



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Measurement of oxidative stress markers in drug addicts blood

Μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα τοξικομανών

Κορτσινίδου Αικατερίνη

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Λάρισας 2017-2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δημήτριος Στάγκος : Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τσιτσιμπίκου Χριστίνα: Γενικό Χημείο Κράτους , Εθνικό γραφείο στήριξης REACH & CLP

*Στην αγαπημένη μου οικογένεια
για την αγάπη και τη στήριξη
όλα αυτά τα χρόνια....*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κ. Κουρέτα Δημήτριο, καθηγητή Τοξικολογίας-Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος “Τοξικολογία”, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου και για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Σπανίδη Άκη, ο οποίος ήταν παρών καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και με βοήθησε τόσο με τις συμβουλές του όσο και με τη συμμετοχή του στη πειραματική διαδικασία.

Τέλος, ευχαριστώ τους υπόλοιπους συναδέλφους του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα και για την βοήθεια τους όποτε την χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	Error! Bookmark not defined.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Γενικά.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών.....	9
1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	10
1.4 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Κυτόχρωμα P450.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.3 Υπεροξειδιοσώματα.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.4 Αιμοσφαιρίνη.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.5 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.....	15
1.4.6 Φλεγμονή.....	16
1.5 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	16
1.6 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών.....	17
1.6.1 Λιπίδια.....	18
1.6.2 Πρωτεΐνες.....	18
1.6.3 DNA.....	18
1.6.4 Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων.....	19
1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	19
1.7.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	20
1.7.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	20
1.7.1.2 Καταλάση (CAT).....	21
1.7.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).....	21
1.7.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).....	21
1.7.1.5 Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD).....	22
1.7.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	23
1.7.2.1 Βιταμίνη E.....	23
1.7.2.2 Βιταμίνη C.....	24
1.7.2.3 Β-καροτίνη.....	25
1.7.2.4 Σελήνιο.....	25
1.7.2.5 Γλουταθειόνη.....	26
1.7.2.6 Ουρικό οξύ.....	27
1.7.2.7 Συνένζυμο Q10.....	27
1.8 Οξειδωτικό στρές.....	28
1.9 Μεθαδόνη.....	28
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 Επεξεργασία αίματος.....	30
2.2 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρές.....	31
2.2.2 Μέτρηση γλουταθειόνης (GSH).....	31
2.2.3 Μέτρηση καταλάσης (CAT).....	35
2.2.4 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	37
2.2.5 Μέτρηση TBARS.....	40
2.2.6 Μέτρηση καρβονυλίων.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για το οξειδωτικό στρές και για τις επιβλαβείς επιπτώσεις του στον οργανισμό. Η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί τόσο στους παράγοντες που προκαλούν το οξειδωτικό στρές αλλά κυρίως σε τρόπους αντιμετώπισης του μέσω της διατροφής χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικά. Ωστόσο το οξειδωτικό στρές έχει διαφορετικές επιπτώσεις ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ανθρώπων.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να μελετήσει μία συγκεκριμένη ομάδα τους τοξικομανείς μέσω μέτρησης δεικτών οξειδωτικού στρές στο αίμα τους. Μελετήθηκαν 20 δείγματα χρηστών μεθαδόνης των οποίων η αιμολυψία έγινε μέσα στον OKANA. Τα δείγματα περιείχαν τόσο πλάσμα όσο και αιμόλυμα. Το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για να μετρήσουμε τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα TAC. Το αιμόλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηρότητας της καταλάσης. Από τους δείκτες που μετρήθηκαν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλους τους δείκτες εκτός από την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Από τη μία πλευρά είδαμε αύξηση της συγκέντρωσης στα καρβονύλια και στα TBARS ενώ είδαμε σημαντική μείωση στα επίπεδα γλουταθειόνης και καταλάσης στους τοξικομανείς σε σχέση με τα control. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα έδειξαν όντως ότι υπάρχει διαφορά στους δείκτες ανάμεσα στους τοξικομανείς και σε υγιείς ανθρώπους και μπορούμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα για το πόσο επιβαρύνεται η άμυνα του οργανισμού μέσα από τη χρήση μεθαδόνης.

ABSTRACT

In recent years, there has been a keen interest in the oxidative stress and its harmful effects on the human organism. The scientific community has turned both on the factors that cause the oxidative stress but mainly on ways to treat it through diet using antioxidants. However, the oxidative stress has different effects among different groups of people.

This diploma thesis aims at studying a specific group of drug addicts by measuring oxidative stress markers in their blood. 20 samples of methadone users whose hemolysis was made in OKANA were studied. The samples contained both plasma and hemolysis. Plasma was used to measure TBARS, proteinaceous carbonyls and total TAC antioxidant capacity. The haemolysis was used to determine reduced glutathione (GSH) and catalase activity. Of the indicators measured, a statistically significant difference was observed in all indicators except total antioxidant capacity (TAC). On the one hand, we saw an increase in carbonyl and TBARS concentration, while we saw a significant decrease in glutathione and catalase levels in drug addicts relative to controls

Summarizing the results showed that there is a difference in the markers between drug addicts and healthy people and we can draw some conclusions about how much the body defenses through the use of methadone.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

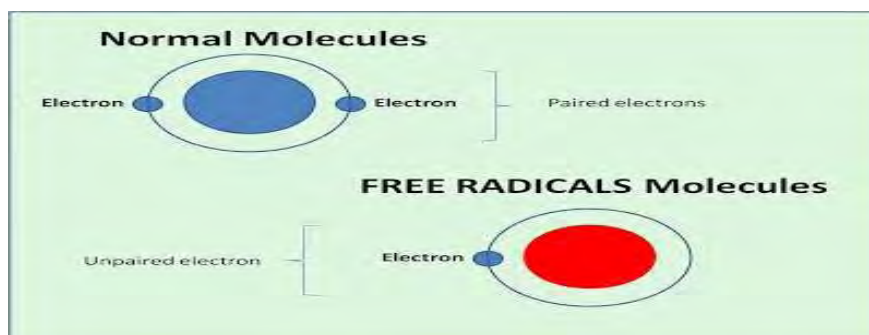
ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1 Γενικά

Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας των ατόμων και των μορίων βρίσκονται συνήθως σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε μια καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται αντίστοιχα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, που φέρουν στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα του ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηριότητα του μορίου ή του ατόμου, γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά άτομα, προκειμένου να σχηματίσει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που θα κάνει τη δομή του σταθερότερη.

Γενικά οι ελεύθερες ρίζες οφείλουν την αστάθειά τους και τη μεγάλη του χημική δραστηριότητα στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους (Valavanidis, 2006). Σε αυτή τους τη μεγάλη χημική δραστηριότητα αποδίδεται και το γεγονός πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του εκάστοτε βιολογικού υποστρώματος. Σε περίπτωση που το βιολογικό υπόστρωμα είναι το DNA τότε είναι δυνατόν να προκληθούν μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν στον καρκίνο.

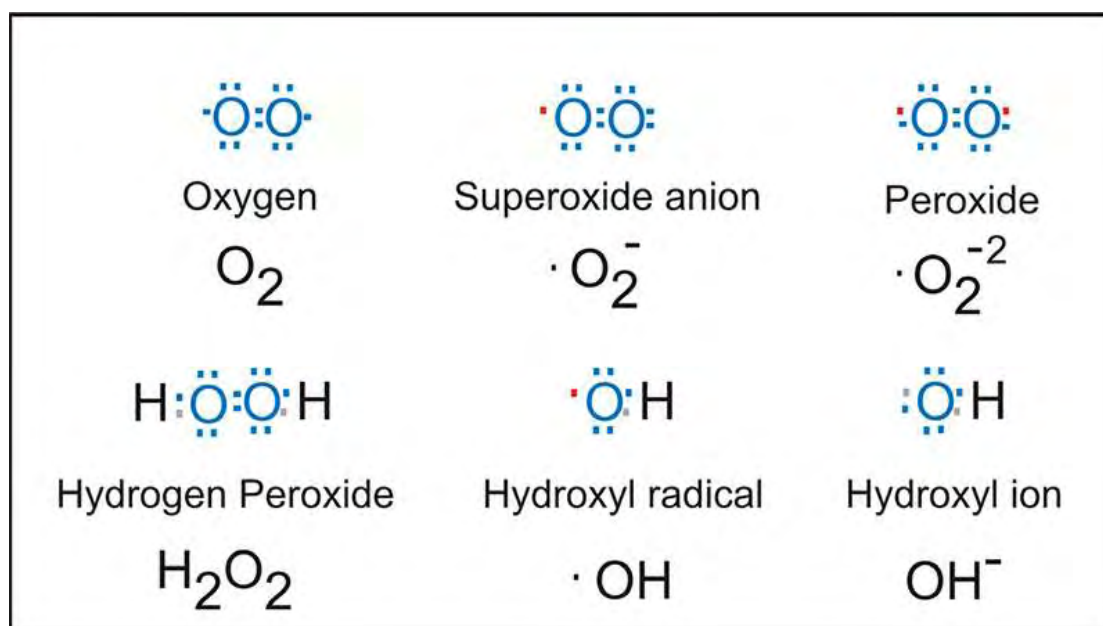


Εικόνα 1. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα που δημιουργεί ελεύθερη ρίζα

1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων οι πιο συνήθεις ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες ανήκουν οι ρίζες:

- ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$),
- ανιόν υπεροξειδίου ($O_2\cdot^{-2}$),
- υδροξυλίου ($OH\cdot$),
- αλκοξειδίου ($RO\cdot$),
- υπεροξειδίου ($RO_2\cdot$).



