

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΟΣΟ
ALZHEIMER

ASSESSMENT OF REDOX STATUS MARKERS IN SAMPLES OF
PATIENTS WITH A PREDISPOSITION TO ALZHEIMER'S DISEASE

Ανατολιωτάκη Χριστίνα του Γεωργίου

Λάρισα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Αριστείδης Βεσκούκης : Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ασπροδίνη Ευτυχία: Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής 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 2022.

Πρώτα από όλα,θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον κύριο Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την δυνατότητα να συμμετέχω στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία και να βρίσκομαι στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Επιπλέον,θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Αριστείδη Βεσκούκη και την κυρία Ευτυχία Ασπροδίνη που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Στην συνέχεια,θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα ,η οποία υπήρξε υπεύθυνη μου στο εργαστήριο για την καθοδήγηση ,τις συμβουλές και τον χρόνο που μου έδωσε κατά την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Αξίζει να ευχαρίστησω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ευχάριστο συνεργατικό κλίμα και για την βοήθειά τους όσο βρισκόμουν στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος,οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την στηριξή της.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.1.2 Διαδικασία παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό.....	12
1.1.3 Θετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών.....	15
1.1.4 Αρνητικές δράσεις των ελευθέρων ριζών.....	16
1.1.5.Η έννοια του οξειδωτικού στρες.....	16
1.1.6 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	18
1.1.6.1 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα λιπίδια	18
1.1.6.2 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες.....	18
1.1.6.3 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στο DNA.....	19
1.2 Η νόσος Αλτσχάιμερ.....	20
1.2.1 Ιστορία της νόσου Αλτσχάιμερ	21
1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ.....	22
1.2.3 Συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ	22
1.2.4 Στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ	23
1.2.5. Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ	24
1.2.6 Υποθέσεις για την νόσο Αλτσχάιμερ.....	25
1.2.6.1 Χολινεργική υπόθεση.....	25
1.2.6.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς.....	26
1.2.6.3 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau.....	27
1.2.6.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες.....	27
1.3 Οξειδωτικό στρες και νόσος Αλτσχάιμερ	28
1.3.1 Οξείδωση πρωτεϊνών στην νόσο Αλτσχάιμερ	29
1.3.2 Οξείδωση λιπιδίων στην νόσο Αλτσχάιμερ	30
1.3.3 Οξείδωση DNA στην νόσο Αλτσχάιμερ.....	30
1.3.4 Αλληλεπίδραση Αβ πεπτιδίων και ROS.....	31

1.3.5 Η έννοια των αντιοξειδωτικών	32
2.ΣΚΟΠΟΣ.....	33
3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
3.1 Γενικά.....	34
3.2 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC).....	34
3.3 Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).....	36
3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	37
3.5 Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power Assay).....	38
3.6 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl radical scavenging activity)	40
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη και σοβαρή νευροεκφυλιστική νόσο, η οποία απασχολεί πολύ μεγάλο μέρος του γηραιότερου πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, τα βασικά της χαρακτηριστικά είναι η απώλεια μνήμης και η γνωστική εξασθένηση. Χωρίζεται σε τρία στάδια και τα παθολογικά αίτια είναι η συσσώρευση αμυλοειδών πλακών και οι νευρωνιδιακοί σωροί. Ο μηχανισμός εμφάνισης της νόσου είναι ακόμη ασαφής, όμως, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της εξέλιξης της νόσου από το πρώιμο μέχρι και το τελευταίο. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση των δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ατόμων με προδιάθεση για την νόσο Αλτσχάιμερ. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης, ουσίες που αντιδρούν με θεοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και η εκτίμηση εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity). Πραγματοποιήθηκε αιμολήψια και λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε ένα σύνολο 96 ατόμων σε μία χρονική στιγμή, ενώ μετά από δύο χρόνια έγινε ξανά ίδια λήψη αλλά μόνο σε 20 άτομα από τα 96 που συμμετείχαν και στη πρώτη χρονική στιγμή. Αρχικά, στο πρώτο στάδιο ανάλυσης των αποτελεσμάτων έγινε σύγκριση του κάθε δείκτη ξεχωριστά μεταξύ του συνόλου των 96 ατόμων που έλαβαν μέρος στην λήψη των δειγμάτων την πρώτη χρονική στιγμή και των 20 ατόμων που έλαβαν μέρος στην λήψη των δειγμάτων την δεύτερη χρονική στιγμή. Στο δεύτερο στάδιο, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα των δεικτών μόνο των 20 ατόμων ατόμων που συμμετείχαν και στις δύο φάσεις της λήψης των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση την δεύτερη χρονική στιγμή. Αντίθετα, τα επίπεδα των υπολοίπων δεικτών δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στην συνέχεια, έγινε συσχέτιση των τιμών καποιών δεικτών με καποιών άλλων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κυρίως αλλά και στο πλάσμα. Σε τελευταία φάση ανάλυσης των αποτελεσμάτων έγινε ξεχωριστά σύγκριση των τιμών των δεικτών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε σχέση με τους ίδιους δείκτες στο πλάσμα. Όμως, στην τρίτη και στην τέταρτη φάση τα συμπεράσματα δεν θεωρούνται έγκυρα λόγω χαμηλού συντελεστή συσχέτισης.

Λέξεις Κλειδια: 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 is an extremely complicated and serious neurodegenerative disease, which affects a huge part of the older population. More specifically, its main characteristics are memory loss and cognitive impairment. It is divided into three stages and the pathological causes are the accumulation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. The mechanism of Alzheimer's disease etiology is still unclear, but oxidative stress to have a very important role in all stages of the progression of the disease from the first role up to the last one. The aim of the present study was to evaluate the markers of redox in samples of individuals with a high risk for developing Alzheimer's disease. The markers, which we measured, were the total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reducing power and the Hydroxyl Radical Scavenging Activity. Initially, in the first stage of analysis of the results, a comparison was made of each marker separately between the total of 96 people who took part in taking samples at the first time point and the 20 people who took part in taking samples at the second time point. In the second stage, the results of the markers from the 20 people who participated in both phases of sampling were compared. The results showed that the levels of reduced glutathione showed a significant increase at the second time point. However, the level of the remaining markers didn't show any statistically significant difference. In addition, the values of some markers were correlated with others in cerebrospinal fluid mainly but also in plasma. In the last phase of the analysis, a separate comparison was made of the values of the markers of the cerebrospinal fluid in relation to the same markers in plasma. However, in the third and in the fourth phase the conclusions are not considered valid due to a low correlation coefficient.

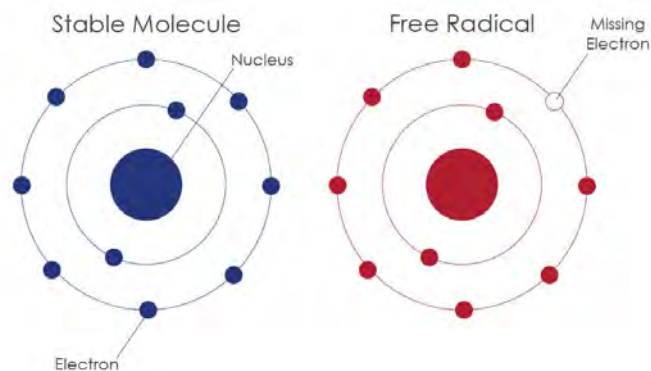
Keywords: Alzheimer's disease, oxidative stress, total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (TBARS), reducing power, hydroxyl radical scavenging activity

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί ως ένα άτομο ή μόριο ή ιόν που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων μίας ελεύθερης ρίζας την καθιστά ασταθή και εξαιρετικά αντιδραστική. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να δωρίζουν ή λαμβάνουν ένα άλλο ηλεκτρόνιο προκειμένου να επιτύχουν σταθερότητα, με αποτέλεσμα να δρουν είτε ως οξειδωτικά είτε ως αναγωγικά. (Phaniendra A. et al, 2015)

Η πρώτη ελεύθερη ρίζα ταυτοποιήθηκε από τον καθηγητή Moses Gomberg στο πανεπιστήμιο του Michigan των ΗΠΑ το 1900 όμως η τεχνολογία εκείνης της περιόδου δεν επαρκούσε για περαιτέρω έρευνα. Αρκέτα χρόνια αργότερα η εκταταμένη εργασία του Gomberg και άλλων συγγραφέων που βασίστηκαν στο έργο του οδήγησαν σε ένα μεγάλο σύνολο πειραματικών στοιχείων, με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να αποκτήσουν μια σημαντική θέση στους χημικούς κύκλους. (Di Meo S. et al, 2020)



Εικόνα 1 : Απεικόνιση μίας ελεύθερης ρίζας

Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες με βάση το κεντρικό τους άτομο οι οποίες είναι:

1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)
2. Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)
3. Δραστικές μορφές χλωρίου (RCS)
4. Δραστικές μορφές θείου (RSS)

1.Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτελούν τις πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τις μεταβολικές αντιδράσεις μαζί με τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και οι βασικότερες μορφές αναφέρονται στην παρακάτω εικόνα.

Free radical	Symbol
Reactive oxygen species-ROS	
Radicals	
Superoxide	$O_2^{\bullet-}$
Hydroxyl	OH^{\bullet}
Alkoxyl radical	RO^{\bullet}
Peroxyl Radical	ROO^{\bullet}

Εικόνα 2: Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Εκτός από τις παραπάνω μορφές, στην ομάδα των ROS περιλαμβάνονται και τα μη ριζικά είδη οξυγόνου τα οποία δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς. (Phaniendra A. et al, 2014)

Non radicals	
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Singlet oxygen	1O_2
Ozone	O_3
Organic peroxide	ROOH

Εικόνα 3: Μη δραστικές μορφές οξυγόνου

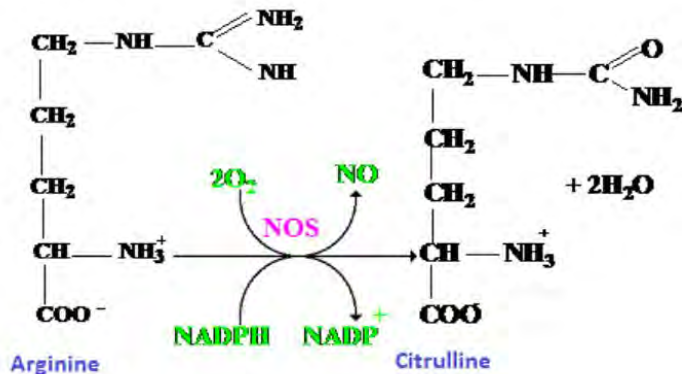
2. Δραστικές μορφές Αζώτου (RNS)

Οι δραστικές μορφές αζώτου έχουν ως κεντρικό άτομο το άζωτο. Όπως συμβαίνει και με την ομάδα των ROS περιέχουν τόσο τις δραστικές μορφές όσο και τις μη ρίζες. (Phaniendra A. et al, 2014)

Free radical	Symbol
Radicals	
Nitric oxide	NO^\bullet
Nitrogen dioxide	NO_2^\bullet
Non radicals	
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Nitrosyl cation	NO^+
Nitroxyl anion	NO^-
Dinitrogen trioxide	N_2O_3
Dinitrogen tetraoxide	N_2O_4
Nitrous acid	HNO_2
Peroxynitrous acid	$ONOOH$

Εικόνα 4: Είδη δραστικών μορφών αζώτου

Είναι μικρά μόρια τα οποία δημιουργούνται στους ιστούς απο διαφορετικές συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου (NOS) και από μία οικογένεια ενζύμων που εξαρτώνται από το NADPH. (Ozcan A. et al. 2015)



Εικόνα 5: Σχηματισμός μονοξειδίου του αζώτου

3. Δραστικές μορφές χλωρίου (RCS)

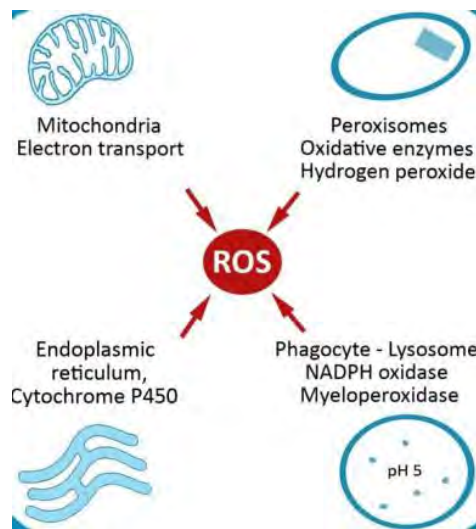
Οι δραστικές μορφές χλωρίου αποτελούν ενώσεις με κεντρικό άτομο το χλώριο (Cl) και περιλαμβάνουν τις χλωροαμίνες και το υποχλωριώδες οξύ (HOCL).

4. Δραστικές μορφές θείου (RSS)

Είναι δραστικές ενώσεις με κεντρικό άτομο το θείο. Έχουν αναγνωριστεί τις τελευταίες δεκαετίες ως πολύ σημαντικά μόρια στην ρύθμιση οξειδοαναγωγής και συμμετέχουν σε πολλές μεταβολικές διεργασίες. (Iciek M. et al, 2022). Περιλαμβάνουν τα θειικά ιόντα (SO_4^{2-}), τα θειώδη (SO_3^{2-}), το θειοθειικό ($S_2O_3^{2-}$) και τον σιδηροπυρίτη (FeS_2).

1.1.2 Διαδικασία παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό

Ο κρίσιμος ρόλος του μοριακού οξυγόνου είναι αδιαμφισβήτητος στην βιολογία, αφού είναι απαραίτητο για ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών λειτουργιών στον άνθρωπο και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς. Μία από τις διεργασίες που εμπλέκεται το μοριακό οξυγόνο είναι η παραγωγή του ενεργειακού νομίσματος ATP μέσω των μιτοχονδρίων που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές. Οι ενδογενείς πηγές αναφέρονται κυρίως στον ενζυματικό μεταβολισμό των κυττάρων στα μιτοχόνδρια, τα φαγοκύτταρα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, λόγω της κατανάλωσης του οξυγόνου εκεί.



