



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Παπαδόπουλος

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ
ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΓΗΣΙΑ ΣΕ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ
ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ - ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ**

ΣΟΥΛΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
Ιατρός Αναισθησιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/ /32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης: 2-10-1998

Ημερομηνία ορισμού της τριμελούς επιτροπής: συν. 379^α/11-5-1999

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Γεώργιος Παπαδόπουλος

Καθηγητής Αναισθησιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Δημήτριος Γάλαρης

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καμπίλη Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 27-10-1999

Ημερομηνία καταθέσεως της διατριβής: 8-5-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Β. Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας – Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Μαυρίδης Ανέστης

Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Γεώργιος Παπαδόπουλος

Καθηγητής Αναισθησιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπων

Γάλαρης Δημήτριος

Αν. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Καμπίλη Μαρία

Επ. Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Ματσάγκας Μιλτιάδης

Επ. Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Πασχόπουλος Μηνάς

Επ. Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Βαθμός Διατριβής: **“ΑΡΙΣΤΑ”**

Η Γραμματέας της Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



Αφιερώσεις

- στους γονείς μου, Κυριάκο και Μαρία.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κάνοντας ανασκόπηση στα χρόνια που διατελώ αναισθησιολόγος στην πόλη μας, μπορώ να αναφέρω, ότι ένα από τα κυριότερα προβλήματα που αντιμετώπιζαν οι συνάδελφοι αναισθησιολόγοι στην πόλη μας, ήταν η έλλειψη σημείου αναφοράς, όσον αφορούσε την επιστημονική τους εξέλιξη και καταξίωση.

Αυτή η κατάσταση φάνηκε αμέσως ότι αλλάζει, με την έλευση στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο του καθηγητή μας κ. Γ. Παπαδόπουλου.

Αξιοποίησα λοιπόν, την δυνατότητα να πραγματοποιήσω μια φιλοδοξία, αλλά και καθήκον, που πιστεύω ότι όλοι οι συνάδελφοι έχουν, από τη στιγμή που αποφασίζουν να εξασκήσουν την ιατρική επιστήμη: την συγγραφή μιας διδακτορικής διατριβής.

Για το σκοπό μου αυτόν, βρήκα αμέριστη καθοδήγηση, συμπαράσταση, ενθάρρυνση και βοήθεια από τον καθηγητή μας. Χωρίς αυτόν, η ανάθεση και η εκπόνηση αυτής της δουλειάς θα ήταν αδύνατη.

Πιστεύω επίσης, ότι η Αναισθησιολογία στην πόλη μας, χωρίς την παρουσία του, δεν θα είχε την ανάπτυξη, εξέλιξη και αναγνώριση που έχει τώρα, τόσο σε τοπικό, όσο και σε Πανελλήνιο επίπεδο.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

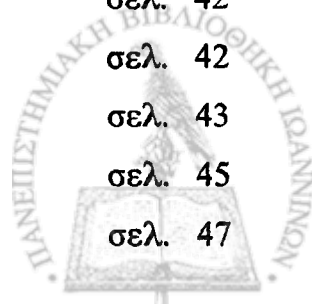
1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικές έννοιες	σελ. 1
1.2. Αντιοξειδωτικά συστήματα	σελ. 6
- ορισμοί	
- ταξινόμηση ενδογενών αντιοξειδωτικών	
- χαρακτηριστικά της αντιοξειδωτικής άμυνας	
1.3. Περιγραφή των κυριότερων αντιοξειδωτικών	σελ. 9
-ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	σελ. 9
(δισμουτάσες υπεροξειδίου, υπεροξειδάσες και τρανσφεράσες γλουταθειόνης)	
-μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	σελ. 14
(Α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, απτοσφαιρίνες, αιμοπεξίνη, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ, θειόλες, γλουταθειόνη, γλυκόζη)	
1.4. Παραγωγή-απελευθέρωση EPO κατά το σύνδρομο ισχαιμίας- επαναιμάτωσης	σελ. 22
1.5. Στρατηγικές αντιμετώπισης της τοξικής δράσης των Ελευθέρων Ριζών. Προποφόλη.	σελ. 26 σελ. 29
1.6. Παραγωγή-απελευθέρωση EPO κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση μυϊκού ιστού	σελ. 31
1.7.Επώδυνα σύνδρομα οφειλόμενα στη δράση των EPO	σελ. 33

