

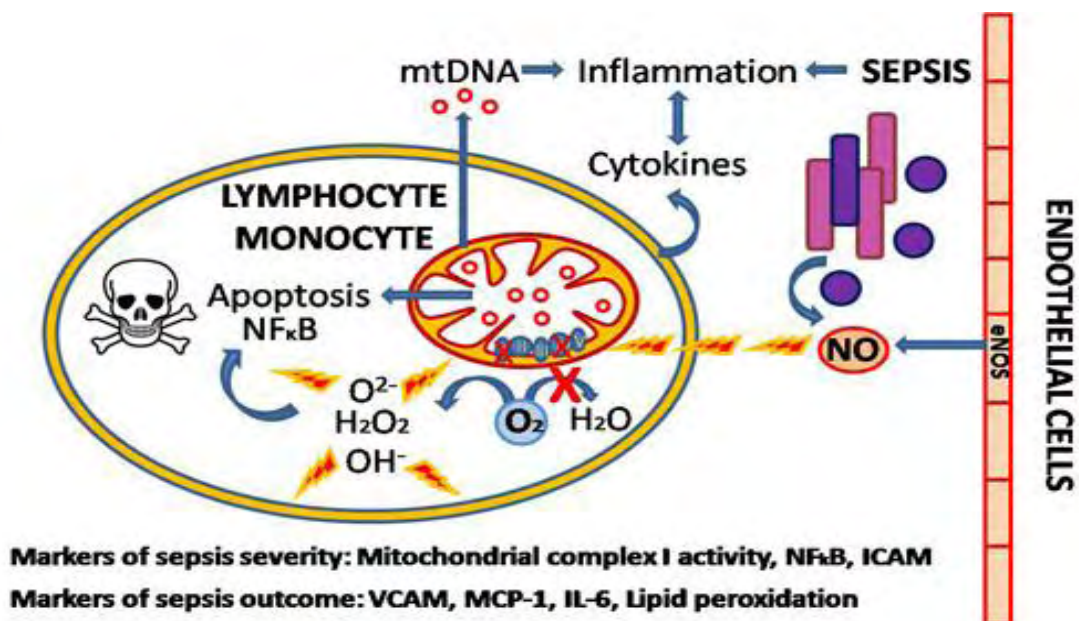
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΣΕ ΣΗΠΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**



**ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN SEPTIC
PATIENTS**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Τριμελής επιτροπή

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

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

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

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

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Λεωνίδα για την παρουσία του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Γκουτζουρέλα για τη πολύτιμη βοήθειά του.

<u>Περιεχόμενα</u>	Σελίδα
Περίληψη	7
Abstract	8
Εισαγωγή	9
1.1.1 Ιστορική αναδρομή για τον όρο σήψη.....	9
1.1.2 Ο όρος σήψη.....	10
1.1.3 Παθοφυσιολογία.....	14
1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια.....	15
1.1.4.1 Το φύλο.....	15
1.1.4.2 Η ηλικία.....	16
1.1.4.3 Συνυπάρχουσες Ασθένειες.....	16
1.1.5 Διακυμάνσεις της θνησιμότητας και των διαφόρων τύπων σήψης.....	17
1.1.6 Θεραπεία.....	19
1.2 Οξειδωτικό Στρες.....	19
1.2.1 Ορισμός.....	19
1.2.2 Ιστορική αναδρομή.....	20
1.2.3 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.....	21
1.2.4 Πως παράγονται οι ελεύθερες ρίζες.....	24
1.2.5 Επιπτώσεις.....	25
1.2.5.1 Θετικές Επιδράσεις.....	26
1.2.5.2 Αρνητικές Επιδράσεις.....	27
1.2.6 Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες.....	29
1.2.7 Αντιοξειδωτικά.....	29

1.2.7.1 Τι είναι τα αντιοξειδωτικά.....	29
1.2.7.2 Ρόλος αντιοξειδωτικών.....	30
2. Σκοπός.....	31
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	32
3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες.....	32
3.1.1 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα.....	32
3.1.2 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια (PC).....	36
3.1.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος (TAC).....	40
3.1.4 Στατιστική Ανάλυση.....	44
4.Αποτελέσματα.....	45
4.1 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του Πλάσματος (TAC).....	45
4.2 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS).....	46
4.3 Αποτελέσματα μέτρησης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC).....	47
5.Συζήτηση.....	48
6. Βιβλιογραφία.....	51

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 : Η εμφάνιση σήψης επηρεάζεται από την ηλικία του ασθενή.....	16
Διάγραμμα 2: Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ.....	17
Διάγραμμα 3: Ποσοστά ασθενών για κάθε ασθένεια.....	18
Διάγραμμα 4: Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών.....	18
Διάγραμμα 5: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων TAC.....	45
Διάγραμμα 6: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων TBARS.....	46
Διάγραμμα 7: Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων PC.....	47

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα εξωφύλλου: *The effects of sepsis on mitochondria*

Garrabou G. et al. 2012

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του όρου σηψη.....	12
Εικόνα 2: Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων.....	13
Εικόνα 3: Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας.....	22
Εικόνα 4: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	24
Εικόνα 5: Μεταβολισμός Οξυγόνου.....	25
Εικόνα 6: Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.....	28
Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών.....	30

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήψη ορίζεται ως συστηματική φλεγμονώδης απάντηση του οργανισμού που λαμβάνει μέρος κατά την διάρκεια σοβαρής λοίμωξης. Οι ασθενείς που πάσχουν από σήψη ή σηψαιμία εμφανίζουν υψηλό πυρετό, αναπνευστική ανεπάρκεια καθώς και οργανική ανεπάρκεια. Τα τελευταία 25 χρόνια παρατηρείται υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.

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

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός και η σύγκριση δεικτών οξειδωτικού στρες σε σηπτικούς ασθενείς και σε μη σηπτικούς. Λήφθηκαν δείγματα από εξήντα επτά (67) ασθενείς, από τους οποίους οι τριάντα επτά (37) έπασχαν από σήψη.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με σήψη εμφάνισαν αυξημένο οξειδωτικό στρες. Εφαρμόστηκαν τρεις (3) πειραματικές διεργασίες χρησιμοποιώντας πλάσμα από κάθε ασθενή: η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η λιπιδική υπεροξειδωση (TBARS) και πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC). Μέσω των πειραματικών διαδικασιών παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που πάσχουν από σήψη έχουν αυξημένα ποσοστά οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τα ποσοστά των μη σηπτικών ατόμων, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη φλεγμονής.

Abstract

Sepsis is defined as systemic inflammatory response of the body takes place during severe infection. Patients suffering from sepsis exhibit a high fever, respiratory failure and organ failure. The last 25 years has a high mortality rate.

Oxidative stress represents an imbalance between the production of ROS (Reactive Oxygen Species, ROS) and the ability of a biological system to neutralize these toxic molecules and to repair the damage caused.

The aim of this study is to quantify and compare markers of oxidative stress in septic patients and non-septic individuals. Samples were taken from sixty-seven (67) patients, of whom thirty-seven (37) suffered from sepsis.

Results showed that patients with sepsis experienced increased oxidative stress. Were applied three (3) experimental processes using plasma from each patient: the total plasma antioxidant capacity (TAC), lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonyls (PC). Through experimentation it was observed that patients suffering from sepsis have increased levels of oxidative stress compared to the rates of non-septic individuals, which is probably due to the presence of inflammation.

