

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ  
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ  
ALZHEIMER

---

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

Καραμπατζάκης Θωμάς του Νικολάου

Λάρισα, 2021

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Δημήτριος Κουρέτας (Επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

**Αριστείδης Βεσκούκης:** Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το εαρινό εξάμηνο του 2021.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δ. Κουρέτα που με εμπιστεύτηκε και μου πρόσφερε τη δυνατότητα να εργαστώ στην παρούσα μελέτη και να συνεργαστώ με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς επίσης για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δ. Στάγκο και τον κύριο Α. Βεσκούκη που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο, την υποψήφια διδάκτορα Ζωή – Βασιλική Σκαπέρδα, για τον χρόνο της που μου διέθεσε, τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε και για την εμπιστοσύνη και το ενδιαφέρον που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να πω και ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό και συνεργατικό κλίμα καθ' όλης της παρουσίας μου στο εργαστήριο καθώς επίσης για την προθυμία τους να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου ανά πάσα στιγμή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου και τις γιαγιάδες μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια και εξακολουθούν να το κάνουν δίνοντας μου δύναμη να συνεχίζω.

## Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i> .....	6
<i>ABSTRACT</i> .....	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	10
1.1.2 Παραγωγή των ελευθέρων ριζών στον άνθρωπο .....	13
1.1.3 Φυσιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών.....	17
1.1.4 Επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών στην υγεία του ανθρώπου .....	17
1.1.5 Οξειδωτικό στρες.....	18
1.1.6 Οξειδωτικό στρες και νευρολογικές διαταραχές.....	18
1.2 Αλτσχάιμερ.....	19
1.2.1 Ιστορία της νόσου Αλτσχάιμερ .....	20
1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ .....	20
1.2.3 Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ.....	21
1.2.4 Χαρακτηριστικά και Συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ .....	22
1.2.5 Αιτιολογικές υποθέσεις για τη νόσο Αλτσχάιμερ .....	23
1.2.5.1 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau.....	23
1.2.5.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς.....	24
1.2.5.3 Υπόθεση των χολινεργικών νευρώνων .....	24
1.2.5.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες .....	24

1.3 Το οξειδωτικό στρες στη νόσο Αλτσχάιμερ .....	25
1.3.1 Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου .....	26
1.3.2 Εξέλιξη του οξειδωτικού στρες κατά τη νόσο Αλτσχάιμερ .....	26
1.3.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ ROS και Αβ πεπτιδίων .....	28
1.3.4 Οξειδωτικό στρες και καταστροφή των συνάψεων .....	29
1.3.5 Οξείδωση λιπιδίων στη νόσο Αλτσχάιμερ.....	30
1.3.6 Οξείδωση DNA στη νόσο Αλτσχάιμερ .....	31
1.3.7 Οξείδωση πρωτεϊνών στη νόσο Αλτσχάιμερ .....	31
1.3.8 Μηχανισμοί άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες .....	32
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	34
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	35
3.1 Γενικά.....	35
3.2 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC).....	35
3.3 Μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) .....	37
3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS).....	39
3.5 Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power Assay).....	41
3.6 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl radical scavenging activity) .....	43
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	53
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από την απώλεια μνήμης, τη δυσκολία εκτέλεσης απλών καθημερινών εργασιών και αποτελεί το 60-80% των περιπτώσεων άνοιας. Σε παθολογικό επίπεδο, στον εγκέφαλο παρατηρείται ατροφία, συσσώρευση αμυλοειδών πλακών και σχηματισμός νευροϊνιδιακών σωρών. Παρ' ότι τα αίτια εμφάνισης της νόσου παραμένουν αδιευκρίνιστα, το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωριστεί ως ο κυρίαρχος παράγοντας. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το οξειδωτικό στρες δεν εντοπίζεται μόνο σε αρχικά στάδια της ασθένειας, αλλά είναι επίσης υπεύθυνο για τον σχηματισμό τοξικών ουσιών που επιταχύνουν την εξέλιξη της νόσου. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ορού αίματος ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) ως βασικός δείκτης συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) ως δείκτης για την υπεροξείδωση των λιπιδίων, η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl radical scavenging activity, OH $\cdot$ ) ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε δύο χρονικές στιγμές. Την πρώτη χρονική στιγμή έγινε αιμοληψία σε 97 άτομα, ενώ δύο χρόνια μετά λήφθηκε αίμα από 20 άτομα τα οποία συμμετείχαν στην πρώτη αιμοληψία. Σε πρώτο στάδιο ανάλυσης των αποτελεσμάτων, έγινε σύγκριση του κάθε δείκτη ξεχωριστά ανάμεσα στο σύνολο της πρώτης αιμοληψίας με το σύνολο της δεύτερης αιμοληψίας. Σε δεύτερη φάση αναλύσεων, συγκρίθηκαν τα επίπεδα των δεικτών στις δύο χρονικές στιγμές μόνο

στα 20 άτομα που συμμετείχαν και στις δύο αιμοληψίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα τη δεύτερη χρονική στιγμή. Συγκεκριμένα τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης είχαν αυξηθεί σημαντικά κατά 20,87% και της αναγωγικής ισχύος με τον πρώτο τρόπο ανάλυσης αυξήθηκαν σημαντικά κατά 7,48% (unpaired t-test), ενώ με το δεύτερο τρόπο ανάλυσης αυξήθηκαν κατά 14,67% τη χρονική στιγμή t<sub>2</sub> (paired t-test). Αντίθετα, τα επίπεδα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων ήταν σημαντικά μειωμένα κατά 16,24% άρα και μειωμένη οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων. Από την άλλη, τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και τα επίπεδα εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά. Με βάσει τα ευρήματα υποστηρίζεται ότι τα άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ πάσχουν από αναγωγικό στρες. Παρόλο που ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκε ήταν μικρός, τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας αναδεικνύουν τη σημαντικότητα της σχέσης μεταξύ των δεικτών οξειδοαναγωγής και την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Νόσος Αλτσχάιμερ, οξειδωτικό στρες, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), υπεροξειδωση λιπιδίων (TBARS), αναγωγική ισχύς (Reducing Power), εξουδετέρωση της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity).

## *ABSTRACT*

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive memory loss along with neuropsychiatric symptoms and a decline in activities of daily life and is the most common type of dementia accounting for 60-80% of the reported cases. Its main pathological features are cerebral atrophy, amyloid plaques, and neurofibrillary tangles in the brains of patients. Although the basis of AD's etiology remains unknown, oxidative stress (OS) has been recognized as a prodromal factor associated to its progression. Multiple lines of evidence indicate that oxidative stress not only strongly participates in an early stage of Alzheimer's disease, but also contributes to the lesion formations of toxic substances promoting the development of the disease. The aim of the study was to evaluate the markers of redox status in samples of individuals with high risk for developing Alzheimer's disease. We measured the level of total antioxidant capacity (TAC) as a commonly used crude marker, reduced glutathione (GSH), the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as indicator of lipid oxidation, reducing power (R.P) and hydroxyl radical scavenging activity ( $\text{OH}\cdot$ ) as indicators for antioxidant activity. We used serum as biological sample and the sample collection was carried out in two different times. At the first time, blood sample was taken from 97 individuals, and after two years blood sample was taken from 20 individuals who had participated in the first blood sampling. In the first phase of analysis of the results, each redox marker was compared separately between the 97 individuals with the 20 individuals of the two different time points. In the second phase of the analysis, only the 20 individuals' redox markers, who participated in both blood sampling, were compared. The results showed improved redox status in the second blood sampling. Specifically, both levels of GSH and reducing power were significantly increased (GSH levels  $t_0$ ; 10,63  $\mu\text{mol/L}$  versus  $t_2$ ; 12,85  $\mu\text{mol/L}$ , R.P levels  $t_0$ ; 0,42



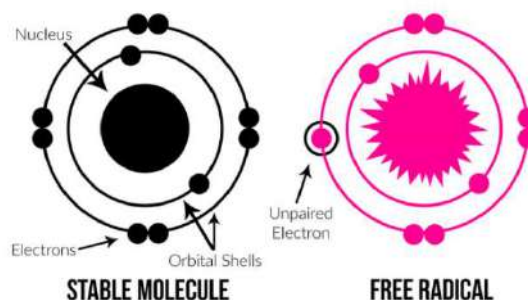
mmol potassium ferricyanide / ml versus t<sub>2</sub>; 0,45 mmol potassium ferricyanide/ml (unpaired t-test), R.P t<sub>0</sub>;0,39 mmol potassium ferricyanide / ml versus t<sub>2</sub>; 0,45 mmol potassium ferricyanide / ml (paired t-test)). Moreover, we observed significant decreased levels of lipid peroxidation showing decreased oxidative damage in lipids (TBARS levels t<sub>0</sub>; 6,30 µmol/L versus t<sub>2</sub>; 5,28 µmol/L). Meanwhile, levels of total antioxidant capacity (TAC) and hydroxyl radical scavenging activity did not show any significant difference. These findings support that individuals with high risk for developing AD are under reductive stress. Although the study is based on a limited population, the results could constitute the basis for further studies regarding the redox status markers and the possibility to develop Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease (AD), oxidative stress, total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (TBARS), reducing power, hydroxyl radical scavenging activity.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται μόρια, άτομα ή ιόντα τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (Venditti P. et al, 2020) (Εικόνα 1). Η παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου οδηγεί σε ορισμένες ιδιότητες που μοιράζονται οι περισσότερες ρίζες. Είναι ασταθείς και έχουν έντονη δραστικότητα. Μπορούν είτε να δωρίσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συνεπώς συμπεριφέρονται ως οξειδωτικά ή αναγωγικά (Lobo V. et al, 2010).



Εικόνα 1: Παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Οι ελεύθερες ρίζες αρχικά περιεγράφησαν από τον Moses Gomberg πριν από περισσότερο έναν αιώνα. Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα δεν θεωρούνταν ότι ήταν παρούσες σε βιολογικά συστήματα λόγω της έντονης δραστικότητάς τους και του σύντομου χρόνου ζωής τους. Τη δεκαετία του 1950, οι ελεύθερες ρίζες εντοπίστηκαν σε βιολογικά συστήματα και αμέσως θεωρήθηκαν ότι εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις και στη γήρανση. Από τότε οι γνώσεις σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες έχουν αυξηθεί (Luschchak V. I. et al, 2014).

Κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)
- Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)
- Δραστικές μορφές θείου (RSS)
- Δραστικές μορφές χλωρίου (RCS)

Στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται και μη ρίζες οι οποίες δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ως εκ τούτου δεν θεωρούνται ελεύθερες ρίζες. Παραδείγματα μη δραστικών μορφών είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ο δραστικός περοξυνιτρίτης (ONOO<sup>-</sup>), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και το όζον (O<sub>3</sub>).

#### Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Είναι δραστικά είδη με κεντρικό άτομο το οξυγόνο. Παράγονται κατά τον μεταβολισμό στα μιτοχόνδρια, αλλά η παραγωγή τους μπορεί να προκληθεί και από ξενοβιοτικά, κυτοκίνες και από βακτηριακή μόλυνση έχοντας ισχυρή οξειδωτική δράση (Tsuji Y. et al, 2012). Τα κυριότερα είδη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

**Πίνακας 1: Δραστικά Είδη Οξυγόνου**

Δραστικά Είδη Οξυγόνου ROS			
Radicals		Non-Radicals	
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxide	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
OH <sup>·</sup>	Hydroxyl	HOCl <sup>-</sup>	Hypochlorious acid
ROH <sup>·</sup>	Peroxyl	O <sub>3</sub>	Ozone
RO	Alkoxy	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet oxygen
HO <sub>2</sub>	Hydroperoxyl	ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite

#### Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Ορίζονται ως δραστικές μορφές με κεντρικό άτομο το άζωτο. Είναι μια οικογένεια μορίων που προέρχονται από τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και τη ρίζα του σουπεροξειδίου με τη δράση των ενζύμων της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου 2 (NOS2) και της οξειδάσης του NADPH (Hancock J. T., 2019). Τα κυριότερα παραδείγματα δραστικών μορφών αζώτου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2**).

**Πίνακας 2: Δραστικά Είδη Αζώτου**

Δραστικά Είδη Αζώτου (RNS)			
Radicals		Non-Radicals	
NO	Nitric Oxide	ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite
NO <sub>2</sub>	Nitrogen dioxide	ROONO	Alkyl Peroxynitrites
		N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dinitrogen trioxide
		N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dinitrogen tetroxide
		HNO <sub>2</sub>	Nitrous acid
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitronium anion

Δραστικά είδη θείου (RSS)

Ανήκουν σε μια ομάδα χημικών μορίων που έχουν ως βάση το θείο και μπορούν και οξειδώνουν και αναστέλλουν πρωτεΐνες και ένζυμα τα οποία έχουν μια ομάδαθειόλης (Pluth M. D. et al, 2018)

**Πίνακας 3: Δραστικά Είδη Θείου**

Δραστικά Είδη Θείου (RSS)	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfate
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Sulfite
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Thiosulfate
FeS <sub>2</sub>	Pyrite

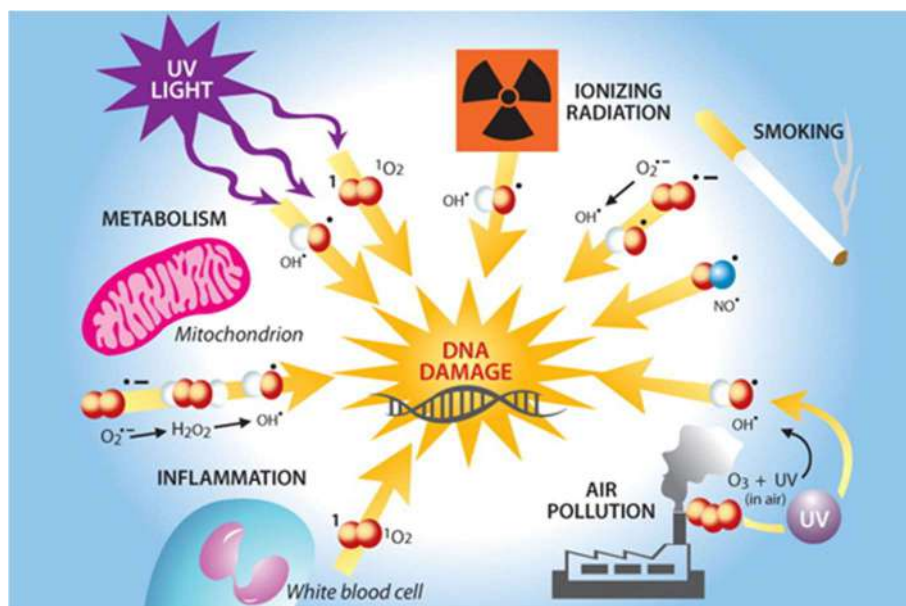
Δραστικές μορφές χλωρίου (RCS)

Ενώσεις με κεντρικό άτομο το χλώριο, ικανά να οξειδώνουν και να δίνουν χλώριο σε άλλα μόρια. Σε αυτήν την οικογένεια περιλαμβάνονται το HOCl και οι χλωραμίνες (Hwang I. et al, 2020).

### 1.1.2 Παραγωγή των ελευθέρων ριζών στον άνθρωπο

Το οξυγόνο είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για τη ζωή. Όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας, οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται ως συνέπεια της παραγωγής ATP από τα μιτοχόνδρια. Αυτά τα παραπροϊόντα είναι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) καθώς και δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της οξειδοαναγωγής.

Ο σχηματισμός ROS και RNS μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους: ενζυμικά και μη ενζυμικά (*Εικόνα 2*). Οι ενζυμικές αντιδράσεις που παράγουν ελεύθερες ρίζες είναι αυτές που εμπλέκονται στις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, της οξειδάσης της ξανθίνης και στο σύστημα του κυτοχρώματος P450.



