



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΗΝ ΝΟΣΟ ΑΛΖΧΕΙΜΕΡ”



Μπλόντζου Νικολέττα του Αργυρίου

Λάρισα, Φεβρουάριος 2022



DIPLOMA THESIS

“ASSESSMENT OF REDOX STATUS MARKERS IN SAMPLES OF PATIENTS WITH ALZHEIMER DISEASE”



Nikoletta Blontzou

Larisa, February 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Δρ. Κουρέτας Δημήτριος(επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών- Τοξικολογίας(Διευθυντής εργαστηρίου) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- Δρ. Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών -Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- Δρ. Βεσκούκης Αριστείδης: Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών , του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας κ. Κουρέτα Δημήτριο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους στάθηκαν στο πλευρό μου κατά την υλοποίηση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Κουρέτα, επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προκειμένου να αναλάβω την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του, καθώς και την αρωγή του καθ'όλη την πορεία.

Θα ήθελα, στη συνέχεια, να ευχαριστήσω τον κύριο Στάγκο και τον κύριο Βεσκούκη που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο, την υποψήφια διδάκτορα Ζωή – Βασιλική Σκαπέρδα, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συμπαράσταση της κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, τόσο για το φιλικό και συνεργατικό τους πνεύμα καθ'όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο, όσο και για την προθυμία τους να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την συμπαράσταση τους κατά την διάρκεια περάτωσης των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.1.2 Παραγωγή των ελευθέρων ριζών	14
1.1.3 Θετικές και Αρνητικές Επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών	19
1.1.4 Οξειδωτικό στρες.....	21
1.1.5 Οξειδωτικό στρες και νευρολογικές διαταραχές.....	21
1.2 Νόσος Αλτσχάιμερ.....	22
1.2.1 Alois Alzheimer.....	23
1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ	27
1.2.3 Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ.....	29
1.2.4 Στάδια εξέλιξης της νόσου Αλτσχάιμερ	30
1.2.5 Συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ.....	31
1.2.6 Αιτιολογικές υποθέσεις για τη νόσο Αλτσχάιμερ	33
1.2.6.1 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau.....	33
1.2.6.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς.....	33
1.2.6.3 Υπόθεση των χολινεργικών νευρώνων.....	34
1.2.6.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες	34
1.3 Το οξειδωτικό στρες στη νόσο Αλτσχάιμερ	34

1.3.1 Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου	35
1.3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ROS και Αβ πεπτιδίων	36
1.3.3 Οξειδωτικό στρες και καταστροφή των συνάψεων	37
1.3.4 Οξείδωση λιπιδίων στη νόσο Αλτσχάιμερ.....	38
1.3.5 Οξείδωση DNA στη νόσο Αλτσχάιμερ	39
1.3.6 Οξείδωση πρωτεϊνών στη νόσο Αλτσχάιμερ	39
1.3.7 Μηχανισμοί άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες	40
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	45
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
3.1 Γενικά.....	46
3.2 Μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).....	46
3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC).....	49
3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS).....	51
3.5 Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power Assay).....	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Alzheimer (Alzheimer's disease-AD) είναι μια καταστροφική νευροεκφυλιστική διαταραχή χωρίς θεραπεία. Οι περισσότερες περιπτώσεις AD είναι σποραδικές με την ηλικία να αντιπροσωπεύει τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου. Η έλλειψη κατανόησης του μηχανισμού της νόσου εμποδίζει την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η απώλεια των συνάψεων στις πληγείσες περιοχές του εγκεφάλου συσχετίζεται καλύτερα με τη βλάβη της γνωστικής λειτουργίας σε ασθενείς με AD και έχει θεωρηθεί ως ο πρώιμος μηχανισμός που προηγείται της νευρωνικής απώλειας. Το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση και στην εξέλιξη πολλαπλών νευροεκφυλιστικών νόσων συμπεριλαμβανομένης και της AD. Αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) που σχετίζονται με απώλεια λειτουργίας των μιτοχονδρίων εξαρτώμενων από την ηλικία και την ασθένεια, η αλλοιωμένη ομοιοστάση των μετάλλων και η μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα επηρεάζουν άμεσα τη συναπτική δραστηριότητα και τη νευροδιαβίβαση σε νευρώνες που οδηγεί σε γνωστική δυσλειτουργία. Επιπλέον, μόρια-στόχοι που επηρεάζονται από τις ROS περιλαμβάνουν πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, ομοιοστάση ασβεστίου, μιτοχονδριακή δυναμική και λειτουργία, κυτταρική αρχιτεκτονική, διακίνηση υποδοχέων και ενδοκυττάρωση, και ενεργειακή ομοιοστάση. Ο μη φυσιολογικός κυτταρικός μεταβολισμός με τη σειρά του θα μπορούσε να επηρεάσει την παραγωγή και τη συσσώρευση αμυλοειδούς (A) και υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau, η οποία ανεξάρτητα θα μπορούσε να επιδεινώσει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την παραγωγή ROS, συμβάλλοντας έτσι σε έναν φαύλο κύκλο. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) ως βασικός δείκτης συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) ως δείκτης για την υπεροξείδωση των λιπιδίων και η αναγωγική ισχύς (R.P) ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από 94 άτομα με

υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου και για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) των ατόμων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ ENY και ορού. Χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson r , (παραμετρικός) στατιστικός δείκτης προκειμένου να αξιολογηθεί εάν υπάρχει συνάφεια μεταξύ των δύο μεταβλητών (ENY και ορού). Ουσιαστικά στα αποτελέσματα δεν βρέθηκε κάτι στατιστικά σημαντικό ($p \geq 0.05$), άρα η συσχέτιση των δύο , του ορού και του ENY δεν δείχνει κάποια σύνδεση μεταξύ τους.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disorder without treatment. Most cases of AD are sporadic with age representing the highest risk factor. Lack of understanding of the mechanism of the disease hinders the development of effective therapeutic approaches. Loss of synapses in the affected areas of the brain is best correlated with cognitive impairment in patients with AD and has been thought to be the early mechanism that precedes neuronal loss. Oxidative stress has been identified as a contributing factor to aging and the development of multiple neurodegenerative diseases including AD. Increased production of reactive oxygen species (ROS) associated with age- and disease-dependent mitochondrial dysfunction, impaired metal homeostasis, and decreased antioxidant defenses directly affect synaptic activity and neurotransmission leading to neurotransmission cognitive dysfunction. In addition, target molecules affected by ROS include nuclear and mitochondrial DNA, lipids, proteins, calcium homeostasis, mitochondrial dynamics and function, cellular architecture, receptor circulation and endocytosis, and energy homeostasis. Abnormal cellular metabolism could in turn affect the production and accumulation of amyloid (A) and hyperphosphorylated Tau protein, which in turn could exacerbate mitochondrial dysfunction and ROS production, thus contributing to a vicious cycle. The aim of this study was to evaluate redox markers in samples of individuals at high risk of developing Alzheimer's disease. The indicators studied were total antioxidant capacity (TAC) as a baseline indicator of total antioxidant capacity, reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactants (TBARS) as an indicator for lipid peroxidation (RP) as an indicator of antioxidant capacity. The samples were collected from 94 individuals at high risk of developing the disease and the cerebrospinal fluid (CSF) of the subjects was used for the experiments. In this case, the correlation between CSF and serum was studied. The Pearson correlation coefficient r , (parametric) statistical

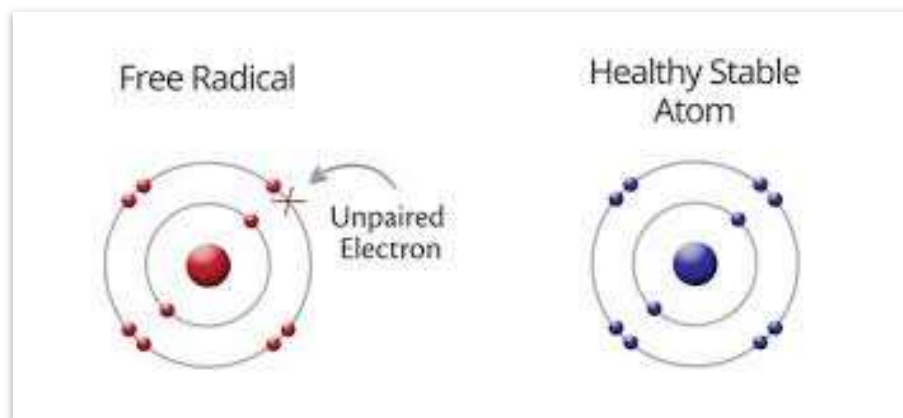
index was used to assess whether there is a correlation between the two variables (CSF and serum). In fact, nothing statistically significant was found in the results ($p \geq 0.05$), so the correlation of the two, serum and CSF, does not show any connection between them.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Σε κάθε τροχιακό υπάρχει η δυνατότητα να συνυπάρχουν δύο ηλεκτρόνια, τα οποία λειτουργούν ως ζεύγος και περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους σε αντίθετες κατευθύνσεις (αντιπαράλληλα spin).

Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα το μόριο να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το άτομο γίνεται ασταθές - σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση - και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα.



Εικόνα 1 : Απεικόνιση ενός υγιούς σταθερού μορίου(δεξιά) και ενός ασταθούς μορίου (αριστερά). Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας

Ως **ελεύθερη ρίζα** χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Κύρια

χαρακτηριστικά των ελευθέρων ριζών είναι η μεγάλη αστάθεια και η υψηλή δραστικότητα εξαιτίας της τάσης που παρουσιάζουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια να συζεύγνυνται με ηλεκτρόνια που δανείζονται από άλλα άτομα μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες. Με τη σειρά τους, τα μόρια αυτά που χάνουν το ηλεκτρόνιο τους από την ελεύθερη ρίζα, αποσπούν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια πυροδοτώντας μία αλυσιδωτή αντίδραση με δυσμενείς συνέπειες σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές δομές (πρωτεΐνες, κυτταρική μεμβράνη, DNA). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο.

Πρώτος ο Denham Harman το 1956 πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και αργότερα έθεσε ως αξίωμα ότι αυτά τα συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες νευροεκφυλιστικές και φλεγμονώδεις ασθένειες, στον σακχαρώδη διαβήτη καθώς και στη πρόωρη γήρανση, μέσω πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό και μιτοχονδριακό DNA.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του μεταβολισμού. Απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, τα οποία αποτελούν για το κύτταρο, το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας. Στα κυτταρικά αυτά οργανίδια λαμβάνει χώρα η οξειδωση των τροφών.

Διακρίνονται 4 τύποι ελευθέρων ριζών ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο: Οι δραστικές μορφές με κέντρο (α) το οξυγόνο (Reactive oxygen species, ROS), (β) το άζωτο (Reactive nitrogen species, RNS), (γ) το θείο ή (δ) το χλώριο (*Halliwell and Gutteridge 2007*). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται και μη ρίζες, οι οποίες μπορούν δυνητικά να είναι εξίσου ή και περισσότερο δραστικές.

Η σημαντικότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς είναι εκείνη που έχει σαν κεντρικό τους άτομο το οξυγόνο. Ωστόσο υπάρχουν και κάποιες ενώσεις του οξυγόνου, όπως το μοριακό οξυγόνο (O_2) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι οποίες αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες συμπεριφέρονται όπως αυτές, επειδή χημικά είναι πολύ δραστικές και μπορούν και αυτές να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

Πιο συγκεκριμένα, το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Επειδή τα δύο αυτά ασύζευκτα ηλεκτρόνια έχουν την ίδια στροφορμή, το μοριακό οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα μόνο ηλεκτρόνιο κάθε φορά, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η δραστηκότητά του. Η μορφή αυτή του O_2 ονομάζεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (triplet state), συμβολίζεται με $3O_2$ και δεν είναι ιδιαίτερα δραστηκή. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, εάν ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια διεγερθεί και αλλάξει στροφορμή, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστηκή αυτή μορφή οξυγόνου που προκύπτει ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (single state) και συμβολίζεται με O_2 . Αν και η μορφή αυτή του οξυγόνου δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, είναι πολύ δραστηκά και ως εκ τούτου μπορούν να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστηκό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) (Halliwell, 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται **δραστηκά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ)** (Gutteridge, 1995).

Δραστηκές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS)

Οι δραστηκές μορφές οξυγόνου(ROS) αναφέρονται σε ενεργές χημικές ουσίες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο και έχουν τόσο καταστρεπτική όσο και ευεργετική δράση για τον οργανισμό.

Υπάρχουν πολλοί τύποι ROS στο σώμα. Ιδιαίτερα βλαβεροί τύποι ROS είναι οι παρακάτω :

- **Η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2)**, το οποίο δεν αποτελεί ρίζα αλλά θεωρείται ενεργή μορφή οξυγόνου και μπορεί δυνητικά να μετατρέπεται σε μια πολύ δραστική ρίζα, τη ρίζα υδροξυλίου, που είναι μια από τις πιο ισχυρές ρίζες ενδογενώς παραγόμενες και μπορεί να προσβάλλει όλα τα μόρια του σώματος όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιποειδή και DNA.
- **Η ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$)** έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (10-9s) και γι' αυτό όταν παράγεται δρα κοντά στο χώρο σχηματισμού της, αποσπώντας γρήγορα ηλεκτρόνια από τα γύρω μόρια. Μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών.
- **Η ρίζα περοξυλίου($ROO\cdot$)** προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, να προκαλέσει τη λύση του κυττάρου και την απελευθέρωση του περιεχομένου του.
- **Το μονήρες οξυγόνο(1O_2)** δεν αποτελεί ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.

<u>ΑΜΟ</u>	<u>Μοριακός τύπος</u>
Ανιόν σουπεροξειδίου	O_2^-
Υδρουπεροξειδική ρίζα	$HOO\cdot$
Ρίζα υδροξυλίου	$OH\cdot$
Ρίζα Αλκοξειδίου	$RO\cdot$
Ρίζα υπεροξειδίου	$ROO\cdot$
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2
Οργανικά υδρουπεροξειδία	$ROOH$
Μονήρες οξυγόνο	1O_2
Οξόν	O^3
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$
Περοξυνιτρώδες	$ONOO^-$

Πίνακας 1 : Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) έχουν τόσο ευεργετικές όσο και επιβλαβείς επιδράσεις στον οργανισμό. Συγκεκριμένα, οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις. Οι ROS χρησιμεύουν ως μόρια σηματοδότησης που ρυθμίζουν βιολογικές και φυσιολογικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση των οδών σηματοδότησης, η έκφραση γονιδίων και η απόπτωση.

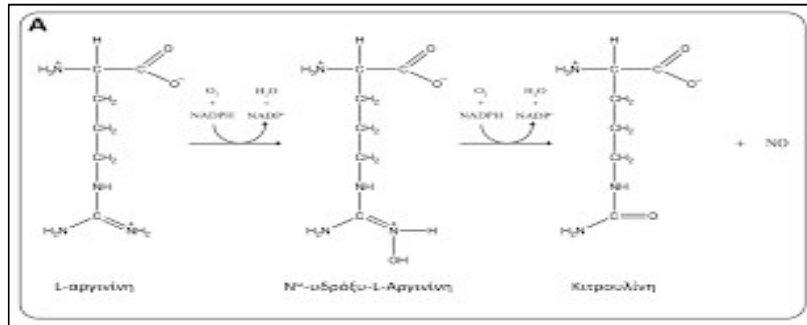
Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις οι δραστικές μορφές οξυγόνου αντιδρούν εύκολα με όλους σχεδόν τους τύπους βιολογικών μορίων όπως: πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα, επάγοντας συνήθως μη αναστρέψιμες λειτουργικές μεταβολές ή ακόμα και πλήρη καταστροφή. Έτσι, προκαλείται βλάβη σε πολλά κυτταρικά και εξωκυτταρικά συστατικά.

Δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species - RNS)

Ορίζονται ως δραστικές μορφές με κεντρικό άτομο το άζωτο. Ωστόσο λόγω της παρουσίας οξυγόνου θα μπορούσαν να καλύπτονται μαζί με τις Δραστικές Μορφές Οξυγόνου από τον όρο “Δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Αζώτου” (ΔΜΟ/ΔΜΑ).

Παραδείγματα ενεργών μορφών αζώτου αποτελούν :

➤ **το μονοξειδίου του αζώτου (NO)** το οποίο αποτελεί και την κυριότερη δραστική μορφή αζώτου, όπου συντίθεται κατά την αντίδραση οξείδωσης της L- αργινίνης προς κιτρουλλίνη, που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του NO (NOSs). Έχει μικρή οξειδωτική ικανότητα και είναι ένα σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών και σε μεγάλες συγκεντρώσεις καθώς μπορεί να μετατραπεί σε άλλες ενεργές μορφές αζώτου.



Εικόνα 2: Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO)

➤ **το ανιόν υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻)** το οποίο αποτελεί την πιο δραστική ρίζα αζώτου καθώς είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και έχει τη δυνατότητα να διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και να αντιδρά με βιομόρια όπως πρωτεΐνες καταστρέφοντας ή τροποποιώντας τη λειτουργία τους, καθώς και με το CO₂ παράγοντας ασταθή προϊόντα.