1.Εισαγωγή

1.1.1. Ιστορική αναδρομή για τον όρο σήψη

Ο όρος σήψη προέρχεται από τον ιατρό Ιπποκράτη, ο οποίος ήταν πιθανώς ο πρώτος που κλήθηκε να περιγράψει το φαινόμενο του σηπτικού σοκ («*παρουσία υψηλού πυρετού, αν το εξωτερικό μέρος είναι κρύο ωστόσο το εσωτερικό μέρος έχει αυξημένη θερμοκρασία, τότε είναι επικίνδυνο*»). Η φιλόσοφος Niccolò Machiavelli (1469-1527) περιέγραψε την δυσκολία στην διάγνωση και την θεραπεία της σήψης ως εξής: «*όπως οι γιατροί λένε ότι συμβαίνει σε καταστάσεις έντονου πυρετού, ότι στην αρχή της ασθένειας είναι εύκολο να θεραπευτεί αλλά δύσκολο να διαγνωσθεί, ωστόσο με την πάροδο του χρόνου το γεγονός ότι δεν έγινε η διάγνωση και η θεραπεία στα αρχικά στάδια της σήψης έχει ως αποτέλεσμα να γίνεται η εύκολη διάγνωση της ασθένειας αλλά να είναι δύσκολη η θεραπεία*». Το 1546, ο Ιταλός γιατρός Girolamo Fracastoro διατύπωσε την έννοια της μετάδοσης τονίζοντας ότι οι επιδημικές ασθένειες μεταδίδονται από άμεση ή έμμεση επαφή και εξ αποστάσεως μέσω του αέρα και ότι πιθανώς οι υπαίτιοι παράγοντες είναι ορατά σπόρια ή μικρόβια (Spink WW. 1978). Όταν εδραιώθηκε η χρήση μικροσκοπίων, το 1683, ο Anthony van Leeuwenhoek ήταν ο πρώτος που δημοσίευσε απεικονίσεις βακτηρίων από δείγμα ανθρώπινων δοντιών. Το 1847, ο Ούγγρος ιατρός Ignaz Semmelweis, μετά την παρατήρηση αυξανόμενου επιλόχειου πυρετού σε εγκυμονούσες, καθιέρωσε την χρήση αντισηπτικού πριν την εξέταση των ασθενών. Το πλύσιμο των χεριών με ένα διάλυμα ασβεστίου μείωσε την θνησιμότητα των ασθενών με επιλόχειο πυρετό από 18% σε 3%. Αυτό το γεγονός πιθανόν αποτέλεσε την πρώτη κλινική δοκιμή σε μολυσματικές ασθένειες. Στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, η θεωρία περί μικροβίων επιβεβαιώθηκε από τους Robert Koch και Louis Pasteur και το 1879 ο Louis Pasteur ανακοίνωσε στην Γαλλική Ακαδημία ότι ο στρεπτόκοκκος προκαλεί επιλόχεια σηψαιμία. Επίσης, πρότεινε τρόπους για να αποτρέψει την είσοδο μικροοργανισμών στο ανθρώπινο σώμα, προτρέποντας έτσι τον Joseph Lister να αναπτύξει και να καθιερώσει αντισηπτικές μεθόδους σε χειρουργικές επεμβάσεις.

Τον προηγούμενο αιώνα γνωστοποιήθηκε ότι ο «Μαύρος Θάνατος», μία από τις πιο καταστροφικές πανδημίες στην ανθρώπινη ιστορία, προκλήθηκε από σηψαιμία εξαιτίας του βακτηρίου *Yersinia pestis* (το οποίο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια πανώλη (*Drancourt M et al. 1998*). Το 1909, ο L. Jacob δημοσίευσε τις πρώτες 12 δημοσιεύσεις ασθενών με σήψη, που είχε προκληθεί από Gram αρνητικά βακτήρια *Escherichia Coli*, από τους οποίους το 50% είχε πεθάνει. Το 1914, ο Hugo Schottmuller έδωσε τον πρώτο επιστημονικό ορισμό της σήψης : “Η σήψη είναι μία κατάσταση που προκαλείται από την είσοδο μικροβίων από μία τοπική πηγή φλεγμονής στην κυκλοφορία του αίματος το οποίο οδηγεί σε διαδοχική μόλυνση σε απομακρυσμένα όργανα” (*Schottmueller H. 1914*) . Ωστόσο, λιγότεροι από το ήμισυ των ασθενών που έχουν συμπτώματα σήψης έχουν θετικές καλλιέργειες αίματος ή άλλες υποδείξεις μικροβιακής λοίμωξης. Ο William Osler (1849-1919) ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε τον σημαντικό ρόλο της απάντησης του ξενιστή στην σήψη : “Εξερουμένου μερικών περιπτώσεων, οι ασθενείς πεθαίνουν λόγω της απάντησης του οργανισμού τους στην μόλυνση και όχι εξαιτίας της μόλυνσης”. Αυτή η αντίληψη ήταν ορόσημο για την κατανόηση του ρόλου της ανοσοαπάντησης του ξενιστή σε μία λοίμωξη (*Konrad Reinhart et al. 2012*).

1.1.2 Ο όρος σήψη

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

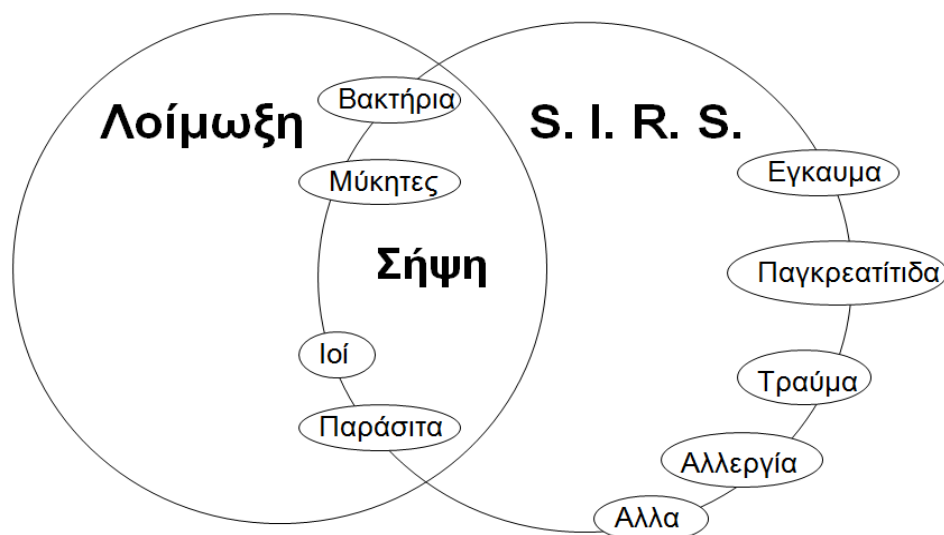
Η σήψη είναι η πιο κοινή αιτία πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας. Είναι ένα σύνδρομο που προέκυψε μέσα από τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), οι οποίες παρείχαν υπηρεσίες απαραίτητες για την ανθρώπινη ζωή, όπως υποστήριξη ζωτικών οργάνων, μηχανική υποστήριξη καθώς και αναπνευστική υποστήριξη. Πριν την εγκαθίδρυση των ΜΕΘ, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με οξεία σήψη και σηπτικό σοκ πέθαναν σε μικρό χρονικό διάστημα λόγω των ανεπανόρθωτων ζημιών που προκαλούσε το σοκ στον οργανισμό τους και στα ζωτικά τους όργανα. Το 1975, ένα άρθρο από τον A. Baue, με τίτλο *Multiple, Progressive or Sequential Systems Failure, a Syndrome of the 1970s*, περιγράφει ένα σύνδρομο κλινικής φύσεως το οποίο δεν ήταν μέχρι τότε γνωστό. Χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι όροι για να περιγραφούν οι συνέπειες αυτού του εξελισσόμενου κλινικού συνδρόμου που οδηγούσαν στην αδικαιολόγητη ανεπάρκεια ανεξάρτητων οργανικών συστημάτων. Πρόσφατα, εδραιώθηκε η χρήση του όρου σύνδρομο πολλαπλής οργανικής ανεπάρκειας (*multiple-organ dysfunction syndrome, MODS*) (Marshall JC. 2000).

Το 1989, οι Bone et al., οδηγούμενοι από την ανάγκη να προσδιορίσει τον πληθυσμό των πραγματικών σηπτικών ασθενών έτσι ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος των κορτικοστεροειδών ως φάρμακο (Bone RC et al. 1989) πρότειναν τον όρο σηπτικό σοκ για ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση με κλινικές και εργαστηριακές ενδείξεις σοβαρής λοίμωξης, ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα καλλιέργειας αίματος και τις μικροβιακές ενδείξεις μόλυνσης. Ο όρος σηπτικό σύνδρομο ήταν έγκυρος όταν η συστηματική φλεγμονή ακολουθούταν από τουλάχιστον 2 από τα εξής συμπτώματα: υψηλό καρδιακό ρυθμό, υψηλό ρυθμό αναπνοής, χαμηλά επίπεδα αρτηριακής πίεσης, έντονος πυρετός ή υποθερμία, και τέλος λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία. Με βάση αυτά τα κριτήρια ορίστηκε αργότερα ο όρος «σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης» (*systemic inflammatory response syndrome, SIRS*). Το 1992, οι Bone et al. απέδειξαν ότι ο κλινικός φαινότυπος και τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν παρόμοια σε ομάδες ασθενών με αποδεδειγμένη μικροβιακή λοίμωξη και θετικές καλλιέργειες αίματος, καθώς και σε ομάδες ασθενών με κλινική υποψία παρουσίας σήψης ή σηπτικής λοίμωξης (Bone RC et al. 1992).

