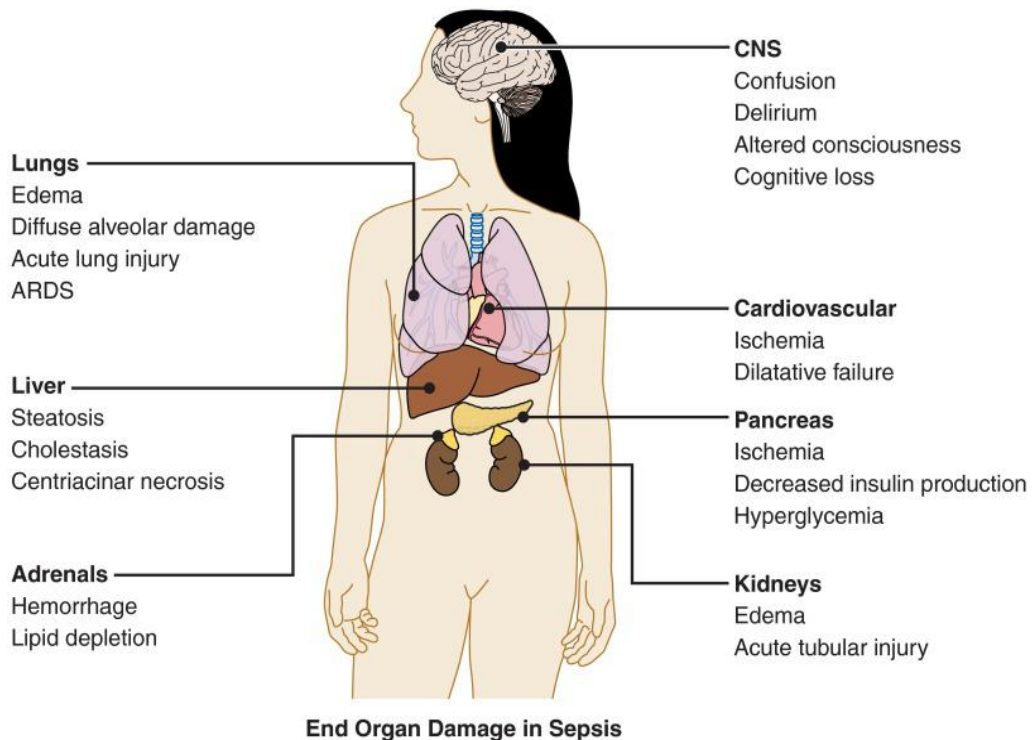
- Θερμοκρασία σώματος $> 38^{\circ} \text{C}$ ή $< 36^{\circ} \text{C}$
- Καρδιακή Συχνότητα (ΚΣ) > 90 σφύξεις/min
- Αναπνευστική συχνότητα : αναπνοές > 20 /min
- Λευκά αιμοσφαίρια > 12000 ή $< 4000/\text{mm}^3$ ή 10% άωρες μορφές

Σήψη (sepsis) ορίζεται η ταυτόχρονη παρουσία λοίμωξης και SIRS (τουλάχιστον 2 κριτήρια SIRS).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του όρου σήψη

Σοβαρή Σήψη (severe sepsis) ορίζεται η σήψη, που συνοδεύεται από δυσλειτουργία οργάνων, αρτηριακή υπόταση ή ιστική υποάρδευση. Κατά συνέπεια μπορεί να συνυπάρχουν διαταραχές του επιπέδου συνείδησης, γαλακτική οξέωση ή και ολιγουρία. Στην εικόνα που ακολουθεί τονίζονται οι επιπτώσεις της σοβαρής σήψης σε διάφορα οργανικά συστήματα (*Kendra N. et al., 2013*).



Εικόνα 2. Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων

Σηπτικό σοκ (septic shock) ορίζεται η σοβαρή σήψη η οποία συνοδεύεται από αρτηριακή υπόταση ή από αναγκαία χορήγηση αγγειοσυσπαστικών φαρμάκων, παρά την επαρκή χορήγηση υγρών (*Andrew Lever and Iain Mackenzie, 2007*).

1.1.3 Παθοφυσιολογία

Η σήψη προκαλεί σημαντικές μεταβολές στο καρδιαγγειακό σύστημα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ιστικής υποάρδευσης. Η ιστική υποάρδευση εάν δεν αντιμετωπιστεί κατάλληλα οδηγεί στην ανάπτυξη πολυοργανικής ανεπάρκειας και τελικά στο θάνατο . Οι κύριες καρδιαγγειακές μεταβολές, που παρατηρούνται στη σήψη, είναι η υποογκαιμία (εξαιτίας της αγγειοδιαστολής και της αυξημένης τριχοειδικής διαπερατότητας, που οδηγεί στην απώλεια υγρών στον τρίτο χώρο) και η καταστολή του μυοκαρδίου (σηπτική μυοκαρδιοπάθεια) . Επιπρόσθετα, ιστική υποάρδευση είναι δυνατόν να υπάρχει ακόμα και όταν διατηρείται ικανοποιητική αρτηριακή πίεση (ΑΠ) και καρδιακή παροχή (ΚΠ), πιθανά λόγω διαταραχών στην κατανομή του αίματος σε επίπεδο περιοχικής κυκλοφορίας και σε διαταραχές της μικροκυκλοφορίας. Είναι φανερό ότι κύριος θεραπευτικός στόχος στην αντιμετώπιση των ασθενών με σοβαρή σήψη και σηπτικό shock είναι η άρση της ιστικής υποάρδευσης. Η έγκαιρη και επιθετική αιμοδυναμική παρέμβαση έχει μεγάλη σημασία, καθώς είναι δυνατόν να περιορίσει τις βλάβες από την ιστική υποάρδευση και να τροποποιήσει τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (*Jones A.E. and Puskarich M.A., 2009*).

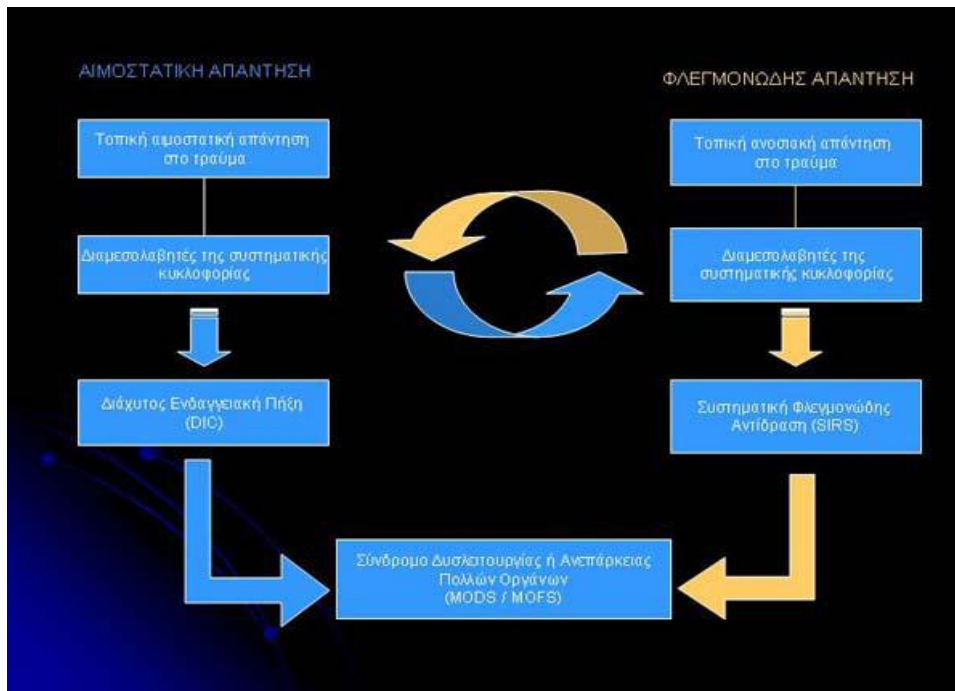
Οι φυσιολογικές ανοσολογικές αποκρίσεις έχουν ως στόχο την εξάλειψη παθογόνων παραγόντων και η παθοφυσιολογία της σήψης οφείλεται στην μη φυσιολογική ρύθμιση αυτών των φυσιολογικών αντιδράσεων. Σε ένα ιδανικό σενάριο, η πρώτη επαφή του παθογόνου με το σύστημα αντιμετώπισης της φλεγμονής θα έπρεπε να εξουδετερώσει το μικρόβιο. Η σηπτική απάντηση μπορεί να επιταχυνθεί λόγω της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων. Η αυξορρύθμιση συνδιεγερτικών μορίων των λεμφοκυττάρων και η ταχεία απόπτωση των λεμφοκυττάρων, είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της απόπτωσης των ουδετερόφιλων και την αυξημένη νέκρωση κυττάρων ή ιστών, γεγονότα που συμβάλλουν επίσης στην παθογένεση της σήψης (*Deborah J. Stearns-Kurosawa et al., 2011*). Η ισχυρή απόκριση του ξενιστή στην λοίμωξη περιλαμβάνει, επίσης, μία σειρά από γεγονότα όπως η έκλυση κυτοκινών ή χημειοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, το νιτρικό οξείδιο και οι ιντερλευκίνες . Οι λοιμώξεις στους πνεύμονες, στην

κοιλιακή χώρα και στην ουρογεννητική οδό εμπλέκονται στη σήψη συχνότερα από ότι οι λοιμώξεις σε άλλες περιοχές του σώματος.

1.1.3.1 Παθοφυσιολογία έκλυσης φλεγμονώδους αντίδρασης

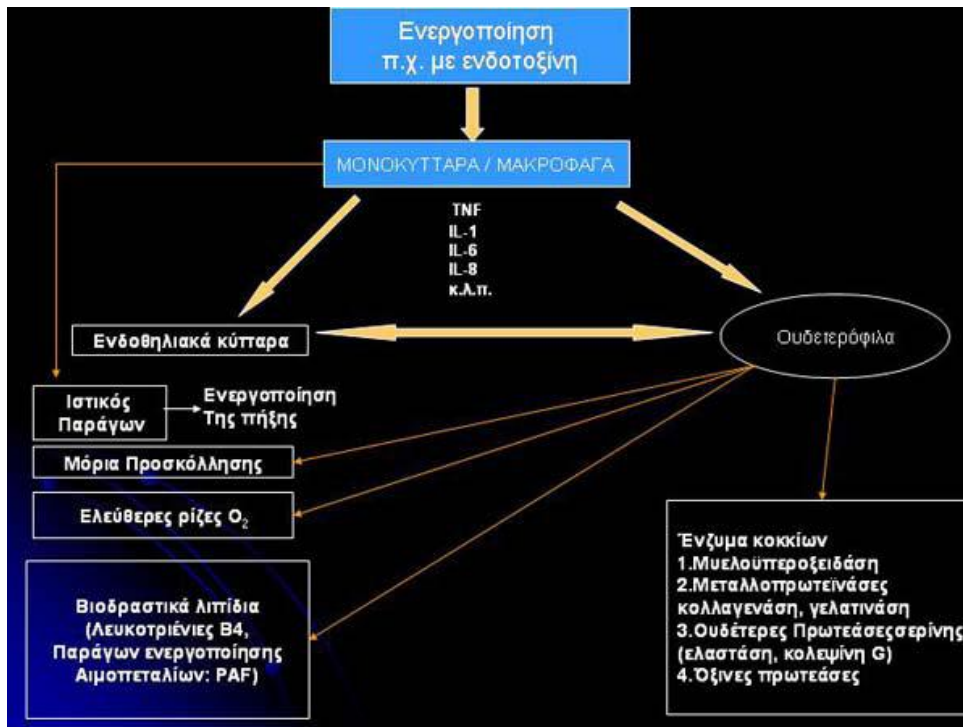
1. Η ενεργοποίηση του συστήματος των αλληλοδιάδοχων αντιδράσεων.

Η φλεγμονώδης διαδικασία που πυροδοτείται από μία απλή κάκωση, για παράδειγμα, καθώς και αυτή που προκαλείται από την είσοδο ενός παθογόνου μικροοργανισμού στο ανθρώπινο σώμα, συνήθως στερείται της δυναμικής εκείνης που μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των καταρρακτωδών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε περιπτώσεις εκτεταμένης κάκωσης όμως, όπως και σε σοβαρές σηπτικές καταστάσεις, η ενεργοποίηση των διαφόρων συστημάτων των καταρρακτωδών αντιδράσεων, (όπως της πήξης, της ινωδόλυσης και του συμπληρώματος), πέραν της ικανότητας αυτορρύθμισης των ενδογενών μηχανισμών αποκατάστασης που διαθέτει ο οργανισμός, είναι δυνατό να ευθύνεται για μια πληθώρα καταστάσεων που έχουν τελικό αποτέλεσμα την οργανική δυσλειτουργία. Η επίδραση της φλεγμονώδους διαδικασίας στους μηχανισμούς της αιμόστασης είναι συνεργατική και αποσκοπεί στην θωράκιση του οργανισμού έναντι εισβολής των παθογόνων μικροοργανισμών, όσο και στην επίτευξη της αιμόστασης. Οι διαμεσολαβητές της συστηματικής κυκλοφορίας αλληλεπιδρούν από κοινού στους δύο καταρράκτες και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της διαδικασίας αυτής. Πιο συγκεκριμένα, τα μονοκύτταρα του αίματος αποτελούν ένα σημαντικό συνδετικό κρίκο μεταξύ αυτών των δύο συστημάτων. Η ενεργοποίησή τους (π.χ. από ενδοτοξίνες) προκαλεί τη σύνθεση και απελευθέρωση εκτός όλων των άλλων, του ιστικού παράγοντα, ο οποίος με την σειρά του επιταχύνει την ενεργοποίηση των μηχανισμών πήξης του αίματος. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Ενεργοποίηση αιμοστατικής και φλεγμονώδους απάντησης.

Παράλληλα αυξάνεται η παραγωγή και η απελευθέρωση από τα μακροφάγα του Ιστικού Παράγοντα Νέκρωσης (Tumor Necrosis Factor: TNF), της ιντερλευκίνης -1β (IL-1β) και άλλων διαμεσολαβητών. Ο TNF και η IL1β με την σειρά τους επάγουν το σχηματισμό του ιστικού παράγοντα στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Επιπλέον, ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ένζυμα, μόρια προσκόλλησης, βιοδραστικά λιπίδια, όπως τα λευκοτριένια B4, τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και διάφορες πρωτεάσες. Εντός των αγγείων υπάρχει ένας αριθμός αντιαιμοπεταλιακών, αντιπηκτικών, ινωδολυτικών και αγγειοδιασταλτικών παραγόντων που περιορίζουν τον μηχανισμό ενεργοποίησης της αιμόστασης στην αρχική εντόπιση του παθογόνου παράγοντα. (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ενεργοποίηση μακροφάγων μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων.

Κυρίαρχο ρόλο μεταξύ των αντιθρομβωτικών και ινωδολυτικών παραγόντων διαδραματίζει η αντιθρομβίνη. Η αντιθρομβίνη συμμετέχει στο σχηματισμό ενός συμπλόκου με τους ενεργοποιημένους παράγοντες του συστήματος της πήξης, αναστέλλοντας τις πρωτεάσες της σερίνης. Πιο συγκεκριμένα τα μόρια που σχηματίζουν το σύμπλοκο με την αντιθρομβίνη είναι η θρομβίνη, οι παράγοντες FVIIa, FIXa, FXa, FXIa και οι καλλικρεΐνες. (Εικόνα 5).

**Ρυθμιστικοί παράγοντες των καταρρακτοειδών συστημάτων.
ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ**

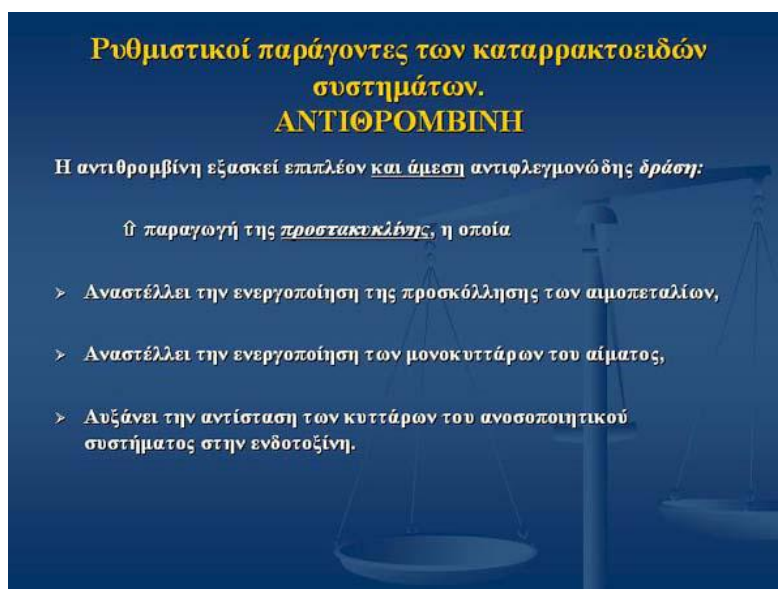
Συστηματικός αναστολέας της πήξης του αίματος.
Προκαλεί την αναστολή των πρωτεασών της σερίνης του συστήματος της πήξης:

- ✓ θρομβίνη
- ✓ FVIIa(παράγων 7)
- ✓ FIXa(παράγων 9)
- ✓ FXa (παράγων 10)
- ✓ FXIa (παράγων 11)
- ✓ καλλικρεΐνες

Αυτή η ανασταλτική επίδραση της αντιθρομβίνης στο σχηματισμό θρόμβων στη μικροκυκλοφορία μπορεί να θεωρηθεί μία *έμμεση* αντιφλεγμονώδη δράση.

Εικόνα 5. Ρυθμιστικοί παράγοντες των καταρρακτοειδών συστημάτων
Αντιθρομβίνη(1)

Σημαντική ιδιότητα της αντιθρομβίνης είναι η αναστολή της προστακυκλίνης, εμποδίζοντας έτσι τόσο την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, όσο και την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. Αν η λειτουργική δράση της αντιθρομβίνης αποδειχθεί ανεπαρκής, αναπτύσσεται διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC) η οποία θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη του MODS, όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω. (Εικόνα 6).

