

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ

*ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN PATIENTS WITH
SYSTEMATIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME AFTER SURGERY*



ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΑΡΑΤΖΙΔΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Τριμελής επιτροπή

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

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζακυνθινός Επαμεινώνδας: Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τομέας Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου διεύρυνε το γνωστικό μου πεδίο καθώς και για την άψογη συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο, Επικουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

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

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Κατάλογος εικόνων | 5 |
| Κατάλογος διαγραμμάτων | 5 |
| Περίληψη | 6 |
| Abstract..... | 8 |
| 1. Εισαγωγή..... | 9 |
| 1.1 Συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση | 9 |
| 1.2 Οξειδωτικό Στρες..... | 24 |
| 1.3 Φλεγμονή και οξειδωτικό στρες | 34 |
| 2. Σκοπός..... | 47 |
| 3. Υλικά και μέθοδοι..... | 48 |
| 3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες..... | 48 |
| 3.2 Στατιστική ανάλυση..... | 60 |
| 4. Αποτελέσματα..... | 61 |
| 4.1. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAC) | 61 |
| 4.2 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS) | 63 |
| 4.3 Αποτελέσματα Μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων | 65 |
| 4.4 Συσχέτιση της βαρύτητας ασθένειας και των δεικτών οξειδωτικού στρες TAC, TBARS και καρβονύλια. | 67 |
| 5. Συζήτηση | 68 |
| Βιβλιογραφία | 70 |

Κατάλογος εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του όρου σήψη..... | 11 |
| Εικόνα 2: Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων..... | 12 |
| Εικόνα 3: Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας..... | 27 |
| Εικόνα 4: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών..... | 29 |
| Εικόνα 5: Μεταβολισμός οξυγόνου..... | 30 |
| Εικόνα 6: Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες..... | 33 |
| Εικόνα 7: Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη βιολογία της HMGB1..... | 38 |
| Εικόνα 8: Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και στους Toll-like υποδοχείς .. | 41 |
| Εικόνα 9: Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην ενεργοποίηση του NLRP3..... | 46 |

Κατάλογος διαγραμμάτων

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1: Η εμφάνιση σήψης επηρεάζεται από την ηλικία του ασθενή..... | 21 |
| Διάγραμμα 2: Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ. Ευγενική χορηγία του Angus et al. CCM 2001..... | 22 |
| Διάγραμμα 3: Ποσοστά ασθενών για κάθε ασθένεια. Ευγενική χορηγία Morenoetal.. IntCareMed 2008..... | 23 |
| Διάγραμμα 4: Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών. ΕυγενικήχορηγίαMorenoetal. IntCareMed 2008; Kumaretal. CritCareMed 2006..... | 23 |
| Διάγραμμα 5: Ημερήσια επίπεδα TAC σηπτικών ασθενών..... | 61 |
| Διάγραμμα 6: Ημερήσια επίπεδα TAC ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.. | 62 |
| Διάγραμμα 7: Σύγκριση τιμών TAC ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση..... | 62 |
| Διάγραμμα 8: Ημερήσια επίπεδα TBARS σηπτικών ασθενών..... | 63 |
| Διάγραμμα 9: Ημερήσια επίπεδα TBARS ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση..... | 64 |
| Διάγραμμα 10: Σύγκριση τιμών TBARS ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση..... | 64 |
| Διάγραμμα 11: Ημερήσια επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σηπτικών ασθενών..... | 65 |
| Διάγραμμα 12: Ημερήσια επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση..... | 66 |
| Διάγραμμα 13: Σύγκριση τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση..... | 66 |
| Διάγραμμα 14: Σύγκριση βαρύτητας ασθένειας σε σχέση με τους δείκτες TAC, TBARS και CARBONYLS..... | 67 |

Περίληψη

Το χειρουργικό στρες ορίζεται ως ο αντίκτυπος μιας χειρουργικής επέμβασης στον ανθρώπινο οργανισμό. Το χειρουργικό τραύμα προκαλεί ένα μεγάλο κύμα φυσιολογικών και ανοσολογικών αντιδράσεων που έχουν ως σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού και την επιβίωση.

Ως σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης (SIRS) ορίζεται η αντίδραση του οργανισμού σε διάφορους λοιμώδεις παράγοντες, αλλά και μη λοιμώδεις όπως για παράδειγμα κάποιο τραύμα, έγκαυμα ή και παγκρεατίτιδα. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο ή περισσότερων από τα εξής κριτήρια: Θερμοκρασία σώματος $> 38^{\circ}\text{C}$ ή $< 36^{\circ}\text{C}$, Καρδιακή Συχνότητα (ΚΣ) > 90 σφίξεις/min, Αναπνευστική συχνότητα: αναπνοές $> 20/\text{min}$, Λευκά αιμοσφαίρια > 12000 ή $< 4000/\text{mm}^3$ ή 10% άωρες μορφές, ενώ ως σήψη ορίζεται η ταυτόχρονη παρουσία λοίμωξης και SIRS (τουλάχιστον 2 κριτήρια SIRS).

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

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) οι οποίοι έχουν εμφανίσει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση ή σήψη μετά από χειρουργείο, καθώς και η σύγκριση των τιμών οξειδωτικού στρες της πρώτης μέρας εισαγωγής τους στη ΜΕΘ με τιμές υγιών ατόμων. Πραγματοποιήθηκε καθημερινή αιμοληψία σε 12 ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και σε 4 ασθενείς με σήψη για τις πρώτες 7 ημέρες παραμονής στους στη ΜΕΘ και μετρήθηκαν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η υπεροξειδωση των λιπιδίων (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών (protein-carbonyls). Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους ασθενείς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση την 3^η, 4^η και 5^η ημέρα, ωστόσο την 6^η ημέρα

αυτή άρχισε να αυξάνεται και πάλι. Επίσης, συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης ημέρας εισαγωγής των ασθενών στη ΜΕΘ (ασθενείς που πάσχουν από σήψη και ασθενείς που έχουν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση) παρατηρήθηκε πως υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στο πλάσμα των ασθενών. Στις υπόλοιπες μετρήσεις που διεξήχθησαν δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές. Τέλος κατά την σύγκριση των τριών δεικτών με τις τιμές βαρύτητας της ασθένειας, σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II παρατηρήθηκε ότι η βαρύτητα της ασθένειας δεν επηρεάζει τους δείκτες οξειδωτικού στρες.

Abstract

Surgical stress is defined as the impact exerted on the human body by a surgical procedure. Surgical trauma causes a surge of physiological and immunological reactions for preservation of homeostasis and survival.

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) is defined as the body's response to various infectious, and non-infectious agents such as trauma, burn or pancreatitis. This syndrome is characterized by the presence of two or more of the following criteria: body temperature $> 38^{\circ} \text{C}$ or $< 36^{\circ} \text{C}$, Heart rate (HR) > 90 beats / min, Respiratory rate: breathing > 20 / min, White Blood Cells > 12000 or < 4000 / mm^3 or 10% pupae. Sepsis is defined by the simultaneous presence of infection and SIRS (at least 2 of the SIRS criteria).

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

The purpose of the present study is to indicate how the levels of oxidative stress change over time in intensive care unit (ICU) patients that have undergone surgery and present clinical symptoms of either SIRS or sepsis, as well as the comparison of these levels with those of healthy control adults. Blood sampling was performed daily in 12 patients with SIRS and 4 patients with sepsis for the first seven days of their stay in the ICU and three oxidative stress markers in plasma were determined; total antioxidant capacity of the plasma (TAC), lipid peroxidation (TBARS) and protein peroxidation (protein carbonyls). The results indicated a statistically significant reduction of the total antioxidant capacity (TAC) on the 3rd, 4th, and 5th day, although on the 6th day it started rising again. Comparing the levels of oxidative stress markers between healthy control adults and the first day of the hospitalization of the aforementioned ICU patients, a statistically significant increase of TBARS in the patients' plasma was observed. The rest of the conducted tests showed none statistical importance. Finally, by comparing the three markers with the disease severity values, according to the APACHE II scoring system, we concluded that the the severity of the disease did not affect the oxidative stress markers.

1. Εισαγωγή

1.1 Συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση

1.1.1 Χειρουργικό στρες και συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση

Η φυσιολογική απάντηση στο τραύμα αποτελείται από τρεις φάσεις: (α) υποδυναμική φάση ύφεσης (σοκ), όπου το ανθρώπινο σώμα προσπαθεί να περιορίσει την απώλεια αίματος και να διατηρήσει την αιμάτωση των ζωτικών οργάνων, (β) υπερδυναμική φάση ροής η οποία στοχεύει στο να απομακρύνει τα παραπροϊόντα και να επιτρέψει στα θρεπτικά συστατικά να φτάσουν στο σημείο του τραυματισμού για επιδιόρθωση και (γ) φάση ανάρρωσης, η οποία διαρκεί για μήνες και επιχειρεί να επαναφέρει το ανθρώπινο σώμα στη φυσιολογική του κατάσταση. Ωστόσο, καθώς συλλέγονται όλο και περισσότερα δεδομένα έχει γίνει σαφές πως η φυσιολογική απόκριση στο τραύμα είναι ένα αρκετά περίπλοκο φαινόμενο. Η αντίδραση του ανθρώπινου οργανισμού σε ποικίλα επιβλαβή ερεθίσματα ορίζεται ως «αντίδραση στρες». Κάθε παράγοντας ο οποίος ασκεί επίδραση στους ανθρώπινους ιστούς μπορεί να επηρεάσει την λεπτή ισορροπία της ομοιόστασης. Το τραύμα, οι ασθένειες και η φαρμακευτική αγωγή δύνανται να πυροδοτήσουν την αντίδραση στρες. Συγκεκριμένα, οι χειρουργικές επεμβάσεις οδηγούν σε ποικιλία σοβαρών αλλαγών στην αιμοδυναμική και στις ενδοκρινικές και ανοσολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ρυθμιστικά συστήματα του οργανισμού απαντούν στο χειρουργικό στρες με νευρικά σήματα και φλεγμονώδεις ουσίες.

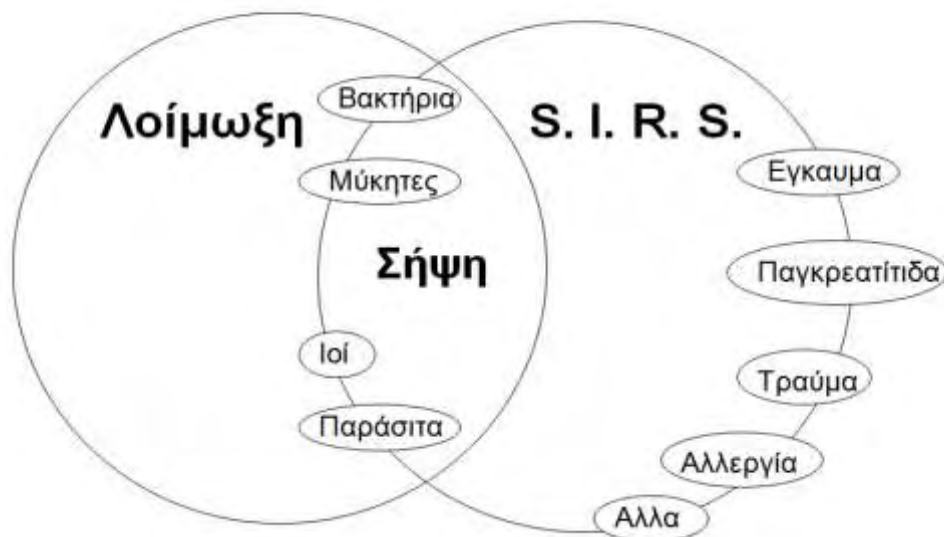
Το χειρουργικό στρες ορίζεται ως ο αντίκτυπος μιας χειρουργικής επέμβασης στον ανθρώπινο οργανισμό. Το χειρουργικό τραύμα προκαλεί ένα μεγάλο κύμα φυσιολογικών και ανοσολογικών αντιδράσεων που έχουν ως σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού και την επιβίωση. Το μέγεθος της βλάβης του ιστού καθορίζει το μέγεθος της απόκρισης. Οι συστηματικές κυτοκίνες αποτελούν

δείκτες του μετεγχειρητικού τραύματος του ιστού. Το κοινό χαρακτηριστικό της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης είναι η ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κυτοκινών η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση διαλυτών υποδοχέων κυτοκινών. Ο κύριος άξονας κυτοκινών διεγείρει την απελευθέρωση πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ και ρυθμίζει τόσο μεταβολικά μονοπάτια όσο και ορμονικές αποκρίσεις. Αυτή η συστημική φλεγμονώδης διαδικασία ορίστηκε το 1991 κατά ομοφωνία από το American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), ως **συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση**

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

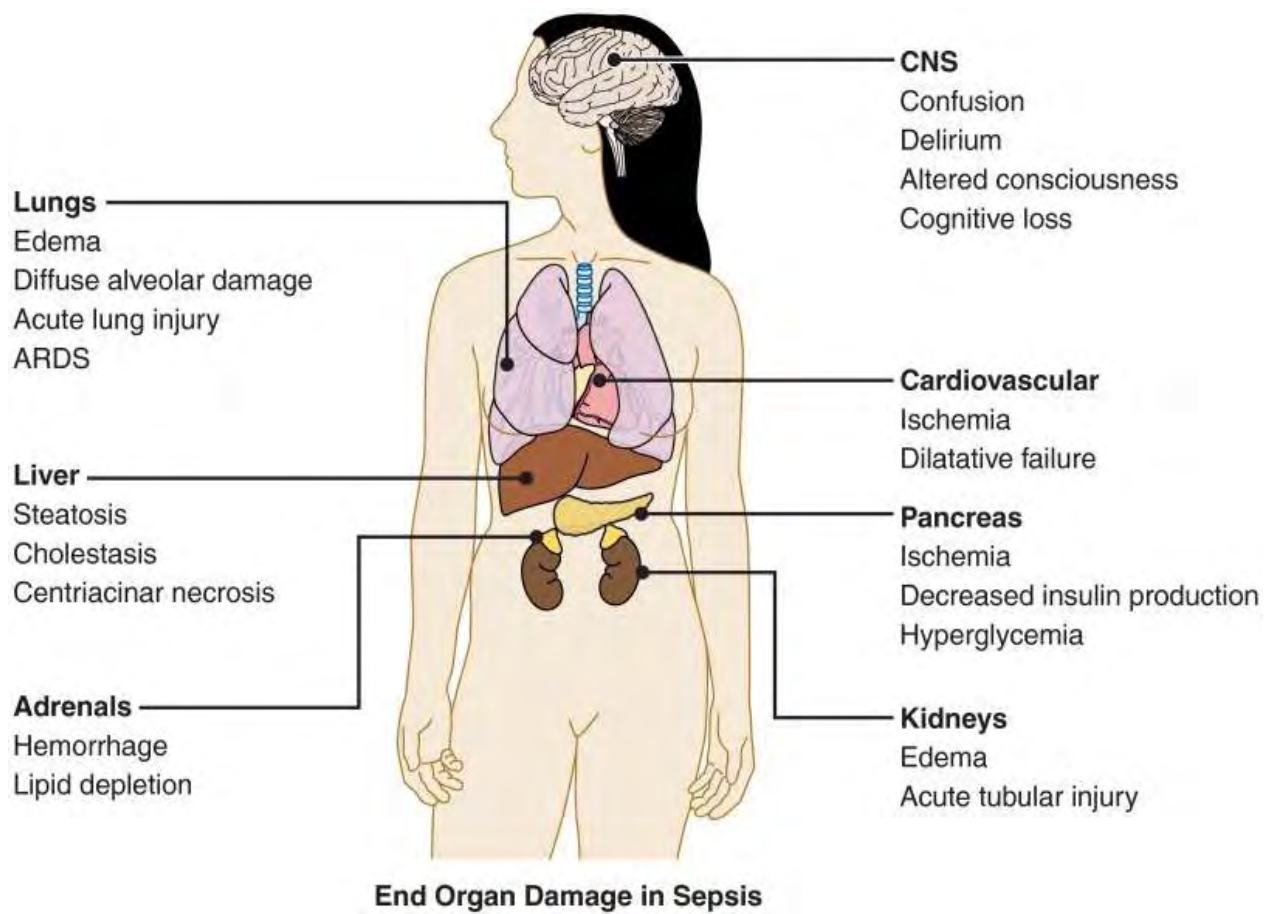
- Θερμοκρασία σώματος $> 38^{\circ}\text{C}$ ή $< 36^{\circ}\text{C}$
- Καρδιακή Συχνότητα (ΚΣ) > 90 σφύξεις/min
- Αναπνευστική συχνότητα : αναπνοές > 20 /min
- Λευκά αιμοσφαίρια > 12000 ή $< 4000/\text{mm}^3$ ή 10% άωρες μορφές

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



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του όρου σήψη.