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

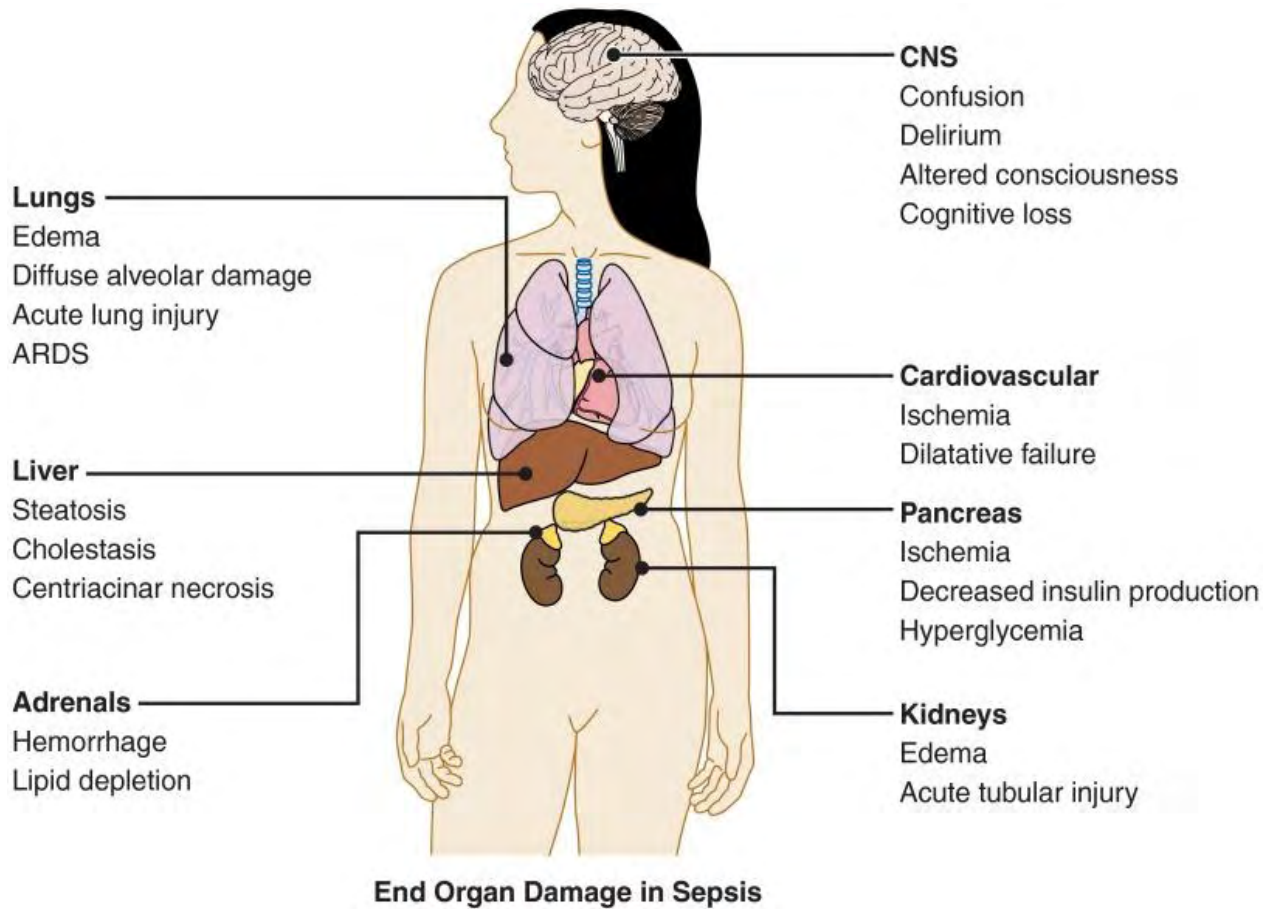
- Θερμοκρασία σώματος $> 38^{\circ} \text{C}$ ή $< 36^{\circ} \text{C}$
- Καρδιακή Συχνότητα (ΚΣ) > 90 σφύξεις/min
- Αναπνευστική συχνότητα : αναπνοές > 20 /min
- Λευκά αιμοσφαίρια > 12000 ή $< 4000/\text{mm}^3$ ή 10% άωρες μορφές

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



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του όρου σήψη.

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



Εικόνα 2: Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων.

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

1.1.3 Παθοφυσιολογία

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

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

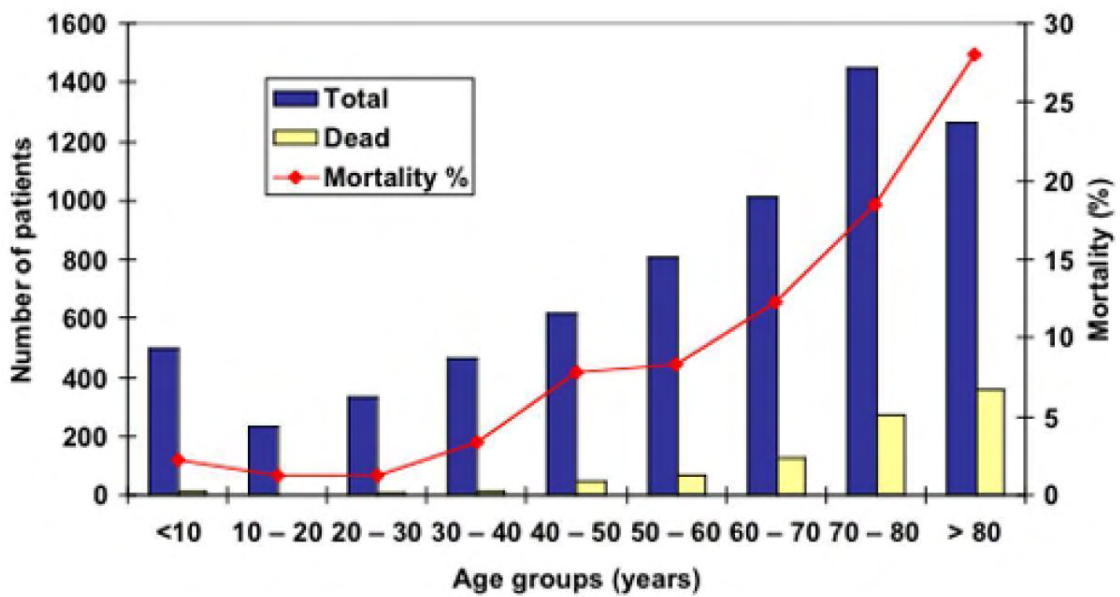
στους πνεύμονες, στην κοιλιακή χώρα και στην ουρογεννητική οδό εμπλέκονται στη σήψη συχνότερα από ότι οι λοιμώξεις σε άλλες περιοχές του σώματος.

1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια

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

1.1.4.1 Η Ηλικία

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



Critical Care

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

1.1.4.2 Το φύλο

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

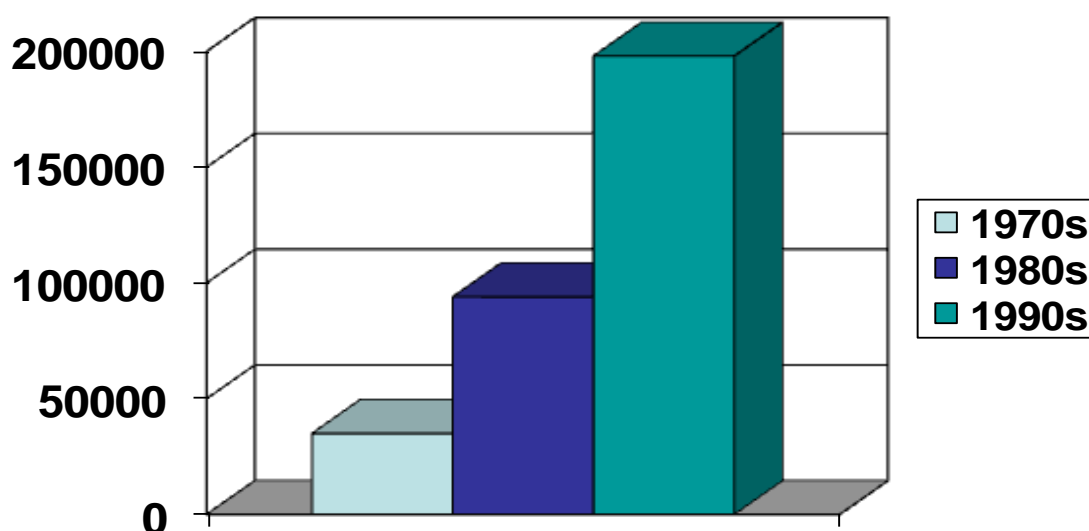
1.1.4.3 Συνυπάρχουσες Παθήσεις

Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο θνησιμότητας περιλαμβάνουν ήδη υπάρχουσες παθήσεις, όπως η ανοσοκαταστολή, ο καρκίνος, HIV/AIDS, ανεπάρκεια ήπατος, καθώς και η εξάρτηση από το αλκοόλ. Όλες αυτές οι ασθένειες εξασθενούν