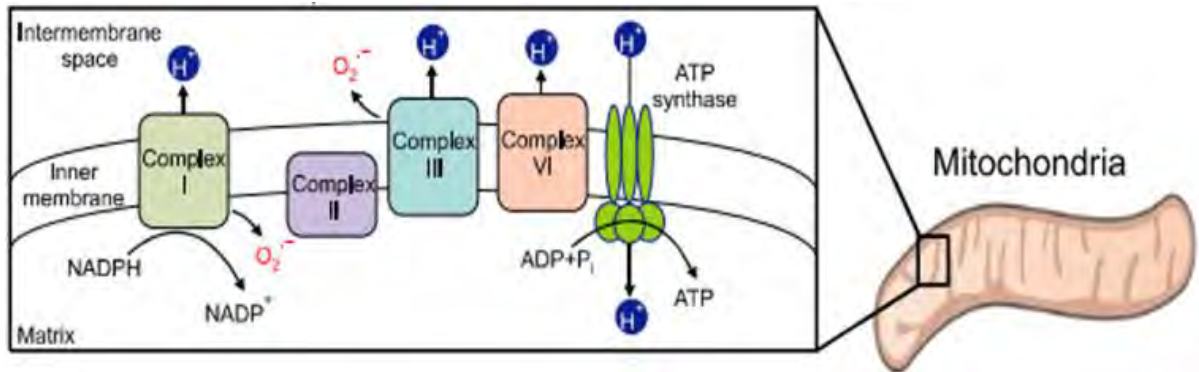
Εικόνα 6: Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS

Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Κατά την δημιουργία της κινητήριας δύναμης πρωτονίων για την παραγωγή ATP από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, περίπου το 0,1 με 0,2% του O₂ που καταναλώνεται από τα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε ROS (Ryu J. et al, 2015). Οι ρίζες υπεροξειδίου παράγονται σε δύο κύριες θέσεις στην αλυσίδα

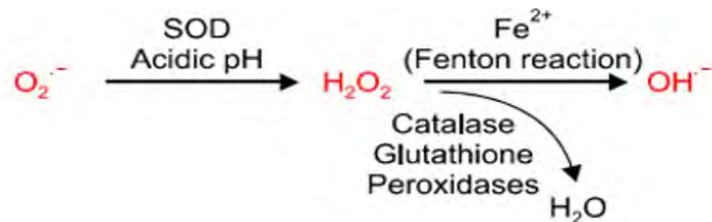
μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αύτες οι θέσεις αποτελούν το σύμπλοκο I και το σύμπλοκο III, δηλαδή την αφυδρογονάση NADH και την αναγωγάση του κυτοχρώματος c της ουβικινόνης αντίστοιχα.

(Phaniendra et al, 2015).



Εικόνα 7: Παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα από τα δύο πρώτα σύμπλοκα στο συνένζυμο Q, προκαλεί τον σχηματισμό της ανηγμένης μορφής του (QH₂), η οποία αναγεννά το συνένζυμο Q μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης ($\cdot Q$) στον κύκλο Q. Από τον κύκλο Q σχηματίζεται ρίζα υπεροξειδίου, η οποία στην συνέχεια χρησιμοποιείται για την παραγωγή H₂O₂ με την κατάλυση του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Μάλιστα, το H₂O₂ είναι ικανό να αντιδρά με μέταλλα, όπως το Fe²⁺ και το Cu⁺ για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου (OH⁻) μέσω της αντίδρασης Fenton. (Phaniendra et al, 2014)



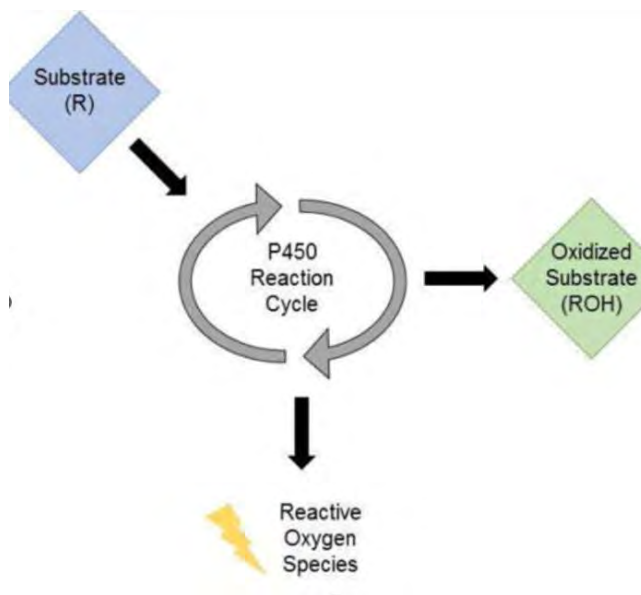
Εικόνα 8: Αντίδραση Fenton

Παραγωγή ROS από τα φαγοκύτταρα

Η φαγοκυττάρωση λαμβάνει χώρα σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα και αφορά μια οξειδωτική έκρηξη που απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ριζών. Αυτά τα δραστικά είδη ριζών χρησιμεύουν ως σημαντικά συστατικά του αμυντικού μηχανισμού έναντι των εισβολέων παθογόνων. Οι εκρήξεις ελεύθερων ριζών παράγονται μέσω μιας ελεγχόμενης αντίδρασης και χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν τα φαγοκυτταρωμένα βακτήρια. Η αντίδραση καταλύεται από την NADPH οξειδάση με την χρήση του NADPH ως υπόστρωμα για δότη ηλεκτρονίων. (Arben S. et al, 2016)

Παραγωγή ROS από το σύστημα του κυτοχρώματος P450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 αποτελούν σημαντικούς καταλύτες για ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών αντιδράσεων και είναι κυριώς γνωστά για τον ρόλο τους στην οξείδωση του υποστρώματος (R). Λόγω της οξειδωτικής τους ικανότητας, παίζουν κομβικό ρόλο στον μεταβολισμό της φάσης I των φαρμάκων και τον ξενοβιοτικών, αυξάνοντας την πολικότητα του υποστρώματος και βοηθώντας στην απέκκριση παράγοντας ταυτόχρονα ελεύθερες ρίζες. (Veith A. et al, 2018)



Εικόνα 9: Παραγωγή ROS από το σύστημα κυτοχρώματος P450

Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών:

Έκτος απο τις ενδογενείς πηγες που μεσολαβούν ένζυμα, ελευθέρες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν και από εξωκυτταρικές πηγες.Καποίες από αυτές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. (Phaniendra et al,2014)

Ρύπανση αέρα ή νερού	Φυτοφάρμακα
Αλκοόλ	Υπεριώδες φως
Καπνός τσιγάρου	Μαγείρεμα
Βιομηχανικοί διαλύτες	Φάρμακα όπως παρακεταμόλη

Πίνακας 1: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.1.3 Θετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών

Τόσο τα ROS όσο και τα RNS έχει φανεί πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ευεργετικά αποτελέσματα και συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ανοσοποιητική λειτουργία.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως τα ROS είναι ιδανικά μόρια σηματοδότησης καθώς λόγω του μικρού μεγέθους τους μπορούν να πραγματοποιήσουν διάχυτες μικρές αποστάσεις.Πέρα από τον ρόλο τους ως αγγελιοφόροι, εμπλέκονται στην επαγωγή ή την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην διαδικασία της απόπτωσης είτε για την ενεργοποίηση είτε για την αναστολή της.Άλλες έρευνες αναφέρουν πως μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα πολλών ενζύμων μέσω της οξειδωσης αμινοξέων των καταλυτικών περιοχών τους ,όπως κινάσες τυροσίνης και σερίνης.

Το H₂O₂ φαίνεται πως μεταβάλλει τα πρότυπα γονιαδικής έκφρασης των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης παραγόντων μεταγραφής όπως είναι ο NF-kB.Σε αυτήν την περίπτωση ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με μία πρωτεΐνη αναστολέα,την

Ik-B, η οποία απομακρύνεται με την δράση του H₂O₂ επιτρέποντας στον μεταγραφικό παράγοντα να μεταφερθεί στον πυρήνα. (J.T. Hancock. et al, 2001)

Όσον αφορά τα RNS, το NO. είναι ένας σημαντικός αγγελιοφόρος που διεγείρει την γουανυλική κυκλάση και τις πρωτεϊνικές κινάσες, βοηθώντας έτσι στην χαλάρωση των λείων μυών στα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστής της κυτταρικής οξειδοαναγωγής και να ρυθμίσει την ενζυματική δραστηριότητα νιτροζυλιώνοντας τις πρωτεΐνες. (Phaniendra et al, 2014)

1.1.4 Αρνητικές δράσεις των ελευθέρων ριζών

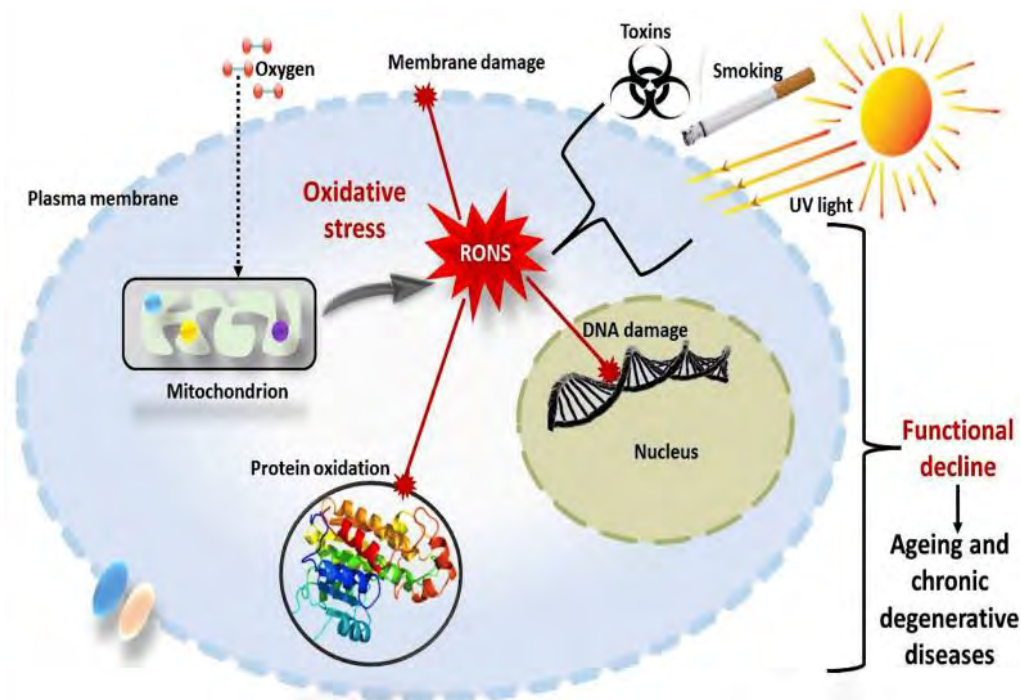
Εκτός από τον θετικό ρόλο τους, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποβούν πολύ τοξικές για το ζωντανό σύστημα. Τα βιομόρια, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι πολύ ευαίσθητα στις ελεύθερες ρίζες. Σε υψηλές συγκεντρώσεις τα ROS και τα RNS δημιουργούν στρες δημιουργώντας αλλαγές σε αυτά τα βιομόρια. Αξίζει να αναφερθεί πως, ο εγκέφαλος έχει μεγάλη ζήτηση για οξυγόνο και καταναλώνει 20% περισσότερο οξυγόνο από άλλα μέρη του σώματος με αποτέλεσμα να θεωρείται ένα εργοστάσιο ελευθέρων ριζών, οι οποίες όταν υπάρχουν σε περίσσεια μπορούν να προκαλέσουν επιβλαβείς επιδράσεις, όπως για παράδειγμα την φθόρα νευρωνικών κυττάρων. Μάλιστα, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) έχει βρεθεί ότι έχει πολύ τοξική επίδραση στους νευρώνες και στα λιπίδια των μεμβρανών. (Singh A. et al, 2019)

1.1.5. Η έννοια του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία κατάσταση που προκαλείται από την ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών σε ένα βιολογικό σύστημα. Η ανισορροπία είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης υπερβολικού επιπέδου των ελευθέρων ριζών, όπως των ROS και RNS ή και της ακατάλληλης λειτουργίας του αντιοξειδωτικού συστήματος να τις απομακρύνει. Αυτά τα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου στοχεύουν διάφορα βιομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες,

τα λιπίδια, DNA και RNA με αποτέλεσμα η συσσώρευσή τους να βλάπτει την ακεραιότητα τους και τον τρόπο λειτουργίας τους, προκαλώντας σε πολλές περιπτώσεις σοβαρές ασθένειες.

Υπό κανονικές συνθήκες, η παρουσία ενός φυσικού αντιοξειωτικού συστήματος συμμετέχει στην απομάκρυνση των ROS και διατηρεί το τυπικό κυτταρικό περιβάλλον. Η έναρξη του οξειδωτικού στρες πυροδοτεί την υπερβολική παραγωγή ROS έχοντας επιβλαβή επίδραση στα βιομόρια προκαλώντας κακή αναδίπλωση και συσσώρευση πρωτεϊνών, μεταλλάξεις και βλάβη του DNA καθώς και υπεροξειδωση λιπιδίων. Η υψηλή κατανάλωση και παραγωγή ROS σε συνδυασμό με την δυσκολία των αντιοξειδωτικών να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό καθιστά τον εγκέφαλο το πιο ευάλωτο μέρος του σώματος στο οξειδωτικό στρες. Επομένως, τα ROS συσσωρεύονται στον εγκέφαλο και επιδρούν καταστροφικά στους νευρώνες, βλάπτουν τις νευρωνικές πρωτεΐνες οδηγώντας αργότερα σε σοβαρές νευρολογικές διαταραχές όπως η νόσος Πάρκινσον και το Αλτσχάιμερ. (Singh A. et al, 2019)



Εικόνα 10: Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο

1.1.6 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

1.1.6.1 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στα λιπίδια

Τα λιπίδια της μεμβράνης και ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων (PUFAs) είναι πολύ ευαίσθητα στην οξείδωση από ελεύθερες ρίζες. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στην απώλεια λειτουργίας της μεμβράνης μέσω της μείωσης της ρευστότητας της και την αδρανοποίηση των δεσμευμένων υποδοχέων και ενζύμων. Η αντίδραση υπεροξείδωσης ξεκινά όταν κάποια ελεύθερη ρίζα προσβάλει τα λιπίδια και αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από την ομάδα του μεθυλενίου που βρίσκεται μεταξύ δύο διπλών δεσμών στο λιπαρό οξύ και σχηματίζεται στην πορεία μία λιπουπεροξειδική ρίζα (LOO·). Η λιπουπεροξειδική ρίζα, αυτή, υφίσταται αναδιάταξη μέσω μίας αντίδρασης κυκλοποίησης για να σχηματίσει μετά από κάποιες διεργασίες, ενώσεις όπως την μηλονοδιαλδευδη (MDA) και την 4-υδροξυνονεάλη (4-HNE). Τα παραπάνω προϊόντα είναι πολύ τοξικά προκαλώντας στην συνέχεια είτε βλάβη στο DNA και στις πρωτεΐνες είτε μεταφέρουν την αντίδραση υπεροξείδωσης στα υπόλοιπα λιπίδια. (Phaniendra A. et al 2014)