1.1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες.

Ενδογενείς Πηγές Ελευθέρων Ριζών

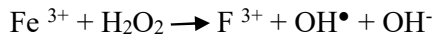
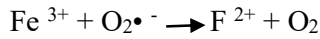
Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν εκείνες που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργώντας μέσα στο κύτταρο και εκείνες που σχηματίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή.

Οι βασικές ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών είναι οι εξής:

I. Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ATP που συνθέτουν οι περισσότεροι οργανισμοί, λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και περιέχονται όλα τα ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αμινοξέων, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος. Περιλαμβάνει αναγωγή του O₂ σε H₂O με ηλεκτρόνια που προκύπτουν από το NADH και το FADH₂. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή

της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2\cdot^-$ και H_2O_2 . Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2\cdot^-$ (Chance et al., 1979). Το $O_2\cdot^-$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2\cdot^-$ και στο H_2O_2 δημιουργείται $OH\cdot$

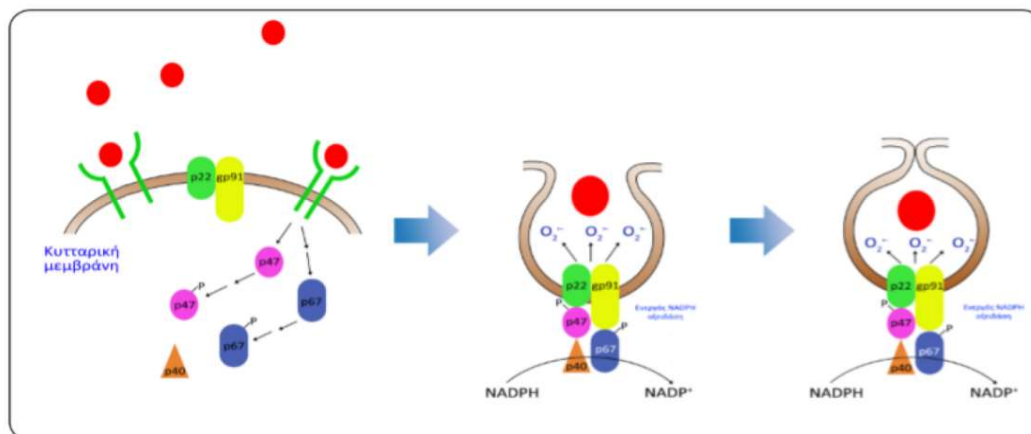


Όπως προκύπτει, κατά την αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες, επικίνδυνες για τα κύτταρα καθώς προκαλούν βλάβες στα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους.

I. Φαγοκυττάρωση

Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα έχουν την ικανότητα όταν διεγείρονται να αυξάνουν τη κατανάλωση του οξυγόνου (~100 φορές) και να παράγουν μεγάλες ποσότητες O_2^- . Το παραγόμενο O_2^- προέρχεται από την αναγωγή του O_2 με ένα μονό ηλεκτρόνιο. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο, που ονομάζεται “NADPH οξειδάση” και εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων. Το σύμπλοκο “NADPH οξειδάση” χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικό-δινουκλεοτίδιο (NADPH), αποτελώντας τον δότη ηλεκτρονίων. Η ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού επάγεται από την πρόσδεση διαφόρων ουσιών σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων, τους TLR (toll-like receptors). Το γεγονός αυτό πυροδοτεί μια σειρά σηματοδοτικών αντιδράσεων εκ των οποίων η φωσφορύλιωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών p47 και p67, η μεταφορά τους στη μεμβράνη και η πρόσδεσή τους με τις πρωτεΐνες p40, p22 και gp91 για την δημιουργία της ενεργοποιημένης μορφής της “NADPH οξειδάσης” (Babior, 1999). Ταυτόχρονα δημιουργείται μια εγκόλπωση παγιδεύοντας την ξένη ουσία και σχηματίζοντας ένα

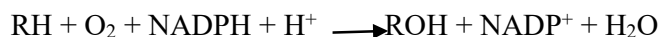
κυστίδιο. Οι μεγάλες ποσότητες O_2^- που παράγονται από την ενεργοποιημένη NADPH οξειδάση στοχεύουν την καταστροφή της ξένης αυτής ουσίας. (Σχήμα).



Σχήμα 1: Σχηματισμός O_2^- από διεγερμένα φαγοκύτταρα

II. Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό. Τα ένζυμα του συστήματος P450 αποτελούνται από αιμοπρωτεΐνες και βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, με μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Κύριος μηχανισμός λειτουργίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο (O_2), οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα (δηλαδή το ξενοβιοτικό - RH) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

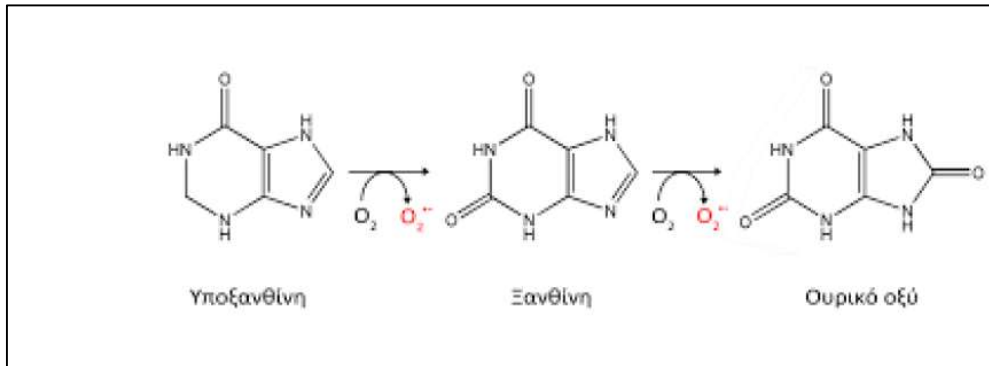


Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, κάποιες φορές όμως η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει σε τοξικές και καρκινογόνες ουσίες.

III. Οξείδωση της ξανθίνης (XO)

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξείδωση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kurppusamy and Zweier, 1989). Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης είναι μια σιδηρο-θειο-μολυβδαινο

φλαβοπρωτεΐνη και υπάρχει κυρίως στο πλάσμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και υφίσταται κυρίως ως αφυδρογονάση. Σε φυσιολογικές συνθήκες καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ και λαμβάνει τα ηλεκτρόνια του υποστρώματος ανάγοντας το NAD^+ σε NADH . Ωστόσο, κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών καταστάσεων, μπορεί να μετατραπεί σε οξειδάση. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση τόσο της υποξανθίνης όσο και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, στους νεφρούς και στο ήπαρ, με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε O_2^- και H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Φυσιολογικά η παραπάνω αντίδραση γίνεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH), η οποία ανάγει το NAD^+ σε NADH κι όχι το O_2 σε O_2^- . Η αφυδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης μετά από οξείδωση μερικών θειολικών ομάδων (-SH) ή μετά από περιορισμένη πρωτεόλυση από διάφορες πρωτεάσες. Επομένως κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δεν σχηματίζεται O_2^- . Αντίθετα, σε περιπτώσεις τραυματισμού ιστών είναι πιθανόν να πραγματοποιείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση της ξανθίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία O_2^- .

IV. Υπεροξειδισώματα

Είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Τα υπεροξειδισώματα συμμετέχουν, επίσης, στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου γίνεται μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό FADH_2 και από αυτό στο

μοριακό οξυγόνο O₂ (Berg et al., 2010). Τελικά, το H₂O₂ αδρανοποιείται μετά από τη μετατροπή του σε νερό.

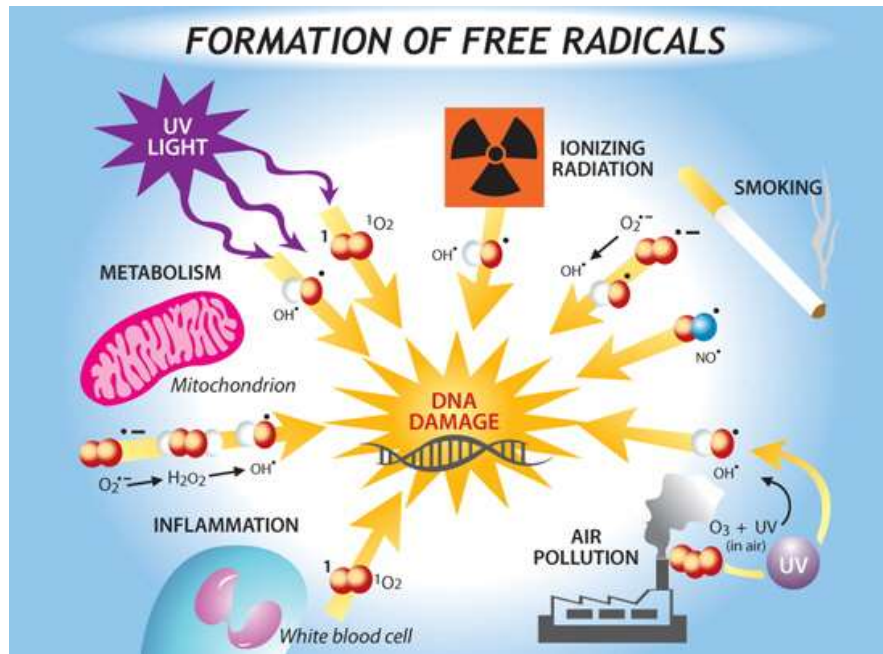
V.Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames, 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα σε O₂•⁻ (Cooper, 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H₂O₂ (Brandley, 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Εξωγενείς Πηγές Ελευθέρων Ριζών

Οι βασικότεροι εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι:

- Έκθεση σε ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία)
- Έκθεση στο όζον
- Φλεγμονή
- Κάπνισμα
- Ρύπανση της ατμόσφαιρας (από ρύπους όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το διοξείδιο του αζώτου (NO₂-))
- Αλκοόλ
- Φυτοφάρμακα
- Ιόντα βαρέων μετάλλων κ.α.



Εικόνα 3 : Απεικόνιση των ενδογενών και εξωγενών πηγών παραγωγής ελεύθερων ριζών

1.1.3 Θετικές και Αρνητικές Επιπτώσεις των Ελευθέρων Ριζών

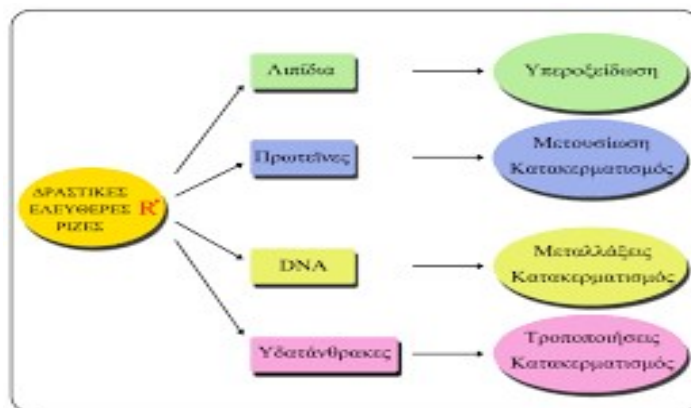
Θετικές Επιδράσεις

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ποικίλες βλάβες στον οργανισμό, ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για την λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμοποιούν στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης, καθώς οι ελεύθερες 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 (Kirlin et al. 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS οι οποίες 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 H₂O₂ χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις υπεροξειδάσες της αίμης που εμπλέκονται στην ιωδίωση των ορμονών του θυρεοειδή αδένα. Η συγκέντρωση του H₂O₂ 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 σηματοδότησης αναστέλλονται από υπεροξείδια ή από την υπερέκφραση καταλάσης καθιστά πιθανή την εμπλοκή του H₂O₂ στον καταρράκτη σηματοδότησης. Η σηματοδότηση της ινσουλίνης φαίνεται να περιλαμβάνει H₂O₂ 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).

Αρνητικές Επιδράσεις

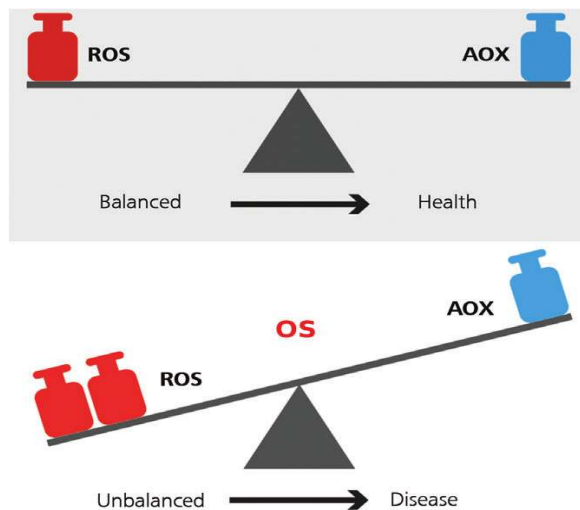
Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικά μόρια με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού. Προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA αλληλεπιδρώντας με τις βάσεις, αλλοιώνουν τις κυτταρικές μεμβράνες, έχουν σχέση σε ένα βαθμό με παθήσεις όπως ο διαβήτης, αρτηριοσκλήρυνση ακόμα και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) καθώς και με την πρόωρη γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).



Εικόνα 4 : Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με βασικά κυτταρικά συστατικά και οι επιπτώσεις τους

1.1.4 Οξειδωτικό Στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004). Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που υπερβαίνει την ικανότητα του οργανισμού να τις εξουδετερώσει, είτε σε ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η εμφάνισή του οξειδωτικού στρες μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς αλλά και σε εξωγενείς παράγοντες και εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών νοσημάτων.



Εικόνα 5 : Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

1.1.5 Οξειδωτικό στρες και νευρολογικές διαταραχές

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος, αν και αποτελεί μόνο το 2% του σωματικού βάρους, καταναλώνει ~20% του οξυγόνου που παρέχεται από το αναπνευστικό σύστημα. Η υψηλή κατανάλωση ενέργειας του εγκεφάλου σημαίνει ότι είναι πιο επιρρεπής στο οξειδωτικό στρες από οποιοδήποτε άλλο όργανο του οργανισμού. Ως βασική λειτουργική μονάδα του εγκεφάλου οι νευρώνες είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στο οξειδωτικό στρες επειδή έχουν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό. Η οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων στους νευρώνες αποτελούν ένα κοινό παθολογικό χαρακτηριστικό της ασθένειας του Αλτσχάιμερ. Οι νευρώνες περιέχουν μεγάλη

ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που οδηγεί σε έναν αυτοπολλαπλασιαζόμενο καταρράκτη λιπιδικής υπεροξειδωσής και μοριακής καταστροφής. (Chen Z, Zhong C)

Το οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, εκ των οποίων η νόσος Alzheimer, η νόσος του Parkinson, και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση. Οξειδωτικές βλάβες έχουν εντοπιστεί ακόμη και σε πρώιμα στάδια αυτών των ασθενειών, υποδεικνύοντας ότι η αιτιολογία τους συνδέεται με ελεύθερες ρίζες.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου που διαφεύγουν των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και συσσωρεύονται προοδευτικά θα ενεργοποιήσουν μηχανισμούς υπεροξειδωσής λιπιδίων και θα προκαλέσουν δομική βλάβη στις πρωτεΐνες και στο DNA. Αυτές οι μοριακές αλλαγές επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα νευρικά κύτταρα καθώς επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες και ο βρεγματικός λοβός επηρεάζονται σημαντικά στην περίπτωση της νόσου Alzheimer, ενώ η μέλαινα ουσία του μεσεγκεφάλου, το ραβδωτό σώμα και οι κινητήριοι νευρώνες επηρεάζονται στις περιπτώσεις της νόσου Parkinson, της νόσου Huntington καθώς και στην πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (Diaz-Hung A.M. et al, 2014).

1.2 Νόσος Αλτσχάιμερ

Με την ραγδαία βελτίωση του βιοτικού επιπέδου του ανθρώπου τις τελευταίες δεκαετίες και την επακόλουθη αύξηση του προσδόκιμου ζωής, αυξάνεται η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία μεταξύ των μεγαλύτερων ανθρώπων γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο αντικείμενο προβληματισμού για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Είναι γνωστό ότι οι ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία προκαλούν προοδευτική και μη αναστρέψιμη απώλεια νευρώνων και οδηγούν με αυτό τον τρόπο σε άνοια. Μια από αυτές τις ασθένειες είναι η νόσος Αλτσχάιμερ.

Η νόσος Alzheimer είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική

εξασθένηση των γνωστικών (νοητικών) λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της μνήμης, της κατανόησης, της γλώσσας, της προσοχής, του συλλογισμού και της κρίσης. Επίσης παρατηρούνται αλλαγές στην προσωπικότητα και ασταθής συμπεριφορά, σε βαθμό που να επηρεάζεται η ικανότητα για ανεξάρτητη διαβίωση του ασθενούς.