τον οργανισμό του ασθενή καθιστώντας τον ευάλωτο στις συνέπειες της σήψης. Σύμφωνα με μία μελέτη μεταξύ των ασθενών που εμφάνισαν σοβαρά συμπτώματα σήψης αποδείχθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών είχαν ήδη κάποιο νόσημα, ιδιαίτερα διαβήτη (23%), χρόνια πνευμονία (17%), καρκίνο (16%), καρδιακή ανεπάρκεια (14%), νεφρική ανεπάρκεια (11%), και ηπατική νόσο (7%) (Kendra N. Iskander et al. 2013, Martin G. et al. 2009).

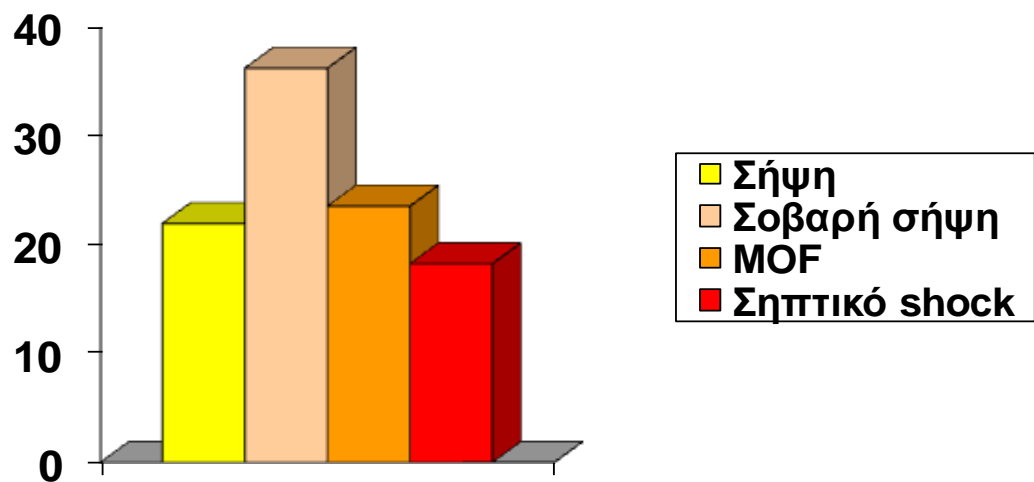
1.1.5 Διακυμάνσεις της θνησιμότητας και των διαφόρων τύπων σήψης

Η σοβαρή σήψη και η σηπτική καταπληξία (shock) αποτελούν μείζονα προβλήματα παγκοσμίως, αφενός διότι η συχνότητά τους αυξάνεται, αφετέρου διότι συνοδεύονται από υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Περισσότερα από 750.000 άτομα ετησίως παρουσιάζουν σοβαρή σήψη στις ΗΠΑ, ενώ περίπου 67% (500.000 άτομα) χρειάζονται κάποιο είδος εντατικής φροντίδας και νοσηλείας. Η θνητότητα κυμαίνεται από 25-50%. Ωστόσο, η έγκαιρη αναγνώριση και έγκαιρη εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης είναι δυνατόν να βελτιώσουν την έκβαση των ασθενών με σοβαρή σήψη και σηπτικό shock και να αυξήσουν την επιβίωσή τους (Angus et al. 2001).

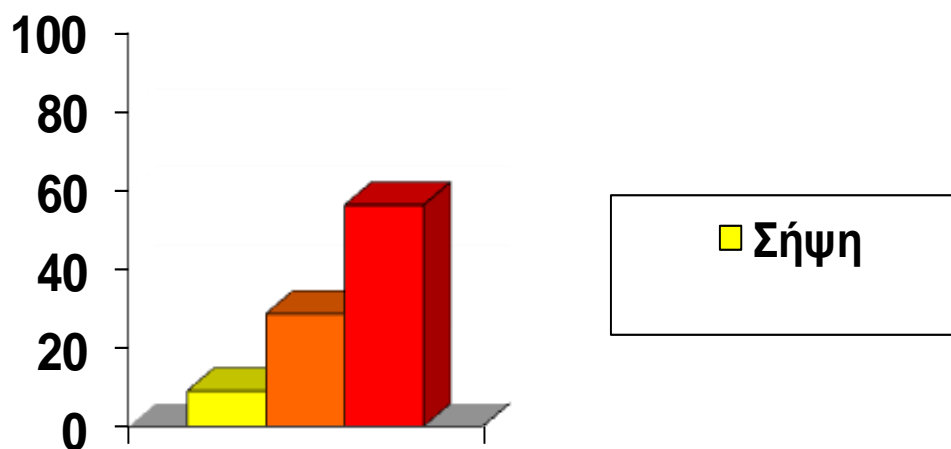


Διάγραμμα 2. Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ. Ευγενική χορηγία του Angus et al. 2001

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



Διάγραμμα 3. Ποσοστά ασθενών για κάθε ασθένεια. Ευγενική χορηγία Moreno et al. 2008



Διάγραμμα 4. Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών. Ευγενική χορηγία Moreno et al. 2008, Kumar et al. 2006

Στο **Διάγραμμα 4** φαίνεται ότι τα ποσοστά θνησιμότητας των ασθενών με σηπτικό σοκ ξεπερνάν τα ποσοστά της σήψης και της σοβαρής σήψης. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από μελέτη που εξέταζε την διάρκεια της υπότασης πριν την χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων, τονίζοντας ότι η διάρκεια έπαιζε σημαντικό ρόλο για την επιβίωση των ασθενών (Kumar et al. 2006).

1.1.6 Θεραπεία

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

1.2 Οξειδωτικό Στρες

1.2.1 Ορισμός

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

βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Έχει οριστεί ως μία διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων.

1.2.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1775, ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

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

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

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να κατανοούν καλύτερα τις επιβλαβείς δράσεις, αλλά και την επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών

συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2.3 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Με την οξυγόνωση της ατμόσφαιρας της Γης σημειώθηκε μια δραματική αλλαγή στην πορεία της εξέλιξης. Η αύξηση στην συγκέντρωση του οξυγόνου επέτρεψε την αξιοποίηση των πλούσιων σε οξυγόνο πρωτεϊνών διαμεμβρανικής επικοινωνίας, οι οποίες είναι απαραίτητες για την πολυκύτταρη ευκαρυωτική ζωή, για τα υψηλά μεταβολικά επίπεδα καθώς και για ποικιλία νέων μεταβολικών αντιδράσεων. Τα υψηλά επίπεδα του οξυγόνου οδήγησαν τελικά στην άνοδο των σύνθετων μορφών ζωής και την επακόλουθη επίγεια εξάπλωσή τους (*Baudouin-Cornu P. And Thomas D. 2007*).

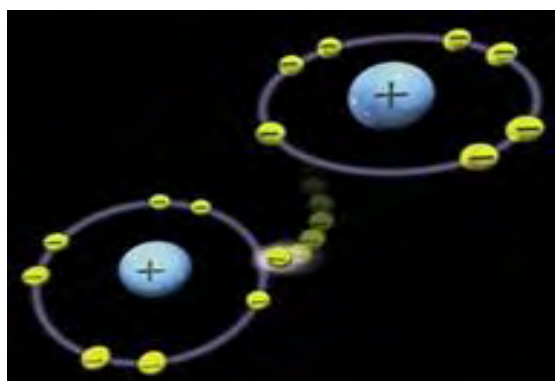
Ωστόσο, τα οφέλη που προσφέρει μια ατμόσφαιρα πλούσια σε οξυγόνο στην επίγεια ζωή συνοδεύονται με συνέπειες, από τις οποίες η βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS, επίσης γνωστά ως ελεύθερες ρίζες), είναι ίσως η πιο σημαντική. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως τα υπεροξειδία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

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

ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

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

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (*Gilbert 2000, Halliwell & Gutteridge 1990*). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (*Halliwell & Gutteridge, 1990*).