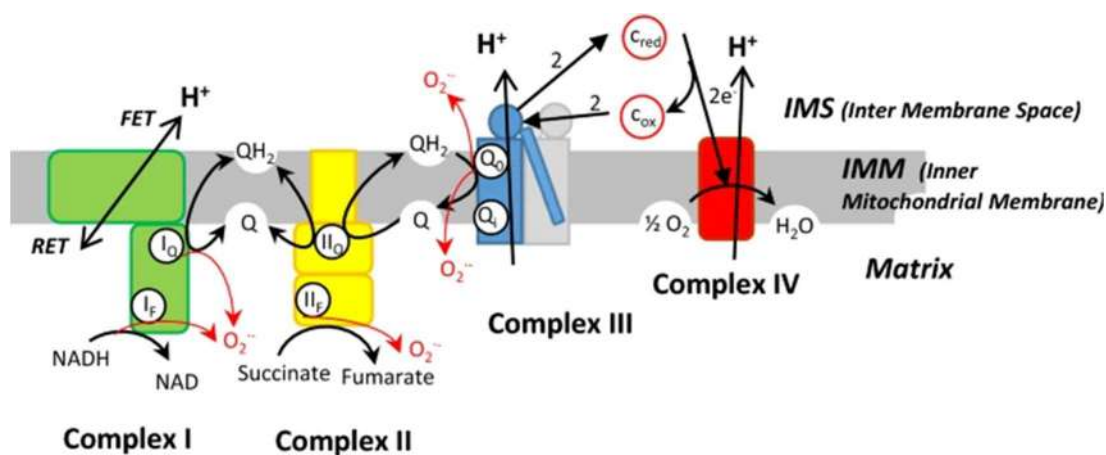
*Εικόνα 2: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες*

## Παραγωγή ROS από τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης

Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την κατανάλωση του οξυγόνου και να παράγουν μεγάλες ποσότητες  $O_2^-$  όταν διεγείρονται. Την αντίδραση σχηματισμού  $O_2^-$  καταλύει η NADPH οξειδάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το φωσφορικό νικοταμίδιο – αδενινο - φωσφορικό – δινουκλεοτίδιο (NADPH) αποτελώντας το δότη ηλεκτρονίων. Η ενεργοποίηση του ενζύμου επάγεται από την πρόσδεση διαφόρων ουσιών σε ειδικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων, τους TLR (toll-like receptors) (Nuesse O. et al, 2020).

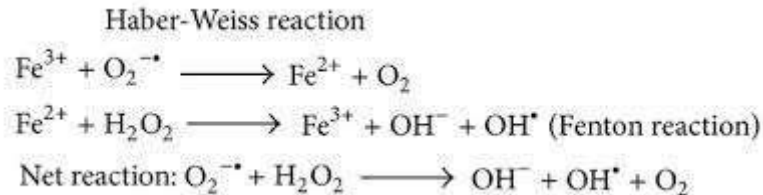
## Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς οξυγόνου στα μιτοχόνδρια

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα ATP που συνθέτουν οι οργανισμοί. Λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και εκεί περιέχονται όλα τα ένζυμα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, των αμινοξέων και του κιτρικού οξέος. Περιλαμβάνει αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$  με ηλεκτρόνια που προκύπτουν από το NADH και το  $FADH_2$ . Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^-$  και  $H_2O_2$  (Mazat J. P. et al, 2021) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την αλυσίδα μεταφοράς οξυγόνου.

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δημιουργείται από τη μεταφορά του από το NADH και το FADH<sub>2</sub> προς την ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει ρίζα O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Η ρίζα του O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ανάγεται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου. Μέσω της αντίδρασης Haber – Weiss, από την αντίδραση μεταξύ της ρίζας O<sub>2</sub><sup>·-</sup> και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκύπτει ρίζα υδροξυλίου (*Εικόνα 4*).

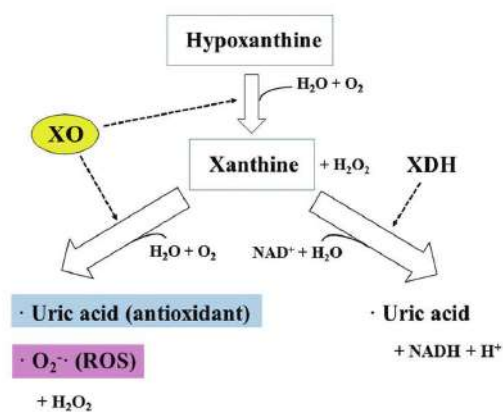


*Εικόνα 4: Αντίδραση Haber – Weiss.*

#### Παραγωγή ROS από την οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση τόσο της υποξανθίνης όσο και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, στους νεφρούς και στο ήπαρ με ταυτόχρονη αναγωγή του O<sub>2</sub> σε O<sub>2</sub><sup>·-</sup> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

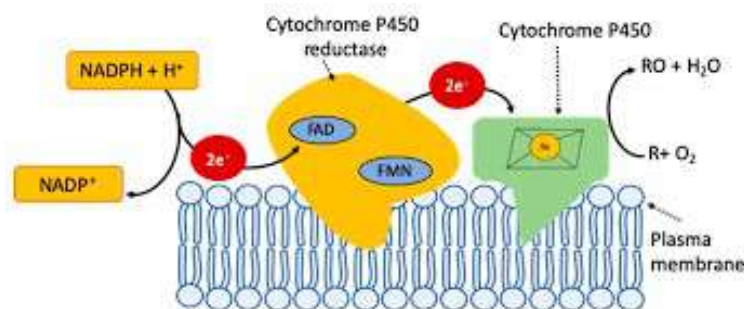
Φυσιολογικά η αντίδραση γίνεται από το ένζυμο αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH), η οποία ανάγει το NAD<sup>+</sup> σε NADH. Η αφυδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης μετά από οξείδωση μερικών θειολικών ομάδων ή μετά από περιορισμένη πρωτεόλυση από διάφορες πρωτεάσες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν σχηματίζεται O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Ενώ σε περιπτώσεις τραυματισμού ιστών είναι πιθανόν να πραγματοποιείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση της ξανθίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (*Granger D. N. et al, 2015*) (*Εικόνα 5*).



*Εικόνα 5: Παραγωγή ROS από την αντίδραση της ξανθίνης.*

## Παραγωγή ROS από το σύστημα του κυτοχρώματος P450

Τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν κυρίως κατά την φάση I του μεταβολισμού, αλλά και όταν εντοπιστεί μια ουσία ξένη προς τον οργανισμό μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH προς το O<sub>2</sub> και οξειδώνοντας το υπόστρωμα, το ξενοβιοτικό, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6**.



**Εικόνα 6: Παραγωγή ROS από το κυτόχρωμα P450.**

Όπου R το ξενοβιοτικό.

Έχουν βασικό ρόλο για την απομάκρυνση ξένων ουσιών όμως μερικές φορές μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία τοξικών ουσιών για τον οργανισμό (*Guengerich F. P., 2019*).

### Μη ενζυμικές αντιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν ακόμη να σχηματιστούν από μη ενζυμικές αντιδράσεις, από αντιδράσεις οξυγόνου με οργανικές ενώσεις καθώς και από ιονίζουσες ακτινοβολίες.

Ορισμένες από αυτές είναι:

- Καπνός τσιγάρου
- Περιβαλλοντικοί ρύποι
- Ακτινοβολία
- Φάρμακα, φυτοφάρμακα
- Βιομηχανικοί διαλύτες
- Όζον (*Lobo V. et al, 2010*)



### 1.1.3 Φυσιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών

Τα ROS και τα RNS παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού, ή κατά την απόκριση σε ξενοβιοτικά, κυτοκίνες και σε βακτηριακές λοιμώξεις και εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια ή σε άλλες κυτταρικές δομές (υπεροξυσωμάτια, ενδοπλασματικό δίκτυο) από μια ποικιλία ενζυμικών αντιδράσεων.

Τα ROS και τα RNS είναι σημαντικοί αγγελιοφόροι σε ένα μεγάλο αριθμό οδών κυτταρικής σηματοδότησης, κρίσιμων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επηρεάζουν την ενεργότητα πολλών ενζύμων (κινασών τυροσίνης, σερίνης και θρεονίνης και φωσφατασών) μέσω της οξειδωσης αμινοξέων που βρίσκονται στις καταλυτικές περιοχές των ενζύμων. Ακόμη ρυθμίζουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων μέσω της τροποποίησης μεταγραφικών παραγόντων όπως NRF2, NFκB, HIF-1 και p53.

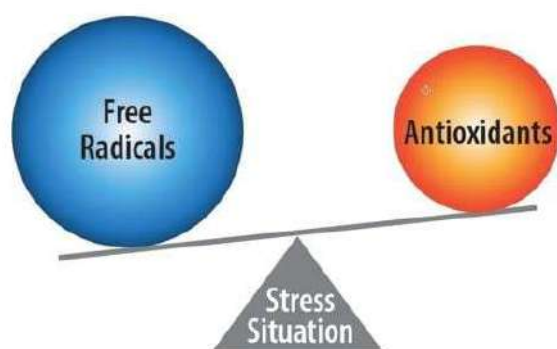
Άλλη μια σημαντική λειτουργία των ROS και RNS είναι η ενεργοποίηση του φλεγμονόσωμα NLRP3 λόγω κάποιας μόλυνσης από παθογόνα. Τέλος τα ROS και RNS έχουν κρίσιμο ρόλο κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο καθώς ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια της νέκρωσης, της απόπτωσης και της αυτοφαγίας (Cahova M. et al, 2018).

### 1.1.4 Επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών στην υγεία του ανθρώπου

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν τα ROS στα βιολογικά συστήματα, θεωρούνταν ότι προκαλούν τοξικές επιπτώσεις και ότι σχετίζονται με ασθένειες. Τα ROS αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία μορίων πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων, νουκλεϊκών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας και της δομής αυτών των μορίων (Faria M. et al, 2019). Ακόμη, όσον αφορά τα RNS, ιδίως το NO είναι κυτταροτοξικό (Venditti P. et al, 2020). Όταν η παραγωγή RNS και ROS αυξάνεται και το αντιοξειδωτικό σύστημα υπολειτουργεί τότε παρατηρείται καταστροφή των κυττάρων σε συνθήκες χρόνιου στρες (Fouad A. M. et al, 2020).

### 1.1.5 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση η οποία προκαλείται από την υπερπαραγωγή και τη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου στα κύτταρα και στους ιστούς λόγω της αδυναμίας του βιολογικού συστήματος να παράγει αντιοξειδωτικά και να απομακρύνει τα τοξικά αυτά προϊόντα (*Εικόνα 7*). Είναι μια επιβλαβής κατάσταση η οποία επηρεάζει αρνητικά κυτταρικές δομές όπως μεμβράνες, λιπίδια, πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες και το DNA. Εάν αυτή η κατάσταση δεν ελεγχθεί, τότε το οξειδωτικό στρες μπορεί να συσχετιστεί με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών (*Pizzino G. et al, 2017*).



*Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες λόγω ανισορροπίας οξειδωτικών – αντιοξειδωτικών.*

### 1.1.6 Οξειδωτικό στρες και νευρολογικές διαταραχές

Η μοναδική ιδιαιτερότητα του εγκεφάλου να είναι ευάλωτος σε οξειδωτική καταστροφή βασίζεται σε φυσιολογικούς, ανατομικούς και λειτουργικούς παράγοντες. Παρόλο που ο εγκέφαλος αποτελεί το 2% του συνολικού βάρους του ανθρώπινου σώματος καταναλώνει το 20% του συνολικού οξυγόνου λόγω του υψηλού ρυθμού μεταβολισμού. Η ανάγκη του εγκεφάλου να χρειάζεται και να καταναλώνει περισσότερο οξυγόνο έχει ως αποτέλεσμα και την παραγωγή ελευθέρων ριζών (*Patel M. et al, 2016*). Συγκεκριμένα το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα γίνεται ευάλωτο σε επιθέσεις ROS, λόγω της έλλειψης αντιοξειδωτικών μηχανισμών, της υψηλής συγκέντρωσης λιπιδίων και της επιλεκτικότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ο οποίος περιορίζει την είσοδο αντιοξειδωτικών.

Το οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Αλτσχάιμερ, της νόσου του Πάρκινσον και της πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης. Έχει εντοπιστεί σε αρχικά στάδια διάφορων ασθενειών και υποδηλώνει την αιτιολογία της ασθένειας λόγω της συσσώρευσης ελευθέρων ριζών.

Αυτές οι μοριακές αλλαγές επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα νευρικά κύτταρα καθώς επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες και ο βρεγματικός λοβός επηρεάζονται ιδιαίτερα στην περίπτωση της νόσου του Αλτσχάιμερ, ενώ η μέλαινα ουσία του μεσεγκεφάλου, το ραβδωτό σώμα και οι κινητήριοι νευρώνες επηρεάζονται στις περιπτώσεις της νόσου Πάρκινσον, της νόσου Huntington και στην πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (*Diaz-Hung A.M. et al, 2014*).

## 1.2 Αλτσχάιμερ

Παγκοσμίως, όσο ο γηραιότερος πληθυσμός αυξάνεται, αυξάνεται επίσης και η συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία μεταξύ των μεγαλύτερων ανθρώπων αποτελώντας ιδιαίτερο αντικείμενο προβληματισμού για τη δημόσια υγεία. Είναι γνωστό ότι οι ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία προκαλούν προοδευτική και μη αναστρέψιμη απώλεια νευρώνων και οδηγούν με αυτό τον τρόπο σε άνοια. Μια από αυτές τις ασθένειες είναι η νόσος Αλτσχάιμερ.

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια και αποτελεί μια από τις πιο κοινές μορφές άνοιας. Χαρακτηρίζεται από εξασθένηση των γνωστικών (νοητικών) λειτουργιών, αλλαγές στην προσωπικότητα και ασταθή συμπεριφορά, σε βαθμό που να επηρεάζεται η ικανότητα για ανεξάρτητη διαβίωση. Η νόσος έχει πολλούς αιτιολογικούς παράγοντες όπως γενετικούς, περιβαλλοντικούς και τρόπο ζωής (*Moklas Mohd M. A. et al, 2019*).

### 1.2.1 Ιστορία της νόσου Αλτσχάιμερ

Η νόσος Αλτσχάιμερ αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Alois Alzheimer (*Εικόνα 8*) το 1906 στο άρθρο του με τίτλο “*On an unusual Illness of the Cerebral Cortex*”, όπου περιέγραφε την περίπτωση ενός ασθενούς με απώλεια μνήμης, παραισθήσεις και απότομες αλλαγές στη συμπεριφορά. Στον εγκέφαλο του ασθενούς παρατήρησε ατροφία προκαλούμενη από τη συσσώρευση μιας ουσίας την οποία δεν μπόρεσε να εξηγήσει (*Collin F. et al, 2019*). Μετά από 70 χρόνια από την ανακάλυψή του άρχισαν πολλοί ερευνητές να δείχνουν ενδιαφέρον σχετικά με τη νόσο. Τα ευρήματα αποκάλυψαν ότι τα αρχικά στάδια της νόσου συνέβαιναν πολύ καιρό πριν εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα. Πολλές έρευνες οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια μορφή άνοιας και ότι αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου παγκοσμίως.