Εικόνα 2: Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS)

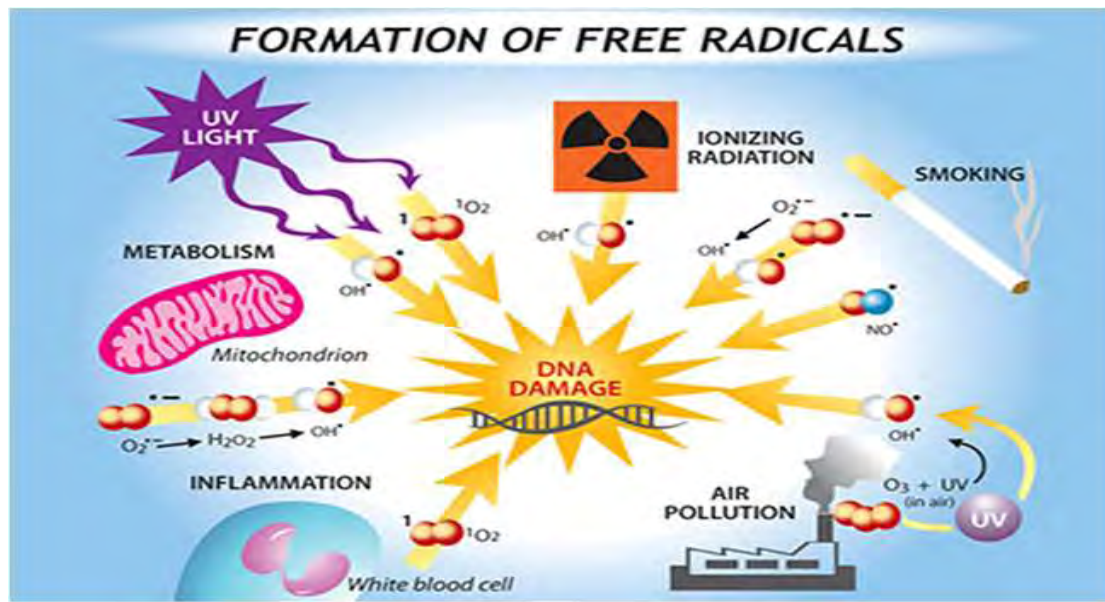
Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman & Slater, 1993). Στις **ROS** επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το

υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).

Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται και οι δραστικές μορφές αζώτου (**RNS**) που προέρχονται από το άζωτο, με συνήθη στο εσωτερικό των κυττάρων τη ρίζα $NO\cdot$, οι δραστικές μορφές θείου (**RSS**) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (**RCS**) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles et al., 2002).

1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ως παραπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια ή και κατά τη λιπιδική οξείδωση. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν οι ακτινοβολίες (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία), η φλεγμονή, το κάπνισμα και η ρυπασμένη ατμόσφαιρα. Η παρουσία ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται, προκειμένου να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παράγονται ως παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών, όπως προαναφέρθηκε.



Εικόνα 3. Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες:

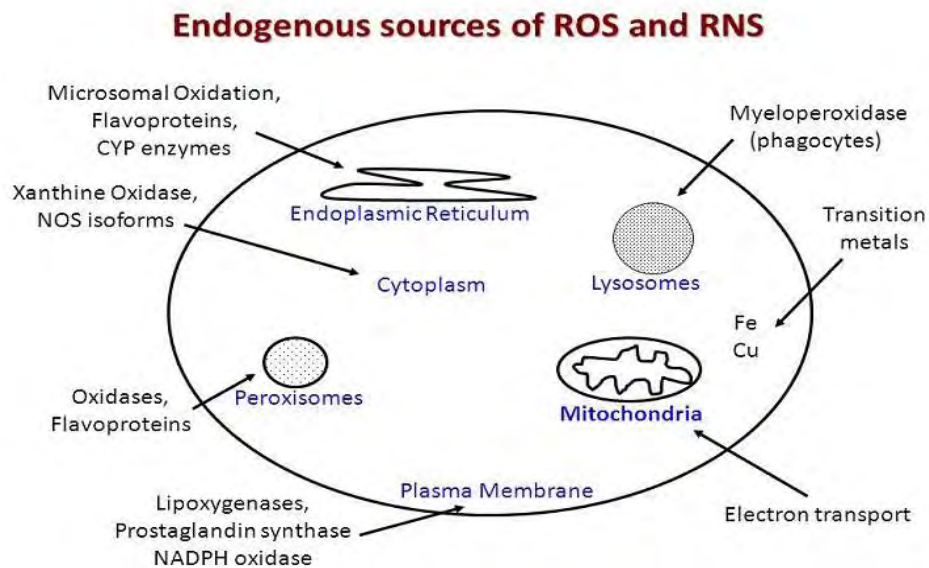
- ◆ Είναι ρυθμιστές της ομοιόστασης και της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών, συμμετέχοντας στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και ενεργοποιώντας τη διαδικασία της απόπτωσης.
- ◆ Ενεργοποιούν ένζυμα και προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς.
- ◆ Αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων έναντι παθογόνων μικροοργανισμών
- ◆ Η ρίζα NO^\cdot είναι σημαντικός ρυθμιστής της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυϊκών ιστών.

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται ο όρος Reactive Oxygen Species (ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\cdot-}$ και το OH^\cdot . Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^\cdot), του αλκοξυλίου (RO^\cdot), και του περοξυλίου (ROO^\cdot).

Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθύλιου (CCl_3^\cdot), οι θειούχες ρίζες (RS^\cdot) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

1.4 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών προέρχεται από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το οξυγόνο το οποίο σε συγκεντρώσεις πάνω από 21% είναι τοξικό. Αν και κατά βάση οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται επιβλαβείς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και εξυπηρετούν σε συγκεκριμένες διεργασίες όπως: η μεταγωγή σήματος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η φαγοκυττάρωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, διαδικασία που απαιτεί την ύπαρξη ενός οξειδωμένου περιβάλλοντος.



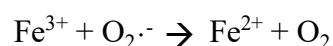
Εικόνα 4: Ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS και RNS

1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διεργασία στην οποία 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, των αμινοξέων και τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέως. Περιλαμβάνει την αναγωγή του O_2 σε H_2O με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το $FADH_2$ δια μέσου μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-

ουβικινόνης, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης-κυτοχρώματος c και η οξειδάση του κυτοχρώματος c αποτελούν τα βασικά σύμπλοκα μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια που καταλύουν την αναγωγή του O₂. Ωστόσο η μερική αναγωγή του O₂ οδηγεί στην παραγωγή O₂^{·-} (Berg et al., 2010). Το O₂^{·-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O₂^{·-} και στο H₂O₂ δημιουργείται OH[·].

Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή:



Το δεύτερο βήμα είναι η αντίδραση Fenton:

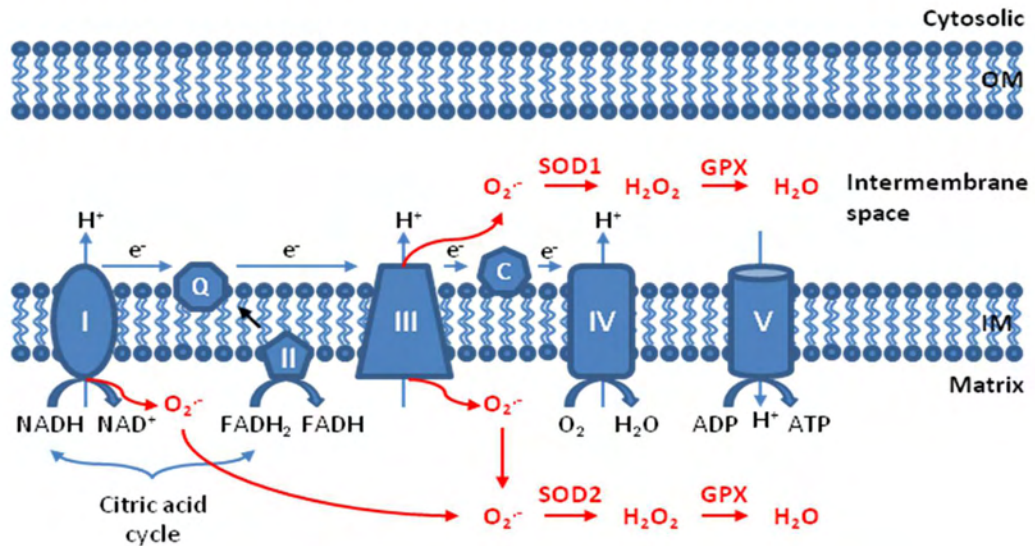


Η πλήρης αντίδραση:



Επομένως, κατά την αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόν, οι οποίες είναι επικίνδυνες για τα κύτταρα καθώς προκαλούν βλάβες στις πρωτεΐνες, στα μεμβρανικά λιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα.

Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα είναι αυξημένα κατά 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, άμεσα αυξάνεται η παραγωγή ριζών οξυγόνου που ξεφεύγουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια προκαλείται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

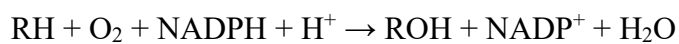


Εικόνα 5 : παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση

1.4.2. Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό, τα ένζυμα του περιέχουν μια αίμη ως συμπαραγόνα και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται ως αιμοπρωτεΐνες, βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Ο κύριος μηχανισμός λειτουργίας του είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα ξενοβιοτικό RH είναι η ακόλουθη:



Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών ουσιών τις καθιστά περισσότερο υδατοδιαλυτές και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, ωστόσο ορισμένες φορές η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει στους τοξικούς μεταβολίτες τους (Zangar et al., 2004).