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



Εικόνα 2: Η σοβαρή σήψη προκαλεί δυσλειτουργία οργάνων.

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

1.1.2 Ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση και παθοφυσιολογία της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης

1.1.2.1 Ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση

Η ανοσολογική απόκριση στα παθογόνα βασίζεται σε συστατικά της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας. Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε μία μόλυνση και για αυτό εξασφαλίζει την ευρεία αναγνώριση παθολογικών δομών και την άμεση απόκριση σε αυτά χωρίς προηγούμενη επαφή με το παθογόνο. Εν αντιθέσει, η επίκτητη ανοσία χαρακτηρίζεται από την εξειδικευμένη αναγνώριση ξένων αντιγόνων, την ικανότητα αναγνώρισης μεγάλου εύρους διακριτών αντιγονικών επιτόπων και την ικανότητα δημιουργίας ανοσολογικής μνήμης.

Οι απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή σε βακτηριακές και μυκητιακές μολύνσεις γίνονται αρχικά με τη μεσολάβηση των ουδετερόφιλων, των μονοκύτταρων και των μακροφάγων. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου PRRs (pattern recognition receptors), οι οποίοι αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μη μεταβλητά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα, τα PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) τα οποία βρίσκονται σε διάφορους μικροοργανισμούς. Οι PRRs πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια πρόκλησης φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, αφού αναγνωρίσουν τα παθογόνα, τα σκοτώνουν με διάφορους μηχανισμούς όπως η παραγωγή κυτταροτοξικών ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και άλλων διαμεσολαβητών στο σημείο της μόλυνσης και στις φαγοσωμικές μεμβράνες. Αυτοί οι αρμονικά συνδεδεμένοι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την εξάλειψη των μολυσματικών παραγόντων και την επιδιόρθωση του ιστού.

1.1.2.2 Toll-like υποδοχείς

Οι TLRs (toll-like receptors) είναι βασικά συστατικά της έμφυτης ανοσίας, κύρια λειτουργία της οποίας είναι να αντιλαμβάνεται σήματα κινδύνου από τα PAMPs. Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από μία εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε λευκίνες, για την αναγνώριση του συνδέτη, μία μικρή διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά που έχει ομολογία με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1, υπεύθυνη για τη μετάδοση σήματος (O' Neill and Bowie, 2007). Στους ανθρώπους εκφράζονται δέκα TLRs. Οι TLRs 1, 2, 4, 5 και 6 βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη ώστε να ανιχνεύουν επιφανειακά συστατικά των μικροβίων. Ο TLR2, ο οποίος σχηματίζει ομοδιμερή και ετεροδιμερή με τους TLR1 και TLR6 και ο οποίος χρησιμοποιεί πολλούς συνυποδοχείς όπως τους CD14, CD36 και dectin-1, αναγνωρίζει βακτηριακά λιποπεπτίδια και πεπτιδογλυκάνες όπως επίσης και μαννάνες και γλυκάνες οι οποίες προέρχονται από μύκητες. Ο TLR4 με τον συνυποδοχέα MD-2 ανιχνεύει το σύμπλοκο που δημιουργείται από το LPS (lipopolysaccharide) και το CD14, ενώ ο TLR5 ανιχνεύει τη βακτηριακή φλαγγελίνη. Οι TLRs 3, 7, 8 και 9 εκφράζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (ενδοπλασματικό δίκτυο, ενδοσώματα και λυσοσώματα) όπου και ανιχνεύουν ιικά και βακτηριακά νουκλεϊκά οξέα (Lee et al., 2012; Song and Lee, 2012).

Οι TLRs επίσης ανιχνεύουν ενδογενή DAMPs (damage-associated molecular patterns) τα οποία απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα και τον εξωκυτταρικό σκελετό, όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, λιποπρωτεΐνες πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες καθώς επίσης και νουκλεϊκά οξέα και σύμπλοκα νουκλεϊκών οξέων-πρωτεϊνών. Πολλές διαφορές στην αναγνώριση των PAMPs και DAMPs (διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης, διαφορετικοί συνυποδοχείς) και η ενεργοποίηση διαφορετικών ρυθμιστικών μονοπατιών μπορεί να βοηθήσουν στην διάκριση εξωγενών από ενδογενείς απειλές. Για παράδειγμα, η αναγνώριση ενός DAMP πυροδοτεί μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης, ώστε να περιορίσει την πιθανή βλάβη του οργανισμού.

Όλοι οι TLRs, με εξαίρεση τον TLR3, αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein). Οι TLR 7, 8 και 9 του ενδοσώματος και ο TLR5 της κυτταρικής επιφάνειας συνδέονται απευθείας με την MyD88, ενώ οι TLR 1, 2, 4 και 5 (οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια) στρατολογούν επίσης την πρωτεΐνη TIRAP (TIRdomain-containing adaptor protein) η οποία συνδέει τις περιοχές TIR των TLRs και της MyD88. Έπειτα από σύνδεση του προσδέτη, οι TLR3 και TLR4 στρατολογούν την πρωτεΐνη TRIF (TIRdomain-containing adaptor inducing interferon- β) είτε άμεσα (TLR3) είτε έμμεσα μέσω της TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (TLR4) (Gayand Gangloff, 2007; SongandLee, 2012). Η MyD88 ενεργοποιεί το μονοπάτι IRAK-TRAF6-TAK1 το οποίο ενεργοποιεί την κινάση του αναστολέα του κB (I κ B), την IKK, και κινάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs) οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF- κB και AP-1 αντιστοίχως. (Kawai and Akira, 2010; Song and Lee, 2012).

1.1.2.3 Επίκτητη ανοσία

Πέρα από την ικανότητα να σκοτώνουν τα εισβάλλοντα παθογόνα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν συστατικά των παθογόνων στα T κύτταρα, ενεργοποιώντας έτσι την επίκτητη ανοσία. Τα B και τα T λεμφοκύτταρα συνιστούν το σύστημα της επίκτητης ανοσίας. Η αναγνώριση του παθογόνου στην επίκτητη ανοσία βασίζεται στους αντιγονικούς υποδοχείς της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τον ειδικό υποδοχέα για κάθε αντιγονικό επίτοπο επιλέγονται μετά από την σύνδεση του επιτόπου, η οποία προκαλεί τον κλωνικό πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου κυττάρου.

Τα B λεμφοκύτταρα εκφράζουν αντιγονοειδικά αντισώματα σε διαλυτή αλλά και μεμβρανική μορφή. Τα εκκρινόμενα αντιγόνα είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της χυμικής απάντησης. Εκτός από τις θέσεις αναγνώρισης του αντιγόνου, τα

αντισώματα έχουν και σταθερές περιοχές (Fc) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την επικοινωνία ανοσοκυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης των Fc υποδοχέων.

Τα Τ λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν έναν επιφανειακό υποδοχέα ώστε να αναγνωρίσουν κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί από ενδοκυτταρικά παθογόνα ή κύτταρα τα οποία έχουν εσωτερικεύσει παθογόνα σε μεμβρανικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Για την παρουσίασή τους στα Τ κύτταρα, τα αντιγόνα θα πρέπει να πεφθούν σε πεπτίδια και να μεταφερθούν στην κυτταρική επιφάνεια. Η αντιγονοπαρουσίαση γίνεται μέσω μιας οικογένειας πολυμορφικών πρωτεϊνών, του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC (major histocompatibility complex). Τα CD8+ Τ κύτταρα είναι κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα τα οποία σκοτώνουν κύτταρα-στόχους μετά από αναγνώριση πεπτιδίων τα οποία παρουσιάζονται από το MHC. Τα CD4+ Τ κύτταρα χωρίζονται σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες ανάλογα με το είδος των κυτοκινών τις οποίες εκκρίνουν. Τα Th1 κύτταρα εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF-α (tumor necrosis factor-α), ουσίες οι οποίες ενισχύουν την αντιμικροβιακή ικανότητα των φαγοκυττάρων, βοηθώντας το σύστημα της έμφυτης ανοσίας να στοχεύσει και να καταστρέψει ενδοκυτταρικά παράσιτα. Τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 4 (IL-4) και η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) υποστηρίζοντας κυρίως την χυμική απάντηση έναντι στην καταπολέμηση εξωκυτταρικών παθογόνων. Αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως τα αιμοπετάλια μπορούν να συμμετέχουν στις απαντήσεις της επίκτητης ανοσίας μέσω παραγωγής του CD 154. Η αφαίρεση των αιμοπεταλίων οδηγεί σε μείωση της παραγωγής αντιγονοειδικών αντισωμάτων. Κατά τη διάρκεια της σήψης παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση των Th2 κυττάρων, γεγονός που σχετίζεται με αρνητική έκβαση της νόσου καθώς θα πρέπει να υπάρχει ισορροπία των δύο μορφών ανοσίας.

1.1.2.4 Δενδριτικά κύτταρα

Η έμφυτη και η επίκτητη ανοσία επικοινωνούν σε διάφορα στάδια κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης. Τα δενδριτικά κύτταρα φαίνεται πως είναι τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τα οποία συνδέουν τους δύο τύπους ανοσίας.

Τα δενδριτικά κύτταρα βρίσκονται σε περιφερειακούς ιστούς σε ανώριμη κατάσταση, και περιμένουν επαφή με το αντιγόνο. Μετά από αυτή την επαφή, τα δενδριτικά κύτταρα πέπτουν το αντιγόνο σε πεπτίδια τα οποία προσκολλώνται στα μόρια του MHC για παρουσίαση στα T κύτταρα. Μετά από εισβολή παθογόνων, φλεγμονή και ιστική βλάβη, τα δενδριτικά κύτταρα λαμβάνουν επιπρόσθετα σήματα ενεργοποίησης μέσω διάφορων υποδοχέων όπως TLRs, IL-1R, IL-18R, TNF-R1, TNF-R2, CD40, υποδοχέα Fc, RANK (receptor activator of NF-κB) και άλλους. Αυτή η ενεργοποίηση επάγει αλλαγές στο φαινότυπο και τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων και επίσης επάγει τη μετακίνησή τους από τους περιφερειακούς ιστούς στους λεμφαδένες. Επιπλέον, η ενεργοποίηση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων πυροδοτεί την παραγωγή κυτοκινών όπως οι ιντερλευκίνες 12, 18 και 10, γεγονός το οποίο ενισχύει τις απαντήσεις των T κυττάρων. Τέλος κάποια υποείδη δενδριτικών κυττάρων συμμετέχουν στις απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας ενάντια σε βακτηριακές μολύνσεις μέσω παραγωγής του TNF και της επαγωγίσιμης οξειδάσης του νιτρικού οξέος (iNOS).

1.1.2.5 Διαταραχή της φλεγμονής στη σήψη

Σε κάποιες περιπτώσεις, η πολύ έντονη φλεγμονώδης απάντηση σε μολυσματικούς παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε σήψη. Αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από μαζική έκκριση προφλεγμονώδων διαμεσολαβητών όπως ο TNF-α, η IL-1β, ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης των μακροφάγων και η πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας HGMB-1. Αυτές οι πρωτεΐνες καθυστερούν σημαντικά την απόπτωση των ουδετερόφιλων, γεγονός που τους

επιτρέπει να δράσουν πιο αποτελεσματικά στα σημεία της φλεγμονής οδηγώντας σε ενισχυμένη εποπτεία για επόμενους πιθανούς μολυσματικούς παράγοντες και σε μια παρατεταμένη στρατολόγηση προφλεγμονωδών κυττάρων μέσω της έκκρισης κυτοκινών και χυμοκινών. Αυτή η δυσανάλογη φλεγμονώδης απάντηση οδηγεί τελικά σε ιστική βλάβη, αλλαγές στην αιμοδυναμική, πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια και θάνατο.

Ο TNF-α αλληλεπιδρά με τους δύο υποδοχείς TNF-R1 και TNF-R2. Ο TNF-R1 είναι κυρίως υπεύθυνος για την επαγωγή προφλεγμονώδων απαντήσεων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB αλλά μπορεί επίσης να επάγει και την απόπτωση. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του TNF-R1 φαίνεται να εξαρτάται από συγκεκριμένες μεμβρανικές μικροπεριοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, τις λιπιδιακές σχεδίες. Η μετατόπιση του TNF-R1, μετά από την ενεργοποίησή του, στις λιπιδιακές σχεδίες είναι μεγάλης σημασίας για την ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ η ανάμειξή του με την οργάνωση των λιπιδιακών σχεδιών οδηγεί σε απόπτωση. Ο ρόλος του TNF-R2 είναι λιγότερο αποσαφηνισμένος αλλά φαίνεται να υποστηρίζει τις λειτουργίες που πυροδοτούνται από τον TNF-R1.

Η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), είναι μείζων διαμεσολαβητής της φλεγμονής και παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα και υπάρχει σε δύο μορφές, την IL-1α και την IL-1β. Ο υψηλής συγγένειας υποδοχέας της ιντερλευκίνης-1, IL-1R1, εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα και στους ινοβλάστες, ενώ ο χαμηλής συγγένειας, IL-1R2 σε διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της IL-1 είναι η παρουσία ενός ενδογενούς ανταγωνιστή, του IL-1RA, ο οποίος εκφράζεται στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα. Η ιντερλευκίνη 18 (IL-18) έχει παρόμοια δομή και λειτουργία με την IL-1 και προκαλεί παρόμοιες απαντήσεις μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα της IL-18R.

Η στρατολόγηση των ουδετερόφιλων στα σημεία της φλεγμονής και η επακόλουθη μετανάστευσή τους μέσα στους ιστούς είναι σημαντικό βήμα στη διαδικασία της φλεγμονής. Η μετανάστευση είναι μία διαδικασία πολλών βημάτων που περιέχει

αλληλεπιδράσεις λευκοκυττάρων με ενδοθηλιακά κύτταρα, και ένα σύνολο διακριτών ομάδων μορίων προσκόλλησης. Οι β2-ιντεγκρίνες μαζί με τις σελεκτίνες συνεισφέρουν στην κύλιση των λευκοκυττάρων. Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων γίνεται μέσω α4 β₁-ιντεγκρινών. Αυτό το μονοπάτι είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη μαζική λευκοκυτταρική περιθωριοποίηση που παρατηρείται στη σήψη. Η παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης α4-ιντεγκρίνη/VCAM-1 μπορεί να μειώσει μόνο την υπερβολική εξαγγείωση των λευκοκυττάρων, ενώ η ανοσολογική απάντηση για την εξάλειψη του παθογόνου παραμένει ανέπαφη. Για τον λόγο αυτό η αναστολή της α4-ιντεγκρίνης μπορεί να είναι ένας νέος στόχος στη θεραπεία της σήψης.