Εικόνα 3. Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (*Sengupta et al. 2004, Pani and Galeotti 2010, AICR*

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

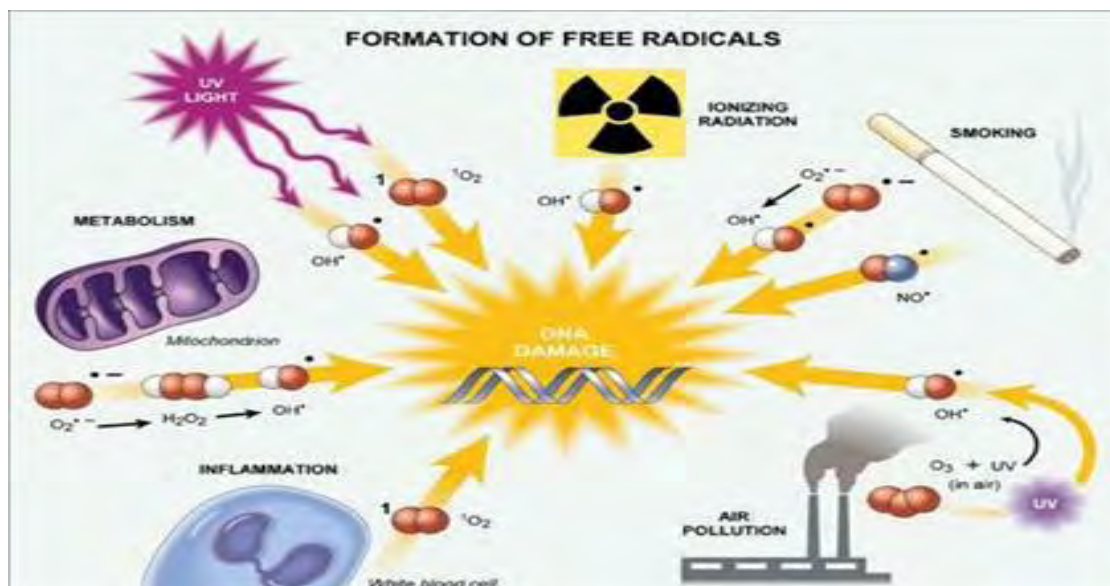
Υπάρχουν πολλοί τύποι ελευθέρων ριζών στο σώμα. Τα τέσσερα ιδιαίτερα βλαβερά είναι :

- ❖ Η ρίζα του υπεροξειδίου τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει.
- ❖ Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.
- ❖ Η ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί την λύση του κυττάρου και ελευθέρωση του περιεχομένου του.
- ❖ Το μονήρες οξυγόνο δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.

1.2.4 Πώς παράγονται οι ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να παραχθούν ενδογενώς στους οργανισμούς καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στην μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά. Συγκεκριμένα μπορούν να παραχθούν στους οργανισμούς ως εξής ενδογενώς και εξωγενώς (Battin et al. 2009):

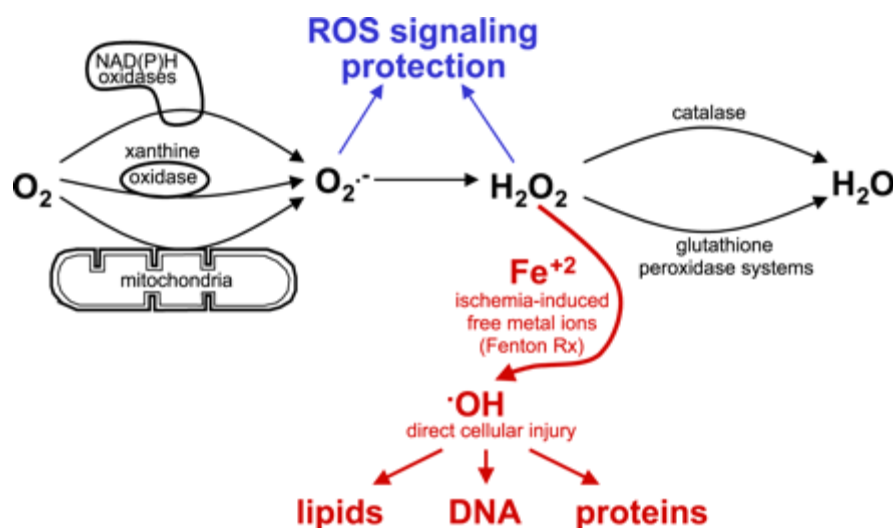
- κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας (στα μιτοχόνδρια)
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα
- τη λιπιδική οξείδωση
- την ακτινοβολία
- τη φλεγμονή
- το κάπνισμα
- την μολυσμένη ατμόσφαιρα, το νέφος (όζον, νιτροξειδία)



Εικόνα 4. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.

1.2.5 Επιπτώσεις

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell 2001, Halliwell & Gutteridge 1998). Υπό κανονικές συνθήκες περίπου το 5% του εισπνεόμενου οξυγόνου μεταβολίζεται στο νερό μέσω της διαδρομής που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το σουπεροξειδίο του οξυγόνου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγονται φυσιολογικά και μπορεί να έχουν προστατευτικές δράσεις. Ωστόσο, με την επαναιμάτωση η φυσιολογική ισορροπία χάνεται και ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) μπορούν να παραχθούν μέσω της αντίδρασης Fenton (Hess M.L. and Manson N.H. 1984).



Εικόνα 5. Μεταβολισμός οξυγόνου.

1.2.5.1 Θετικές επιδράσεις

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί ποικίλες βλάβες στον οργανισμό, ωστόσο οι δραστικές ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για την λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης, καθώς οι δραστικές ρίζες οξυγόνου ενισχύουν την βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων. Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό (ιδιαίτερα το H_2O_2), την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid 2001, Linnane et al. 2002). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

Είναι πλέον επιστημονικώς αποδεδειγμένο ότι οι ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως υποστρώματα ενζύμων, όπως το H_2O_2 χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις υπεροξειδάσες της αίμης που εμπλέκονται στην ιωδίωση των ορμονών του θυρεοειδή αδένου. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στον ιστό ποικίλει από 1 έως 700 nM. 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 H_2O_2 στον καταρράκτη σηματοδότησης. Η σηματοδότηση της ινσουλίνης φαίνεται να περιλαμβάνει H_2O_2 ως μέρος του μηχανισμού για αναστρέψιμη αδρανοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης, την ίδια στιγμή που οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα ινσουλίνης (John W Baynes and Marek H. Dominiczak 2012).

1.2.5.2 Αρνητικές επιδράσεις

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

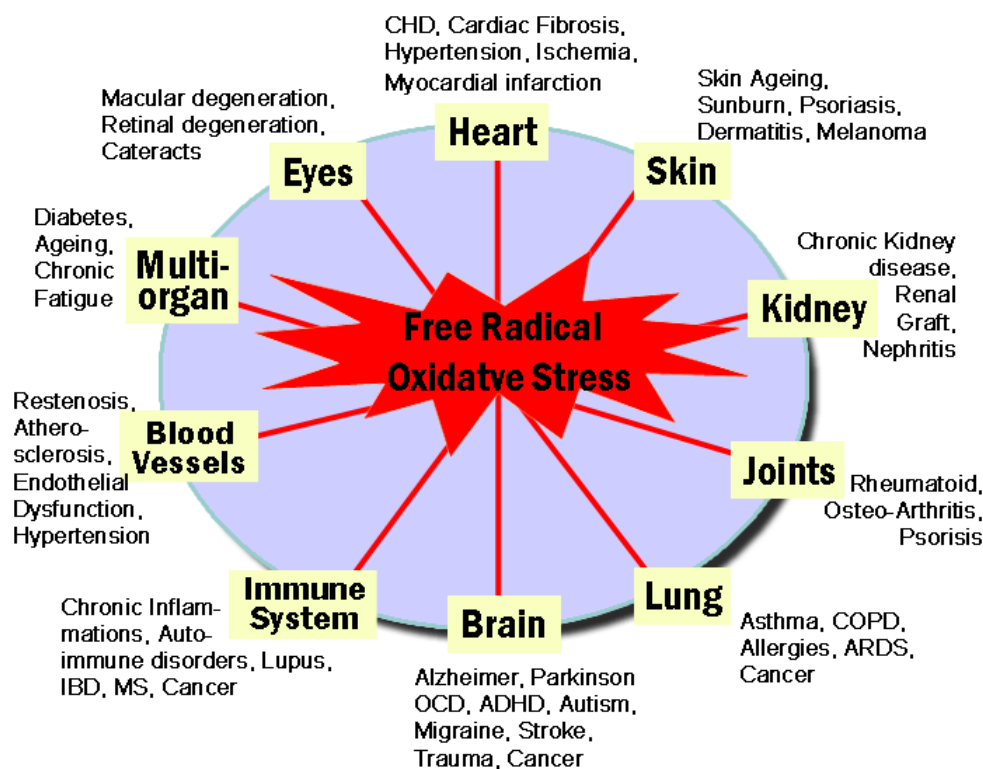
Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση. Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει $ROO\cdot$ κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge 1999).

Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $OH\cdot$, το $RO\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο

επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis 1987, Grune et al. 1997, Halliwell and Gutteridge 1999, Levine et al. 2000, Stadtman 1986).

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

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



Εικόνα 6. Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην σωστή και ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι έχουν τόσο ευεργετικές όσο και επιβλαβείς συνέπειες για την υγεία. Πρέπει να διατηρείται η ισορροπία των επιπέδων των υπεροξειδίων, καθώς η διατάραξη αυτής θα είχε ως αποτέλεσμα την βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο (Craig N. Morell 2008).

1.2.6 Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες

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

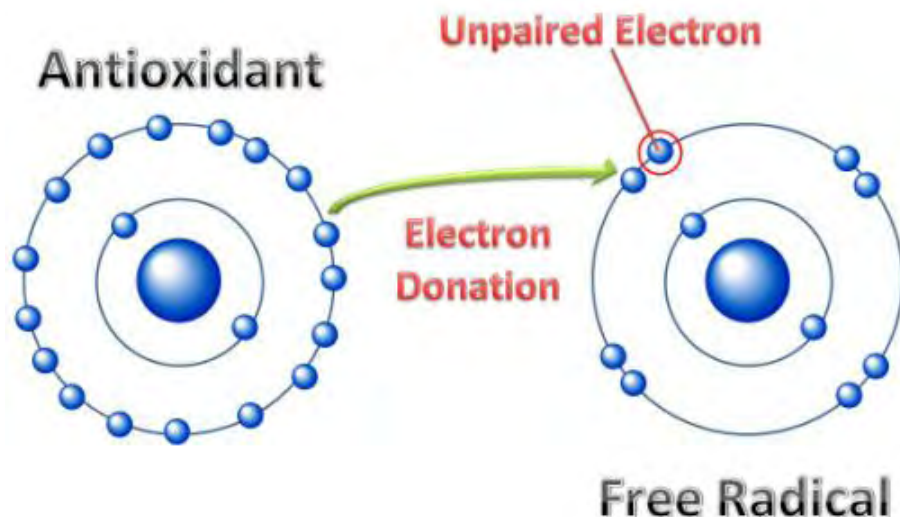
- ο καρκίνος
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Parkinson, Alzheimer, Huntington)
- η αθηροσκλήρυνση
- το AIDS
- η ηπατίτιδα
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα

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

1.2.7 Αντιοξειδωτικά

1.2.7.1 Τι είναι τα 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 δρουν δανείζοντας ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παρέχουν μία θωράκιση στο σώμα μας (μία δηλαδή αντιοξειδωτική προστασία). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί.



Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών.

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

Στα αντιοξειδωτικά που δρουν με μη ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν μόρια τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες όπως : η βιταμίνη E, η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, β΄-καροτίνη, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 (σαρδέλα, σόγια) και το σελήνιο.

1.2.7.2 Ρόλος αντιοξειδωτικών

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

2. Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η σύγκριση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σήψη και σε μη σηπτικούς. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες σε πλάσμα ασθενών, όπως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα καθώς και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα δείγματα λήφθηκαν από το νοσοκομείο της Πάτρας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

Για την διεξαγωγή της έρευνας χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από 67 ασθενείς, οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε 2 κατηγορίες: σε σηπτικούς ασθενείς και σε μη σηπτικούς ανθρώπους.

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

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η 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 αλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

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

Διαλύματα

- *Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)*

Για να φτιάξουμε ≈ 100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.*

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

- *Διάλυμα Na_2SO_4 (2 M) – TBA (55 mM)*

Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος. Για παρασκευή 10ml διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na_2SO_4 και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως.

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε.

3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.
5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 mL σε erpendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

(mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to μmol/L.

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

Χρήσιμες πληροφορίες

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

Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας σε οργανικά διαλύματα.

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

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δειγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31 \times 2$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$) και το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό. Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το $\mu\text{mol/L}$.

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

3.1.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ (PC)

Αρχή της μεθόδου

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

της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι αξιόπιστης δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

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

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

Αντιδραστήρια

- *Διάλυμα HCl 2.5 N*
HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φοράοντας γάντια.

- *DNPH 14 mM (MB: 198.1)*

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το

ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.

9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.

10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

11. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επιάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.

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

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

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

Υπολογισμοί

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

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

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

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

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

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

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

Υπολογισμοί

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

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

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

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

Συγκέντρωση καρβονυλίων ανά mg αιμοσφαιρίνης

Protein carbonyls (nmol/ mg Hb)

3.1.3 ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (ΤΑC) ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Αρχή της μεθόδου

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

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

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

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

Αντιδραστήρια

- *Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)*

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- *DPPH 0.1 mM, MB: 394.32*

Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- *Ασκορβικό οξύ 10 mM*

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

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

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

Παράδειγμα. Αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος}$ ή $0.5 \text{ mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή 0.5 mmol DPPH/L .

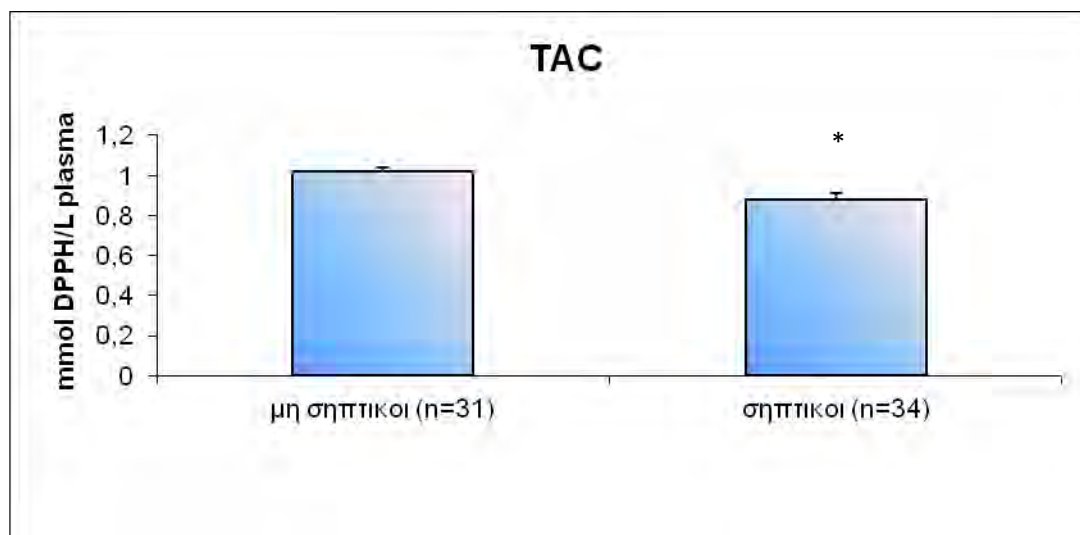
3.1.4 Στατιστική ανάλυση

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

4.Αποτελέσματα

4.1. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAC)

Η πρώτη πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η TAC. Όπως προαναφέρθηκε ο όρος TAC αναφέρεται στην ικανότητα συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Στην συγκεκριμένη μέθοδο η TAC του ορού υπολογίζεται χρησιμοποιώντας DPPH. Παρουσία ενός δότη υδρογόνων η ρίζα DPPH ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης. Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$.