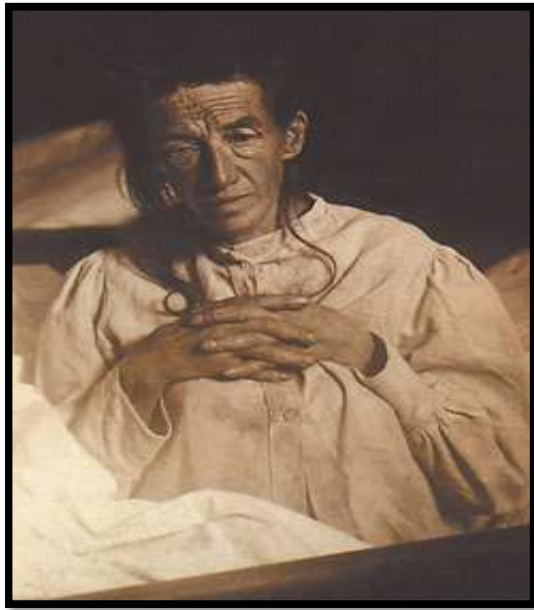
1.2.1 Alois Alzheimer

Ο Alois Alzheimer (**εικόνα 6**) ήταν ψυχίατρος και νευροπαθολογοανατόμος, γεννήθηκε στις 14 Ιουνίου 1864 σε ένα μικρό χωριό της Βαυαρίας, το Marktbreit. Ξεκίνησε τις ιατρικές σπουδές του στο Βερολίνο και πήρε το πτυχίο του το 1887. Σχεδόν αμέσως, το 1888 και για πολλά έτη, εργάστηκε στο Ψυχιατρικό νοσοκομείο της Φρανκφούρτης (The Städtische Anstalt für Irre und Epileptische, Asylum for Lunatics and Epileptics), δίπλα στον Franz Nissl. Ο Alzheimer υιοθέτησε στο έπακρο την μέθοδο χρωματισμού Nissl στα ιστολογικά δείγματα εγκεφάλου που μελετούσε. Οι δυο τους δούλεψαν μαζί πάνω στην παθολοανατομία του εγκεφάλου, ενώ μοιράστηκαν μια μακροχρόνια φιλία. Τα προσεχή έτη ο Alzheimer εκπόνησε μελέτες που αφορούσαν στη νωτιαία μυϊκή ατροφία, στη νόσο του Binswanger, στην επιληψία, στην λεγόμενη τότε γεροντική άνοια, στη εγκεφαλική αθηροσκλήρυνση καθώς επίσης στην κληρονομική ψύχωση και στην γενικευμένη παράλυση.



Εικόνα 6: Alois Alzheimer (1864-1915)

Στις 25 Νοεμβρίου 1901, εισάγεται στην κλινική μία ασθενής 51 ετών, η Auguste Deter (**εικόνα 7**). Το κλινικό της σύνδρομο αφορούσε σε διαταραχή μνήμης και έκπτωση όλων των ανώτερων νοητικών λειτουργιών, ιδιαίτερα του λόγου. Επιπλέον είχε εμφανίσει συμπτώματα όπως ψευδαισθήσεις, παρανοϊκό ιδεασμό καθώς και ζηλοτυπικό παραλήρημα. Με το πέρασμα του χρόνου η Auguste δεν ήταν σε θέση να αυτοεξυπηρετηθεί, παρέμεινε κλινήρης με απώλεια σφιγκτήρων και απεβίωσε μετά από σηψαιμία λόγω πνευμονίας.



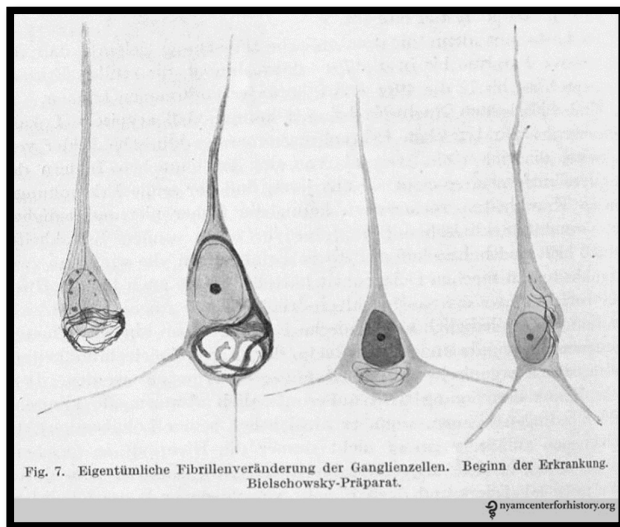
Εικόνα 7: *Auguste Deter*(1850-1906)

Ο Alzheimer έδειξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την Auguste και από την αρχή της νοσηλείας της ηχογραφούσε όλες τις συνεδρίες τους, ενώ ήταν η πρώτη φορά που ζήτησε να φωτογραφηθεί ασθενής και να παραμείνει η φωτογραφία στο φάκελό της. Το 1907, ο Alois Alzheimer περιέγραψε προσεκτικά τα συμπτώματα της Auguste Deter. Η περιγραφή των συμπτωμάτων της είναι σχεδόν σίγουρα ο πρώτος νευροψυχολογικός χαρακτηρισμός της νόσου. Συγκεκριμένα ο Alzheimer ανέφερε: «Η μνήμη της είναι σοβαρά εξασθενημένη. Αν της δείξουν αντικείμενα, τα ονομάζει σωστά, αλλά σχεδόν αμέσως μετά τα έχει ξεχάσει όλα. Όταν διαβάζει ένα τεστ, παραλείπει από γραμμή σε γραμμή ή διαβάζει συλλαβίζοντας τις λέξεις μεμονωμένα ή καθιστώντας τις άνευ σημασίας μέσω της προφοράς της. Στη γραφή επαναλαμβάνει πολλές φορές χωριστές συλλαβές, παραλείπει άλλες και γρήγορα σπάει εντελώς. Στην

ομιλία της, χρησιμοποιεί κενά-γεμίσματα και μερικές παραφρασμένες εκφράσεις, ενώ μερικές φορές είναι προφανές ότι δεν μπορεί να συνεχίσει. Προφανώς, δεν καταλαβαίνει ορισμένες ερωτήσεις. Δεν θυμάται τη χρήση κάποιων αντικειμένων».

Όταν πέθανε η Auguste Deter το 1906, ο Alzheimer χρησιμοποίησε τη νέα τότε ιστολογική τεχνική χρώσης αργύρου για να εξετάσει τον εγκέφαλό της μικροσκοπικά. Ο Alzheimer παρατήρησε στο επίχρισμα σοβαρή ατροφία στον εγκεφαλικό φλοιό, αρτηριοσκλήρυνση μικρών αγγείων, ενώ ανά περιοχές γύρω από τους νευρώνες υπήρχε συσσωρευμένη μία περίεργη ουσία που δεν χρωματίζεται, ιδιαίτερα στις ανώτερες στιβάδες του φλοιού. Επιπλέον, παρατήρησε ενδοκυττάρια πολλαπλά ινίδια, ιδιαίτερα πεπαχυμένα και αδιαπέραστα. Φαίνεται λοιπόν, ότι ο Alzheimer το 1906 περιέγραψε στον εγκέφαλο της Auguste τις γεροντικές πλάκες και αντίστοιχα τα νευροϊνιδιακά τολύπια (**εικόνα 8**), χαρακτηριστικά στοιχεία της νόσου που έμελλε να φέρει το όνομα του.

Συσχετίζοντας την κλινική εικόνα της ασθενούς με τα ευρήματα της βιοψίας, ο Alzheimer πείστηκε πως έχει μπροστά του μία νέα σοβαρή νόσο και την ονόμασε «προ-γεροντική άνοια».



Εικόνα 8: Τα νευροϊνιδιακά τολύπια όπως τα ζωγράφισε ο Alzheimer και τα δημοσίευσε το 1911

Την ίδια χρονιά ο Alzheimer ανακοίνωσε τα ευρήματά του σχετικά με την παθολογική εκφύλιση του εγκεφάλου και τα συμπτώματα της «προ γεροντικής άνοιας» στις 3 Νοεμβρίου 1906 στο Tübingen, σε μία συνάντηση των ψυχιάτρων της

νοτιοδυτικής Γερμανίας. Δυστυχώς η διάλεξή του συνάντησε την αδιαφορία των συναδέλφων του, χωρίς να δεχθεί καμία ερώτηση ή σχόλιο σχετικά με την ανακάλυψη των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών ενός τύπου γεροντικής άνοιας. Μετά την διάλεξή του ο Alzheimer δημοσίευσε μία περίληψη των ευρημάτων του, ενώ το 1907 έγραψε μία εκτενή εργασία, όπου παρουσίαζε με λεπτομέρεια τη νόσο και τα ευρήματά του.

Ο ίδιος ο Alzheimer δεν ισχυρίστηκε ότι ανακάλυψε τη «νόσο του Alzheimer», αν και ο μέντοράς του Emil Kraepelin στην Ιατρική Σχολή του Μονάχου δικαίως του απέδωσε το γεγονός αυτό επινοώντας τον όρο στο δικό του Εγχειρίδιο Ψυχιατρικής (*Kraepelin, 1910*). Μέχρι το 1911, η ιατρική κοινότητα χρησιμοποιούσε τις απεικονίσεις του Alzheimer για τη διάγνωση ασθενών τόσο στην Ευρώπη όσο και στις Ηνωμένες Πολιτείες (*Mauer & Mauer, 2003*).

Επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ο Eugen Bleuler ήταν εκείνος που στη μελέτη του για τη σχιζοφρένεια επινόησε τον όρο «οργανικό ψυχοσύνδρομο» για να αναφέρεται σε μειώσεις στη μνήμη, την κρίση, τις αντιληπτικές διακρίσεις, την προσοχή, τη συναισθηματική αστάθεια και τον ελαττωματικό έλεγχο των παρορμήσεων που σχετίζονται με τη χρόνια διάχυτη φλοιώδη βλάβη. Αυτή η ταξινόμηση υιοθετήθηκε ουσιαστικά από την Αμερικανική Ψυχιατρική Εταιρεία (American Psychiatric Association-APA) για να ορίσει την άνοια στις δύο πρώτες εκδόσεις του Διαγνωστικού και Στατιστικού Εγχειριδίου Ψυχικών Διαταραχών (DSM). Συγκεκριμένα, το DSM-II όρισε το «οργανικό εγκεφαλικό σύνδρομο» ως «βασική ψυχική κατάσταση που προκύπτει από διάχυτη βλάβη της λειτουργίας του εγκεφαλικού ιστού από οποιαδήποτε αιτία» και η οποία εκδηλώνεται συμπεριφορικά ως έκπτωση στον προσανατολισμό, τη μνήμη, τις διανοητικές λειτουργίες, την κρίση και το συναίσθημα. (*APA, 1968*).

Μια από τις πιο σημαντικές δημοσιεύσεις στα επόμενα χρόνια, θεωρήθηκε αυτή των Blessed, Tomlinson και Roth το 1968, οι οποίοι για πρώτη φορά συσχέτισαν τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer με τα παθοφυσιολογικά ευρήματα του εγκεφάλου που είχε περιγράψει ο ίδιος. Το 1976, ο Robert Katzman, συνοψίζοντας παθολογοανατομικά και επιδημιολογικά δεδομένα κατέδειξε πως προ-γεροντική και γεροντική άνοια παρουσιάζουν κοινό ιστολογικό και παθοφυσιολογικό υπόβαθρο.

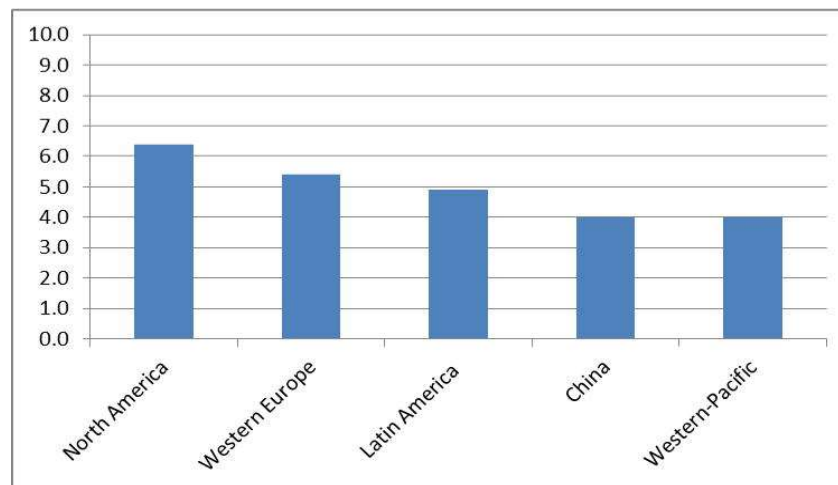
Επίσης, κατέδειξε πως η νόσος Alzheimer ήταν τότε η 4^η αιτία θανάτου στους ηλικιωμένους.

Βάσει αυτών, η άνοια παύει να είναι μία σπάνια διαταραχή, αλλά ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας, το οποίο άρχισαν να μελετούν εκτεταμένα τα αρμόδια ινστιτούτα υγείας.

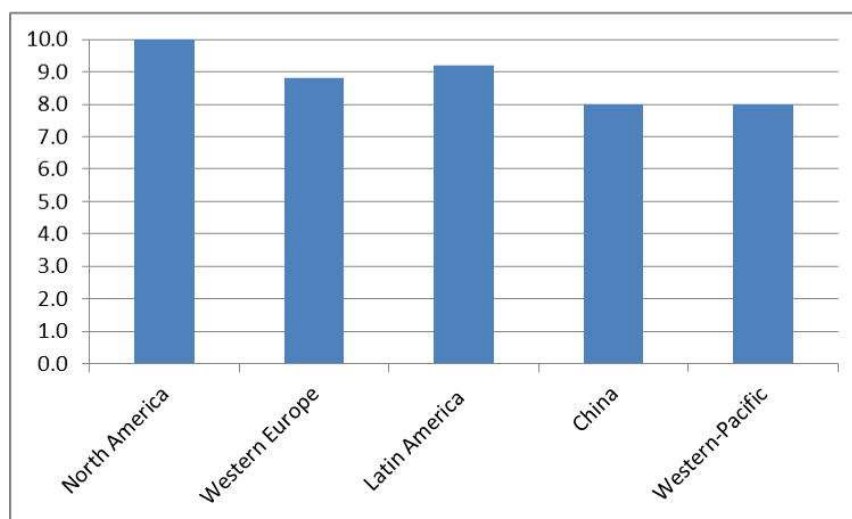
1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Η μεγάλη αύξηση του αριθμού των ασθενών που πάσχουν από άνοια αποτελεί αναπόφευκτο επακόλουθο της γήρανσης του γενικού πληθυσμού λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής. Αυτή η αύξηση του μέσου όρου ζωής έχει ως αποτέλεσμα και αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των παθήσεων της τρίτης ηλικίας, όπως η άνοια, η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση καθώς και διάφορα αγγειακά εγκεφαλικά προβλήματα.

Ο παγκόσμιος επιπολασμός της άνοιας φτάνει τα 24 εκατομμύρια και έχει προβλεφθεί ότι θα τετραπλασιαστεί μέχρι το 2050. Μέχρι το 2005, 24,2 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο είχαν άνοια και περίπου 4,6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις εμφανίζονταν κάθε χρόνο. Το 70% αυτών των περιπτώσεων αποδίδονταν στη νόσο του Αλτσχάιμερ. Μεταξύ των περιφερειακών πληθυσμών ηλικίας 60 ετών, εκείνοι από τη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη πιστεύεται ότι παρουσιάζουν τον υψηλότερο επιπολασμό και ποσοστό επίπτωσης της άνοιας. Στη συνέχεια, ακολουθούν η Λατινική Αμερική, η Κίνα και οι γείτονές της στον δυτικό Ειρηνικό, όπως απεικονίζονται και στις παρακάτω εικόνες. (Reitz C, Mayeux R., 2014)



Εικόνα 9: Παγκόσμιος επιπολασμός της άνοιας (%)



Εικόνα 10: Ποσοστά επίπτωσης (ανά 1000 άτομα στον πληθυσμό)

Για όλους τους πληθυσμούς που προαναφέρθηκαν, το ποσοστό επίπτωσης της άνοιας αυξάνεται εκθετικά με την ηλικία, με την πιο έντονη αύξηση να εμφανίζεται κατά την 7η και 8η δεκαετία της ζωής. Παρόμοια πρότυπα παρατηρούνται για τον επιπολασμό και τη συχνότητα της AD.