1.4.3. Υπεροξειδιοσώματα

Είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα, όπως η καταλάση, για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Τα υπεροξειδιοσώματα συμμετέχουν στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των οποίων παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al., 2010).

1.4.4. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει στην παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα η αυτοοξείδωση της οξυαιμοσφαιρίνης και οξυμυοσφαιρίνης οδηγεί στο σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$ και στην συνέχεια σε σχηματισμό H_2O_2 (Cooper et al., 2002).

1.4.5. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

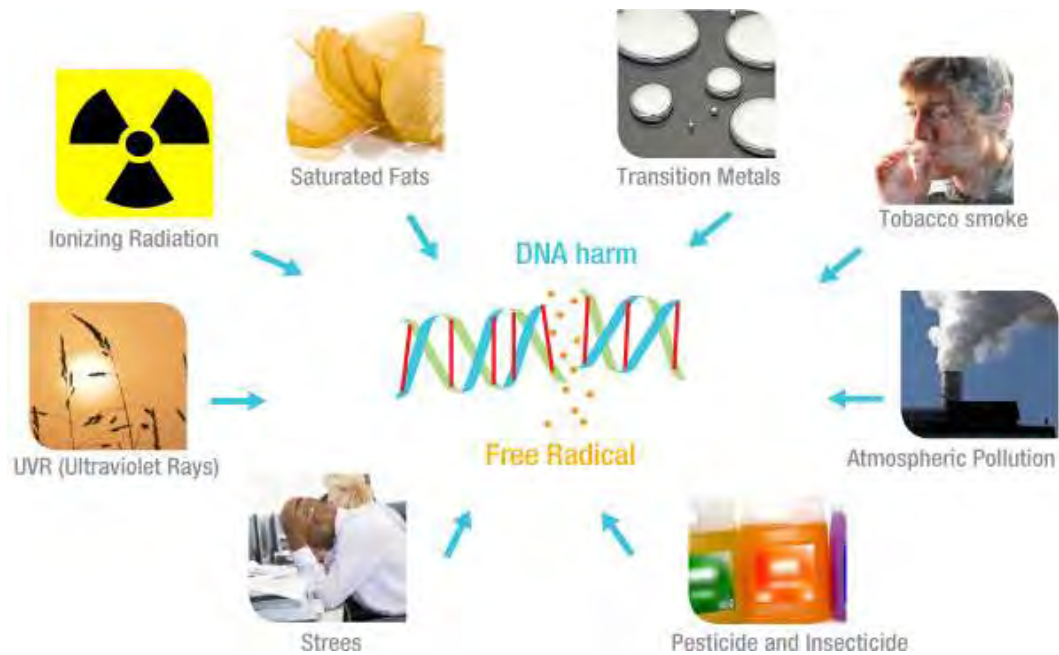
Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό σε AMP. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα δύο στάδια της αντίδραση αυτής, η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύονται από σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1999; Vina et al., 2000). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

1.4.6 Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος παράγουν ουσίες που σκοπό έχουν να προστατεύσουν τον οργανισμό από κάποια μόλυνση και από "ξένα σώματα", όπως βακτηρία και ιούς. Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ανοσοποιητικό μηχανισμό του οργανισμού (Pyne, 1994; Slauch, 2011). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani et al., 1992). Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύνονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Φλεγμονή μπορεί να προκληθεί κατά τη διάρκεια έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της καταστροφής μυϊκών ινών.

1.5 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

- Έκθεση σε ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία)
- Κάπνισμα
- Ατμοσφαιρική ρύπανση
- Υπεροξεία
- Βιομηχανικά απόβλητα
- Φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα
- Ιόντα βαρέων μετάλλων
- Φάρμακα και ξενοβιοτικά
- Αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ
- Στρες
- Κορεσμένα λιπαρά



Εικόνα 6 : Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.6 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Είναι πλέον καλά αναγνωρισμένος ο διπλός ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS). Η υπερβολική παραγωγή τους οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ROS και RNS έχουν ευεργετικά για τον οργανισμό αποτελέσματα καθώς διαδραματίζουν ενδοκυτταρικούς ρόλους. Όπως αναφέρθηκε 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) και γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

1.6.1 Λιπίδια

Όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια, τα οποία είναι ευαίσθητα σε οξείδωση και μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών υπεροξειδίου $ROO\cdot$, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneany, 2001).

1.6.2 Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine & Stadtman, 2001; Levine, 2002).

1.6.3 DNA

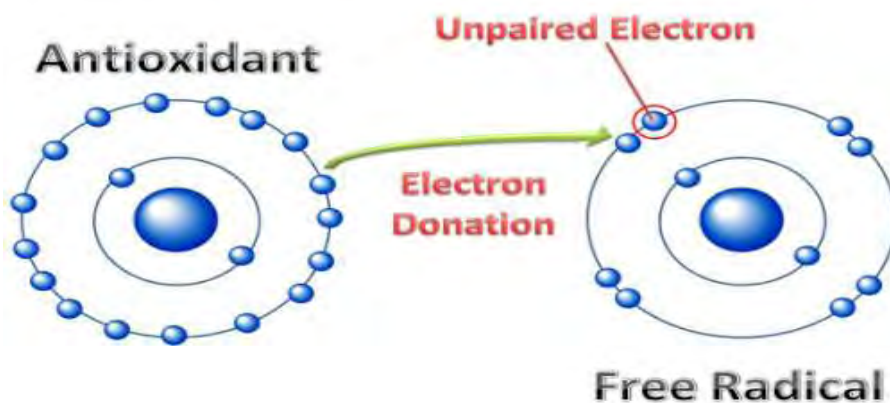
Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο ωστόσο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το αλλοιώσουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα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

1.6.4 Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων

Η σημαντικότερη μάλλον δράση των ελευθέρων ριζών είναι η διαταραχή που επέρχεται στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων. Για να επιτευχθεί ομοιόσταση του κυττάρου είναι απαραίτητο να υπάρχει ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης ελευθέρων ριζών. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων όπως κινάσες, φωσφατάσες και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζονται από την ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση (Latimer & Veal, 2016). Η έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικές ουσίες που εξαντλούν τα αποθέματα της γλουταθειόνης, επάγει την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και οδηγεί σε πληθώρα αλλαγών σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο.

1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1999). Οι οργανισμοί για να προστατευτούν από τις βλαβερές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών, έχουν αναπτύξει μια σειρά από προστατευτικούς μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.



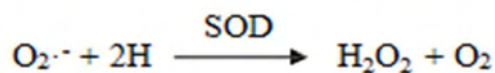
Εικόνα 7: Δράση αντιοξειδωτικών ουσιών σε ελεύθερες ρίζες

1.7.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στους ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR).

1.7.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

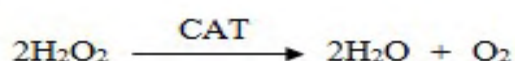
Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu-Zn-SOD), ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα (Valko et al., 2006).

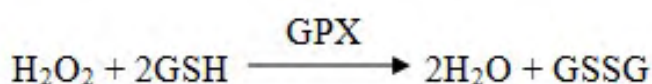
1.7.1.2 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται σε οξυγόνο (όπως βακτήρια, φυτά και ζώα). Είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στην προστασία του κυττάρου από οξειδωτικές βλάβες από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα ενώ εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών και του ήπατος, στους γλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 (Antunes et al., 2002).



1.7.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

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



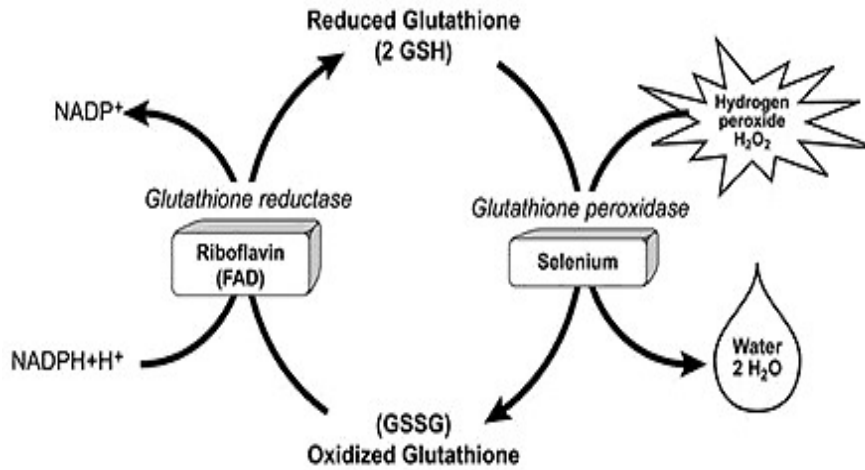
όπου: GSH → ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG → οξειδωμένη γλουταθειόνη

1.7.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

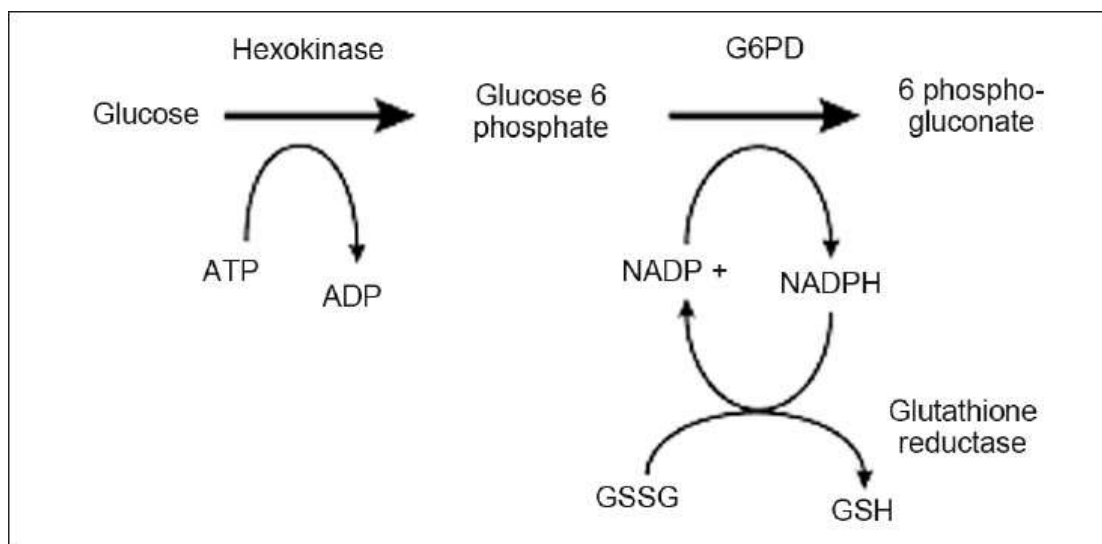
(FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH (Antunes et al., 2002).