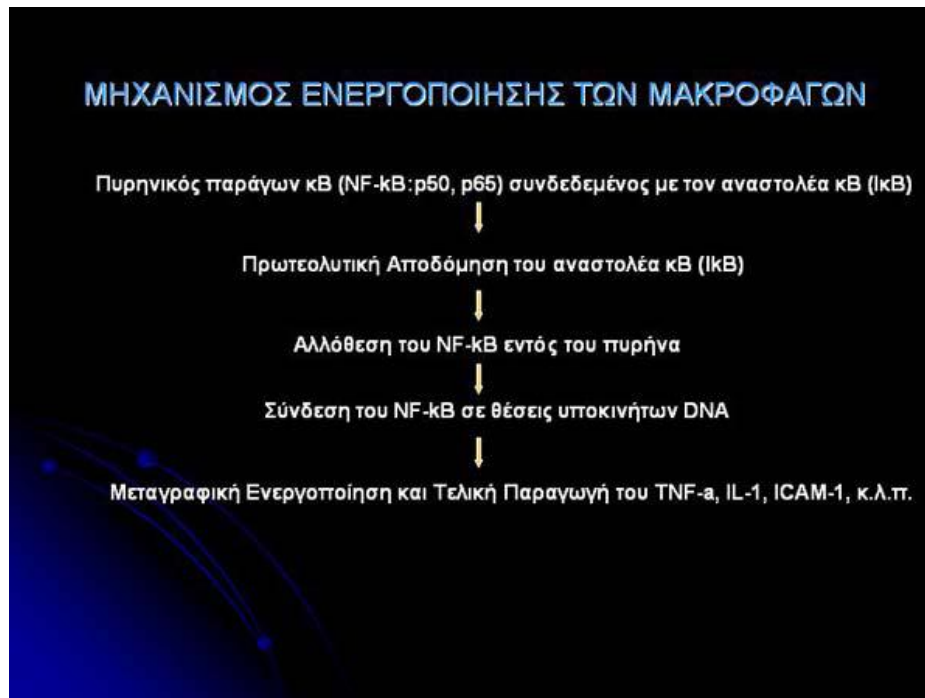


Εικόνα 6. Ρυθμιστικοί παράγοντες των καταρρακτοειδών συστημάτων
Αντιθρομβίνη(2)

2. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων.

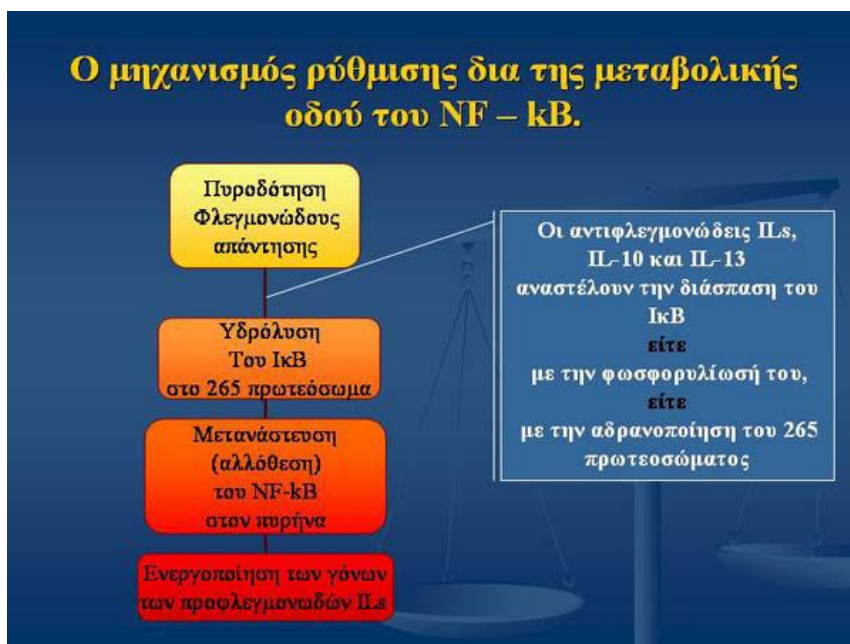
Για να επιτευχθεί αρχικά, η ενεργοποίηση και έπειτα η παραγωγή μακροφάγων απαραίτητη είναι η παρουσία των φλεγμονωδών κυτταροκινών. Αυτές παράγονται από τα κύτταρα κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως μικροβιακών ή μη. Για την έναρξη όμως της παραγωγής τους μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής και κατόπιν της μετάφρασης είναι απαραίτητη η προσκόλληση στο DNA του μακροφάγου, ενός ειδικού πυρηνικού παράγοντα του NF-kB. Ο πυρηνικός αυτός παράγοντας με τη σειρά του πυροδοτεί την διαδικασία της παραγωγής αγγελιοφόρου mRNA (μεταγραφή) που κωδικοποιεί τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Ο πυρηνικός παράγοντας NF-kB αποτελείται από δύο 2 υπομονάδες, την p-50 και την p-65. Φυσιολογικά ο παράγοντας αυτός βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου δεσμευμένος στον αναστολέα kB (Inhibitor kB: IκB), ο οποίος συνδέεται προς το

σύμπλοκο NF-κB και αποτρέπει την είσοδό του στον πυρήνα (αλλόθεση) και την επακόλουθη σύνδεση με το DNA παράγοντα. (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μηχανισμός ενεργοποίησης των μακροφάγων.

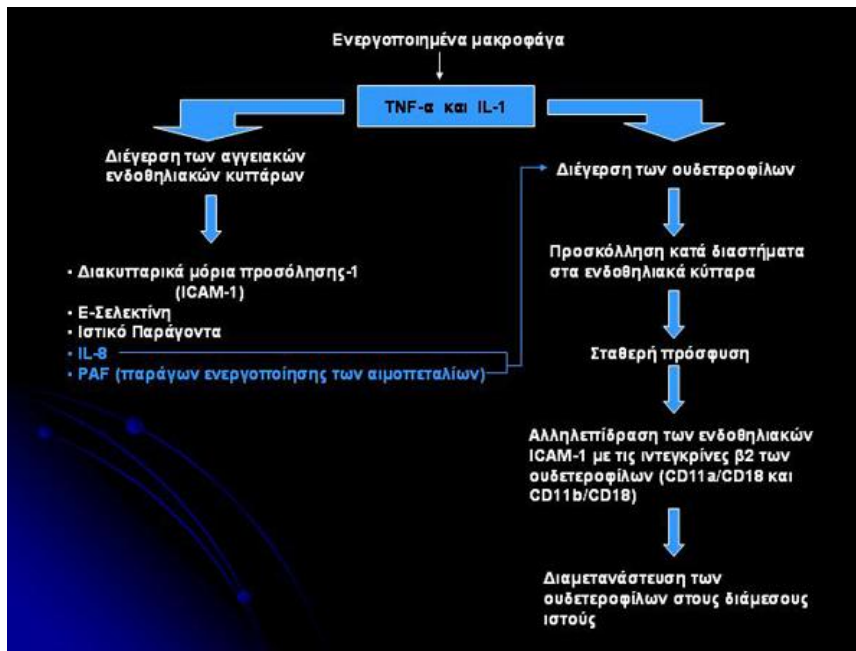
Με την έναρξη της διαδικασίας της φλεγμονής, τα μακροφάγα που βρίσκονται στην περιοχή του εκλυτικού αιτίου, ενεργοποιούνται και ο IκB του μακροφάγου υπόκειται σε φωσφορύλιωση. Το πρωτεόσωμα 265 του μακροφάγου τότε προκαλεί την διάσπαση του συμπλόκου και ο απελευθερωμένος πλέον παράγοντάς NF-κB μπορεί μετά να μεταφερθεί στον πυρήνα, στις σειρές του υποκινητή του DNA και να προκαλέσει μεταγραφική υπερρύθμιση για τον TNF-α, την IL-1, τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης (ICAM-1) και άλλους διαμεσολαβητές της φλεγμονώδους διαδικασίας. Μέσω του προαναφερόμενου μηχανισμού της δράσης των φλεγμονωδών μεσολαβητών προκαλείται σε σηπτικές καταστάσεις υπερβολικά βλαπτική επίδραση στους ιστούς που έχουν προσβληθεί. Η διαδικασία όμως αυτή, υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται κάτω από τον ρυθμιστικό έλεγχο των αντιφλεγμονωδών κυτταροκίνων. Συγκεκριμένα, οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10 και IL-13 αναστέλουν την υδρόλυση του κB παράγοντα στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μετακίνησή του στον πυρήνα του μακροφάγου και την πυροδότηση της παραγωγής προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί σημαντικότατο στάδιο στον περιορισμό της ισχύος της δράσης της φλεγμονής. (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μηχανισμός ρύθμισης μέσω της οδού NF-kB.

3. Η ενεργοποίηση και η συνάθροιση των ουδετερόφιλων.

Η ισχαιμία, η παρουσία βακτηριδίων ή βακτηριδιακών πολυσακχαριτών, η εναπόθεση ανοσιακών συμπλεγμάτων, είναι καταστάσεις που πυροδοτούν την ενεργοποίηση των καταρρακτοειδών αντιδράσεων του συμπληρώματος της πήξης, της ινωδόλυσης, καθώς επίσης και την ενεργοποίηση των ιστικών μακροφάγων. Για τη μελέτη όλων αυτών των φλεγμονωδών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο, το πειραματικό μοντέλο πρόκλησης κυψελίτιδας σε πνεύμονες ποντικών. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν τις κυτταροκίνες πρώιμης απάντησης TNF-α και την IL-1. Η κύρια λειτουργία αυτών των κυτταροκινών είναι να διεγείρουν τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα προκειμένου να εκφράσουν τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης - 1 (Intercellular Adhesion Molecular-1 : ICAM-1), την E-σελεκτίνη και τον ιστικό παράγοντα. Οι κυτταροκίνες αποτελούν, επίσης, σημαντικό παράγοντα ενεργοποιητή των ουδετερόφιλων. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9. Δράση ενεργοποιημένων μακροφάγων.

Τα ουδετερόφιλα, κατ' αρχάς προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η σταθερή αυτή πρόσφυση των ουδετερόφιλων είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μετανάστευσή τους στους διάμεσους ιστούς. Επιπλέον, η σταθερή πρόσφυση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο, συνεπάγεται αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών ICAM-1, με τις ιντεγκρίνες β2 από τα ουδετερόφιλα (CD11a/CD18 και CD11b/CD18). Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν, επιπλέον, την IL-8 και τον παράγοντα που ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια (Platelet Activated Factor: PAF). Οι παράγοντες αυτοί είναι ισχυροί διεγέρτες των ουδετερόφιλων. Όταν λοιπόν, τα ουδετερόφιλα προσκολληθούν στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, «προ-ενεργοποιούνται», ώστε όταν φθάσουν σε μια άλλη περιοχή που βρίσκεται ένας διεγέρτης-αγωνιστής, για παράδειγμα, ο TNF-α, να δράσουν άμεσα και γρήγορα. Η είσοδος των ουδετερόφιλων στους ιστούς, (πχ στις κυψελίδες των πνευμόνων), μαζί με τα ενεργοποιημένα μακροφάγα πυροδοτεί την βλάβη των κυττάρων του πνεύμονα και των γλυκοπρωτεϊνών του υποστρώματος (πχ της ελαστίνης και του κολλαγόνου). Η βλάβη σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή οξειδωτικών προϊόντων και την απελευθέρωση πρωτεασών της σερίνης και μεταλλοπρωτεασών του υποστρώματος.

4. Η παραγωγή οξειδωτικών προϊόντων.

Τα περισσότερα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απάντησης προέρχονται από τα φαγοκύτταρα. Οι δύο κύριες οδοί παραγωγής των οξειδωτικών προϊόντων είναι : η οδός της NADPH οξειδάσης και η

οδός της επαγωγίμης (ή προκλητής) συνθετάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου (Nitric Oxide: NO) παράγοντα. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10. Παραγωγή οξειδωτικών προϊόντων.

5. Η μεταβολική οδός της NADPH οξειδάσης

Στα κύτταρα η NADPH οξειδάση υπάρχει σε υπομονάδες που εντοπίζονται τόσο στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση του κυττάρου προκαλεί μετακίνηση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πολυμερικού συμπλόκου με δράση οξειδάσης. Χαρακτηριστική είναι μια ασυνήθης σειρά μεταφοράς ηλεκτρονίων στη μεταβολική οδό της NADPH οξειδάσης. Με την παρουσία της οξειδάσης, το NADPH υφίσταται οξείδωση (αποβολή ηλεκτρονίων). Τα απελευθερωμένα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το μοριακό O₂ το οποίο ανάγεται και σχηματίζει το ανιόν του υπεροξειδίου. Μια από τις δράσεις του υπεροξειδίου είναι να προκαλέσει αναγωγή στον ενδοκυττάριο σίδηρο, μετατρέποντάς τον από τρισθενή σίδηρο σε δισθενή. Η αποβολή, όμως, ενός ηλεκτρονίου από το μόριο του οξυγόνου (οξείδωση), το μετατρέπει σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα και μπορεί να αναχθεί στην πλέον δραστική ρίζα του οξυγόνου, την ρίζα του υδροξυλίου (HO). Η παραγωγή ρίζας του υδροξυλίου απαιτεί την παρουσία ενός βαρέως μετάλλου, για παράδειγμα σιδήρου, στην μεταβατική (ασταθή) μορφή του

δισθενούς σιδήρου. Δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο στο υπεροξείδιο του υδρογόνου ο δισθενής σίδηρος επαναοξειδώνεται σε τρισθενή σίδηρο. Άλλο ισχυρό οξειδωτικό το οποίο παράγεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι το υποχλωριώδες οξύ. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στα ουδετερόφιλα με την παρουσία του ενζύμου της μυελοϋπεροξειδάσης και ενός αλογόνου, όπως του χλωρίου, όπου μετατρέπεται ενζυμικά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε υποχλωριώδες οξύ.

6. Η μεταβολική οδός της επαγωγίμης (ή προκλητής) συνθετάσης του NO (Inducible Nitric Oxide Synthetase: iNOS)

Η οδός παραγωγής οξειδωτικών προϊόντων εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα κύτταρα (διεγερμένα). Η επαγωγή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου υπερπαράγεται και αντιδρά με την L-Arginine για να παραχθεί το μονοξείδιο του αζώτου, το οποίο προκαλεί χάλαση στα λεία μυϊκά κύτταρα. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά επίσης με τα αρωματικά οξέα για να σχηματίσει σταθερά παράγωγα, όπως είναι η νιτροτυροσίνη. Η τροποποίηση (νιτροζυλίωση) των πρωτεϊνών που περιέχουν τυροσίνη, μπορεί να καταστρέψει τη λειτουργία τους. Το μονοξείδιο του αζώτου μετατρέπεται σε υπεροξυνιτρώδες ανιόν, το οποίο αντιδρά έντονα με την ομάδαθειώλης. Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν διασπάται στις νιτρώδη και νιτρική ρίζα, οι οποίες χρησιμεύουν σαν κατάλληλοι ποσοτικοί αντιπροσωπευτικοί δείκτες της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου. Η παραγωγή οξειδωτικών παραγώγων στα φαγοκύτταρα εξηγούν πολλές τελικές ιστικές βλάβες κατά την φλεγμονώδη απάντηση. Πιο συγκεκριμένα, τα οξειδωτικά προϊόντα μπορεί να διαιωνίζουν την διέγερση των φαγοκυττάρων προκειμένου να παράγουν επιπλέον βλαπτικούς διαμεσολαβητές και κυτταροκίνες. Επίσης, χημικές ενώσεις ανάλογες προς την L-arginine ανταγωνίζονται αποτελεσματικά την δυνατότητα της επαγωγίμης συνθετάσης του NO να αντιδρά με το φυσικό υπόστρωμα, την L-Arginine. Τα οξειδωτικά προϊόντα τέλος, ανταγωνίζονται την ενδογενή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου - των ενδοθηλιακών κυττάρων - προκαλώντας με τον τρόπο αυτό, απώλεια στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, η οποία οδηγεί σε συστηματική υπέρταση.

7. Ο ρόλος της ιστικής και επιθηλιακής απόπτωσης στη φλεγμονή.

Η απόπτωση αποτελεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, μία διακριτή μορφή κυτταρικού θανάτου που δεν σχετίζεται με την γήρανση και ως εκ τούτου τον βιολογικό θάνατο του κυττάρου. Η απόπτωση είναι παρούσα σε ποικίλες φυσιολογικές ή και παθολογικές καταστάσεις με ρόλο μη διακριτό πάντα. Αρκετοί ερευνητές έχουν

αναζητήσει τον ακριβή μηχανισμό δράσης της σε συνθήκες ισχαιμίας, τραύματος και ιστικής καταστροφής, χωρίς να καταλήγουν πάντα σε ακριβή συμπεράσματα. Γενικά όμως, έχει αποδειχθεί πως ο βαθμός της ιστικής και της ενδοθηλιακής απόπτωσης επηρεάζεται από την αυξημένη απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , IL-1 β , ιντερφερόνη- γ : IFN- γ κ.λ.π.). καθώς και από την αυξημένη παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων (H₂O₂, O₂, OH, NO), κυρίως σε καταστάσεις εναλλαγής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Καθένας ξεχωριστά από αυτούς τους παράγοντες, από τη μία ευθύνεται για τη διαταραχή της ισορροπίας της απόπτωσης στους ιστούς, ενώ από την άλλη με την ταυτόχρονη ενεργοποίησή τους μπορεί να έχουν συνεργική δράση στην πυροδότηση της απόπτωσης. (Εικόνα 11)

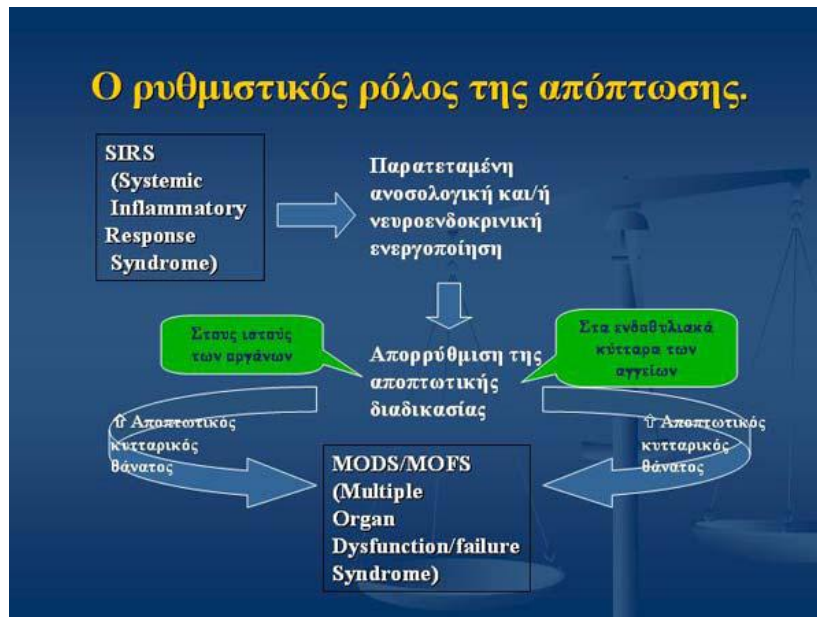
Ο ρυθμιστικός ρόλος της απόπτωσης

Ο βαθμός της ιστικής και επιθηλιακής απόπτωσης επηρεάζεται από:

- \uparrow απελευθέρωση φλεγμονωδών (TNF- α , IL-1, IFN- γ) και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-6, IL-10, IL-13),
- \uparrow παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων,
- Έκφραση και απελευθέρωση των πρωτεϊνών της φάσης του θερμού *shock* (HSP) από τα ιστικά κυττάρα και το ήπαρ,
- \uparrow συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών από ενεργοποίηση του φλοιού των επινεφριδίων,
- Απελευθέρωση βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών (LPS) στη συστηματική κυκλοφορία.