2.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	σελ. 35
------------------------	---------

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ. 37
2.0 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 39
3.0 ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 41
3.1 Προεγχειρητική αξιολόγηση ασθενών	σελ. 42
3.2 Αναισθησία	σελ. 42
3.3. Μετεγχειρητική Αναλγησία	σελ. 43
3.4 Διερεύνηση έντασης μετεγχειρητικού πόνου	σελ. 45
4.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ. 47



4.1 Εργαστηριακές μετρήσεις συγκεντρώσεων TBARS	σελ. 47
4.2 Διερεύνηση έντασης μετεγχειρητικού πόνου	σελ. 52
4.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων	σελ. 57
5.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ. 59
6.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 63
7.0 SUMMARY	σελ. 65
8.0 ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ. 67
9.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ. 69



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Τι είναι ελεύθερες ρίζες; Τα άτομα περιέχουν ένα πυρήνα και ηλεκτρόνια περιστρέφονται γύρω απ' αυτόν, κατά κανόνα σε ζεύγη. Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο ή μόριο, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια ¹. Το μονήρες αυτό ηλεκτρόνιο αλλάζει (αλλοιώνει) την χημική δραστηριότητα του ατόμου ή του μορίου, συνήθως κάνοντάς το πιο δραστικό από το αντίστοιχο που διαθέτει τα ηλεκτρόνια σε ζεύγος. Εν τούτοις η ακριβής χημική δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών παρουσιάζει τεράστια ποικιλία.

Η ρίζα υδρογόνου, η οποία περιέχει 1 πρωτόνιο και 1 ηλεκτρόνιο, προφανώς μονήρες, ($H^{\cdot}$, το ίδιο όπως το άτομο υδρογόνου), είναι η απλούστερη ελεύθερη ρίζα. Η ακολουθία αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών, συχνά αρχίζει με απόσπαση $H^{\cdot}$ από άλλα μόρια (π.χ κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων ²

Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στην μελέτη των μοριακών μηχανισμών δημιουργίας και δράσης των ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό, και η άμεση διαπίστωση είναι ότι ο οργανισμός, βρίσκεται υπό την άμεση επίδραση του σχηματισμού και της δράσης των ελευθέρων ριζών.

Είμαστε εκτεθειμένοι στις ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες από το φυσικό περιβάλλον (όπως από το ραδόνιο και την κοσμική ακτινοβολία), αλλά και από τις πηγές που οι ίδιοι κατασκευάσαμε και χρησιμοποιούμε. Οι χαμηλού μήκους κύματος ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες (π.χ οι ακτίνες γ), μπορούν να διασπάσουν το νερό του οργανισμού, ώστε να σχηματισθούν ρίζες υδροξυλίου, $OH^{\cdot}$. Αυτή η εξαιρετικά δραστική ρίζα, αφ' ότου σχηματισθεί, αντιδρά χημικά με οτιδήποτε διαθέσιμο υπάρχει γύρω της. ¹ Αν και ο χρόνος ζωής της είναι απειροελάχιστος, επειδή αντιδρά απ' ευθείας στο σημείο σχηματισμού της, συνήθως το αποτέλεσμα είναι μια αλυσιδωτή διάδοση αντιδράσεων ελευθέρων ριζών ¹.