1.1.6.2 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες

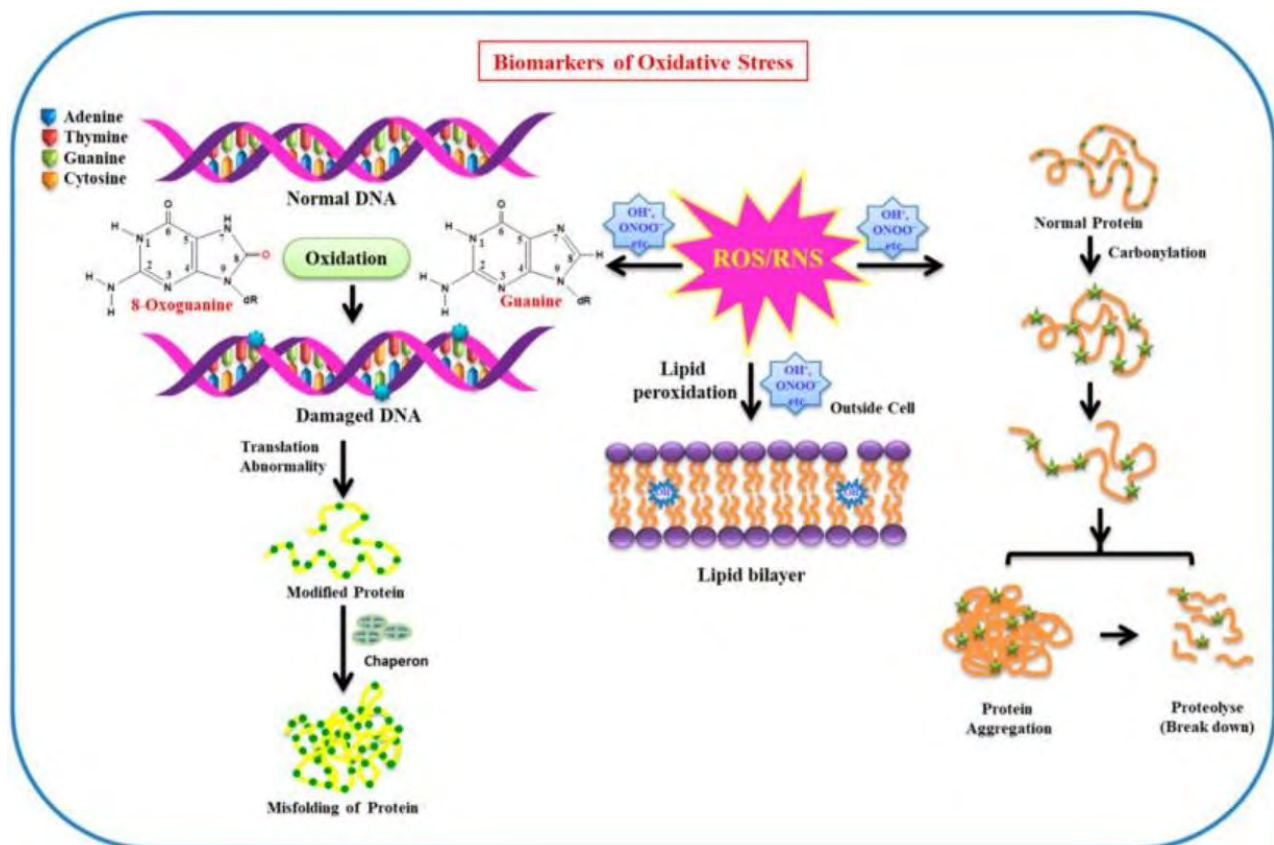
Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί από πολλά είδη ριζών οξυγόνου, όπως το OH·, αλλά και από μη ριζικά είδη όπως το H₂O₂. Πιο συγκεκριμένα, τα ROS οξειδώνουν διαφορετικά αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στον σχηματισμό διασυνδέσεων μεταξύ των πρωτεϊνών, στην μετουσίωση τους και στην απώλεια λειτουργίας τους. Άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι η απώλεια της ενζυματικής δραστηριότητας, της λειτουργίας υποδοχέων αλλά και η καταστροφή συστημάτων με πρωτεΐνες μεταφοράς.

Αμινοξέα που περιέχουν θείο είναι τα πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες και μετατρέπονται μετά από την προσβολή των ROS σε δισουλφίδια. Άλλοι δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών είναι η Ο-τυροσίνη που προκαλείται από την ρίζα υδροξυλίου και η 3-νιτροτυροσίνη που προκαλείται από δραστικές μορφές αζώτου. (Phaniendra A. et al 2014)

1.1.6.3 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στο DNA

Τόσο τα ROS όσο και τα RNS μπορούν να βλάψουν οξειδωτικά το DNA. Η ρίζα υδροξυλίου OH έχει την ικανότητα να αντιδρά άμεσα με όλα τα συστατικά του DNA, όπως οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης προκαλώντας σοβαρές αλλαγές. Τέτοιες αλλαγές αφορούν μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις των αλυσιδών του DNA, διασταρούμενη σύνδεση DNA/DNA ή DNA/πρωτεΐνης και πολλές τροποποιήσεις βάσεων. Για παράδειγμα, η γουανίνη αποτελεί μία βάση που προσβάλλεται πολύ εύκολα από το οξειδωτικό στρες και μετατρέπεται σε 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) και σε 8-υδροξυγουανοσίνη (8-OHG).

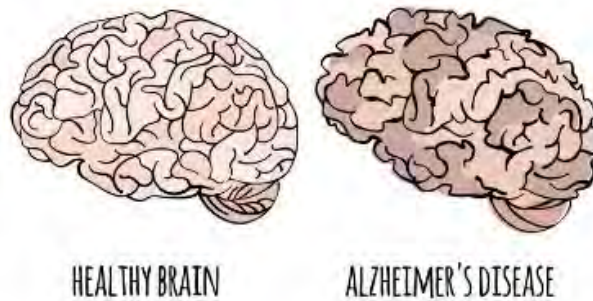
Από την άλλη πλευρά, τα RNS αντιδρούν με την γουανίνη και παράγονται η 8-νιτρογουανίνη και η 8-οξυδεοξυγουανοσίνη. Η 8-νιτρογουανίνη είναι ιδιαίτερα ασταθής και μπορεί να απομακρυνθεί γρήγορα είτε να συζευχθεί με αδενίνη κατά την σύνθεση του DNA, το οποίο την καθιστά ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνο παράγοντα. (Wang X. et al, 2014)



Είκονα 11: Επίπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

1.2 Η νόσος Αλτσχάιμερ

Η νόσος Αλτσχάιμερ αποτελεί μία σύνθετη πολυπαραγοντική, προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια που αφορά τον γηραιότερο πληθυσμό και μάλιστα είναι η τέταρτη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως μεταξύ αυτού του πληθυσμού. Τα συχνότερα κλινικά χαρακτηριστικά αφορούν την απώλεια μνήμης και την γνωστική δυσλειτουργία των ασθενών.



Εικόνα 12: Σύγκριση εγκεφάλου απόμων φυσιολογικών με ασθενείς της νόσου Αλτσχάιμερ

1.2.1 Ιστορία της νόσου Αλτσχάιμερ



Εικόνα 12: Alois Alzheimer

Η ανακάλυψη της νόσου ως νευροεκφυλιστική ασθένεια αποδίδεται στον γερμανό νευρολόγο και ψυχίατρο Alois Alzheimer το 1907. Ο Alois Alzheimer εξέτασε μια 51χρονη γυναίκα, η οποία παρουσίαζε απώλεια μνήμης και της ικανότητας να εκτελεί καθημερινές δραστηριότητες, αποπροσανατολισμό και παραισθήσεις. Η αυτοψία που έγινε μετά τον θάνατό της αποκάλυψε ατροφία του φλοιού του εγκεφάλου της σε συνδυασμό με πλάκες και σωρούς, που δεν μπορούσε να εξηγήσει αλλά πείστηκε ότι δεν πρόκειται για μία τυπική άνοια αλλά για κάτι σοβαρότερο. Έτσι δημοσίευσε μια ερευνητική εργασία με τίτλο <<Νόσος του Αλτσχάιμερ>> σε ένα συνέδριο ψυχιατρικής της Γερμανίας.

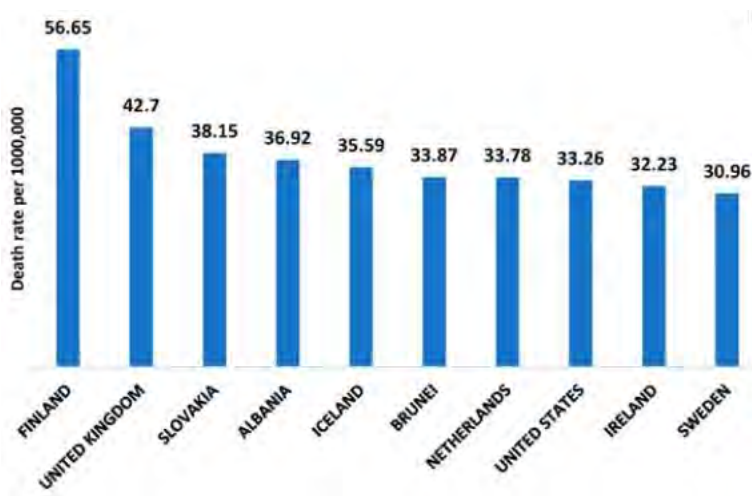
Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1980, ερευνητές βασίστηκαν στα ευρήματα του Alzheimer και ανακάλυψαν πως οι πλάκες και οι σωροί αναφέρονταν σε βήτα αμυλοειδείς πλάκες και νευροινιδικούς σωρούς tau αντίστοιχα.

Βέβαια, αν και έχουν περάσει πολλά χρόνια από την ανακάλυψη της νόσου υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα τόσο για την αιτιολογία της νόσου όσο και για τις θεραπευτικές μεθόδους που

πρέπει να εφαρμοστούν για την αντιμετώπιση της κυρίως λόγω της διαφορετικής εξέλιξης της σε κάθε ασθενή. (McGirr S. et al,2020)

1.2.2 Επιδημιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Ο παγκόσμιος επιπολασμός της άνοιας εκτιμάται ότι είναι πάνω από 45 εκατομμύρια άνθρωποι. Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή αιτία άνοιας, υπεύθυνη για το 60-80% των περιπτώσεων. Η έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση είναι κρίσιμης σημασίας για την AD, καθώς αυτή η ασθένεια αποτελεί σημαντική ανησυχία για τη δημόσια υγεία στις Ηνωμένες Πολιτείες Υπολογίζεται ότι 5,8 εκατομμύρια Αμερικανοί ηλικίας 65 ετών και άνω πάσχουν από την νόσο , αριθμός που θα μπορούσε να αυξηθεί στα 13,8 εκατομμύρια έως το 2050. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ποσοστά θνησιμότητας από άνοια αυξάνονται ραγδαία από τη δεκαετία του 1990 και το ποσοστό θνησιμότητας έχει αυξηθεί από 10,49 θανάτους ανά 100.000 σε 20.98 θανάτους ανά 100.000 από το 1990 έως το 2019.(Sehar U. Et al 2022)



Εικόνα 13: Οι δέκα πρώτες χώρες με τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου λόγω άνοιας σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας το 2020

1.2.3 Συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι πολυπαραγοντική και νευροεκφυλιστική ασθένεια που προκύπτει από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις της γενετικής, της ηλικίας και του περιβάλλοντος. Η νόσος

επηρεάζει την συμπεριφορά, την σκέψη και την μνήμη σε ηλικιωμένα άτομα. Σε πρώιμα στάδια παρατηρούνται η αποτυχία εύρεσης λέξεων, η μειωμένη λογική κρίση αλλά και νευροψυχιατρικά χαρακτηριστικά όπως είναι η κατάθλιψη και η απάθεια σε διάφορους τομείς. Όσο η ασθένεια εξελίσσεται εμφανίζονται ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις αλλά και μια τάση επιθετικότητας τόσο λεκτική όσο και σωματική. Μάλιστα, παρουσιάζεται δυσκολία στην εκτέλεση καθημερινών δραστηριοτήτων και γίνονται πιο εμφανείς οι γνωστικές δυσκολίες. Όσοι επιβιώνουν μέχρι τα τελευταία στάδια της νόσου, ο θάνατος προκαλείται τις περισσότερες φορές από τις ίδιες τις συνεπείες της νόσου με μέσο όρο επιβίωσης των ατόμων 8 χρόνια από την διάγνωση. (McGirr S. et al 2020)

1.2.4 Στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ

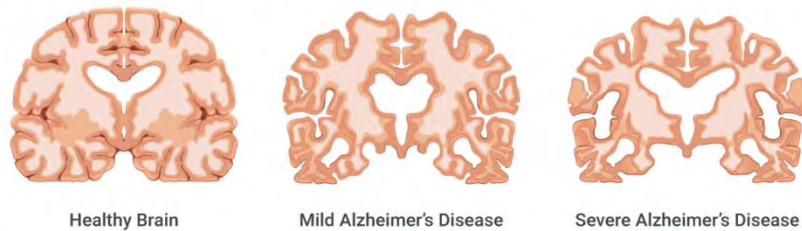
Η νόσος Αλτσχάιμερ χωρίζεται σε 3 φάσεις.

Η πρώτη φάση ονομάζεται “Προκλινική νόσος Αλτσχάιμερ” και οι ασθενείς δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα συμπτώματα και φέρονται φυσιολογικά με εξαίρεση κάποια ήπια γνωστικά χαρακτηριστικά. Βέβαια είναι σημαντικό στάδιο για τους ερευνητές προκειμένου να βρεθεί θεραπεία με στόχο την πρόληψη της εξέλιξης της νόσου από προκλινική εικόνα.

Η δεύτερη φάση ονομάζεται “Ήπια γνωστική εξασθένηση”. Στην φάση, αυτή, αρχίζουν οι ανησυχίες από το περιβάλλον του ατόμου καθώς εμφανίζονται οι δυσκολίες στην εκτελεστική ικανότητα, στον τρόπο ομιλίας και στην λογική του κρίση. Όμως, το άτομο ακόμη διατηρεί την ανεξαρτησία του.

Η φάση τρία ονομάζεται “ Στάδιο εκδήλωσης της νόσου Αλτσχάιμερ”. Στο τρίτο στάδιο παρουσιάζεται το γνωστό κλινικό σύνδρομο της άνοιας, το οποίο επηρεάζει τόσο την καθημερινότητα όσο και την συμπεριφορά του ατόμου και οι ασθενείς δεν είναι πλέον ανεξάρτητοι από το περιβάλλον τους. Πολλές φορές, έχουν το στάδιο είναι τόσο όψιμο που οδηγεί και στον θάνατο. (James M. et al 2023)

Progression of Alzheimer's Disease



Εικόνα 13: Τα τρία στάδια της νόσου Αλτσχάιμερ

1.2.5. Παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ

Παρά τα περισσότερα από 100 χρόνια που έχουν περάσει από την ανακάλυψη της νόσου, οι πολύπλοκοι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην παθοφυσιολογία της νόσου Αλτσχάιμερ δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου Αλτσχάιμερ μέχρι και σήμερα είναι οι πλάκες αμυλοειδούς και οι νευροϊνιδικοί σωροί.