Εικόνα 11. Ρυθμιστικός ρόλος της απόπτωσης.

Η απόπτωση επομένως, διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην πρόοδο της σηπτικής διαδικασίας. Τελευταία αναδεικνύεται πως η απορρύθμιση της αποπτωτικής διεργασίας ίσως να είναι το πρώτο βήμα στην ανεπαρκή λειτουργία του οργάνου στόχου. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12. Ρυθμιστικός ρόλος της απόπτωσης.

Συμπέρασμα: Ο οργανισμός διαθέτει μια πληθώρα αμυντικών μηχανισμών, οι οποίοι ενεργοποιούνται σε κάθε κατάσταση ή συνθήκη που θα μπορούσε δυνητικά να διαταράξει την ακεραιότητα και τη φυσιολογική λειτουργία του. Τόσο οι λοιμώξεις, οι τραυματισμοί, τα εγκαύματα, οι κακώσεις, όσο και άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η παγκρεατίτιδα, οι μεταγγίσεις, η οξεία ηπατική ανεπάρκεια, η συστηματική αγγειίτιδα, μπορούν να πυροδοτήσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Συγχρόνως όμως, μέσω των προφλεγμονωδών μεσολαβητών- οι οποίοι ανθίστανται στην παθολογική κατάσταση- ο οργανισμός φροντίζει ώστε να προφυλαχθεί από την δράση των ίδιων των αμυντικών του μηχανισμών ή διαφορετικά από την υπέρμετρη ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού. Για αυτό τον σκοπό παράγει και αντισταθμιστικές-ρυθμιστικές κυτταροκίνες που με ένα πολύπλοκο αλληλεπιδρούμενο σύστημα επηρεάζουν και ελέγχουν την αντίδραση στον παθογόνο παράγοντα. Κατά την σηπτική κατάσταση όμως, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί αδυνατούν να αντιρροπίσουν την φλεγμονώδη διαδικασία. Αυτό συμβαίνει είτε σε περιπτώσεις εκτεταμένων και επιλεγμένων κακώσεων, είτε σε πολύπλοκα και πολλαπλά φλεγμονώδη ερεθίσματα. Τα ίδια τα κύτταρα άμυνας που παράγει ο οργανισμός για να τον προστατέψουν, στρέφονται εναντίον του και επιδρούν πλέον βλαπτικά μόνο και μόνο από την αδυναμία αυτοπεριορισμού τους. Μια πληθώρα αντιδράσεων και μηχανισμών εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία, συστηματοποιώντας έτσι την ανεπάρκεια αυτορρύθμισης και σε άλλα ζωικά όργανα. Πρόκειται τότε για μια

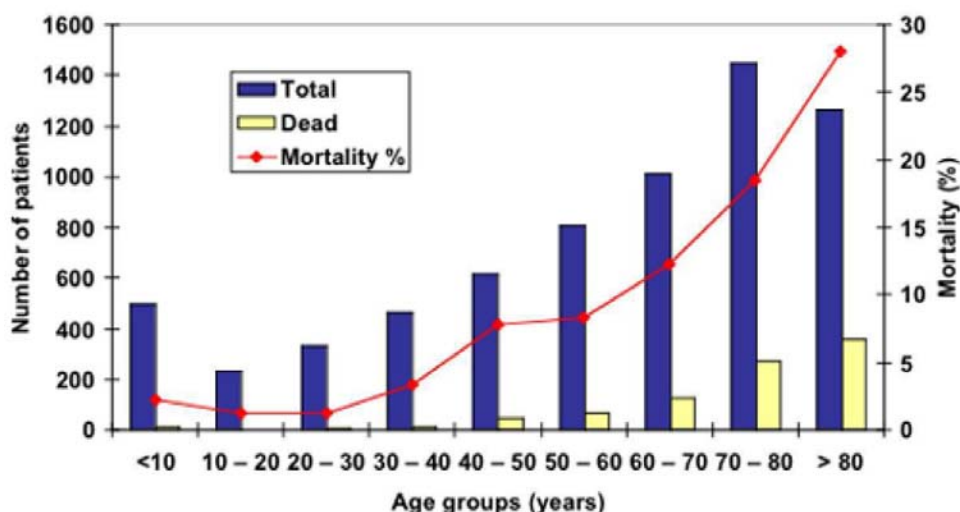
κατάσταση την οποία ο οργανισμός αδυνατεί να αντιρροπήσει ακόμα και με κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση.

1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια

Η σοβαρότητα της ασθένειας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, οι κυριότεροι είναι η ηλικία, το φύλο καθώς και η παρουσία άλλων ασθενειών.

1.1.4.1 Η Ηλικία

Η συχνότητα εμφάνισης σήψης είναι υψηλότερη σε ηλικιωμένους ασθενείς. Σύμφωνα με μία μελέτη, που διεξήχθη στις ΗΠΑ σε πάνω από 10,4 εκατομμύρια ενήλικων σηπτικών ασθενών και εξέταξε την επίδραση της ηλικίας στην σήψη σε διάρκεια 24 χρόνων, οι ηλικιωμένοι ασθενείς (ηλικίας άνω των 65 χρονών) αντιπροσωπεύουν περίπου το 65% των περιπτώσεων σήψης. Σε σύγκριση με τους νεότερους ασθενείς οι ηλικιωμένοι σηπτικοί ασθενείς έχουν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας κατά την διάρκεια της νοσηλείας (Martin GS et al., 2006). Οι ηλικιωμένοι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν ασυνήθιστα χαρακτηριστικά της ασθένειας με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της διάγνωσης και κατά συνέπεια της θεραπείας. Ακόμα, η μείωση της νεφρικής λειτουργίας καθώς και η κακή ροή του ήπατος μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των αντιμικροβιακών φαρμάκων (McCue JD, 1999).



Διάγραμμα 1. Η εμφάνιση σήψης επηρεάζεται από την ηλικία του ασθενή.

1.1.4.2 Το φύλο

Τα πειραματικά δεδομένα σε ζώα δείχνουν ότι οι γυναίκες έχουν ένα έμφυτο πλεονέκτημα επιβίωσης στην σήψη (Zellweger R. *Et al.*, 1997), ωστόσο τα ποσοστά που προκύπτουν από κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους ποικίλλουν μεταξύ των δύο (2) φύλων. Διεξήχθησαν διάφορες έρευνες όπου τα ποσοστά θνησιμότητας των γυναικών ήταν άλλοτε υψηλότερα, άλλοτε μικρότερα ή και ίδια με αυτά των ανδρών. Οι διαφορές στα αποτελέσματα μπορεί να αποδοθούν σε διάφορους λόγους , όπως στις ορμόνες του κάθε φύλου, καθώς και σε πολυμορφισμούς φυλογεννητικών γονιδίων (Federman *DDN Engl J Med*, 2006).

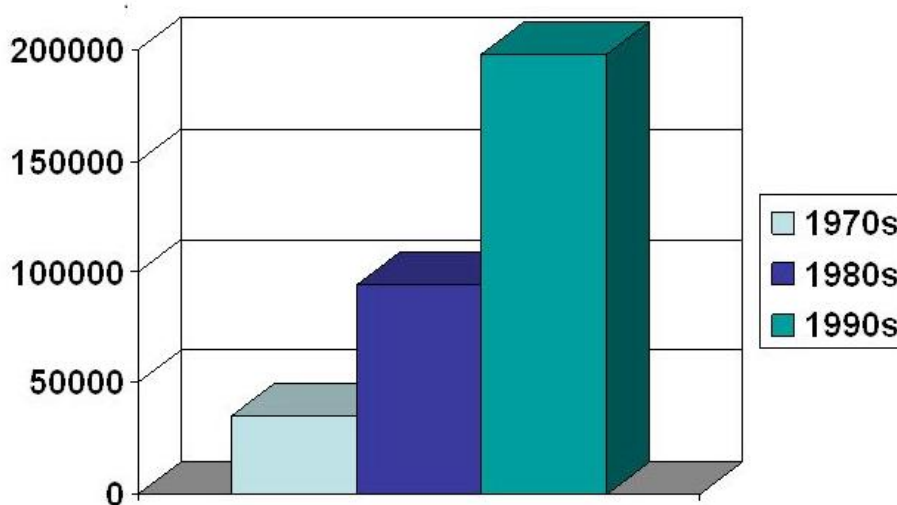
1.1.4.3 Συνυπάρχουσες Παθήσεις

Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο θνησιμότητας περιλαμβάνουν ήδη υπάρχουσες παθήσεις, όπως η ανοσοκαταστολή, ο καρκίνος, HIV/AIDS, ηπατική ανεπάρκεια, καθώς και η εξάρτηση από το αλκοόλ. Όλες αυτές οι ασθένειες εξασθενούν τον οργανισμό του ασθενή καθιστώντας τον ευάλωτο στις συνέπειες της σήψης. Σύμφωνα με μία μελέτη μεταξύ των ασθενών που εμφάνισαν σοβαρά συμπτώματα σήψης αποδείχθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών είχαν ήδη κάποιο νόσημα, ιδιαίτερα διαβήτη (23%), χρόνια πνευμονία (17%), καρκίνο (16%), καρδιακή ανεπάρκεια (14%), νεφρική ανεπάρκεια (11%), και ηπατική νόσο (7%) (Kendra N. Iskander et al. 2013, Martin G. et al. 2009).

1.1.5 Διακυμάνσεις της θνησιμότητας και των διαφόρων τύπων σήψης

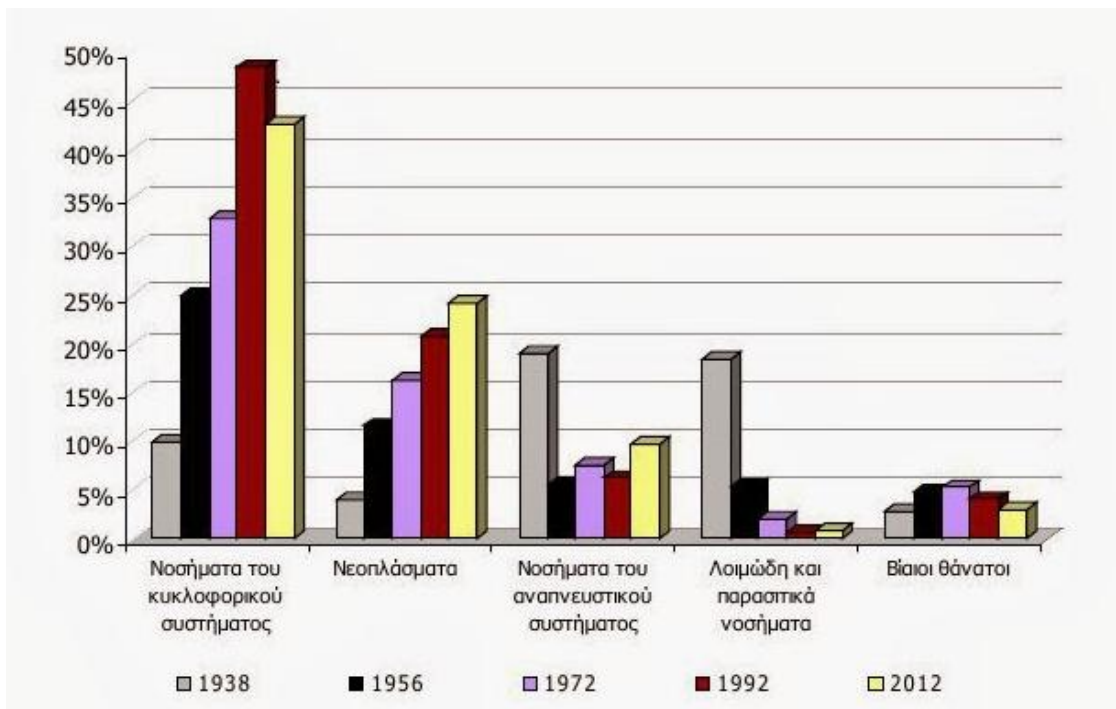
Η σοβαρή σήψη και η σηπτική καταπληξία (shock) αποτελούν μείζονα προβλήματα παγκοσμίως, αφενός διότι η συχνότητά τους αυξάνεται, αφετέρου διότι συνοδεύονται από υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Περισσότερα από 750.000 άτομα ετησίως παρουσιάζουν σοβαρή σήψη στις ΗΠΑ, ενώ περίπου 67% (500.000 άτομα) χρειάζονται κάποιο είδος εντατικής φροντίδας και νοσηλείας. Η θνησιμότητα κυμαίνεται από 25-50%. Ωστόσο, η έγκαιρη αναγνώριση και έγκαιρη εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης είναι δυνατόν να βελτιώσουν την έκβαση

των ασθενών με σοβαρή σήψη και σηπτικό shock και να αυξήσουν την επιβίωσή τους. (Angus et al. CCM 2001)

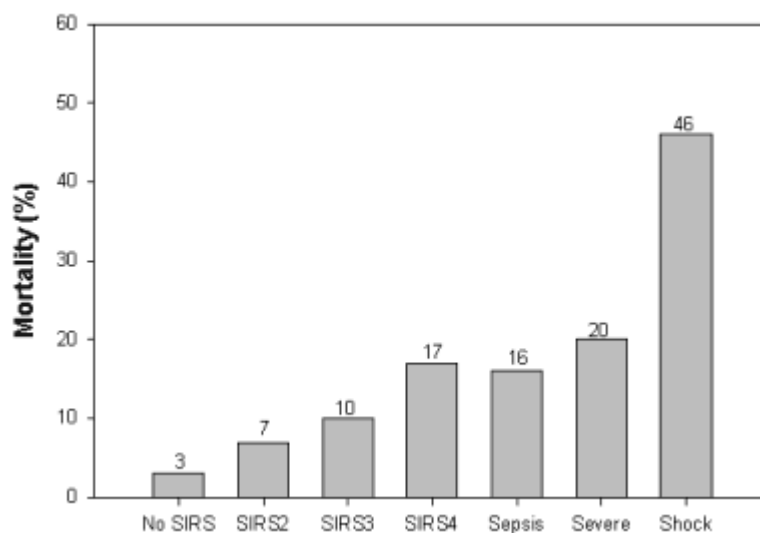


Διάγραμμα 2. Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ. Ευγενική χορηγία του Angus et al. CCM 2001

Η σήψη όπως προαναφέρθηκε είναι μία ασθένεια που προέκυψε μέσα από τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη το 2008 από τους Moreno et al. Int Care Med 2008. Η μελέτη περιλάμβανε 2.600 ασθενείς οι οποίοι βρίσκονταν στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας πάνω από 48 ώρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται παρακάτω, στο **Διάγραμμα 3**. Είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που προσβλήθηκε από σοβαρή σήψη, ακολουθεί στην συνέχεια η πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια (MOF) και τέλος η σήψη και το σηπτικό σοκ, με μικρή διαφορά μεταξύ τους (Andrés Esteban et al. 2008).



Διάγραμμα 3. Εξέλιξη της ποσοστιαίας κατανομής των κυριότερων ομάδων αιτιών θανάτου για τα έτη 1938, 1956, 1972, 1992 και 2012.



Διάγραμμα 4. Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών.

Στο Διάγραμμα 4 φαίνεται ότι τα ποσοστά θνησιμότητας των ασθενών με σηπτικό σοκ ξεπερνάν τα ποσοστά της σήψης και της σοβαρής σήψης. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από μελέτη που εξέταζε την διάρκεια της υπότασης πριν

την χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων, τονίζοντας ότι η διάρκεια έπαιξε σημαντικό ρόλο για την επιβίωση των ασθενών (Kumar, Anand MD et al.).

1.1.6 Θεραπεία

Μέχρι στιγμής έχουν γίνει πολλές προσπάθειες έτσι ώστε να βρεθεί ο κύριος παράγοντας που προκαλεί σήψη. Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί κάποιος συγκεκριμένος μεσολαβητής ή κάποιο συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι, αυτό κατά συνέπεια αυξάνει την πολυπλοκότητα της ασθένειας. Δεδομένης της θνησιμότητας που προκαλεί η ασθένεια είναι επιτακτική ανάγκη η μελέτη και κατανόηση της παθοφυσιολογίας της σήψης έτσι ώστε να βρεθεί στοχευμένη θεραπεία. (Kendra N et al. 2013).

1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης

1.2.1. Ορισμός

Με τον όρο σακχαρώδης διαβήτης ονομάζουμε την μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της *γλυκόζης*, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κήσης. Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει χρόνια πορεία και μπορεί να προκαλέσει μια σειρά σοβαρών επιπλοκών, όπως καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βλάβες του αμφιβληστροειδούς, βλάβες των νεύρων, στυτική δυσλειτουργία κ.α. Πρωτεύοντα ρόλο στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη παίζει η χορήγηση ινσουλίνης.

1.2.2. Είδη σακχαρώδη διαβήτη

- *Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1*

Παλαιότερα αποκαλούμενος ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης, ο διαβήτης τύπου 1 χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Η ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη είναι συνήθως φυσιολογική, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Η καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτοάνοσης αιτιολογίας. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 ανιχνεύονται στην κυκλοφορία ένα ή περισσότερα είδη αυτοαντισωμάτων, οι ασθενείς αυτοί δε εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Παρ' όλα αυτά, σ' ένα μικρό ποσοστό ασθενών με διαβήτη τύπου 1 δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα, ο τύπος δε αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Ο διαβήτης τύπου 1 εισβάλλει συνήθως απότομα και οδηγεί συχνά στην ανάπτυξη κέτωσης και διαβητικής κετοξέωσης εάν το έλλειμμα ινσουλίνης δεν καλυφθεί. Ο ασθενής είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου του αίματος να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα.

• **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2**

Παλαιότερα αποκαλούμενος μή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται ινσουλινοαντοχή). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα.