Ο ίδιος ο οργανισμός παράγει μια άλλη ρίζα οξυγόνου, το ανιόν του σουπερουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) που σχηματίζεται με την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου στο άτομο του οξυγόνου. Αυτό γίνεται τυχαία, από «χημικό ατύχημα» θα λέγαμε, αλλά είναι αναπόφευκτο να συμβεί, ειδικά στις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, στα μιτοχόνδρια και κατά την οξείδωση των κατεχολαμινών, για παράδειγμα ^{1,3} Το οξυγόνο στην μορφή που το αναπνέουμε, δεν μπορεί να αντιδράσει άμεσα με τα βιολογικά μόρια, και αυτή η χημική του αδράνεια εξηγείται από

την ηλεκτρονική του δομή. Το μοριακό οξυγόνο από μόνο του είναι μία διπλή ρίζα με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε καθένα από τα δύο εξωτερικά τροχιακά του (σχ. 1). Τα δύο αυτά ασύζευκτα ηλεκτρόνια περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους με την ίδια φορά με αποτέλεσμα η στροφορμή τους (spin) να είναι παράλληλη⁴. Η χημική δραστηριότητα που αναμενόταν να έχει το μοριακό οξυγόνο ως ελεύθερη ρίζα περιορίζεται από αυτόν ακριβώς τον παράλληλο προσανατολισμό των δύο ασύζευκτων ηλεκτρονίων του ($\uparrow\uparrow$). Προκειμένου να ζευγαρώσουν τα ηλεκτρόνια αυτά, τα νέα ηλεκτρόνια που δέχεται το οξυγόνο όταν οξειδώνει ένα άλλο άτομο ή μόριο, πρέπει να έχουν κι αυτά παράλληλο spin, ώστε να καλύψουν τα κενά στα π^* τροχιακά⁵. Συνήθως όμως τα άτομα ή τα μόρια στο ατομικό ή μοριακό τους τροχιακό έχουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με αντιπαράλληλο spin ($\uparrow\downarrow$) και έτσι περιορίζεται η οξειδωτική ικανότητα του οξυγόνου. Όταν το O_2 αντιδράσει με άτομα ή μόρια που έχουν αντιπαράλληλο spin τότε αυτό έχει την τάση να πάρει ένα μόνο ηλεκτρόνιο. Η αναγωγή όμως ενός μόνο ηλεκτρονίου του οξυγόνου είναι δυσμενής, και έτσι περιορίζεται και πάλι η οξειδωτική του ικανότητα.

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων κατά την διεργασία παραγωγής ενέργειας με οξειδωτικό καταβολισμό.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ποσοστό 98% περίπου του αναπνεόμενου οξυγόνου υφίσταται πλήρη αναγωγή (τετρασθενής αναγωγή) σε H_2O από τον τελευταίο φορέα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, την κυτοχρωμική οξειδάση:



Τα ηλεκτρόνια στην αντίδραση αυτή προέρχονται από την συμμετοχή των προϊόντων του καταβολισμού των βασικών συστατικών των τροφών στον κύκλο του Krebs και μεταφέρονται στο μοριακό O_2 σταδιακά και ελεγχόμενα μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, γεγονός που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την παράκαμψη της χημικής αδράνειας του μοριακού O_2 , ενώ ταυτόχρονα παράγεται ενέργεια από την οξειδωτική φωσφορυλίωση⁶. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας σχηματίζονται δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία παραμένουν σταθερά συνδεδεμένα στα ενεργά κέντρα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα να μην αποτελούν κίνδυνο για το κύτταρο⁷.



Ένα μικρό ποσοστό, περίπου 2%, του οξυγόνου που φθάνει στα κύτταρα υφίσταται σταδιακή μονοσθενή αναγωγή με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου κάθε φορά.