*Εικόνα 8: Alois Alzheimer*

Σήμερα, εξακολουθούν να υφίστανται πολλά ερωτήματα για την αιτιολογία της ασθένειας καθώς και για τα συμπτώματα που μερικές φορές εμφανίζονται ταχύτερα σε κάποιους ανθρώπους, αλλά επίσης και για το πώς μπορεί να αντιμετωπιστεί αυτή η ασθένεια αποτελεσματικά (*Moklas Mohd M. A. et al, 2019*).

### 1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

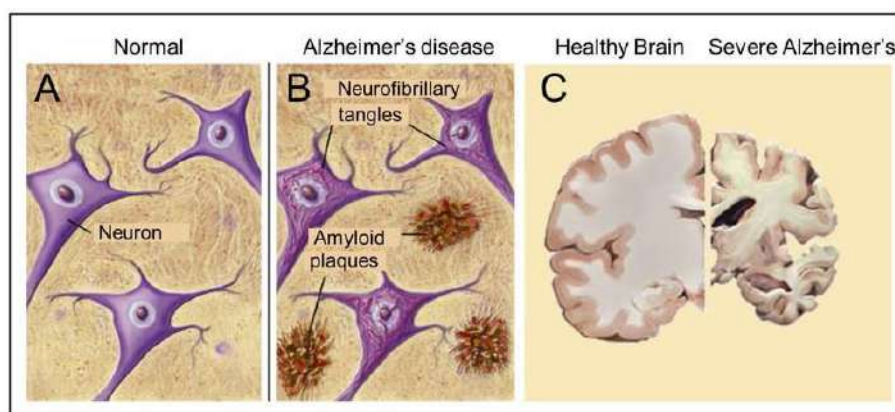
Η νόσος Αλτσχάιμερ συνιστά περίπου το 65% με 75% των περιπτώσεων άνοιας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, το ποσοστό των ανθρώπων με άνοια ηλικίας 65 ετών και άνω είναι γύρω στο 8%, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης άνοιας διπλασιάζεται από το 1% στο 2% στις ηλικίες μεταξύ 65 και 70, και αυξάνεται στο 30% μετά την ηλικία των 85 ετών και άνω (*Wang X. et al, 2012*). Η νόσος Αλτσχάιμερ διακρίνεται σε σποραδική (*Sporadic Alzheimer’s Disease, SAD*) και σε οικογενή (*Familial Alzheimer’s Disease, FD*). Η οικογενής νόσος Αλτσχάιμερ αφορά το 1-5% όλων των περιπτώσεων (*Kang J. S. et al, 2019*).

Το Αλτσχάιμερ εξαρτάται πάρα πολύ από την ηλικία και αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισής του όσο αυξάνεται η ηλικία. Για ανθρώπους ηλικιακών ομάδων 65-69, 70,74, 75-79, 80-84 και 85 και άνω η πιθανότητα εμφάνισης Αλτσχάιμερ είναι 0,6%, 1,0%, 2,0%, 3,3% και 8,4% αντίστοιχα. Σε παγκόσμια, 25 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από τη νόσο και ενώ το 2007 είχαν καταγραφεί 5 εκατομμύρια περιστατικά, μέχρι το 2050 ο αριθμός των περιστατικών εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κατά 13 εκατομμύρια (Wang X. et al, 2012).

### 1.2.3 Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι πλήρως ξεκάθαροι, αυτό που χαρακτηρίζει ιστολογικά τη νόσο είναι η σταδιακή εναπόθεση συσσωματωμάτων πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον ιππόκαμπο, στο μετωπιαίο και βρεγματικό λοβό, στην αμυγδαλή, στον πρόσθιο θάλαμο και κάποιων μονοαμινεργικών πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους (Duran-Prado M., et al, 2020), οι οποίες σχηματίζουν δύο ιδιαίτερες δομές (*Εικόνα 9*):

- Τις πλάκες αμυλοειδούς (amyloid plaques)
- Τους νευροϊνδιακούς σωρούς (Neurofibrillary tangles)



*Εικόνα 9: Απεικόνιση των αμυλοειδών πλακών και των νευροϊνδιακών σωρών σε εγκέφαλο ασθενούς με τη νόσο Αλτσχάιμερ.*

Οι πλάκες αμυλοειδούς αποτελούνται από εναποθέσεις ενός πεπτιδίου που λέγεται β-αμυλοειδές. Οι πλάκες αυτές βρίσκονται ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα και σχετίζονται με τις βιοχημικές διαδικασίες επεξεργασίας της πρόδρομης πρωτεΐνης του

αμυλοειδούς (amyloid precursor protein APP). Οι πλάκες αυτές είναι αδιάλυτες, βρίσκονται έξω από τους νευρώνες και παρεμβαίνουν στην επικοινωνία των κυττάρων στον εγκέφαλο. Η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς κόβεται αρχικά με τη β-σεκρετάση και εν συνεχεία με τη γ-σεκρετάση με τη συνέργεια της πρεσενιλίνης (PS) ώστε να δημιουργηθούν τα πεπτίδια (Wojda U. et al, 2018).

Οι νευροϊνιδιακοί σωροί αποτελούνται από την πρωτεΐνη *tau* και βρίσκονται εντός των νευρικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη *tau* έχει σημαντικό ρόλο για τον εγκέφαλο, όμως όταν υπερσυσσωρεύεται, σχηματίζονται αναστραμμένα λεπτά ινίδια, με αποτέλεσμα τα συστήματα μεταφοράς των νευρώνων να αποικοδομούνται, ουσιώδη θρεπτικά συστατικά να μη μπορούν να κινηθούν δια μέσου αυτών και έτσι να νευρικά κύτταρα να αρχίζουν να εκφυλίζονται επηρεάζοντας τις λειτουργίες του εγκεφάλου.

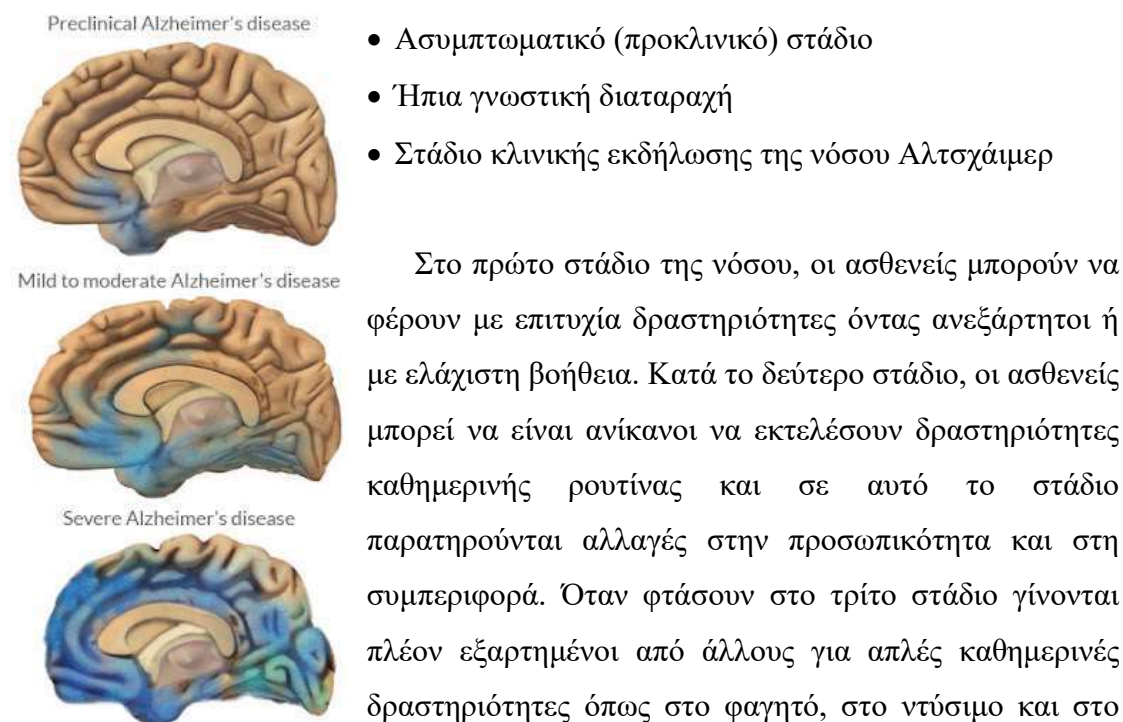
Από γενετικής σκοπιάς, η νόσος οφείλεται σε μεταλλάξεις τριών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά είναι το APP, το Presenilin-1 και το Presenilin-2, τα οποία συνδέονται με υπερπαραγωγή του αμυλοειδούς-β (Cedazo-Miriguez A. et al, 2014).

#### **1.2.4 Χαρακτηριστικά και Συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ**

Η νόσος Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από απώλεια μνήμης, απότομες αλλαγές στη διάθεση, προβλήματα στην προσοχή και στον προσανατολισμό και στη δυσκολία ανάληψης καθημερινών δραστηριοτήτων. Σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρείται δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια, οξειδωτικό στρες, ανισορροπία στην αποθήκευση μετάλλων, φλεγμονή και αυξημένη απόπτωση.

Επίσης, πολλά από τα συμπτώματα δεν είναι σταθερά και καθόλου καθολικά καθώς ο κάθε άνθρωπος μπορεί να εμφανίσει διαφορετικά συμπτώματα τα οποία μπορεί να αλλάζουν σε κάποια χρονική περίοδο. Επιπλέον, άλλα συμπτώματα πέρα από την απώλεια μνήμης είναι η αμνησία, δυσκολία στην κατάποση, στην ομιλία και στο περπάτημα. Αυτές οι αλλαγές αντανακλούν τη σοβαρότητα της νόσου η οποία σχετίζεται με την απώλεια νευρώνων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου.

Υπάρχουν τρία στάδια της νόσου:



Στο πρώτο στάδιο της νόσου, οι ασθενείς μπορούν να φέρουν με επιτυχία δραστηριότητες όντας ανεξάρτητοι ή με ελάχιστη βοήθεια. Κατά το δεύτερο στάδιο, οι ασθενείς μπορεί να είναι ανίκανοι να εκτελέσουν δραστηριότητες καθημερινής ρουτίνας και σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται αλλαγές στην προσωπικότητα και στη συμπεριφορά. Όταν φτάσουν στο τρίτο στάδιο γίνονται πλέον εξαρτημένοι από άλλους για απλές καθημερινές δραστηριότητες όπως στο φαγητό, στο ντύσιμο και στο

**Εικόνα 10: Τα τρία στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ και ποιες περιοχές του εγκεφάλου επηρεάζουν.** μπάνιο (Εικόνα 10)(Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

## 1.2.5 Αιτιολογικές υποθέσεις για τη νόσο Αλτσχάιμερ

### 1.2.5.1 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau

Η υπόθεση αναφέρει ότι η υπερφωσφορυλίωση της tau πρωτεΐνης οδηγεί στη μετατροπή της κανονικής πρωτεΐνης σε ένα συζευγμένο ελικοειδές νήμα (PHF-tau) και σε NFTs, καθώς τα μονομερή της πρωτεΐνης μετατρέπονται σε ολιγομερή. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη tau ελέγχει την ανάπτυξη των νευρώνων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστροφή των νευρώνων συμβαίνει λόγω της παρουσίας της τοξικής μορφής της tau πρωτεΐνης και όχι από την παρουσία των NFTs (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

### **1.2.5.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς**

Αυτή είναι η πιο ευρέως αποδεχόμενη και πιο μελετημένη υπόθεση. Η παρουσία των αμυλοειδών πλακών είναι αδιαμφισβήτητο το χαρακτηριστικότερο κομμάτι της παθολογίας της νόσου Αλτσχάιμερ. Σύμφωνα με τη θεωρία, οι αμυλοειδείς πλάκες προέκυψαν λόγω της συσσώρευσης των Αβ πεπτιδίων ως αποτέλεσμα του πρωτεολυτικού διαχωρισμού της APP. Μη κανονικός διαχωρισμός της APP έχει βρεθεί ότι οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων μορφών Αβ, των οποίων η συσσώρευση τους δημιουργεί ολιγομερή τα οποία ευθύνονται για την τελική καταστροφή των νευρώνων (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

### **1.2.5.3 Υπόθεση των χολινεργικών νευρώνων**

Η υπόθεση αναφέρει σημαντική μείωση ενός νευροδιαβιβαστή, της ακετυλοχολίνης, στους νευρώνες και θεωρείτο υπεύθυνη για την αιτιολογία της νόσου. Αυτή η υπόθεση προτείνει ότι νευρώνες οι οποίοι δεν περιέχουν τη φυσιολογική σύσταση ακετυλοχολίνης στα βασικά γάγγλια εμπλέκονται στην εμφάνιση της κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Η ακετυλοχολίνη (ACh) παίρνει μέρος σε βασικές λειτουργίες της μνήμης και της ανθρώπινης συμπεριφοράς. Η καταστροφή των χολινεργικών νευρώνων συνεπάγεται με σοβαρή εκδήλωση της νόσου Αλτσχάιμερ (Moklas Mohd M. A. et al, 2019).

### **1.2.5.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες**

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



### 1.3 Το οξειδωτικό στρες στη νόσο Αλτσχάιμερ

Η ηλικία, η γενετική και κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να φέρουν σε ανισορροπία το οξειδοαναγωγικό σύστημα αυξάνοντας τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις ενεργές μορφές αζώτου (RNS). Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το βασικότερο καταναλωτή οξυγόνου μέσα στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να παράγουν το 1% με 5% της συνολικής παραγωγής ROS των κυττάρων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Οι συνθήκες στρες, αλλαγές στο μεταβολισμό, γενετική αστάθεια και καταστροφές των κυττάρων είναι κάποιοι από τους πιο κοινούς παράγοντες της συσσώρευσης ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Για παράδειγμα, στη νόσο Αλτσχάιμερ το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα σημείο κλειδί για την εξέλιξη της ασθένειας (*Duran-Prado M. et al, 2020*). Όπως σε άλλα όργανα, έτσι και στον εγκέφαλο τα νευρικά κύτταρα έχουν να αντιμετωπίσουν ένα τεράστιο φορτίο οξειδωτικού στρες και μεταβολικών αλλαγών (*Smith M. A. et al, 2006*).

Γνωρίζοντας την ευαισθησία των νευρώνων στις ελεύθερες ρίζες, δεν είναι παράξενο το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην έναρξη αλλά και σε όλη τη διάρκεια νόσησης. Με βάση αυτό, έχουν εντοπιστεί πολλοί δείκτες στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο Αλτσχάιμερ που ταυτοποιούν βλάβη προκαλούμενη από το οξειδωτικό στρες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (*Wojda U. et al, 2018*).

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

- Αλλαγή στην ομοιόσταση σιδήρου, όπου σε συνδυασμό με το υπεροξείδιο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγούν στο σχηματισμό των πιο επιβλαβών ελευθέρων ριζών,
- Αυξημένη υπεροξειδίωση των λιπιδίων που συνοδεύονται με αλλαγές στις μεμβράνες,
- Αυξημένη οξείδωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων στον εγκέφαλο,
- Μεταβολές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων,
- Συσσώρευση του β-αμυλοειδούς με τελικό σχηματισμό των πλακών (*Zafrilla et al, 2006*).

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

Η μελέτη βιολογικών δειγμάτων, όπως ορός και πλάσμα αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού, με σκοπό την ταυτοποίηση βιοδεικτών για νευρολογικές διαταραχές αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση και πολλές ερευνητικές ομάδες εργάζονται σε αυτό το πεδίο (*Marcourakis T. et al, 2008*). Άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου θεωρούνται αυτά που έχουν είτε κάποιο συγγενή διαγνωσμένο με τη νόσο Αλτσχάιμερ, είτε έχουν διαγνωστεί με άνοια, είτε οι ίδιοι φέρουν ένα αλληλόμορφο Apo E4, είτε έχουν κάποιο τραύμα στο κεφάλι και είτε έχουν κάποια ψυχιατρική διαταραχή σχετιζόμενη με υψηλό ρίσκο εμφάνισης άνοιας.