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικους. Σπουδαίος προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι η παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής πιθανόν λόγω της παραγωγής ουσιών από τον λιπώδη ιστό που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό.

Στον διαβήτη τύπου 2, τα συμπτώματα είναι πιο ήπια και η πιθανότητα εμφάνισης διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή. Παρ' όλ' αυτά, ο κίνδυνος απώτερων και σοβαρών επιπλοκών παραμένει υψηλός. Το πρώτο βήμα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής του ασθενούς, με στόχο την απώλεια βάρους, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υγιεινή διατροφή. Εάν κριθεί απαραίτητο, χρησιμοποιούνται αντιδιαβητικά φάρμακα. Στην περίπτωση που η θεραπεία αποτύχει, κρίνεται σκόπιμη η χορήγηση ινσουλίνης για τον έλεγχο και αυτών των ασθενών.

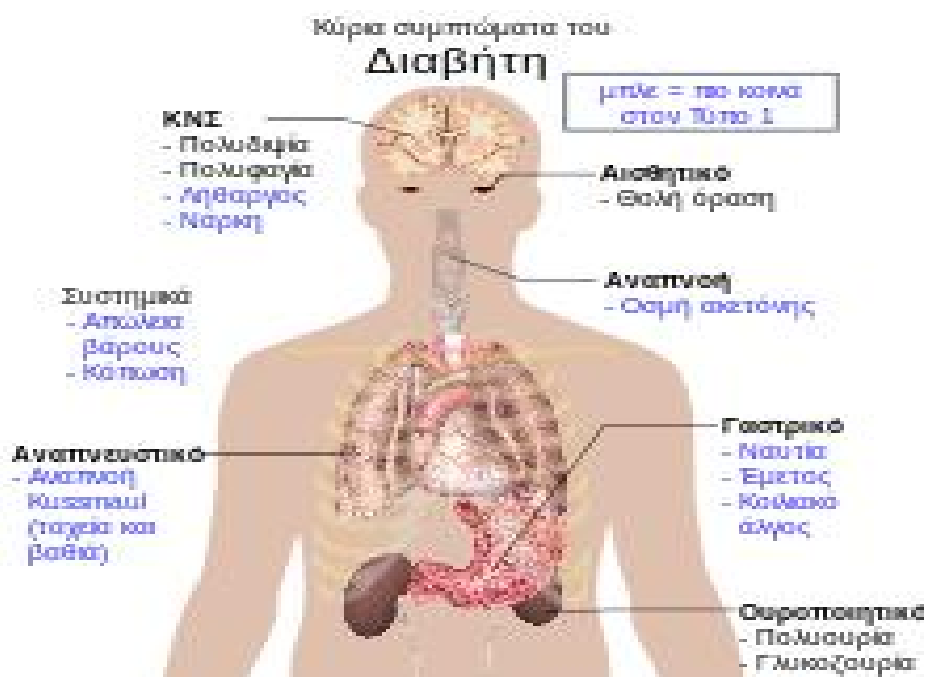
• **Διαβήτης της κύησης**

Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. (δεν συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό γυναίκες με γνωστό διαβήτη πριν την έναρξη της εγκυμοσύνης). Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου 2 ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Παχύσαρκες γυναίκες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν διαβήτη της κύησης. Ο τύπος αυτός διαβήτη αφορά το 3-5% των κυήσεων. 30-40% των γυναικών με διαβήτη κύησης θα αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους. Ο διαβήτης της κύησης είναι αναστρέψιμος και υποχωρεί μετά τον τοκετό, μπορεί όμως να προκαλέσει περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού.

• Άλλοι τύποι διαβήτη

Σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί και στις ακόλουθες περιπτώσεις :

- Γενετικά ελαττώματα των β-κυττάρων του παγκρέατος
- Γενετικό ελάττωμα της δράσης της ινσουλίνης
- Νόσοι του παγκρέατος
- Ορμονικές διαταραχές και ενδοκρινικά νοσήματα
- Διαβήτης λόγω λήψης φαρμάκων



Εικόνα 13. Κύρια συμπτώματα του διαβήτη

1.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μέχρι το 2030 περισσότερα από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

Στη χώρα μας, το 6% του γενικού πληθυσμού πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Η νόσος έχει υψηλότερο επιπολασμό (συχνότητα εμφάνισης) στο δυτικό κόσμο (ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου II) και αυτό αποτελεί μια σαφή ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές μας συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης.

Ο σακχαρώδης διαβήτη τύπου II αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως καθώς συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά επεισόδια.

Άλλες σοβαρές επιπλοκές αποτελούν η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, η τύφλωση και οι ακρωτηριασμοί.

1.2.4. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans») ή Β-κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά πρώτα παράγουν ένα πρόδρομο μόριο την προϊνσουλίνη, η οποία μετατρέπεται σε ινσουλίνη μετά την αφαίρεση των μεσαίων τμημάτων της. Παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Εκτός από αυτή τη λειτουργία της για τη ρύθμιση της γλυκόζης η ινσουλίνη εμπλέκεται και στην διατήρηση επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων ούτως ώστε να καθίσταται εφικτή η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Το γεγονός ότι το κεντρικό νευρικό σύστημα παίζει ρόλο-κλειδί και στις δύο προαναφερόμενες λειτουργίες, και ότι τόσο το σωματικό βάρος όσο και η γλυκόζη του αίματος ρυθμίζονται κατά κύριο λόγο από την ίδια ορμόνη, αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας. Η σημασία της ινσουλίνης στην εγκεφαλική λειτουργία έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο σε σχέση με το ρόλο της στην περιφέρεια. Παρ' όλα αυτά, η πλειοτροπική φύση της δράσης της ινσουλίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει υπάρξει το αντικείμενο πληθώρας αξιολογήσεων. Η ινσουλίνη, αλληλεπιδρώντας με άλλα ρυθμιστικά πεπτίδια και νευροδιαβιβαστές, μπορεί να ενεργοποιήσει διεργασίες που σχετίζονται με την τροφική συμπεριφορά, τη μάθηση και τη μνήμη, ενώ δυνητικά εμπλέκεται και στην ενδοεπικοινωνία εγκεφαλικών δομών, και πιο συγκεκριμένα του υποθαλάμου και του μεταιχμιακού συστήματος. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αποδοτική δράση της ινσουλίνης στον εγκέφαλο είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ενέργειας, των επιπέδων της γλυκόζης και της λιπιδικής ομοιόστασης.

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη. Αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, μια α – αλυσίδα 21 αμινοξικών καταλοίπων που είναι συνδεδεμένη με μια β – αλυσίδα 30 αμινοξικών καταλοίπων με δυο δισουλφιδικές γέφυρες. Η προ – ινσουλίνη όπως προαναφέρθηκε συντίθεται στα β – κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων του

Langerhans και στη συνέχεια αποκόπτεται από ειδικά ένζυμα (προκομβερτάσες) σε ινσουλίνη και σε πεπτίδιο C. Η ινσουλίνη αποθηκεύεται σε εκκριτικά κυστίδια. Η ινσουλίνη αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους μυς και από τον λιπώδη ιστό, μετατοπίζοντας μεταφορείς γλυκόζης από μια ενδοκυττάρια δεξαμενή στην κυτταρική επιφάνεια. Αν και το mRNA και η πρωτεΐνη της ινσουλίνης έχουν βρεθεί σε αρκετούς ιστούς (σε διαφορετικά μοντέλα διαβήτη) σε τρωκτικά, η ινσουλίνη παράγεται φυσιολογικά στα εξαιρετικά εξειδικευμένα β – κύτταρα στα νησίδια του παγκρέατος. Η ιστο – ειδική έκφραση της ινσουλίνης ρυθμίζεται στενά στο μεταγραφικό επίπεδο και τα κύρια ρυθμιστικά στοιχεία εντοπίζονται στο 5' ακραίο άκρο του γονιδίου της ινσουλίνης. Στα ενήλικα θηλαστικά, η έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης περιορίζεται ουσιαστικά στα β – κύτταρα του παγκρέατος. Υπάρχει μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή ~ 340 kb ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής, που αναφέρεται ως προαγωγέας της ινσουλίνης και συνεισφέρει τόσο στην ιστο – ειδική έκφραση, όσο και στην μεταβολική ρύθμιση του γονιδίου της ινσουλίνης. Η έκκριση της ινσουλίνης παρακολουθεί πιστά τις αλλαγές της ενεργειακής ισορροπίας σε τάξη μεγέθους λεπτών ως ωρών

Η ανεπάρκεια της ινσουλίνης προκαλεί την νόσο του σακχαρώδη διαβήτη. Η ορμόνη αυτή έχει παρασκευαστεί συνθετικά από το 1921 και χορηγείται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Παρασκευάζεται και με βάση την ινσουλίνη από ζώα, κυρίως χοίρους. Σήμερα παρασκευάζεται - με την τεχνική της γενετικής μηχανικής - και από βακτήρια.

1.2.5. Λοιμώξεις σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης φαίνεται να συνοδεύεται με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων οι οποίες φαίνεται να είναι βαρύτερες και με μεγαλύτερο κίνδυνο επιπλοκών από τον κοινό πληθυσμό [215, 216]. Δεν υπάρχουν πάντως επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα που να αποδεικνύουν την αυξημένη αυτή προδιάθεση των διαβητικών στις λοιμώξεις.

Ορισμένες λοιμώξεις παρουσιάζονται αποκλειστικά στους διαβητικούς ασθενείς και τέτοιες είναι:

- Η κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα (από *Pseudomonas aeruginosa*), μια ασυνήθης αλλά σοβαρή και δυνητικά θανατηφόρα λοίμωξη.

- Η εγκεφαλορρινική μουκορμυκητίαση (από τους μύκητες *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*), με αυξημένη επίπτωση στους σακχαροδιαβητικούς και σε ασθενείς με A.I.D.S με υψηλά ποσοστά θνητότητας,
- Η εμφυσηματώδης πυελονεφρίτιδα, η οποία αφορά σχεδόν αποκλειστικά τους διαβητικούς ασθενείς (90% όλων των περιπτώσεων).
- Η εμφυσηματώδης χολοκυστίτιδα με υψηλή συχνότητα (έως 35% των περιπτώσεων) σε διαβητικούς ασθενείς.

1.2.5.1. Κοινές λοιμώξεις σε διαβητικούς

Στους διαβητικούς ασθενείς παρατηρούνται λοιμώξεις αναπνευστικού με αυξημένη συχνότητα από *Streptococcus pneumoniae* και *influenza virus* οι οποίες και συνδέονται με αυξημένη θνησιμότητα και νοσηρότητα ενώ η βακτηριαμία σε πνευμονιοκοκκική λοίμωξη συνοδεύεται με αυξημένη θνησιμότητα συγκριτικά με μη διαβητικούς ασθενείς. Πάντως δεν είναι ξεκάθαρο αν ο ΣΔ αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για αυξημένη επίπτωση ή βαρύτητα νόσου σε κοινές λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού αν και ειδικοί μικροοργανισμοί όπως το *Mycobacterium tuberculosis* έχουν παρατηρηθεί σε αυξημένη συχνότητα στους διαβητικούς ασθενείς.

Πρόσφατη μελέτη του ασιατικού πληθυσμού στη Μ. Βρετανία κατέγραψε αυξημένη συχνότητα φυματίωσης πνευμόνων των διαβητικών σε σχέση με τους μη διαβητικούς, εύρημα ήδη γνωστό από μελέτες των αρχών του 20^{ου} αιώνα.

Λοιμώξεις μαλακών μορίων κυρίως ποδιών, αποτελούν συχνές αιτίες νοσηρότητας και αυξημένης θνητότητας σε διαβητικούς ασθενείς. Η *Candida* ευθύνεται για βλεννογονοδερματικές λοιμώξεις, με αυξημένη συχνότητα στους διαβητικούς ασθενείς, όπως και για άλλες μυκητιασικές λοιμώξεις που έχουν αυξημένη επίπτωση στους διαβητικούς, ανεξάρτητα από ηλικία/διάρκεια νόσου/τύπο ΣΔ, γεγονός που έχει αποδοθεί στην αυξημένη *in vitro* προσκόλληση των στοματικών κυττάρων των διαβητικών για την *Candida albicans* συγκριτικά με των υγιών μαρτύρων. Το υπεργλυκαιμικό περιβάλλον φαίνεται επίσης να ενισχύσει τη λοιμογόνο δράση του *Candida albicans*, η οποία εκφράζει μια επιφανειακή πρωτεΐνη (iC3b) με μεγάλη ομολογία με τον υποδοχέα του συμπληρώματος τύπου 3 (CR3). Σε υπεργλυκαιμικό περιβάλλον, αυξάνεται η έκφραση των υποδοχέων τύπου CR3 της

Candida albicans κι αυτό οδηγεί σε ανταγωνιστική δέσμευση και αναστολή της μέσω συμπληρώματος φαγοκυττάρωσης.

Ο ΣΔ είναι επίσης κοινός προδιαθεσικός παράγων για μυκητιασικές λοιμώξεις ουροποιητικού (ειδικά από είδη *Candida*), που συμπεριλαμβάνουν από άνευ σημασίας αποικισμό κατώτερου ουροποιητικού μέχρι εμφυσηματώδη κυστίτιδα και συνοδεύονται από πολλές επιπλοκές. Οι διαβητικοί ασθενείς υφίστανται βαρύτερες λοιμώξεις ουροποιητικού και η οξεία πυελονεφρίτιδα αμφοτερόπλευρα είναι συχνότερη σε διαβητικούς από μη διαβητικούς ασθενείς. Πολλές μελέτες επίσης καταγράφουν αυξημένη επίπτωση βακτηριουρίας σε διαβητικές γυναίκες συγκριτικά με μη διαβητικές γυναίκες. Η γλυκοζουρία σε διαβητικούς με κακή ρύθμιση της γλυκόζης αίματος επαυξάνει την ανάπτυξη διαφόρων στελεχών *Escherichia coli* και ίσως αυτό παίζει ένα ρόλο στην μεγάλη επίπτωση λοιμώξεων ουροποιητικού στους διαβητικούς .

Παρόλο που οι λοιμώξεις από *S.aureus* θεωρούνται από τις πιο κοινές λοιμώξεις στους διαβητικούς, τα στοιχεία από μελέτη ανασκόπησης των λοιμώξεων των διαβητικών δεν το τεκμηριώνουν.

1.2.5.2 Ανοσοποιητικό σύστημα και λοιμώξεις σε ΣΔ

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη έχει μελετηθεί εκτεταμένα και πολλές διαταραχές περιγράφονται ιδίως στην έμφυτη ανοσοποίηση τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική (πίνακας 1).

Λειτουργία ανοσοποιητικού	Σακχαρώδης Διαβήτης
Απάντηση λευκοκυττάρων	Μειωμένη χημειοταξία προσκόλληση και φαγοκυττάρωση λεμφοκυττάρων ,ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων
Ανοσολογική απάντηση μέσω κυττάρων	Μειωμένες απαντήσεις ,μειωμένη απάντηση στη φυτοαιμαγλουτίνη και <i>Staphylococcus aureus</i>
Βραδείες ατιδράσεις υπερευαισθησίας	παθολογικές
Χυμική ανοσία	Χωρίς ιδιαίτερες διαταραχές
Επίπεδα ανοσοσφαιρινών	Όχι αποδεδειγμένες διαταραχές

Πίνακας 1. Διαταραχές ανοσοποιητικού συστήματος στο σακχαρώδη διαβήτη.

1.2.6 Ιστορική αναδρομή

Το 1962 σε έναν τάφο ευγενών στο Λούξορ της Αιγύπτου ανακαλύπτεται η πρώτη αναφορά στο διαβήτη που χρονολογείται το 1550 π.Χ.

Ο ξακουστός γιατρός Αρεταίος ο Καππαδόκης (120-200 π. Χ.), η τρίτη μεγαλύτερη ιατρική προσωπικότητα της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη και τον Γαληνό, έδωσε την ονομασία «διαβήτης» από το ρήμα «διαβαίνω» εξαιτίας του ότι το νερό που έπινε ο άρρωστος διάβαινε (πέρναγε) αναλλοίωτο στα ούρα. Πριν την ονομασία αυτή λέγονταν «δίψακο» από το όνομα φιδιού που όταν δαγκώνει προκαλεί ακατάσχετη δίψα και πίστευαν ότι ήταν και το αίτιο της νόσου.

Ταυτόχρονα στην Κίνα ο διαβήτης ήταν γνωστός ως η νόσος της δίψας ενώ στην Ινδία ως «νόσος με μελώδη ούρα». Ο άραβας γιατρός Avicenna (Αβικένα 980-1037 μ.Χ.) περιέγραψε πρώτος τη διαβητική γάγγραινα στο πόδι.

Μετά από αιώνες αδράνειας τον 17ο αιώνα προστίθεται ο όρος «σακχαρώδης» μετά την διαπίστωση ότι τα ούρα έχουν γλυκιά γεύση ενώ τον 18ο αιώνα ανακαλύπτεται η ύπαρξη γλυκόζης στα ούρα. Ένας φοιτητής Ιατρικής στο Βερολίνο, ο Paul Langerhans (1847-1888) παρατηρεί με το μικροσκόπιο του σωρούς κυττάρων στο πάγκρεας του κουνελιού που αποκαλούμε νησίδια (λατινιστί insulae), όμως δεν τα

συσχέτισε με τον διαβήτη. Το 1889 βόμβα μεγατόνων ταραίζει τα λιμνάζοντα νερά. Δύο γιατροί απ' το Στρασβούργο οι Minkowski και Mering αφαιρούν το πάγκρεας από σκύλους και βλέπουν ότι εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά συμπτώματα του διαβήτη η πολυουρία και η πολυδιψία. Τα δύστυχα ζώα πλημμυρίζουν το πάτωμα με ούρα των οποίων η χημική ανάλυση αποκαλύπτει την παρουσία τεράστιων ποσοτήτων γλυκόζης. Επιτέλους, η σχέση παγκρέατος και σακχαρώδους διαβήτη αποδείχτηκε.