Η μονοσθενής αναγωγή του O_2 γίνεται σε θέσεις που δεν συνδέονται με την αναπνευστική αλυσίδα. Έτσι οι ρίζες του οξυγόνου που σχηματίζονται ανεξέλεγκτα δεν είναι συνδεδεμένες σε συγκεκριμένες θέσεις και ονομάζονται *ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (EPO)*. Εξ ορισμού οι ελεύθερες ρίζες O_2 φέρουν στην εξωτερική στιβάδα των τροχιακών τους ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (δηλαδή ηλεκτρόνια με την ίδια στροφορμή). Το γεγονός αυτό τις καθιστά χημικά πολύ δραστικές, διότι έχουν ισχυρή τάση να ζευγαρώσουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους. Επιπλέον εάν αντιδράσουν με μια άλλη ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα κ.ο.κ. δημιουργούμενων κατ' αυτόν τον τρόπο αλυσιδωτών αντιδράσεων ⁸. Οι EPO μπορούν να αντιδράσουν με πλήθος βιομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA κ.ά.) και να καταστρέψουν τελικά την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου ⁹. Ενοχοποιούνται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων και των διαδικασιών της γήρανσης και της καρκινογένεσης (πίνακας 1).

Από το προαναφερθέν μικρό ποσοστό του οξυγόνου (περίπου 2%) το οποίο φθάνει στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και υφίσταται την σταδιακή μονοσθενή αναγωγή (ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες) με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου κάθε φορά, σχηματίζονται δραστικές μορφές (ROS : Reactive Oxygen Species – σημ 3), όπως ανιόν του σουπεροξειδίου O_2^- , υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 και ρίζες υδροξυλίου $HO^\cdot$, με αναγωγή ενός, δύο και τριών ηλεκτρονίων αντίστοιχα.

Το O_2^- το οποίο σχηματίζεται στο πρώτο στάδιο είναι μετρίως δραστικό. Μεσολαβεί όμως το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η οποία απαντάται σχεδόν παντού στα αερόβια κύτταρα. Αυτή καταλύει την αντίδραση δύο μορίων O_2^- , το ένα εκ των οποίων ανάγεται σε H_2O_2 προσλαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο, ενώ το άλλο οξειδώνεται σε O_2 με παραχώρηση ενός ηλεκτρονίου.

Το ανιόν υπεροξειδίου αντιδρά κυρίως με πρωτεϊνικά μόρια τα οποία περιέχουν πυρήνες σιδήρου – θείου (4Fe-4S) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση δραστικού σιδήρου και αδρανοποίηση των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 ανάγεται περαιτέρω σε H_2O , προκειμένου να αποφευχθεί ο ενδιάμεσος σχηματισμός ρίζας υδροξυλίου $HO^\cdot$ που είναι άκρως δραστική. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση ενζύμων, όπως καταλάσες, περοξυδάσες της γλουταθειόνης και περοξυρεδοξίνες.



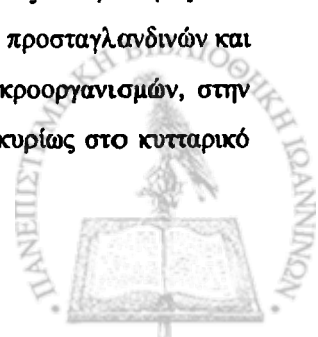
Ένα ποσοστό $O_2^{\cdot -}$ αντιδρά με το νιτρικό οξείδιο ($NO\cdot$) και σχηματίζεται περοξυνιτρίδιο ($ONOO^{\cdot -}$), το οποίο είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας, ικανός να αλλοιώσει συστατικά του κυττάρου όπως πρωτεΐνες και DNA^{109,110,111}.