Η παθογένεση του αμυλοειδούς αρχίζει με την διαφορετική διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), μιας ενσωματωμένης πρωτεΐνης στην μεμβράνη του πλάσματος από β-εκκριτάσες και γ-εκκριτάσες. Η γ-εκκριτάση αποτελεί μία ενδομεμβρανική πρωτεάση που αποτελείται από 4 πρωτεΐνες με τις δύο σημαντικότερες να είναι η πρεσενιλίνη 1 (PSEN1) και η πρεσενιλίνη 2 (PSEN2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αδιάλυτων και τοξικών θραυσμάτων $A\beta$ ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$), συσσωματώνονται και δημιουργούν τις πλάκες αμυλοειδούς. Μάλιστα, η συσσωμάτωση συμβάλλει στην επιδείνωση της υγείας των νευρώνων και τελικά στον θάνατο των νευρωνικών κυττάρων.

Το δεύτερο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η νευροϊνιδικοί σωροί (Neurofibrillary tangles-NFTs) στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη tau συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους και έχει ως ρόλο την σταθεροποίηση τους και τον σχηματισμό ενός σταθερού δικτύου. Η πρωτεΐνη tau γίνεται παθολογική όταν η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της γίνεται ανεξέλεγκτη με αποτέλεσμα οι υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες tau να πολυμερίζονται σε

νήματα και να δημιουργούνται νευροϊνιδικοί σωροί. Αυτό οδηγεί σε δυσλειτουργία των δομικών και ρυθμιστικών δράσεων του κυτταροσκελετού και στη συνέχεια σε ανώμαλη μορφολογία, μεταφορά και συναπτική λειτουργία των νευρώνων, οδηγώντας έτσι στον νευροεκφυλισμό τους. (Scheltens P. et al, 2021)

Η πρόοδος στην γενετική έρευνα έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα της ύπαρξης αυτοσωμικών επικρατών μεταλλάξεων στα γονίδια APP, PSEN1, PSEN 2 που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 21, 14 και 1 αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις στο PSEN1 αντιπροσωπεύουν το 81% των περιπτώσεων, στο PSEN2 το 6% και στο APP περίπου το 14%. (Liu P. et al, 2019)

1.2.6 Υποθέσεις για την νόσο Αλτσχάιμερ

Πολλές υποθέσεις έθεσαν τα θεμέλια για την κατανόηση της αιτιολογίας της νόσου Αλτσχάιμερ.

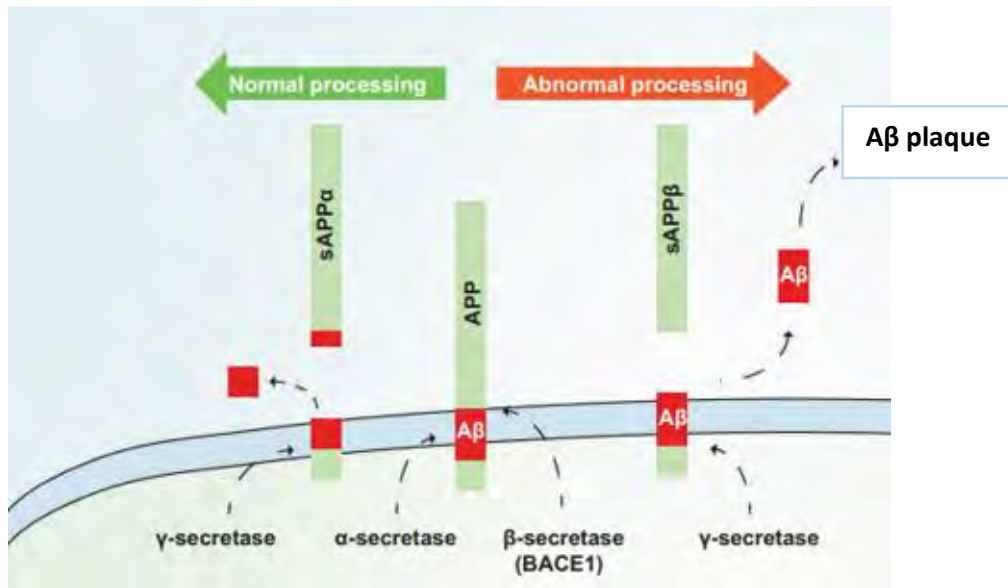
1.2.6.1 Χολινεργική υπόθεση

Αυτή η αιτιολογία της νόσου είναι από τις παλαιότερες υποθέσεις και προτάθηκε από τους Peter Davies και A.J.F. Maloney το 1974. Βασίζεται στο γεγονός ότι ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης (βασικό ένζυμο στην σύνθεση ακετυλοχολίνης) και της ακετυλοχολινεστεράσης στον εγκεφαλο και συγκεκριμένα στην αμυγδαλή, τον ιππόκαμπο και τον φλοιό σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. (Sagar H. et al, 2015)

Ο μεταθανάτιος εγκεφαλικός ιστός από ασθενείς επιβεβαίωσε την μειωμένη δραστηριότητα της οδού των νευροδιαβιβαστών αποκαλύπτοντας ότι ο εκφυλισμός των χολινεργικών νευρώνων και η απώλεια της χολινεργικής νευροδιαβίβασης συμβάλλουν σημαντικά στην γνωστική εξασθένηση που παρατηρείται στους ασθενείς. (McGirr S. et al, 2020)

1.2.6.2 Υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς

Η υπόθεση του σηματοδοτικού μονοπατιού του αμυλοειδούς αφορά την ευρέως αποδεκτή υπόθεση για την παθογένεση της νόσου Αλτσχάιμερ και προτάθηκε από τον John Hardy και τον David Allsop το 1991. (Sagar H. et al, 2015)



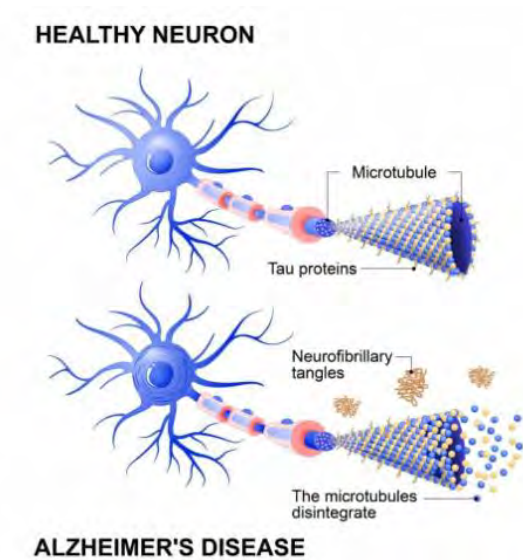
Εικόνα 13: Σχηματισμός Αβ αμυλοειδών πλακών

Αύτη η θεωρία βασίζεται στην ιδέα ότι η υπερπαραγωγή ή η μειωμένη απομάκρυνση των αμυλοειδών βήτα πεπτιδίων (Αβ) οδηγεί στην αυξημένη εναπόθεση τους και στην δημιουργία των αμυλοειδών πλακών προκαλώντας νευρωνική βλάβη. Το αδιάλυτο Αβ δημιουργείται από την διάσπαση της APP μέσω της β- και γ-εκκριτάσης. Οι δύο κύριοι τύποι αμυλοειδών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία είναι το Αβ40 και το Αβ42. Αύτα συσσωματώνονται σε αμυλοειδείς πλάκες και προκαλούν προβλήματα όπως η απελευθέρωση κυτοκίνης, φλεγμονώδη απόκριση, απώλεια συνάψεων και νευρωνικό θάνατο και τέλικά βαριά εγκεφαλική ατροφία. (McGirr S. et al, 2020)

1.6.2.3 Υπόθεση της πρωτεΐνης tau

Οι ενδοκυτταρικοί νευροϊνιδικοί σωροί NFTs είναι ένα σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου Αλτσχάιμερ και ουσιαστικά περιέχουν υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες tau. Οι tau ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που δεσμεύουν μικροσωληνίσκους και είναι ετερογενείς σε μοριακό βάρος. Ως βασική λειτουργία έχουν την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων.

Η συσσώρευση της πρωτεΐνης tau θεωρείται ότι προκαλείται από την αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων που δρουν στην tau, που ονομάζονται κινάσες tau. Οι κινάσες που δρουν στην tau προκαλούν αυξημένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να αναγκάζονται να αναδιπλώνονται εσφαλμένα, σχηματίζοντας νευροϊνιδικούς σωρούς NFTs. (Liu P. et al, 2019)



Εικόνα 14: Απεικόνιση των NFTs

1.2.6.4 Υπόθεση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση που προκαλείται από ανισσοροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών σε ένα βιολογικό σύστημα. Ο εγκέφαλος καταναλώνει μεγάλη

ποσότητα οξυγόνου για να λειτουργήσει σωστά με αποτέλεσμα να παράγει μεγάλη ποσότητα ελευθέρων ριζών. Το παραπάνω γεγονός σε συνδυασμό με την ανεπαρκή παρουσία του αντιοξειδωτικού συστήματος στον εγκέφαλο οδηγεί στην συσσώρευση διαφόρων δεικτών οξειδωτικής βλάβης σε σημαντικά βιομόρια προκαλώντας νευροεκφυλισμό και την γήρανση του εγκεφάλου, στοιχεία που παρουσιάζονται στην νόσο Αλτσχάιμερ. (Navaro N. et al 2010)

1.3 Οξειδωτικό στρες και νόσος Αλτσχάιμερ

Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί ως μια από τις πιθανές κοινές αιτιολογίες σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και μη. Υπάρχει πλέον πλούσια βιβλιογραφία με στοιχεία για την συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην παθοφυσιολογία τέτοιων διαταραχών υγείας. Η παραγωγή ROS λαμβάνει χώρα σε διάφορες θέσεις μέσα στο κύτταρο με την σημαντικότερη να είναι τα μιτοχόνδρια. Όταν υπάρχει μεγάλη αύξηση των ROS τότε έχουμε έναρξη της κατάστασης του οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα να εμφανίζονται επιβλαβείς επιδράσεις στις πρωτείνες, στα λιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα. Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει πολύ περισσότερο τον εγκέφαλο λόγω της μεγάλης ποσότητας ROS και PUFA και έτσι έχουμε καταστροφική επίδραση στους νευρώνες και στην συνέχεια την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως το Αλτσχάιμερ. (Singh A. et al, 2019)

Αρκέτα στοιχεία δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται από νωρίς στην πορεία της νόσου Αλτσχάιμερ, το οποίο μπορεί να υποστηρίξει τον ρόλο του στην παθογένεση. Είναι γνωστό ότι η νόσος Αλτσχάιμερ παρουσιάζει μια αρχική περίοδο, κύριως τα δύο πρώτα στάδια, χωρίς την εμφάνιση ιδιαίτερων συμπτωμάτων. Σε αυτά τα άτομα, έχει βρεθεί ότι εμφάνισαν σημαντική οξειδωτική ανισορροπία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα παρόμοιας ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, είχαν αυξημένη υπεροξειδωση και τροποποίηση πρωτεϊνών στον ιππόκαμπο. όπου είναι σημαντική περιοχή για την εξέλιξη της νόσου. (Wang X. et al, 2014)

Άλλα ευρήματα από μελέτες δείχνουν ότι σχεδόν όλες οι πτυχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας έχουν αναφερθεί ότι είναι εξασθενημένες στην νόσο Αλτσχάιμερ. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή οξειδωτικού στρες επειδή είναι αναπόφευκτη η διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έτσι, προκαλείται μια συνεχής παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι ερευνητές

θεωρούν ότι τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια είναι λιγότερο αποτελεσματικοί παραγωγοί ATP και πιο αποτελεσματικοί παραγωγοί ROS αντιπροσωπεύοντας μια κύρια πηγή οξειδωτικής ανισορροπίας που παρατηρείται στην νόσο Αλτσχάιμερ.(*Castellani R.et al ,2002*)

Τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες παρατηρείται στην νόσο Αλτσχάιμερ συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

1.Αυξημένη οξείδωση πρωτεϊνών στον εγκέφαλο
2.Αυξημένη οξείδωση των λιπιδίων
3.Αρνητική επίδραση στην λειτουργία των μιτοχονδρίων
4.Αυξημένη οξείδωση μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA
5.Μεταβολές στην ομοιόσταση μετάλλων,όπως ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος

Πίνακας 2:στοιχεία οξειδωτικού στρες στην νόσο Αλτσχάιμερ

(*Cheignon C.et al 2017*)

1.3.1 Οξείδωση πρωτεϊνών στην νόσο Αλτσχάιμερ

Οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που προκύπτουν είτε από άμεση προσβολή των ROS είτε από προϊόντα αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες όπως ας πούμε με υπεροξειδωμένα λιπίδια έχουν αναφερθεί σε μεγάλο βαθμό στην νόσο Αλτσχάιμερ.Οι πιο διαδεδομένοι δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η 3-νιτροτυροσίνη.Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ανιχνεύθηκαν στην περιοχή του ιππόκαμπου και στον βρεγματικό φλοιό ,δηλαδή σε περιοχές του εγκεφάλου που συμμετέχουν περισσότερο στην νόσο Αλτσχάιμερ.Η 3-νιτροτυροσίνη,που αποτελεί προϊόν της αντίδρασης RNS και τυροσίνης,βρέθηκε επίσης σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου ασθενών όπως και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. (*Wang X.et al ,2014*)