1.1.2.6 Αντιφλεγμονώδης απάντηση

Η πρώιμη υπερφλεγμονώδης φάση, ωστόσο, ακολουθείται από αντισταθμιστικούς μηχανισμούς και οι υπερ- και αντι-φλεγμονώδεις καταστάσεις διαδέχονται η μία την άλλη κατά τη διάρκεια της σήψης. Οι διαμεσολαβητές της αντιφλεγμονώδους απάντησης είναι οι TNF-R, IL-1Ra, IL-4, IL-10 και ο TGF-β. Η IL-10 αναστέλλει κυρίως την έκκριση κυτοκινών από τα μακροφάγα και την αντιγονοπαρουσίαση. Επιπλέον, επάγει την απόπτωση των ουδετερόφιλων στη διάλυση της φλεγμονής. Ο TGF-β προωθεί πολλές αντιφλεγμονώδεις δράσεις, όπως η παραγωγή αντιφλεγμονώδων κυτοκινών και η αναστολή της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων.

1.1.2.7 Ανοσοκαταστολή στη σήψη

Οι ασθενείς με σήψη παρουσιάζουν σοβαρά ελαττώματα στην ανοσοαπάντηση όπως καθυστερημένη υπερευαισθησία, μειωμένη έκφραση αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων, μετατόπιση προς την παραγωγή αντιφλεγμονώδων κυτοκινών και άλλα. Όλα αυτά καθιστούν τον οργανισμό ανίκανο να αντιμετωπίσει μολύνσεις και τον καθιστούν ευάλωτο σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σήψης και η αποτυχία επαναφοράς του συνεπάγεται θάνατο. Οι ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας συχνά βρίσκονται ήδη σε κατάσταση

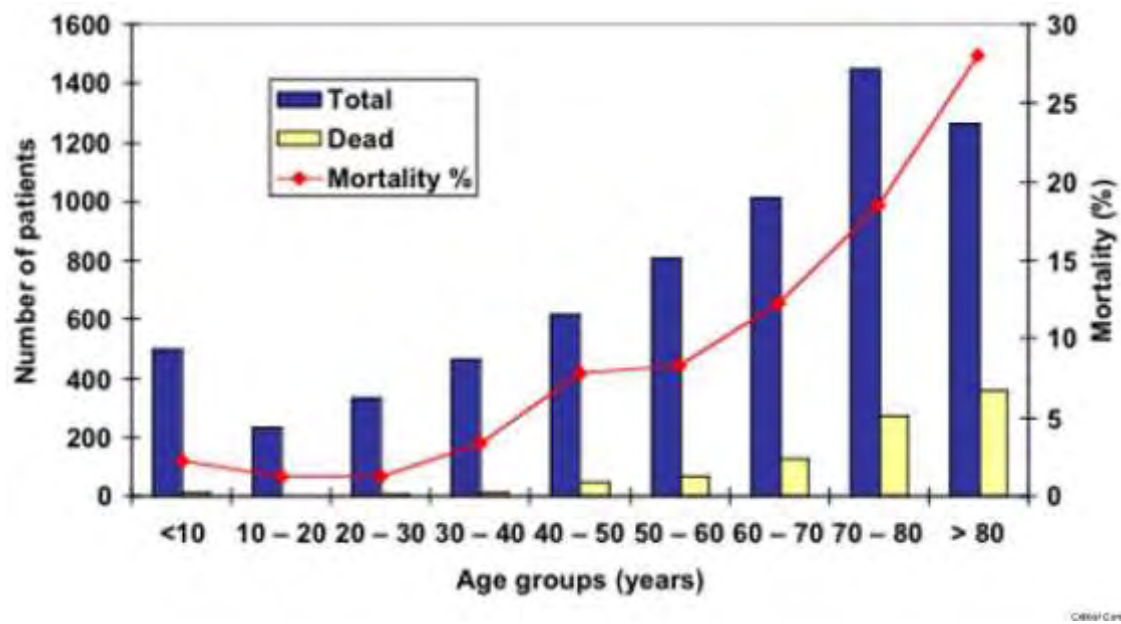
ανοσοκαταστολής ως αποτέλεσμα προϋπαρχόντων ασθενειών όπως σακχαρώδης διαβήτης, πνευμονία, ή χειρουργική επέμβαση. Ο βαθμός ανοσοκαταστολής των ασθενών με σήψη καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την έκβαση της ασθένειας. Ο λόγος IL-10/TNF είναι υψηλότερος σε ασθενείς που τελικά πεθαίνουν συγκριτικά με αυτούς που επιζούν. Επίσης, ασθενείς με προεγχειρητικά χαμηλά επίπεδα μονοκυτταρικής παραγωγής IL-12 είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν μετεγχειρητική σήψη.

1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ασθένεια

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

1.1.3.1 Η Ηλικία

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



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

1.1.3.2 Το φύλο

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

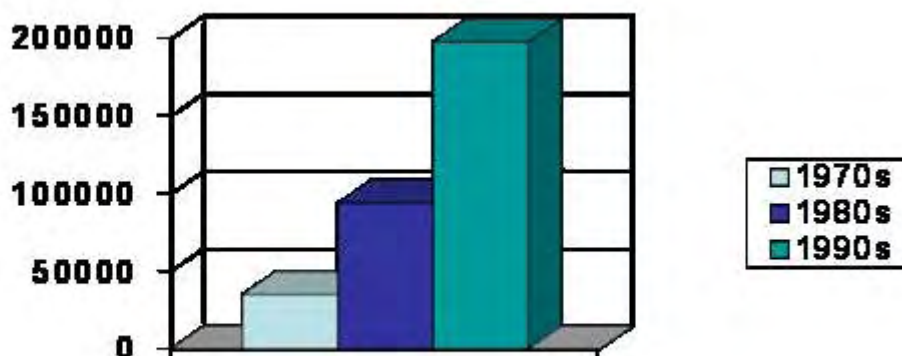
1.1.3.3 Συνυπάρχουσες Παθήσεις

Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο θνησιμότητας περιλαμβάνουν ήδη υπάρχουσες παθήσεις, όπως η ανοσοκαταστολή, ο καρκίνος, HIV/AIDS, ανεπάρκεια ήπατος, καθώς και η εξάρτηση από το αλκοόλ. Όλες αυτές οι ασθένειες εξασθενούν τον οργανισμό του ασθενή καθιστώντας τον ευάλωτο στις συνέπειες της σήψης. Σύμφωνα με μία μελέτη μεταξύ των ασθενών που εμφάνισαν σοβαρά συμπτώματα σήψης αποδείχθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών είχαν ήδη κάποιο

νόσημα, ιδιαίτερα διαβήτη (23%), χρόνια πνευμονία (17%), καρκίνο (16%), καρδιακή ανεπάρκεια (14%), νεφρική ανεπάρκεια (11%), και ηπατική νόσο (7%) (Kendra N. Iskander et al. 2013, Martin G. et al. 2009).

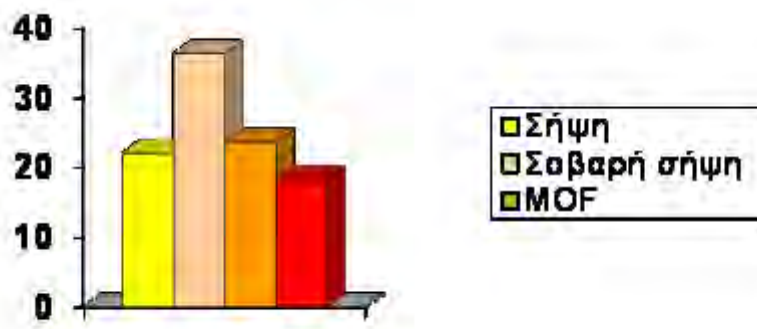
1.1.4 Διακυμάνσεις της θνησιμότητας και των διαφόρων τύπων σήψης

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

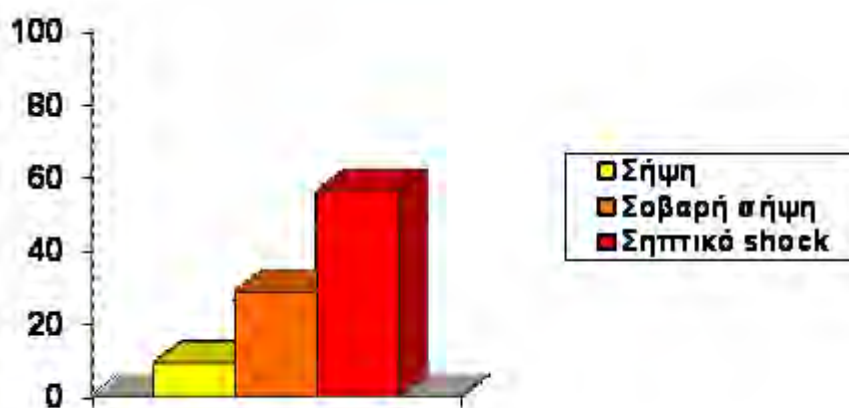


Διάγραμμα 2: Θάνατοι λόγω σήψης στις ΗΠΑ. Ευγενική χορηγία του Angus et al. CCM 2001

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



Διάγραμμα 3: Ποσοστά ασθενών για κάθε ασθένεια. Ευγενική χορηγία Morenoetal.. IntCareMed 2008



Διάγραμμα 4: Ποσοστά θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών. ΕυγενικήχορηγίαMorenoetal. IntCareMed 2008; Kumaretal. CritCareMed 2006

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

1.2 Οξειδωτικό Στρες

1.2.1 Ορισμός

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Έχει οριστεί ως μία διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων.

1.2.2 Ιστορική αναδρομή

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

Το O_2 είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω υπό κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει τοξικό, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως “μια διαταραχή στην προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία” (Sies H. 1985). Παρά το γεγονός ότι αυτός ο ορισμός έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για πάνω από δύο δεκαετίες, ο

ορισμός του οξειδωτικού στρες είναι πιθανό να εξελιχθεί και να υποβληθεί σε αλλαγές στο μέλλον. Πράγματι, λόγω της πολυπλοκότητας που σχετίζεται με την εκτίμηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, έχει υποστηριχθεί ότι ο όρος οξειδωτικό στρες είναι χρήσιμος μόνο αν τα μοριακά στοιχεία της ανισορροπίας είναι γνωστά. Σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η έννοια του οξειδωτικού στρες, ο Dean Jones πρότεινε ότι ο όρος αυτός θα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί ως "διατάραξη της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου» (Jones D P. 2006, CottK. Powers and Malcolm J. Jackson).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεια πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα μέρα με τη μέρα οι ερευνητές να κατανοούν καλύτερα τις επιβλαβείς δράσεις, αλλά και την επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.2.3 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

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

Ωστόσο, τα οφέλη που προσφέρει μια ατμόσφαιρα πλούσια σε οξυγόνο στην επίγεια ζωή συνοδεύονται με συνέπειες, από τις οποίες η βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο ROS είναι ίσως η πιο σημαντική. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως τα υπεροξειδία και τα ιόντα υδροξυλίου, αντιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών

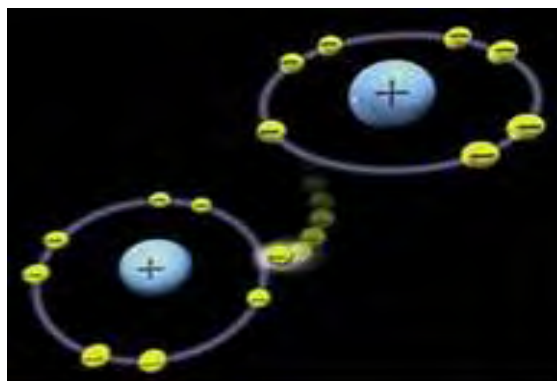
μορίων, προκαλώντας σημαντικές μοριακές βλάβες και παρεμβαίνουν ακόμα και στην κυτταρική λειτουργία. Οι ROS παίζουν μεγάλο ρόλο στην οξειδωτική βλάβη η οποία προκαλείται από τη γήρανση καθώς και από πολλές ασθένειες του ανθρώπου (*Leigh Boardman et al., 2011*).

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

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

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (*Gilbert 2000, Halliwell & Gutteridge 1990*). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια

στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge, 1990).



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

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al. 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με 3O_2 , δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Ωστόσο, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με 1O_2 . Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

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

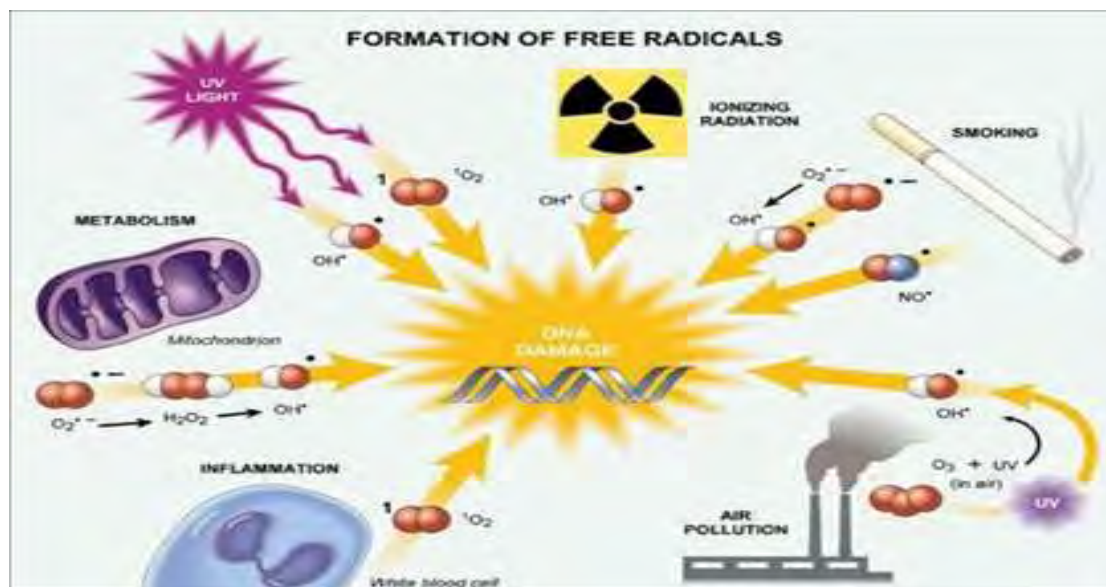
- ❖ Η ρίζα του υπεροξειδίου τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει.
- ❖ Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.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

1.2.4 Πώς παράγονται οι ελεύθερες ρίζες

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

- κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας (στα μιτοχόνδρια)
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα
- τη λιπιδική οξείδωση
- την ακτινοβολία
- τη φλεγμονή

- το κάπνισμα
- τη μολυσμένη ατμόσφαιρα, το νέφος (όζον, νιτροξείδια)

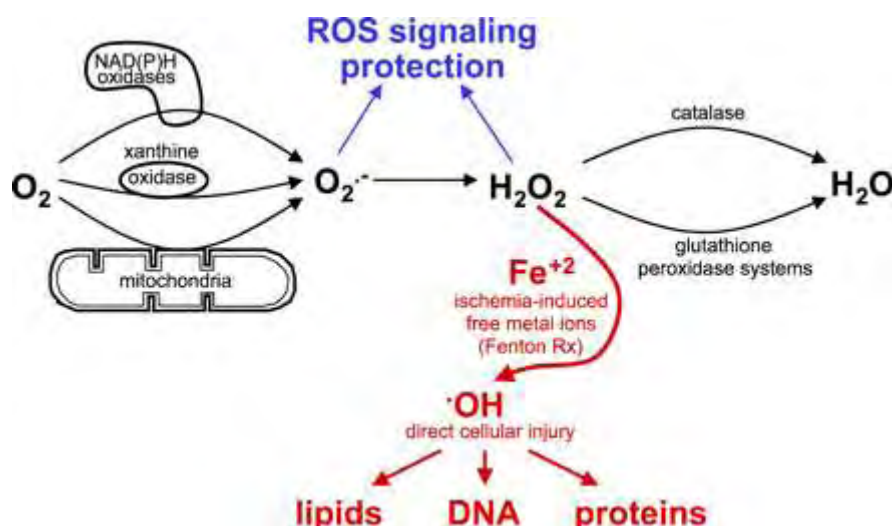


Εικόνα 4: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.