Όσον αφορά τη νόσο Αλτσχάιμερ, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες προερχόμενοι από βιολογικά. Ο κυριότερος δείκτης είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι η βασικότερη συνέπεια του οξειδωτικού στρες προκαλώντας σοβαρές βλάβες στον εγκέφαλο. Προκαλεί αλλαγές στην κινητικότητα και στη διαπερατότητα των μεμβρανών των νευρικών κυττάρων καθώς ο εγκέφαλος περιέχει υψηλή περιεκτικότητα λιπιδίων. Πολλές μελέτες έχουν παρουσιάσει ότι τα επίπεδα των TBARS σε ορό και πλάσμα ατόμων με υψηλό ρίσκο νόσησης είναι αυξημένα σε σχέση με φυσιολογικούς.

Άλλος δείκτης που μελετάται είναι το 8 – OHdG, ένας βιοδείκτης για την οξείδωση νουκλεϊκών οξέων. Οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία αναφέρουν υψηλά επίπεδα 8 – OHdG και μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA σε άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ.

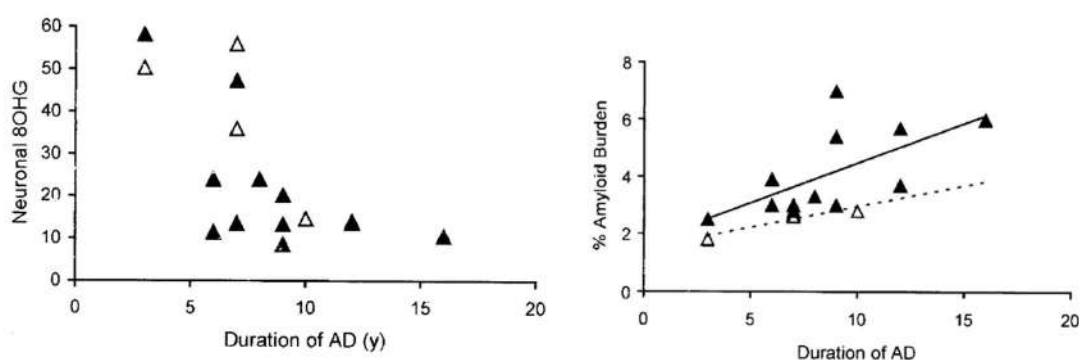
Τέλος, τα επίπεδα των εξωγενών αντιοξειδωτικών σε άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου είναι χαμηλά, ενώ τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν τα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών ποικίλουν. Κάποιες μελέτες δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά, άλλες δείχνουν μείωση στα επίπεδα και άλλες αισθητή αύξηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών (*Lu C. H. et al, 2014*).

### 1.3.2 Εξέλιξη του οξειδωτικού στρες κατά τη νόσο Αλτσχάιμερ

Υπάρχουν πολλά αποδεικτικά στοιχεία ότι ο εγκέφαλος ασθενών με Αλτσχάιμερ εκτίθεται σε οξειδωτικό στρες καθ' όλη τη διάρκεια της ασθένειας. Από τη στιγμή που

υπάρχει ανισορροπία της συγκέντρωσης οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, σίγουρα το οξειδωτικό στρες κατέχει κυρίαρχο ρόλο κατά τη διάρκεια της νόσησης από αυτή την εξαρτώμενη από την ηλικία διαταραχή (Gella A. et al, 2011).

Σε μια μελέτη με επικεφαλή τον Smith και οι συνεργάτες του θέλησαν να δουν το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην εξέλιξη της νόσου Αλτσχάιμερ σε ασθενείς με διαφορετικά στάδια της ώστε να μελετήσουν πότε το οξειδωτικό στρες λαμβάνει μέρος, εξετάζοντας τα επίπεδα του 8 - hydroxy - guanosine (8OHG), ένα οξειδωμένο νουκλεοτίδιο του RNA και τα επίπεδα της νιτροσερίνης, μια τροποποιημένη πρωτεΐνη. Η ανάλυσή τους επικεντρώθηκε σε αυτούς τους δείκτες καθώς τα επίπεδα τους μπορούν με ακρίβεια να μετρηθούν σε οποιοδήποτε στάδιο ανεξαρτήτως του ιστορικού του οξειδωτικού στρες.

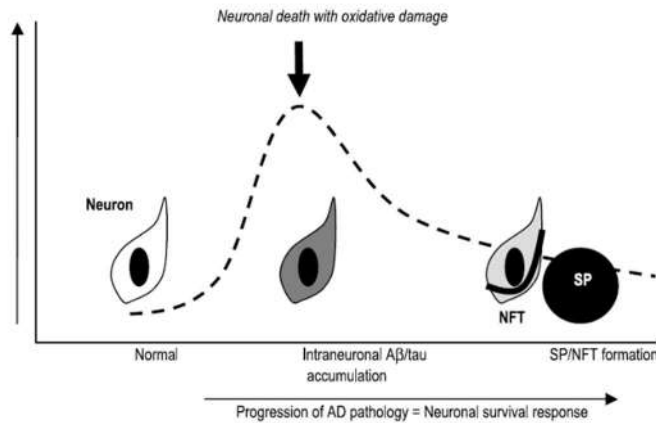


**Εικόνα 11:** Το οξειδωτικό στρες είναι το πρώτο γεγονός που συμβαίνει στη νόσο Αλτσχάιμερ και η συσσώρευση των ελευθέρων ριζών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των αμυλοειδών πλακών.

Τα ευρήματα αποκάλυψαν ότι η οξειδωτική καταστροφή στο RNA και στη πρωτεΐνη συμβαίνει στα αρχικά στάδια της ασθένειας. Ακόμη παρουσιάστηκε ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με το σχηματισμό Αβ πεπτιδίων αλλά και ότι τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες μειώνονται κατά τη πάροδο της ασθένειας (**Εικόνα 11**) (Smith M. A. et al, 2001).

Έτσι το οξειδωτικό στρες παίζει έναν κυρίαρχο και κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Σε ασθενείς με πολύ ήπια συμπτώματα σε αρχικά στάδια παρατηρούνται ήδη αυξημένα επίπεδα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και οξείδωσης των πρωτεϊνών στο πλάσμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στην ουρία και μειωμένα επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Σε επόμενο πείραμα οι Smith et al εντόπισαν ότι το αυξημένο στρες προκαλεί θάνατο των νευρικών κυττάρων χωρίς το σχηματισμό των πλακών του αμυλοειδούς και των νευροϊνιδιακών σωρών (Εικόνα 12).

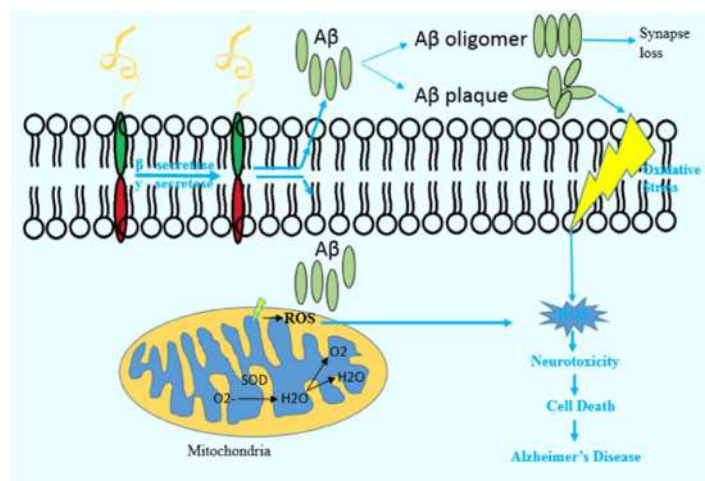


Η ενδοκυττάρια συσσώρευση των Αβ πεπτιδίων και της πρωτεΐνης *tau* πιστεύεται ότι λαμβάνει μέρος κατά την καταστροφή των νευρικών κυττάρων ως αμυντικός μηχανισμός, ώστε να σχηματιστούν οι πλάκες αμυλοειδούς και οι νευροϊνιδιακοί σωροί για να συμβάλλουν στην επιβίωση των νευρώνων (Smith M. A. et al, 2006).

**Εικόνα 12: Σχηματισμός αμυλοειδών πλακών ως απόρροια της καταστροφής νευρικών κυττάρων.**

### 1.3.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ ROS και Αβ πεπτιδίων

Έχει αναφερθεί ότι όχι μόνο τα ROS μπορούν και προωθούν την παραγωγή των Αβ πεπτιδίων αλλά και τα Αβ πεπτίδια με τη δικιά τους σειρά προάγουν την παραγωγή ROS δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο (Εικόνα 13). Η υπερέκφραση του APP προκαλεί



**Εικόνα 13: Προώθηση της παραγωγής ROS από τα Αβ πεπτίδια.**

υπερπαραγωγή των Αβ πεπτιδίων και αυτά ενισχύουν την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου απορρυθμίζοντας τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας δημιουργώντας έτσι μια θετική ανατροφοδοτική αλυσίδα (Wojda U. et al, 2018).

Τα Αβ πεπτιδία αλληλεπιδρούν άμεσα με την amyloid-binding alcohol dehydrogenase (ABAD) στα μιτοχόνδρια. Αυτή η πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων είναι ζωτικής σημασίας για την ρύθμιση της ενέργειας ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στο θάνατο νευρικών κυττάρων. Κύριος ρόλος της είναι ο έλεγχος της ισορροπίας οιστραδιόλης και οιστρονης στους νευρώνες. Η αλληλεπίδραση Αβ πεπτιδίων με τη ABAD προκαλεί ανισορροπία στα επίπεδα της οιστραδιόλης και οιστρονης στους νευρώνες και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης προκαλούν υπερπαραγωγή των ROS και κυτταρική απόπτωση (Trippier P. C. et al, 2019). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα Αβ πεπτιδία επηρεάζουν σημαντικά ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας αναστέλλοντας τα, μειώνοντας τα επίπεδα ATP.

Από αυτά τα δεδομένα προκύπτει ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και σε παραγωγή των Αβ πεπτιδίων. Από την άλλη, τα Αβ πεπτιδία όταν υπερπαραγονται, ολιγομερίζονται και συσσωρεύονται ενισχύοντας το οξειδωτικό στρες. Από τη στιγμή που θα γίνει η θετική ανατροφοδότηση μεταξύ των ROS και των Αβ πεπτιδίων τότε ενισχύεται σταδιακά η παθολόγηση του εγκεφάλου (Wojda U. et al, 2018).

#### **1.3.4 Οξειδωτικό στρες και καταστροφή των συνάψεων**

Οι συνάψεις αποτελούν ένα ειδικό σημείο επαφής όπου επιτυγχάνεται η μεταβίβαση ενός ηλεκτρικού ή χημικού σήματος από ένα κύτταρο σε ένα άλλο. Κατά τη διάρκεια της σύναψης, σηματοδοτικά μόρια όπως γλουταμίνη, ακετυλοχολίνη και ντοπαμίνη απελευθερώνονται από έναν προσυναπτικό νευρώνα και προσδένονται και ενεργοποιούν υποδοχείς σε ένα μετασυναπτικό νευρώνα.

Τα φαινόμενα της συναπτικής πλαστικότητας κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες με κριτήριο τη διάρκεια διατήρησης της μεταβολή της συναπτικής διαβίβασης, τη βραχύχρονη και τη μακρόχρονη συναπτική πλαστικότητα, με ασαφή ωστόσο χρονικά όρια. Τα φαινόμενα μακρόχρονης συναπτικής πλαστικότητας εμπλέκουν τόσο μετασυναπτικούς όσο και προσυναπτικούς μηχανισμούς, ενώ η συμμετοχή των

προσυναπτικών μηχανισμών φαίνεται να κυριαρχεί στη βραχύχρονη συναπτική πλαστικότητα.

Το κυρίαρχο υπόδειγμα συναπτικής πλαστικότητας που θεωρείται ότι αποτελεί θεμελιώδη νευροβιολογική διεργασία της μνήμης και της μάθησης, είναι η μακρόχρονη συναπτική ενδυνάμωση (LTP). Το φαινόμενο της LTP συνίσταται σε μια ετερογενή ομάδα διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών που εμπλέκουν μια πληθώρα κυτταρικών αλληλεπιδράσεων με κυρίαρχο ρόλο το γλουταμινικό υποδοχέα NMDA ως παράγοντα επαγωγής, και το ιόν του ασβεστίου που πυροδοτεί τις διεργασίες έκφρασης και διατήρησης της LTP (Mellor J. R. et al, 2019).

Στη νόσο Αλτσχάιμερ, η συσσώρευση ROS, Αβ πλακών και φωσφοριλιωμένων tau πρωτεϊνών επηρεάζει την ενεργότητα των υποδοχέων NMDA. Με την πάροδο της ηλικίας η λειτουργικότητα των NMDA υποδοχέων εξασθενεί, όμως η συσσώρευση ROS και Αβ αμυλοειδών πλακών μειώνει την ποσότητα των NMDA υποδοχέων που παράγονται, με αποτέλεσμα να προωθείται η κυτταροτοξικότητα, να ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με το στρες, να υπάρχει μη διαχειρίσιμη ποσότητα ιόντων ασβεστίου και εν τέλει να χάνεται σταδιακά η πλαστικότητα των νευρώνων και να καταστρέφονται οι συνάψεις (Trushina E. et al, 2017).

Με δεδομένο το μεγάλο μέγεθος του ιππόκαμπου, βλάβη που περιορίζεται σε οποιοδήποτε από τα κύρια μέρη του συστήματος μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην αποθήκευση της μνήμης. Βλάβη στον περιρρινικό, παραίπποκάμπειο και ενδορρινικό φλοιό που φείδεται του υποκείμενου ιπποκάμπου προκαλεί μεγαλύτερη διαταραχή της αποθήκευσης της μνήμης, όπως διαταραχή της αναγνώρισης αντικειμένων, από ότι περιοχές του ιπποκάμπου που φείδονται του υπερκείμενου φλοιού (McDonald A. J. et al, 2017).

### 1.3.5 Οξείδωση λιπιδίων στη νόσο Αλτσχάιμερ

Ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε φωσφολιπίδια, τα οποία είναι σημαντικά για τις διαδικασίες της νευροδιαβίβασης και για την επικοινωνία των νευρώνων. Τα φωσφολιπίδια του εγκεφάλου περιλαμβάνουν υψηλές ποσότητες των PUFAs, ιδίως το δοκοσαεξανοϊκό και αραχιδονικό οξύ. Έχει βρεθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες αυξάνουν σταδιακά τη συγκέντρωση των PUFA στον εγκέφαλο.

Επιπλέον, οι υπεροξειδάσες των λιπιδίων είναι ιδιαίτερα ασταθείς και μπορούν αυτομάτως να αποσυνθέσουν τα λιπίδια σε MDA, 4 – HNE και σε κετόνες. Σύμφωνα με το Gella et al, έχει δειχτεί ότι αυξημένη συγκέντρωση του MDE και του 4 – HNE σε εγκεφάλους ασθενών με Αλτσχάιμερ.

Η ισοπροστάνη είναι άλλο ένα παράγωγο που προκύπτει από την υπεροξειδίωση των λιπιδίων. Τα F2 – IsoPs παράγονται από το αραχιδονικό μέσω εστεροποίησης. Στη νόσο Αλτσχάιμερ έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα F2 – IsoPs και F4 – IsoPs στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (**Εικόνα 14**)(Gella A. et al, 2009).