Με βάση την ηλικία εμφάνισής της, η AD ταξινομείται σε **AD πρόωμης έναρξης** (EOAD, έναρξη < 65 ετών) που αντιπροσωπεύει το 1–5% όλων των περιπτώσεων και **AD όψιμης έναρξης** (LOAD, έναρξη ≥ 65 ετών) που αντιπροσωπεύει >95% των προσβεβλημένων. Ενώ κλινικά δεν διακρίνεται από το LOAD, το EOAD γενικά σχετίζεται με ταχύτερο ρυθμό εξέλιξης και μεντελικό μοτίβο κληρονομικότητας. (Reitz C, Mayeux R., 2014)

Υπολογίζεται ότι το 43% των ασθενών με AD χρειάζεται νοσηλευτική φροντίδα υψηλού επιπέδου είτε κατ' οίκον είτε εντός ιδρυμάτων. Η μακροχρόνια φροντίδα αυτών των ασθενών αποτελεί σημαντικό οικονομικό κόστος για τις αναπτυγμένες χώρες, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες η φροντίδα παρέχεται αποκλειστικά από το οικογενειακό περιβάλλον. Το 2009, το ετήσιο κόστος για τους ασθενείς με AD και άλλες μορφές άνοιας στις 66 Ηνωμένες Πολιτείες ήταν 148 δις δολάρια και επιπλέον 94 δις δολάρια από την απλήρωτη παροχή φροντίδας, ενώ η νόσος τριπλασίασε το κόστος υγειονομικής περίθαλψης των ασθενών άνω των 65 ετών. Υπολογίζεται ότι θεραπευτικές παρεμβάσεις που καθυστερούν έστω και ένα έτος την

εμφάνιση και την πρόοδο της νόσου, θα μπορούσαν να μειώσουν σημαντικά το συνολικό κόστος αυτής (Brookmeyer R, Gray S, 1998)

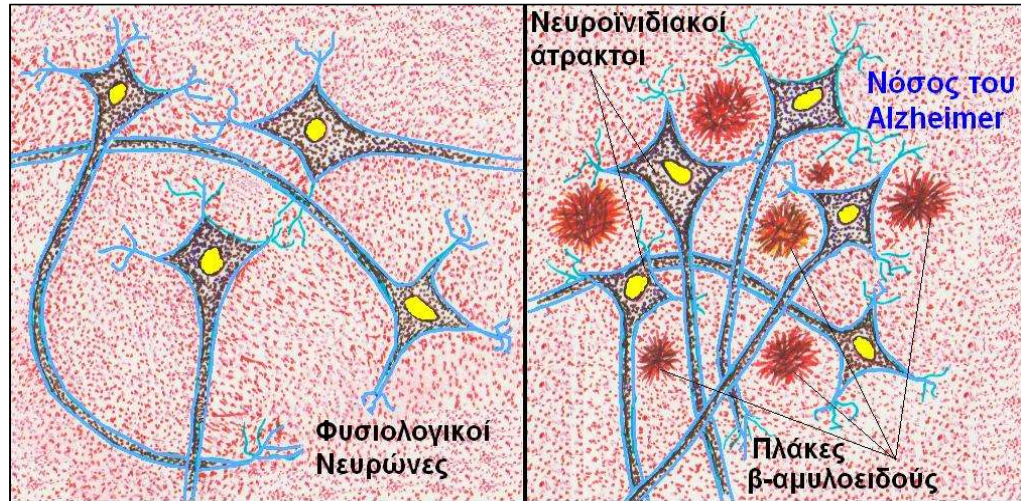
1.2.3 Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι πλήρως ξεκάθαροι, αυτό που χαρακτηρίζει ιστολογικά τη νόσο είναι η σταδιακή εναπόθεση συσσωματωμάτων πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον ιππόκαμπο, στο μετωπιαίο και βρεγματικό λοβό, στην αμυγδαλή, στο πρόσθιο θάλαμο και κάποιων μονοαμινεργικών πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους (Duran-Prado M., et al, 2020), οι οποίες σχηματίζουν δύο ιδιαίτερες δομές:

- **Τις πλάκες αμυλοειδούς (amyloid plaques):** Οι πλάκες αμυλοειδούς αποτελούνται από εναποθέσεις ενός πεπτιδίου που λέγεται β-αμυλοειδής. Οι πλάκες αυτές βρίσκονται ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα και σχετίζονται με τις βιοχημικές διαδικασίες επεξεργασίας της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, (amyloid precursor protein APP). Οι πλάκες αμυλοειδούς μπορούν να καταστρέψουν τα εγκεφαλικά κύτταρα με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της παρεμβολής στην επικοινωνία των κυττάρων μεταξύ τους.
- **Νευροϊνιδιακοί σωφοί (Neurofibrillary tangles):** αποτελούνται από την πρωτεΐνη tau και βρίσκονται εντός των νευρικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη tau παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των νευρώνων και εμπλέκεται σε πολλές νευροεκφυλιστικές νόσους, όμως όταν υπερσυσσωρεύεται, σχηματίζονται αναστραμμένα λεπτά ινίδια, με αποτέλεσμα τα συστήματα μεταφοράς των νευρώνων να αποικοδομούνται , με αποτέλεσμα ουσιώδη θρεπτικά συστατικά να μη μπορούν να κινηθούν δια μέσω αυτών και κατά συνέπεια τα νευρικά κύτταρα να αρχίζουν να εκφυλίζονται επηρεάζοντας τις λειτουργίες του εγκεφάλου.

Από γενετικής άποψης , η νόσος οφείλεται σε μεταλλάξεις τριών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά είναι το APP, το Presenilin-1(PSEN1) και το Presenilin-2(PSEN2). Μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια είναι υπεύθυνες για την πρόωμη έναρξης μορφή

AD και οδηγούν σε υπέρμετρη παραγωγή του Αβ- αμυλοειδούς (Cedazo-Miriguez A. et al, 2014). Ομοίως, ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της όψιμης έναρξης της νόσου, θεωρείται η αλληλουχία ε4 στο γονίδιο της APOE , που τροποποιεί την απομάκρυνση και την συσσώρευση του Αβ-αμυλοειδούς(Kuusisto J, Koivisto K,1994).



Εικόνα 11: Απεικόνιση των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνιδιακών σωρών σε εγκέφαλο ασθενούς με τη νόσο Αλτσχάιμερ

1.2.4 Στάδια εξέλιξης της νόσου Αλτσχάιμερ

Οι νευροεκφυλιστικές διαδικασίες που χαρακτηρίζουν τη νόσο Αλτσχάιμερ αναπτύσσονται βαθμιαία επί μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμα και πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η σύγχρονη θεώρηση της χρονικής εξέλιξης της νόσου είναι η ακόλουθη:

- **Ασυμπτωματικό (προκλινικό) στάδιο**

Διαρκεί πολλά έτη , κατά τα οποία βλάπτονται σταδιακά συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Παρά το ότι συσσωρεύονται διαφόρων ειδών βλάβες (εναπόθεση αμυλοειδούς, νευροϊνιδιακοί σωροί, συναπτική δυσλειτουργία) δεν είναι ικανής βαρύτητας ώστε να προκαλέσουν συμπτώματα. Επομένως, αν και τα άτομα δεν νοσούν κλινικά, φέρουν τις βιολογικές αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν τα πρώτα στάδια.

- **Ήπια γνωστική διαταραχή**

Στο στάδιο αυτό (Mild Cognitive Impairment), οι βλάβες στον εγκέφαλο είναι πιο εκτεταμένες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων, συνήθως διαταραχή της πρόσφατης αυτοβιογραφικής μνήμης. Σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται αλλαγές στην προσωπικότητα και στη συμπεριφορά.

- **Στάδιο κλινικής εκδήλωσης της νόσου Αλτσχάιμερ**

Τα συμπτώματα καθίστανται πλέον αρκετά έντονα , ώστε να επηρεάζεται η ζωή και η καθημερινότητα των ατόμων που νοσούν. Οι νοητικές λειτουργίες σταδιακά επιβαρύνονται , συχνά εμφανίζονται συμπεριφορικά και ψυχολογικά συμπτώματα, ενώ οι ασθενείς χρειάζονται ολοένα και περισσότερη φροντίδα και επιτήρηση. Στα τελικά στάδια της νόσου, οι ασθενείς καθίστανται πλήρως εξαρτώμενοι από το περιβάλλον τους, ακόμα και για τις βασικές λειτουργίες.



Εικόνα 12: Τα τρία στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ και ποιες περιοχές του εγκεφάλου επηρεάζουν

1.2.5 Συμπτώματα της νόσου Alzheimer

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από απότομες αλλαγές στη διάθεση, απώλεια μνήμης, προβλήματα στην προσοχή και στον προσανατολισμό καθώς και δυσκολία στις διάφορες καθημερινές δραστηριότητες. Όσον αφορά το κυτταρικό επίπεδο, παρατηρείται δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια, οξειδωτικό στρες, ανισορροπία στην αποθήκευση μετάλλων, φλεγμονή και αυξημένη απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα:

Συμπτώματα στο ήπιο στάδιο της νόσου Alzheimer

Στους περισσότερους ασθενείς με νόσο του Alzheimer η εκμάθηση και η πρόσφατη μνήμη πλήττονται πρώτα. Συχνά, τα άτομα με άνοια σε αρχικά στάδια χάνουν

πράγματα και δυσκολεύονται πολύ στο να τα βρουν.. Ακόμη, επειδή ξεχνούν κάνουν λάθη στην καθημερινότητά τους Εκτός από το πρόβλημα στην άμεση μνήμη, μια σειρά άλλων συμπτωμάτων συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της νόσου. Μάλιστα, διαταραχές στη συγκέντρωση και μη γνωσιακά συμπτώματα (όπως κατάθλιψη ή απάθεια) μπορεί να προηγούνται της εκδήλωσης διαταραχών στη μνήμη αλλά γίνονται πιο δύσκολα αντιληπτά από το οικογενειακό περιβάλλον και είναι μη ειδικά συμπτώματα. Σε ορισμένους, αφασικά συμπτώματα (δυσκολία στην εύρεση της κατάλληλης λέξης) και οπτικοχωρικά ελλείμματα παρουσιάζονται πρώτα. Καθώς η νόσος προχωρά, διαταραχές σε άλλες ανώτερες λειτουργίες παρουσιάζονται, όπως στην κρίση, το σχεδιασμό και την οργάνωση. Στα αρχικά στάδια της νόσου η έκπτωση στη λειτουργικότητα είναι μικρή και οι περισσότεροι ασθενείς μπορούν να ζουν αυτόνομοι. Χρειάζεται όμως ένα υποστηρικτικό δίκτυο, σε οργανωτικά κυρίως ζητήματα, προκειμένου να μείνουν όσο το δυνατό περισσότερο γίνεται ανεξάρτητοι.

Συμπτώματα στο μέτριο στάδιο της νόσου Alzheimer

Σε αυτό το στάδιο οι ασθενείς φαίνεται να ζουν στο παρελθόν, λόγω της σοβαρής διαταραχής της πρόσφατης μνήμης. Ξεχνάνε τα πρόσφατα γεγονότα, ακόμα και αν αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τους ίδιους. Μπορεί να ξεχνούν τα ονόματα φίλων και συγγενών. Παρουσιάζουν σοβαρή διαταραχή στον χρονικό προσανατολισμό. Τα νευροψυχιατρικά συμπτώματα (παραληρητικές ιδέες, ψευδαισθήσεις, απάθεια, επιθετικότητα, περιπλάνηση κ.λπ.) γίνονται συχνότερα στη μέτρια άνοια, σε σχέση με την ήπια.

Όλα τα παραπάνω συμπτώματα προκαλούν στους ασθενείς σοβαρό πρόβλημα στην καθημερινότητα. Οι ασθενείς δεν μπορούν να μείνουν μόνοι τους και δημιουργούνται κίνδυνοι στο σπίτι, αλλά και έξω από αυτό. Ο ρυθμός της νοητικής έκπτωσης είναι πιο γρήγορος στο μεσαίο στάδιο.

Συμπτώματα στο σοβαρό στάδιο της νόσου Alzheimer

Στη σοβαρή άνοια όλες οι γνωστικές λειτουργίες είναι σοβαρά διαταραγμένες. Οι ασθενείς είναι απαθείς και μπορεί να παρουσιάζουν στερεότυπη κινητική συμπεριφορά. Αντιμετωπίζουν δυσκολίες με τις βασικές καθημερινές δραστηριότητες, όπως το πλύσιμο, η μετακίνηση και το φαγητό. Η φροντίδα είναι πλέον νοσηλευτική και περιπλέκεται από δυσκολίες στην κατάποση και τη βάδιση και διαταραχές στη

συμπεριφορά. Οι ασθενείς τελικά περιορίζονται στο κρεβάτι και έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κατακλίσεων, λοιμώξεων και καρδιαγγειακών συμβάντων που τελικά οδηγούν στο θάνατο.

1.2.6 Αιτιολογικές υποθέσεις για τη νόσο Αλτσχάιμερ

1.2.6.1 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau

Η πρωτεΐνη tau ελέγχει την ανάπτυξη των νευρώνων και έχει φυσιολογικό ρόλο στο axonal guidance. Η λειτουργία της πρωτεΐνης tau διαμορφώνεται από μια σειρά ενδοκυττάρων τροποποιήσεων, όπως η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η γλυκοζυλίωση, η μεθυλίωση και άλλες. Η υπόθεση αναφέρει ότι η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau οδηγεί στη μετατροπή της φυσιολογικής πρωτεΐνης σε ένα συζευγμένο ελικοειδές νήμα (PHF-tau) και σε NFTS, καθώς τα μονομερή της πρωτεΐνης μετατρέπονται σε ολιγομερή. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστροφή των νευρώνων συμβαίνει λόγω της παρουσίας της τοξικής μορφής της tau πρωτεΐνης και όχι από την παρουσία των NFTs. Συνέπεια αυτής της διαδικασίας, είναι η καταστροφή της φυσιολογικής δομής των μικροσωληνίσκων και η απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, απορρυθμίζεται η σταθερότητα των αξόνων, παρεμποδίζεται η αξονική μεταφορά κυστιδίων, μορίων και απαραίτητων ιχνοστοιχείων για τη βιωσιμότητα των νευρώνων. Προοδευτικά αλλοιώνεται η φυσιολογική λειτουργία των συνάψεων και η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

1.2.6.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς

Αυτή είναι η πιο ευρέως αποδεχόμενη και πιο μελετημένη υπόθεση. Η παρουσία των αμυλοειδών πλακών είναι αδιαμφισβήτητο το χαρακτηριστικότερο κομμάτι της παθολογίας της νόσου Αλτσχάιμερ. Σύμφωνα με τη θεωρία, οι αμυλοειδείς πλάκες προέκυψαν λόγω της συσσώρευσης των Αβ πεπτιδίων ως αποτέλεσμα του πρωτεολυτικού διαχωρισμού της APP. Μη κανονικός διαχωρισμός της APP έχει βρεθεί ότι οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων μορφών Αβ, των οποίων η συσσώρευση τους

δημιουργεί ολιγομερή τα οποία ευθύνονται για την τελική καταστροφή των νευρώνων (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

1.2.6.3 Υπόθεση των χολινεργικών νευρώνων

Στη συγκεκριμένη υπόθεση αναφέρεται σημαντική μείωση ενός νευροδιαβιβαστή, της ακετυλοχολίνης, στους νευρώνες γεγονός που αποτελεί και κύρια αιτιολογία της νόσου. Αυτή η υπόθεση προτείνει ότι νευρώνες οι οποίοι δεν περιέχουν τη φυσιολογική σύσταση ακετυλοχολίνης στα βασικά γάγγλια εμπλέκονται στην εμφάνιση της κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Η ακετυλοχολίνη (Ach) παίρνει μέρος σε βασικές λειτουργίες της μνήμης και της ανθρώπινης συμπεριφοράς, συνεπώς καταστροφή των χολινεργικών νευρώνων οδηγεί σε σοβαρή εκδήλωση της νόσου (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

1.2.6.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες

Η πρόσφατη αυτή υπόθεση υποστηρίζει ότι ελεύθερες ρίζες παράγονται και συσσωρεύονται λόγω του γήρατος επηρεάζοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες εμπλέκονται σε πολυάριθμες ασθένειες περιλαμβανομένων ασθενειών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Percario S. et al, 2015). Συνεπώς, το οξειδωτικό στρες έχει κρίσιμο ρόλο για την παθογένεση του Αλτσχάιμερ καθώς ο εγκέφαλος καταναλώνει την περισσότερη ενέργεια, επιτελεί τις περισσότερες λειτουργίες από οποιοδήποτε άλλο όργανο και έτσι η πιθανότητα παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου είναι αυξημένη. (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

1.3 Το οξειδωτικό στρες στη νόσο Αλτσχάιμερ

Η ηλικία, η γενετική και διάφοροι εξωγενείς παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στο οξειδοαναγωγικό σύστημα αυξάνοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις δραστικές μορφές αζώτου(RNS). Τα μιτοχόνδρια, αποτελούν την σπουδαιότερη πηγή των ROS, καθώς καταναλώνουν το 90%του εισπνεόμενου οξυγόνου, ενώ το 2% αυτού ανάγεται σε ανιόν του σουπεροξειδίου (Richter C,et al., 1995).

Υπό συνθήκες στρες, καταστροφή των κυττάρων, γενετική αστάθεια και αλλαγές στον μεταβολισμό αποτελούν τους βασικούς παράγοντες συσσώρευσης των δραστικών μορφών οξυγόνου(ROS). Πιο συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί

ως παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση και στην εξέλιξη πολλαπλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου Αλτσχάιμερ(AD).(*Tönnies, E., & Trushina, E., 2017*). Ο εγκέφαλος καταναλώνει την περισσότερη ενέργεια καθώς επιτελεί τις περισσότερες λειτουργίες από οποιοδήποτε άλλο όργανο και έτσι η πιθανότητα παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου είναι αυξημένη. (*Moklas Mohd M. A. et al, 2019*). Έτσι τα νευρικά κύτταρα έχουν να αντιμετωπίσουν ένα τεράστιο φορτίο οξειδωτικού στρες και μεταβολικών αλλαγών.