1.2.5 Επιπτώσεις

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell 2001; Halliwell & Gutteridge 1998). Υπό κανονικές συνθήκες περίπου το 5% του εισπνεόμενου οξυγόνου μεταβολίζεται στο νερό μέσω της διαδρομής που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το σουπεροξειδίου του οξυγόνου και το υπεροξειδίου του

υδρογόνου παράγονται φυσιολογικά και μπορεί να έχουν προστατευτικές δράσεις. Ωστόσο, με την επαναιμάτωση η φυσιολογική ισορροπία χάνεται και ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) μπορούν να παραχθούν μέσω της αντίδρασης Fenton (Hess M.L. and Manson N.H. 1984).



Εικόνα 5: Μεταβολισμός οξυγόνου.

1.2.5.1 Θετικές επιδράσεις

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

έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

Είναι πλέον επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι οι ROS μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως υποστρώματα ενζύμων, όπως το H_2O_2 χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τις υπεροξειδάσες της αίμης που εμπλέκονται στην ιωδίωση των ορμονών του θυροειδούς αδένου. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στον ιστό ποικίλει από 1 έως 700nM. Ωστόσο, διακρίνονται σημαντικές αλλαγές στην συγκέντρωσή του όταν ανταποκρίνεται σε κυτοκίνες και σε αυξητικούς παράγοντες. Το γεγονός ότι αυτά τα γεγονότα σηματοδότησης αναστέλλονται από υπεροξείδια ή από την υπερέκφραση καταλάσης καθιστά πιθανή την εμπλοκή του H_2O_2 στον καταρράκτη σηματοδότησης. Η σηματοδότηση της ινσουλίνης φαίνεται να περιλαμβάνει H_2O_2 ως μέρος του μηχανισμού για αναστρέψιμη αδρανοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης, την ίδια στιγμή που οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα ινσουλίνης (John W. Baynes and Marek H. Dominiczak, 2012).

1.2.5.2 Αρνητικές επιδράσεις

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

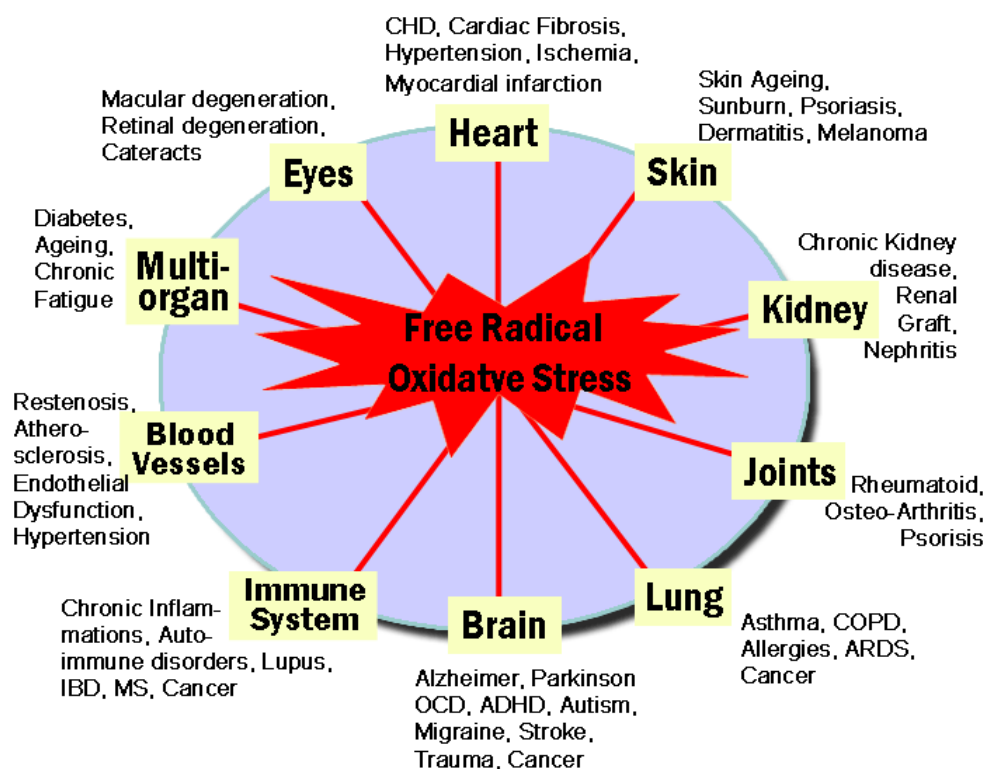
Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση. Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο

περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO· κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, αυτές που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το OH·, το RO· και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis 1987; Gruneetal. 1997; Halliwell. and Gutteridge 1999; Levine e tal. 2000; Stadtman , 1986).

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

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



Εικόνα 6: Ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.

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

1.2.6 Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες

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

- ο καρκίνος

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

Έχει διαπιστωθεί πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται και στην εμφάνιση πολλών άλλων ασθενειών όπως δρεπανοκυτταρική αναιμία, μυοκαρδιακές βλάβες, σχιζοφρένεια, διπολική διαταραχή και συνδρόμο εύθραυστου χρωμοσώματος X. Τέλος, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι εμπλέκεται και στο σύνδρομο της χρόνιας κοπώσεως (*B.N. Ames et al., 1993 ;Cooke et al., 2003*).

1.3 Φλεγμονή και οξειδωτικό στρες

1.3.1 Οξειδωτικό στρες και HMGB1:

Η πρωτεΐνη B1 της ομάδας των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (HMGB1) είναι μία άφθονη, μη ιστονική, πρωτεΐνη του πυρήνα η οποία προσδένεται στο DNA και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής της μεταγραφής και της επιδιόρθωσής του. Η HMGB1 μπορεί να ελευθερωθεί εξωκυτταρικά είτε μέσω ενεργούς έκκρισης από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα (*Wang et al., 1999*), είτε μέσω παθητικής ελευθέρωσης από κύτταρα τα οποία πεθαίνουν (*Scaffidi et al., 2002*), όπου πυροδοτεί μία πληθώρα δράσεων όπως η φλεγμονή η χημειοταξία, η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Andersson and Tracey, 2011*). Αυτές οι ενέργειες πραγματοποιούνται μετά από αλληλεπίδραση της HMGB1 με υποδοχείς οι οποίοι εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διαδικασίες και ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων PRRs (pattern recognition receptors), κυρίως τους TLR4 και RAGE (*Janko et al., 2013*). Η HMGB1 επίσης δημιουργεί διάφορα σύμπλοκα με πολλά διαφορετικά μόρια στο εξωκυτταρικό περιβάλλον,

προάγοντας επιπρόσθετες προφλεγμονώδεις διεργασίες μέσω αλληλεπίδρασής της με τους TLR2, TLR3, TLR9 και τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1R) (Bianchi, 2009; Janko et al., 2013). Η HMGB1 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της στείρας φλεγμονής (Andersson and Tracey, 2011) η οποία σχετίζεται με διάφορες οξείες και χρόνιες παθήσεις όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ηπατική ισχαιμία, το εγκεφαλικό, το κυκλοφορικό σοκ και το τραύμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, και επίσης δρα ως προφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία εμπλέκεται στην παθογένεση της σήψης (Yang et al., 2004). Έτσι, η HMGB1 φαίνεται πως είναι κεντρικός διαμεσολαβητής στη διασταύρωση μεταξύ λοιμώδους και μη λοιμώδους φλεγμονής (Andersson and Tracey, 2011).

Πολλά πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν τον ρόλο-κλειδί τον οποίο παίζει το οξειδωτικό στρες στη διαδικασία της απελευθέρωσης της HMGB1 στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Σε μία έρευνα στην οποία χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα καρδιομυοκύτταρα *in vitro*, παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε τοξικές συγκεντρώσεις περοξυνιτρίτη οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο και συσχετίστηκε με την απελευθέρωση πολύ μεγάλων ποσοτήτων HMGB1 (Loukili et al., 2011). Παρομοίως, η ομάδα του Tang (Tang et al., 2007, 2011) απέδειξε ότι η προσθήκη H₂O₂ σε ποικίλες κυτταρικές σειρές ανθρώπων και ποντικών προήγαγε την εξωκυτταρική απελευθέρωση της HMGB1 ενώ η ομάδα του Tsung (Tsung et al., 2007), έδειξε ότι οξειδωτικά μόρια προήγαγαν την ενεργητική απελευθέρωση HMGB1 από καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων μέσω σηματοδότησης κινασών οι οποίες εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη. *In vivo*, σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι με έμφραγμα του μυοκαρδίου, παρατηρήθηκε σχηματισμός σημαντικής ποσότητας περοξυνιτρίτη στο νεκρωτικό μυοκάρδιο μαζί με συσσώρευση HMGB1. Η εξάλειψη του περοξυνιτρίτη χρησιμοποιώντας καταλύτες διάσπασής του, μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου και κατέστειλε την αύξηση της συγκέντρωσης της HMGB1, γεγονός τα οποία οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο κυτταρικός θάνατος ο οποίος προκαλείται από τον περοξυνιτρίτη είναι το ερέθισμα για την συσσώρευση της καρδιακής HMGB1 κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας (Loukili et al., 2011). Έτσι, η απελευθέρωση της HMGB1 φαίνεται πως είναι μία κοινή απάντηση στο κυτταρικό στρες το οποίο

προκαλείται από ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικά μέσα *in vitro* και *in vivo*, αποτελώντας λοιπόν έναν σημαντικό μηχανισμό ο οποίος συνδέει το οξειδωτικό στρες με τη φλεγμονή.

Κάτι το οποίο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι το γεγονός ότι η HMGB1, ενώ απελευθερώνεται από κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες λόγω της παρουσίας τριών σημαντικών καταλοίπων κυστεΐνης. Η HMGB1 αποτελείται από δύο μοτίβα πρόσδεσης στο DNA, το boxA και το boxB, και μία όξινη αμινοτελική ουρά. Το boxA περιέχει δύο γειτονικές κυστεΐνες (Cys23 και Cys45), ενώ το boxB φέρει μία κυστεΐνη στη θέση 106 (Cys106) (Tang et al., 2012). Ανάλογα με το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον η HMGB1 μπορεί να βρεθεί σε τρεις μορφές, την ολοθειολική HMGB1 (και οι τρεις κυστεΐνες βρίσκονται στην ανηγμένη SH μορφή), τη δισουλφιδική HMGB1 (παρουσία δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ των Cys23 και Cys45 στο boxA) και την πλήρως οξειδωμένη HMGB1 (οξείδωση και των τριών κυστεϊνών) (Tang et al., 2012). Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η αναγνώριση των τριών δομών της HMGB1 μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό ειδικών φαρμακολογικών αναστολέων με πιθανές θεραπευτικές ενέργειες έναντι της φλεγμονής που εξαρτάται από την HMGB1 (Gero et al., 2013).

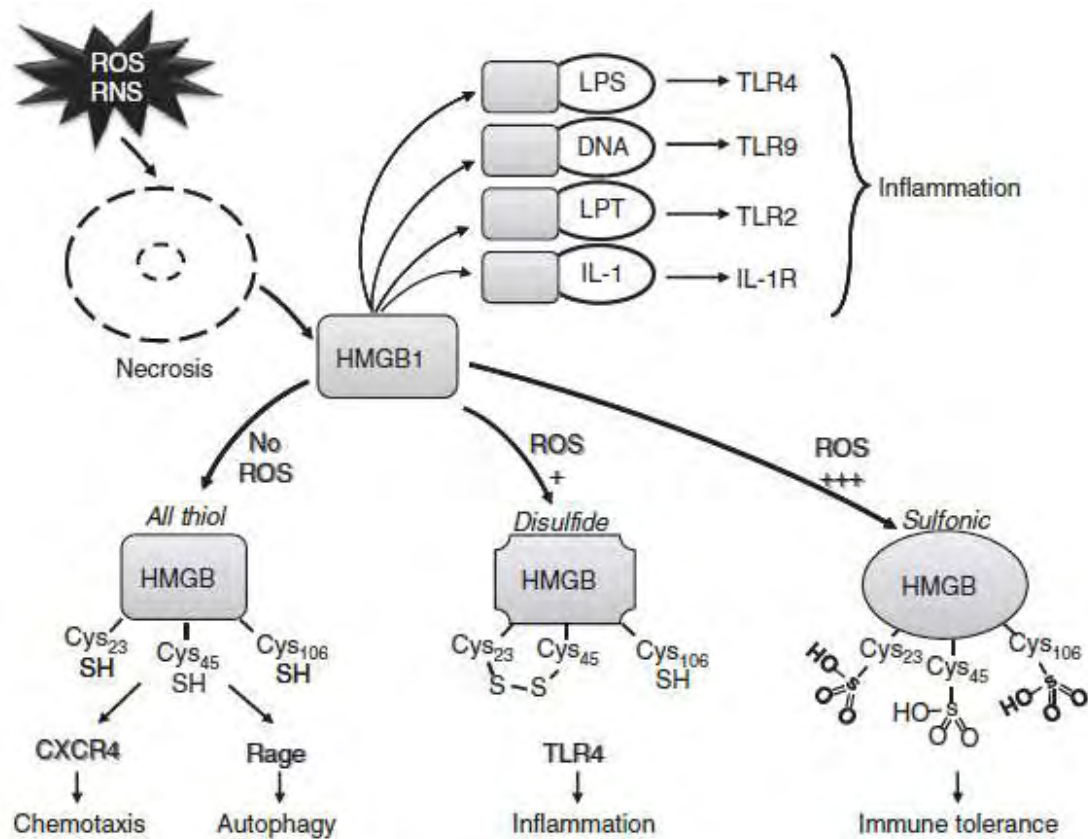
Από αυτές τις τρεις διαμορφώσεις της HMGB1 μόνο η δισουλφιδική HMGB1 έχει την ικανότητα να προσδέεται στον TLR4 και να προάγει την απάντηση της έμφυτης ανοσίας (Tang et al., 2012). Εν αντιθέσει, η ολοθειολική HMGB1 δεν μπορεί να προσδεθεί στον TLR4, αλλά έχει συσχετισθεί με την επαγωγή αυτοφαγικών αποκρίσεων σε κύτταρα στόχους μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα RAGE (Kang et al., 2011). Επιπλέον, η ολοθειολική HMGB1 δημιουργεί σύμπλοκο με την χυμοκίνη CXCL12, ώστε να προάγει ισχυρές χημειοτακτικές απαντήσεις στα λευκοκύτταρα μέσω πρόσδεσής της στον υποδοχέα CXCR4 (Venereau et al., 2012). Αυτές οι δύο διακριτές μορφές της HMGB1 είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, γεγονός το οποίο υποδηλώνει, ότι ανάλογα με το εκάστοτε μικροπεριβάλλον, η HMGB1 λειτουργεί είτε ως χημειοτακτικό είτε ως επαγωγέας απελευθέρωσης κυτοκινών (Tang et al., 2012; Venereau et al., 2012). Σε συνθήκες τραυματισμού του ιστού

in vivo οι δύο μορφές της HMGB1 είναι διαδοχικά παρούσες (πρώτα η ολοθειολική και έπειτα η δισουλφιδική) αποδεικνύοντας ότι η HMGB1 ενορχηστρώνει επιτυχώς την στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και την επαγωγή της έκκρισης κυτοκινών αποκτώντας διακριτές διαμορφώσεις (Tang et al., 2012; Venereau et al., 2012).