Εικόνα 8 : Σχέση σύνδεσης της αναγωγής της γλουταθειόνης με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

1.7.1.5 Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι ένα ένζυμο στο μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης. Το G6PD μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλύκανο-δ-λακτόνη. Η οδός της G6PD/NADPH είναι η μόνη πηγή του ανηγμένης γλουταθειόνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα). Ο ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων ως φορείς οξυγόνου τα θέτει σε ουσιαστικό κίνδυνο βλάβης από τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες χωρίς την προστατευτική επίδραση της G6PD / NADPH / γλουταθειόνης (Berg et al., 2010).



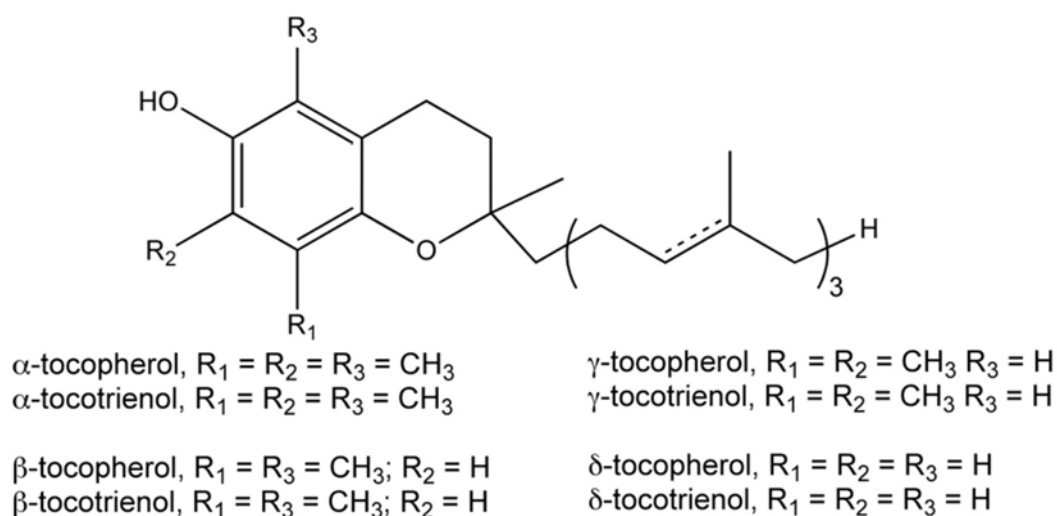
Εικόνα 9: Σχέση G6PD με την Αναγωγή της γλουταθειόνης

1.7.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

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

1.7.2.1 Βιταμίνη E

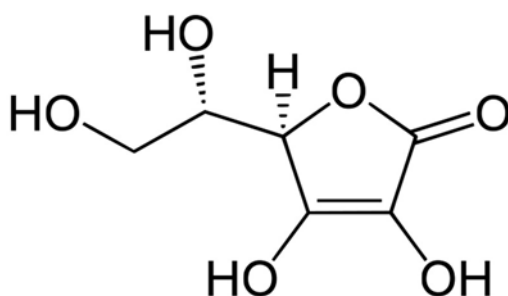
Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες. Από τις πολλές διαφορετικές μορφές της βιταμίνης E, η γ-τοκοφερόλη είναι η πιο κοινή, ενώ η α-τοκοφερόλη είναι η περισσότερο βιολογικά δραστική και η δεύτερη συνηθέστερη μορφή της βιταμίνης E. Καθώς έχει λιποδιαλυτή φύση ενσωματώνεται σε κυτταρικές μεμβράνες και τις προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες. Ως αντιοξειδωτικό, σταματά την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την λιπιδική υπεροξείδωση δημιουργώντας μια ρίζα τοκοφερόλης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία. Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 10 : Δομή Τοκοφερολών

1.7.2.2 Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

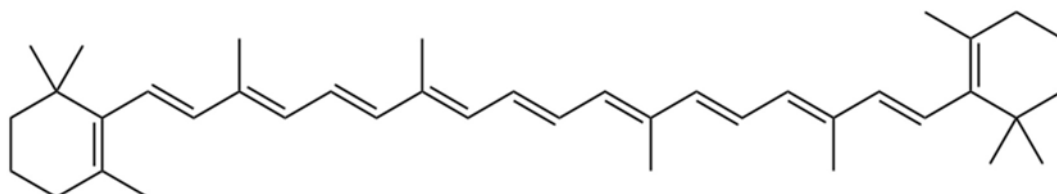
Η βιταμίνη C είναι η πιο γνωστή βιταμίνη και είναι υδατοδιαλυτής φύσης. Ονομάζεται και ασκορβικό οξύ. Ο βιολογικός της ρόλος είναι να δρα ως αναγωγικό μέσο, δωρίζοντας ηλεκτρόνια σε ενζυμικές και μη αντιδράσεις. Αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS. Οι οξειδωμένες μορφές της μπορούν να ανάγονται από την γλουταθειόνη και από μη ενζυμικούς εξαρτώμενους από το NADPH μηχανισμούς. (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 11 : Δομή ασκορβικού οξέος

1.7.2.3 Β-καροτίνη

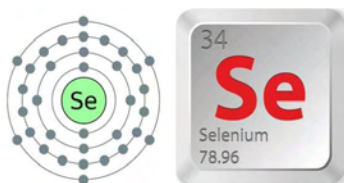
Το β-καροτένιο αποτελεί προβιταμίνη καθώς μπορεί να μετατραπεί στην βιταμίνη Α. Το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο (Pham-Huy et al., 2008). Είναι λιποδιαλυτό μόριο και κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Πιστεύεται ότι μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 12 : Δομή β-καροτενίου

1.7.2.4 Σελήνιο (Se)

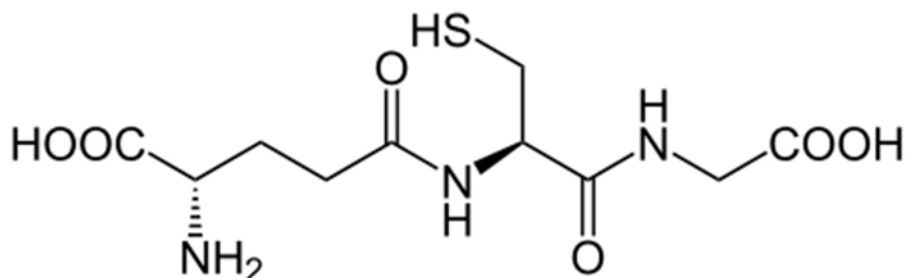
Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία και είναι αναγκαίο για την κυτταρική λειτουργία πολλών οργανισμών. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Το σελήνιο αποτελεί συστατικό των αντιοξειδωτικών ενζύμων: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και αναγωγάση της θειορεδοξίνης, που εμμέσως μειώνουν τις συγκεντρώσεις ορισμένων οξειδωμένων μορίων στα ζώα και σε κάποια φυτά. Λειτουργεί δηλαδή ως συμπαραγοντας των συγκεκριμένων ενζύμων συμμετέχοντας στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 13 : Σελήνιο

1.7.2.5 Γλουταθειόνη

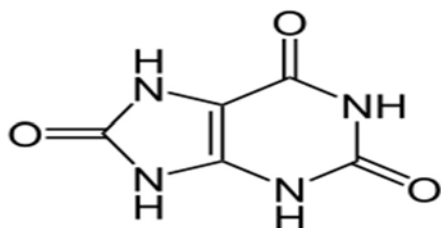
Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό, καθώς προλαμβάνει τις βλάβες σε σημαντικά κυτταρικά συστατικά. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Συντίθεται από την συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης (GCS) και την συνθετάση της γλουταθειόνης (GSS). Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1999; Mendoza-Cozatl et al., 2005). Σε υγιή κύτταρα και ιστούς, περισσότερο από το 90% της συνολικής γλουταθειόνης βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή (GSH) και λιγότερο από το 10% υπάρχει με τη μορφή δισουλφιδίου (GSSH). Μία αυξημένη αναλογία GSSG προς GSH θεωρείται ενδεικτικό οξειδωτικού στρες (Halprin & Ohkawara, 1967).