Οι αερόβιοι οργανισμοί, στους οποίους η παραγωγή *δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)* (σημ 3) είναι μια συνεχής, φυσιολογική διεργασία (σημ 4), κατορθώνουν και επιβιώνουν της παρουσίας των ROS, έχοντας αναπτύξει ιδιαίτερα αποτελεσματικά κυτταρικά και εξωκυτταρικά *αντιοξειδωτικά συστήματα*, υπό τον έλεγχο των οποίων βρίσκεται η "τυχαία" (accidentally) (σημ 4), και επομένως βλαπτική παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Όταν η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενδογενών συστημάτων υπερκερασθεί από τον σχηματισμό των EPO αναπτύσσεται μια κατάσταση γνωστή ως *οξειδωτικό stress*, κατά την οποία εκδηλώνεται η πλήρης έκφραση της υψηλής χημικής δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών, με ανάλογες επιπτώσεις για την επιβίωση του κυττάρου. Καθίσταται επομένως πρόδηλος η μεγάλη σημασία της άμυνας αυτής για τη διατήρηση στη ζωή του κυττάρου, και προφανής η ανάγκη κατανόησης της δομής και της συγκρότησής της.

(σημ 3) Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) ή δραστικοί μεταβολίτες του οξυγόνου (reactive oxygen metabolites, ROM) αποτελούν ένα γενικό όρο, ο οποίος χρησιμοποιείται προκειμένου να συμπεριλάβει στις EPO ($O_2^{\cdot -}$, $HO^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ και $ROO^{\cdot}$) και ορισμένες ουσίες, ($HOCl$, O_3 , $ONOO^{\cdot -}$, H_2O_2 , 1O_2), οι οποίες αν και δεν είναι ρίζες, είναι είτε ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες είτε μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

(σημ 4) Ο σχηματισμός των δραστικών μορφών οξυγόνου στο κύτταρο γίνεται κυρίως με αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι οποίες μπορεί να είναι ενζυμικές ή μη ενζυμικές, συνήθως όμως πραγματοποιούνται παρουσία κάποιου μεταβατικού μετάλλου. Ο σχηματισμός τους μπορεί να γίνεται είτε «τυχαία» (accidentally) είτε για να εξυπηρετήσουν ειδικές μεταβολικές διεργασίες στο ζωικό κύτταρο όντας απαραίτητες στο μεταβολισμό ενδογενών και εξωγενών λιπιδίων, στην κυτταρική αναπνοή, στην παραγωγή προσταγλανδινών και λευκοτριενίων από το αραχιδονικό οξύ, στην φαγοκυττάρωση, στην θανάτωση των μικροοργανισμών, στην ανοσολογική απάντηση¹⁰. Η παραγωγή και δράση των «ωφέλιμων» EPO περιορίζεται κυρίως στο κυτταρικό σύστημα που εξυπηρετούν.



ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Παθολογικές καταστάσεις στις οποίες ενοχοποιείται η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Σύνδρομα ισχαιμίας - επαναιμάτωσης	Έμφραγμα του μυοκαρδίου Ισχαιμική οξεία νεφρική ανεπάρκεια Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο Εντερική ισχαιμία Συντήρηση οργάνων για μεταμόσχευση
Αυτοάνοσα νοσήματα	Αγγειίτιδες Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Κλινικά σύνδρομα από την επίδραση φαρμάκων, τοξινών, και ακτινοβολίας	Ιδιοπαθής αιμοχρωμάτωση Αιμοχρωμάτωση μετά από μεταγγίσεις Αλκοολική μυοπάθεια Ακτινοθεραπεία
Διαταραχές των ερυθρών αιμοσφαιρίων	Δρεπανοκυτταρική αναιμία Μεσογειακή αναιμία Αναιμία Fanconi Δηλητηρίαση από μόλυβδο Ελονοσία
Παθήσεις των πνευμόνων	Εμφύσημα Κυστική ίνωση ARDS Δηλητηρίαση από paraquat, νικοτίνη, Bleomycin, όζον, SO ₃ , NO ₂ Πνευμονοκονίαση
Καρδιαγγειακές παθήσεις	Αθηροσκλήρωση Καρδιομυοπάθεια από ανθρακυκλίνες Αλκοολική μυοκαρδιοπάθεια
Νεφρικές παθήσεις	Σπειραματονεφρίτιδες Νεφροτοξικότητα από αμινογλυκοσίδες Νεφροτοξικότητα από Hg, Pb, Cd Πολυκυστική νόσος των νεφρών
Γενικά νοσήματα και καταστάσεις	Καρκίνος Σηπτικό shock Γήρανση του οργανισμού Σύνδρομο Down Διαβήτης
Παθήσεις των οφθαλμών	Καταρράκτης Οπισθοφακική ίνωση Αμφιβληστροειδοπάθεια
Παθήσεις του νευρικού συστήματος	Πάρκινσον Alzheimer Μυϊκή δυστροφία του Duchenne Σκλήρυνση κατά πλάκας
Νοσήματα του πεπτικού	Stress έλκη Παγκρεατίτιδα Βλάβες του ήπατος από Cl ₄ , αλοθάνιο Φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου
Νοσήματα του δέρματος	Πορφυρία Δερματίτιδα εξ επαφής Βλάβες από ηλιακή και θερμική ακτινοβολία