Εκτός από τις οξειδωτικές τροποποιήσεις, η HMGB1 μπορεί να υποστεί ακετυλίωση ενός καταλοίπου λυσίνης το οποίο βρίσκεται στην αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού. Αυτό προάγει την συσσώρευση της HMGB1 στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας την επανεισαγωγή της στον πυρήνα, καταλήγοντας στην ενεργή έκκριση της HMGB1 από μονοκύτταρα και μακροφάγα, κυρίως υπό συνθήκες ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος (Lu et al., 2012).

Για να συμπληρωθεί η εικόνα των αλληλεπιδράσεων της HMGB1 είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η HMGB1 από μόνη της μπορεί να επάγει σημαντικές οξειδοαναγωγικές τροποποιήσεις επάγοντας την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και ενεργών μορφών αζώτου (RNS) (Janko et al., 2013). Η ενεργοποίηση του TLR4 από την HMGB1 πυροδοτεί την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων που κωδικοποιούν την οξειδάση του NADPH (NOX) και της επαγωγίσιμης μορφής της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS). Ο Fan και η ομάδα του (Fan et al., 2007) έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων *in vitro* με ανασυνδυασμένη HMGB1 προκάλεσε ενεργοποίηση του NOX μέσω TLR4 και επακόλουθη παραγωγή ROS. Χρησιμοποιώντας ένα πειραματικό μοντέλο αιμορραγικού σοκ σε ποντίκια, οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν πως το αιμορραγικό σοκ σχετιζόταν με σημαντική αύξηση των επιπέδων HMGB1 στα περισσότερα όργανα μαζί με μία παράλληλη επαγωγή της NOX στα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα η οποία θα μπορούσε να κατασταλεί είτε μέσω καταστολής του TLR4 είτε μέσω αντισωμάτων εξουδετέρωσης της HMGB1 (Fan et al., 2007). Σε μία άλλη έρευνα από την ομάδα του Sappington το 2002, επώαση μονοστρωμάτων εντερικών κυττάρων Caco-2 με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη HMGB1 κατέδειξε αυξημένη έκφραση iNOS, αυξημένη παραγωγή NO και περοξυνιτρίτη, μαζί με αυξημένη επιθηλιακή διαπερατότητα, η οποία θα μπορούσε να ακυρωθεί με απομάκρυνση του NO και του περοξυνιτρίτη (Sappington

et al., 2002). Έτσι, φαίνεται πως το οξειδωτικό στρες αποτελεί και αιτία αλλά και αποτέλεσμα της απελευθέρωσης HMGB1 σε πολλές περιπτώσεις, και θα μπορούσε να υποθεθεί πως έτσι επάγεται ένας φαύλος κύκλος προοδευτικής φλεγμονώδους ενίσχυσης.



Εικόνα 7: Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη βιολογία της HMGB1

1.3.2 Οξειδωτικό στρες και TLRs: ο ρόλος των οξειδωτικών στην ενεργοποίηση των TLRs και ο ρόλος της ενεργοποίησης των TLRs στην παραγωγή οξειδωτικών.

Είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό πως το οξειδωτικό στρες πυροδοτεί την αυξημένη ικανότητα απόκρισης των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας σε προφλεγμονώδη σήματα (Botha et al., 1995; Fan et al., 1998). Ο υπεύθυνος μηχανισμός δεν είχε αποσαφηνιστεί μέχρι πρόσφατα, όταν προτάθηκε πως τα οξειδωτικά μπορούν να διεγείρουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω ενίσχυσης της σηματοδότησης μέσω TLRs. Σε μία σημαντική έρευνα από τον Powers και την ομάδα του (2006), η έκθεση μακροφάγων από τρωκτικά σε οξειδωτικά, είτε *in vivo* (χρησιμοποιώντας ένα πειραματικό μοντέλο αιμορραγικού σοκ και επαναιμάτωσης), είτε *in vitro* (μέσω άμεσης ενεργοποίησης των μακροφάγων με H₂O₂) προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στα επίπεδα του TLR4, καθώς επίσης και στην ικανότητα απάντησης των κυττάρων στο LPS. Αυτές οι δράσεις εξαρτιόνταν από την εξωκύτωση του TLR4 από τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, επειδή μπορούσαν να κατασταλούν από τη διάσπαση του κυτταροσκελετού. Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί πως η μετατόπιση του TLR4 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τον βοηθά να συνεντοπιστεί με τις «λιπιδιακές σχεδίες» ganglioside GM1, (οι οποίες είναι επιπλέουσες μικροπεριοχές μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες εξυπηρετούν ως πλατφόρμες σηματοδότησης). Τέλος, η αποτροπή της μετακίνησης του TLR4 στις λιπιδιακές σχεδίες με τη χρήση methyl-β-cyclodextrin κατέστειλε την αυξημένη ικανότητα απάντησης σε LPS λόγω οξειδωτικών (Powers et al., 2006). Αυτή, μαζί με πολλές άλλες έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν πως τα οξειδωτικά μόρια είναι απαραίτητα για την μετακίνηση του TLR4 στην κυτταρική επιφάνεια και την απάντηση σε LPS.

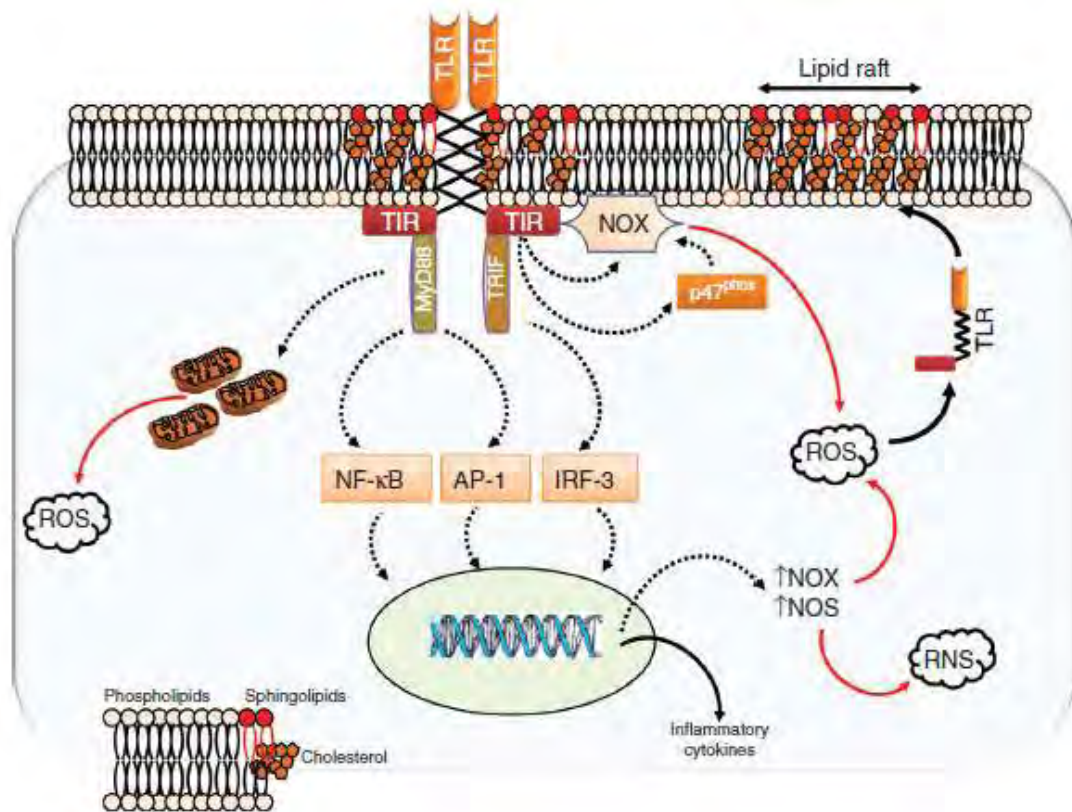
Εκτός από την συνεισφορά των οξειδωτικών στη μεταφορά των TLRs στην κυτταρική μεμβράνη, συσσωρεύονται όλο και περισσότερα στοιχεία πως η παραγωγή των ROS αποτελεί ένα σημαντικό μονοπάτι της σηματοδότησης των TLRs σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και άλλου είδους κύτταρα, η οποία συμβαίνει

κυρίως μέσω της ενεργοποίησης διάφορων ισομορφών NOX (Tsong et al., 2007; Ogier-Denis et al., 2008; Gill et al., 2010). Επιπλέον, οι καταρράκτες προφλεγμονώδων κυτοκινών οι οποίοι πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των TLRs αυξάνουν την έκφραση του iNOS και έτσι προάγουν την παραγωγή NO (Lewis et al., 2011; Shweash et al., 2011). Η επακόλουθη παραγωγή O_2^- (από την NOX) και NO $^+$ (από την iNOS) καταλήγει στην δημιουργία περοξυνιτρίτη και άλλων τοξικών RNS, υπονοώντας πως η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες οξυγόνου αλλά και αζώτου (Jozsef et al., 2006; Lucas and Maes, 2013).

Ενώ η παραγωγή οξειδωτικών μέσω TLRs είναι σημαντική για την καταπολέμηση των παθογόνων (West et al., 2011), μπορεί επίσης να οδηγήσει σε σημαντική κυτταροτοξικότητα και παράπλευρη βλάβη του ιστού σε περίπτωση στείρας φλεγμονής. Επίσης, τα οξειδωτικά μπορεί να βοηθήσουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση των TLRs, δημιουργώντας έναν κύκλο προοδευτικής ενίσχυσης της αρχικής φλεγμονώδους απόκρισης. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό στη διατήρηση της χρόνιας φλεγμονής σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες όπως σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στο σακχαρώδη διαβήτη και σε νευροεκφυλιστικές διαδικασίες (Lucas and Maes, 2013).

Η ενεργοποίηση των NOX φαίνεται πως είναι μία σημαντική διαδικασία η οποία συνδέει τους TLRs με τη δευτερεύουσα παραγωγή ROS. Αυτή η ενεργοποίηση φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα πολλών μηχανισμών, όπως αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης NOX, επαγόμενη συναρμολόγηση των υπομονάδων του ενζύμου, και της απευθείας αλληλεπίδρασης της NOX με την περιοχή TIR των TLRs. Ωστόσο, η δευτερεύουσα παραγωγή των ROS μετά από ενεργοποίηση των TLRs δεν οφείλεται μόνο στην ενεργοποίηση της NOX αλλά και στα μιτοχόνδρια. Ο West και η ομάδα του (2011), ανέφεραν πως η ενεργοποίηση κάποιων TLRs (1, 2 και 4) βοήθησε στην παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια επάγοντας την στρατολόγηση των μιτοχονδρίων στα φαγοσώματα των μακροφάγων. Αυτή η απάντηση συνέβη μέσω μετατόπισης του μορίου-προσαρμογέα TRAF6 στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας στην ουβικιτινίωση

και τον εμπλουτισμό της περιφέρειας των μιτοχονδρίων με την ECSIT (evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathways), μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην συναρμολόγηση της αναπνευστικής αλυσίδας, με επακόλουθη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS. Συνοψίζοντας, έχουν συλλεχθεί σημαντικά στοιχεία πως η αλληλεπίδραση των TLRs με ROS και RNS είναι κύριας σημασίας στην επαγωγή και τη διατήρηση της έμφυτης ανοσίας. Η στόχευση αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην πρόληψη ή την θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών (Lucas and Maes, 2013). Ωστόσο, δεδομένης της μεγάλης σημασίας της δευτερεύουσας παραγωγής ROS μέσω ενεργοποίησης των TLRs στην καταπολέμηση εισβαλλόντων παθογόνων, ο μειωμένος έλεγχος της μόλυνσης είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα σε αυτή τη στρατηγική.



Εικόνα 8: Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο οξειδωτικό στρες και στους Toll-like υποδοχείς

1.3.3 Nod-like υποδοχείς και φλεγμονόσωμα:

Οι NLRs βρίσκονται στο κυτοσόλιο και ανιχνεύουν διάφορα PAMPs και DAMPs. Έχουν μία κοινή δομή η οποία αποτελείται από μία καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης για αλληλεπίδραση με τον προσδέτη, μία κεντρική περιοχή σύνδεσης σε νουκλεοτίδια και ολιγομερισμού για ενεργοποίηση και ένα αμινοτελικό άκρο για αλληλεπίδραση με τους τελεστές. Η δομή του αμινοτελικού άκρου ορίζει τις διάφορες υποοικογένειες NLRs (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP και NLRX) (Kesse et al., 2011). Έπειτα από ενεργοποίησή τους οι NLRP και NLRC δημιουργούν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα φλεγμονοσώματα, τα οποία έπειτα σχηματίζουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη-προσαρμογέα ASC (apoptosis associated speck-like containing a CARD domain) και την κασπάση-1. Αφού ενεργοποιηθεί το φλεγμονόσωμα προάγει την ωρίμανση της pro-IL-1 β και της pro-IL18 σε ώριμες IL-1 β και IL-18 οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της φλεγμονής (Martinon et al., 2009).

Το φλεγμονόσωμα NLRP3 είναι μέχρι στιγμής το πιο μελετημένο από αυτή την οικογένεια. Δύο σήματα είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του NLRP3, αρχικά η ενεργοποίηση του NF- κ B μέσω των TLRs, γεγονός το οποίο θα οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης του NLRP3 και της pro-IL1 β , και έπειτα, ένα σήμα ενεργοποίησης του NLRP3. Ο NLRP3 ενεργοποιείται από μία πληθώρα σημάτων, εξωγενών και ενδογενών. Στους εξωγενείς ενεργοποιητές του NLRP3 συγκαταλέγονται διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες αλλά και μη μολυσματικοί παράγοντες όπως κρυσταλλικές δομές οι οποίες είναι υπεύθυνες για φλεγμονώδεις παθήσεις των πνευμόνων (διοξειδίο του πυριτίου και αμίαντος) καθώς και συγκεκριμένες δομές όπως το μείγμα μετάλλων Co-Cr-Mo το οποίο χρησιμοποιείται ως προσθετικό ορθοπεδικό υλικό.

Πολλαπλά ενδογενή σήματα τα οποία προέρχονται από τον ίδιο τον οργανισμό μπορούν να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση του NLRP3 οδηγώντας σε διάφορες οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις διαδικασίες. Διάφορα είδη κρυστάλλων όπως ουρικό μονονάτριο, πυροφοσφωρικό ασβέστιο και οξαλικό ασβέστιο ενεργοποιούν τον NLRP3 επάγοντας τη φλεγμονή των αρθρώσεων σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα (Busso and Ea, 2012), καθώς επίσης και τη νεφρική βλάβη στην κρυσταλλική νεφροπάθεια (νεφροασβέστωση) (Mulay et al., 2013). Κρύσταλλοι χοληστερόλης γίνονται επίσης αντιληπτοί από τον NLRP3 προάγοντας φλεγμονή εξαρτώμενη από την ιντερλευκίνη-1β, διαδικασία η οποία είναι υπεύθυνη για την αθηρογένεση (Duelletal., 2010). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η ενεργοποίηση του NLRP3 στη μικρογλοία λόγω συσσωμάτων εξωκυτταρικού αδιάλυτου β-αμυλοειδούς πεπτιδίου είναι ένας βασικός μηχανισμός νευροφλεγμονής η οποία εμπλέκεται στην παθολογία του Alzheimer (Heneka et al., 2013). Ο NLRP3 ενεργοποιείται επίσης από τραυματισμό ιστού, κυρίως από το υαλουρονικό οξύ το οποίο απελευθερώνεται από τον εξωκυτταρικό σκελετό (Yamasaki et al., 2009) και από την απελευθέρωση ATP από κύτταρα που πεθαίνουν, προκαλώντας την ανάπτυξη στείρας φλεγμονής σε συνθήκες όπως πχ. η ισχαιμία, καρκίνος, κυκλοφορικό σοκ κ.α.