Ακολούθως ο Ρουμάνος Paulesco δημοσίευσε ότι εκχύλισμα παγκρέατος θα μπορούσε να θεραπεύσει τον διαβήτη. Τελικά ο θρίαμβος έρχεται το 1921 όπου οι γιατροί Banting και Best, στο Τορόντο του Καναδά, μετά από ατελείωτα ξενύχτια και πολύ αγάπη για τον άνθρωπο και την επιστήμη ανακαλύπτουν ότι η έλλειψη της ινσουλίνης προκαλεί τον διαβήτη. Οι ερευνητές αυτοί προχώρησαν από 'κει που είχε φτάσει ο Paulesco. Απομόνωσαν τα νησίδια του Langerhans από πολλά παγκρέατα και με χημική επεξεργασία παρασκεύασαν εκχύλισμα που περιείχε ινσουλίνη και το οποίο χορήγησαν σε ετοιμοθάνατο σκυλάκι, την Μάρτζορι. Η αγωνία κορυφώνεται, οι χτύποι της καρδιάς ανεβαίνουν καθώς μετρούν συνεχώς το σάκχαρο στο αίμα και στα ούρα της σκυλίτσας. Ωσπου έρχεται η δικαίωση. Τα επίπεδα του σακχάρου γίνονται πλέον φυσιολογικά. Τεράστια ικανοποίηση πλημμυρίζει τους ενθουσιώδεις γιατρούς. Μέσα στο αυστηρό περιβάλλον του εργαστηρίου αρχίζουν να χοροπηδούν απ' τη χαρά τους. Επιτέλους πέτυχαν το στόχο τους να δώσουν ζωή σε εκατομμύρια διαβητικούς.

Τον Ιανουάριο του 1922 χορηγήθηκε για πρώτη φορά ινσουλίνη σε άνθρωπο. Ο τυχερός ήταν ο νεαρός Leonard Thompson, 14 ετών, με βάρος μόνο 29 κιλά που έβλεπε το τέλος να πλησιάζει. Η πρώτη χορήγηση δεν απέδωσε τα αναμενόμενα. Μετά όμως από τη χορήγηση καθαρότερου εκχυλίσματος η ανταπόκριση ήταν θεαματική. Το σάκχαρο από 520 mg έπεσε στο 120 και το παιδί σώθηκε.

Ο Banting και ο Macleod (ο διευθυντής του εργαστηρίου που ενθάρρυνε τις έρευνες) τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel το οποίο μοιράστηκαν με τους συνεργάτες τους Best και Collip (χημικός που παρασκεύασε το απαλλαγμένο από προσμίξεις εκχύλισμα).

Η διάκριση μεταξύ διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2 έγινε το 1936 από τον Harold Percival Himsworth.

1.2.7. Συσχετισμός Συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης και Σήψης με Σακχαρώδη Διαβήτη.

Ο ΣΔ σχετίζεται με αυξημένη δεκτικότητα σε μολύνσεις και στη σήψη. Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το κατά πόσο η θνησιμότητα των ασθενών με σήψη επηρεάζεται από την ύπαρξη ΣΔ, πυροδοτώντας τη διαφωνία για τα προνόμια της στενής παρακολούθησης και διαχείρισης της γλυκόζης στους ασθενείς με σήψη. Ο κύριος λόγος που ο ΣΔ προδιαθέτει την εμφάνιση μολύνσεων φαίνεται ότι είναι ανωμαλίες της απόκρισης του ξενιστή, ιδιαίτερα στη χημειοταξία των ουδετερόφιλων, στη προσκόλληση και στην ενδοκυτταρική θανάτωση, ελαττώματα που αποδίδονται στην επίδραση της υπεργλυκαιμίας. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για ελαττώματα στη χυμική ανοσία και αυτό μπορεί να παίζει μεγαλύτερο ρόλο από ότι πιστεύαμε παλαιότερα.

Οι διαβητικοί είναι πιο επιρρεπείς σε λοιμώξεις που οφείλονται σε ανεπάρκεια των λευκών αιμοσφαιρίων. Λόγω αυτής της έλλειψης, ο ασθενής δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσει μικρόβια φλεγμονώδους αντίδρασης ή σήψης όταν αυτά εισέρχονται στον οργανισμό μέσω του δέρματος, τα μάτια ή το στόμα. Παρά το γεγονός ότι εξακολουθούν να διατρέχουν κίνδυνο για άλλες επιπλοκές, οι διαβητικοί είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν αναπνευστική ανεπάρκεια από ΣΦΑ σε σύγκριση με άλλους ασθενείς, αλλά ο ακριβής λόγος για αυτό είναι άγνωστος.

1.3. Οξειδωτικό Στρες

1.3.1. Ορισμός

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Έχει οριστεί ως μία διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφική βιομορίων.

1.3.2. 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 από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Το O₂ είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει τοξικό, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως “μια διαταραχή στην προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ισορροπία” (Sies H. 1985). Παρά το γεγονός ότι αυτός ο ορισμός έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για πάνω από δύο δεκαετίες, είναι πιθανό να υποβληθεί σε αλλαγές στο μέλλον. Πράγματι, λόγω της πολυπλοκότητας που σχετίζεται με την εκτίμηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, έχει υποστηριχθεί ότι ο όρος οξειδωτικό στρες είναι χρήσιμος μόνο αν τα μοριακά στοιχεία της ανισορροπίας είναι γνωστά. Σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η έννοια του οξειδωτικού στρες, ο Dean Jones πρότεινε ότι ο όρος αυτός θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί ως "διατάραξη της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου» (Jones DF. 2006, Cott K. Powers and Malcolm J. Jackson).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να κατανοούν καλύτερα τις επιβλαβείς δράσεις, αλλά και την επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.3.3. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Με την οξυγόνωση της ατμόσφαιρας της Γης σημειώθηκε μια δραματική αλλαγή στην πορεία της εξέλιξης. Η αύξηση στην συγκέντρωση του 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 ποικιλία νέων μεταβολικών αντιδράσεων. Τα υψηλά επίπεδα του οξυγόνου οδήγησαν τελικά στην άνοδο των σύνθετων μορφών

ζωής και την επακόλουθη επίγεια εξάπλωσή τους (*Baudouin-Cornu P. And Thomas D. 2007*).

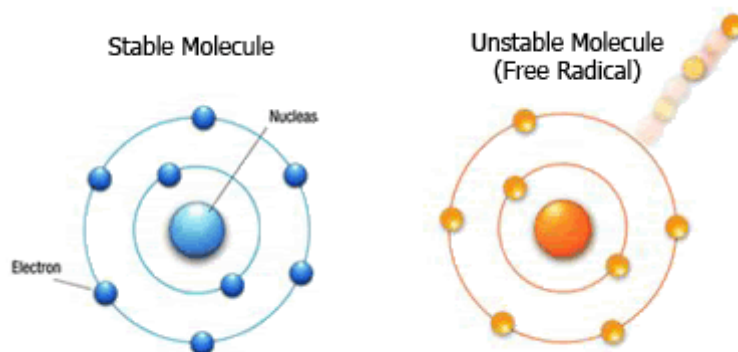
Ωστόσο, τα οφέλη που προσφέρει μια ατμόσφαιρα πλούσια σε οξυγόνο στην επίγεια ζωή συνοδεύονται με συνέπειες, από τις οποίες η βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS, επίσης γνωστά ως ελεύθερες ρίζες), είναι ίσως η πιο σημαντική. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως τα υπεροξειδία και τα ιόντα υδροξυλίου, αντιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών μορίων, προκαλώντας σημαντικές μοριακές βλάβες και παρεμβαίνουν ακόμα και στην κυτταρική λειτουργία. Οι ROS παίζουν μεγάλο ρόλο στην οξειδωτική βλάβη η οποία προκαλείται από την γήρανση καθώς και από πολλές ασθένειες του ανθρώπου (*Leigh Boardman et al.2011*).

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται **παραμαγνητικά**, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, **διαμαγνητικά**. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται **οξειδοαναγωγικές** (redox), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

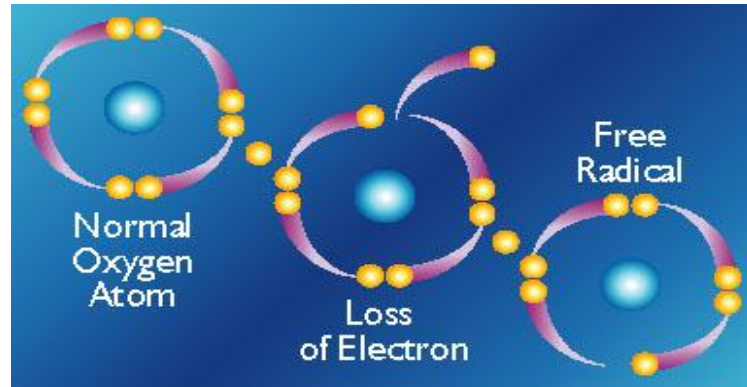
Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (*Gilbert 2000, Halliwell & Gutteridge 1990*). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια

στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge, 1990).



Εικόνα 14. Η δραστηκότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al. 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με 3O_2 , δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με 1O_2 . Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου



Εικόνα 15. Δημιουργία ελεύθερης ρίζας..

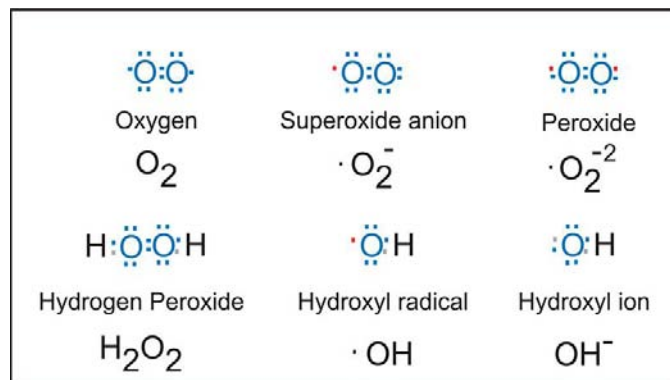
Υπάρχουν πολλοί τύποι ελεύθερων ριζών στο σώμα. Οι τέσσερις ιδιαίτερα βλαβεροί είναι :

➤ Η **ρίζα του υπεροξειδίου** τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει.

➤ Η **ρίζα του υδροξυλίου** μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.

➤ Η **ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων** προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί την λύση του κυττάρου και ελευθέρωση του περιεχομένου του.

➤ Το **μονήρες οξυγόνο** δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.



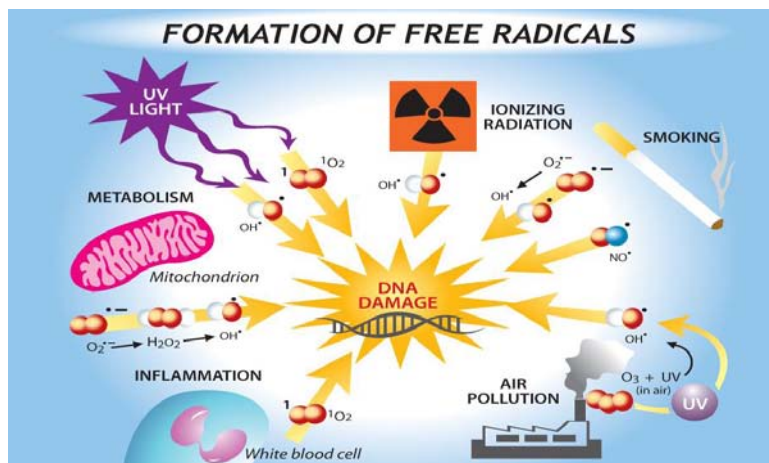
Εικόνα 16. Δραστικές μορφές οξυγόνου.

1.3.4. Πώς παράγονται οι ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να παραχθούν ενδογενώς στους οργανισμούς καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του

κυττάρου. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στην μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά. Συγκεκριμένα μπορούν να παραχθούν στους οργανισμούς ως εξής ενδογενώς και εξωγενώς (Battin et al., 2009) :

- κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας (στα μιτοχόνδρια)
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα
- τη λιπιδική οξείδωση
- την ακτινοβολία
- τη φλεγμονή
- το κάπνισμα
- την μολυσμένη ατμόσφαιρα, το νέφος (όζον, νιτροξείδια)

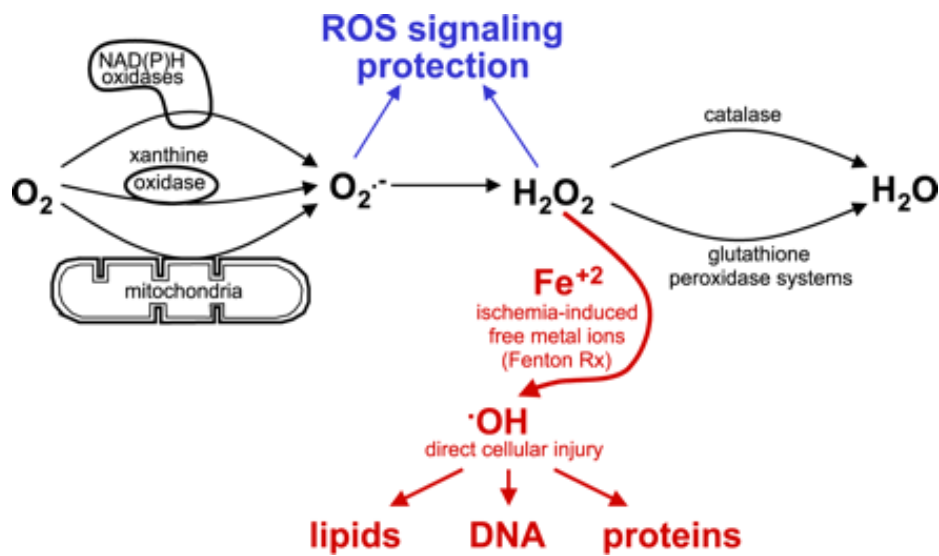


Εικόνα 17. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

1.3.5. Επιπτώσεις

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με

δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell 2001; Halliwell & Gutteridge 1998). Υπό κανονικές συνθήκες περίπου το 5% του εισπνεόμενου οξυγόνου μεταβολίζεται στο νερό μέσω της διαδρομής που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το σουπεροξειδίο του οξυγόνου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγονται φυσιολογικά και μπορεί να έχουν προστατευτικές δράσεις. Ωστόσο, με την επαναιμάτωση η φυσιολογική ισορροπία χάνεται και ρίζες υδροξυλίου (\bullet OH) μπορούν να παραχθούν μέσω της αντίδρασης Fenton (Hess M.L. and Manson N.H. 1984).



Εικόνα 18. Μεταβολισμός οξυγόνου

1.3.5.1 Θετικές επιδράσεις

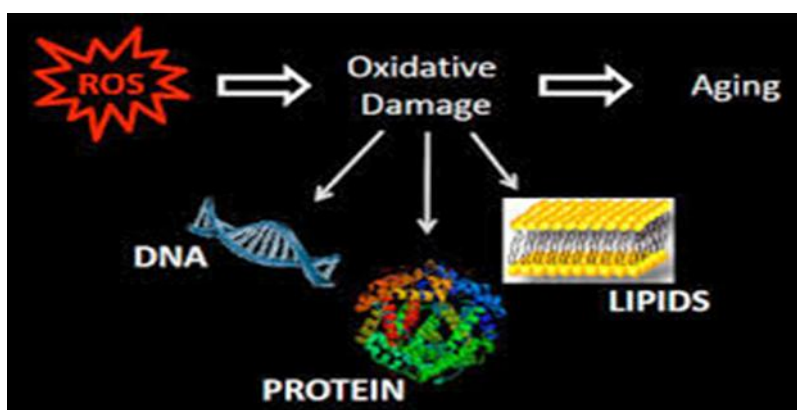
Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ποικίλες βλάβες στον οργανισμό, ωστόσο οι δραστικές ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για την λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμεύουν στην **άμυνα** του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης, καθώς οι δραστικές ρίζες οξυγόνου ενισχύουν την βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων. Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την **ανοσία**, τον **κυτταρικό πολλαπλασιασμό**, το **μεταβολισμό** (ιδιαίτερα το H_2O_2), την **απόπτωση** και τη **μυϊκή συστολή** (Reid, 2001; Linnane et al., 2002). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε

απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της **αγγειογένεσης**.

Είναι πλέον επιστημονικώς αποδεδειγμένο ότι οι ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως **υποστρώματα ενζύμων**, όπως το H_2O_2 χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις υπεροξειδάσες της αίμης που εμπλέκονται στην ιωδίωση των ορμονών του θυρεοειδή αδένου. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στον ιστό ποικίλει από 1 έως 700nM. Ωστόσο, διακρίνονται σημαντικές αλλαγές στην συγκέντρωσή του όταν ανταποκρίνεται σε κυτταροκίνες και σε αυξητικούς παράγοντες. Το γεγονός ότι αυτά τα γεγονότα σηματοδοτούνται αναστέλλονται από υπεροξειδία ή από την υπερέκφραση καταλάσης καθιστά πιθανή την εμπλοκή του H_2O_2 στον καταρράκτη σηματοδότησης. Η σηματοδότηση της ινσουλίνης φαίνεται να περιλαμβάνει H_2O_2 ως μέρος του μηχανισμού για αναστρέψιμη αδρανοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης, την ίδια στιγμή που οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα ινσουλίνης (John W Baynes and Marek H Dominiczak, 2012).

1.3.5.2 Αρνητικές επιδράσεις

Στα αρνητικά αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, συγκαταλέγονται η μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και η οξείδωση μορίων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA (Lyra et al, 1977).



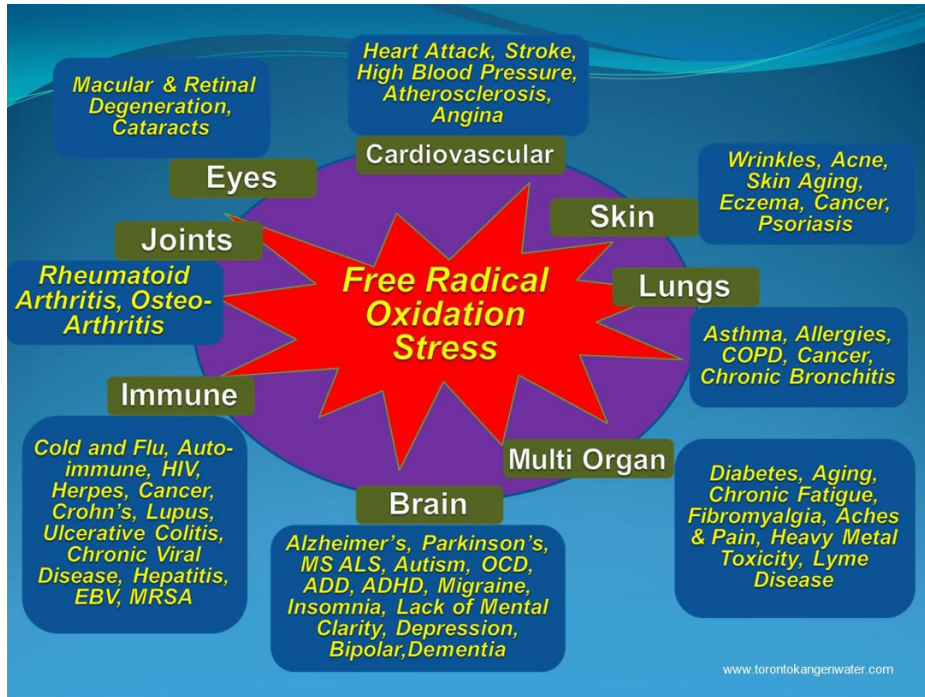
Εικόνα 19. Στόχοι ROS.