### 1.3.6 Οξείδωση DNA στη νόσο Αλτσχάιμερ

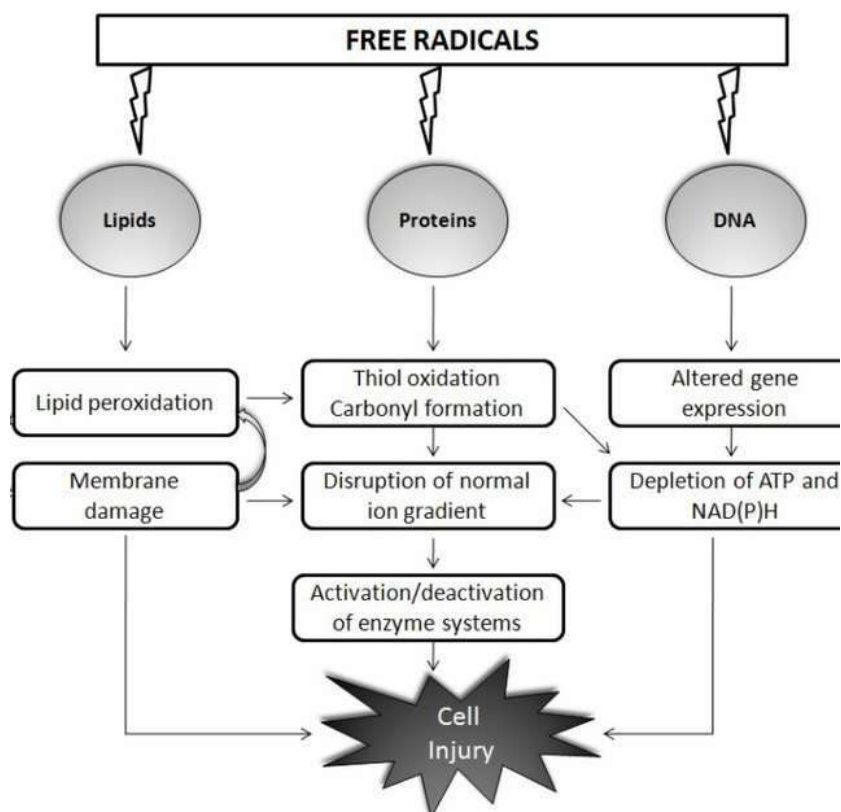
Οι αζωτούχες βάσεις του DNA είναι ευάλωτες στο οξειδωτικό στρες καθώς προκαλούνται βλάβες μέσω της υδροξυλίωσης, της καρβοξυλίωσης των πρωτεϊνών και της νιτροξυλίωσης. Το οξειδωμένο DNA και RNA παρατηρείται μέσω της αύξησης των επιπέδων των 8 - hydroxy – 2 - deoxyguanosine (8OHdG) και της 8 – hydroxyguanosine (8OHG). Επιπλέον αυτοί οι δείκτες έχουν ταυτοποιηθεί στις πλάκες αμυλοειδούς και στους νευροϊνιδιακούς σωρούς. Ακόμη, αυξημένα επίπεδα θραυσμάτων DNA έχουν παρατηρηθεί στη νόσο Αλτσχάιμερ. Αρχικά θεωρούνταν ότι ήταν αποτέλεσμα της κυτταρικής απόπτωσης, αλλά έπειτα από έρευνα διαπιστώθηκε ότι ήταν συνέπεια του οξειδωτικού στρες (**Εικόνα 14**) (Gella A. et al, 2009).

### 1.3.7 Οξείδωση πρωτεϊνών στη νόσο Αλτσχάιμερ

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου ευθύνονται για την οξείδωση των πρωτεϊνών καθώς προστίθεται μια ομάδα υδροξυλίου στη πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων ή παράγονται καρβονύλια. Τα καρβονύλια προκύπτουν μέσω της οξείδωσης των αμινοξέων της πλευρικής αλυσίδας σε κετόνες ή άλλα παράγωγα αλδεϋδών (Gella A. et al, 2009). Αυξημένα επίπεδα καρβονυλίων, τα οποία αποτελούν και δείκτες, έχουν παρατηρηθεί στη νόσο Αλτσχάιμερ.

Αντιδράσεις διαφόρων μορφών οξυγόνου και μορφών αζώτου με την τυροσίνη οδηγούν στην παραγωγή της 3 – νιτροτυροσίνης και της διτυροσίνης, οι οποίες έχουν

εντοπιστεί στα αρχικά στάδια της παθογένεσης της νόσου (*Εικόνα 14*) (Zhong C. et al, 2014).



*Εικόνα 14: Οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών και οι συνέπειες που φέρουν στο κύτταρο.*

### 1.3.8 Μηχανισμοί άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες

Από την άλλη πλευρά ο οργανισμός διαθέτει ένα τεράστιο δίκτυο άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες ώστε να μπορεί να το ανιχνεύσει και να το ελέγξει. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνεται η γλουταθειόνη, η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση και το σύστημα της ρεδοκτάσης της θειορεδοξίνης (*Εικόνα 15*).

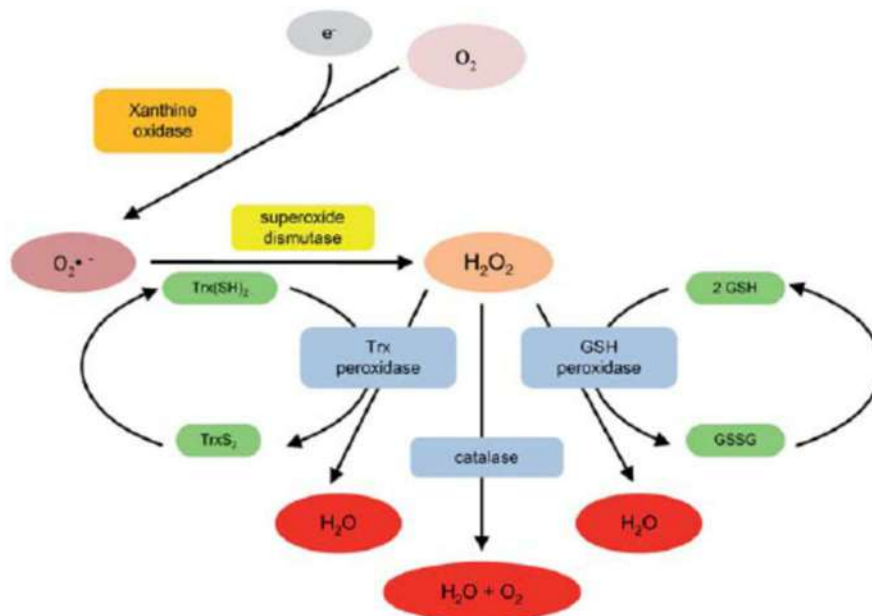
Ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά μέσα στο κύτταρο είναι η γλουταθειόνη, όπου στην πλειονότητα βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή της (GSH). Μπορεί και αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες είτε μόνη της είτε με τη συνέργεια της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) σχηματίζοντας το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG), το οποίο μετατρέπεται στην ανηγμένη του μορφή μέσω της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης (GR).



Άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) και η καταλάση (CAT), τα οποία καταλύουν την αντίδραση της ρίζας του υπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου και η καταλάση, με τη σειρά της, καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα αυτών των δύο ενζύμων μειώνεται δραστικά στη νόσο Αλτσχάιμερ. Ωστόσο, σε κάποια στάδια της ασθένειας η δραστηριότητα των ενζύμων ελαφρώς αυξάνεται όχι όμως σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου περιλαμβανόμενου του μετωπιαίου, μετακεντρικού και ινιακού λοβού.

Η ρεδοκτάση της θειορεδοξίνης (TR) ελέγχει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση μειώνοντας τη θειορεδοξίνη (Trx). Το σύστημα της Trx χρησιμοποιεί το NADPH ως πηγή ηλεκτρονίων. Όμως, και εδώ τα επίπεδα της Trx είναι μειωμένα στην αμυγδαλή και στον ιππόκαμπο στη νόσο Αλτσχάιμερ.

Η προαγωγή αμυντικών συστημάτων θεωρείται ότι επάγεται λόγω χρόνιας έκθεσης σε οξειδωτικό στρες. Ο Wodja και οι συνεργάτες έχουν παρουσιάσει την ανεπιτυχή προσπάθεια των κυττάρων να μειώσουν το οξειδωτικό στρες και να αποφύγουν τη βλάβη στη νόσο Αλτσχάιμερ (Wojda U. et al, 2018).



**Εικόνα 15: Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος και αποτελεί το 60% - 80% των περιπτώσεων άνοιας στους ηλικιωμένους. Αναφερόμενοι στην αιτιολογία της νόσου, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας καθώς εμπλέκονται στον εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων. Χρόνιο στρες οδηγεί σε καταστροφή βασικών συστατικών του κυττάρου επηρεάζοντας τις λειτουργίες. Έτσι, η συσσώρευση οξειδωμένων βιομορίων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της νόσου.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα ορού αίματος ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ ώστε να αξιολογηθεί το οξειδωτικό στρες και η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των ατόμων. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο προσδιορισμός την ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity-OH·).

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Γενικά

Για αυτήν τη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Τη χρονική στιγμή  $t_0$ , λήφθηκε αίμα από 97 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου και ύστερα από 2 χρόνια, τη χρονική στιγμή  $t_2$ , λήφθηκε αίμα από 20 άτομα τα οποία συμμετείχαν στην πρώτη αιμοληψία. Για την αξιολόγηση της οξειδωτικής καταστροφής προσδιορίστηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων χρησιμοποιώντας ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ενώ προσδιορίστηκαν και δείκτες αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ).

#### 3.2 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

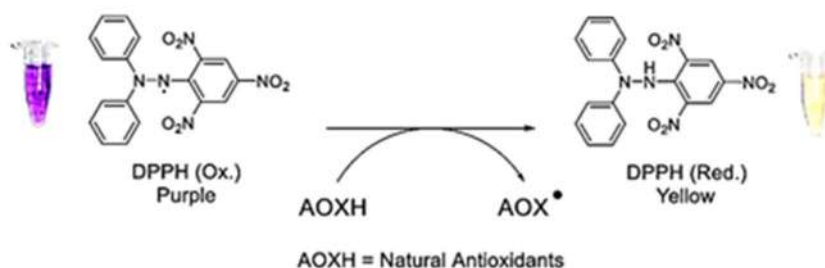
##### Αρχή της μεθόδου

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

Υπάρχουν δύο τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. 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 είναι η μέτρηση της TAC σαν σύνολο.

Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1- diphenyl – 2 – picrylhydrazine), μία έγχρωμη μωβ ουσία. Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα DPPH $\cdot$  ανάγεται προς σχηματισμό

της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazine), ενός κίτρινου έγχρωμου προϊόντος που απορροφά στα 520 nm. Έντονος αποχρωματισμός του δείγματος υποδηλώνει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (*Εικόνα 16*).



*Εικόνα 16: Μέθοδος ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).*

### Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για το πείραμα χρειάζεται ένα διάλυμα Phosphate Buffer 10 mM με pH 7.4 και ένα διάλυμα αραιού DPPH το οποίο είναι το βασικό αντιδραστήριο. Το DPPH παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια ετοιμάζονται τα erpendorfs. Στο κάθε erpendorf προστίθενται οι παρακάτω ποσότητες σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί (*Πίνακας 4*).

*Πίνακας 4: Πειραματικό πρωτόκολλο για TAC*

	<b>Blank</b>	<b>Sample</b>
<b>Phosphate Buffer 10 mM (pH 7.4)</b>	500μl	480μl
<b>DPPH 0.1 mM</b>	500μl	500μl
<b>Πλάσμα</b>	--	20μl

Μόλις προστεθούν οι ποσότητες ακολουθεί ανάδευση στο vortex και ύστερα τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά για να γίνει η αντίδραση. Μόλις

περάσει ο χρόνος της επώασης έπεται φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στα 15000g στους 25° C. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 520 nm.

### Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

α) Διαίρεση με το 100 με σκοπό να μετατραπεί ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης,

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

γ) Πολλαπλασιασμός με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια,

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

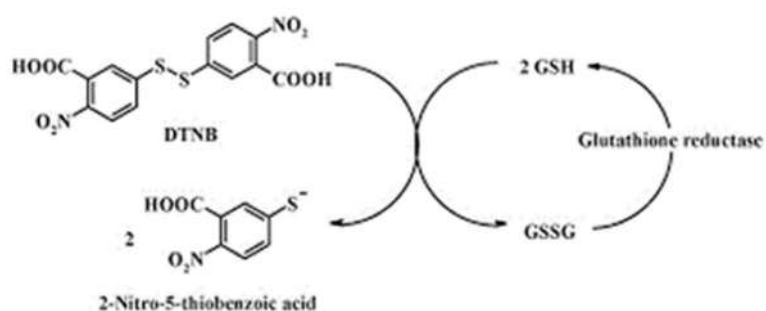
### **3.3 Μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)**

#### Αρχή της μεθόδου

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων οργανισμών. Η γλουταθειόνη απαντάται συνήθως στην ανηγμένη μορφή (GSH) και λιγότερο στην

οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Ο λόγος της οξειδωμένης προς της ανηγμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης παρουσίας ελευθέρων ριζών.

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδου - νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2 - νιτρο - 5 -θειοβενζοϊκό οξύ, ενός έγχρωμου προϊόντος που απορροφά στα 412 nm (*Εικόνα 17*).



*Εικόνα 17: Οξείδωση της GSH από το DTNB.*

### Πειραματικό Πρωτόκολλο

Βασικό αντιδραστήριο αυτής της πειραματικής διαδικασίας είναι το DTNB. Ωστόσο, προτού ξεκινήσει η διαδικασία της προσθήκης του δείγματος και των αντιδραστηρίων στα erpendorf απαιτείται αρχικά καθαρισμός των δειγμάτων. Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με την προσθήκη 100  $\mu$ L δείγματος και 200  $\mu$ L 5% TCA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 5° C. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέα erpendorf.

Στη συνέχεια, στα tubes προστίθενται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και του πλάσματος που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (*Πίνακας 5*).

*Πίνακας 5: Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης*

	<b>Blank</b>	<b>Sample</b>
<b>Phosphate Buffer 400mM (pH 7.95)</b>	700μL	700 μL
<b>TCA 10%</b>	200 μL	--
<b>Πλάσμα</b>	--	200 μL
<b>DTNB σε TRIS-HCL 40mM</b>	100μL	100 μL

Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων σε vortex και εν συνεχεία ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Τέλος, η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται στα 412 nm.

#### Υπολογισμοί

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

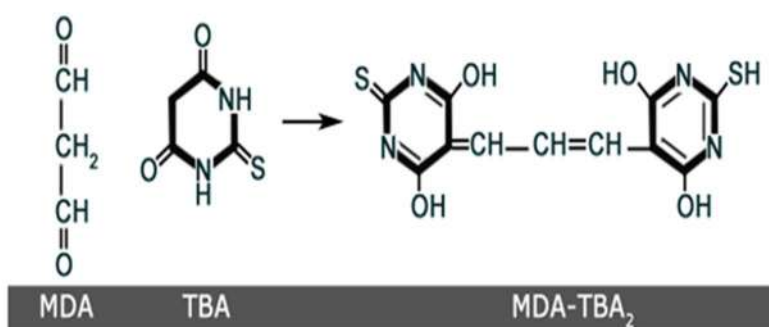
πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογιστεί η 1:1 αραιώση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με  $2 * 1.3$  για να συνυπολογιστεί η πρώτη (50 μL αιμόλυματος / 50 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής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

### **3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (TBARS)**

#### Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της

μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μια έγχρωμη ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ που απορροφά στα 530 nm. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μια φωτομετρική μέθοδος για το προσδιορισμό του βαθμού της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (*Εικόνα 18*).