1.3.4 Ενεργοποίηση του NLRP3: ο ρόλος του οξειδωτικού στρες.

Ο μεγάλος αριθμός των ενεργοποιητών του NLRP3 υποδεικνύει πως είναι πιο πιθανό η ενεργοποίηση του NLRP3 να είναι αποτέλεσμα κυτταρικού στρες το οποίο προκαλείται από τα διάφορα αυτά σήματα (Lamkanfi and Dixit 2012) παρά από την άμεση αλληλεπίδραση του NLRP3 με αυτά. Τρεις κύριοι μηχανισμοί θεωρούνται σήμερα ως υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση του NLRP3. Ο πρώτος ονομάζεται «μοντέλο καναλιών» και σχετίζεται με την εκροή K^+ από το κύτταρο (Tschopp and Schroder, 2010). Σε αυτό το μοντέλο, η εκροή K^+ είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του πουρινεργικού υποδοχέα P2X7 από εξωκυτταρικό ATP και της επακόλουθης δημιουργίας πόρων μετά από στρατολόγηση της παννεξίνης 1

(Pelegrin and Surprenant, 2006) ή προκαλείται από μικροβιακές τοξίνες οι οποίες δημιουργούν πόρους όπως η νιγερισίνη και η αιμολυσίνη (Lamkanfi and Dixit, 2012). Το δεύτερο μοντέλο ονομάζεται «μοντέλο ρήξης λυσοσωμάτων» (Tschopp and Schroder, 2010) και προκαλείται από την αποσταθεροποίηση και ρήξη των φαγολυσοσωμάτων. Μετά από τη ρήξη των λυσοσωμάτων απελευθερώνεται η λυσοσωμική πρωτεΐνη καθρεψίνη-β η οποία ενεργοποιεί τον NLRP3 (Hornung et al., 2008).

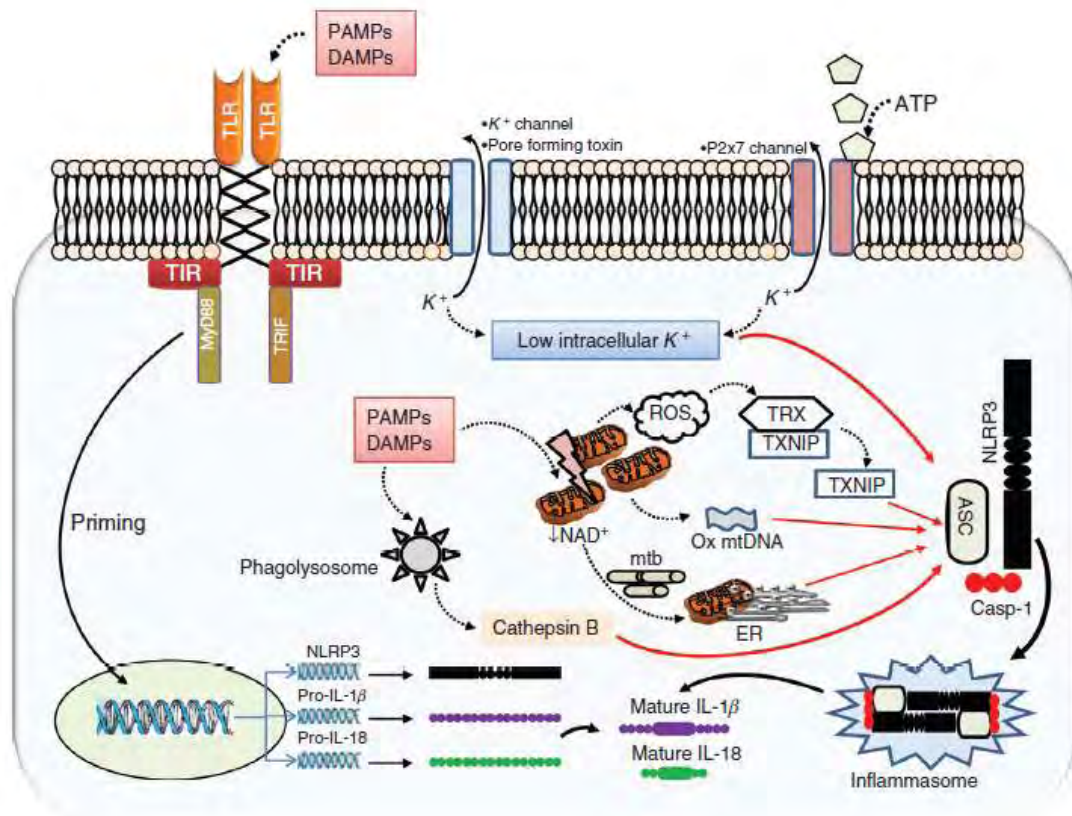
Το τρίτο μοντέλο ονομάζεται «μοντέλο των ενεργών μορφών οξυγόνου» (Tschopp and Schroder, 2010) και εμπλέκει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), την αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου και το μιτοχονδριακό στρες ως μηχανισμούς ενεργοποίησης του NLRP3. Δύο είναι τα κύρια επιχειρήματα που υποστηρίζουν αυτό το μοντέλο. Πρώτον, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως όλοι οι ενεργοποιητές του NLRP3 είναι ικανοί να επάγουν την παραγωγή ενδοκυτταρικών ROS και δεύτερον, η χορήγηση ουσιών που απομακρύνουν τις ROSεμποδίζει την ενεργοποίηση του NLRP3 από πολλούς αγωνιστές (Tschopp and Schroder, 2010). Η ομάδα του Zhou (Zhou et al., 2010), έχει προτείνει ως πιθανό μοριακό σύνδεσμο ο οποίος συνδέει το οξειδωτικό στρες με την ενεργοποίηση του NLRP3, την πρωτεΐνη TXNIP (thioredoxin-interacting protein). Η TXNIP είναι μέλος της οικογένειας των α-αρρεστινών, η οποία συνδέεται στη θειορεδοξίνη (TRX), δρώντας ως αρνητικός ρυθμιστής της ενεργότητας αναγωγάσης της θειορεδοξίνης (Yoshioka et al., 2012). Στη μελέτη τους, ο Zhou και η ομάδα του έδειξαν αρχικά πως η TXNIP έχει την ικανότητα να προσδένεται στον NLRP3 σε εμβρυονικά T νεφρικά κύτταρα ανθρώπων. Έπειτα έδειξαν ότι πολλοί αγωνιστές του NLRP3 όπως το ουρικό μονονάτριο και η imidazoquinolineimidiquimod (R-837) προήγαγαν τη σύνδεση του NLRP3 με την TXNIP, τον επακόλουθο σχηματισμό του φλεγμονοσώματος και την έκκριση ιντερλευκίνης-1β. Η αλληλεπίδραση του NLRP3 με την TXNIP εξαρτάται από τη δευτερεύουσα παραγωγή ROS την οποία προκαλούν αυτοί οι αγωνιστές. Αυτές οι ROS προκαλούν τη διάλυση του συμπλόκου της θειορεδοξίνης με την TXNIP και αυτή είναι πλέον ελεύθερη για σύνδεση με τον NLRP3.

Η επαλήθευση της υπόθεσης ότι οι ROS δρουν ως δευτεροί διαμεσολαβητές υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση του NLRP3 απαιτεί την εύρεση της πηγής αυτών των ROS. Κάποιες έρευνες έδειξαν πως αναστολείς NOX ή σίγαση της έκφρασης της p22^{phox} υπομονάδας της NOX κατέστειλαν την παραγωγή ROS σε κύτταρα τα οποία είχαν επωασθεί με αμίαντο, ουρικό μονονάτριο και ATP. Ωστόσο κάποια άλλα πειράματα έδειξαν πως η παραγωγή ROS μέσω του NOX δεν έχει άμεση σχέση με την ενεργοποίηση του NLRP3.

Πρόσφατες έρευνες έχουν εμπλέξει τα μιτοχόνδρια ως πρωταρχική πηγή των ROS οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του NLRP3 (Zhou et al., 2011; Martinon, 2012). Πολλοί ενεργοποιητές του NLRP3 έχει αποδειχθεί πως επηρεάζουν το δυναμικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, πιθανώς ως συνέπεια κυτταρικής εκροής καλίου η οποία προκάλεσε μεταβολές μεταβολές στον όγκο της μιτοχονδριακής μήτρας. Η επακόλουθη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προάγει την όλο και μεγαλύτερη παραγωγή ROS από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγώντας σε οξειδωση του μιτοχονδριακού DNA και απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα όπου προσδένεται στον NLRP3 και τον ενεργοποιεί. Έτσι, το οξειδωμένο μιτοχονδριακό DNA αναφαίνεται ως σημαντικό δευτερεύον μόριο κινδύνου το οποίο συνδέει πολλές μορφές κυτταρικού στρες με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (Martinon, 2012).

Οι τελευταίες εξελίξεις στη μοριακή βιολογία του NLRP3 παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση του μηχανισμού που ελέγχει την έναρξη και τη συνέχιση της φλεγμονής σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Τα μιτοχόνδρια είναι ευπαθείς στόχοι πολλών παραγόντων κυτταρικού στρες, και έτσι είναι σε θέση να αντιληφθούν επιβλαβή ερεθίσματα και να αποκριθούν σε αυτά. Αυτά τα ερεθίσματα επηρεάζουν το φυσιολογικό μεταβολισμό του μιτοχονδρίου προκαλώντας τη μείωση του κυτταρικού NAD⁺, την παραγωγή ROS και την απελευθέρωση οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA. Ενώ αυτοί οι μηχανισμοί έχουν

αναγνωριστεί εδώ και καιρό ως αιτίες κυτταρικού θανάτου, αρχίζει σιγά σιγά να θεωρείται πως παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση φλεγμονώδων διαδικασιών ενεργοποιώντας τον NLRP3. Ως εκ τούτου, πέρα από τον ρόλο τους στο να ελέγχουν τις διαδικασίες θανάτου, θεωρούνται πλέον ως κύριοι ρυθμιστές της έμφυτης ανοσίας, γεγονός που εξηγεί τη συχνή συσχέτιση της μιτοχονδριακής βλάβης με οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις.



Εικόνα 9: Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην ενεργοποίηση του NLRP3

2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε χειρουργημένους ασθενείς με σήψη ή συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για τον σκοπό αυτό έγιναν καθημερινές αιμοληψίες σε 16 ασθενείς και μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (CARBONYLS). Τέλος, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της βαρύτητας της ασθένειας των ατόμων, σύμφωνα με τιμές που προέκυψαν από το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II¹³ και των δεικτών οξειδωτικού στρες TAC, TBARS και CARBONYLS.

* Η κλίμακα APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμολόγησης που περιλαμβάνει: α) 12 φυσιολογικές παραμέτρους (που λαμβάνονται από το φάκελο του ασθενή κατά το πρώτο 24ωρο νοσηλείας του στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας), β) την ηλικία και γ) την προηγούμενη γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς, με στόχο να παρέχει μια γενική αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου. Η μέγιστη τιμή που μπορεί να λάβει είναι 71 βαθμοί. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα (μπορεί να προβλέψει την επιβίωση σε ποσοστό 90%), αλλά χαμηλή σχετικά ευαισθησία (μικρότερη ακρίβεια στην πρόβλεψη της θνητότητας).

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

3.1.1 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

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

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

Αντιδραστήρια

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

MB (Tris): 121.14

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

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

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

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

MB (TBA): 144.1

MB (Na_2SO_4): 142.04

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

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μl πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μl TCA 35% και 500 μl Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 ml Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.
5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 ml TCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 ml σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

(mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L to $\mu\text{mol/L}$.

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

Χρήσιμες πληροφορίες

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

Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας σε οργανικά διαλύματα.

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

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 × 31 × 2, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μl) με τον όγκο του αιμολύματος (100 μl) (3100 / 100 = 31) και το 2 προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων με απιονισμένο νερό. Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/Lto μmol/L.

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

3.1.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα (PC)

Αρχή της μεθόδου

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

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

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

Αντιδραστήρια

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

Για να φτιάξουμε 100 ml διαλύματος 2.5 NHCl, προσθέτουμε αργά 24.6 ml του 37% HCl (ίσο με 10.1 NHCl) σε ≈70 ml απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 ml με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5

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

- *DNPH 14 mM (MB: 198.1)*

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

- *Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)*

Για να φτιάξουμε 100 ml 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2NHCl), διαλύουμε 30 g ουρίας σε ≈70 ml απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 ml με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 6. Προσθέτουμε 1 ml από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
 7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 8. Προσθέτουμε 0.5 ml αιθανόλης και 0.5 ml οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μείγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
 9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.
 10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 11. Προσθέτουμε 1 ml 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
 12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
 13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.
- *(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί

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

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

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μl στην κυψελίδα /50 μl δείγματος).

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

$$\text{Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg)} = \text{συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/ml} / \text{συγκ. πρωτ mg/ml}$$

$$\text{Συγκέντρωση πρωτεϊνών} = 70 \text{ mg/ml}$$

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

Υπολογισμοί

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

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

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

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

Συγκέντρωση καρβονυλίων ανά mg αιμοσφαιρίνης

Protein carbonyls (nmol/ mgHb)

3.1.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) του πλάσματος

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 του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

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

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

Αντιδραστήρια

- *Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)*
- MB (KH_2PO_4): 136
- MB (Na_2HPO_4): 178

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

- *DPPH 0.1 mM, MB: 394.32*

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

- *Ασκορβικό οξύ 10 mM*

Είναι έτοιμο προς χρήση.

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

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

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

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

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

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

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

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

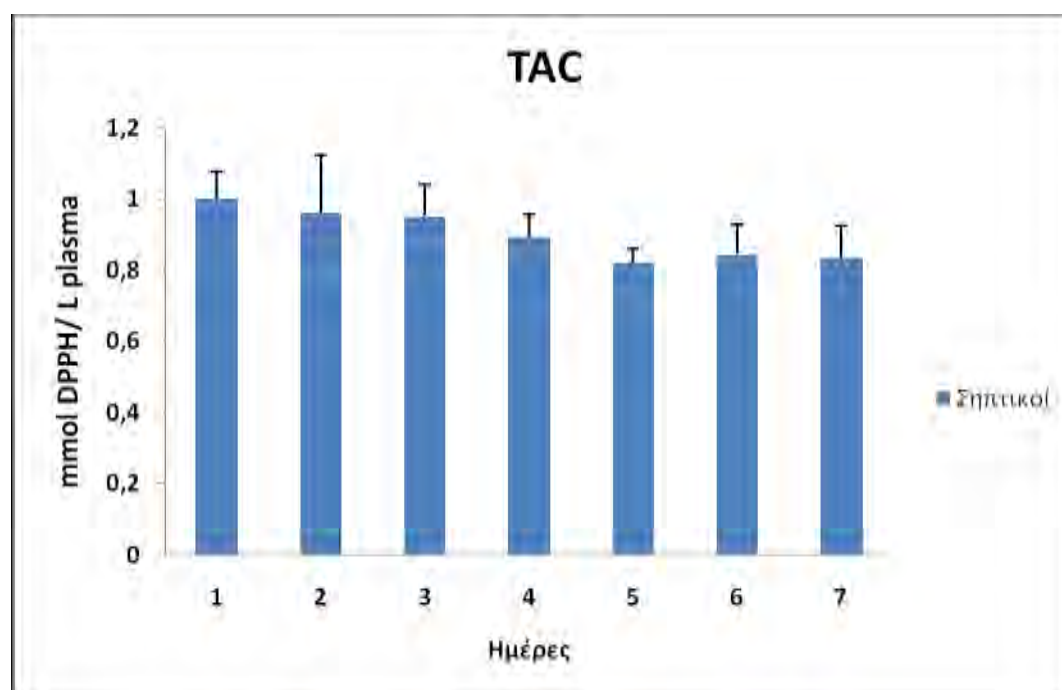
3.2 Στατιστική ανάλυση

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

4. Αποτελέσματα

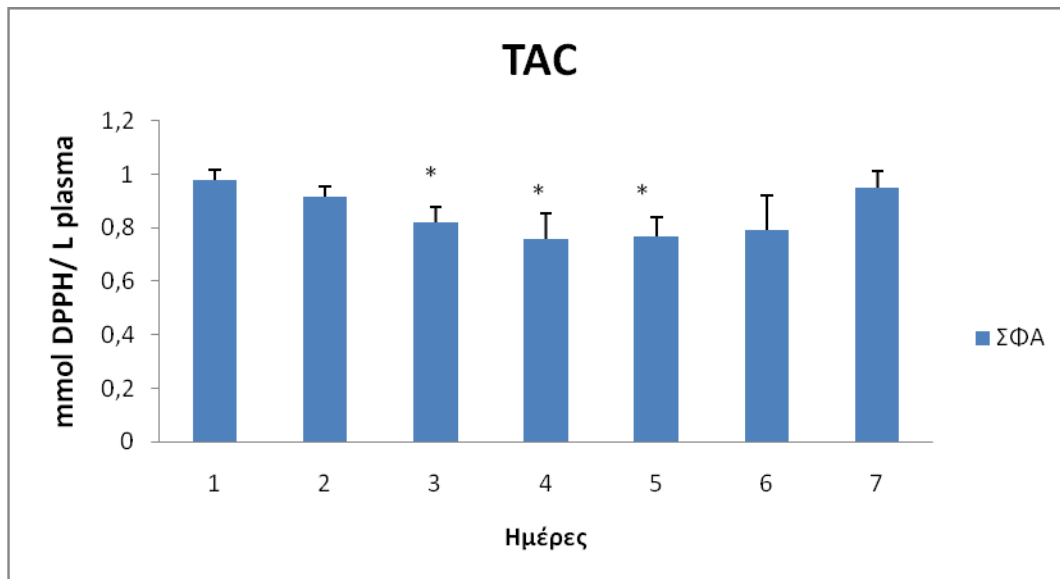
Οι 16 ασθενείς που εξετάσθηκαν χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, αυτούς που έπασχαν από σήψη (n=4) και αυτούς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (n=12). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δείγματα υγιών ατόμων (n=24). Ως πρώτη μέρα δειγματοληψίας ορίζεται η πρώτη ημέρα που εισήχθησαν στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ).