1.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

- ΟΡΙΣΜΟΙ

Ως αντιοξειδωτική ουσία χαρακτηρίζεται κάθε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με ευοξειδωτές ουσίες, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών¹¹. Η δράση τους μπορεί να ασκηθεί με διάφορους τρόπους. Έχουν περιγραφεί έξι μηχανισμοί δράσης όσον αφορά τον ρόλο τους στην λιπιδική υπεροξειδωση: α) απομακρύνουν ή μειώνουν τοπικά την συγκέντρωση του O_2 , β) δεσμεύουν τα ιόντα μετάλλων που δρουν ως καταλύτες και έτσι προλαμβάνουν την γένεση νέων τοξικών ριζών, γ) απομακρύνουν σημαντικές δραστικές μορφές του οξυγόνου, όπως το $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2 , δ) καθαρίζουν το κύτταρο από ελεύθερες ρίζες, όπως είναι η $HO_2^{\cdot}$, η $RO^{\cdot}$ και η $ROO^{\cdot}$, ε) διακόπτουν την παραπέρα διάδοση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, και στ) αποδιεγείρουν το μονήρες οξυγόνο¹².

- ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

Κατά παλαιότερη ταξινόμηση¹³ τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε *πρωτογενή* και *δευτερογενή*. Τα πρώτα περιλαμβάνουν την δισμουτάση του σουπεροξειδίου, την καταλάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, την φωσφολιπιδική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, την τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, την DT-διαφοράση, καθώς επίσης και τα μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ, την α-τοκοφερόλη, την γλουταθειόνη, το β-καροτένιο και το ουρικό οξύ. Στα πρωτογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται, λόγω της ικανότητάς τους να συνδέονται με μεταβατικά μέταλλα, οι λευκωματίνες του ορού, η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη και η φερριτίνη. Στα δευτερογενή ανήκουν τα συστήματα επιδιόρθωσης ή πλήρους αποδόμησης των προσβληθέντων από τις ελεύθερες ρίζες πρωτεϊνών, λιπιδίων και πυρηνικών οξέων.

Ένας δεύτερος τρόπος διάκρισης των ενδογενών αντιοξειδωτικών αναγνωρίζει τέσσερις γραμμές αντιοξειδωτικής άμυνας¹⁴.

Στην πρώτη γραμμή άμυνας ανήκουν τα *αντιοξειδωτικά πρόληψης* (preventive antioxidants), τα οποία προλαμβάνουν και καταστέλλουν τον σχηματισμό των ΕΡΟ. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει: α) ένζυμα, όπως η δισμουτάση του σουπεροξειδίου, που καταλύει την αντίδραση οξείδωσης δύο μορίων $O_2^{\cdot -}$ προς H_2O_2 , β) ένζυμα, τα οποία διασπούν τα οργανικά υδροϋπεροξείδια και το H_2O_2 σε αλκοόλη και νερό αντίστοιχα, όπως είναι η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η φωσφολιπιδική υπεροξειδάση της

γλουταθειόνης και η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, γ) η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη και η φερριτίνη, δ) λιπόφιλα μόρια, όπως τα β-καροτένια, και ε) η DT-διαφοράση, ένα ένζυμο το οποίο προκαλεί αναγωγή δύο ηλεκτρονίων σε ενδογενή και εξωγενή κινονοειδή μόρια, προλαμβάνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών από την παραπέρα αυτοοξειδωση των μορίων αυτών.