Στα **λιπίδια** οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση. Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. 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. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO· 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 οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Στις **πρωτεΐνες** που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH·, το RO· και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis 1987; Grune et al. 1997; Halliwell and Gutteridge 1999; Levine et al. 2000; Stadtman, 1986)

Στην περίπτωση του **DNA**, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες), όσο και στην D-ριβόζη του μορίου, θραύσεις στο DNA, καθώς βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002q Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).

Σε επίπεδο **οργάνων και οργανισμού**, το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε αρκετές εξ αυτών:



Εικόνα 20. Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.

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 επίπεδο (Craig N. Morell, 2008).

1.3.6. Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες

Ο κατάλογος των ασθενειών, που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών συνεχώς αυξάνεται (Haliwell, 2001). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- ο καρκίνος
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Parkinson, Alzheimer, Huntington)
- η αθηροσκλήρυνση
- το AIDS

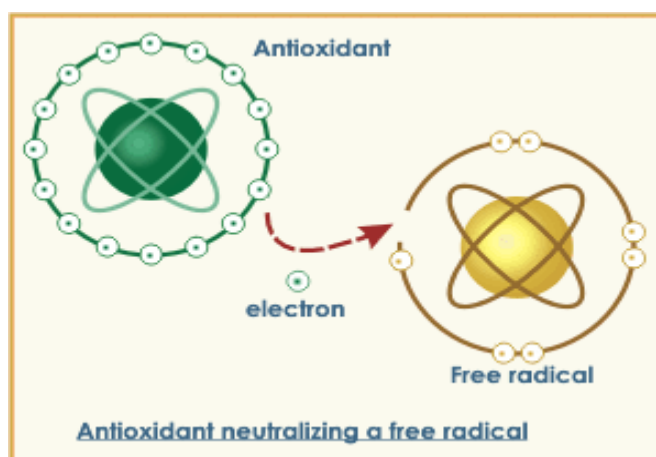
- η ηπατίτιδα
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα

Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μυοκαρδιακών βλαβών, σχιζοφρένειας, διπολικής διαταραχής και συνδρόμου εύθραυστου Χ χρωμοσώματος. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κρύβεται πίσω από το σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως (B.N. Ames et al., 1993, Cooke et al., 2003).

1.3.7. Αντιοξειδωτικά

1.3.7.1. Ορισμός

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 (Halliwell B, 2001). Τα αντιοξειδωτικά δρουν δανείζοντας ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παρέχουν μία θωράκιση στο σώμα μας (μία δηλαδή αντιοξειδωτική προστασία). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί.



Εικόνα 21. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Στα αντιοξειδωτικά με **ενζυμικούς** μηχανισμούς δράσεις περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως : η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Στα αντιοξειδωτικά που δρουν με **μη ενζυμικούς** μηχανισμούς ανήκουν μόρια τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες όπως: η βιταμίνη E, η βιταμίνη C ή

ασκορβικό οξύ, β-καροτίνη, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10(σαρδέλα, σόγια) και το σελήνιο.

1.3.7.2. Ρόλος αντιοξειδωτικών

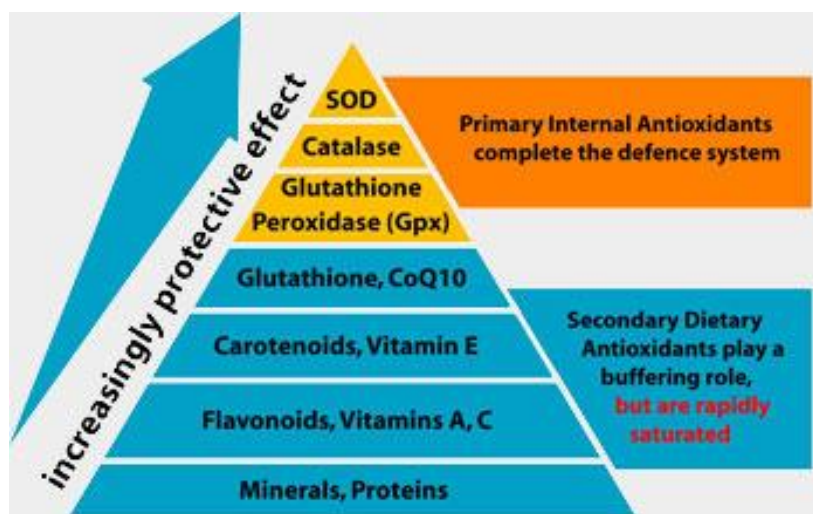
➤ Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

➤ 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.

➤ Δρουν καρδιοπροστατευτικά

➤ Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών.



Εικόνα 22. Κατάταξη με βάση τη σημαντικότητα αντιοξειδωτικών

Table 4. *Relation between presence of SIRS at admission and outcome*

Clinical outcome parameters	No SIRS at admission, N = 80	SIRS present at admission, N = 120	P value
Need for mechanical ventilation at the time of admission	0/80	28/120	<.001
Need for mechanical ventilation on the 1st week of admission	0/80	29/120	<.001
Need for mechanical ventilation on the 2nd week of admission	1/80	9/94	.05
Duration of hospital stay (d)	11.8 ± 10.6	15.01 ± 10.13	.01
Death	1/80	30/128	<.001
mRS score at 1 mo	2.8 ± 1.1	4.5 ± 1.3	<.001
mRS score at 3 mo	2.3 ± 1.2	4.5 ± 1.2	<.001
BI score at 3 mo	81.5 ± 21.4	56.9 ± 8.9	.01
Poor outcome (mRS >2) at 3 mo	20/80	90/120	<.001

Abbreviations: BI, Barthel index; mRS, modified Rankin Scale; SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

Πίνακας 2. Συσχέτιση της παρουσίας SIRS και έκβασης της υγείας των ασθενών.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, σήψη και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για τον σκοπό αυτό έγιναν καθημερινές αιμοληψίες σε 15 ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη και μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (CARBONYLS).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

Για την διεξαγωγή της έρευνας χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από 15 ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και σακχαρώδη διαβήτη, οι οποίοι νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας. Επίσης, για μια περαιτέρω σύγκριση, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες τιμές από 15 φυσιολογικά άτομα. Η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων αξιολογήθηκε με το t-test με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.



Διάγραμμα 5. Τιμές apache των ασθενών όπου φαίνεται η σοβαρότητα της ασθένειας για τον κάθε ασθενή του δείγματος μας.

3.1.1 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 μαλονδιαλδεΰδη. Η μαλονδιαλδεΰδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΰδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της

μαλονδιαλδεΰδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής 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 Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ 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 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \cdot 31$, 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 $\mu\text{mol/L}$.

*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 Na_2SO_4 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 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \cdot 31 \cdot 2$, 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 το $\mu\text{mol/L}$.

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 $10 \cdot 2$, 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 (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). 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 \approx 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 \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 50 μ L πλάματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρήμνιστούν 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 απορρόφηση στα 375 nm.

*(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).

Υπολογισμοί

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

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH 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) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \cdot 1000/50 \cdot 2 \cdot 10$.

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

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL 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 (μmol/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 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 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 KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 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 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

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	$\frac{3}{4}$
Διμόλυμα	$\frac{3}{4}$	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 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,

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

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

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.

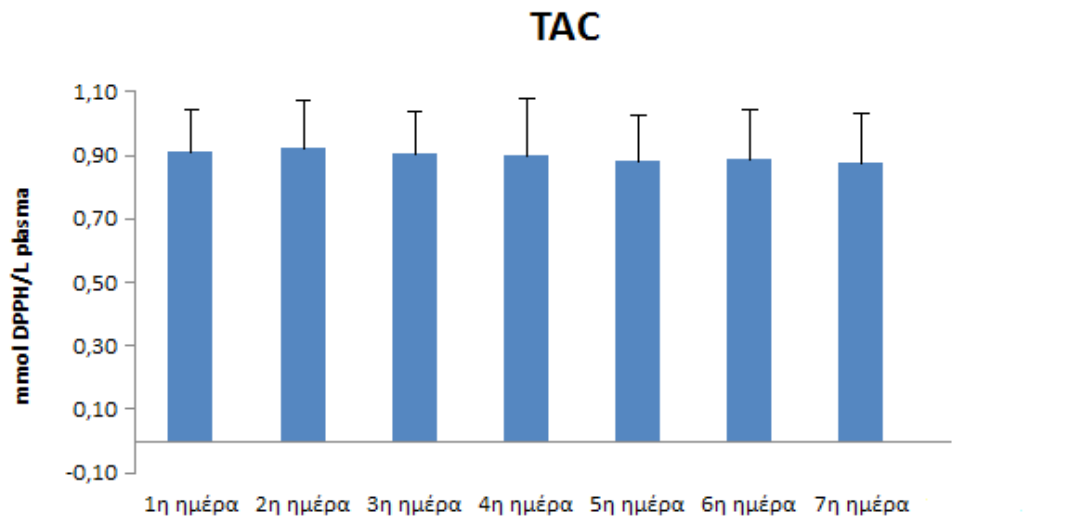
γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

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: $20 / 100 \cdot 50 \cdot 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος}$ ή $0.5 \text{ mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή 0.5 mmol DPPH/L .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

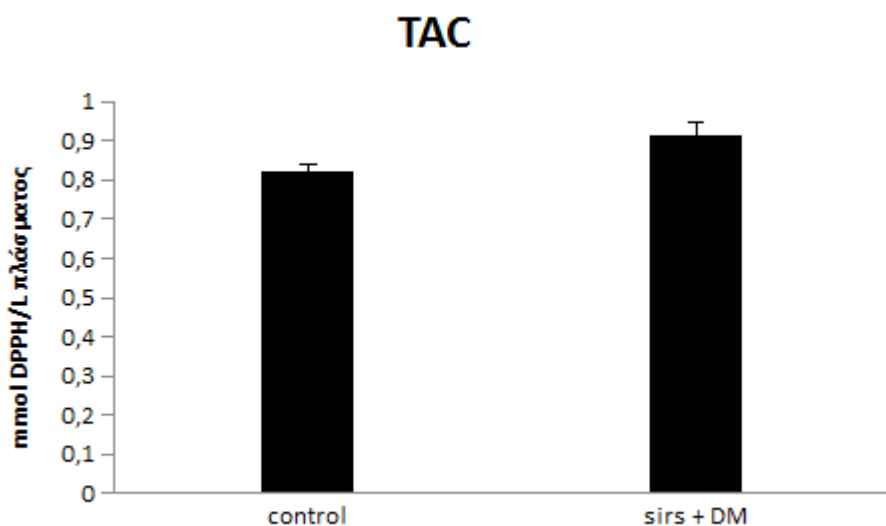
4.1.1. Επίπεδα TAC σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 6. Ημερήσια επίπεδα TAC σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα TAC των ασθενών με την πάροδο του χρόνου.

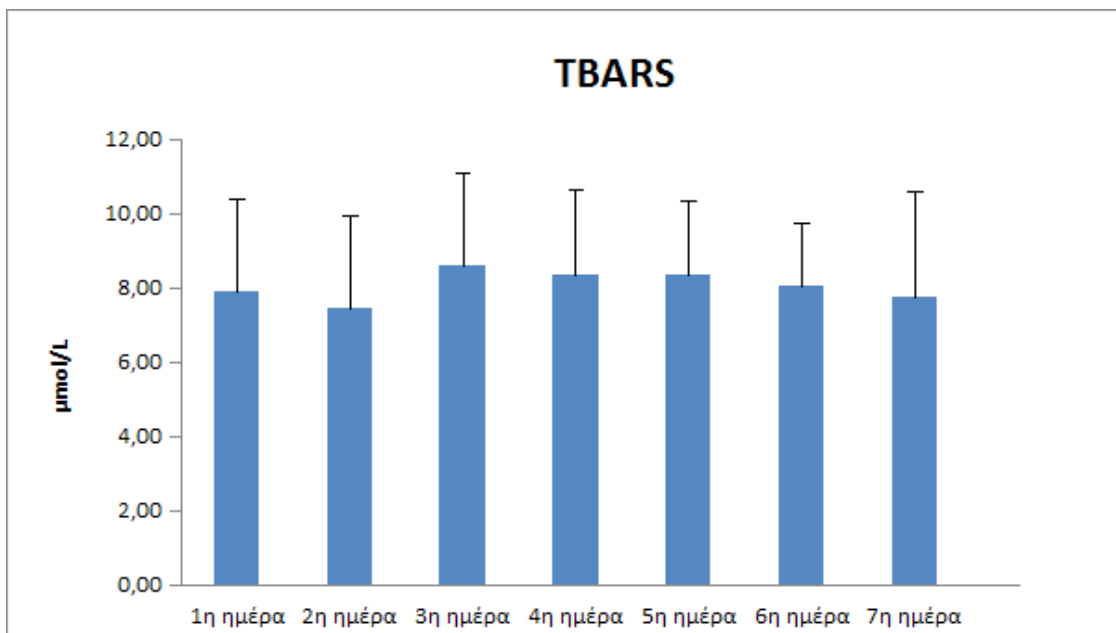
4.1.2. Επίπεδα TAC σε φυσιολογικούς ασθενείς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 7 Σύγκριση επιπέδων TAC σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

❖ Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα επίπεδα της TAC σε ασθενείς με SIRS (πρώτη ημέρα νοσηλείας στη ΜΕΘ) και σακχαρώδη διαβήτη, 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.

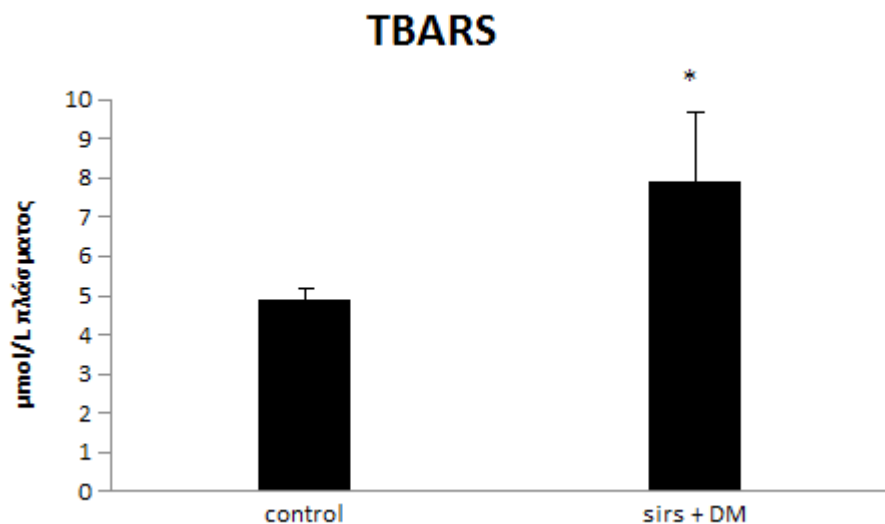
4.2.1. Επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 8. Ημερήσια επίπεδα TBARS σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

- ❖ Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των TBARS.

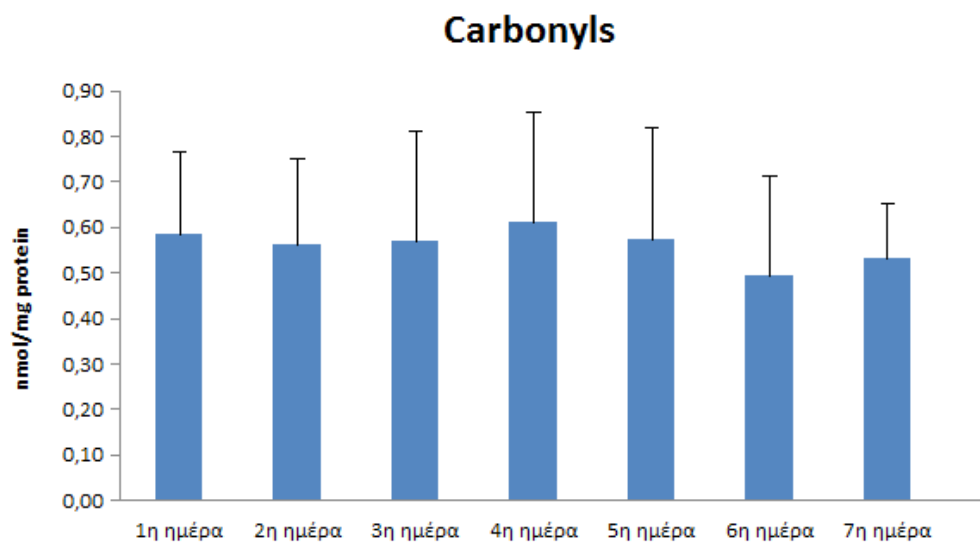
4.2.2. Επίπεδα TBARS σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 9. Σύγκριση τιμών TBARS σε φυσιολογικούς και σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

❖ Στο διάγραμμα 5 γίνεται μια σύγκριση των τιμών TBARS μεταξύ φυσιολογικών ατόμων (ομάδα control) και των τιμών της 1^η ημέρας νοσηλείας των ασθενών με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη, στη ΜΕΘ. Παρατηρούμε ότι κατά την πρώτη μέρα νοσηλείας οι ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα TBARS ($p < 0,05$) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα με ποσοστό 61,34%.

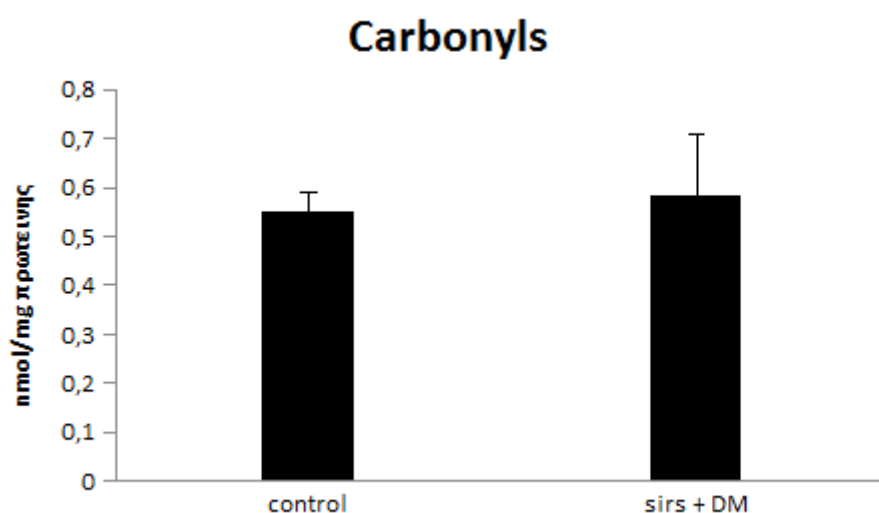
4.3.1. Επίπεδα Καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 10. Επίπεδα Καρβονυλίων σε ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

- ❖ Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των καρβονυλίων.