Εικόνα 14: Δομή γλουταθειόνης

1.7.2.6 Ουρικό οξύ

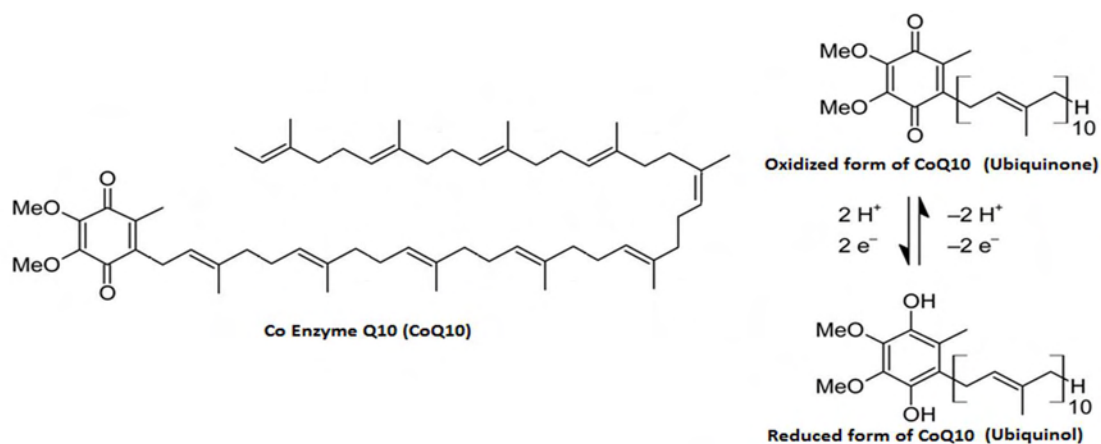
Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και να συμβάλει στην προστασία από τις ROS. Το ουρικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως αντιοξειδωτικό κυρίως στο πλάσμα (Sautin & J 2008).



Εικόνα 15: Δομή ουρικού οξέος

1.7.2.7 Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συμμετέχει στην αερόβια κυτταρική αναπνοή κατά την οποία παράγεται ATP. Το 95% της ενέργειας του ανθρώπινου σώματος παράγεται με αυτόν τον τρόπο (Ernster & Dallner, 1995). Βρίσκεται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, κυρίως στα μιτοχόνδρια. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 16: Δομή Συνενζύμου

1.8 Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ROS. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ROS οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό στρες** και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών (Cicerale et al., 2008; AICR, 2007).

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες συνήθως προκαλείται από τους εξής παράγοντες:

(1) Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

(2) Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

1.9 Μεθαδόνη

Η μεθαδόνη ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων, γνωστή με το όνομα οπιοειδή. Τα φάρμακα αυτά χαρακτηρίζονται από παρόμοια χημική δομή και δράση με τη μορφίνη. Στα οπιοειδή ανήκουν επίσης φυσικά και ημισυνθετικά παράγωγα του οπίου (οπιούχα, όπως η κωδεΐνη, η μορφίνη και η ηρωίνη). Τα οπιοειδή χαρακτηρίζονται ως κατασταλτικά φάρμακα, καθώς επιβραδύνουν τις λειτουργίες του νευρικού συστήματος. Άλλες κατασταλτικές ουσίες είναι το αλκοόλ, η κάνναβη και οι βενζοδιαζεπίνες (όπως το Stedon, το Hipnosedon και το Vulbegal). Η μεθαδόνη παρασκευάζεται συνθετικά και χρησιμοποιείται στη θεραπεία υποκατάστασης για άτομα εξαρτημένα από την ηρωίνη, ή άλλα οπιοειδή. Η δράση της διαρκεί πολύ περισσότερο από της ηρωίνης. Μία δόση είναι αποτελεσματική για τουλάχιστον 24 ώρες, ενώ η ηρωίνη μπορεί να διαρκεί λίγες μόνο ώρες. Στα Θεραπευτικά Προγράμματα Υποκατάστασης η μεθαδόνη χορηγείται υπό την μορφή πόσιμου

διαλύματος (σιρόπι). Η ημερήσια δοσολογία κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 60 και 120mg, κατά την αρχική φάση. Η δόση αυτή μπορεί κατόπιν να μειώνεται σταδιακά, με αργό ρυθμό, χωρίς τον κίνδυνο εμφάνισης στερητικών φαινομένων.

Τι προσφέρει η μεθαδόνη;

Όταν η μεθαδόνη χορηγείται στην κατάλληλη δοσολογία εξαλείφει τα στερητικά συμπτώματα της ηρωίνης και των άλλων οπιοειδών, ενώ μειώνει την επιθυμία που έχει το εξαρτημένο άτομο να κάνει χρήση ηρωίνης. Πέραν αυτών επαναφέρει στο φυσιολογικό πολλές λειτουργίες του οργανισμού που έχουν διαταραχθεί από την κατάχρηση ουσιών. Έτσι δίνεται η ευκαιρία να βελτιωθεί η σωματική κατάσταση, η ψυχική υγεία, αλλά και οι κοινωνικές λειτουργίες του ατόμου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Επεξεργασία Αίματος

Στο εργαστήριο αμέσως μετά από κάθε αιμοληψία, εκτελείτο επεξεργασία των δειγμάτων για την συλλογή αιμολύματος και πλάσματος. (V. Ramnath, et. al., 2007). Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και στο πλάσμα για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των TBARS, και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Περιγραφή Μεθόδου.

1. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.
2. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.
3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρωση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.
4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).
6. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20 °C.

Στην συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

1. Προσθέτουμε 500 μl αιμολύματος σε 500 μl 5% TCA σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της γλουταθειόνης.

2.2 Προσδιορισμός Δεικτών Οξειδωτικού Στρες Στο Αίμα

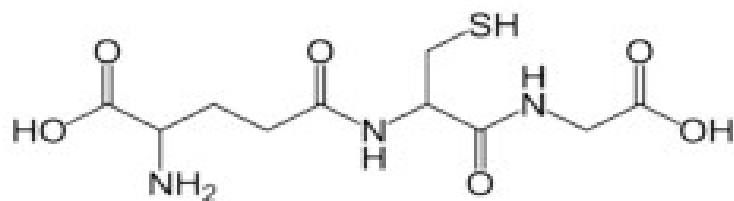
2.2.1 Αξιολόγηση των δεικτών: TBARS, CARB, TAC, GSH, CAT.

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια σειρά από βιοχημικούς δείκτες. Για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων χρησιμοποιούμε ως δείκτη τις ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουτικό οξύ. Για την οξείδωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται να πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης, η δραστηριότητα της καταλάσης και η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος.

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά και οι αρχές των μεθόδων καθώς και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω. Να σημειωθεί πως για κάθε δείκτη που μετρήθηκε πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα ,γεγονός που προσδίδει μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα.

2.2.2 Μέτρηση Γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστέινογλυκίνη) 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), με την τελευταία (GSSG) να αποτελεί το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al., 2003).

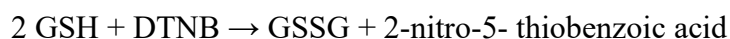


Εικόνα 15. Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης

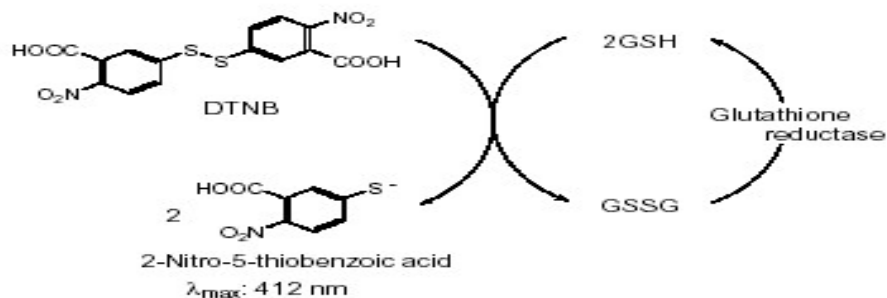
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al., 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι, επίσης, ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών 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).

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. 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 τη GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα . Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95).

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178.

Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

□ **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό\

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

□ **Κιτρικό Νάτριο.** (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10.

Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό

πρωτόκολλο

300μL αιμολύματος προστίθενται σε 300μL TCA 5% και φυγοκεντρώνονται στα 16.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διατηρείται σε φιαλίδιο erpendorf. Σε 300 μL αιμολύματος προστίθενται 90μL TCA 5%, Ανακινούνται με vortex και φυγοκεντρώνονται στα 16.000 g για 5min στους 5°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf για τη συνέχεια του πειράματος. Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

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

Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα εppendorf και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Roland F. Beers, Jr. and Irwin W. Sizer. 1952).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα GSH (mmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta abs_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου 262.6 ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010µL) με τον όγκο του αιμολύματος (20µL) ($1010/20=50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (300µL αιμολ. / 300µL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390µL / 300µL) που έγιναν από το 5% TCA. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

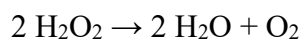
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της 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.

2.2.3 Μέτρηση Καταλάσης

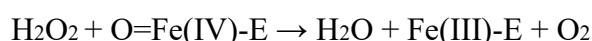
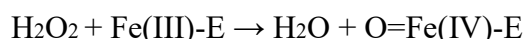
Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. (Chelikani P, et. al., 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H₂O₂ το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο.

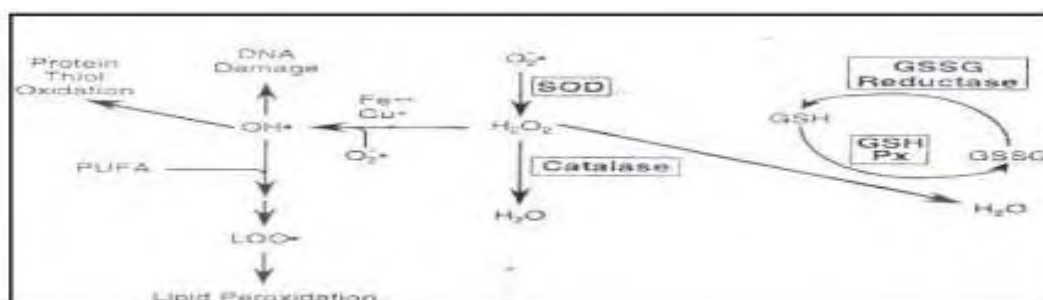
Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon EM, et. al. 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



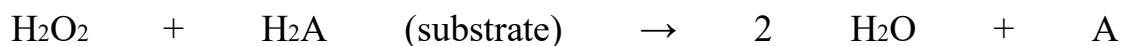
(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 10. Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al., (1984).