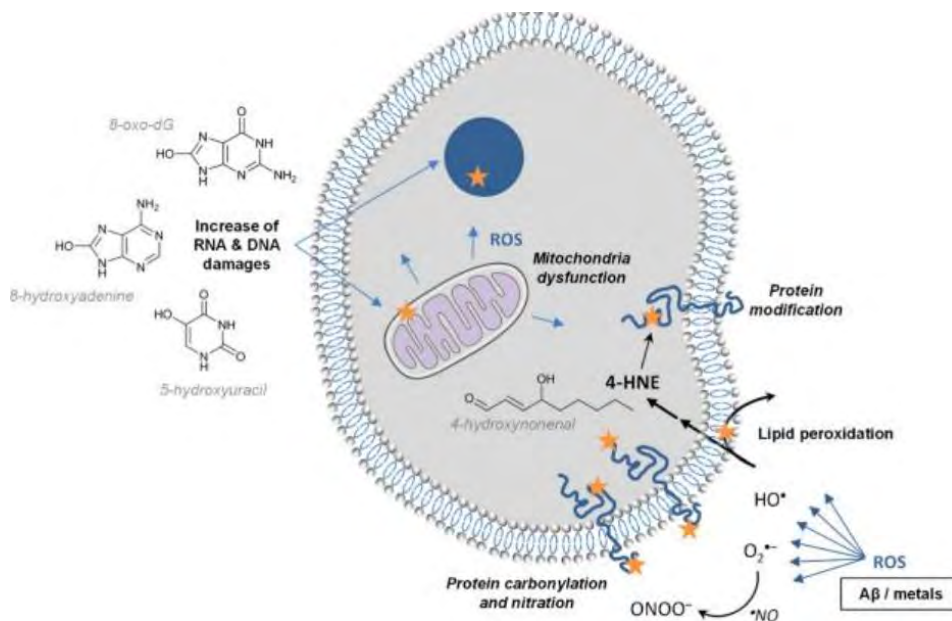
1.3.2 Οξείδωση λιπιδίων στην νόσο Αλτσχάιμερ

Όπως είναι γνωστό, η υπεροξείδωση λιπιδίων αφορά στην διαδικασία όπου τα λιπίδια προσβάλλονται από ROS μέσω ενός μηχανισμού αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με έρευνες, έχουν βρεθεί σε σημαντικές περιοχές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος μεγάλες συγκεντρώσεις 4-HNE. Μάλιστα, αυτό το προϊόν είναι ικανό να αλληλεπιδράσει με πολλές μεμβρανικές πρωτείνες και να αλλοιώσει την δομή και την λειτουργία τους προκαλώντας νευροτοξικότητα στους ασθενείς. Άλλα ευρήματα δείχνουν αυξημένη παρουσία της MDA και της ακρολεΐνης τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στον κροταφικό φλοιό ατόμων που νοσούν από Αλτσχάιμερ. (Wang X. et al 2014)

1.3.3 Οξείδωση DNA στην νόσο Αλτσχάιμερ

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει σοβαρά θραύσματα στις αλυσίδες του DNA προκαλώντας τροποποιήσεις. Υψηλά επίπεδα σπασίματος DNA ανιχνεύθηκαν στον ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό φλοιό ατόμων με νόσο Αλτσχάιμερ. (Anderson A. et al, 1996)

Επιπλέον, η 8-υδροξυδεοξυγουανোসίνη (8-OHdG) και η 8-υδροξυγουανোসίνη (8-OHG) που αποτελούν δύο από τους πιο ευρέως γνωστούς οξειδωτικούς δείκτες βρέθηκαν σε πολυ αυξημένη συγκέντρωση τόσο στο μιτοχονδριακό όσο και στο πυρηνικό DNA ασθενών σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα παρόμοιας ηλικίας που έγινε η σύγκριση. (Lyras L. et al, 1997)



Εικόνα 13: Οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων στην νόσο Αλτσχάιμερ

1.3.4 Αλληλεπίδραση Αβ πεπτιδίων και ROS

Έρευνες έχουν δείξει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης των Αβ πεπτιδίων με την ομάδα των ROS. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι όχι μόνο τα ROS μπορούν να ρυθμίσουν την παραγωγή και την έκκριση του Αβ αλλά και το Αβ με την σειρά του έχει την ικανότητα να προκαλέσει την υπερβολική παραγωγή ROS. Μια αυξημένη έκφραση της APP επιτυγχάνει μια μεγαλύτερη παραγωγή των Αβ πεπτιδίων και αυτό οδηγεί στην ενίσχυση της παραγωγής των ROS αλλά στην μείωση της παραγωγής ATP από τα μιτοχόνδρια.

Όσον αφορά την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, φαίνεται πως σε μεγάλο βαθμό οφείλεται στα Αβ πεπτίδια. Τα Αβ πεπτίδια είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν με την αφυδρογονάση της αλκοόλης (ABAD) που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια προκαλώντας διαρροή ROS και μιτοχονδριακή βλάβη. Εκτός από την ABAD, τα πεπτίδια Αβ μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά μιτοχονδριακά ένζυμα, να προκαλέσουν την αναστολή των συμπλόκων που συμμετέχουν στην αλυσίδα

μεταφοράς ηλεκτρονίων έχοντας ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων ATP. Έτσι, έχουμε έναν φαύλο κύκλο θετικής ανατροφοδότησης μεταξύ των πεπτιδίων Αβ και των ROS, ο συνδυασμός των οποίων οδηγεί σε ενισχυμένο νευροεκφυλισμό. (Wojda U. et al, 2018)

1.3.5 Η έννοια των αντιοξειδωτικών

Ο οργανισμός προκειμένου να ανιχνεύσει και να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες έχει δημιουργήσει ένα σύστημα μηχανισμών άμυνας. Σε αυτό το σύστημα μηχανισμών άμυνας περιλαμβάνεται ο κύκλος οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης, η καταλάση και η δισμουτάση του υπεροξειδίου.

Το πιο διαδεδομένο αντιοξειδωτικό στα κύτταρα είναι η γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να αντιδρά με ελεύθερες ρίζες και να σχηματίζεται το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG). Αυτό το επιτυγχάνει είτε ανεξάρτητα ως GSH είτε μέσω της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR) είναι εκείνη που επαναφέρει ξανά την γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή. Η αναλογία GSH προς GSSG αποτελεί συχνά έναν χρήσιμο δείκτη του δυναμικού οξειδοαναγωγής των κυττάρων και του οξειδωτικού στρες ακόμη και στην ασθένεια του Αλτσχάιμερ.

Άλλο ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η οποία καταλύει την αντίδραση της ρίζας του υπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η SOD έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζει μείωση στους ασθενείς με την νόσο Αλτσχάιμερ σε όλα τα στάδια της εξέλιξής της.

Τέλος, η καταλάση είναι υπεύθυνη για την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς νερό και οξυγόνο. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί παρόμοια μείωση με την δισμουτάση του υπεροξειδίου στα διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου Αλτσχάιμερ.

2.ΣΚΟΠΟΣ

Η νόσος Αλτσχάιμερ αποτελεί μία εξαιρετικά πολύπλοκη και προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσο και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες περιπτώσεων άνοιας παγκοσμίως. Η αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών σε συνδυασμό με την αδυναμία των αντιοξειδωτικών συστημάτων προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο έχει πολύ επιβλαβείς επιδράσεις στα βιομόρια των κυττάρων. Έτσι, η συσσώρευση των οξειδωμένων βιομόριων επηρεάζει πολλές από τις λειτουργίες του κυττάρου και συμβάλλουν σημαντικά στον νευροεκφυλισμό. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Με τους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μπορεί να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των ατόμων. Οι δείκτες που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης, ουσίες που αντιδρούν με θεοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) και η εκτίμηση εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity).

3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

Σε αυτές τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ.Την χρονική στιγμή t_0 έγινε αιμοληψία και λήψη εγκεφαλονωτιαίο υγρού σε 127 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της ασθένειας και στη συνέχεια την χρονική στιγμή t_2 έγινε αιμοληψία και λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε 46 άτομα τα οποία όμως συμμετείχαν και στην χρονική στιγμή t_0 .

Για να εκτιμηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ερυθροκυττάρων προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.Για να αξιολογηθεί το οξειδωτικό στρες,προσδιορίστηκε η υπεροξειδωση των λιπιδίων με την χρήση ουσιών που μπορούν να αντιδράσουν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Για να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα έγινε υπολογισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας,της αναγωγικής ισχύς και έγινε προσδιορισμός της εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου.

3.2 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

➤ Αρχή της μεθόδου

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι η ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.Τα συστατικά μεταξύ τους διαφέρουν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση συνεισφέροντας περισσότερο ή λιγότερο στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος.

Το αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος μπορεί να αξιολογηθεί είτε με την ποσοτική μέτρηση των μεμονωμένων αντιοξειδωτικών μορίων είτε αξιολογώντας την συνολική δράση τους και την ολική αποτελεσματικότητά τους.

Η TAC υπολογίζεται με την χρήση του DPPH ή αλλιώς 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine. Το DPPH έχει την ικανότητα να ανάγεται και να σχηματίζει την αντίστοιχη υδραζίνη όταν υπάρχει ένας δότης υδρογόνων.

➤ Πειμαρικό Πρωτόκολλο

Η διεξαγωγή του πειράματος χρειάζεται ένα διάλυμα Phosphate Buffer 10mM (pH 7.4) ένα διάλυμα αραιού DPPH για βασικό αντιδραστήριο. Λόγω της φωτοευαισθησίας του DPPH είναι απαραίτητη η παρασκευή του την ημέρα του πειράματος. Για το πείραμα, αυτό, απαιτείται η χρήση erpendorfs στο καθένα απο τα οποία προστίθονται ποσότητες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

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

Πίνακας 3: Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC

Στην συνέχεια ακολουθεί ανάδευση σε vortex και μετά τα δείγματα επωάζονται στο σκοταδί για 60 λεπτά ωσπού να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 15000g στους 25 °C. Το τελευταίο βήμα αποτελεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 520nm.

➤ Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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 αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια

δ) Διαίρεση με το 1000 για να μετατραπούντα L πλάσματος σε ml ορού

3.3 Μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

➤ Αρχή της μεθόδου

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από το γλουταμινικό οξύ, την γλυκίνη και την κυστεΐνη. Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη στους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού και συνήθως βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή (GSH) αλλά συναντάται και με την οξειδωμένη της μορφή δισουλφιδίου (GSSG). Ο λόγος την οξειδωμένης προς την ανηγμένη γλουταθειόνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης οξειδωτικού στρες.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την οξείδωση της γλουταθειόνης από το διθειόδυο – νιτροβενζοϊκό οξύ DTNB και την παραγωγή του GSSG και 2- νιτρο - 5 – θειοβενζοϊκό οξύ.

➤ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Ως βασικό αντιδραστήριο σε αυτήν την πειραματική διαδικασία είναι το DTNB. Στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας απαιτείται ο καθαρισμός των δειγμάτων. Αυτός επιτυγχάνεται με την προσθήκη 100 μL δείγματος και 200 μL 5% TCA. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 5° C από όπου συλλέγεται το υπερκείμενο και προστίθεται σε νεά eppendorf.

Έπειτα, προστίθονται στα tubes οι ποσότητες των αντιδραστηρίων και του πλάσματος με βάση των παρακάτω πίνακα.

	Blank	Sample
Phosphate Buffet 400mM (pH 7.95)	700μL	700μL
TCA 10%	200μL	--
Πλάσμα	--	200μL
DNTB σε TRIS-HCL 40mM	100μL	100μL

Πίνακας 4 : Πειραματικό πρωτόκολλο για την μέτρηση ανηγμένης γλουταθειόνης

Για την συνέχεια ,πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων σε vortex και ύστερα γίνεται επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά.Η απορρόφηση των δειγμάτων γίνεται στα 412 nm.

➤ Υπολογισμοί

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

Πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογιστεί 1:1 αραίωση της λύσης των ερυθροκυττάρων και με 2* 1.3 για να συνυπολογιστεί η πρώτη (50μL αιμολύματος / 50μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390μL / 300μL ή 260μL / 200μL) που πραγματοποιήθηκαν απο το TCS 5%.Το 13.6 αποτελεί τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DTNB.

3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

➤ Αρχή της μεθόδου

Η περίσσεια των ελευθέρων ριζών δημιουργεί οξειδωτικό στρες το οποίο έχει πολλές επιπτώσεις στα βιομόρια.Μια από αυτές είναι ο σχηματισμός άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.Η μαλονδιαλδεΐδη είναι ένα προϊόν της διάσπασης τέτοιων ασταθών μορίων και μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασης της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.Με άλλα λόγια το θειοβαρβιτουρικό οξύ χρησιμοποιείται ως μέτρο έκφρασης της μαλονδιαλδεΐδης ,η οποία σχηματίζει μία ένωση με το TBARS με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς TBARS ½ σε μία φωτομετρική μέθοδο.

➤ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας απαιτείται η χρήση δύο Falcon για το τυφλό και δύο Falcon για κάθε δείγμα. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon προστίθονται 100μL πλάσματος και 100μL PBS για το τυφλό. Έπειτα, προστίθονται 500μL Tris-HCl και 500μL 35% TCA. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Μετά τα 10 λεπτά προστίθονται 1mL Na₂SO₄ – TBA και τα δείγματα τοποθετούνται στους 95°C για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο. Στην συνέχεια, τα Falcon μεταφέρονται στον πάγο για 5 λεπτά και μετά προστίθονται 1mL TCA 70% και πραγματοποιείται ανάδευση. Όταν τελειώσει η διαδικασία ανάδευσης μεταφέρεται 1mL δείγματος σε eppendorfs και γίνεται φυγοκέντρηση στα 11200g για 5 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 530nm.

➤ Υπολογισμοί

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

*οπου το 31 είναι συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από την διαίρεση του τελικού όγκου 3100μL με τον όγκο του πλάσματος 100μL. Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA.

3.5 Αναγωγική Ισχύς (Reducing Power Assay)

➤ Αρχή της μεθόδου

Μια μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η αναγωγική ισχύς. Τέτοιες ενώσεις είναι δότες ηλεκτρονίων που μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα που προέρχονται από την υπεροξειδίωση των λιπιδίων, έτσι ώστε να μπορούν να λειτουργούν ως πρωτογενή ή δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Στην μέθοδο, αυτή, το αρχικό αντιδραστήριο απο κίτρινο χρώμα μετατρέπεται σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική ισχύ των ουσιών, με την παρουσία των οποίων μετατρέπεται ο τρισθενής σίδηρος σε δισθενής.

➤ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται erpendorfs και προστίθονται ποσότητες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	Blank	Control	Sample
Πλάσμα	--	--	10 µL
Phosphate Buffer (0.2 M, pH 6.6)	500 µL	250 µL	240 µL
Potassium ferricyanide	--	250 µL	250 µL

Πίνακας 5 : Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος

Υστερα γίνεται επώαση στους 50°C για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη 700 µL από το υπερκείμενο σε νέα erpendorfs με βάση των παρακάτω πίνακα.

	Blank	Control	Sample
dH ₂ O	250 µL	250 µL	250 µL
Ferric chloride	50 µL	50 µL	50 µL

Πίνακας 6 : Πειραματικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος

Το επόμενο βήμα είναι η επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος η φωτομέτρηση τους στα 700nm.