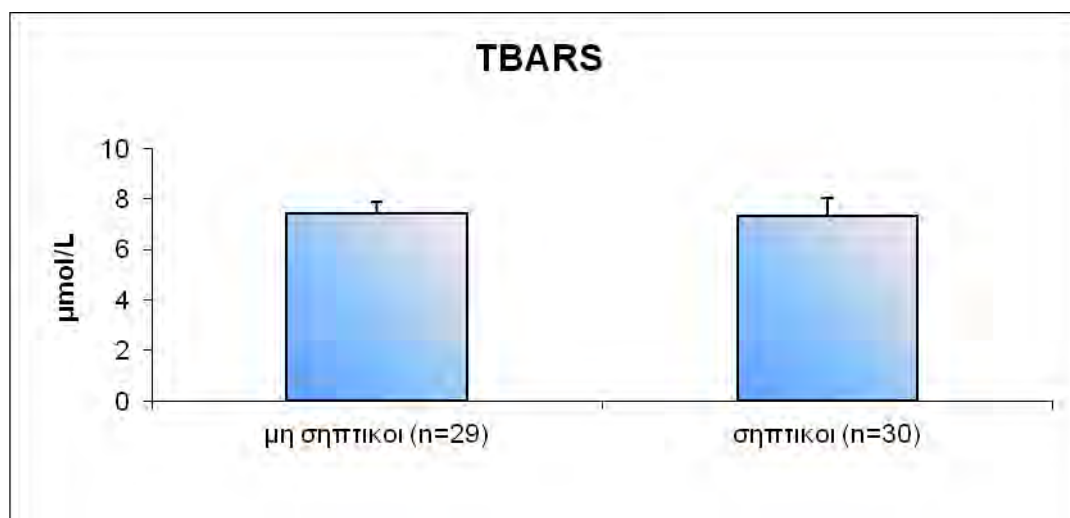


Διάγραμμα 5. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της TAC.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η διαφορά της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα σε μη σηπτικούς και σηπτικούς είναι στατιστικά σημαντική.

4.2 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS)

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. 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 λιπιδίων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε * $p < 0,05$

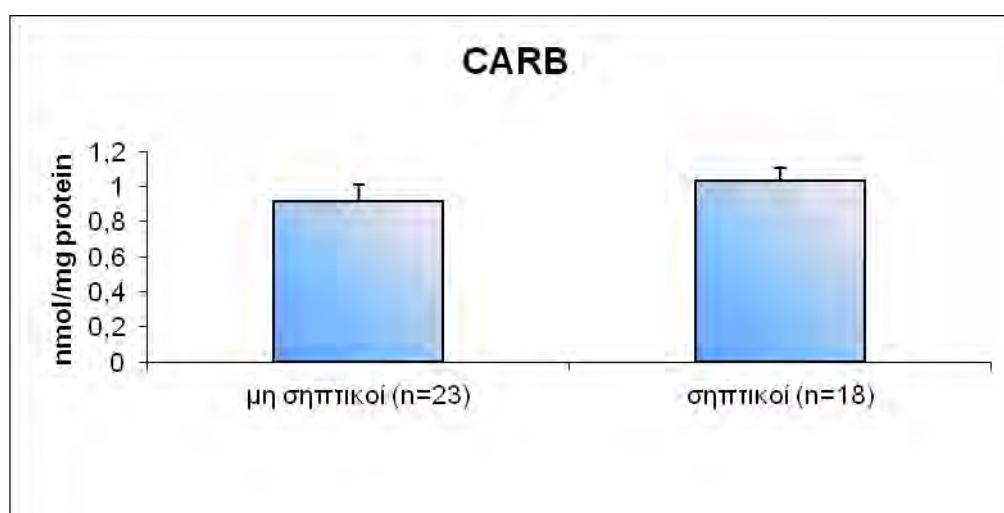


Διάγραμμα 6. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων TBARS.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα δεν υπάρχει εμφανής διαφορά μεταξύ σηπτικών και μη σηπτικών ατόμων, καθώς οι τιμές είναι σχεδόν ίδιες. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

4.3 Αποτελέσματα Μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm SEM. Εκτελέστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one way ANOVA), με το πρόγραμμα PASW Statistics 18 (πρώην SPSS Statistics), κατά Tukey και Dunnett. Το επίπεδο σημαντικότητας προσδιορίστηκε σε $*p < 0,05$



Διάγραμμα 7. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων PC.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα οι τιμές Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων της ομάδας των σηπτικών ατόμων είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές της ομάδας των μη σηπτικών ατόμων. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

5. Συζήτηση

Η σήψη είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε κρίσιμη κατάσταση σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Η παθοφυσιολογία της σήψης χαρακτηρίζεται από μία σειρά γεγονότων συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μεταλλαγές στο σύστημα πήξεως, οι οποίες οδηγούν σε διαταραχές στην μεταφορά οξυγόνου και μεταβολικών υποστρωμάτων στους ιστούς, σε οργανική ανεπάρκεια και τελικά στον θάνατο. Το οξειδωτικό στρες υποδηλώνει την ανισορροπία μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρες παίζει κρίσιμο ρόλο τόσο ως υποκινητής όσο και ως μεσολαβητής της συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (*Derek S. Wheeler 2011*).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι ελεύθερες δραστικές ρίζες (ROS, RNS) προκαλούν έμμεση βλάβη στους ιστούς μέσω ενεργοποίησης προ-φλεγμονωδών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στο στάδιο πριν την εκδήλωση φλεγμονής. Τα δραστικά αυτά είδη προκαλούν μεταλλαγές σε πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο, οι οποίες μεσολαβούν στην μεταγωγή εξωκυτταρικών σημάτων από τους υποδοχείς στους μεταγραφικούς παράγοντες του πυρήνα (όπως ο AP-1 και ο NF-κB). Συγκεκριμένα ο παράγοντας NF-κB φαίνεται να είναι ο κύριος διακόπτης ή το κύριο σημείο ελέγχου για την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων.

Οι παράγοντες NF-κB και AP-1 ρυθμίζονται μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων εντός του κυττάρου. Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι η οξειδοαναγωγή έχει διαφορετικά αποτελέσματα για τους πολυδύναμους αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι προ-οξειδωτικοί παράγοντες ενεργοποιούν τον NF-κB και καταστέλλουν τον AP-1, ενώ οι αντι-οξειδωτικοί παράγοντες ενεργοποιούν τον AP-1 και καταστέλλουν τον NF-κB. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν το μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB ως κύριο χαρακτηριστικό του σηπτικού σοκ (*Abraham E. 2003*).

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ήταν η σύγκριση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σήψη και σε μη σηπτικούς ασθενείς. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες σε πλάσμα ασθενών, όπως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS) καθώς και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC).

Σύμφωνα με την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών του πλάσματος (TAC), η ομάδα των μη σηπτικών ασθενών παρουσιάζει αυξημένες τιμές, στατιστικά σημαντικές, σε σχέση με τις τιμές των σηπτικών ασθενών. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την θεωρία που προ-αναφέρθηκε. Οι σηπτικοί ασθενείς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερα ποσοστά οξειδωτικού στρες, αυτό μπορεί να οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ριζών οξυγόνου, σε μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα ή σε συνδυασμό των δύο παραπάνω.

Σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ σηπτικών και μη σηπτικών ασθενών και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Επίσης, σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, οι τιμές της ομάδας των σηπτικών ατόμων είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις τιμές της ομάδας των μη σηπτικών ατόμων. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Σε μια παράλληλη εργασία που διεξήχθη στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, μελετήθηκε η σχέση σήψης και παχυσαρκίας. Τα αποτελέσματα, τα οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά, επιβεβαίωσαν την συνεργιστική σχέση σήψης και παχυσαρκίας (Κορδάλης Ε. 2014).

Συμπερασματικά, ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εμφάνιση σήψης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες σε σηπτικούς ασθενείς βρέθηκαν αυξημένοι δείκτες οξειδωτικού στρες. Στην συγκεκριμένη μελέτη μόνο τα αποτελέσματα της TAC ήταν στατιστικώς σημαντικά, ενώ τα αποτελέσματα των TBARS και PC δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας έτσι ώστε να αποκαλυφθεί πλήρως η συνεργιστική

δράση σήψης και οξειδωτικού στρες και να γίνει εφικτή η θεραπεία ασθενών που πάσχουν από την ασθένεια.