4.3.2. Επίπεδα καρβονυλίων σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.



Διάγραμμα 11. Επίπεδα καρβονυλίων σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη.

❖ Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται μια σύγκριση μεταξύ ατόμων με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη 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 στη ΜΕΘ εμφάνισαν ίδια επίπεδα καρβονυλίων με τους φυσιολογικούς.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

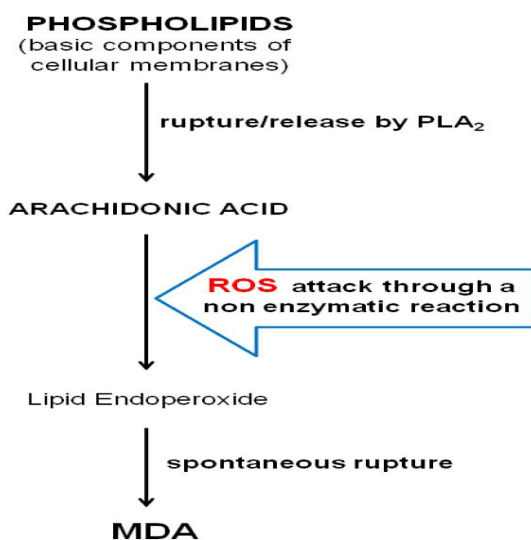
Η σήψη είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε κρίσιμη κατάσταση σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Η παθοφυσιολογία της σήψης χαρακτηρίζεται από μία σειρά γεγονότων συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μεταλλαγές στο σύστημα πήξεως, οι οποίες οδηγούν σε διαταραχές στην μεταφορά οξυγόνου και μεταβολικών υποστρωμάτων στους ιστούς, σε οργανική ανεπάρκεια και τελικά στον θάνατο.

Ο σακχαρώδης διαβήτης, βασικά μια πάθηση του μεταβολισμού των τροφών, λόγω μερικής ή πλήρους έλλειψης της ζωτικής σημασίας ορμόνης που παράγεται στο πάγκρεας, της ινσουλίνης, είναι μια αιτία του οξειδωτικού στρες και αποδυνάμωσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Η παρουσία SIRS σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη μονάδα εντατικής θεραπείας έχει αναφερθεί να σχετίζεται με το θάνατο και την αναπηρία. Δεν έχει βρεθεί άμεση σχέση του διαβήτη στην εκδήλωση του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS). Στο σακχαρώδη διαβήτη, το SIRS μπορεί να είναι ένα σύμπτωμα της συστηματικής λοίμωξης και τα αποτελέσματα του μπορεί να μην είναι παρόμοια με μη μολυσματικά αίτια. Κατά τα τελευταία χρόνια, έχει εξετασθεί ο ρόλος του SIRS στο σακχαρώδη διαβήτη, από την άποψη της θνησιμότητας, του λειτουργικού αποτελέσματος, και των επιπλοκών κατά τη διάρκεια της παραμονής στο νοσοκομείο, όπως η πνευμονία, η ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι ελεύθερες δραστικές ρίζες (ROS, RNS) προκαλούν έμμεση βλάβη στους ιστούς μέσω ενεργοποίησης προ-φλεγμονωδών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στο στάδιο πριν την εκδήλωση φλεγμονής. Τα δραστικά αυτά είδη προκαλούν μεταλλαγές σε πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο, οι οποίες μεσολαβούν στην μεταγωγή εξωκυτταρικών σημάτων από τους υποδοχείς στους μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα (όπως ο AP-1 και ο NF-κB). Συγκεκριμένα ο παράγοντας NF-κB φαίνεται να είναι ο κύριος 'διακόπτης' ή το κύριο σημείο ελέγχου για την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Οι παράγοντες NF-κB και AP-1 ρυθμίζονται μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων εντός του κυττάρου. Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι η οξειδοαναγωγή έχει διαφορετικά αποτελέσματα για τους πολυδύναμους αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι προ-οξειδωτικοί παράγοντες ενεργοποιούν τον NF-κB και καταστέλλουν τον AP-1, ενώ οι αντι-οξειδωτικοί

παράγοντες ενεργοποιούν τον AP-1 και καταστέλλουν τον NF-κB. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν το μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB ως κύριο χαρακτηριστικό του σηπτικού σοκ (Abraham E. 2003).

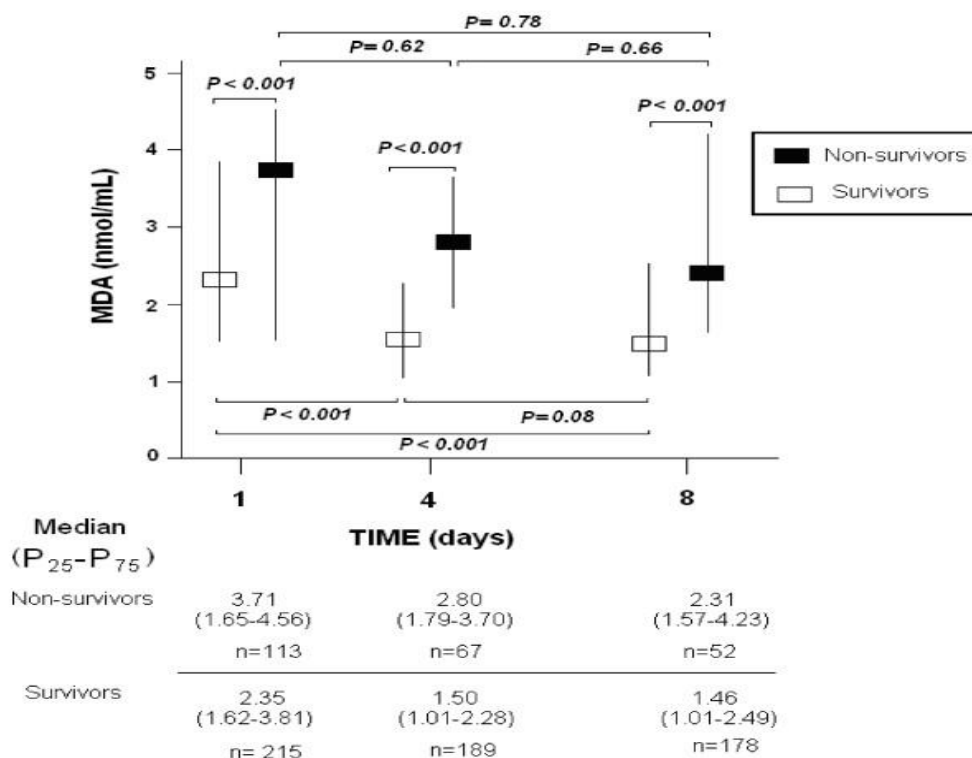
Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί στην παθογένεια της σήψης η οποία, οδηγεί σε δυσλειτουργία οργάνων και ως εκ τούτου αντιπροσωπεύει έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο. Το οξειδωτικό στρες υποδηλώνει την ανισορροπία μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, γι' αυτό παίζει κρίσιμο ρόλο τόσο ως υποκινητής όσο και ως μεσολαβητής της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (Derek S. Wheeler 2011). Ωστόσο, επειδή οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής, ο προσδιορισμός του σχηματισμού ελευθέρων ριζών σε ανθρώπινα δείγματα είναι εξαιρετικά δύσκολος. Ως εκ τούτου, οι μετρήσεις του οξειδωτικού στρες έχουν στηριχθεί σε ποσοτικοποίηση των παραπροϊόντων της οξείδωσης των μακρομορίων (Scott L. Weiss et.al, 2014). Σε μια προηγούμενη μελέτη, ο Lorente και οι συνεργάτες του, έδειξαν αυξημένα επίπεδα μηλονοδιαλδεϋδης (MDA), έναν δείκτη της υπεροξείδωσης λιπιδίων, στον ορό των ενηλίκων με σοβαρή σήψη (Lorente L et, al, 2013). Η MDA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα αποτελεσματικός βιοδείκτης της οξείδωσης των λιπιδίων για περισσότερα από 30 χρόνια. (Lorente L et, al, 2013).



Εικόνα 23. Παραγωγή MDA.

Στη σήψη η αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μηχανισμών οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROS. (Galley HF, 2010), (von Dessauer B, et.al, 2011). Ο συνδυασμός αυξημένου σουπεροξειδίου και της αυξημένης έκφρασης οξειδίου του αζώτου στη σήψη, οδηγούν

σε αυξημένη παραγωγή νιτρικού υπεροξειδίου και άλλων τοξικών δραστικών ειδών αζώτου (RNS) (Murphy MP,2009). Το αποτέλεσμα είναι συσσωρευμένη βλάβη σε λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα τα οποία ενδέχεται να εμποδίζουν την κυτταρική λειτουργία. Ειδικότερα, η οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια του πλάσματος και της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μπορεί να επηρεάσουν και να βλάψουν την διαπερατότητα των μεμβρανών και την πρόσδεση σε αυτές υποδοχέων και ενζύμων. Το MDA και άλλες δραστικές αλδεΐδες, είναι μεταξύ των τοξικών ειδών που μπορούν να διαταράξουν την πρωτεϊνική δομή και λειτουργία (Slatter DA, et.al 1999). Επειδή είναι αλδεΐδες απελευθερώνονται στο αίμα όταν τα κύτταρα έχουν καταστραφεί από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, η MDA είναι ένα από τα πολλά προϊόντα που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. 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 μέσω μιας μη ενζυμικής αντίδραση 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. Έτσι, το MDA στον ορό έχει προταθεί ως ένας έμμεσος δείκτης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων λόγω του οξειδωτικού στρες (Dalle-Donne I., et.al, 2006). Ο Lorente και οι συνεργάτες του (Lorente, et.al, 2013), αναφέρουν αυξημένα επίπεδα μαλονοδιαλδεΐδης του ορού, σε ενήλικες με σοβαρή σήψη, ιδιαίτερα σε μη επιζώντες. Ενώ οι επιζώντες παρουσίασαν μείωση της μαλονοδιαλδεΐδης του ορού με την πάροδο του χρόνου, η αύξηση επήλθε στους μη επιζώντες. Συγκεκριμένα, στη μελέτη τους παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα MDA στον ορό σηπτικών ασθενών την 1^η, 4^η και 8^η ημέρα ($p < 0.001$) από την διάγνωση της ασθένειας. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει αυξημένο οξειδωτικό στρες στη σήψη και ειδικότερα, ότι τα λιπίδια της μεμβράνης στοχεύονται από ελεύθερες ρίζες. Στα ευρήματα που προκύπτουν από αυτήν την μελέτη ωστόσο, τα επίπεδα TBARS δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με την πάροδο του χρόνου. Για αυτό τον λόγο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την επικύρωση της χρησιμότητας της μαλονοδιαλδεΐδης ως προγνωστικός βιοδείκτης στη σήψη ώστε να καθορίσει ένα ρόλο για αντιοξειδωτική θεραπεία. Ωστόσο, τα επίπεδα TBARS ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με σήψη και σακχαρώδη διαβήτη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα.



Εικόνα 24. Επίπεδα MDA του ορού σε επιζώντες και μη ασθενείς με σήψη. Τα επίπεδα MDA του ορού είναι μεγαλύτερα στους σηπτικούς ασθενείς, την 1^η, 4^η και 8^η ημέρα. (Lorente et.al, 2013)

Η σοβαρή σήψη είναι ένα δύσκολο πρόβλημα στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) (Brealey D, et.al, 2002), καθότι μπορεί να οδηγήσει σε σηπτικό σοκ ή πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων. Οι πολύπλοκοι μηχανισμοί που οδηγούν σε σοβαρή σήψη παραμένουν ασαφείς. Στη σήψη, η συστηματική φλεγμονώδης απόκριση έναντι του παθογόνου είναι η κύρια παθοφυσιολογικά πρόκληση, παρά το παθογόνο το ίδιο. Σε μια συστηματική φλεγμονώδη απόκριση, και οι δύο τύποι κυττάρων, τα ενδοθηλιακά και τα ουδετερόφιλα, ενεργοποιούνται για να απελευθερώσουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Cowley HC, et.al, 1996). Φαίνεται ότι αυτές οι οξυρίζες παίζουν ρόλο στην πρόκληση ή την διάδοση του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS) σε απειλητικές για τη ζωή συνθήκες, και ότι η ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάσταση αντικατοπτρίζει τόσο το οξειδωτικό στρες όσο και τη βλάβη των ιστών (Alonso de Vega JM, et.al, 2002), (Alonso de Vega JM, et.al, 2000).

Μετρήσεις των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έδειξαν να παρέχουν έναν ολοκληρωμένο δείκτη, σε αντίθεση με την ξεχωριστή μέτρηση όλων

των αντιοξειδωτικών (Ghiselli A, et.al 2000). Θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η πραγματική αλλαγή στην αντιοξειδωτική κατάσταση σε ασθενείς με σοβαρή σήψη και μπορεί να οδηγήσει σε καθολικά χρήσιμη θεραπεία (Pinsky MR, et.al, 2003). Οι περισσότεροι πιστεύουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και τα χαμηλότερα επίπεδα των αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με SIRS ή σηπτική καταπληξία, οδηγούν σε ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων (Goode HF, et.al, 1995), (Leaver HA, et.al, 1995), (Motoyama T, et.al, 2003). Ωστόσο, τα επίπεδα της TAC του ορού, αυξάνονται σε χειρουργικούς ασθενείς με σηπτικό σοκ (Pascual C, et.al, 1998). Επιπλέον, η ενδογενής δυνατότητα εκκαθάρισης των περοξυλ-ριζών στο πλάσμα ασθενών με SIRS, βρέθηκε να είναι αυξημένη στους μη επιζώντες (Tsai K, et.al, 2000), (Bone RC, et.al, 1992), (Shiesh SC, et.al, 2000). Οι Chuang *et al*, έδειξαν ότι τα επίπεδα της TAC στον ορό αντανακλούν την κλινική σοβαρότητα της σήψης. Τα επίπεδα της TAC του ορού βρέθηκαν υψηλότερα στους μη επιζώντες σε σχέση με τους επιζώντες. Η πραγματική μεταβολή των επιπέδων της TAC στη σοβαρή σήψη παραμένει αμφιλεγόμενη. Πιθανολογείται ότι οι αντιφλεγμονώδεις διαδικασίες ενεργοποιούνται για να αντισταθμίσουν τα υπερβολικά επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών (van der Poll T, et.al, 1999) ή το οξειδωτικό στρες (Boveris A, et.al, 2002). Είναι επίσης πιθανό ότι μια αλλαγή στην αντιοξειδωτική άμυνα (π.χ. μια σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της TAC του ορού) τελικά οδηγεί σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και κακή έκβαση στους επιζώντες (Tsai K, et.al, 2000), (Bone RC, et.al, 1992), (Shiesh SC, et.al, 2000). 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 (MacKinnon KL, et.al, 1999). Επιπλέον, ο Pascual και οι συνεργάτες του (Pascual C, et.al, 1998) ανέφεραν ότι τα επίπεδα της TAC του πλάσματος ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με σήψη, αλλά υψηλότερα σε ασθενείς με σηπτικό σοκ σε σχέση με τα άτομα ελέγχου. Ο MacKinnon και οι συνεργάτες του (MacKinnon KL, et.al, 1999), 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 επιζώντες από ό, τι στους επιζώντες, και πιθανολογείται ότι η υψηλότερη συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση θα μπορούσε να αντανακλά τα υψηλότερα επίπεδα του ουρικού οξέος που προκαλούνται από τη νεφρική δυσλειτουργία. Επίσης, σύμφωνα με τα ευρήματα των Tsai et.al (Tsai K, et.al, 2000) τα επίπεδα της TAC στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερα στους μη

επιζώντες σε σχέση με τους επιζώντες. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες (Cowley HC, et.al, 1996), (Goode HF, et.al, 1995), (Dasgupta A, et.al, 1997), διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος στους μη επιζώντες ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη στους επιζώντες μεταξύ των ασθενών με σοβαρή σήψη. Η διαφορά στα ευρήματα από τις μελέτες αυτές μπορεί κυρίως να οφείλεται σε διαφορές στις μεθόδους μέτρησης καθώς και στη διαφορετική βαρύτητα της σήψης στους ασθενείς. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κυρίως για την αποτίμηση της TAC είναι, η φασματοφωτομετρική μέθοδος, και η μέθοδος TRAP. Επίσης, ο Ghiselli και οι συνεργάτες του, (Ghiselli A, et.al 2000) πρότειναν ότι το πλάσμα, αντί του ορού, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των επιπέδων της TAC, γιατί σε κάποιες μελέτες, φάνηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων TAC, τα οποία ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα και στον ορό. Στην συγκεκριμένη μελέτη, τα επίπεδα της TAC δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την πάροδο του χρόνου. Καθίσταται σαφές ότι πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες για την σχέση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την ασθένεια και την έκβαση της.

Η σοβαρή σήψη συνδέεται με μια βαθιά απώλεια των πρωτεϊνών του σώματος (Streat SJ, et.al ,1987), και αυτή η πρωτεόλυση παρεμβαίνει σε σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες (Windsor JA 1993), (Windsor JA, et.al, 1988), που μπορεί να καθυστερήσει την ανάρρωση του ασθενούς και την έξοδο του από το νοσοκομείο. Η σοβαρή σήψη συνδέεται με την πρόωμη οξείδωση των πρωτεϊνών (Winterbourn CC, et.al, 2000), και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που μπορεί να συμβάλουν στην δυσλειτουργία αναπνευστικών μυών (Supinski G., 1998). Οι καρβονυλικές ομάδες είναι παρούσες στις πρωτεΐνες σε φυσιολογικούς ιστούς σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Park Y. Et.al, 1991). Η οξείδωση 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 (Gladstone IM Jr, et.al, 1994). 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 (Blakeman DF, et.al 1995), (Reznick AZ, et.al, 1992). Στη μελέτη των Fikri M. et.al (Fikri M. Et.al, 2002), η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη στους σηπτικούς ασθενείς από ό,τι στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου καθ 'όλη τη διάρκεια της μελέτης. Αυξημένες συγκεντρώσεις, στο πλάσμα και στους ιστούς των πρωτεϊνικών καρβονυλίων,

συσχετίζονται με την σοβαρότητα της ασθένειας και την κλινική έκβαση, σε διάφορες ασθένειες σήψης και φλεγμονώδεις ασθένειες (Gladstone IM Jr, et.al, 1994), (Lih-Brody L, et.al, 1996), (Quinlan GJ, et.al 1994). Εντούτοις, στην συγκεκριμένη μελέτη δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των καρβονυλίων. Αυτό ίσως να οφείλεται, πιθανότατα, στην προσπάθεια αντιμετώπισης της κατάστασης των ασθενών στην ΜΕΘ καθώς και στο ότι οι ασθενείς δεν παρουσίασαν βαριά σήψη όπως φαίνεται από το δείκτη APACHE.