➤ Υπολογισμοί

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

$$Mmol \text{ potassium ferricyanide} / ml = [\% Abs \text{ reduction} / 100] * 7.14 * 2.10 / 1000$$

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

β) Πολλαπλασιασμός με το 7.14 λόγω της συγκέντρωσης του potassium ferricyanide στην αντίδραση,

γ) Διαίρεση με το 1000 για να μετατραπούν τα L σε ml

3.6 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl radical scavenging activity)

➤ Αρχή της μεθόδου

Είναι γνωστό πως μία από τις πιο επικίνδυνες ρίζες που μπορεί να προκαλέσει επιβλαβή αποτελέσματα στα βιομόρια των κυττάρων είναι η ρίζα του υδροξυλίου. Επιπλέον, είναι ικανή να συνδεθεί με νουκλεοτίδια DNA δημιουργώντας θραύση της διπλής αλυσίδας, το οποίο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μεταλλαξιογένεση, κυτταροτοξικότητα ακόμα και καρκινογένεση. Στην διαδικασία, αυτή, ο προσδιορισμός της οξειδωμένης ρίζας υδροξυλίου γίνεται χρησιμοποιώντας δεοξυριβόζη.

➤ Πειραματικό Πρωτόκολλο

Προετοιμάζονται τα erpendorfs και προστίθενται οι ποσότητες σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	Blank	Control	Sample	Αρνητικός Μάρτυρας
Phosphate Buffer (0.2M , pH 7.4)	225 μ L	225 μ L	225 μ L	225 μ L
2- deoxyribose 1mM	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L
FeSO ₄ – EDTA 1-mM	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L
H ₂ O ₂ 10mM	--	75 μ L	75 μ L	--
dH ₂ O	375 μ L	300 μ L	290 μ L	365 μ L
Πλάσμα	--	--	10 μ L	10 μ L

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

Στην συνέχεια, ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά στους 37 ° C και προσθήκη 375 μL TCA 2.8 % και TBA 1 % σε όλα τα δείγματα. Ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά και αφού ψυχθούν , γίνεται φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 5 λεπτά. Τελευταίο βήμα αποτελεί η απορρόφηση των δειγμάτων στα 520 nm

➤ Υπολογισμοί

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

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

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

β) Πολλαπλασιασμός με το 0.25 % λόγω της συγκέντρωσης της δεοξυριβόζης,

γ) Πολλαπλασιασμός με το 150,

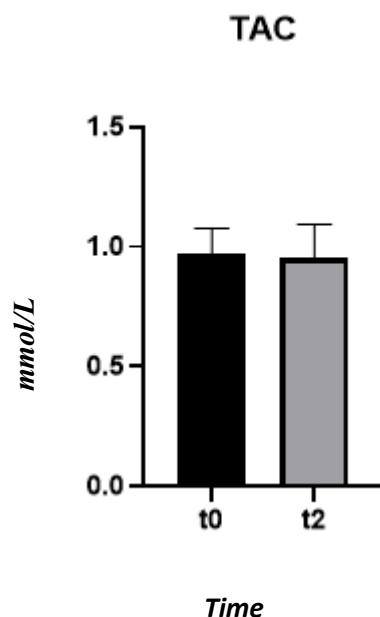
δ) Διαίρεση με το 1000 για την μετατροπή των L σε ml

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 127 άτομα τα οποία είχαν υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ με στόχο την αξιολόγηση των δεικτών οξειδωτικού στρες. Αρχικά, έγινε λήψη αίματος από το σύνολο των 127 ατόμων την χρονική στιγμή t_0 . Δύο χρόνια μετά, την χρονική στιγμή t_2 έγινε αιμοληψία σε 46 άτομα από τα 127 που συμμετείχαν στην πρώτη φάση. Σε όλα τα δείγματα και των δύο φάσεων μετρήθηκαν οξειδοαναγωγικοί δείκτες για να εκτιμηθεί αργότερα η οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Αυτοί οι δείκτες ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η αναγωγική ισχύς και ο προσδιορισμός της εξουδετέρωσης ρίζας υδροξυλίου.

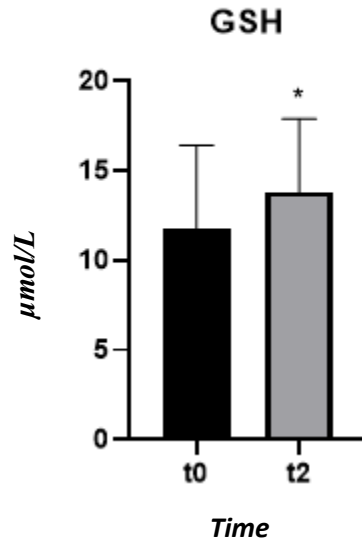
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα του κάθε δείκτη ξεχωριστά την χρονική στιγμή t_0 και την χρονική στιγμή t_2 .

Όπως διακρίνεται στο Σχήμα 1 τα επίπεδα του δείκτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών δεν παρουσιάζουν σχεδόν καμία διαφορά.



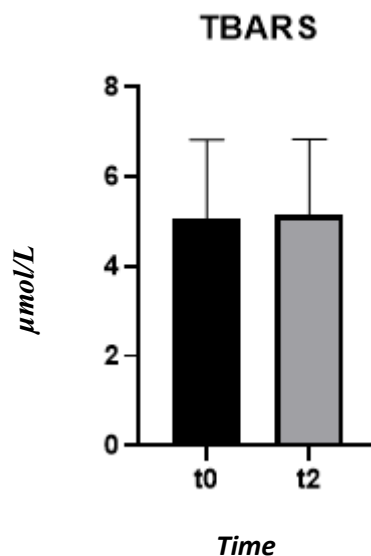
Σχήμα 1 :Επίπεδα mmol του DPPH που απομακρύνθηκε ανά mg ολικής πρωτεΐνης για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Όσον αφορά τα επίπεδα του δείκτη της ανηγμένης γλουταθειόνης βρέθηκε σημαντική αύξηση στην χρονική στιγμή t_2 σε σχέση με την t_0 .



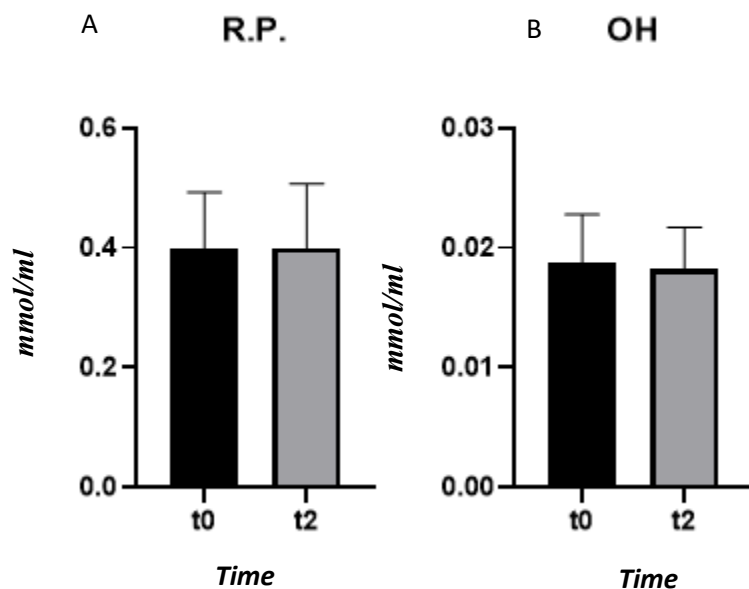
*Σχήμα 2 :Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε μονάδες $\mu\text{mol/L}$ ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα στις χρονικές στιγμές t_0 και t_2 . (Το σύμβολο * χαρακτηρίζει την σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου))*

Στην περίπτωση των TBARS ,που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες δεν παρουσιάστηκε κάποια σημαντική διαφορά στις δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές t_0 και t_2 .



Σχήμα 3:Επίπεδα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (TBARS) σε μονάδες $\mu\text{mol/L}$ ολικής πρωτεΐνης τις χρονικές στιγμές t_0 και t_2 . (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου)

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος και της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Όπως μπορεί να δει κανείς τα επίπεδα και των δύο δεικτών δεν είχαν κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές.



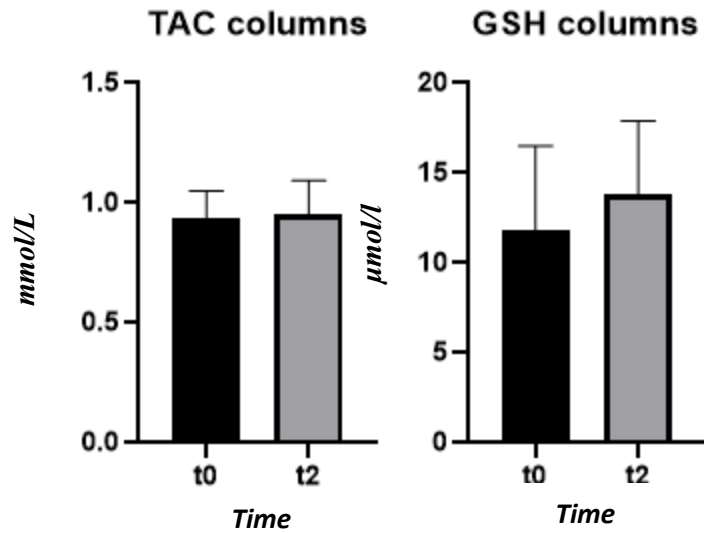
Σχήμα 4:

A) Επίπεδα της αναγωγικής ισχύος (R.P) σε μονάδες mmol/ml) τις χρονικές στιγμές t_0 και t_2 .

B) Επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου σε μονάδες mmol/ml) τις χρονικές στιγμές t_0 και t_2 .

Στην επόμενη φάση, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μόνο των 46 ατομών που έλαβαν μέρος και στις δύο αιμοληψίες που έγιναν την χρονική στιγμή t_0 και την χρονική στιγμή t_2 .

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα για τον δείκτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και για τον δείκτη της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). Όπως φαίνεται και στις δύο περιπτώσεις δεν υπήρξε κάποια αξιολογήσιμη διαφορά ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές, αν και στην περίπτωση της GSH εμφανίστηκε μία μικρή αύξηση.

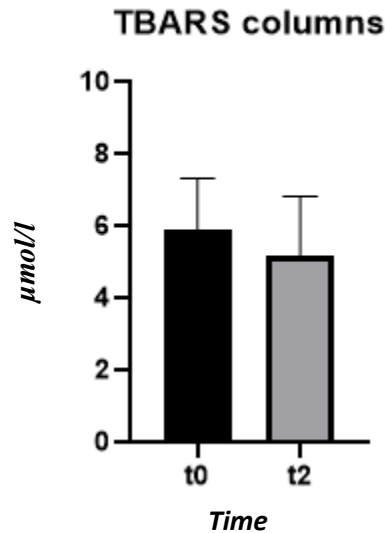


Σχήμα 5:

A) Επίπεδα mmol του DPPH που απομακρύνθηκαν ανά L πρωτεΐνης για τον προσδιορισμό της TAC

B) επίπεδα της GSH σε μονάδες μmol/L ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα στις δύο χρονικές στιγμές

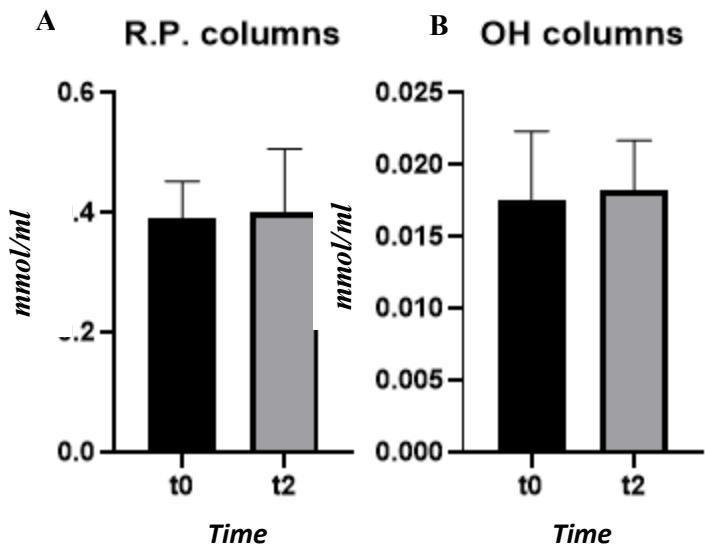
Στην περίπτωση των TBARS ,τα επίπεδα τους παρουσίασαν μία μικρή πτώση ,η οποία όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί στατικά σημαντική.



Σχήμα 6 :

Επίπεδα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων σε μονάδες μmol/L ολικής πρωτεΐνης στα 20 άτομα που συμμετείχαν στην λήψη αίματος και των δύο χρονικών στιγμών

Όσον αφορά,τα επίπεδα της αναγωγικής ισχύος (R.P) και τα επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις μία πολύ μικρή αύξηση χωρίς να αποτελεί όμως στατιστικά σημαντικό εύρημα.