*Εικόνα 18: Αντίδραση MDA και TBA για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσής λιπιδίων.*

### Πειραματικό Πρωτόκολλο

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

Μόλις τελειώσει ο χρόνος της επώασης προστίθενται 1 mL  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – TBA και τα δείγματα τοποθετούνται στους 95° C για 45 λεπτά μέσα στο υδατόλουτρο. Ύστερα, τα Falcon μεταφέρονται στον πάγο και αφήνονται να κρυώσουν για 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 1 mL TCA 70% και ακολουθεί ανάδευση. Αμέσως μετά μεταφέρονται 1 mL δείγματος σε erpendorfs και φυγοκεντρούνται στα 11200 g για 5 λεπτά. Τέλος, η οπτική απορρόφηση μετριέται στα 530 nm.



## Υπολογισμοί

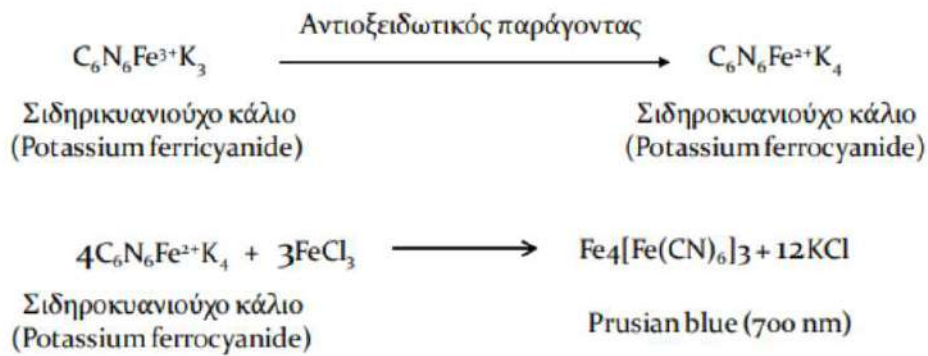
Συγκέντρωση των TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 * 31$ ,

όπου το 31 είναι συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100  $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του πλάσματος (100  $\mu\text{L}$ ) ( $3100 / 100 = 31$ ). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA.

### **3.5 Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power Assay)**

#### Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγική ισχύς σχετίζεται με την αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να χρησιμεύει ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι ενώσεις με αναγωγική ισχύ είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν από την υπεροξειδίωση των λιπιδίων, έτσι ώστε να μπορούν να λειτουργούν ως πρωτογενή ή δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Συγκεκριμένα, ουσίες του ορού που μπορεί να έχουν αναγωγική ικανότητα αντιδρούν με τον τρισθενή σίδηρο και τον ανάγουν σε δισθενή, ο οποίος σε αντίδρασή του με το χλωριούχο σίδηρο δίνει σύμπλοκο που απορροφά στα 700nm. Σε αυτό το τεστ, το κίτρινο χρώμα του αρχικού αντιδραστηρίου αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα της αναγωγικής ισχύος των ουσιών. Όσο μεγαλύτερη η αλλαγή του χρώματος, τόσο μεγαλύτερη η απορρόφηση του δείγματος στα 700 nm και άρα τόσο μεγαλύτερη και η αναγωγική του ισχύς (*Εικόνα 19*).



*Εικόνα 19: Μετατροπή τρισθενή σιδήρου σε δισθενή για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος.*

### Πειραματικό Πρωτόκολλο

Ετοιμάζονται τα erpendorfs και προστίθονται οι ποσότητες όπως αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα ακολουθώντας τα ενδιάμεσα βήματα (**Πίνακας 6**).

*Πίνακας 6: Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος*

	Blank	Control	Sample
<b>Πλάσμα</b>	--	--	10 μL
<b>Phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6)</b>	500 μL	250 μL	240 μL
<b>Potassium ferricyanide</b>	--	250 μL	250 μL
<b>Επώαση στους 50° C για 20 λεπτά</b>			
<b>TCA</b>	250 μL	250 μL	250 μL
<b>Φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά και Προσθήκη 700 μL από το υπερκείμενο σε νέα erpendorfs</b>			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	250 μL	250 μL	250 μL
<b>Ferric chloride</b>	50 μL	50 μL	50 μL

Μόλις προστεθούν όλες οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 700 nm.

#### Υπολογισμοί

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

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

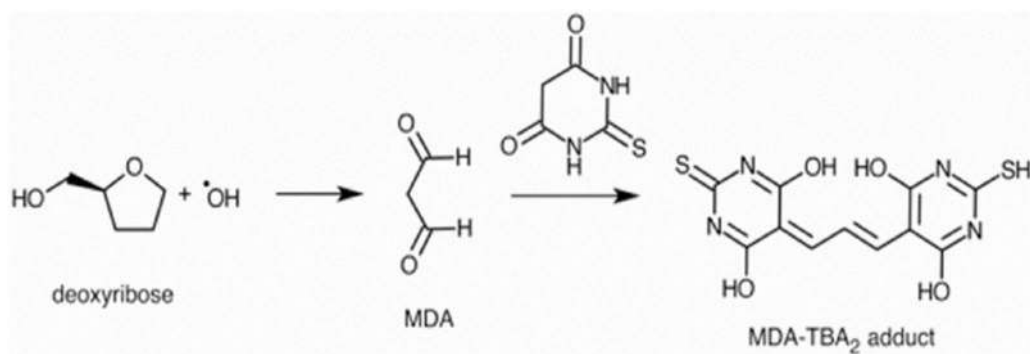
- i) Διάρθρωση με το 100 ώστε να μετατραπεί τη ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση.
- ii) Πολλαπλασιασμός με το 7.14 καθώς τόση είναι η συγκέντρωση του potassium ferricyanide στην αντίδραση.
- iii) Διάρθρωση με το 1000 ώστε να μετατραπούν τα L σε ml.

### **3.6 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl radical scavenging activity)**

#### Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα ενεργή σε βιολογικά συστήματα και έχει ταυτοποιηθεί ως μια από τις πιο επιβλαβείς ενδογενείς ελεύθερες ρίζες ικανή να προκαλέσει καταστροφή των βιομορίων σε ζωντανά κύτταρα. Αυτή η ελεύθερη ρίζα μπορεί να συνδεθεί με νουκλεοτίδια του DNA και να προκαλέσει σπάσιμο της διπλής αλυσίδας και να οδηγήσει σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα. Ο δείκτης της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου χρησιμοποιείται προκειμένου να μειώσει τη δραστηριότητα της ρίζας υδροξυλίου ή να την εξουδετερώσει. Το τεστ αυτό βασίζεται στην ικανότητα της 2 - D - δεοξυριβόζης

να οξειδώνεται από τη ρίζα του υδροξυλίου που παράγεται από την αντίδραση Fenton. Τα αρχικά διαφανή δείγματα έπειτα της προσθήκης του αντιδραστήριου χρωματίζονται σε διάφορες αποχρώσεις του ροζ και εμφανίζουν τη μέγιστη απορρόφηση στα 520 nm (Εικόνα 20).



*Εικόνα 20: Προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου με τη χρήση δεοξυριβόζης.*

### Πειραματικό Πρωτόκολλο

Ετοιμάζονται τα εppendorfs και στη συνέχεια προστίθονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

*Πίνακας 7: Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου*

	Blank	Control	Sample
<b>Phosphate Buffer (0.2 M, pH 7.4)</b>	225 $\mu\text{L}$	225 $\mu\text{L}$	225 $\mu\text{L}$
<b>2 – deoxyribose 1 mM</b>	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$
<b>FeSO<sub>4</sub> – EDTA 1- mM</b>	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM</b>	--	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	375 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	290 $\mu\text{L}$
<b>Πλάσμα</b>	--	--	10 $\mu\text{L}$

<b>Επώαση για 1 ώρα στους 37° C</b>			
<b>TCA 2.8 %</b>	375 µL	375 µL	375 µL
<b>TBA 1%</b>	375 µL	375 µL	375 µL
<b>Αρνητικός Μάρτυρας</b>			
			Sample
<b>Phosphate Buffer (0.2 M, pH 7.4)</b>			225 µL
<b>2 – deoxyribose 10 mM</b>			75 µL
<b>FeSO<sub>4</sub> – EDTA 10 mM</b>			75 µL
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM</b>			--
<b>dH<sub>2</sub>O</b>			365 µL
<b>Πλάσμα</b>			10 µL
<b>Επώαση για μια ώρα στους 37° C</b>			
<b>TCA 2.8%</b>			375 µL
<b>TBA 1%</b>			375 µL

Ακολουθεί τοποθέτηση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο, έπειτα ψύχονται και ύστερα φυγοκεντρώνονται στους 3000 rpm για 5 λεπτά. Τέλος, η απορρόφηση μετράται στα 520 nm.

#### Υπολογισμοί

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control} * 100$$

$$\text{mmol deoxyribose} / \text{ml} = [ (\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 0.25 * 150 ] / 1000,$$

- i) Διαίρεση με 100 με σκοπό η ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης να μετατραπεί σε απλή απορρόφηση,
- ii) Πολλαπλασιασμός με το 0.25 λόγω της συγκέντρωσης της δεοξυριβόζης,
- iii) Πολλαπλασιασμός με το 150,
- iv) Διαίρεση με το 1000 για τη μετατροπή των L σε ml.

### 3.7 Στατιστική ανάλυση

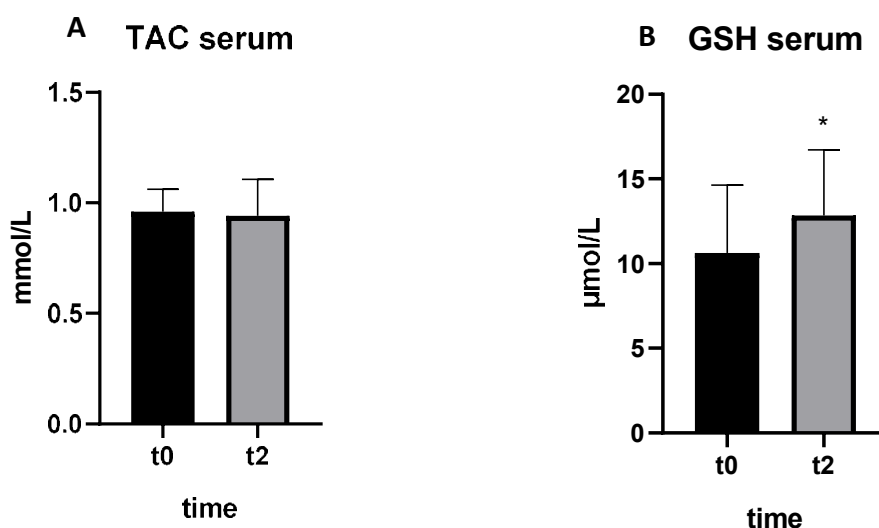
Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πτυχιακής έγινε χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 8.0.1. Χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά πακέτα unpaired t-test και paired t-test ( $p < 0.05$ ) για την εύρεση στατιστικά σημαντικά αποτελεσμάτων μεταξύ της πρώτης χρονικής στιγμής ( $t_0$ ) και της δεύτερης χρονικής στιγμής ( $t_2$ ).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που μετρήθηκαν προέρχονταν από άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Τη χρονική στιγμή  $t_0$  λήφθηκε αίμα από 97 άτομα. Μετά από δύο χρόνια, τη χρονική στιγμή  $t_2$ , λήφθηκε αίμα από 20 άτομα τα οποία ανήκαν στο σύνολο των ατόμων της πρώτης αιμοληψίας. Σε αυτά τα δείγματα των 117 συνολικά, μετρήθηκαν δείκτες οξειδοαναγωγής ώστε να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάστασή τους. Οι δείκτες αυτοί ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη, οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η αναγωγική ισχύς και ο προσδιορισμός της εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου.

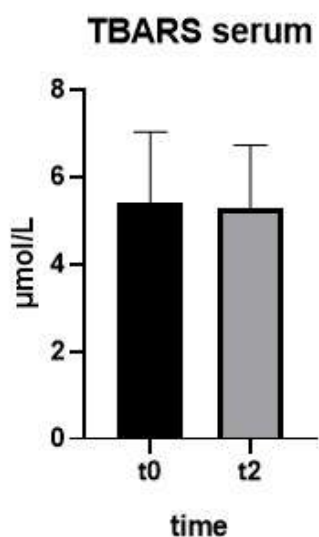
Σε πρώτη φάση των αποτελεσμάτων, έγινε σύγκριση του κάθε δείκτη οξειδοαναγωγής ξεχωριστά μεταξύ των δύο συνόλων των δειγμάτων των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών. Ουσιαστικά, έγινε σύγκριση των 97 δειγμάτων της χρονικής στιγμής  $t_0$  με τα 20 δείγματα της χρονικής στιγμής  $t_2$ .

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1** δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδα του δείκτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών. Αντίθετα, τα επίπεδα του δείκτη της ανηγμένης γλουταθειόνης τη χρονική στιγμή  $t_2$  ήταν σημαντικά αυξημένα κατά 20,85% σε σχέση με τη χρονική στιγμή  $t_0$  ( $p < 0.05$ ).



**Σχήμα 1:** A) Επίπεδα mmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά mg ολικής πρωτεΐνης για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και στις δύο χρονικές στιγμές, B) Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε μονάδες  $\mu\text{mol/L}$  ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα και στις δύο χρονικές στιγμές. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

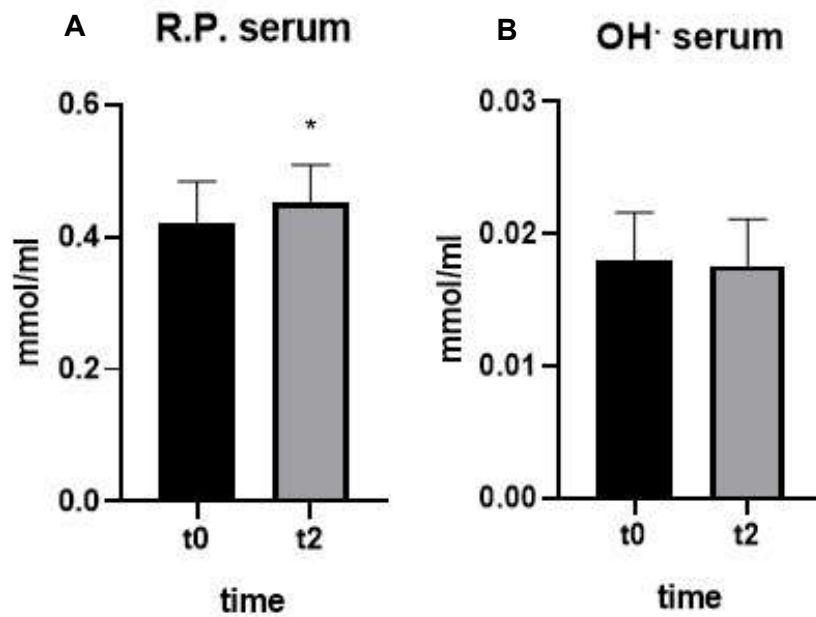
Για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν τα επίπεδα των TBARS, όπως παρατηρείται από το **Σχήμα 2** δεν παρουσιάζεται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του δείκτη για την υπεροξείδωση των λιπιδίων μεταξύ των χρονικών στιγμών  $t_0$  και  $t_2$  (τιμή  $p < 0.05$ ).



**Σχήμα 2:** Επίπεδα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (TBARS) σε μονάδες  $\mu\text{mol/L}$  ολικής πρωτεΐνης τη χρονική στιγμή  $t_0$  και  $t_2$  (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συνεχίζεται με το **Σχήμα 3**, το οποίο απεικονίζει σημαντική διαφορά στα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος, η οποία έχει αυξηθεί κατά 7,48 % στα άτομα της χρονικής στιγμής  $t_2$  (**Σχήμα 3A**), ενώ δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου μεταξύ των ατόμων των δύο χρονικών στιγμών (**Σχήμα 3B**).