4.1. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAC)



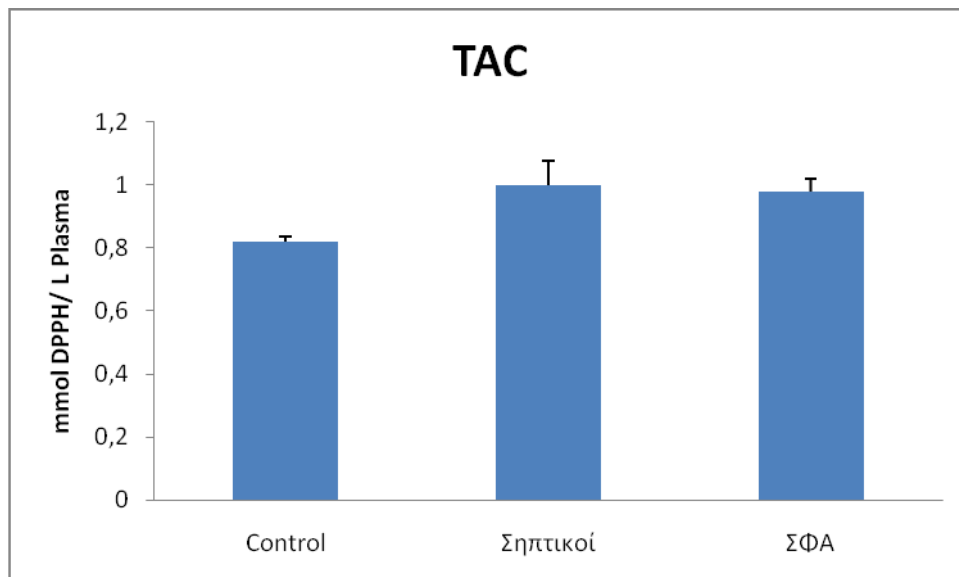
Διάγραμμα 5: Ημερήσια επίπεδα TAC σηπτικών ασθενών.

Στους σηπτικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα TAC στην πάροδο 7 ημερών, ωστόσο υπήρχε μία τάση μείωσης στην 5^η ημέρα.



Διάγραμμα 6: Ημερήσια επίπεδα TAC ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

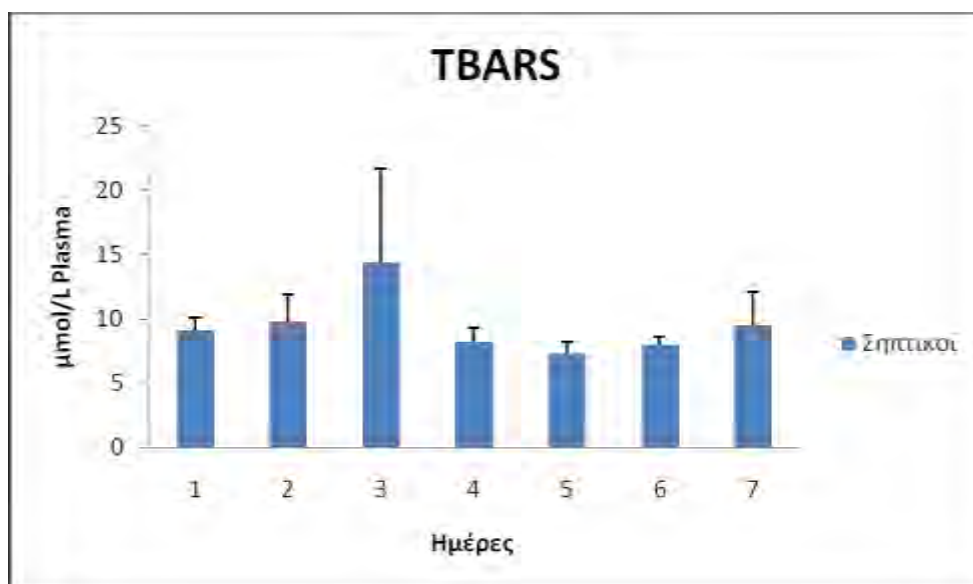
Στους ασθενείς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας την 3^η, 4^η και 5^η ημέρα, ωστόσο την 6^η ημέρα αυτή άρχισε να αυξάνεται και πάλι.



Διάγραμμα 7: Σύγκριση τιμών TAC ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

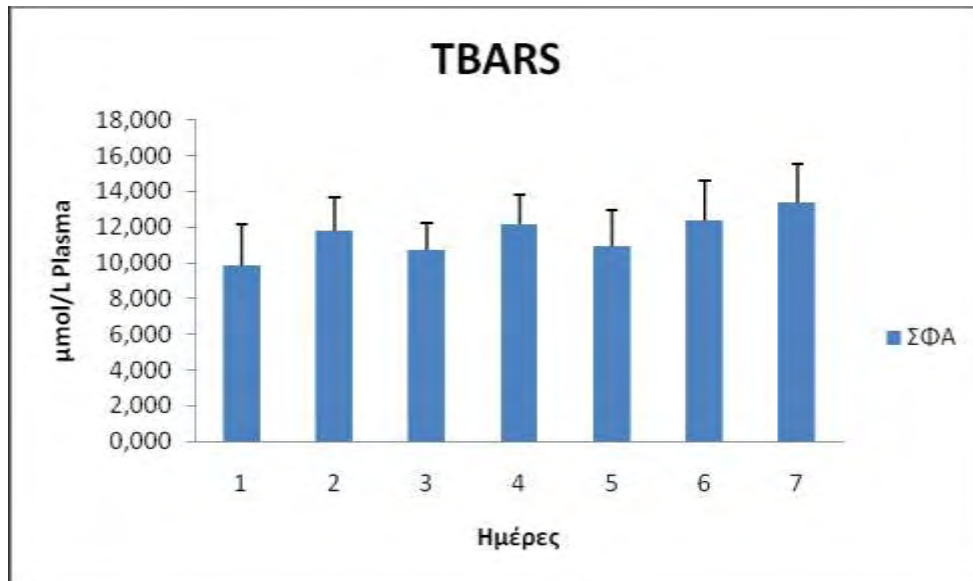
Συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης ημέρας εισαγωγής των ασθενών στη ΜΕΘ (ασθενείς που πάσχουν από σήψη και ασθενείς που έχουν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση) παρατηρούμε πως υπάρχει μια τάση αύξησης της TAC και στις δύο ομάδες ασθενών, χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

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



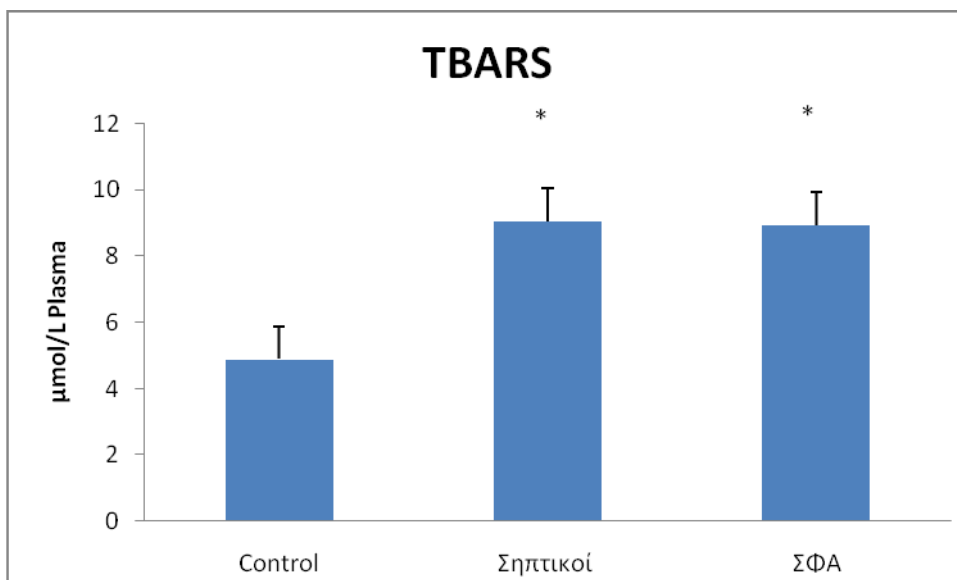
Διάγραμμα 8: Ημερήσια επίπεδα TBARS σηπτικών ασθενών

Στους σηπτικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των TBARS στην πάροδο 7 ημερών.



Διάγραμμα 9: Ημερήσια επίπεδα TBARS ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

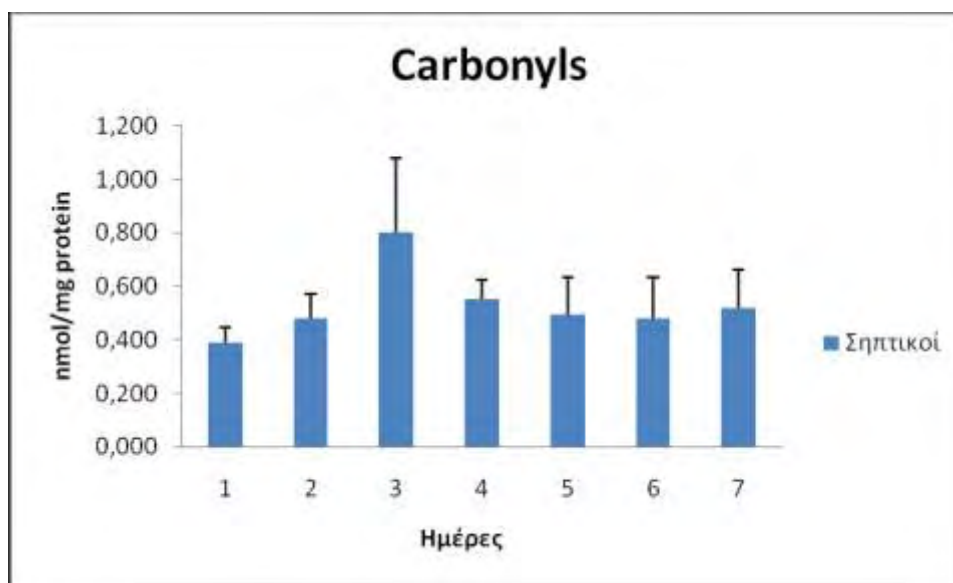
Στους ασθενείς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των TBARS στην πάροδο 7 ημερών.



Διάγραμμα 10: Σύγκριση τιμών TBARS ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

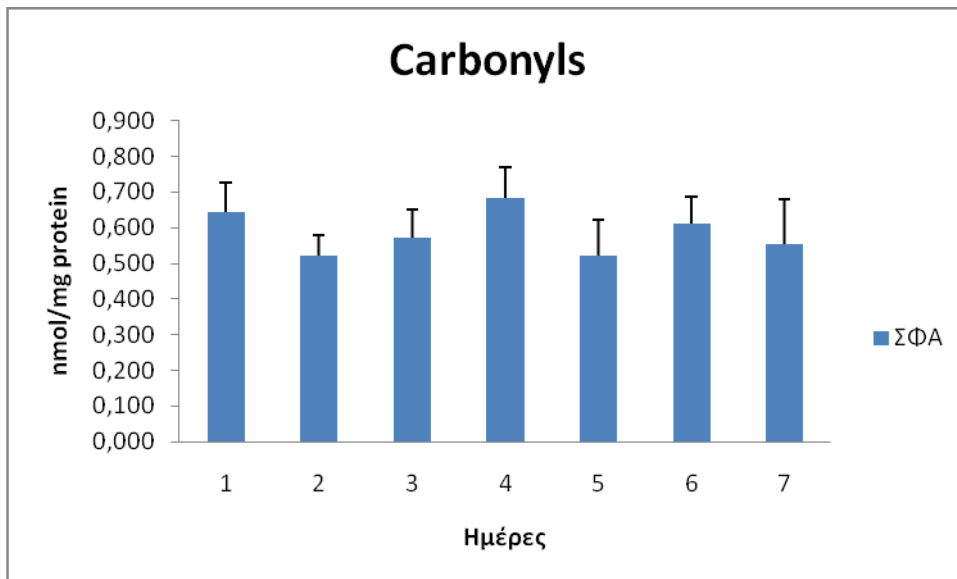
Συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης ημέρας εισαγωγής των ασθενών στη ΜΕΘ (ασθενείς που πάσχουν από σήψη και ασθενείς που έχουν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση) παρατηρούμε πως υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στο πλάσμα των ασθενών.

4.3 Αποτελέσματα Μέτρησης Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων



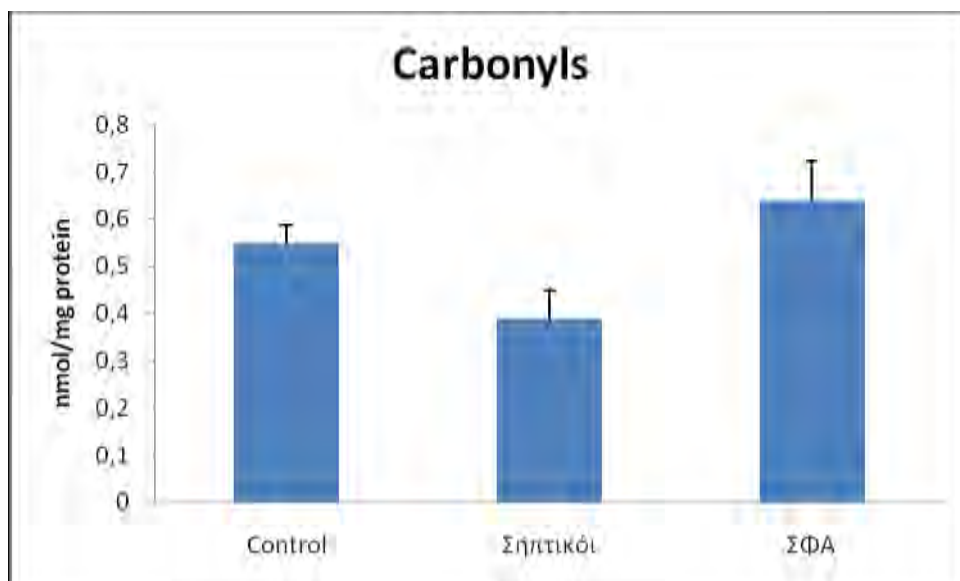
Διάγραμμα 11: Ημερήσια επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σηπτικών ασθενών

Στους σηπτικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην πάροδο 7 ημερών.