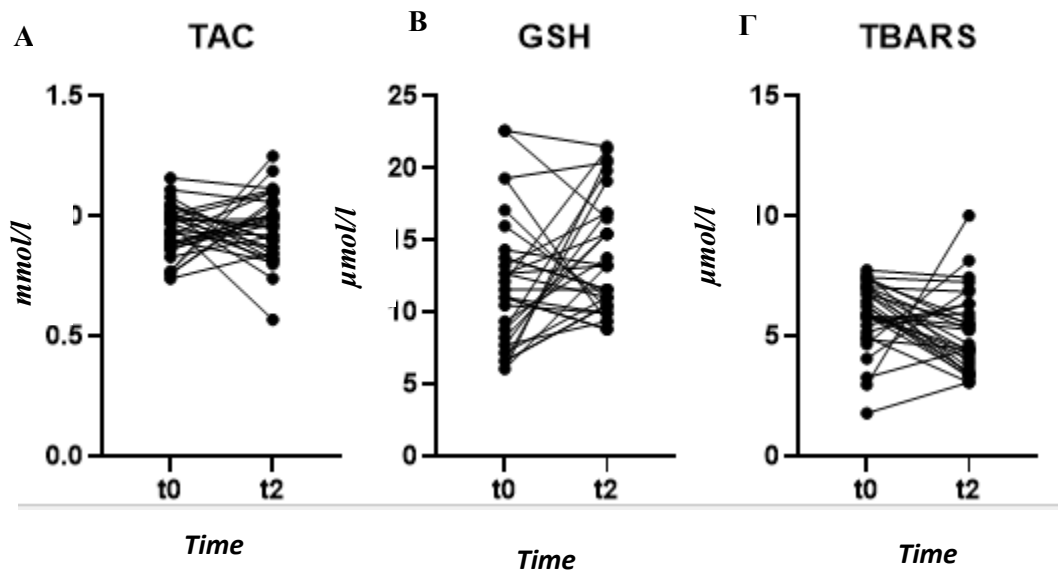


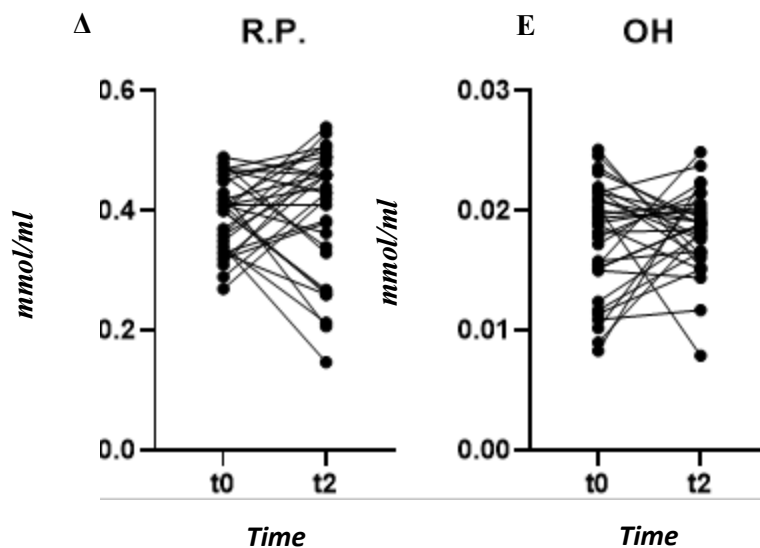
Σχήμα 7 :

A) Επίπεδα της αναγωγικής ισχύς (R.P) σε μονάδες mmol/L

B) Επίπεδα της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (OH) σε μονάδες mmol/ml

Παρακάτω μπορεί κανείς να δει για καθένα δείκτη ξεχωριστά τις μεταβολές που παρουσιάσαν τα επίπεδα όλων των δεικτών οξειδοαναγωγής των 20 ατόμων που έλαβαν μέρος και στις δύο αιμοληψίες τις χρονικές στιγμές t₀ και t₂.



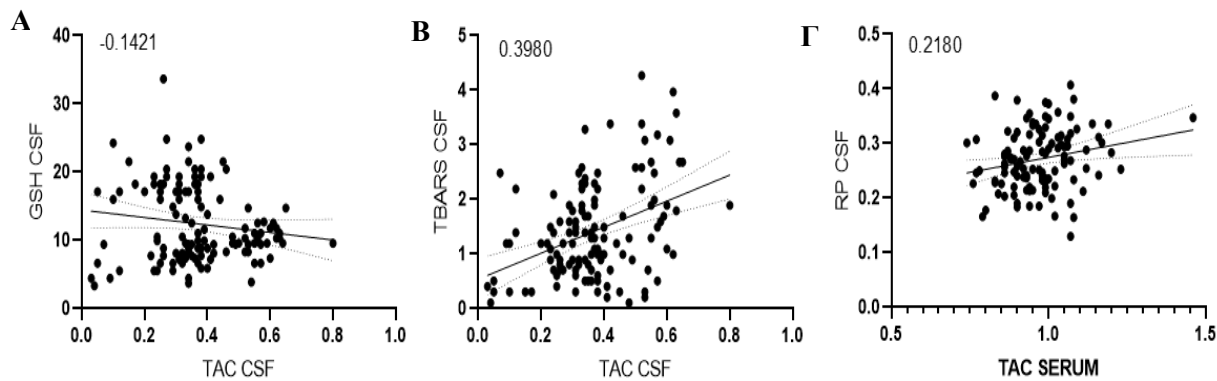


Σχήμα 8: Μεταβολές των επιπέδων των δεικτών οξειδοαναγωγής ξεχωριστά των 20 ατόμων που συμμετείχαν στις αιμοληψίες στις δύο χρονικές στιγμές.

A) Μεταβολή των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), B) Μεταβολή των επιπέδων για την ανηγμένη γλουταθειόνη, Γ) Μεταβολή των επιπέδων για τον δείκτη TBARS Δ) Μεταβολή των επιπέδων για τον δείκτη της αναγωγικής ισχύος (Reducing Power) E) Μεταβολή των επιπέδων για τον δείκτη της ρίζας του υδροξυλίου

Στην συνέχεια, στο Σχήμα 9 και στο Σχήμα 10 απεικονίζεται η σύγκριση των τιμών των δεικτών οξειδοαναγωγής μεταξύ τους τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό όσο και στο πλάσμα από όλα τα άτομα που ελάβαν μέρος στην συγκεκριμένη έρευνα.

Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται στο διάγραμμα A ο τρόπος μεταβολής της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε σχέση με τον δείκτη ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Όπως φαίνεται, όσο αυξάνεται η τιμή της GSH τόσο μειώνεται η τιμή της TAC, όμως ο συντελεστής συσχέτισης Pearson είναι ίσος με -0.1421 που σημαίνει πως το αποτέλεσμα, αυτό, δεν είναι στατικά σημαντικό για να μπορεί να υπάρξει ένα έγκυρο συμπέρασμα. Στο διάγραμμα B μπορεί να δει κανείς πως όσο αυξάνεται η τιμή των TBARS στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τόσο αυξάνεται αντίστοιχα και η τιμή της TAC στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Παρακάτω στο διάγραμμα Γ, όπου παρουσιάζεται η σχέση της τιμής της αναγωγικής ισχύος (Reducing Power) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την TAC στο πλάσμα, φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η μία τόσο αυξάνεται και η άλλη τιμή. Βέβαια, σε αυτές τις περιπτώσεις λόγω της χαμηλής τιμής του συντελεστή Pearson το συμπέρασμα δεν είναι έγκυρο.



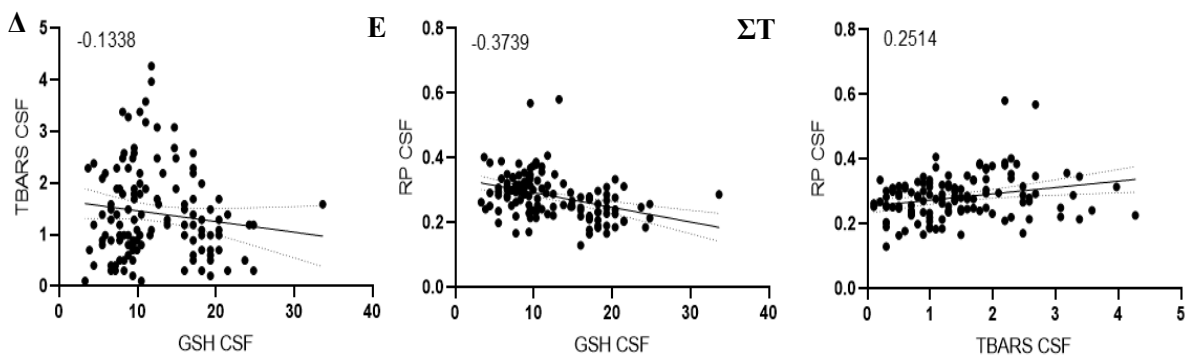
Σχήμα 9:

A: μεταβολή της τιμής της *GSH* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής της *TAC* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με συντελεστή *Pearson* -0.1421

B: μεταβολή της τιμής των *TBARS* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής της *TAC* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με συντελεστή *Pearson* 0.3980

Γ: μεταβολή της τιμής της *RP* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής της *TAC* στο πλάσμα με συντελεστή *Pearson* 0.218

Στο διάγραμμα Δ και στο διάγραμμα Ε φαίνονται η σχέση της μεταβολής της τιμής των *TBARS* με την μεταβολή της τιμής της *GSH* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και η σχέση της μεταβολής της τιμής της αναγωγικής ισχύος με την *GSH* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αντίστοιχα. Οι σχέσεις των τιμών, αυτών, είναι αντιστρόφως ανάλογες. Αναλυτικότερα, όσο αυξάνονται τα επίπεδα της μίας τιμής τόσο μειώνονται της άλλης και το αντίστροφο. Η τιμή του συντελεστή *Pearson*, όμως, είναι αρκετά χαμηλή στα διαγράμματα Δ και Ε (-0.1138 και -0.03739 αντίστοιχα), άρα η συσχέτιση δεν μπορεί να είναι έγκυρη με βεβαιότητα. Στο τελευταίο διάγραμμα ΣΤ παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής της αναγωγικής ισχύος σε σχέση με την μεταβολή της τιμής των *TBARS* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Οι δύο δείκτες μεταξύ τους παρουσιάζουν μία ανάλογη σχέση με την τιμή του συντελεστή *Pearson* να είναι ίση με 0.2514 γεγονός που δεν το καθιστά σίγουρο συμπέρασμα.



Σχήμα 10:

Α: μεταβολή της τιμής των *TBARS* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής της *GSH* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με συντελεστή Pearson -0.1338

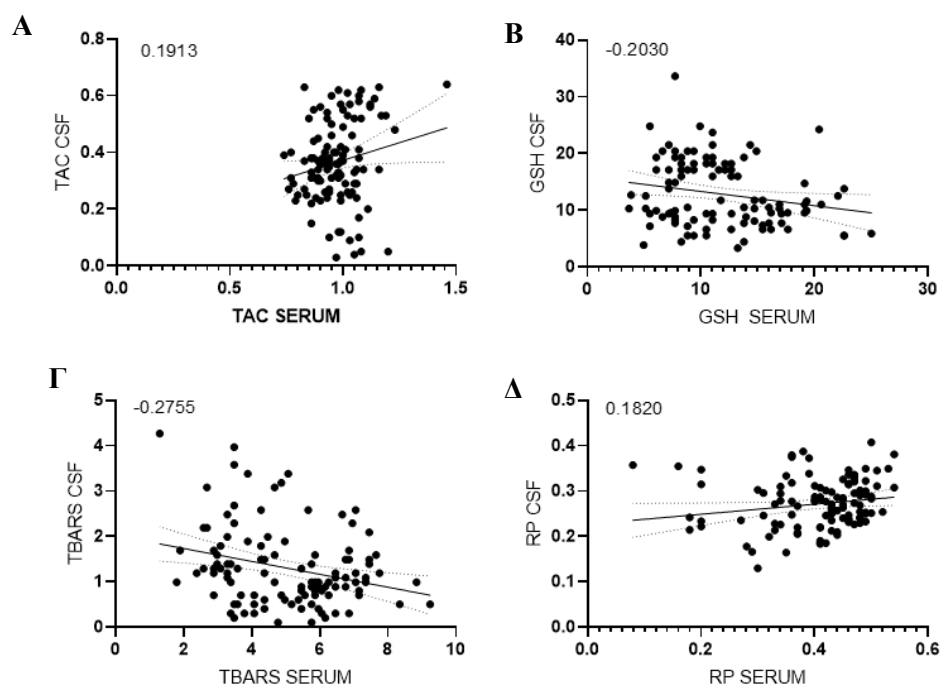
Ε: μεταβολή της τιμής της *RP* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής της *GSH* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με συντελεστή Pearson -0.3739

ΣΤ: μεταβολή της τιμής της *RP* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με την μεταβολή της τιμής των *TBARS* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με συντελεστή Pearson 0.2514

Στην τελευταία φάση των αποτελεσμάτων, έγινε σύσχετιση των τιμών του κάθε οξειδοαναγωγικού δείκτη ξεχωρίστα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα όλων των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη.

Στο διάγραμμα Α φαίνεται η συσχέτιση των τιμών του δείκτη ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μεταξύ του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του πλάσματος και σύμφωνα με τον χαμηλό συντελεστή Pearson που είναι ίσος με 0.1913 όσο αυξάνεται ή μειώνεται η τιμή της μίας τιμής τόσο αυξάνεται ή μειώνεται η τιμή της άλλης αντίστοιχα χωρίς να είναι έγκυρο. Στο διάγραμμα Β απεικονίζεται η σχέση της τιμής του δείκτη της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρο και στο πλάσμα. Η τιμή του συντελεστή Pearson που είναι -0.2030 αντικατοπτρίζει την αντιστρόφως ανάλογη σχέση που έχουν, η οποία δεν είναι αξιολογήσιμη ούτε σε αυτήν την περίπτωση. Στο διάγραμμα Γ, φαίνεται η συσχέτιση της τιμής του δείκτη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα. Για τις τιμές των TBARS, λοιπόν των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα φαίνεται πως όσο αυξάνεται η τιμή των TBARS στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τόσο μειώνεται η τιμή των TBARS στο πλάσμα και αντίστροφα. Λόγω του χαμηλού αριθμού του συντελεστή Pearson (τιμή -0.2755) δεν μπορεί κανείς να πει ότι η σχέση

αυτή ισχύει με βεβαιότητα. Τέλος, στο διάγραμμα Δ, όπου απεικονίζεται η συσχέτιση της μεταβολής του δείκτη της αναγωγικής ισχύς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με το πλάσμα, με συντελεστή Pearson να έχει τιμή 0.1820. Η τιμή, αυτή, αφού είναι θετική υποδηλώνει πως όσο αυξάνεται η τιμή του ενός τόσο αυξάνεται η τιμή του άλλου αλλά δεν μπορεί να υπάρξει ένα έγκυρο συμπέρασμα.