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματικό

πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μL

Πίνακας 6. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

- 1.Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37°C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
- 2.Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
- 3.Προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλιμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης ($U/\text{mg Hb}$) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$. Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) (3000/4=750), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων. Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοφαιρίνη.

$\Delta \text{ Abs}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol}/\text{min}$.

$\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

2.2.4 Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο

επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Αρχή της μεθόδου

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

Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Αντιδραστήρια

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178.

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH₂PO₄ (10 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

DPPH 0.1 mM, MB: 394.32

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

Ασκορβικό οξύ 10 mM

Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των

δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorf:

	Blank	Θετικό control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μ L	495 μ L	480 μ L
DPPH 0.1 mM	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	-	5 μ L	-
Πλάσμα	-	-	20 μ L

Πίνακας 7. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC.

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, % 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

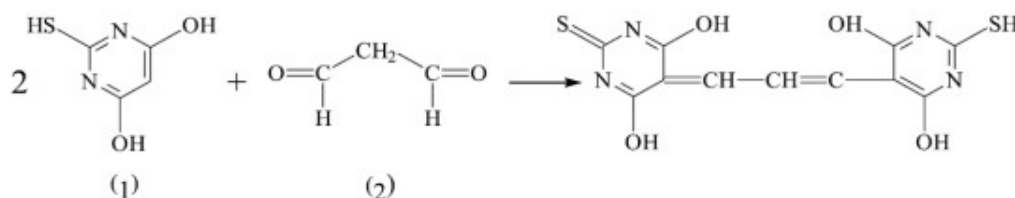
την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50). δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL ορού.

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

2.2.5 Μέτρηση TBARS

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 μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 11. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

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

Αντιδραστήρια

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).

MB (Tris): 121.14.

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

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

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

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM).

MB (TBA): 144.1

MB (Na₂SO₄): 142.04.

Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

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 ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).

Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 min στο υδατόλουτρο.

Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.

Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.

Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 $^\circ\text{C}$ για 3 min.

Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

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

2.2.6 Μέτρηση Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

Αρχή της μεθόδου

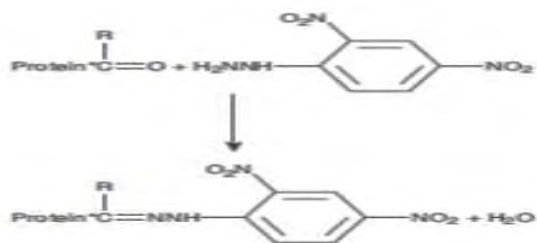
Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο

οξυγόνου C = O, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. 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-δίνιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004).



Εικόνα . Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNPH (δίνιτριφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 2.5 N

HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος

του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

DNPH 14 mM (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

Ουρία 5 M (pH 2.3). (MB: 60.06)

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε 50 μ L πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorf 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 κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, 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. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού εθυλεστέρα (αναλογία μείγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που

δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022$
x 1000/50. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι 22 mM x cm⁻¹.

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

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

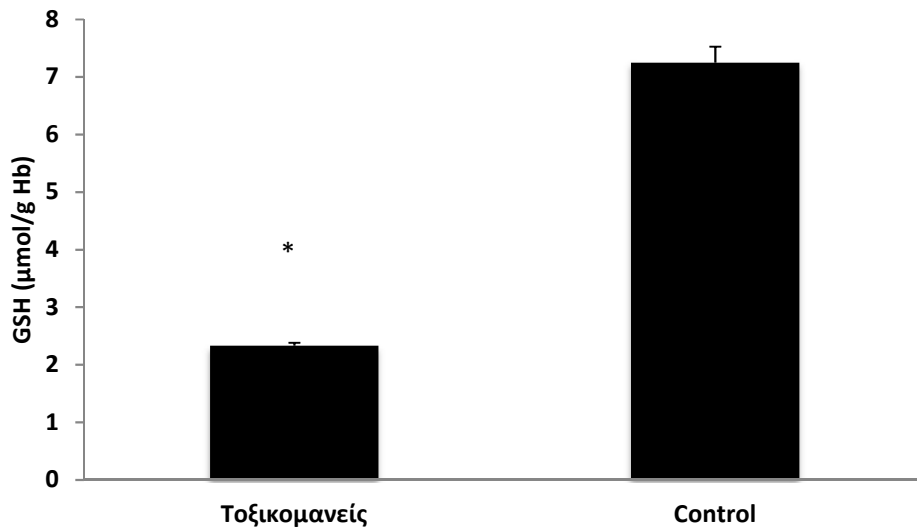
συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ. mg/mL.

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70mg/mL

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επίπεδα ανηγμένης Γλουταθειόνης

Όσο αφορά τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αιμόλυμα τοξικομανών παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά με μείωση στη συγκέντρωσή της σε σχέση με το αίμα υγιών εθελοντών.



Γράφημα 1 : Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

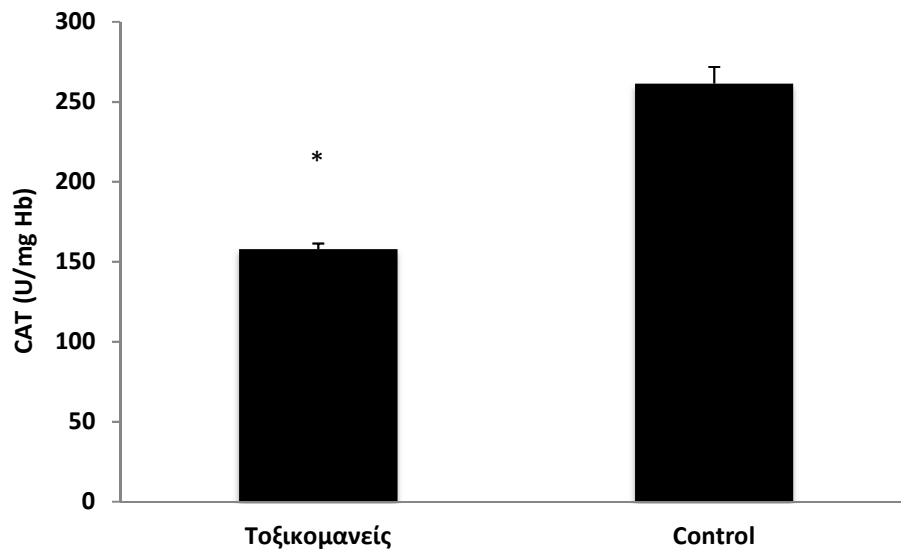
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά

	Συγκέντρωση GSH(μmol/gHb)
Τοξικομανείς	2,33
Control	7,24

Πίνακας 1 : Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης

2. Δραστηκότητα ενζύμου Καταλάσης

Όσο αφορά τη δραστηκότητα της καταλάσης στο αιμόλυμα επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με μείωση της συγκέντρωσής της στους τοξικομανείς σε σχέση με τους υγιής εθελοντές.



Γράφημα 2 : Συγκέντρωση καταλάσης (CAT)

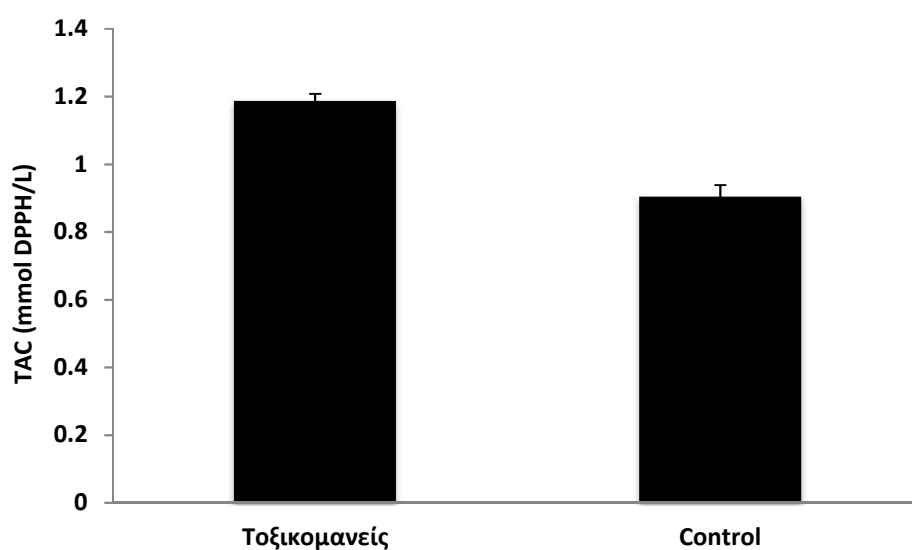
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα control

	Συγκέντρωση CAT(U/mgHb)
Τοξικομανείς	157,8
Control	261,3

Πίνακας 2 : Συγκέντρωση καταλάσης (CAT)

3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Όσο αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε στο πλάσμα δεν βρέθηκε σημαντική στατιστική διαφορά, οι συγκεντρώσεις είναι σχετικά ίδιες με λίγο μεγαλύτερα επίπεδα στους τοξικομανείς.