Ως βασική λειτουργική μονάδα του εγκεφάλου οι νευρώνες είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στο οξειδωτικό στρες επειδή έχουν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό, επομένως είναι πολύ πιθανό το οξειδωτικό στρες να εμπλέκεται και στην έναρξη αλλά και σε όλη τη διάρκεια νόσησης. Με βάση αυτό, έχουν εντοπιστεί πολλοί δείκτες στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο Αλτσχάιμερ που ταυτοποιούν βλάβη που έχει προκληθεί από το οξειδωτικό στρες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (*Cioffi F, Adam RHI, Bansal R, Broersen K.,2021*)

Οι ενδείξεις ότι παρατηρείται αυξημένο οξειδωτικό στρες στη νόσο Αλτσχάιμερ αποδεικνύονται από τα εξής:

- Μεταβολές στη λειτουργία και τη δυναμική των μιτοχονδρίων,
- Συσσώρευση του β-αμυλοειδούς που οδηγούν σε σχηματισμό των πλακών
- Αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων που συνοδεύονται με αλλαγές στις μεμβράνες,
- Αυξημένη οξείδωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων στον εγκέφαλο,
- Αλλαγή στην ομοιόσταση σιδήρου, όπου σε συνδυασμό με το υπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγούν στο σχηματισμό των πιο επιβλαβών ελευθέρων ριζών

1.3.1 Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου

Η νόσος Alzheimer (NA) είναι η πιο κοινή μορφή προοδευτικής νευροεκφυλιστικής άνοιας σε ηλικιωμένους και κλινικά χαρακτηρίζεται από προοδευτική εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών. Τα τελευταία χρόνια και στην προσπάθεια αναζήτησης τροποποιητικών θεραπειών της νόσου, αυξήθηκε το ενδιαφέρον για ανεύρεση βιοδεικτών έτσι ώστε να διαγιγνώσκεται η νόσος με μεγαλύτερη ακρίβεια και όσο το δυνατόν στα πρόδρομα στάδιά της.

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες που προέρχονται από βιολογικά δείγματα όπως ο ορός, το πλάσμα αίματος και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες σε άτομα με AD ταξινομούνται ως υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, οξείδωση DNA, υπεροξειδική δισμουτάση και σύστημα γλουταθειόνης. Ο κυριότερος δείκτης είναι οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μία από τις κύριες συνέπειες του οξειδωτικού στρες που προκαλεί σοβαρές βλάβες στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, προκαλεί αλλαγές στη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και μειώνει τη δραστηριότητα των ενζύμων που συνδέονται με τη μεμβράνη. Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι τα επίπεδα των TBARS ορού ή πλάσματος σε άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης Αλτσχάιμερ είναι σημαντικά υψηλότερα από ό,τι σε φυσιολογικούς.

Το 8-OHdG αποτελεί τον πιο συχνά μελετημένο βιοδείκτη για την οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων. Οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία αποκαλύπτουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του 8-OHdG σε άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης Αλτσχάιμερ από ό,τι σε φυσιολογικούς. (Lu C. H. et al, 2014).

Τα αντιοξειδωτικά προτείνονται ως πιθανοί έμμεσοι δείκτες επεξεργασίας του οξειδωτικού στρες σε άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης AD. Μελέτες παρουσιάζουν τα επίπεδα των εξωγενών αντιοξειδωτικών σε άτομα που εμφανίζουν υψηλό ρίσκο νόσησης να είναι χαμηλά, ενώ μελέτες μελετών που αφορούν τα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών ποικίλουν, καθώς άλλες δείχνουν μείωση στα επίπεδα και άλλες αισθητή αύξηση των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών. (Lu C. H. et al, 2014).

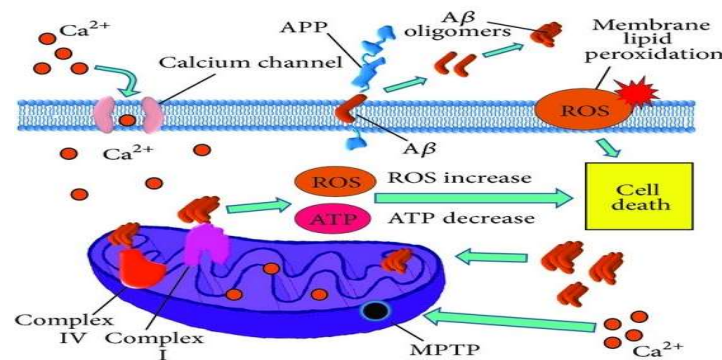
1.3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ROS και Αβ πεπτιδίων

Τα ROS μπορούν και προωθούν την παραγωγή των Αβ πεπτιδίων, ωστόσο και τα Αβ πεπτιδία με τη δικιά τους σειρά προάγουν την παραγωγή ROS δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο. Η υπερέκφραση της APP οδήγησε στην παραγωγή των Αβ πεπτιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό των πλακών γεγονός που οδήγησε στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ανιόντος του υδρογόνου, δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και σε μειωμένη παραγωγή ATP που οφείλεται σε αναστολή της λειτουργίας ειδικών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Με

αυτόν τον τρόπο απορρυθμίζεται η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας δημιουργώντας μια θετική ανατροφοδοτική αλυσίδα (Kirsty E A Muirhead I, Eva Borger, Laura Aitken, Stuart J Conway, Frank J Gunn-Moore, 2010)

Το αμυλοειδές β πεπτίδιο (Aβ) δεσμεύει την αφυδρογονάση της αλκοόλης (ABAD), ένα ένζυμο που υπάρχει στα νευρωνικά μιτοχόνδρια. Το ABAD φαίνεται να δρα ως μοριακός διακόπτης. Παρουσία χαμηλών επιπέδων Aβ, το ABAD μπορεί να παρουσιάζει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα, καθώς αυξάνονται τα επίπεδα Aβ, το ABAD χάνει την ικανότητά του να προστατεύει γεγονός που ενισχύει την τοξικότητα του Aβ και οδηγεί στο θάνατο νευρικών κυττάρων (Kazuhiro Takuma I, Jun Yao, Jianmin Huang, Hongwei Xu, Xi Chen, John Luddy, Anne-Cecile Trillat, David M Stern, Ottavio Arancio, Shirley Shidu Yan, 2005).

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και σε παραγωγή των Aβ πεπτιδίων, η υπερπαραγωγή και συσσώρευση των οποίων ενισχύει το οξειδωτικό στρες. Επομένως, η απορρύθμιση της μιτοχονδριακής αλυσίδας που οδηγεί σε παραγωγή των ROS ενισχύει σταδιακά την παθολόγηση του εγκεφάλου.



Εικόνα 13: Προώθηση της παραγωγής ROS από τα Aβ πεπτίδια.

1.3.3 Οξειδωτικό στρες και καταστροφή των συνάψεων

Οι συνάψεις είναι δομικά εξειδικευμένες περιοχές σε νευρώνες που διαδίδουν ένα ηλεκτρικό ή χημικό σήμα από το ένα κύτταρο στο άλλο. Κατά τη νευροδιαβίβαση, μόρια σηματοδότησης όπως το γλουταμικό, η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη και άλλα

που απελευθερώνονται από τις ενεργές ζώνες ενός προσυναπτικού νευρώνα συνδέονται και ενεργοποιούν υποδοχείς σε έναν μετασυναπτικό νευρώνα.

Η δύναμη της συναπτικής μετάδοσης εξαρτάται από τις αλλαγές στη νευρωνική δραστηριότητα όπου η δυναμική φύση της συναπτικής πλαστικότητας, συμπεριλαμβανομένης της μακροπρόθεσμης ενίσχυσης (LTP) και της μακροχρόνιας κατάθλιψης (LTD) αντιπροσωπεύει τον θεμελιώδη μηχανισμό της μάθησης και της μνήμης. Η AD χαρακτηρίζεται από προοδευτική εξασθένηση της μνήμης, η οποία σχετίζεται με την αναστολή της LTP και την ενίσχυση της LTD στον υπόκαμπο. Η απώλεια των συνάψεων στις πληγείσες περιοχές του εγκεφάλου συσχετίζεται καλύτερα με τη γνωστική εξασθένηση σε ασθενείς με AD και έχει θεωρηθεί ως ο πρώιμος μηχανισμός που προηγείται της νευρωνικής απώλειας.

Το φαινόμενο της LTP συνίσταται σε μια ετερογενή ομάδα διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών που εμπλέκουν μια πληθώρα κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στις οποίες σημαντικό ρόλο παίζει ο γλουταμινικός υποδοχέας NMDA και το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} , αύξηση του οποίου πυροδοτεί ενδοκυτταρικούς καταρράκτες που οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα ROS, οξειδωτικό στρες και διακυβεύονται περαιτέρω με τον κυτταρικό θάνατο.

Στη νόσο Αλτσχάιμερ, αυξημένα επίπεδα ROS, Αβ πλακών και φωσφορυλιωμένης tau επηρεάζουν την ενεργότητα των υποδοχέων NMDA. Υπερβολικές ποσότητες του γλουταμικού συνδέονται με έντονη παροδική εισροή Ca^{2+} οδηγώντας σε μιτοχονδριακές λειτουργικές βλάβες που χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση των μεταβατικών πόρων διαπερατότητας στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, με απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και εξάντληση του ATP και ταυτόχρονο σχηματισμό ROS. Τα παραπάνω οδηγούν εν τέλει στο να χάνεται σταδιακά η πλαστικότητα των νευρώνων και να καταστρέφονται οι συνάψεις.

1.3.4 Οξείδωση Λιπιδίων στη νόσο Alzheimer

Ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε φωσφολιπίδια, τα οποία είναι κρίσιμα για διεργασίες νευροδιαβίβασης και για την επικοινωνία των νευρώνων. Τα φωσφολιπίδια του εγκεφάλου περιέχουν υψηλή ποσότητα PUFAs, ιδιαίτερα το δοκοσαεξανοϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. Έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνεται η παραγωγή των ελεύθερων ριζών, μειώνεται σταδιακά το περιεχόμενο των PUFA στον εγκέφαλο.

Επιπλέον, τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία είναι ιδιαίτερα ασταθείς και μπορούν να αποσυντεθούν αυτόματα σε διάφορα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των MDA, 4-HNE, κετόνες, εποξειδία και υδρογονάνθρακες παρουσία σιδήρου. Αρκετές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει μια αύξηση του MDA και των επιπέδων 4-HNE στους εγκεφάλους ασθενών με AD και ήπια γνωστική εξασθένηση (MCI).

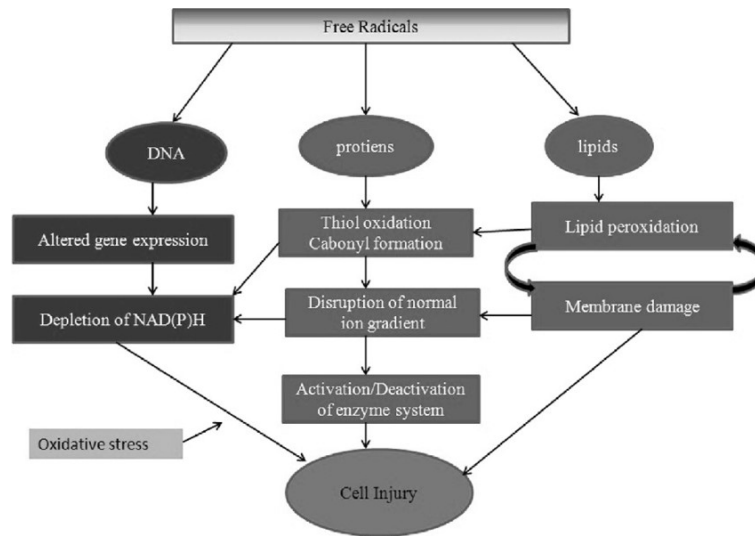
Η παραγωγή ισοπροστανίου είναι ένα άλλο αποτέλεσμα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Τα F2-IsoPs παράγονται από αραχιδονικό οξύ μέσω εστεροποίησης. Μια άλλη μελέτη βρήκε επίσης ότι αύξηση των επιπέδων στη ποσότητα των F2-IsoPs και F4-IsoP στο ENY σε ασθενείς με MCI. (*Zhichun Chen, Chunjiu Zhong, 2014*)

1.3.5 Οξειδωση Πρωτεϊνών στη νόσο Alzheimer

Αυξημένο επίπεδο πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενός δείκτη οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες, έχει αποδειχθεί στον εγκέφαλο ασθενών με AD. Αντιδράσεις διαφόρων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και δραστικών μορφών αζώτου (RNS) με τυροσίνη έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 3-νιτροτυροσίνης και της διτυροσίνης, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε πρώιμο στάδιο στην παθογένεση της AD. (*Zhichun Chen, Chunjiu Zhong, 2014*)

1.3.6 Οξειδωση DNA στη νόσο Alzheimer

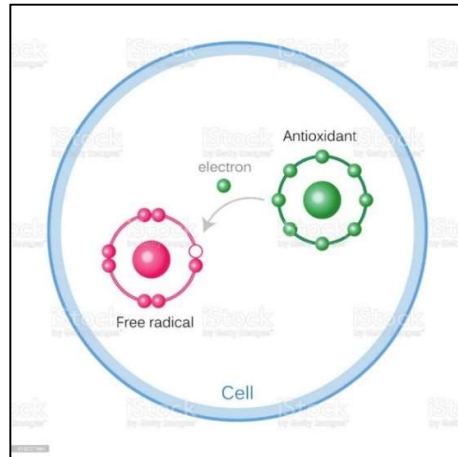
Η οξειδωση του DNA μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό 8-OHdG. Η οξειδωτική τροποποίηση στο RNA είναι επίσης αυξημένη στον εγκέφαλο ασθενών με AD. Είναι ενδιαφέρον ότι το 8-OHG φαίνεται να προηγείται όλων των τυπικών σημάτων κατατεθέν της AD, όπως NFTs και πλάκες Αβ, και συγκεκριμένα εμφανίζεται δεκαετίες πριν από την Αβ συσσώρευση σε ασθενείς με AD. Ένας άλλος τρόπος μέτρησης της οξειδωσής του DNA είναι ο προσδιορισμός της θραύσης του κλώνου του DNA. Έχει αναφερθεί ότι το επίπεδο θραύσης του DNA στον εγκεφαλικό φλοιό των ασθενών με AD είναι διπλάσιος από αυτόν στους μάρτυρες.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση της οξείδωσης νουκλεϊκών, πρωτεϊνών και λιπιδίων και οι συνέπειες που φέρουν στο κύτταρο.

1.3.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί έναντι του οξειδωτικού στρες

Ο οργανισμός διαθέτει αρκετούς μηχανισμούς για να αντισταθμίσει το οξειδωτικό στρες με την παραγωγή αντιοξειδωτικών, τα οποία είτε παράγονται φυσικά *in situ* (ενδογενή αντιοξειδωτικά) είτε προμηθεύονται εξωτερικά μέσω τροφών ή συμπληρωμάτων (εξωγενή αντιοξειδωτικά). 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 ουσιαστικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το άτομο υδρογόνου ή ηλεκτρόνιο που τους λείπει, ώστε να τις σταθεροποιήσουν και να τις εμποδίσουν να προσεγγίσουν άλλα μόρια και να τα οξειδώσουν. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών, λοιπόν, είναι να εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελεύθερων ριζών, να προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.



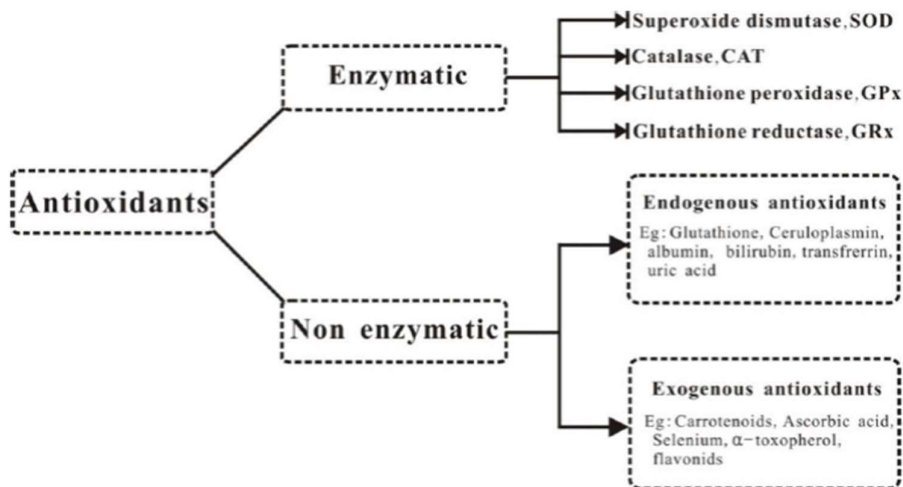
Εικόνα 15: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση:

- την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή)
- τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα)
- τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική)

Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 16 : Κατηγορίες ενζυματικών και μη-ενζυματικών αντιοξειδωτικών

Στα αντιοξειδωτικά με ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως : η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Η δράση των

παραπάνω ενζύμων είναι να καταλύουν τη διάσπαση των ROS στο ενδοκυττάριο περιβάλλον.