Για δεκαετίες, η παρατηρούμενη προ-φλεγμονώδης απόκριση, χαρακτηριστική της πρόωρης σήψης, πιστεύεται ότι ήταν η κύρια αιτία της βλάβης των οργάνων, αλλά, μέχρι σήμερα, οι δοκιμές αντιφλεγμονωδών παραγόντων έχουν σταθερά αρνητικά αποτελέσματα, σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Οι Lorente και οι συνεργάτες του προτείνουν, ότι οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εξετάσουν εάν βιοδείκτες μπορούν να εντοπίσουν ασθενείς με αυξημένο οξειδωτικό στρες που μπορεί να αποκομίσουν το μέγιστο όφελος από τη θεραπεία με αντιοξειδωτικά, στη σήψη. Ομοίως, η χρήση αντιοξειδωτικής θεραπείας στη σήψη παραμένει μια ελκυστική, αλλά αναπόδεικτη στρατηγική. Ενώ τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα με βιταμίνη Ε, σελήνιο, Ν-ακετυλοκυστεΐνη, και άλλες ενώσεις μπορούν να μειώσουν το οξειδωτικό στρες, οι κλινικές μελέτες έχουν αποτύχει να αποδείξουν με πειστικό τρόπο ένα ωφέλιμο αποτέλεσμα. Τα αντιοξειδωτικά τα οποία, στοχεύουν στα μιτοχόνδρια, σε πρωτεύουσα θέση παραγωγής των ROS/RNS, έχουν φανεί υποσχόμενα σε προκλινικές μελέτες (Lorente, et.al, 2013).

Συνοπτικά, στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα της TAC, των TBARS και των καρβονυλίων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την πάροδο του χρόνου κατά τη νοσηλεία σε ασθενείς με σήψη και σακχαρώδη διαβήτη. Σε μια περαιτέρω σύγκριση με τιμές φυσιολογικών ατόμων, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με SIRS και σακχαρώδη διαβήτη, κατά την 1^η ημέρα νοσηλείας στην ΜΕΘ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα TBARS (61,34%) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες δεν εμφάνισαν στατιστική σημαντική διαφορά. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με τη μεταβολή των δεικτών οξειδωτικού στρες με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς με σήψη, συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και σακχαρώδη διαβήτη. Πιθανόν το αποτέλεσμα να οφείλεται στο μικρό αριθμό ασθενών ή στην χαμηλή βαρύτητα της σήψης στους ασθενείς του δείγματος. Καθώς τα

αποτελέσματα δεν δείχνουν τάση συσχέτισης, θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham E. **Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure**, *J Infect Dis*. 2003 Jun 15;187 Suppl 2:S364-9.
- Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF: **Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome**. *Crit Care Med* 2002, **30**:1782-1786.
- Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF: **Plasma redox status relates to severity in critically ill patients**. *Crit Care Med* 2000, **28**:1812-1814.
- Andrés Esteban, Niall D. Ferguson, Maureen O. Meade, Fernando Frutos-Vivar, Carlos Apezteguía, Laurent Brochard, Konstantinos Raymondos, Nicolas Nin, Javier Hurtado, Vinko Tomcic, Marco González, José Elizalde, Peter Nightingale, Fekri Abroug, Paolo Pelosi, Yaseen Arabi, Rui Moreno, Manuel Jibaja, Gabriel D'Empaire, Fredi Sandi, Dimitros Matamis, Ana María Montañez, and Antonio Anzueto "**Evolution of Mechanical Ventilation in Response to Clinical Research**", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 177, No. 2 (2008), pp. 170-177.
- [Andrew Lever](#), professor of infectious diseases and honorary consultant physician and [Iain Mackenzie](#), consultant in intensive care medicine and anesthesia . *BMJ. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis*, Oct 27, 2007; 335(7625): 879–883
- Άννα Δάλλα. 7 ερωτήσεις για την... ινσουλίνη στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al. **Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study**. *Intensive Care Med* 2002;28:108–21.
- Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Cicoira M, Shamim W, Kemp M, et al.: **Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging**. *Circulation* 2003, **107**:1991-1997.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, et al. **Sepsis: update on pathophysiology, diagnostics and therapy**. *Anaesthesist* 2006;55:835–45
- Baudouin-Cornu P., Thomas D. 2007. **Evolutionary biology: oxygen at life's boundaries**. *Nature* 445, 35–36
- Blakeman DP, Ryan TP, Jolly RA, Petry TW. **Diquatdependent protein carbonyl formation. Identification of lipid dependent and lipid independent pathways**. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 929–935
- Burkinshaw L, Morgan DB, Silverton NP, Thomas RD. **Total body nitrogen and its relation to body potassium and the fat-free mass in healthy subjects**. *Clin Sci* 1981; 61: 457–462.

- Boveris A, Alvarez S, Navarro A: **The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock.** *Free Rad Biol Med* 2002, 33:1186-1193
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **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, 101:1644-1655.
- Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA *Crit Care Med.* 1989 May; 17(5):389-93), **Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group.**
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ **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.** 1992 Jun; 101(6):1644-55.
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. **The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.** *Chest* 1992;101:1481-3.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer ML: **Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock.** *Lancet* 2002, 360:219-223.
- Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK: **Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors.** *Crit Care Med* 1996, 24:1179-1183.
- Craig N. Morrell **Reactive Oxygen Species Finding the Right Balance** [Circ Res. Sep 12, 2008; 103\(6\): 571-572](#)
- Chia-Chang Chuang, Shu-Chu Shiesh, Chih-Hsien Chi, Yi-Fang Tu, Lien-I Hor, ChiChang Shieh and Ming-Feng Chen. **Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis.** *Critical Care* 2006
- Dasgupta A, Malhotra D, Levy H, Marcadis D, Blackwell W, Johnston D: **Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients.** *Life Sciences* 1997, 60:335-340.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A: **Biomarkers of oxidative damage in human disease.** *Clin Chem* 2006, 52:601-623.
- [David F. Stowe](#) and [Amadou K. S. Camara](#) **Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function,** *Antioxid Redox Signal.* Jun 2009; 11(6): 1373-1414.
- [Deborah J. Stearns-Kurosawa](#), [Marcin F. Osuchowski](#), [Catherine Valentine](#), [Shinichiro Kurosawa](#), and [Daniel G. Remick](#) **The Pathogenesis of Sepsis** , [Annu Rev Pathol.](#) 2011; 6: 19-48.

- *Derek S. Wheeler Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis, Oct 2011*
- *[Diana Mühl](#), [Gábor Woth](#), [Livia Drenkovics](#), [Adrienn Varga](#), [Subhamay Ghosh](#), [Csaba Csontos](#), [Lajos Bogár](#), [György Wéber](#), [János Lantos](#) Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury , Indian Journal of Medical Research, 2011*
- *Diabetes and Sepsis: Preclinical Findings and Clinical Relevance. Philipp Schuetz, MD, Pedro Castro, MD, PHD, and Nathan I. Shapiro, MD, MPH*
- *Diabetic Patients with Severe Sepsis Admitted to Intensive Care Unit Do Not Fare Worse than Non-Diabetic Patients: A Nationwide Population-Based Cohort Study. Cheng-Wei Chang , Victor C. Kok , Ta-Chien Tseng, Jorng-Tzong Horng, Chun-Eng Liu*
- *Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. 1998. Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:12637–12640*
- *[Dongping Liu](#) and [Yang Xu](#) p53, Oxidative Stress, and Aging, Antioxid Redox Signal. Sep 15, 2011; 15(6): 1669–1678.*
- *Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. Intensive Care Med 2007;33:606–18.*
- *Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C: Risk and the efficacy of anti-inflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2002, 166:1197-1205.*
- *Federman DDN Engl J Med The biology of human sex differences, 2006 Apr 6; 354(14):1507-14.*
- *Fikri M. Abu-Zidan, Lindsay D. Plank and John. A. Windsor. Proteolysis in Severe Sepsis is Related to Oxidation of Plasma Protein. Taylor and Franks, 2002.*
- *Finfer S, Bellomo R, Lipman J, et al. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. Intensive Care Med 2004;30:589–96.*
- *Galley HF: Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. Crit Care 2010, 14:230.*
- *Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Rad Biol Med 2000, 29:1106-1114.*
- *Gladstone IM Jr, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. Pediatrics 1994; 93: 764–768.*

- Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR: **Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction.** *Crit Care Med* 1995, **23**:646-651.
- Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM. *The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database.* *Crit Care* 2006;**10**:R42.
- Hess M.L., Manson N.H **Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury.**1984 (November)*J. Mol. Cell. Cardiol.* 16(11):969–985.
- **Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΗΨΗ.** Λεωνίδα Α. Λεωνίδου ιατρού ειδικού παθολόγου, Χαράλαμπος Α. Γώγος, Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Επιβλέπων καθηγητής, Βενετσάνα Ε. Κυριαζοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Πατρών, Αγαθοκλής Ψυρρόγιαννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Πατρών.
- Η ινσουλίνη με απλά λόγια. Τι πρέπει να γνωρίζουν οι διαβητικοί. Ηλίας Σιακαβέλλας ιατρός παθολόγος.
- Indian Heart Association Why South Asians Facts Web. May 8, 2015.<http://indianheartassociation.org/why-indians-why-south-asians/overview/>
- Ischiropoulos H, Beckman JS: *Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?* *J Clin Invest* 2003, **111**:163–169.
- John W Baynes and Marek H Dominiczak, 2012 **Medical Biochemistry**, chapter *The beneficial effects of reactive oxygen species*)
- Jones A.E., Puskarich M.A., 2009. **Sepsis - Induced Tissue Hypoper fusion.** *Critical Care Clinics*, **25**, pp. 769–779.
- Jones DP. **Redefining oxidative stress.***Antioxid Redox Signal.* 2006 **8**:1865–1879.
- [Kendra N. Iskander, Marcin F. Osuchowski, Deborah J. Stearns-Kurosawa, Shinichiro Kurosawa, David Stepien, Catherine Valentine, and Daniel G. Remick](#) **Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding** *Physiol Rev.* Jul 2013; **93**(3): 1247–1288.
- [Konrad Reinhart, Michael Bauer, Niels C. Riedemann, and Christiane S. Hartog](#) 2012 **New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers**
- Kumar, Anand MD; Roberts, Daniel MD; Wood, Kenneth E. DO; Light, Bruce MD; Parrillo, Joseph E. MD; Sharma, Satendra MD; Suppes, Robert BSc; Feinstein, Daniel MD; Zanotti, Sergio MD; Taiberg, Leo MD; Gurka, David MD; Kumar, Aseem PhD; Cheang, Mary MSc **Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the**

*critical determinant of survival in human septic shock** , © 2006 Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 34(6), June 2006, pp 1589-1596

➤ Leaver HA, Yap PL, Rogers P, Wright I, Smith G, Williams PE, France AJ, Craig SR, Walker WS, Prescott RJ: **Peroxides in human leukocytes in acute septic shock: a preliminary study of acute phase changes and mortality.** *Eur J Clin Invest* 1995, **25**:777-783.

➤ [Lee P. Skrupky](#), Pharm.D., B.C.P.S., [Paul W. Kerby](#), M.B B.S., and [Richard S. Hotchkiss](#), M.D, **Advances in the Management of Sepsis and in the Understanding of Key Immunologic Defects of the Disorder** *Anesthesiology*. Dec 2011; **115**(6): 1349–1362.

➤ [Leigh Boardman](#), [John S. Terblanche](#), [Stefan K. Hetz](#), [Elrike Marais](#) and [Steven L. Chown](#) **Reactive oxygen species production and discontinuous gas exchange in insects** , 24 Aug 2011

➤ Leonardo Lorente, corresponding author, María M Martín, Pedro Abreu-González, Alberto Domínguez-Rodríguez, Lorenzo Labarta, César Díaz, Jordi Solé-Violán, José Ferreres, Judith Cabrera, Jose Carlos Igeño, and Alejandro Jiménez. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Critical care* 2013.

➤ Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–6.

➤ Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD: Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 1995, **18**:153-158.

➤ Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; **41**: 2078–2086

➤ Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez A, Labarta L, Díaz C, Solé-Violán J, Ferreres J, Cabrera J, Igeño JC, Jiménez A: Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Crit Care* 2013, **17**:R290

➤ MacKinnon KL, Molnar Z, Lowe D, Watson ID, Shearer E: **Measures of total free radical activity in critically ill patients.** *Clin Biochem* 1999, **32**:263-268.

➤ [Marshall JC](#). **SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care?** , 2000 Dec, **14**(6):586-9.

➤ Martin G, Brunkhorst FM, Janes JM, Reinhart K, Sundin DP, Garnett K, Beale R **The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes.** *Crit Care*. 2009; **13**(3):R103.

➤ Martin GS, Mannino DM, Moss M **The effect of age on the development and outcome of adult sepsis** *Crit Care Med*. 2006 Jan, **34**(1):15-21.

- *Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546–54.*
- *Martin CM, Priestap F, Fisher H, et al. A prospective, observational registry of patients with severe sepsis: the Canadian Sepsis Treatment and Response Registry. Crit Care Med 2009;37:81–8.*
- *McCue JD Antibiotic use in the elderly: issues and nonissues Clin Infect Dis. 1999 Apr; 28(4):750-2.*
- *Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci (Lond) 1993, 84:407-412.*
- *Mosby's Medical Dictionary, 8th edition. Elsevier. 2009.*
- *Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H: Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med 2003, 31:1048-1052.*
- *Murphy MP: How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 2009, 417:1–13.*
- *Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, Reinhart K: Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. Crit Care Med 1998, 26:705-709.*
- *Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, et al. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. Crit Care Med 2003;31:2332–8.*
- *Pinsky MR: Antioxidant therapy for severe sepsis: promise and perspective. Crit Care Med 2003, 31:2697-2698.*
- *Πρόληψη και νεώτερες μέθοδοι αντιμετώπισης του διαβήτη τύπου 1. Τσαντάκης Στέφανος, Φραγκιαδάκης Γεώργιος Α.*
- *Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. Free Radic Res 1994; 20: 289–298.*
- *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition. (8th ed.). Philadelphia, Pa: Elsevier. 2009.*
- *Ronan M. G. Berg, Kirsten Moller and Damian M.Bailey, Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis, July 2011 J Cereb Blood Flow Metab 31(7): 1532–1544.*
- *Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). Ger Med Sci 2010;8. <http://dx.doi.org/10.3205/000103>.*

- Reznick AZ, Cross CE, Hu M-L et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J* 1992; 286: 607– 611.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008.
- Σακχαρώδης διαβήτης. Ελληνική ενδοκρινολογική εταιρία.
- Stanley Finger; François Boller; Kenneth L. Tyler (2010). [Handbook of Clinical Neurology](#). North-Holland Publishing Company. p. 401
- Schoenberg MH, Weiss M, Radermacher P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:44–8.
- Schottmueller H. 1914, **Wesen und Behandlung der Sepsis**. *Inn. Med* 31:257–280
- [Scott K. Powers](#) and Malcolm J. Jackson **Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production** *Physiol Rev*. Jul 23, 2010. [Physiol Rev](#). Oct 2008; 88(4): 1243–1276.
- Scott L Weiss and Clifford S Deutschman. Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about? *Critical Care* 19 Mar 2014.
- Shiesh SC, Chen CY, Lin XZ, Liu ZA, Tsao HC: **Melatonin prevents pigment gallstone formation induced by bile duct ligation in guinea pigs**. *Hepatology* 2000, 32:455-460
- Sies H. **Oxidative Stress**. 1985 London Academic.
- Slatter DA, Paul RG, Murray M, Bailey AJ: Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem* 1999, 274:19661–19669.
- Spink WW., **1978 Infectious diseases. Prevention and treatment in the nineteenth and twentieth centuries**. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN
- Siegel S, Castellan Jr. *Nonparametric statistics for behavioral sciences*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1988.
- Streat SJ, Beddoe AH, Hill GL. Aggressive nutritional support does not prevent protein loss despite fat gain in septic intensive care patients. *J Trauma* 1987; 27: 262–266.
- Supinski G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem* 1998; 179: 99–110.
- [Stuart G. Jarrett](#) and [Michael E. Boulton](#) **CONSEQUENCES OF OXIDATIVE STRESS IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION**, [Mol Aspects Med](#). Aug 2012; 33(4): 399–417.

- *Teng RJ, Ye YZ, Parks DA, Beckman JS: Urate produced during hypoxia protects heart proteins from peroxynitrite-mediated protein nitration. Free Rad Biol Med 2002, 33:1243-1249.*
- *The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. G. C. K. W. Koh, S. J. Peacock, T. van der Poll, and W. J. Wiersinga.*
- *Tsai K, Hsu TG, Kong CW, Lin K, Lu F: Is the endogenous peroxy-radical scavenging capacity of plasma protective in systemic inflammatory disorders in humans? Free Rad Biol Med 2000, 28:926-933.*
- *van der Poll T, van Deventer SJ: Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. Infect Dis Clin North Am 1999, 13:413-426.*
- *Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med 2006;34:344-53.*
- *von Dessauer B, Bongain J, Molina V, Quilodran J, Castillo R, Rodrigo R: Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. J Crit Care 2011, 26:103.e101-e107.*
- *Weiss SL, Deutschman CS. Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about? Crit Care. 2014 Mar 19;18(2):125.*
- *WHO. "The top 10 causes of death".*
- *Whitehead TP, Thorpe GHG, Maxwell SRJ: Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. Analytica Chimica Acta 1992, 266:265-277.*
- *Wilmore DW. Does loss of body protein determine outcome in patients who are critically ill? Ann Surg 1998; 228: 143-145.*
- *Windsor JA. Underweight patients and the risks of major surgery. World J Surg 1993; 17: 165-172.*
- *Windsor JA, Hill GL. Risk factors for postoperative pneumonia. The importance of protein depletion. Ann Surg 1988, 208: 209-214.*
- *Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med. 1997 Jan; 25(1):106-10.*