Σχήμα 11:

A: η συσχέτιση της μεταβολής της τιμής της TAC στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την τιμή της TAC στο πλάσμα με την τιμή συντελεστή Pearson να είναι ίση με 0.1913

B A: η συσχέτιση της μεταβολής της τιμής της GSH στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την τιμή της GSH στο πλάσμα με την τιμή συντελεστή Pearson να είναι ίση με -0.2030

Γ: η συσχέτιση της μεταβολής της τιμής των TBARS στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την τιμή των TBARS στο πλάσμα με την τιμή συντελεστή Pearson να είναι ίση με -0.2755

Δ: η συσχέτιση της μεταβολής της τιμής της αναγωγικής ισχύος στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με την τιμή της ίδιας στο πλάσμα με την τιμή συντελεστή Pearson να είναι ίση με 0.1820

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ αποτελεί μία επικίνδυνη νευροεκφυλιστική νόσο που απασχολεί κυρίως το γηραιότερο μέρος του πληθυσμού και είναι η τέταρτη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως.Μερικά από τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η απώλεια μνήμης και οι πολλαπλές γνωστικές βλάβες.Μάλιστα,είναι μία προοδευτική νόσος για αυτό και τα συμπτώματα εμφανίζονται σε πολύ αρχικά στάδια και με την πάροδο του χρόνου εξελίσσονται σε πιο σοβαρά.Η έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση είναι κρίσιμης σημασίας για την νόσο καθώς όσες έρευνες και αν έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια ,δεν έχει βρεθεί αξιόπιστη θεραπεία με τα απαιτούμενα αποτελέσματα.Οι διαθέσιμες θεραπείες αποσκοπούν μόνο στην ανακούφιση των συμπτωμάτων.Επομένως,είναι απαραίτητη πιο εκτεταμένη έρευνα με σκοπό να κατανοηθεί ο ακριβής νευροπαθολογικός μηχανισμός ,ο οποίος παραμένει ακόμη ασαφής και να αναπτυχθούν οι κατάλληλες στρατηγικές πάνω σε νέους πιθανούς βιοδείκτες για την σωστή διάγνωση και καταπολέμηση της νόσου Αλτσχάιμερ. *(Sehar U.et al,2022)*

Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί ως μία απο τις πιθανές κοινές αιτιολογίες σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες με μία απο αυτές να αποτελεί η νόσος Αλτσχάιμερ.Πιο συγκεκριμένα,ο κύριος λόγος που οφείλεται αυτό είναι η πολύ αυξημένη ποσότητα των επιπέδων των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου σε συνδυασμό με την ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στην περιοχή του εγκεφάλου.Μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση θα μπορούσε να αποτελεί η χρήση πολλαπλών αντιοξειδωτικών ,η σωστή και ισορροπημένη δοσολογία τους σε συνδυασμό με την εύρεση των κατάλληλων βιοδεικτών για την εκτιμηση του οξειδωτικού στρες και την έγκαιρη ανίχνευση του στους ασθενείς.Άρα,είναι απαραίτητη η εφαρμογή περισσότερων κλινικών δοκιμών για τον σχεδιασμό πιο στοχευμένων θεραπειών και η χρήση νέων μεθόδων τεχνολογίας.*(Singh A.et al,2019)*

Όσον αφορά τα αντιοξειδωτικά,μέχρι σήμερα τα σημαντικότερα είναι η γλουταθειόνη,η καταλάση και η δεσμουτάση του υπεροξειδίου.Βέβαια,έχουν βρεθεί και άλλες περιπτώσεις σημαντικών αντιοξειδωτικών,όπως είναι οι διάφορες βιταμινές,τα φρούτα και τα λαχανικά,τα οποία αποτελούν πλούσια πηγή πολυφαινολών και επομένως μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά.*(Halliwell B.et al,2008)*

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγής σε δείγματα ατόμων με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ. Πιο αναλυτικά, από τα ανάλογα αποτελέσματα που θα είχε ήταν ως στόχος να παρθούν συμπεράσματα σχετικά με τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε 127 άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου την χρονική στιγμή t_0 . Αφού πέρασαν δύο χρόνια έγινε ξανά αιμοληψία και λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού την χρονική στιγμή t_2 σε 46 άτομα από τα 127 που συμμετείχαν και στην πρώτη φάση της έρευνας. Στο σύνολο όλων των δειγμάτων έγινε μελέτη πέντε δεικτών οξειδοαναγωγής. Αναλυτικότερα, οι δείκτες αυτοί ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οι ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η αναγωγική ισχύς (Reducing Power- RP) και ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity). Οι δείκτες που αναφέρθηκαν, είναι από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς ένδειξης του οξειδωτικού στρες και αποτελούν αξιόπιστους βιοδείκτες για την αντιοξειδωτική ικανότητα.

Αρχικά, ο πρώτος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αποτελεί έναν όρο για την εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης του συνόλου των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού. Σε πρώτη φάση ανάλυσης των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) μεταξύ όλων των ατόμων που συμμετείχαν την χρονική στιγμή t_0 σε σχέση με το σύνολο των 46 ατόμων που συμμετείχαν στην χρονική στιγμή t_2 . (Σχήμα 1). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδα της TAC ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές. Σε δεύτερη φάση, έγινε σύγκριση των επιπέδων της TAC μόνο των 46 ατόμων που συμμετείχαν και στις δύο χρονικές στιγμές (Σχήμα 5A), όμως ούτε σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

Ο επόμενος δείκτης που μετρήθηκε ήταν η γλουταθειόνη. Πιο συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά που παράγεται από τα κύτταρα και συμμετέχει απευθείας στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών ενώ συντηρεί και εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E. Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στην πρώτη φάση παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση (Σχήμα 2), ενώ αντίθετα στην δεύτερη φάση των αποτελεσμάτων δεν εμφανίστηκε κάποια σημαντική διαφορά. (Σχήμα 5B).

Ο τρίτος δείκτης που εξετάστηκε ήταν η υπεροξειδωση των λιπιδίων .Λόγω του εξαιρετικά σύντομου χρόνου ημιζωής των ROS είναι δύσκολο να μετρηθεί το οξειδωτικό στρες άμεσα και έτσι μπορεί να μετρηθεί μέσω των βιομορίων που υφίστανται οξειδωτική βλάβη όπως είναι τα λιπίδια.Όσον αφορά τα αποτελέσματα,σε καμία απο τις δύο φάσεις των αναλύσεων δεν παρουσιάστηκε κάποια αξιολογήσιμη διαφορά ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές.(**Σχήμα 3** και **Σχήμα 6**).

Ο επόμενος δείκτης που μελετήθηκε ήταν η αναγωγική ισχύς (Reducing Power) ,η οποία αναφέρεται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων.Όταν υπάρχουν τέτοιες ενώσεις στο δείγμα προκαλείται η μετατροπή του τρισθενή σιδήτου σε δισθενή.Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και από τις δύο φάσεις δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των χρονικών στιγμών t_0 και t_2 .(**Σχήμα 4A** και **Σχήμα 7A**)

Ο τελευταίος δείκτης που ερευνήθηκε ήταν ο δείκτης της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (Hydroxyl Radical Scavenging Activity).Η ρίζα υδροξυλίου είναι μια εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα και μπορεί να αντιδράσει έντονα τόσο με οργανικά μόρια όσο και με ανόργανα όπως το DNA,τις πρωτεΐνες , τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες και να προκαλέσει σοβαρότερη βλάβη στα κύτταρα από ότι μπορεί να κάνει οποιοδήποτε άλλο ROS.Αν εξετάσει κανείς την ανάλυση των αποτελεσμάτων και στις δύο φάσεις θα διαπιστώσει ότι δεν υπήρχε καποιά σημαντική διαφορά στις δύο χρονικές στιγμές.(**Σχήμα 4B** και **Σχήμα 7B**)

Στο **Σχήμα 8** απεικονίζεται η μεταβολή των επιπέδων του κάθε δείκτη ξεχωριστά για το σύνολο των 46 ατόμων που έλαβαν μέρος και στις δύο φάσεις τις χρονικές στιγμές t_0 και t_2 .

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια τρίτη ανάλυση των αποτελεσμάτων.Η ανάλυση,αυτή,αφορούσε στην συσχέτιση των τιμών των δεικτών οξειδοαναγωγής μεταξύ τους τόσο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό όσο και στο πλάσμα από όλα τα άτομα που έλαβαν μέρος στην συγκεκριμένη έρευνα.

Από τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι η ανηγμένη γλουταθειόνη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αυξάνεται και μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα σε σχέση με την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.(**Σχήμα 9A**).Επιπλέον,όταν συγκρίθηκαν οι τιμές της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με τις τιμές της TAC στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό όπως και όταν έγινε συσχέτιση μεταξύ των τιμών της αναγωγικής

ισχύς (Reducing Power) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με τις τιμές της TAC στον ορό του αίματος βρέθηκε και στις δύο περιπτώσεις πως οι σχέσεις των αποτελεσμάτων των δεικτών ήταν αναλογικές. Με άλλα λόγια, όσο αυξάνεται ή μειώνεται η τιμή του ενός οξειδωτικού δείκτη τόσο αυξάνεται ή μειώνεται η τιμή του άλλου οξειδωτικού δείκτη. (Σχήμα 9B και Σχήμα 9Γ)

Στην συνέχεια, έγινε συσχέτιση της μεταβολής των τιμών των TBARS του εγκεφαλονωτιαίου υγρού με την GSH του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και συσχέτιση των επιπέδων της αναγωγικής ισχύς του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε σχέση με την GSH του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. (Σχήμα 10A και Σχήμα 10B) Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως οι σχέσεις των τιμών και στις δύο περιπτώσεις ήταν αντιστρόφως ανάλογες. Τέλος, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ των τιμών της αναγωγικής ισχύος στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με τις τιμές των TBARS στο ίδιο υγρό. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όσο αυξανόταν η αναγωγική ισχύς τόσο αυξανόταν και η υπεροξείδωση των λιπιδίων. (Σχήμα 10 Γ)

Βέβαια, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν να υποθούν με εγκυρότητα καθώς ο συντελεστής Pearson σε όλες τις περιπτώσεις ήταν πολύ χαμηλός. Επομένως, απαιτούνται περισσότερες κλινικές δοκιμές για θεμελιωθεί ένα αξιόλογο συμπέρασμα για την συσχέτιση των δεικτών οξειδοαναγωγής των ατόμων.

Ως τελευταία φάση των αποτελεσμάτων αποτέλεσε η σύγκριση των τιμών για τον κάθε δείκτη ξεχωριστά μεταξύ του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του ορού του αίματος όλων των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα.

Η συσχέτιση μεταξύ των τιμών της TAC στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα έδειξε πως οι τιμές αυξομειώνονται με αναλογικό τρόπο (Σχήμα 11 A), ενώ αντίστοιχη συσχέτιση μεταξύ των τιμών της GSH στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα έδειξε αντιστρόφως ανάλογη σχέση. (Σχήμα 11B) Μάλιστα, όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα των τιμών για την υπεροξείδωση των λιπιδίων (TBARS) βρέθηκε ότι όσο αυξανόταν η τιμή των TBARS στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τόσο μειωνόταν στο πλάσμα των ατόμων. (Σχήμα 11Γ). Τέλος, συσχετίστηκαν οι τιμές της αναγωγικής ισχύος και τα αποτελέσματα έδειξαν αναλογική σχέση. (Σχήμα 11Δ) Δυστυχώς, όμως, πάλι και στις τέσσερις περιπτώσεις η τιμή του συντελεστή Pearson ήταν αρκετά χαμηλή για να μπορεί κανείς να στηριχθεί με βεβαιότητα στα παραπάνω ευρήματα. Αν μελλοντικές έρευνες επικεντρωθούν περισσότερο στον τομέα της συσχέτισης των δεικτών οξειδοαναγωγής μεταξύ του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του πλάσματος των ατόμων και

αποκτηθεί έγκυρο αποτέλεσμα θα μπορούσε αυτό να αποτελέσει πολύ σημαντική βάση για νέες θεραπευτικές μεθόδους.

Από τις τέσσερις φάσεις αναλύσεων των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση μόνο στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) ανάμεσα στο σύνολο των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα την χρονική στιγμή t_0 και στα 46 άτομα από την χρονική στιγμή t_0 που έλαβαν μέρος και στην αιμοληψία την χρονική στιγμή t_2 . Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γλουταθειόνη είναι ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά των ζωντανών οργανισμών και προστατεύει τα κύτταρα εξουδετερώνοντας τα δραστική είδη οξυγόνου. Επομένως, φαίνεται πως τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν μετά από δύο χρόνια στα άτομα με υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου καθώς το Αλτσχάιμερ είναι μία προοδευτική νόσος και όσο εξελίσσεται τόσο αυξάνονται και τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες που πρέπει να αντιμετωπίσουν τα κύτταρα. Παράδοξο, όμως, αποτελεί το γεγονός πως υπήρξε μόνο μία πολύ μικρή αύξηση των επιπέδων υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία δεν μπορεί να θεωρηθεί στατιστικώς σημαντική για να εκτιμηθεί πως υπήρξε και αντίστοιχη αύξηση του οξειδωτικού στρες στα 46 άτομα της χρονικής στιγμής t_2 . Επομένως, απαιτείται στο μέλλον εκτεταμένη μελέτη των οξειδοαναγωγικών δεικτών για διευρυνήθει περισσότερο ο τομέας αυτός.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην διερεύνηση πολύ σημαντικών βιοδεικτών με σκοπό την αξιοποίησή τους για την ανίχνευση του οξειδωτικού στρες, το οποίο κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο σε κάθε στάδιο της νόσου Αλτσχάιμερ. Αν αναλογιστεί κανείς ότι η νόσος είναι προοδευτική, μπορεί να αντιληφθεί πως σε όσο πιο πρώιμο στάδιο ανιχνευθεί το οξειδωτικό στρες τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες για την αποτελεσματικότερη θεραπεία των ασθενών πριν εξελιχθεί σε κάποιο σοβαρότερο στάδιο νευροεκφυλισμού.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., & Teunissen, C. et al. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 397(10284), 1577-1590. doi: 10.1016/s0140-6736(20)32205-4

Rostagno, A. (2022). Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(1), 107. doi: 10.3390/ijms24010107

Alzheimers Disease: A Brief Review. (2020). *Journal Of Experimental Neurology*, 1(3). doi: 10.33696/neurol.1.015

Sehar, U., Rawat, P., Reddy, A., Kopel, J., & Reddy, P. (2022). Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(21), 12924. doi: 10.3390/ijms232112924

The Three Stages of Alzheimer's Disease | BrightFocus Foundation. (2021). Retrieved 17 June 2023,

AHSAN, H., ALI, A., & ALI, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical And Experimental Immunology*, 131(3), 398-404. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02104.x

Phaniendra, A., Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0

Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion In Toxicology*, 7, 44-51. doi: 10.1016/j.cotox.2017.10.003

Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2020, 1-32. doi: 10.1155/2020/9829176

Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Basic Principles And Clinical Significance Of Oxidative Stress. doi: 10.5772/61193

Iciek, M., Bilska-Wilkosz, A., Kozdrowicki, M., & Górny, M. (2022). Reactive sulfur species and their significance in health and disease. *Bioscience Reports*, 42(9). doi: 10.1042/bsr20221006

Leyane, T., Jere, S., & Houreld, N. (2022). Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(13), 7273. doi: 10.3390/ijms23137273

Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease*, 1842(8), 1240-1247. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.10.015

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., ... Butterfield, D. A. (2002). Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2146–2156. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. doi: 10.3390/molecules24081583

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464. doi:10.1016/j.redox.2017.10.014

McGirr S, Venegas C, Swaminathan A. Alzheimer's Disease: A Brief Review. *J Exp Neurol*. 2020;1(3): 89-98.

Phaniendra, A., Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0

Castellani, R., Hirai, K., Aliev, G., Drew, K. L., Nunomura, A., Takeda, A., ... Smith, M. A. (2002). *Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 357–360. doi:10.1002/jnr.10389

Pei-Pei Liu, Yi Xie, Xiao-Yan Meng, Jian-Sheng Kang (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease . *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4(1):29, DOI:10.1038/s41392-019-0063-8