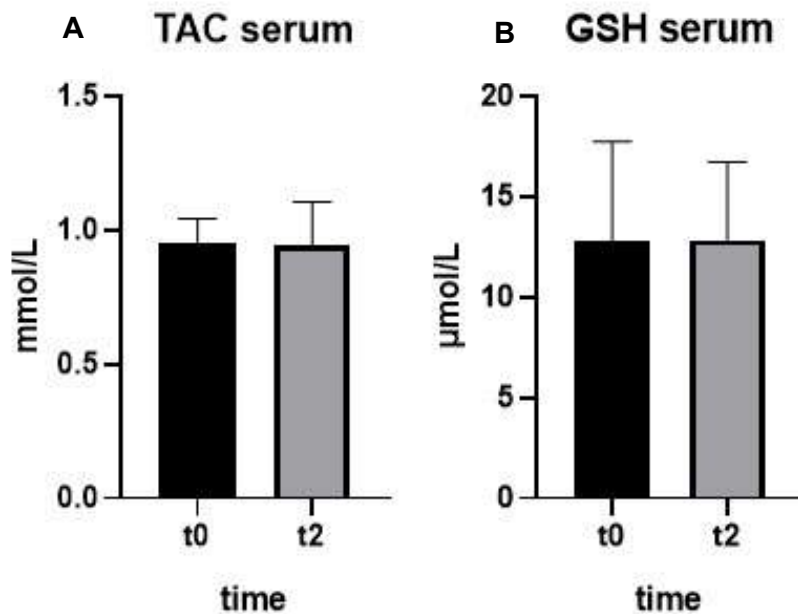




**Σχήμα 3:** A) Επίπεδα της αναγωγικής ισχύος (*Reducing Power*) σε μονάδες *mmol ferricyanide/ml* τη χρονική στιγμή  $t_0$  και  $t_2$ , B) Επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου σε μονάδες *mmol deoxyribose/ml* τη χρονική στιγμή  $t_0$  και  $t_2$ . Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

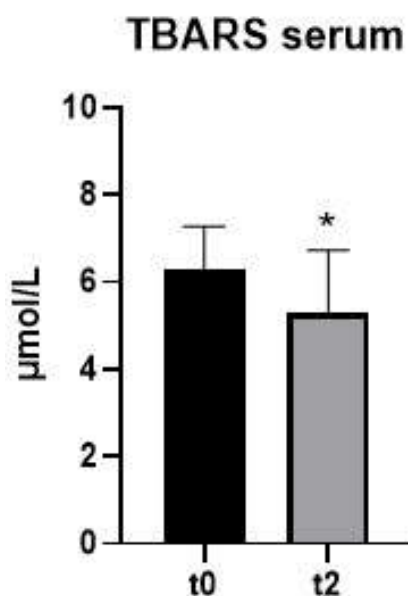
Σε δεύτερο στάδιο ανάλυσης των αποτελεσμάτων έγινε σύγκριση των δεικτών οξειδοαναγωγής μόνο των ατόμων που υπήρχαν και στις δύο χρονικές στιγμές της αιμοληψίας. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα που έδωσαν τα 20 άτομα τη χρονική στιγμή  $t_2$  συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα που είχαν δώσει αυτά τα ίδια άτομα τη χρονική στιγμή  $t_0$ .

Στο **Σχήμα 4** φαίνεται ότι τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορεί να έχουν μειωθεί κατά 1.03% τη χρονική στιγμή  $t_2$  και τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης να έχουν αυξηθεί κατά 0,42% τη χρονική στιγμή  $t_2$  ωστόσο αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



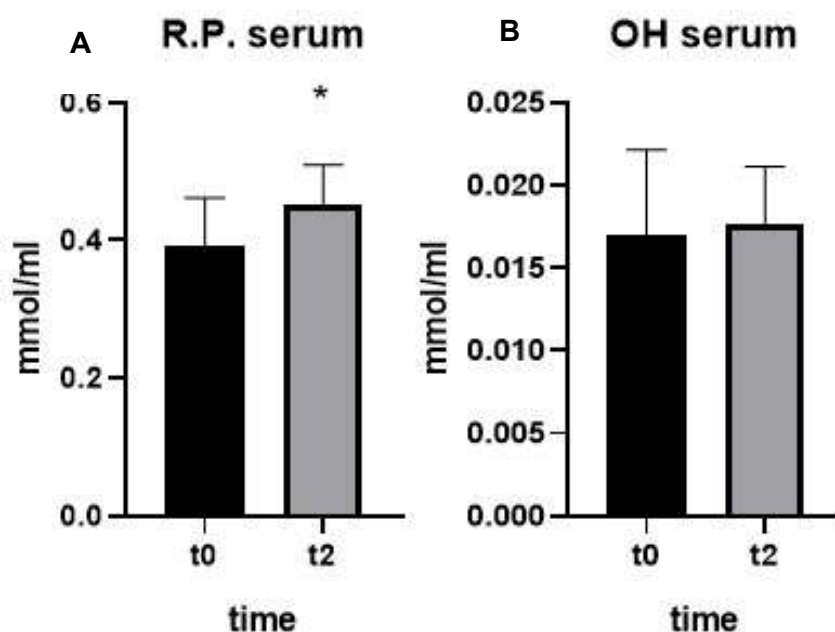
*Σχήμα 4: Σύγκριση των επιπέδων των δεικτών μόνο στα 20 άτομα που υπήρχαν και στις δύο χρονικές στιγμές. Α) Επίπεδα mmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά L πρωτεΐνης για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), Β) επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε μονάδες μmol/L ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα και στις δύο χρονικές στιγμές (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).*

Τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν σημαντική μείωση κατά 16, 24% τη χρονική στιγμή t<sub>2</sub> αντανακλώνοντας έτσι μια μείωση στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες δύο χρόνια μετά από την πρώτη αιμοληψία (p<0.05) (Σχήμα 5).



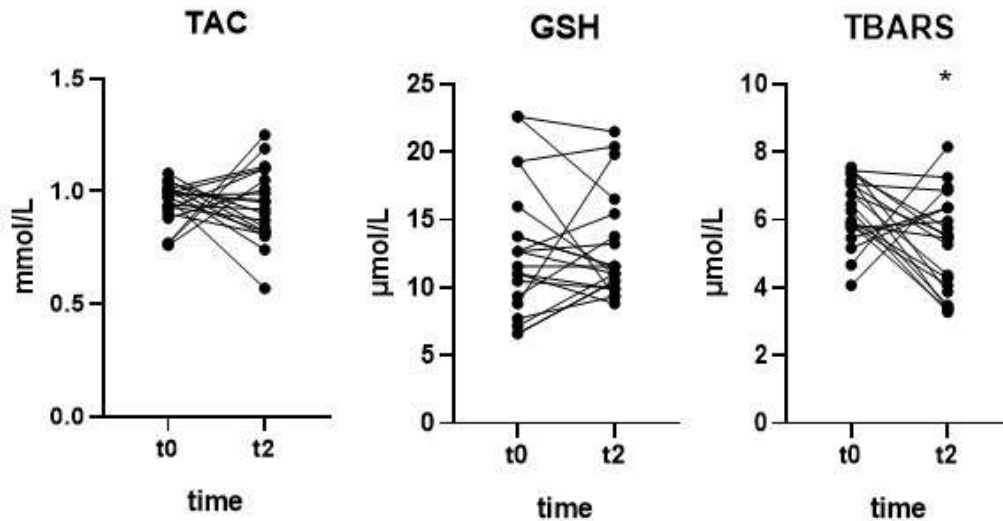
**Σχήμα 5:** Επίπεδα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) με μονάδες  $\mu\text{mol/L}$  ολικής πρωτεΐνης μόνο στα 20 άτομα που υπήρχαν και τις δύο χρονικές στιγμές. Ο αστερίσκος υποδηλώνει σημαντική στατική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

Στο **Σχήμα 6** φαίνεται ότι τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος εμφανίζουν σημαντική αύξηση κατά 14,76% τη χρονική στιγμή  $t_2$  σε σχέση με τα επίπεδα της χρονικής στιγμής  $t_0$ , ενώ στα επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά (**Σχήμα 6B**).

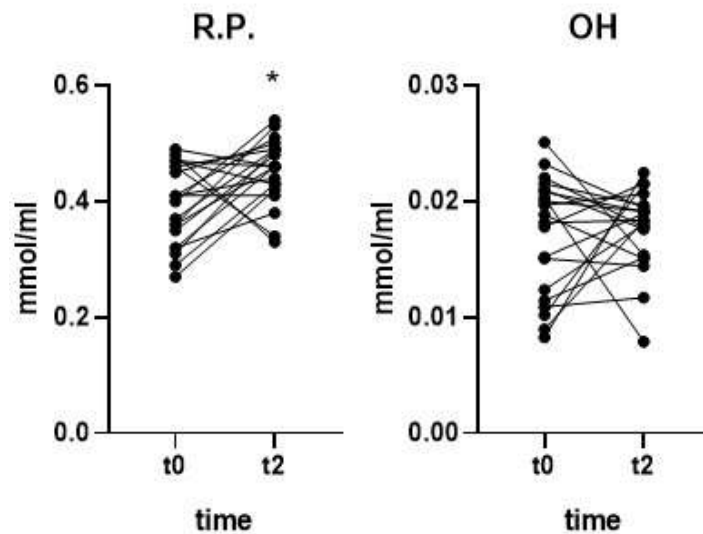


**Σχήμα 6:** Σύγκριση των επιπέδων των δεικτών μόνο στα 20 άτομα που υπήρχαν και στις δύο χρονικές στιγμές. A) Επίπεδα της αναγωγικής ισχύος (Reducing Power) σε μονάδες  $\text{mmol potassium ferricyanide/ml}$ , B) Επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου σε μονάδες  $\text{mmol deoxyribose/ml}$ . Ο αστερίσκος υποδηλώνει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων (μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

Στη συνέχεια ακολουθούν τα διαγράμματα (Σχήμα 7, Σχήμα 8) κάθε δείκτη ξεχωριστά στα οποία απεικονίζονται οι μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οξειδοαναγωγής αυτών των 20 ατόμων στις δύο χρονικές στιγμές.



Σχήμα 7: Απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων των δεικτών οξειδοαναγωγής για τις δύο χρονικές στιγμές σε κάθε άτομο από τους είκοσι συνολικά για τους δείκτες ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και TBARS.



Σχήμα 8: Απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων των δεικτών οξειδοαναγωγής για τις δύο χρονικές στιγμές σε κάθε άτομο από τους είκοσι συνολικά για τους δείκτες αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια πολύπλοκη και παθολογικά ετερογενής ασθένεια. Οι δομικές αλλαγές στον εγκέφαλο και κατ'επέκταση οι λειτουργικές αλλαγές συμβαίνουν στα πολύ αρχικά στάδια της ασθένειας, σε προκλινική φάση (*Chaffer – Pericas et al, 2018*). Η έρευνα πάνω στη νόσο Αλτσχάιμερ προχωράει με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Οι ερευνητές προσπαθούν να βρουν τρόπους για την έγκαιρη διάγνωση της άνοιας και της νόσου του Αλτσχάιμερ σε αρχικά στάδια της τους, ενώ άλλες μελέτες επικεντρώνονται στο να εντοπίσουν βιοδείκτες οι οποίοι θα προσθέσουν ειδικότητα στις κλινικές διαγνώσεις (*de Toda I. M. et al, 2019*).

Οι χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον ίδιο τον άνθρωπο και την ποιότητα ζωής του. Η έγκαιρη διάγνωση σε συνδυασμό με νέες θεραπευτικές μεθόδους μπορούν να καθυστερήσουν ή να αποτρέψουν τις μη αντιστρέψιμες συνέπειες αυτών των διαταραχών. Το ζήτημα της έγκαιρης διάγνωσης ενδιαφέρει κυρίως ασθενείς οι οποίοι προέρχονται από μια κατώτερη κοινωνική τάξη και δεν έχουν πρόσβαση σε προηγμένες και εξειδικευμένες διαγνωστικές διαδικασίες. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα 2/3 των νευροεκφυλιστικών ασθενειών παραμένουν μη διαγνώσιμα. Η έρευνα πάνω σε νέους πιθανούς βιοδείκτες για τη διάγνωση αυτών των ασθενειών του νευρικού συστήματος είναι κύριο τρέχον ζήτημα υψηλής σημαντικότητας. Επιπλέον, αυτοί οι νέοι τρόποι διάγνωσης θα πρέπει να είναι ιδανικά προσιτοί και οικονομικοί σε όλους (*Marra C. A. et al, 2012*).

Στη νόσο Αλτσχάιμερ, το οξειδωτικό στρες είναι ένα από τα πρώτα γεγονότα που λαμβάνουν μέρος και έχει αναγνωριστεί ως το κυρίαρχο αιτιατό της παθογένεσης και της εξέλιξης της νόσου. Η ουσία στο οξειδωτικό στρες όπως είχε αναφερθεί από τον Sies ήταν ότι παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών και μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών (*Sies H., 2015*). Οι πιο κοινές ενεργές μορφές που απαντώνται σε κύτταρα και ιστούς είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου και οι ενεργές μορφές αζώτου. Αναφερόμενοι στα αντιοξειδωτικά, τα κυριότερα είναι που παράγονται ενδογενώς όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, η καταλάση και η γλουταθειόνη, αλλά και εκείνα που λαμβάνονται εξωγενώς μέσω της διατροφής, όπως είναι οι βιταμίνες (*Boveris A. et al, 2019*).

Το κομμάτι της πληροφορίας που συνδέει το οξειδωτικό στρες με τη νόσο Αλτσχάιμερ είναι τεράστιο καθώς επίσης νέα πληροφορία γύρω από αυτό το θέμα προστίθεται συνεχώς με αποτέλεσμα η βιβλιογραφία να αλλάζει με ταχείς ρυθμούς. Λόγω αυτού του μεγάλου ενδιαφέροντος και της κρισιμότητας της νόσου είναι αναγκαίο να αποτυπωθεί και να βρεθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το οξειδωτικό στρες και το πώς αυτό επηρεάζει δομικά και λειτουργικά τον εγκέφαλο (Schrag M. et al, 2018). Το κύριο χαρακτηριστικό ενός βιοδείκτη για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί είναι να εντοπίζει την πιθανότητα νόσησης σε πολύ αρχικά επίπεδα σε προκλινικό στάδιο κιάλας, ώστε να συνδέεται με τη εξέλιξη της νόσου. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες θα πρέπει να χαρακτηριστούν ως αξιόπιστοι καθώς το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε όλη της διαδικασία της νόσου και να μπορούν να προβλέψουν αποτελεσματικά το ρίσκο εμφάνισής της (Marra C. A. et al, 2012).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ορού αίματος ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Έτσι, με βάσει στοιχεία που θα προκύψουν από αυτήν τη μελέτη μπορούν να βγουν συμπεράσματα σχετικά με την κατάσταση του οξειδωτικού στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα αυτών των ατόμων με υψηλές πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

Σχετικά με την επιλογή των δειγμάτων, σε πρώτη φάση έγινε αιμοληψία σε 97 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου τη χρονική στιγμή  $t_0$ . Ύστερα από δύο χρόνια, τη χρονική στιγμή  $t_2$ , λήφθηκε αίμα από 20 άτομα τα όποια ανήκαν στο αρχικό σύνολο των 97 ατόμων της πρώτης αιμοληψίας της χρονικής στιγμής  $t_0$ . Σε αυτά τα 117 συνολικά δείγματα πραγματοποιήθηκε η μελέτη των δεικτών οξειδοαναγωγής. Συγκεκριμένα, οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC – Total Antioxidant Capacity), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity).