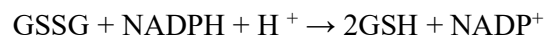
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο και περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο το ιχνοστοιχείο σελήνιο. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης ανάγουν οργανικά και ανόργανά υπεροξεία προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH).



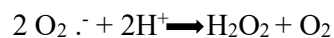
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφιδρυλομάδες που αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH. Η εν λόγω αντίδραση είναι η εξής:



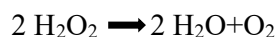
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) καταλύει τη μετατροπή σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Καταλάση (CAT)

Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα και το κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων. Καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω αντίδραση:

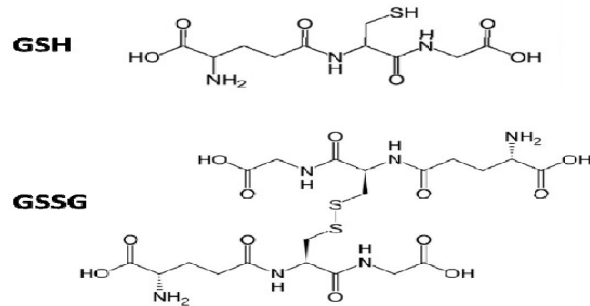


. Έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα αυτών των δύο ενζύμων(**SOD,CAT**) μειώνεται δραστικά κατά τη νόσο Αλτσχάιμερ. Ωστόσο, σε κάποια στάδια της ασθένειας έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων όχι όμως σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου περιλαμβανόμενου του μετωπιαίου, μετακεντρικού και ινιακού λοβού.

Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα ενδογενή και στα εξωγενή μέσω της διατροφής .Στα εξωγενή περιλαμβάνονται η βιταμίνη Α (ρετινόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) και οι πολυφαινόλες. Στα ενδογενή περιλαμβάνονται οι θειόλες (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και τα ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.

Ένα από τα σημαντικότερα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη και τον σημαντικότερο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Είναι ένα τριπεπίδιο που συντίθεται από τα αμινοξέα : L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη και γλυκίνη. Η γλουταθειόνη εντοπίζεται στο κύτταρο σε δύο μορφές, την οξειδωμένη (GSSG) και την ανηγμένη (GSH). Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή .Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί δείκτη οξειδωτικού stress σε έναν οργανισμό. Η γλουταθειόνη εμπλέκεται στη νευροπροστατευτική δράση ενάντια σε πληθώρα εξωγενών και ενδογενών νευροτοξινών, ενώ αλλαγές στον μεταβολισμό της έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον, και η νόσος Αλτσχάιμερ.



Εικόνα : Συντακτικοί τύποι της γλουταθειόνης, (Α) ανηγμένη μορφή και (Β) οξειδωμένη μορφή

Εκτός από την ευρεία αύξηση των οξειδωτικών βιομορίων έχει αναφερθεί επανειλημμένα σημαντική μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών ή της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας. Τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο πλάσμα όπως η αλβουμίνη, η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ, το λυκοπένιο, η βιταμίνη Α, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E βρέθηκαν να **μειώνονται** σε ασθενείς με AD. (Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. 2014).

Η προαγωγή των αμυντικών συστημάτων θεωρείται ότι επάγεται λόγω χρόνιας έκθεσης σε οξειδωτικό στρες. Στη νόσο Αλτσχάιμερ όμως, υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν την ανεπιτυχή προσπάθεια των κυττάρων να μειώσουν το οξειδωτικό στρες και να αποφύγουν τη βλάβη (Wojda U. et al, 2018).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η νόσος Alzheimer είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Αναφερόμενοι στην αιτιολογία της νόσου, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας καθώς εμπλέκονται στον εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων. Το χρόνιο στρες οδηγεί σε καταστροφή βασικών συστατικών του κυττάρου με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι κυτταρικές λειτουργίες. Συνεπώς, η συσσώρευση οξειδωμένων βιομορίων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της νόσου. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα ENY από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ, ώστε να αξιολογηθεί το οξειδωτικό στρες και η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των ατόμων. Για αυτήν την σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Λήφθηκε ENY από 94 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο προσδιορισμός την ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) και η αναγωγική ισχύς (Reducing Power). Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σύγκριση αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μετρήσεις σε ίδια δείγματα ίδιων ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Στην προκειμένη διπλωματική ως βιολογικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ENY των ατόμων, ενώ στη μελέτη που είχε προηγηθεί είχε χρησιμοποιηθεί ως βιολογικό δείγμα ο ορός πλάσματος από 94 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

Για αυτήν την σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Το ENY, το υγρό που περιβάλλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα(ΚΝΣ), έχει ύψιστη κλινική σημασία. Είναι σε ισορροπία με τον εγκέφαλο, με τον νωτιαίο μυελό και με το εξωκυττάριο υγρό και αντανακλά την κατάσταση της υγείας και της δραστηριότητας του ΚΝΣ και προσφέρει αξιόπιστη, αν και έμμεση, εκτίμηση της φυσιολογίας του εγκεφάλου και των δυσλειτουργιών του. Για αυτήν την σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Λήφθηκε ENY από 94 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, προσδιορίστηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων μέσω ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και η αναγωγική ισχύς(Reducing Power). Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σύγκριση αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μετρήσεις σε ίδια δείγματα ίδιων ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Στην προκειμένη διπλωματική ως βιολογικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ENY των ατόμων , ενώ στη μελέτη που είχε προηγηθεί είχε χρησιμοποιηθεί ως βιολογικό δείγμα ο ορός πλάσματος από 94 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου.

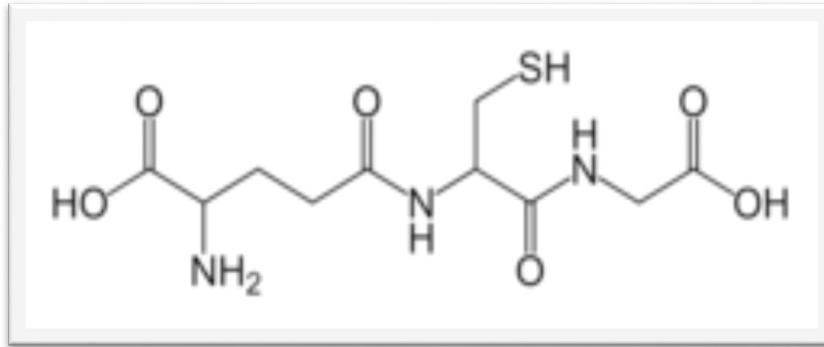
Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασφατοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

3.2 Μέτρηση της Ανηγμένης γλουταθειόνης, GSH

Αρχή της μεθόδου

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστείνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο

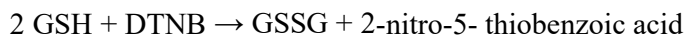
αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας(*Pastore et al., 2003*).



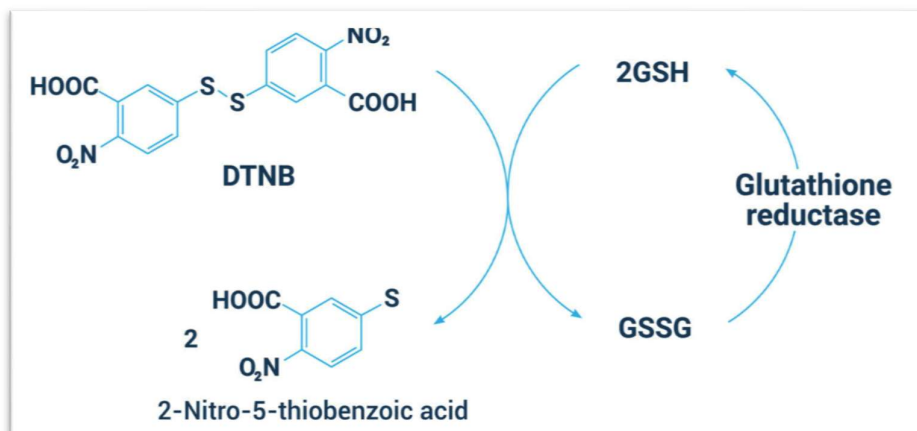
Εικόνα 18: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη λειτουργεί ως υπόστρωμα σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών(*Sengupta et al., 2004*).

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρίεται στο ENY. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (*Reddy et.al.,2004*).



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 19: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της Γλουταθειόνης

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Πριν τη μέτρηση πραγματοποιείται καθαρισμός των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό, προστίθενται 100μL ENY σε 200μL TCA 5% και κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση στα 15.000g για 5 min στους 5° C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται σε νέα erppendorf.

Στη συνέχεια, στα tube προστίθενται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και του ENY που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

	Blank	Sample
Tris-HCl 400Mm (pH 7.4)	700μL	700μL
ENY	-	200μL
DTNB 1 mM	100μL	100μL
TCA 10%	200μL	-

Πίνακας 2: Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων

Αναδεύουμε τα erppendorfs και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση τους στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10'. Η διατήρηση τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ DTNB και GSH. Επόμενο βήμα αποτελεί η μεταφορά του περιεχομένου σε πλαστική κυψελίδα και ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm (*Beers & Sizer, 1952*).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού} / 13.6) * 2 * 1000 / 20$,

πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογιστεί η 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με $2 * 1.3$ για να συνυπολογιστεί η πρώτη (50 μL αιμολύματος / 50 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

3.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

Αρχή της Μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος και των ιστών, να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Ποσοτικοποίηση αυτής μπορεί να γίνει είτε αθροίζοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε συστατικού ξεχωριστά είτε με μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl – 2 – picrylhydrazine). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janas Zweska και Bartos Z.,(2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για το πείραμα χρειάζεται ένα διάλυμα Phosphate Buffer 10 mM με pH 7.4 και ένα διάλυμα αραιού DPPH το οποίο είναι το βασικό αντιδραστήριο. Το DPPH παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια

ετοιμάζονται τα erpendorfs. Στο καθένα erpendorf προστίθενται οι παρακάτω ποσότητες σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί.

	Blank	Θετικό control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	—	5 μL	—
ENY	—	—	20 μL

Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC.

Ακολουθεί ανακίνηση των Erpendorfs μερικές φορές και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση τους στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντας την στην πιο σταθερή ένωση, την υδραζίνη. Ακολούθως πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 15000g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφορά 900ml από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 520nm.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / ml πλάσματος = $[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 50 * 50] / 1000$

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

β) Πολλαπλασιασμός με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

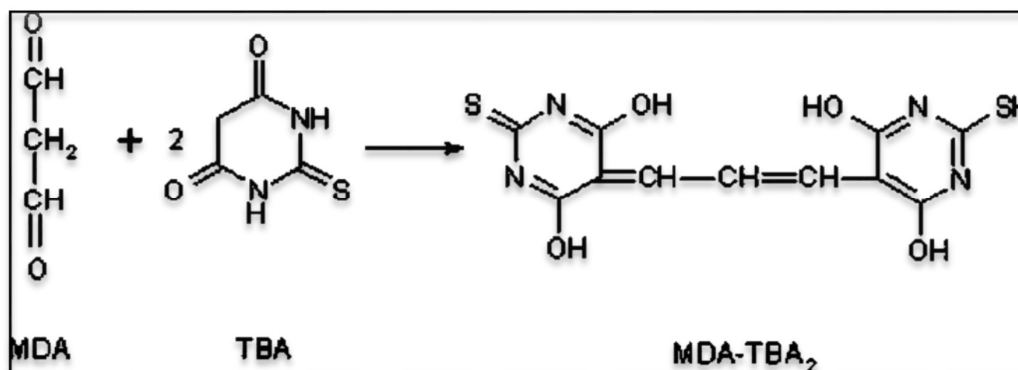
γ) Πολλαπλασιασμός με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαίρεση με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε ml ορού.

3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

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



Εικόνα 20: Αντίδραση TBA με MDA που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μία ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του *Keles et al.,(2001)*. Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95°C.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Ετοιμάζονται 2 Falcon για κάθε δείγμα και 2 Falcon για το τυφλό. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon προστίθενται 100 μL ENY και 100 μL PBS για το τυφλό. Στη συνέχεια, προστίθενται 500 μL Tris – HCl και 500 μL 35% TCA και ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων. Έπειτα, τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Μόλις τελειώσει ο χρόνος της επώασης προστίθενται 1 mL Na₂SO₄ – TBA και τα δείγματα τοποθετούνται στους 95° C για 45 λεπτά μέσα στο υδατόλουτρο. Ύστερα, τα Falcon μεταφέρονται στον πάγο και αφήνονται να κρυώσουν για 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 1 mL TCA 70% και ακολουθεί ανάδευση. Αμέσως μετά μεταφέρονται 1 mL δείγματος σε erpendorfs και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11200 g για 5 λεπτά. Τέλος, η οπτική απορρόφηση μετριέται στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

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

3.5 Αναγωγική Ισχύς, Reducing power assay

Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγική ισχύς σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να χρησιμεύει ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι ενώσεις με αναγωγική ισχύ

είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, έτσι ώστε να μπορούν να λειτουργούν ως πρωτογενή ή δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Σε αυτό το τεστ, το κίτρινο χρώμα του αρχικού αντιδραστηρίου αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα της αναγωγικής ισχύος των ουσιών. Η παρουσία αυτών των ουσιών έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του τρισθενή σιδήρου σε δισθενή.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα tubes:

	Blank	Control	Sample
ENY	-	-	10μL
Phosphate buffer (0.2M,pH 6.6)	500 μL	250μL	240μL
Potassium ferricyanide	-	250μL	250μL
Επώαση στους 50°C για 20΄			
TCA	250μL	250μL	250μL
Φυγοκέντρηση στα 3000rpm			
dH₂O	250μL	250μL	250μL
Ferric chloride	50μL	50μL	50μL

Πίνακας 4: Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος

Σε tubes, 10 μL πλάσματος (αραιωμένο 1:4) προστίθενται σε 250 μL σιδηροκυανιούχου καλίου 1% (Potassium ferricyanide) και 230 μL ρυθμιστικού Phosphate buffer (0,2M, pH 6,6). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμική πλάκα (50 °C), όπου επωάζονται για 20 λεπτά. Τα δείγματα ψύχονται και προστίθενται 250 μL TCA 10%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστίθενται 250 μL dH₂O και 500 μL χλωριούχου σιδήρου 0,1 % (ferric chloride) . Επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm.

Υπολογισμοί

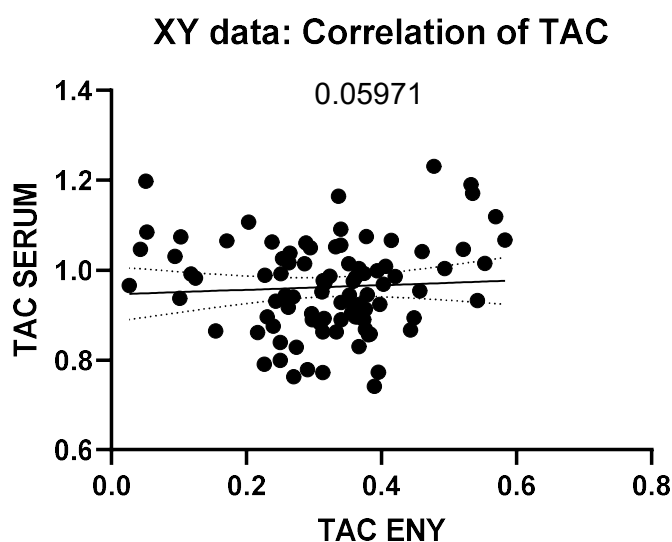
$$\% \text{ Abs reduction} = (\text{Abs δείγματος} - \text{Abs control}) / \text{Abs δείγματος} * 100$$

$$\text{mmol potassium ferricyanide} / \text{ml} = [(\% \text{ Abs reduction} / 100) * 7.14 * 210] / 1000,$$

- i) Διαίρεση με το 100 ώστε να μετατραπεί τη ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση.
- ii) Πολλαπλασιασμός με το 7.14 καθώς τόση είναι η συγκέντρωση του potassium ferricyanide στην αντίδραση.
- iii) Διαίρεση με το 1000 ώστε να μετατραπούν τα L σε ml.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που μετρήθηκαν προέρχονταν από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Λήφθηκε ENY από 94 άτομα συνολικά. Σε αυτά τα δείγματα, μετρήθηκαν δείκτες οξειδοαναγωγής ώστε να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Οι δείκτες αυτοί ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη, οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τέλος η αναγωγική ισχύς(RP). Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ ENY και ορού. Χρησιμοποιήθηκε ο **συντελεστής συσχέτισης Pearson r**, (παραμετρικός) στατιστικός δείκτης προκειμένου να αξιολογηθεί εάν υπάρχει συνάφεια μεταξύ των δύο μεταβλητών(ENY και ορού).