Διάγραμμα 12: Ημερήσια επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων ασθενών με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

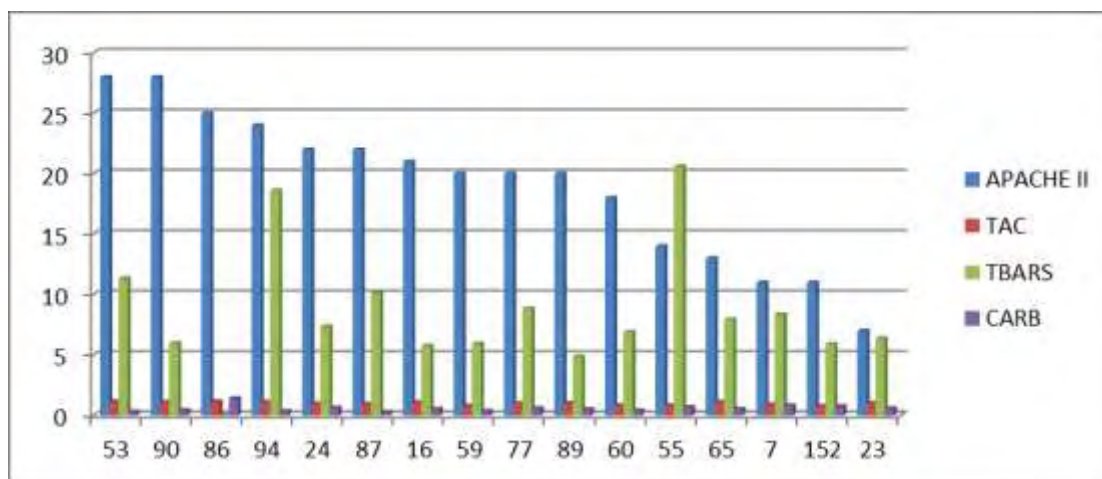
Στους ασθενείς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην πάροδο 7 ημερών.



Διάγραμμα 13: Σύγκριση τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάμεσα σε υγιή άτομα, ασθενείς με σήψη και ασθενείς με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση.

Συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης ημέρας εισαγωγής των ασθενών στη ΜΕΘ (ασθενείς που πάσχουν από σήψη και ασθενείς που έχουν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση) παρατηρούμε πως δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταξύ των τριών ομάδων.

4.4 Συσχέτιση της βαρύτητας ασθένειας και των δεικτών οξειδωτικού στρες TAC, TBARS και καρβονύλια.



Διάγραμμα 14: Σύγκριση βαρύτητας ασθένειας σε σχέση με τους δείκτες TAC, TBARS και CARBONYLS.

Σε αυτό το διάγραμμα εμφανίζονται οι τιμές βαρύτητας ασθένειας των ατόμων με SIRS ή σήψη σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης APACHE II σε σύγκριση με τις τιμές TAC, TBARS και CARBONYLS κατά την πρώτη μέρα νοσηλείας των ασθενών. Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι η βαρύτητα της ασθένειας δεν επηρεάζει τις τιμές των δεικτών του οξειδωτικού στρες. Έπειτα από στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Spearman βρέθηκε πως οι συντελεστές συσχέτισης του δείκτη APACHE II με κάθε δείκτη οξειδωτικού στρες είναι: για την TAC $r=0.554$, για τα TBARS $r=0.031$ και για τα καρβονύλια $r=-0.441$. Καμία από τις τιμές δεν είναι στατιστικά σημαντική.

5. Συζήτηση

Παρά τις προόδους στην μετεγχειρητική περίθαλψη των ασθενών, η σήψη παραμένει η κύρια αιτία θανάτου στις μη καρδιακές μονάδες εντατικής θεραπείας και η δέκατη αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Εκτιμάται πως στις Η.Π.Α. σημειώνονται περισσότερα από 1.1 εκατομμύριο περιστατικά σήψης ενώ η συχνότητα εμφάνισής της μεγαλώνει με την αύξηση της ηλικίας. Η συχνότητα εμφάνισης σήψης σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία των ΗΠΑ είναι 208 περιπτώσεις ανά 10.000 ασθενείς με τη θνησιμότητα των εν λόγω ασθενών να βρίσκεται στο 30%. Οι χειρουργημένοι ασθενείς αναλογούν στο ένα τρίτο των ασθενών που εμφανίζουν σηπτικά σύνδρομα.

Η παθοφυσιολογία της σήψης χαρακτηρίζεται από μία σειρά γεγονότων συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και μεταλλαγών στο σύστημα πήξεως, οι οποίες οδηγούν σε διαταραχές στην μεταφορά οξυγόνου και μεταβολικών υποστρωμάτων στους ιστούς, σε οργανική ανεπάρκεια και τελικά στον θάνατο. Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης και της σήψης και σχετίζεται με τη σοβαρότητα και την έκβαση της ασθένειας. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών οι οποίοι τις εξουδετερώνουν.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να καταδείξει πώς το οξειδωτικό στρες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου σε χειρουργημένους ασθενείς με σήψη ή συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Για τον σκοπό αυτό έγιναν καθημερινές αιμοληψίες σε 16 ασθενείς και μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος (TBARS) και η οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος (protein carbonyls).

Σύμφωνα με την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών του πλάσματος (TAC), στους σηπτικούς ασθενείς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα TAC στην πάροδο 7 ημερών. Στους ασθενείς που είχαν αναπτύξει συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση παρατηρήθηκε

μία στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας την 3^η, 4^η και 5^η ημέρα, ωστόσο την 6^η μέρα αυτή άρχισε να αυξάνεται και πάλι. Συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης μέρας εισαγωγής των ασθενών και των δύο ομάδων στη ΜΕΘ παρατηρούμε πως υπάρχει μια τάση αύξησης της TAC και στις δύο ομάδες ασθενών, χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Σύμφωνα με τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των TBARS στην πάροδο 7 ημερών σε καμία από τις δύο ομάδες. Ωστόσο, συγκρίνοντας τις τιμές υγιών ατόμων με τις τιμές της πρώτης μέρας εισαγωγής των ασθενών και των δύο ομάδων στη ΜΕΘ, παρατηρούμε πως υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TBARS στο πλάσμα των ασθενών. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων παρατηρείται συχνά σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, καθώς τα λιπίδια αποτελούν στόχους των ROS προκαλώντας μία αλυσιδωτή αντίδραση, τη λιπιδική υπεροξείδωση. Αυξημένες τιμές TBARS σηπτικών ασθενών έχουν συσχετισθεί με αυξημένη θνησιμότητα (Lorente et. al, 2013).

Όσον αφορά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (protein carbonyls), δεν παρατηρήθηκαν σε καμία απ τις δύο ομάδες στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην εμφάνιση σήψης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες σε σηπτικούς ασθενείς βρέθηκαν αυξημένοι δείκτες οξειδωτικού στρες. Στην συγκεκριμένη μελέτη μόνο τα αποτελέσματα της TAC ήταν στατιστικώς σημαντικά, ενώ τα αποτελέσματα των TBARS και PC δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Αυτή η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως παραδείγματος χάριν στην ηλικία των ασθενών, στη σοβαρότητα της κατάστασής τους, στη φαρμακευτική αγωγή που λάβανε, στην αιτία η οποία προκάλεσε τη συστηματική φλεγμονή κ.α. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας έτσι ώστε να αποκαλυφθεί πλήρως η συνεργιστική δράση σήψης και οξειδωτικού στρες και να γίνει εφικτή η θεραπεία ασθενών που πάσχουν από την ασθένεια.

Βιβλιογραφία

- Andrew Leverand Iain Mackenzie ***Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis***, BMJ Oct 27, 2007; 335(7625): 879–883
- Baudouin-Cornu P., Thomas D. 2007. ***Evolutionary biology: oxygen at life's boundaries***. Nature 445, 35–36
- Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA ***Crit Care Med***. 1989 May; 17(5):389-93) ***Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis*** Study Group.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ ***Chest*** ***Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis***. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992 Jun; 101(6):1644-55.
- Craig N. Morrell ***Reactive Oxygen Species Finding the Right Balance*** Circ Res. Sep 12, 2008; 103(6): 571–572
- David F. Stowe and Amadou K. S. Camara ***Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function***, Antioxid Redox Signal. Jun 2009; 11(6): 1373–1414.
- Deborah J. Stearns-Kurosawa, Marcin F. Osuchowski, Catherine Valentine, Shinichiro Kurosawa, and Daniel G. Remick ***The Pathogenesis of Sepsis***, Annu Rev Pathol. 2011; 6: 19–48.
- Derek S. Wheeler ***Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis***, Oct 2011
- Diana Mühl, Gábor Woth, Livia Drenkovics, Adrienn Varga, Subhamay Ghosh, Csaba Csontos, Lajos Bogár, György Wéber, János Lantos ***Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury*** , Indian Journal of Medical Research, 2011
- Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. 1998. ***Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia***. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:12637–12640
- Federman DD ***N Engl J Med*** ***The biology of human sex differences***, 2006 Apr 6; 354(14):1507-14.

- Hess M.L., Manson N.H ***Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury.*** 1984 (November) J. Mol. Cell. Cardiol. 16(11):969–985.
- John W Baynes and Marek H Dominiczak, 2012 ***Medical Biochemistry***, chapter *The beneficial effects of reactive oxygen species*)
- Jones A.E., Puskarich M.A., 2009. ***Sepsis - Induced Tissue Hypoper fusion.*** *Critical Care Clinics*, 25, pp. 769–779.
- Jones DP. ***Redefining oxidative stress.*** *Antioxid Redox Signal.* 2006 8:1865–1879.
- Kendra N. Iskander, Marcin F. Osuchowski, Deborah J. Stearns-Kurosawa, Shinichiro Kurosawa, David Stepien, Catherine Valentine, and Daniel G. Remick ***Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding*** *Physiol Rev.* Jul 2013; 93(3): 1247–1288.
- Kumar, Anand MD; Roberts, Daniel MD; Wood, Kenneth E. DO; Light, Bruce MD; Parrillo, Joseph E. MD; Sharma, Satendra MD; Suppes, Robert BSc; Feinstein, Daniel MD; Zanotti, Sergio MD; Taiberg, Leo MD; Gurka, David MD; Kumar, Aseem PhD; Cheang, Mary MSc ***Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock**** , © 2006 Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 34(6), June 2006, pp 1589-1596
- Lee P. Skrupky, Pharm.D., B.C.P.S., Paul W. Kerby, M.B B.S., and Richard S. Hotchkiss, M.D, ***Advances in the Management of Sepsis and in the Understanding of Key Immunologic Defects of the Disorder*** *Anesthesiology.* Dec 2011; 115(6): 1349–1362.
- Leigh Boardman, John S. Terblanche, Stefan K. Hetz, Elrike Marais and Steven L. Chown ***Reactive oxygen species production and discontinuous gas exchange in insects*** , 24 Aug 2011
- Marshall JC. ***SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care?*** , 2000 Dec, 14(6):586-9.
- Martin GS, Mannino DM, Moss M ***The effect of age on the development and outcome of adult sepsis*** *Crit Care Med.* 2006Jan, 34(1):15-21.

- Ronan M. G. Berg, Kirsten Moller and Damian M. Bailey, ***Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis***, July 2011 J Cereb Blood Flow Metab 31(7): 1532–1544.
- Sies H. ***Oxidative Stress***. 1985 London Academic
- Scott K. Powers and Malcolm J. Jackson ***Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production*** Physiol Rev. Jul 23, 2010. Physiol Rev. Oct 2008; 88(4): 1243–1276.
- Weiss SL, Deutschman CS. ***Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to 'stress' about?*** Crit Care. 2014 Mar 19;18(2):125.
- Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH ***Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males***. Crit Care Med. 1997 Jan; 25(1):106-10.
- Mette M. Berger, MD, PhD; René L. Chioléro, MD ***Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome***. Crit Care Med 2007 Vol 35
- Adriana Cristina Galbiati Parminondi Elias PhD, RN , Tiemi Matsuo PhD, Cintia Magalhães Carvalho Grion MD, PhD, Lucienne Tibery Queiroz Cardoso MD, PhD, Paulo Henrique Verri ***Incidence and risk factors for sepsis in surgical patients: A cohort study***. Journal of Critical Care (2012) 27, 159–166
- M. Zakkar, R. Ascione, A.F. James, G.D. Angelini, M.S. Suleiman ***Inflammation, oxidative stress and postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery***. Pharmacology & Therapeutics 154 (2015) 13–20
- Maria Karapetsa, Marina Pitsika, Nikos Goutzourelas, Dimitrios Stagos, Aphrodite Tousia Becker, Epaminondas Zakynthinos ***Oxidative status in ICU patients with septic shock***. Food and Chemical Toxicology 61 (2013) 106–111
- J. Macdonald, H.F. Galley and N. R. Webster ***Oxidative stress and gene expression in sepsis***. British Journal of Anaesthesia 90 (2): 221±32 (2003)
- H. F. Galley ***Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis*** British Journal of Anaesthesia 107 (1): 57–64 (2011)
- José M. Alonso de Vega, MD; Julián Díaz, PhD; Enrique Serrano, MD; Luis F. Carbonell, MD ***Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome*** Crit Care Med 2002 Vol. 30, No. 8

- David Bar-Or, Raphael Bar-Or, Leonard T. Rael, Edward N. Brody ***Oxidative stress in severe acute illness*** Redox Biology 4 (2015) 340–345
- Kendra N. Iskander, Marcin F. Osuchowski, Deborah J. Stearns-Kurosawa, Shinichiro Kurosawa, David Stepien, Catherine Valentine, and Daniel G. Remick ***Sepsis: Multiple abnormalities. heterogeneous responses and evolving understanding*** *Physiol Rev* 93: 1247–1288, 2013doi:10.1152/physrev.00037.2012
- Peter V. Giannoudis, Haralambos Dinopoulos, Byron Chalidis, George M. Hall ***Surgical stress response***. *Injury, Int. J. Care Injured* (2006) 37S, S3–S9
- J.P. Desborough ***The stress response to trauma and surgery***. *British Journal of Anaesthesia* 85 (1): 109-17 (2000)
- Castellheim, O.-L. Brekke, T. Espevik, M. Harboe & T. E. Mollnes ***Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis***. *Scandinavian Journal of Immunology* 69, 479–491
- Jerome Lugin, Nathalie Rosenblatt-Velin, Roumen Parapanov and Lucas Liaudet ***The role of oxidative stress during inflammatory processes***. *Biol. Chem.* 2014; 395(2): 203–230
- Markus A. Weigand Christian Hoerner Hubert J. Bardenheuer Axel Bouchon ***The systemic inflammatory response syndrome*** *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* Vol. 18, No. 3, pp. 455–475, 2004
- Leonardo Lorente, María M Martín, Pedro Abreu-González, Alberto Domínguez-Rodríguez, Lorenzo Labarta, César Díaz, Jordi Solé-Violán, José Ferreres, Judith Cabrera, Jose Carlos Igeño and Alejandro Jiménez ***Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients*** *Critical Care* 2013, 17:R290