Οι δείκτες αυτοί επιλέχθησαν καθώς αποτελούν βασικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες στους έμβιους οργανισμούς. Ειδικότερα, η γλουταθειόνη, ένα από τα πιο σημαντικά ενδογενή μόρια, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των δραστικών ειδών καθώς ο σουλφιδικός δεσμός της κυστεΐνης οξειδώνεται, ανάγοντας ελεύθερες ρίζες. Σε πρώτη φάση ανάλυσης των αποτελεσμάτων έγινε σύγκριση των επιπέδων της γλουταθειόνης των 97 ατόμων της χρονικής στιγμής  $t_0$  με τα επίπεδα της

γλουταθειόνης των 20 ατόμων της χρονικής στιγμής  $t_2$  (**Σχήμα 1B**). Αξιολογώντας τα συγκεκριμένα αποτελέσματα παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση κατά 20,85% των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης τη χρονική στιγμή  $t_2$  σε σχέση με τη χρονική στιγμή  $t_0$  (unpaired t-test). Αντίθετα, στο δεύτερο στάδιο των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης αποκλειστικά των 20 ατόμων που υπήρχαν και στις δύο χρονικές στιγμές (**Σχήμα 4B**). Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στην παρούσα φάση δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά.

Ο επόμενος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο όρος αυτός αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του αίματος να έχουν διαφορετική αντιοξειδωτική δράση. Όμως, κάθε ένας συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Τα επίπεδα της TAC δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά ούτε στην πρώτη (**Σχήμα 1A**) ούτε και στη δεύτερη σειρά ανάλυσης των αποτελεσμάτων (**Σχήμα 4A**).

Στη συνέχεια μετρήθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί ένα κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες και έναν καίριο βιοδείκτη για τη νόσο Αλτσχάιμερ. Αυτό συμβαίνει καθώς ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε λιπίδια και οποιαδήποτε καταστροφή αυτών των βιομορίων επηρεάζει άμεσα τη δομή και τη λειτουργικότητα του εγκεφάλου. Αναφορικά με τα αποτελέσματα των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξείδωσης, δεν παρουσιάστηκε κάποια στατιστικώς διαφορά σε αυτά όταν συγκρίθηκαν τα 97 άτομα της χρονικής στιγμής  $t_0$  με τα 20 άτομα της χρονικής στιγμής  $t_2$  (**Σχήμα 2**). Αντίθετα, όσον αφορά τα επίπεδα των TBARS μόνο των 20 ατόμων που συμμετείχαν και στις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 16,24% των επιπέδων τους κατά τη χρονική στιγμή  $t_2$  σε σχέση με τη χρονική στιγμή  $t_0$  (**Σχήμα 5**). Ένας άλλος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η αναγωγική ισχύς (Reducing Power). Η αναγωγική ισχύς σχετίζεται με την ικανότητα βιολογικών δειγμάτων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή. Ενώσεις με αναγωγική ισχύ είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος φαίνεται να αυξάνονται στατιστικά σημαντικά και στο **Σχήμα 3A** και στο **Σχήμα 6A**. Ανεξαρτήτως του τρόπου ανάλυσης των αποτελεσμάτων η αναγωγική ισχύς είναι αυξημένη τη χρονική στιγμή  $t_2$  σε σχέση με τα επίπεδά της τη χρονική στιγμή  $t_0$ . Με τον πρώτο τρόπο ανάλυσης των

αποτελεσμάτων τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος αυξήθηκαν κατά 7,48% (unpaired t-test), ενώ με το δεύτερο τρόπο ανάλυσης αποτελεσμάτων ήταν αυξημένα κατά 14,67% (paired t-test).

Τελευταίος δείκτης που μετρήθηκε ήταν ο δείκτης της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity, OH<sup>·</sup>). Η ρίζα του υδροξυλίου είναι η πιο επιβλαβής, ενδογενώς παραγόμενη ελεύθερη ρίζα ικανή να προκαλέσει καταστροφή βιομορίων σε ζωντανά κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών ούτε στο **Σχήμα 3B** ούτε στο **Σχήμα 6B**. Ο τρόπος ανάλυσης των αποτελεσμάτων δεν επηρέασε το τελικό αποτέλεσμα, καθώς καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα αυτού του δείκτη.

Τα **Σχήματα 7 και 8** παρατείνονται με σκοπό να παρουσιαστεί η μεταβολή των επιπέδων του κάθε δείκτη ξεχωριστά σε αυτά τα 20 άτομα που συμμετείχαν και στις δύο αιμοληψίες των χρονικών στιγμών  $t_0$  και  $t_2$ .

Συμπερασματικά, με όσα έχουν παρουσιαστεί, παρατηρείται ότι στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίζουν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος και τα επίπεδα των TBARS. Αναλυτικότερα, φαίνεται ότι τα άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ σε αυτό το διάστημα των δύο ετών από την πρώτη μέχρι τη δεύτερη αιμοληψία, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής άμυνας έχουν αυξηθεί, ενώ ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί οξειδωτική καταστροφή βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα υπάρχει η αίσθηση της ύπαρξης ενός παράδοξου: από τη στιγμή που αυτά τα άτομα έχουν υψηλό κίνδυνο νόσησης, για ποιο λόγο έχουν ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Μελετώντας τον κάθε δείκτη ξεχωριστά, όσον αφορά τα επίπεδα της γλουταθειόνης σε ασθενείς με τη νόσο Αλτσχάιμερ, οι αναφορές στη βιβλιογραφία δεν είναι σαφείς. Κάποιες έρευνες θεωρούν ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά στα επίπεδα της γλουταθειόνης μεταξύ υγιών ανθρώπων με ρίσκο νόσησης και ασθενών με τη νόσο Αλτσχάιμερ. Άλλες έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνης είναι σημαντικά μειωμένα και αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με μειωμένο ρίσκο εμφάνισης της νόσου (Scarmeas N. Et al, 2020).

Όμως μια έρευνα των Vina et al, είχε παρουσιάσει ότι άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα κάποια χρόνια πριν τη νόσησή τους. Τα άτομα που είχαν επιλεχθεί είτε είχαν ελεγχθεί γενετικά είτε κάποιο συγγενικό τους



πρόσωπο έπασχε από τη νόσο Αλτσχάιμερ. Τα αποτελέσματά τους αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης. Η εξήγηση που δόθηκε ήταν ότι οι ελεύθερες ρίζες παράγονται φυσιολογικά όμως τα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπερλειτουργούν «φορτώνοντας» έτσι την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Πλέον, γίνεται λόγος για αναγωγικό στρες, όπου κάποια στιγμή πριν την εμφάνιση της ασθένειας το σύστημα της αντιοξειδωτικής τους άμυνας θα καταρρεύσει και οι ελεύθερες ρίζες θα συσσωρευτούν οδηγώντας έτσι τον οργανισμό σε μια μη διαχειρίσιμη κατάσταση οξειδωτικού στρες (Vina J. et al, 2013). Πιθανώς για αυτό το λόγο παρατηρήθηκαν σε αυτό το πείραμα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης και αναγωγικής ισχύος.

Όσον αφορά την υπεροξείδωση των λιπιδίων, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων τα επίπεδα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων έχουν αυξηθεί σημαντικά σε άτομα με υψηλό ρίσκο νόσησης, επειδή ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε λιπίδια και ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες καθώς καταναλώνει πολύ ενέργεια και άρα μεγαλύτερες πιθανότητες να παράγει ελεύθερες ρίζες με τελικό αποτέλεσμα να επέλθει η οξείδωση των λιπιδίων (Mecocci P. et al, 2009). Όμως υπάρχουν και μελέτες που δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά στα επίπεδα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Lu H. et al, 2014). Στο παρόν πείραμα βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα λιπιδικής υπεροξείδωσης τη χρονική στιγμή t<sub>2</sub>. Ίσως σε αυτό το χρονικό διάστημα μεταξύ των αιμοληψιών τα άτομα αυτά έπασχαν από αναγωγικό στρες καθώς βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης και αναγωγικής ισχύος και μέχρι τη χρονική στιγμή t<sub>2</sub> δεν θα είχε πιθανώς καταρρεύσει η αντιοξειδωτική τους άμυνα.

Κλείνοντας, αυτή η μελέτη μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη εύρεσης νέων βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου Αλτσχάιμερ σε άτομα υψηλού ρίσκου, εστιάζοντας συγκεκριμένα σε δείκτες οξειδοαναγωγής, καθώς το οξειδωτικό στρες είναι από τα πρώτα συμβάντα της νόσου και έχει κρίσιμη θέση στην παθογένεση και στην εξέλιξη αυτής της νευροεκφυλιστικής ασθένειας. Αξίζει να τονιστεί όμως ότι δε θα πρέπει αυτοί οι δείκτες να εξετάζονται μεμονωμένα, καθώς απαιτείται η συνδυαστική μελέτη όλων των δεικτών που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός οργανισμού, ώστε να υπάρξει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την έγκαιρη διάγνωση της νόσου Αλτσχάιμερ.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel Naseer, M., Rabah, A. M., Rashed, L. A., Hassan, A., & Fouad, A. M. (2020). Glutamate and Nitric Oxide as biomarkers for disease activity in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 38(101873), 101873.

Badía, M.-C., Giraldo, E., Dasí, F., Alonso, D., Lainez, J. M., Lloret, A., & Viña, J. (2013). Reductive stress in young healthy individuals at risk of Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 63, 274–279.

Chang, Y.-T., Chang, W.-N., Tsai, N.-W., Huang, C.-C., Kung, C.-T., Su, Y.-J., Lin, W.-C., Cheng, B.-C., Su, C.-M., Chiang, Y.-F., & Lu, C.-H. (2014). The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *BioMed Research International*, 2014, 182303.

Charisis, S., Ntanasi, E., Yannakoulia, M., Anastasiou, C. A., Kosmidis, M. H., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G., Sakka, P., Veskoukis, A. S., Kouretas, D., & Scarmeas, N. (2021). Plasma GSH levels and Alzheimer's disease. A prospective approach.: Results from the HELIAD study. *Free Radical Biology & Medicine*, 162, 274–282.

Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271–281.

Collin, F., Cheignon, C., & Hureau, C. (2018). Oxidative stress as a biomarker for Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*, 12(3), 201–203.

Cristalli, D. O., Arnal, N., Marra, F. A., de Alaniz, M. J. T., & Marra, C. A. (2012). Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Journal of the Neurological Sciences*, 314(1–2), 48–56.

Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9829176.

Díaz-Hung, M. L., & González Fraguera, M. E. (2014). Oxidative stress in neurological diseases: Cause or effect? *Neurología (English Edition)*, 29(8), 451–452.

Feng, Y., & Wang, X. (2012). Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 472932.

Ferreira, M. E. S., de Vasconcelos, A. S., da Costa Vilhena, T., da Silva, T. L., da Silva Barbosa, A., Gomes, A. R. Q., Dolabela, M. F., & Percário, S. (2015). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Should we keep trying antioxidant therapies? *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5), 595–614.

Gella, A., & Bole, I. (2011). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Pathogenesis, biomarkers and therapy. In *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*. InTech.

Gella, A., & Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 88–93.

Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551.

Guengerich, F. P. (2019). Cytochrome P450 research and the journal of biological chemistry. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1671–1680.

Hancock, J. T. (2019). Considerations of the importance of redox state for reactive nitrogen species action. *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 4323–4331.

Kim, C., Thao, T. T., Kim, J.-H., & Hwang, I. (2020). Effects of the formation of reactive chlorine species on oxidation process using persulfate and nano zero-valent iron. *Chemosphere*, 250(126266), 126266.

Liu, P.-P., Xie, Y., Meng, X.-Y., & Kang, J.-S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 29.

Llanos-González, E., Henares-Chavarino, Á. A., Pedrero-Prieto, C. M., García-Carpintero, S., Frontiñán-Rubio, J., Sancho-Bielsa, F. J., Alcain, F. J., Peinado, J. R., Rabanal-Ruiz, Y., & Durán-Prado, M. (2019). Interplay between mitochondrial oxidative disorders and proteostasis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1444.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.

Mahdi, O., Baharuldin, M. T. H., Nor, N. H. M., Chiroma, S. M., Jagadeesan, S., & Moklas, M. A. M. (2019). Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomedical Research and Therapy*, 6(11), 3460–3484.

Mangialasche, F., Polidori, M. C., Monastero, R., Ercolani, S., Camarda, C., Cecchetti, R., & Mecocci, P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Research Reviews*, 8(4), 285–305.

Marcourakis, T., Camarini, R., Kawamoto, E. M., Scorsi, L. R., & Scavone, C. (2008). Peripheral biomarkers of oxidative stress in aging and Alzheimer's disease. *Dementia & Neuropsychologia*, 2(1), 2–8.

Martínez de Toda, I., Miguélez, L., Vida, C., Carro, E., & De la Fuente, M. (2019). Altered redox state in whole blood cells from patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 71(1), 153–163.

Mazat, J.-P., Devin, A., Yoboue, E., & Ransac, S. (2021). A theoretical model of mitochondrial ATP synthase deficiencies. The role of mitochondrial carriers. *Processes (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1424.

McDonald, A. J., & Mott, D. D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory: Amygdalohippocampal Interconnections. *Journal of Neuroscience Research*, 95(3), 797–820.

Morsy, A., & Trippier, P. C. (2019). Amyloid-binding alcohol dehydrogenase (ABAD) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(9), 4252–4264.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., & Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759–767.

Nunomura, Akihiko, Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G., & Smith, M. A. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(7), 631–641.

Pajares, M., Cuadrado, A., Engedal, N., Jirsova, Z., & Cahova, M. (2018). The role of free radicals in autophagy regulation: Implications for ageing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–19.

Palacios-Filardo, J., & Mellor, J. R. (2019). Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 37–43.

Patel, M. (2016). Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(9), 768–778.

Peña-Bautista, C., Baquero, M., Vento, M., & Cháfer-Pericás, C. (2019). Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 491, 85–90.

Persson, T., Popescu, B. O., & Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 427318.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13.

Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.

Serra, J. A., Domínguez, R. O., Marschoff, E. R., Guareschi, E. M., Famulari, A. L., & Boveris, A. (2009). Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochemical Research*, 34(12), 2122–2132.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183.

Song, Z., Hudik, E., Le Bars, R., Roux, B., Dang, P. M.-C., El Benna, J., Nüsse, O., & Dupré-Crochet, S. (2020). Class I phosphoinositide 3-kinases control sustained NADPH oxidase activation in adherent neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 178(114088), 114088.

Steiger, A. K., Zhao, Y., & Pluth, M. D. (2018). Emerging roles of carbonyl sulfide in chemical biology: Sulfide transporter or gasotransmitter? *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(16), 1516–1532.

Wojsiat, J., Zoltowska, K. M., Laskowska-Kaszub, K., & Wojda, U. (2018). Oxidant/antioxidant imbalance in Alzheimer's disease: Therapeutic and diagnostic prospects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–16.

Zabel, M., Nackenoff, A., Kirsch, W. M., Harrison, F. E., Perry, G., & Schrag, M. (2018). Markers of oxidative damage to lipids, nucleic acids and proteins and antioxidant enzymes activities in Alzheimer's disease brain: A meta-analysis in human pathological specimens. *Free Radical Biology & Medicine*, 115, 351–360.

Zafrilla, P., Mulero, J., Xandri, J. M., Santo, E., Caravaca, G., & Morillas, J. M. (2006). Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Current Medicinal Chemistry*, 13(9), 1075–1083.