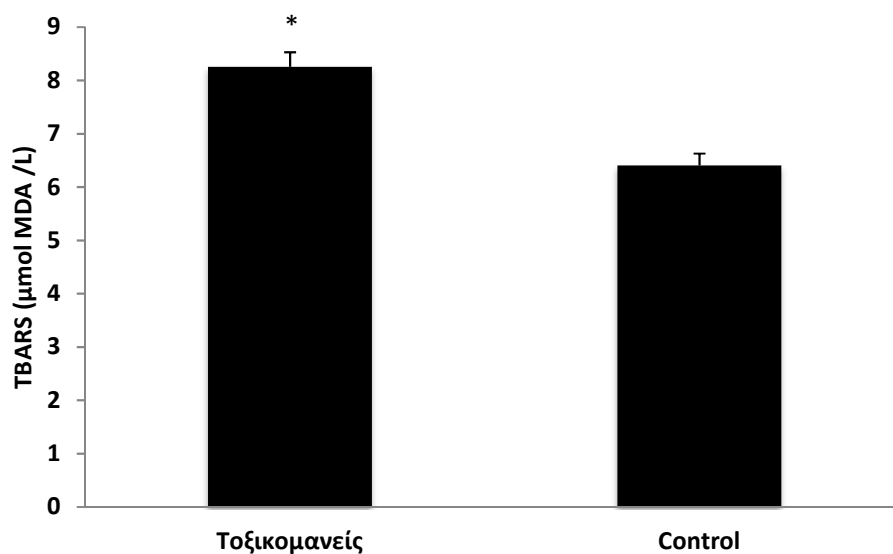
Γράφημα 3 : Συγκέντρωση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

	Συγκέντρωση TAC(mmolDPPH/L)
Τοξικομανείς	1,18
Control	0,90

Πίνακας 3: Συγκέντρωση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

4. Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS)

Όσο αφορά το θειοβαρβιτουρικό οξύ που μετρήθηκε στο πλάσμα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους τοξικομανείς και υγιής εθελοντές με αυξημένες συγκεντρώσεις στο αίμα τοξικομανών.



Γράφημα 4 : Συγκέντρωση TBARS

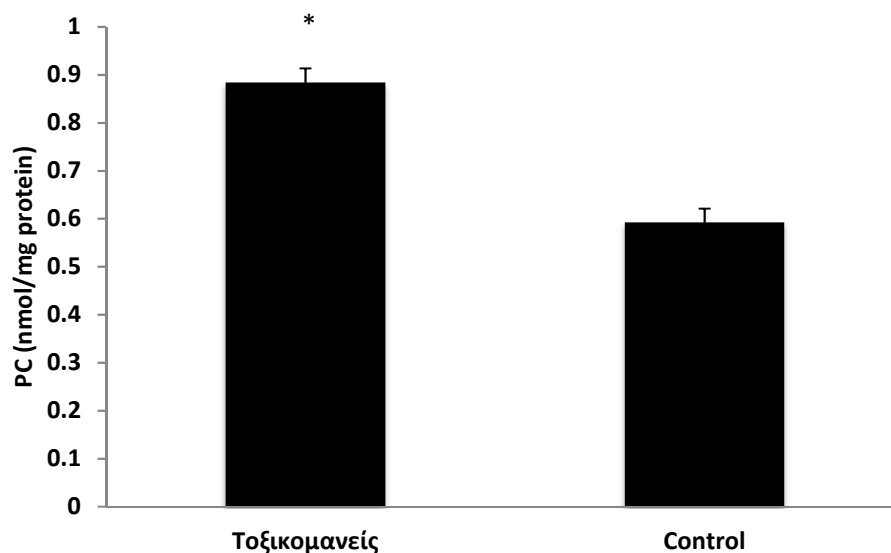
(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά

	Συγκέντρωση TBARS(μmol MDA/L)
Τοξικομανείς	8,25
Control	6,40

Πίνακας 4 : Συγκέντρωση TBARS

5. ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ

Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που μετρήθηκαν στο πλάσμα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους τοξικομανείς και υγίης εθελοντές με σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στο αίμα τοξικομανών.



Γράφημα 5 : Συγκέντρωση καρβονυλίων

(*) Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα control

	Συγκέντρωση καρβονυλίων (nmol/mg protein)
Toξικομανείς	0,88
Control	0,59

Πίνακας 5 : Συγκέντρωση καρβονυλίων

Πίνακας 6 : Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων όλων των δεικτών

Δείκτης	Toξικομανείς	Control	Ποσοστιαία διαφορά %
PC (nmol/mg protein)	0,88	0,59	49,15
TBARS (μmol/L)	8,25	6,40	28,91
TAC (mmol DPPH/L)	1,18	0,90	31,11

GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$)	2,33	7,24	210,73
CAT (U/mg Hb)	157,8	261,3	65,59

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο εθισμός στα ναρκωτικά είναι πρόβλημα που μαστίζει τη σημερινή κοινωνία. Όλο και περισσότεροι νέοι άνθρωποι κυρίως κάνουν χρήση απαγορευμένων ουσιών και ένα ποσοστό αυτών καταλήγουν στον θάνατο. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ναρκωτικά είναι η ηρωίνη, η κοκαΐνη και τα οπιοειδή. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια επικεντρώνονται κυρίως στο πώς συνδέεται η χρήση ναρκωτικών ουσιών με το οξειδωτικό στρες και τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της απομάκρυνσής τους από το αντιοξειδωτικό σύστημα (Veskoukis et al, 2008; Nikolaidis et al, 2007). Το γεγονός αυτό μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό διότι προκαλεί βλάβες στη δομή και τη λειτουργία βιομορίων, διαταράσσοντας κατά αυτόν τον τρόπο βασικές διεργασίες (Finaud et al, 2006; Veskoukis et al, 2008; Schneider et al, 2007; Phaneuf S, 2001). Οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την έκθεση σε φάρμακα κατάχρησης μπορεί να προέρχεται από άμεσες ή έμμεσες επιπτώσεις και μπορεί να συμβεί μετά την έκθεση του φαρμάκου ή κατά τη διάρκεια της απόσυρσης από το φάρμακο. Αύξηση των επιπέδων οξειδωτικών σε σύγκριση με τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα οδηγεί στην οξείδωση πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων ή το DNA, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Σύμφωνα με αυτή την έρευνα που έγινε στο πανεπιστήμιο του Coimbra η έκθεση σε ηρωίνη ή μορφίνη είχε επιπτώσεις στον εγκέφαλο και στη σπονδυλική στήλη που εμπλέκονται με το οξειδωτικό στρες. Η μορφίνη προκάλεσε υπεροξείδωση των λιπιδίων που σημαίνει ότι υπήρξε παραγωγή μαλονδιαλδεύδης επομένως και αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με τη παρούσα εργασία αφού και στα δικά μας αποτελέσματα φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των TBARS σε σύγκριση με τα control. Αντίστοιχα και με την έκθεση των ποντικών σε ηρωίνη παρατηρήθηκε βλάβη στο DNA, οξείδωση των πρωτεϊνών και υπεροξείδωση λιπιδίων στον εγκέφαλο και στο ήπαρ αλλά όχι στη καρδιά. Αυτό το εύρημα πάλι συμφωνεί με τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας καθώς βρέθηκε και στατιστικά

σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των καρβονυλίων στο αίμα τοξικομανών καθώς υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης του κάτι που αιτιολογείται από την οξειδωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον και με την έκθεση σε ηρωίνη πάλι παρατηρήθηκε υπεροξείδωση των λιπιδίων που συνεπάγεται και αύξηση των TBARS. Επίσης βρέθηκε ότι και σε περίπτωση απόσυρσης της ναρκωτικής ουσίας πάλι προκλήθηκε οξειδωτικό στρές και αύξηση της συγκέντρωσης της μαλονδιαλδεύδης πιθανώς επειδή παραμένει στον οργανισμό για μέρες. (Jasna Lovric et al,2008). Όσο αφορά την αντιοξειδωτική άμυνα των ποντικών παρατηρήθηκε μείωση στη καταλάση και στην ανηγμένη γλουταθειόνη κάτι που επίσης συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα αφού βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωσή τους. Ωστόσο όσο αφορά τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) παρατηρήθηκε μείωση στην συγκεκριμένη έρευνα κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα αφού στη δική μας έρευνα δεν προέκυψε σημαντική διαφορά τα αποτελέσματα ήταν περίπου στα ίδια επίπεδα στους τοξικομανείς και στα control. Σε μία άλλη έρευνα που έγινε στο τμήμα Φαρμακευτικής Τοξικολογίας στη Στρατιωτική Ιατρική Ακαδημία στη Τουρκία (Soykut B et al,2013) που έγινε σε τοξικομανείς χρήστες ηρωίνης βρέθηκαν ότι υπήρξε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις ενζύμων όπως η καταλάση και η γλουταθειόνη αλλά επίσης παρατηρήθηκε και βλάβη στο DNA, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες. Αυτό είναι σύμφωνο με τα δικά μας αποτελέσματα επίσης όπως και με τη προηγούμενη έρευνα. Από την άλλη μεριά φάνηκε ότι η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών βελτίωνε τη κατάσταση και ίσως ήταν μία καλύτερη προσέγγιση σε σχέση με τη χρήση φαρμάκων. Επιπλέον υπάρχει η πιθανότητα οι ελεύθερες ρίζες να συνδέονται και με τον εθισμό στα ναρκωτικά για αυτό είναι αναγκαίο να βρεθεί τρόπος που να μπλοκάρει το οξειδωτικό στρές (Soykut B et al,2013)

Παρόμοιες έρευνες σε αρουραίους έδειξαν ότι η παρατεταμένη χρήση ναρκωτικών οδηγεί τον οργανισμό σε μία προσαρμογή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και καταλήγει σε συνεχές οξειδωτικό στρές. Περαιτέρω φάνηκε ότι το οξειδωτικό στρές εμπλέκεται και με τη μνήμη των αρουραίων δείχνοντας ότι έχουν πρόβλημα στην εκμάθηση κάτι που μπορεί να συσχετιστεί και με τον εθισμό των χρηστών.