Βιβλιογραφία

- Abraham E. ***Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure***, J Infect Dis. 2003 Jun 15;187 Suppl 2:S364-9.
- AICR ***Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective***; World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Washington, DC, USA, 2007.
- Ames BN ***Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens***, 1986, *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
- Andrés Esteban, Niall D. Ferguson, Maureen O. Meade, Fernando Frutos-Vivar, Carlos Apezteguia, Laurent Brochard, Konstantinos Raymondos, Nicolas Nin, Javier Hurtado, Vinko Tomicic, Marco González, José Elizalde, Peter Nightingale, Fekri Abroug, Paolo Pelosi, Yaseen Arabi, Rui Moreno, Manuel Jibaja, Gabriel D'Empaire, Fredi Sandi, Dimitros Matamis, Ana María Montañez, and Antonio Anzueto ***"Evolution of Mechanical Ventilation in Response to Clinical Research"***, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 177, No. 2 (2008), pp. 170-177.
- Andrew Lever, professor of infectious diseases and honorary consultant physician and Iain Mackenzie, consultant in intensive care medicine and anesthesia . BMJ. ***Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis***, Oct 27, 2007 335(7625): 879–883.
- Battin E. E., Brumaghim J. L. ***Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms***, *Cell Biochem Biophys*, 2009,55:1–23.
- Baudouin-Cornu P., Thomas D. 2007. ***Evolutionary biology: oxygen at life's boundaries***. *Nature* 445, 35–36.
- Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA *Crit Care Med*. 1989 May; 17(5):389-93), ***Sepsis syndrome: a valid clinical entity***. ***Methylprednisolone Severe Sepsis*** Study Group.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ *Chest* ***Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis***. The ACCP/SCCM Consensus Conference

- Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992 Jun; 101(6):1644-55.
- Cooke M. S., Evans m. D., Dizdaroglu M. and Lunec J. (2003) ***Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*** *FASEB J.* 17: 1195–1214.
 - Craig N. Morrell ***Reactive Oxygen Species Finding the Right Balance*** *Circ Res.* Sep 12, 2008; 103(6): 571–572.
 - David F. Stowe and Amadou K. S. Camara ***Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function***, *Antioxid Redox Signal.* Jun 2009; 11(6): 1373–1414.
 - Davis KJ. ***Protein damage and degradation by oxygen radicals***. I. general aspects. 1987 *J Biol Chem* 262:9895-9901.
 - Deborah J. Stearns-Kurosawa, Marcin F. Osuchowski, Catherine Valentine, Shinichiro Kurosawa, and Daniel G. Remick ***The Pathogenesis of Sepsis*** , *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 19–48.
 - Derek S. Wheeler ***Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis***, Oct 2011 *Open Inflamm J.* Oct 7, 2011; 4(s1): 74–81.
 - Diana Mühl, Gábor Woth, Livia Drenkovics, Adrienn Varga, Subhamay Ghosh, Csaba Csontos, Lajos Bogár, György Wéber, János Lantos ***Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury*** , *Indian Journal of Medical Research*, 2011.
 - Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. 1998. ***Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:12637–12640.
 - Dongping Liu and Yang Xu ***p53, Oxidative Stress, and Aging***, *Antioxid Redox Signal.* Sep 15, 2011, 15(6): 1669–1678.
 - Douglas W. Haden, Hagir B. Suliman, Martha Sue Carraway, Karen E. Welty-Wolf, Abdelwahid S. Ali, Hiroshi Shitara, Hiromichi Yonekawa, and Claude A. Piantadosi ***Mitochondrial Biogenesis Restores Oxidative Metabolism during Staphylococcus aureus Sepsis*** *Am J Respir Crit Care Med.* Oct 15, 2007, 176(8): 768–777.
 - D. A. Lowes, N. R. Webster, M. P. Murphy, and H. F. Galley ***Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve***

- mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis*** Br J Anaesth. Mar 2013; 110(3): 472–480.
- Federman DDN Engl J Med ***The biology of human sex differences***, 2006 Apr 6; 354(14):1507-14.
 - Garabou G , Moren C , Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, Casademont J. ***The effects of sepsis on mitochondria*** 2012.
 - Gilbert D.L, ***Fifty years of radical ideas***, Ann NY Acad Sci, 899:1, 2000.
 - Grune T, Reinhecker T, Davies KJA ***Degradation of oxidized proteins in mammalian cells***, 1997 FASEBJ 11:526-534.
 - Halliwell B, Gutteridge JMC, ***Free Radicals in Biology and Medicine***, 11: 416-493, 188-266, 1989.
 - Halliwell B and Gutteridge JMC, ***Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview***, in Parker L, Glazer AN , Methods in Enzyme bgy 186, 1990.
 - Halliwell B, Gutteridge JMC, “***The antioxidants of human extracellular fluids***”, Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 1–8, 1990.
 - Halliwell B., ***Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease***, Encyclopedia of Life Science, 2001.
 - Hess M.L., Manson N.H ***Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury***. 1984 (November) J. Mol. Cell. Cardiol. 16(11):969–985.
 - Jay K. Kolls ***Oxidative stress in sepsis: a redox redux*** J Clin Invest. Apr 3, 2006; 116(4): 860–863.
 - John W Baynes and Marek H Dominiczak, 2012 ***Medical Biochemistry***, chapter *The beneficial effects of reactive oxygen species*).
 - Jones A.E., Puskarich M.A., 2009. ***Sepsis - Induced Tissue Hypoper fusion***. *Critical Care Clinics*, 25, pp. 769–779.
 - Jones DP. ***Redefining oxidative stress.Antioxid Redox Signal***. 2006 8:1865–1879.
 - Kendra N. Iskander, Marcin F. Osuchowski, Deborah J. Stearns-Kurosawa, Shinichiro Kurosawa, David Stepien, Catherine Valentine, and Daniel G.

- Remick ***Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding*** *Physiol Rev.* Jul 2013; 93(3): 1247–1288.
- Konrad Reinhart, Michael Bauer, Niels C. Riedemann, and Christiane S. Hartog' 2012 ***New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers.***
 - Kumar, Anand MD; Roberts, Daniel MD; Wood, Kenneth E. DO; Light, Bruce MD; Parrillo, Joseph E. MD; Sharma, Satendra MD; Suppes, Robert BSc; Feinstein, Daniel MD; Zanotti, Sergio MD; Taiberg, Leo MD; Gurka, David MD; Kumar, Aseem PhD; Cheang, Mary MSc ***Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock****, Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 34(6), June 2006, pp 1589-1596.
 - Lee P. Skrupky, Pharm.D., B.C.P.S., Paul W. Kerby, M.B B.S., and Richard S. Hotchkiss, M.D, ***Advances in the Management of Sepsis and in the Understanding of Key Immunologic Defects of the Disorder*** *Anesthesiology.* Dec 2011; 115(6): 1349–1362.
 - Leigh Boardman, John S. Terblanche, Stefan K. Hetz,Elrike Marais and Steven L. Chown ***Reactive oxygen species production and discontinuous gas exchange in insects*** , 24 Aug 2011.
 - Levine RL. ***Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease.*** *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
 - Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, ***An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer's Disease***, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
 - Marshall JC. ***SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care?*** , 2000 Dec, 14(6):586-9.
 - Martin G, Brunkhorst FM, Janes JM, Reinhart K, Sundin DP, Garnett K, Beale R ***The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes.*** *Crit Care.* 2009; 13(3):R103.
 - Martin GS, Mannino DM, Moss M ***The effect of age on the development and outcome of adult sepsis*** *Crit Care Med.* 2006 Jan, 34(1):15-21.
 - McCue JD ***Antibiotic use in the elderly: issues and nonissues*** *Clin Infect Dis.* 1999 Apr, 28(4):750-2.

- Pani G., Galeotti T. and Chiarugi P. (2010) ***Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress*** *Cancer Metastasis Rev* 29:351–378.
- Ronan M. G. Berg, Kirsten Moller and Damian M. Bailey, ***Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis***, July 2011 *J Cereb Blood Flow Metab* 31(7): 1532–1544.
- Schottmueller H. 1914, ***Wesen und Behandlung der Sepsis***. *Inn. Med.* 31:257–280
- Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. ***Allium Vegetables in Cancer Prevention: An Overview*** *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2004, 5: 237-245.
- Sies H. ***Oxidative Stress***. 1985 London Academic.
- Scott K. Powers and Malcolm J. Jackson ***Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production*** *Physiol Rev.* Jul 23, 2010. *Physiol Rev.* Oct 2008; 88(4): 1243–1276.
- Stadtman ER ***Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function***, 1986, *Trends Biochem Sci* 11: 11-12.
- Spink WW., ***1978 Infectious diseases. Prevention and treatment in the nineteenth and twentieth centuries***. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN.
- Stuart G. Jarrett and Michael E. Boulton ***CONSEQUENCES OF OXIDATIVE STRESS IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION***, *Mol Aspects Med.* Aug 2012; 33(4): 399–417.
- Weiss SL, Deutschman CS. ***Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about?*** *Crit Care.* 2014 Mar 19;18(2):125.
- Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH ***Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males***. *Crit Care Med.* 1997 Jan; 25(1):106-10.