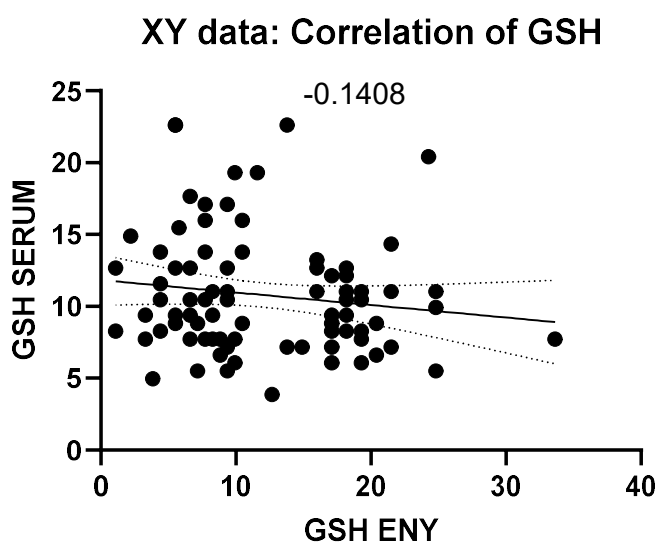
Σχήμα 1: Συσχέτιση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε δείγματα ορού και ENY

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1 (διάγραμμα διασποράς)** , όσο αυξάνονται οι τιμές της TAC στον ορό , δεν παρουσιάζουν την ανάλογη αύξηση με τις τιμές TAC στο ENY στο ίδιο άτομο. Ο συντελεστής r έχει τιμή $r = 0.05971$.

- Αν $r = \pm 1$ υπάρχει τέλεια γραμμική συσχέτιση
- Αν $-0,3 \leq r < 0,3$ δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση

- Αν $-0,5 < r \leq -0,3$ ή $0,3 \leq r < 0,5$ υπάρχει ασθενής γραμμική συσχέτιση.
- Αν $-0,7 < r \leq -0,5$ ή $0,5 \leq r < 0,7$ υπάρχει μέση γραμμική συσχέτιση.
- Αν $-0,8 < r \leq -0,7$ ή $0,7 \leq r < 0,8$ υπάρχει ισχυρή γραμμική συσχέτιση.
- Αν $-1 < r \leq -0,8$ ή $0,8 \leq r < 1$ υπάρχει πολύ ισχυρή γραμμική συσχέτιση.

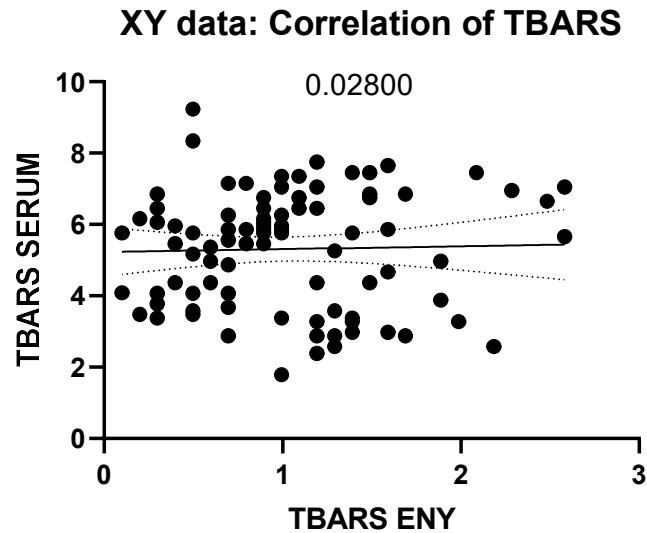
Το r στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πολύ χαμηλό και βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ορό και στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0,05$. (Η κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα άτομο που έχει συγκεκριμένο βαθμό TAC στον ορό και συγκεκριμένο βαθμό TAC στο ENY)



Σχήμα 2: Συσχέτιση της ανηγμένης γλουταθειόνη (GSH) σε δείγματα ορού και ENY

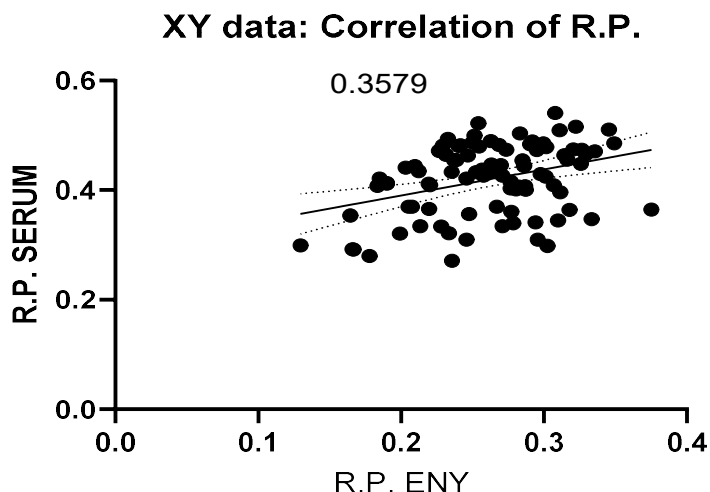
Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2 (διάγραμμα διασποράς)**, ο συντελεστής r έχει τιμή αρνητική, $r=-0,1408$. Αφού η τιμή του r είναι αρνητική σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα αρνητικής συσχέτισης ανάμεσα στον ορό και στο ENY. Δηλαδή, όσο αυξάνονται τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον ορό, τόσο μειώνονται στο ENY. Στο σχήμα 2, φαίνεται πως όσο αυξάνονται οι τιμές στον ορό δεν υπάρχει αντίστοιχη μείωση στο ENY. Επιπλέον το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$ και είναι πολύ χαμηλό, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ανηγμένης γλουταθειόνης στον ορό και στο ENY. Το όριο

σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$. (Η κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα άτομο που έχει συγκεκριμένο βαθμό GSH στον ορό και συγκεκριμένο βαθμό GSH στο ENY).



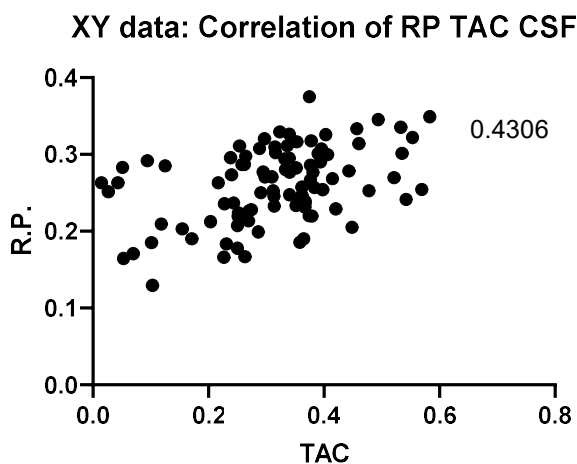
Σχήμα 3: Συσχέτιση τιμών της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) στον ορό και στο ENY

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3** (διάγραμμα διασποράς), όσο αυξάνονται οι τιμές των TBARS στον ορό δεν υπάρχει ανάλογη αύξηση στις τιμές TBARS στο ENY. Επιπρόσθετα ο συντελεστής r έχει τιμή $r = 0,02800$. Το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$ και είναι πολύ χαμηλό, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές υπεροξειδωσης των λιπιδίων στον ορό και στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p < 0.05$. (Η κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα άτομο που έχει συγκεκριμένο βαθμό TBARS στον ορό και συγκεκριμένο βαθμό TBARS στο ENY)



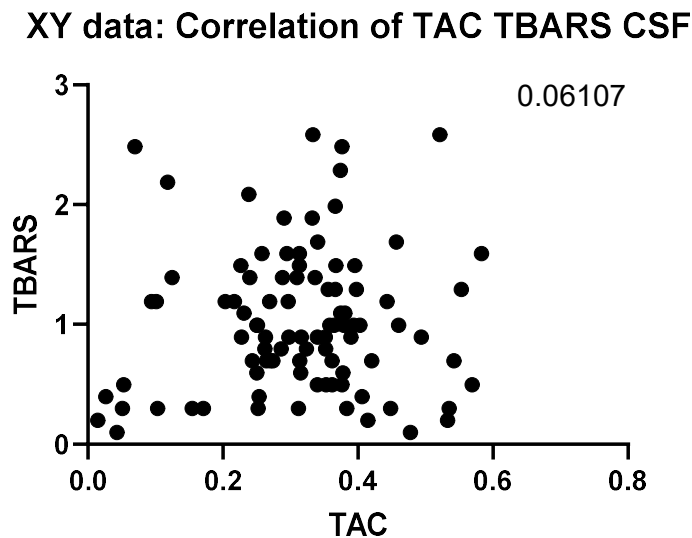
Σχήμα 4: Συσχέτιση της αναγωγικής ισχύος R.P. σε δείγματα ορού και ENY

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4** (διάγραμμα διασποράς), όσο αυξάνονται οι τιμές R.P στον ορό αυξάνονται και οι τιμές R.P στο ENY, για το ίδιο άτομο. Επιπλέον, ο συντελεστής r έχει τιμή $r=0,3579$. Το r που είναι ανάμεσα στα όρια $0,3 \leq r < 0,5$ παρουσιάζει μία ασθενή τάση για σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της αναγωγικής ισχύος στον ορό και στο ENY. (Η κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα άτομο που έχει συγκεκριμένο βαθμό R.P στον ορό και συγκεκριμένο βαθμό R.P. στο ENY).



Σχήμα 5: Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της αναγωγικής ισχύος (R.P) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε δείγματα ENY

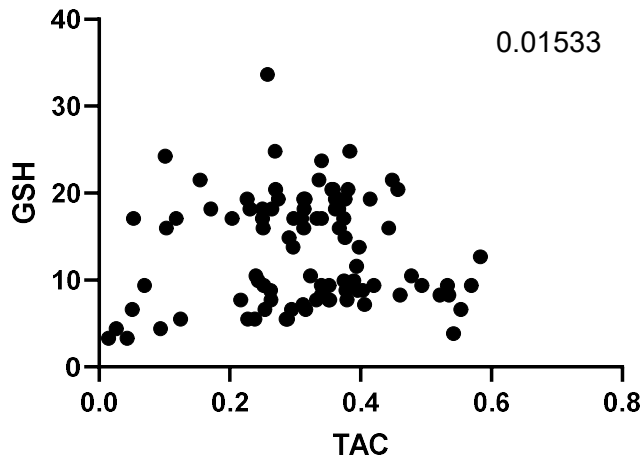
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5 (διάγραμμα διασποράς), η τιμή του συντελεστή r είναι $r=0,4306$. Το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $0,3 \leq r < 0,5$. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει μία ασθενής τάση για γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων, της αναγωγικής ισχύος και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο ENY. Δηλαδή, όσο αυξάνεται η τιμή της R.P υπάρχει πιθανότητα να αυξάνεται και η τιμή της TAC και αντίστοιχα, όσο μειώνεται η τιμή της R.P υπάρχει πιθανότητα να μειώνεται η τιμή της TAC.



Σχήμα 6: Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (TBARS) σε δείγματα ENY

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6 (διάγραμμα διασποράς), όσο αυξάνονται οι τιμές των TBARS δεν αυξάνονται αναλογικά οι τιμές των TAC στο ENY. Επιπλέον, η τιμή του συντελεστή r είναι $r=0.06107$. Το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $- 0,3 \leq r < 0,3$ και είναι χαμηλό, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεθόδους, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (TBARS) στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$.

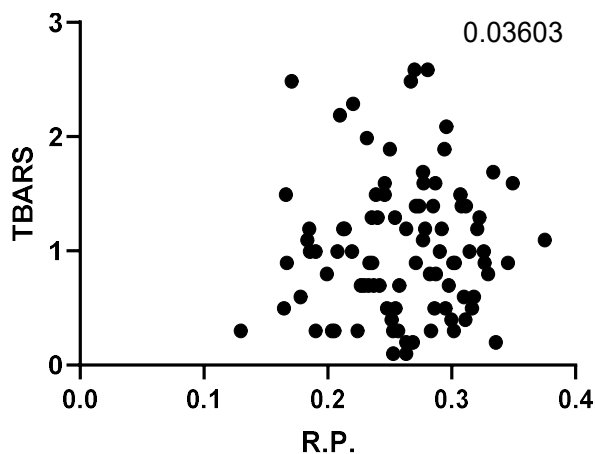
XY data: Correlation of TAC GSH CSF



Σχήμα 7: Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε δείγματα ENY

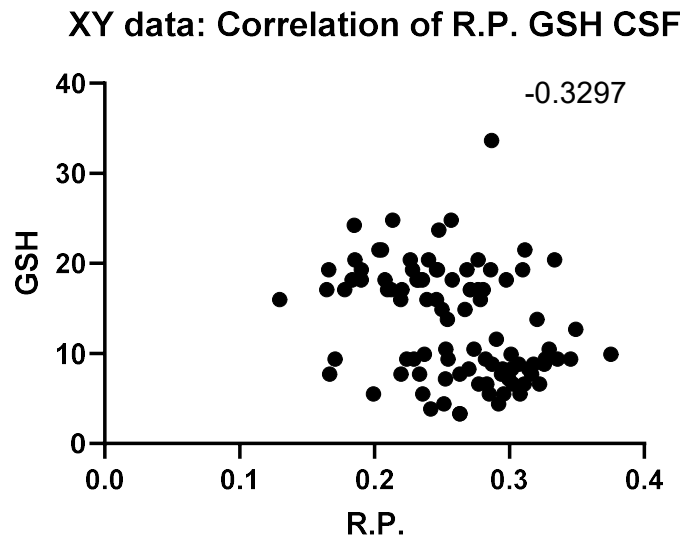
Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 7(διάγραμμα διασποράς)**, όσο αυξάνονται οι τιμές της ανηγμένης γλουταθειόνης GSH δεν υπάρχει αντίστοιχη αύξηση στις τιμές της TAC στο ENY. Επιπλέον, η τιμή του συντελεστή r είναι $r=0.01533$. Το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$ και είναι πολύ χαμηλό, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεθόδους, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$.

XY data: Correlation of R.P. TBARS CSF



Σχήμα 8: Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της αναγωγικής ισχύος (R.P) και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) σε δείγματα ENY

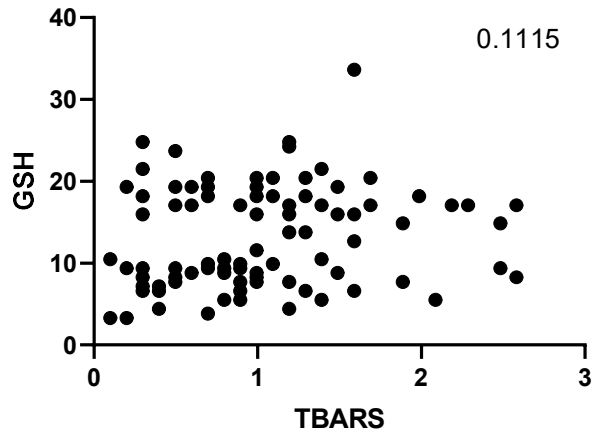
Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 8 (διάγραμμα διασποράς)**, όσο αυξάνονται οι τιμές των TBARS δεν αυξάνονται αναλογικά και οι τιμές της R,P στο ENY. Επιπλέον, η τιμή του συντελεστή r είναι $r=0.03603$. Το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$ και είναι πολύ χαμηλό, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεθόδους, της αναγωγικής ισχύος και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$.



Σχήμα 9: Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της αναγωγικής ισχύος (R.P) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε δείγματα ENY

Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 9 (διάγραμμα διασποράς)**, η τιμή του συντελεστή r είναι αρνητική και είναι $r=-0.3297$. Το r βρίσκεται ανάμεσα σε αυτά τα όρια $-0,5 < r \leq -0,3$.Επομένως υπάρχει μία τάση(ασθενής) για αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Δηλαδή, όσο θα αυξάνονται οι τιμές της GSH οι τιμές της R.P θα έχουν την τάση να μειώνονται. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο σχήμα 9, βλέπουμε πως όσο αυξάνονται οι τιμές της GSH δεν μειώνονται αναλογικά οι τιμές της R.P. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$.