Άλλες έρευνες επικεντρώθηκαν στο πώς συνδέεται το οξειδωτικό στρές και η χρήση ναρκωτικών με τον εγκέφαλο και συγκεκριμένα με την παρεγκεφαλίδα που είναι το όργανο που ελέγχει τις κινήσεις των μυών (Teresa Cunha-Oliviera et al

2016). Η ναρκωτική ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κοκαΐνη και μετά από 18 ημέρες που χορήγησε της σε αρουραίους παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά στη συγκέντρωση της GPx σε σχέση με τα control με αποτέλεσμα να μην καταλύεται η αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και ο οργανισμός να βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες.

Μία έρευνα σχετική με τη παρούσα εργασία μελέτησε 14 συμμετέχοντες ηλικίας 18 και άνω που συμμετείχαν σε μία μελέτη αποτοξίνωσης με μεθαδόνη και 10 άτομα ήταν τα control. Αυτό το μέγεθος θεωρήθηκε επαρκές βάση προηγούμενων ερευνών και έλαβαν υπόψιν και ψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές των δειγμάτων. Τα άτομα έλαβαν ιατρική και ψυχιατρική αξιολόγηση με συνήθεις κλινικές εργαστηριακές εξετάσεις κατά την εξέταση. Η διάγνωση της εξάρτησης από τα οπιοειδή (ΟΠ) με φυσιολογική εξάρτηση επιβεβαιώθηκε από τη λίστα ελέγχου DSM IV για αυτή τη διαταραχή (APA, 2000) και από τη δοκιμή φαρμάκων στα ούρα (UDT). Η κατάσταση της τρέχουσας εξάρτησης από ουσίες άλλες από τα οπιοειδή ή τη νικοτίνη αποκλείστηκε. Επίσης από την έρευνα αποκλείστηκαν άτομα σε περίπτωση εγκυμοσύνης, διπολικής διαταραχής και οποιασδήποτε άλλης νευρολογικής διαταραχής ή χρήστες άλλων φαρμάκων.

Οι ασθενείς συμμετείχαν σε 6 μέρες νοσηλείας και χορηγούνταν μεθαδόνη ημερησίως δια του στόματος με μειωμένες συγκεντρώσεις με τη πάροδο των ημερών. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούσαν τα οπιοειδή, τη κάνναβη, τη κοκαΐνη, την αμφεταμίνη και τη μεθαμφεταμίνη. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μεταξύ της 2 και 3 ημέρας της έρευνας προς αποφυγή χρήσης άλλων ουσιών τα δείγματα επεξεργάστηκαν και καταψύχθηκαν.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν μία συσχέτιση της χρήσης ναρκωτικών ουσιών με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς αλλά είναι σαφές ότι πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες ώστε να δημιουργηθεί ένα πλήρες προφίλ για το πώς συνδέονται αυτά τα δύο.

Η παρούσα εργασία μελέτησε 20 δείγματα τα οποία προήλθαν από τον OKANA και όλοι οι ασθενείς έκαναν χρήση μεθαδόνης. Η επεξεργασία του αίματος έγινε εκεί και τα δείγματα στάλθηκαν έτοιμα προς χρήση στο Πανεπιστήμιο. Χωρίστηκαν σε 20 δείγματα πλάσματος και 20 δείγματα αιμολύματος αντίστοιχα για τη μέτρηση των δεικτών. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η γλουταθειόνη, η καταλάση, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα καρβονύλια και τα TBARS.

Ο πρώτος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η γλουταθειόνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τοξικομανών και control. Συγκεκριμένα βρέθηκε μειωμένη συγκέντρωση γλουταθειόνης στο αίμα τοξικομανών που σημαίνει ότι οι χρήστες βρίσκονται σε κατάσταση έντονου (Xu B et al, 2006). Επιπρόσθετα φαίνεται ότι η χρήση μεθαδόνης σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στη μέτρηση της Καταλάσης με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στους τοξικομανείς προφανώς ως απόκριση του οργανισμού στην ευρεία παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Όμοια αποτελέσματα υπήρξαν και στη μέτρηση της οξειδωσης των λιπιδίων με τη μέθοδο μέτρησης TBARS. Βρέθηκε σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στους τοξικομανείς και στα control. Υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης στους τοξικομανείς ένδειξη ότι αυξήθηκε η παραγωγή μαλονδιαλδευδης στον οργανισμό άρα πάλι συμπεραίνουμε ότι υπήρξε έντονο οξειδωτικό στρές.

Όσο αφορά την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) επίσης βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση στους τοξικομανείς που δεν ήταν αναμενόμενη. Αντιθέτως περιμέναμε μείωση στη συγκέντρωσή της λόγω του ότι εξαντλούνται τα αντιοξειδωτικά αποθέματα. Πιθανώς η αύξηση να οφείλεται στον καταβολισμό πουρινών από τις ελεύθερες ρίζες που θα έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουρικού οξέος. Μέσω αυτής της μεθόδου μετράται το ουρικό οξύ κατά ποσοστό 60% (Darko Duplancic et al 2011)

Στη μέτρηση των καρβονυλίων επίσης βρέθηκε στατιστική διαφορά με διπλάσια σχεδόν αύξηση της συγκέντρωσης στους τοξικομανείς. Αυτός ο δείκτης είναι χαρακτηριστικός και αξιόπιστος για την οξειδωση των πρωτεϊνών και τυχόν βλαβών. Άρα συμπεραίνουμε ότι πάλι ο οργανισμός έχει έντονο οξειδωτικό στρές.

Συνοψίζοντας, αξίζει να αναφερθεί η παρούσα εργασία είναι η πρώτη προσέγγιση σχέσης οξειδωτικού στρές και τοξικομανών και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως υπάρχει μία σχέση μεταξύ της χρήσης μεθαδόνης και των επιπτώσεων στην άμυνα του οργανισμού. Επιπλέον δεν έχει μελετηθεί το πώς η χρήση αντιοξειδωτικών μπορεί να συνεισφέρει και τι επιπτώσεις θα έχει στην άμυνα του οργανισμού όπως επίσης δεν έχει δοκιμαστεί σε σχέση με άλλες μεθόδους αποτοξίνωσης μέσω φαρμακευτικής αγωγής. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στο αναδυόμενο προφίλ ασφαλείας των νεότερων φαρμάκων παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Είναι σαφές ότι απαιτούνται περισσότερα δεδομένα για να κατανοηθεί η ατομική

ευαισθησία σε συγκεκριμένους μηχανισμούς τοξικότητας που εξαρτώνται από το ROS. Η κατανόηση μεμονωμένων διαφορών αυτού του τύπου και η πιθανότητα εκδηλώσεων οξειδοαναγωγής ως εκδηλώσεις τοξικότητας είναι ολοένα και πιο πολύτιμη όχι μόνο για τις υπάρχουσες θεραπείες αλλά για την προσαρμογή της κλινικής ανάπτυξης φαρμάκων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(9), 1260–1267.
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Bugra Soykut, Ayse Eken, Onur Erdem, Cemal Akay, Ahmet Ayclin, Mustafa Kemal Cetin and Nesrin Dilbaz (2013). Oxidative stress enzyme status and frequency of micronuclei in heroin addicts in Turkey
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(2), 192–208.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285. <http://doi.org/10.1042/>

Darko Duplancic, Leakukoc Modum, Darko Modun(2011) .Simple and Rapid Method for the Determination of Uric Acid-Independent Antioxidant Capacity

Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.001>

Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383(3-4), 375–388. <http://doi.org/10.1515/BC.2002.042>

Green, H. J., & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59.

Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon, England.

Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). *Nature Publishing Group*, New York.

Halliwell, Barry (Mar 2015) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: *eLS*.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.

Halprin, K. M., & Ohkawara, A. (1967). The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *The Journal of Investigative Dermatology*, 48(2), 149–152.

Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 222(3), 283–292.

Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.

Latimer, H. R., & Veal, E. A. (2016). Peroxiredoxins in Regulation of MAPK Signalling Pathways; Sensors and Barriers to Signal Transduction. *Molecules and Cells*, 39(1), 40–45. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2327>

Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 829–838.

Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502.

- Meydani, M., Evans, W., Handelman, G., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Fiatarone, M. A., ... Cannon, J. G. (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 363–364.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 333(1), 19–39.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Pyne, D. B. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 17(4), 245–258.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., ... Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(1-2), 69–74.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. (2004) Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Reddy, Y.N. and Murthy, S. V. and Krishna, D. R. and Prabhakar, M. C. (2004) *Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients* Indian J Tuberc , 51: 213-218.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619. <http://doi.org/10.1080/15257770802138558>.
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (n.d.). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 5(3), 237–45.
- Slauch, J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*, 80(3), 580–583. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>
- Teresa Cunha-Oliveira, A. Cristina Rego and Catarina R. Oliveira (2016). Oxidative Stress and Drugs of Abuse

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–89.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., & Kouretas, D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 33(6), 1140–1154. <http://doi.org/10.1139/H08-102>.
- Vina, J., Gomez-Cabrera, M. C., Lloret, A., Marquez, R., Minana, J. B., Pallardo, F. V., & Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4-5), 271–277. <http://doi.org/10.1080/713803729>
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–362.
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316–331. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>
- Xu B, Wang Z, Li G, Li B, Li H, Zheng G (2006). Heroin-administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant-alleviated withdrawal syndrome. Abstract.