XY data: Correlation of TBARS GSH CSF



Σχήμα 10: : Συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε δείγματα ENY

Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 10 (διάγραμμα διασποράς)**, όσο αυξάνονται οι τιμές της GSH δεν αυξάνονται αναλογικά οι τιμές TBARS στο ENY. Επιπλέον, η τιμή του συντελεστή r είναι 0.1115. Το r είναι χαμηλό και βρίσκεται ανάμεσα σε αυτά τα όρια $-0,3 \leq r < 0,3$. Επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεθόδους, της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο ENY. Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Alzheimer είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Χαρακτηρίζεται από εξασθένηση των γνωστικών (νοητικών) λειτουργιών, αλλαγές στην προσωπικότητα και ασταθή συμπεριφορά, σε βαθμό που να επηρεάζεται η ικανότητα για ανεξάρτητη διαβίωση. Η αιτιολογία είναι πολυπαραγοντική και ακόμη υπό διερεύνηση, λαμβάνοντας υπόψιν γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου. (Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW.) Οι δομικές αλλαγές στον εγκέφαλο και κατ'επέκταση οι λειτουργικές αλλαγές συμβαίνουν σε πολύ αρχικά στάδια της ασθένειας, σε προ-κλινική φάση (Chaffer – Pericas et al, 2018). Μέχρι σήμερα, δεν υφίσταται αιτιολογική θεραπεία για την AD και οι έρευνες συνεχίζονται για την έγκαιρη διάγνωση της σε αρχικά στάδια της εξέλιξης της, ενώ άλλες έρευνες συνεχίζονται για την εύρεση βιοδεικτών οι οποίοι θα μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με τα νευροπαθολογικά συμπτώματα της AD (Mantzavinos V, Alexiou A, 2017). Η έγκαιρη διάγνωση σε συνδυασμό με νέες θεραπευτικές μεθόδους μπορούν να καθυστερήσουν ή να αποτρέψουν τις μη αναστρέψιμες συνέπειες της νόσου Αλτσχάιμερ. (Mantzavinos V, Alexiou A, 2017).

Το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση και στην εξέλιξη πολλαπλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου Αλτσχάιμερ (Tönnies, E., & Trushina, E., 2017). Στη νόσο Αλτσχάιμερ, το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί ως το κυρίαρχο αίτιο της παθογένεσης και της εξέλιξης της νόσου. Αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που σχετίζονται με απώλεια λειτουργίας των μιτοχονδρίων εξαρτώμενων από την ηλικία και την ασθένεια, αλλοιωμένη ομοιόσταση των μετάλλων και μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα οδηγούν στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες. Οι πιο κοινές δραστικές μορφές που απαντώνται σε κύτταρα και ιστούς είναι εκείνες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο και το άζωτο.

Προκειμένου ο οργανισμός να αντιμετωπίσει τέτοιες καταστάσεις, έχει αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας οι οποίοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, : ενζυμικούς και μη ενζυμικούς, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως: η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Η δράση των παραπάνω ενζύμων είναι να καταλύουν τη διάσπαση των ROS στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Στις μη ενζυμικές

αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνονται: η βιταμίνη Α (ρετινόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, οι θειόλες (γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και τα ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.

Το κομμάτι της πληροφορίας που συνδέει το οξειδωτικό στρες με τη νόσο Αλτσχάιμερ είναι τεράστιο καθώς προστίθεται συνεχώς νέα πληροφορία σε αυτό με αποτέλεσμα η βιβλιογραφία να αλλάζει συνεχώς με ταχείς ρυθμούς. Τα τελευταία χρόνια και στην προσπάθεια αναζήτησης τροποποιητικών θεραπειών της νόσου, αυξήθηκε το ενδιαφέρον για ανεύρεση βιοδεικτών έτσι ώστε να διαγιγνώσκεται η νόσος με μεγαλύτερη ακρίβεια και όσο το δυνατόν στα πρόδρομα στάδιά της. Το κύριο χαρακτηριστικό ενός βιοδείκτη για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί είναι να εντοπίζει την πιθανότητα νόσησης σε πολύ αρχικά στάδια σε προκλινικό στάδιο, ώστε να συνδέεται με την εξέλιξη της νόσου. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες θα πρέπει να χαρακτηριστούν ως αξιόπιστοι, καθώς το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε όλη της διαδικασία της νόσου και θα μπορούν να προβλέψουν αποτελεσματικά το ρίσκο εμφάνισης της νόσου (Marra C. A. et al, 2012).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Σύμφωνα με τα στοιχεία που προκύπτουν από αυτήν τη μελέτη οδηγούμαστε σε συμπεράσματα σχετικά με την κατάσταση του οξειδωτικού στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), ως βιολογικό δείγμα. Λήφθηκε ENY από 94 άτομα συνολικά. Αυτά τα άτομα έχουν υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Σε αυτά τα δείγματα, μετρήθηκαν οι δείκτες οξειδοαναγωγής ώστε να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Οι δείκτες αυτοί ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (-GSH), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) προκειμένου να διερευνηθούν τα επίπεδα της οξείδωσης των λιπιδίων και τέλος η αναγωγική ισχύς (RP), μέσω της οποίας έγινε εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή.

Η επιλογή μέτρησης των συγκεκριμένων δεικτών έγινε καθώς αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Αρχικά ο δείκτης που μετρήθηκε ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο όρος αυτός

αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος, να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της TAC (**Σχήμα 1**) όσο αυξάνονται οι τιμές στον ορό, δεν παρουσιάζουν την ανάλογη αύξηση με τις τιμές στο ENY στο ίδιο άτομο. Η τιμή p που προέκυψε μετά από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερη από 0.05, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στον ορό και στο ENY.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη αποτελεί έναν σημαντικό ενδογενή αντιοξειδωτικό μεταβολίτη έναντι των δραστικών ειδών, καθώς ο σουλφιδικός δεσμός της κυστεΐνης οξειδώνεται, ανάγοντας ελεύθερες ρίζες. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (**Σχήμα 2**), φάνηκε ότι η τιμή του r είναι αρνητική που σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα αρνητικής συσχέτισης ανάμεσα στον ορό και στο ENY. Ωστόσο, όσο αυξάνονται οι τιμές στον ορό δεν υπάρχει αντίστοιχη μείωση στο ENY. Η τιμή p που προέκυψε μετά από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερη από 0.05, επομένως, δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ανηγμένης γλουταθειόνης στον ορό και στο ENY.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, μέσω μέτρησης των επιπέδων ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μία από τις κύριες συνέπειες του οξειδωτικού στρες που προκαλεί σοβαρές βλάβες στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, προκαλεί αλλαγές στη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και μειώνει τη δραστηριότητα των ενζύμων που συνδέονται με τη μεμβράνη. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αποτελεί έναν καίριο βιοδείκτη για την νόσο Αλτσχάιμερ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (**Σχήμα 3**), δεν υπάρχει ανάλογη αύξηση στις τιμές TBARS στο ENY, με τις τιμές TBARS στον ορό για το ίδιο άτομο. Η τιμή p που προέκυψε μετά από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερη από 0.05, επομένως δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές υπεροξειδωσης των λιπιδίων στον ορό και στο ENY.

Ένας άλλος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η αναγωγική ισχύς (Reducing Power). Η αναγωγική ισχύς σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα ενώσεων να

δίνουν ένα ηλεκτρόνιο ανάγοντας τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, μέσω της μετατροπής του τρισθενούς σιδήρου (Fe_3^+), σε δισθενή (Fe_2^+). Από τα αποτελέσματα (**Σχήμα 4**), φάνηκε ότι όσο αυξάνονται οι τιμές R.P στον ορό αυξάνονται παράλληλα και οι τιμές R.P στο ENY, για το ίδιο άτομο. Το r που είναι ανάμεσα στα όρια $0,3 \leq r < 0,5$ παρουσιάζει μία ασθενή τάση για σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της αναγωγικής ισχύος στον ορό και στο ENY.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των μεθόδων που μετρήθηκαν στο ENY προκειμένου να δειχθεί αν υπάρχει συσχέτιση αναμεσα τους. Μεταξύ των μεθόδων TAC και R.P, το r βρίσκεται ανάμεσα στα όρια $0,3 \leq r < 0,5$ (**Σχήμα 5**). Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει μία ασθενής τάση για γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων, της αναγωγικής ισχύος και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο ENY, επειδή όμως η τιμή p που προέκυψε μετά από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερη από 0.05 η συσχέτιση δεν είναι σημαντική. Επιπλέον μεταξύ των μεθόδων της GSH και R.P βλέπουμε πως όσο αυξάνονται οι τιμές της GSH δεν μειώνονται αντίστοιχα οι τιμές της R.P (**Σχήμα 9**). Το όριο σημαντικότητας ήταν $p \geq 0.05$, επομένως η συσχέτιση δεν είναι σημαντική.

Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ($p \geq 0.05$), άρα η συσχέτιση του ορού και του ENY δεν δείχνει κάποια σύνδεση μεταξύ τους.

Όσον αφορά τη γλουταθειόνη οι απόψεις από τη βιβλιογραφία δίστανται. Κάποιες έρευνες θεωρούν ότι δεν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα της γλουταθειόνης μεταξύ υγιών ατόμων με ρίσκο νόσησης και ασθενών με τη νόσο Αλτσχάιμερ. Άλλες έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης είναι σημαντικά μειωμένα, ενώ τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης σχετίζονται με μειωμένο ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ και επιβράδυνση της εκτελεστικής λειτουργίας (*Charisis, S., Et al, 2020*).

Υπάρχουν όμως και έρευνες οι οποίες έχουν αποκαλύψει ότι τα άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου υποφέρουν από αναγωγικό στρες χρόνια πριν από την ανάπτυξη της νόσου. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2013 τα αποτελέσματα εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης και υψηλότερη έκφραση

ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα (Vina J. et al, 2013). Στην προκειμένη περίπτωση η εξήγηση που δόθηκε ήταν ότι οι ελεύθερες ρίζες παράγονται φυσιολογικά όμως τα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπερλειτουργούν φορτώνοντας με αυτόν τον τρόπο την αντιοξειδωτική άμυνα. Κάποια στιγμή πριν την εμφάνιση της ασθένειας το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας θα καταρρεύσει. Όταν συμβεί αυτό, δηλαδή όταν καταρρεύσει το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας, οι ελεύθερες ρίζες θα συσσωρευτούν οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και το άτομο έχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Στο πείραμα που είχε προηγηθεί (όπου είχε χρησιμοποιηθεί ο ορός πλάσματος ως βιολογικό δείγμα) παρατηρήθηκαν σε αυτό αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης και αναγωγικής ισχύος. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της ανηγμένης γλουταθειόνης στον ορό και στο ENY, ενώ παρουσιάζεται μία ασθενής τάση για συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της αναγωγικής ισχύος στον ορό και στο ENY.

Στην περίπτωση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ότι τα επίπεδα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων έχουν αυξηθεί σημαντικά σε άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης, επειδή ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε λιπίδια και ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες επειδή καταναλώνει πολύ ενέργεια και έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να παράγει ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να επέλθει η οξείδωση των λιπιδίων (Mecocci P. et al, 2009). Υπάρχουν όμως και μελέτες που δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά στα επίπεδα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων (Lu H. et al, 2014). Στο πείραμα που είχε προηγηθεί βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα υπεροξειδωσίας λιπιδίων. Ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση, δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές υπεροξειδωσίας των λιπιδίων στον ορό και στο ENY.

Κλείνοντας, αυτή η μελέτη συμβάλλει στην ανάπτυξη εύρεσης νέων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου Αλτσχάιμερ σε άτομα υψηλού ρίσκου, εστιάζοντας συγκεκριμένα σε δείκτες οξειδοαναγωγής καθώς το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα από τα πρώτα συμβάντα της νόσου και έχει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση και στην εξέλιξη αυτής. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι απαιτείται συνδυαστική μελέτη όλων των δεικτών, για μία πιο εμπειριστατωμένη άποψη γύρω από το συγκεκριμένο θέμα και για ένα σίγουρο αποτέλεσμα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dhiman, K., Blennow, K., Zetterberg, H. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers for understanding multiple aspects of Alzheimer's disease pathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 1833–1863 (2019).
2. Charisis, S., Ntanasi, E., Yannakoulia, M., Anastasiou, C. A., Kosmidis, M. H., Dardiotis, E., ... Scarmeas, N. (2020). Plasma GSH levels and Alzheimer's Disease. A prospective approach.: Results from the HELIAD study. *Free Radical Biology and Medicine*.
3. Khedr, E. M., Salama, R. H., Abdel Hameed, M., Abo Elfetoh, N., & Seif, P. (2019). Therapeutic Role of Transcranial Direct Current Stimulation in Alzheimer Disease Patients: Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 33(5), 384–394.
4. Humpel C. Editorial to biomarkers of Alzheimers disease and dementia in cerebrospinal fluid and blood. *Exp Gerontol.* 2010 Jan;45(1):1.
5. Pohanka, M. (2018). Oxidative stress in Alzheimer disease as a target for therapy. *Bratislava Medical Journal*, 119(09), 535–543.
6. Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–32.
7. Li, Y. R., & Trush, M. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species*, 1(1).
8. Mandal PK, Shukla D, Tripathi M, Erslan L. Cognitive Improvement with Glutathione Supplement in Alzheimer's Disease: A Way Forward. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(2):531-535.
9. Pocernich, C. B., & Butterfield, D. A. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 625–630.
10. Soldan, A., Pettigrew, C., Zhu, Y., Wang, M.-C., Moghekar, A., ... Gottesman, R. F. (2019). White matter hyperintensities and CSF Alzheimer disease biomarkers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*, 10.1212/WNL.0000000000008864.
11. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, Tyagi N. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol.* 2016 Jan;53(1):648-661.

12. Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 23(9-10), 818–831.
13. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am.* 2019 Mar;103(2):263-293.
14. Agrawal, I., & Jha, S. (2020). Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Microglia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12.
15. Grøntvedt, G. R., Schröder, T. N., Sando, S. B., White, L., Bråthen, G., & Doeller, C. F. (2018). Alzheimer's disease. *Current Biology*, 28(11), R645–R649.
16. Assal, F. (2019). History of Dementia. *A History of Neuropsychology*, 118–126.
17. Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2020). Mitochondrial Oxidative and Nitrosative Stress and Alzheimer Disease. *Antioxidants*, 9(9), 818.
18. Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950.
19. Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650
20. Devasagayam, T & Bloor, K & Ramasarma, Tangirala. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian journal of biochemistry & biophysics.* 40. 300-8.
21. Díaz-Hung, M. L., & González Fraguera, M. E. (2014). Oxidative stress in neurological diseases: Cause or effect? *Neurología (English Edition)*, 29(8), 451–452.
22. Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW. Alzheimer Disease. 2021 Aug 11. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–
23. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1105-1121.
24. Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271–281.
25. Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume11, 797–810.

26. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607.
27. Tobore TO. On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*. 2019 Aug;40(8):1527-1540.
28. Markesbery, W. R. (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 134–147.
29. Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., & Tyagi, N. (2014). Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 648–661.
30. Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240–1247.
31. Cioffi F, Adam RHI, Bansal R, Broersen K. A Review of Oxidative Stress Products and Related Genes in Early Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021;83(3):977-1001.
32. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001;21(9):3017-3023.
33. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7497-504
34. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-1121.
35. Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res*. 2017;14(11):1149-1154.
36. Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464.
37. Borger, E., Aitken, L., Muirhead, K. E. A., Allen, Z. E., Ainge, J. A., Conway, S. J., & Gunn-Moore, F. J. (2011). Mitochondrial β -amyloid in Alzheimer's disease: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 868–873.

38. Muirhead, K. E. A., Borger, E., Aitken, L., Conway, S. J., & Gunn-Moore, F. J. (2010). The consequences of mitochondrial amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Biochemical Journal*, 426(3), 255–270.
39. Chang, Y.-T., Chang, W.-N., Tsai, N.-W., Huang, C.-C., Kung, C.-T., Su, Y.-J., ... Lu, C.-H. (2014). The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2014, 1–14.
40. Mango, D., Saidi, A., Cisale, G. Y., Feligioni, M., Corbo, M., & Nisticò, R. (2019). Targeting Synaptic Plasticity in Experimental Models of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
41. Halliwell, B. (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716.
42. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125–126.
43. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344.
44. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
45. 10.1016/s0021-9258(19)51062-6
46. Hrbac, J., & Kohen, R. (2000). Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. *Drug Development Research*, 50(3-4), 516–527.
47. Dotan, Y. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
48. Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a006239–a006239.
49. Persson, T., Popescu, B. O., & Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 427318.
50. Mahdi, O., Baharuldin, M. T. H., Nor, N. H. M., Chiroma, S. M., Jagadeesan, S., & Moklas, M. A. M. (2019). Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomedical Research and Therapy*, 6(11), 3460–3484.

51. Ferreira, M. E. S., de Vasconcelos, A. S., da Costa Vilhena, T., da Silva, T. L., da Silva Barbosa, A., Gomes, A. R. Q., Dolabela, M. F., & Percário, S. (2015). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Should we keep trying antioxidant therapies? *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5), 595–614.
52. Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., ... Yaffee, M. (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 67–74.
53. Cioffi F, Adam RHI, Bansal R, Broersen K. A Review of Oxidative Stress Products and Related Genes in Early Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*. 2021 ;83(3):977-1001.
54. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, Trillat AC, Stern DM, Arancio O, Yan SS. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):597-8.
55. Watson M. A., Scott M.G.: Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal
56. fluid. *Clin. Chem*.1995; 41(3):343-360
57. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):640-651.
58. Alzheimer's Association. 2009 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2009;5(3):234-70.
59. Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health*. 1998;88(9):1337-42.
60. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, Mykkänen L, Helkala EL, Vanhanen M, et al. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ*. 1994;309(6955):636-8.
61. Badía MC, Giraldo E, Dasí F, Alonso D, Lainez JM, Lloret A, Viña J. Reductive stress in young healthy individuals at risk of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2013 Oct;63:274-9.
62. Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev*. 2009 Oct;8(4):285-305.