Η δεύτερη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την παραπέρα εξέλιξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως είναι: α) τα υδρόφιλα μόρια ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη και γλουταθειόνη, και β) τα λιπόφιλα μόρια α-τοκοφερόλη και η ουβικινόλη των κυτταρικών μεμβρανών.

Η τρίτη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει τα ένζυμα που επιδιορθώνουν τα τροποποιημένα από τις EPO βιομόρια, όπως είναι: η φωσφολιπάση A₂, πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες και πεπτιδάσες), και ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA (νουκλεάσες).

Ως τέταρτη γραμμή άμυνας θεωρείται η ιδιότητα των ζώντων οργανισμών να προσαρμόζονται σε καταστάσεις αυξημένης παραγωγής EPO, σχηματίζοντας και μεταφέροντας στον κατάλληλο τόπο αντιοξειδωτικά κατάλληλης λειτουργίας.

Οι Halliwell¹⁵ και Gutteridge¹⁶ έχουν προτείνει μια άλλη ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών με όρους κυτταρικής τοπογραφίας. Κατ' αυτήν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε: α) ενδοκυττάρια, β) εξωκυττάρια και γ) αντιοξειδωτικά των κυτταρικών μεμβρανών.

- ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΑΜΥΝΑΣ

Από τα προεκτεθέντα καθίσταται φανερό ότι δεν υπάρχει ένα γενικό αντιοξειδωτικό ικανό να προστατεύει συλλήβδην από όλες τις ROS, αλλά πολλά αντιοξειδωτικά που το καθένα δρα προστατευτικά κατά περίπτωση. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η σύσταση της αντιοξειδωτικής άμυνας διαφέρει από τον ένα ιστό στον άλλο και από κύτταρο σε κύτταρο¹⁷. Τα εξωκυττάρια υγρά έχουν διαφορετική αντιοξειδωτική άμυνα από αυτήν που υπάρχει στον ενδοκυττάριο χώρο και στις κυτταρικές μεμβράνες. Σήμερα είναι καλά γνωστό ότι τα μείζονα ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά συστήματα είναι τα ένζυμα σουπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και περοξειδάση της γλουταθειόνης¹⁸. Εξωκυττάρια υγρά, όπως το πλάσμα του αίματος, το υγρό των ιστών, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), το αρθρικό υγρό και το σπερματικό υγρό επιδεικνύουν ελάχιστη ή καθόλου δραστηριότητα καταλάσης, και χαμηλές δραστηριότητες σουπεροξειδικής δισμουτάσης και σελήνιο-εξαρτώμενης

περοξειδάσης της γλουταθειόνης. Έτσι τα ένζυμα αυτά συνεισφέρουν πολύ λίγο στην αντιοξειδωτική άμυνα των εξωκυτταρίων υγρών ¹⁹. Η άμυνα αυτή εκφράζεται κυρίως με την δράση ουσιών, όπως της τρανσφερίνης, λακτοφερίνης, αλβουμίνης, σερουλοπλασμίνης, χολερυθρίνης, βλέννης, ουρικού οξέως, ασκορβικού οξέως και ενδεχομένως και άλλων.

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) περιέχει μικρές ποσότητες τρανσφερίνης, αλβουμίνης ή σερουλοπλασμίνης αλλά παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέως (περίπου 10 φορές υψηλότερες του πλάσματος) και επίσης περιέχει ουρικό οξύ. Το αρθρικό υγρό, ομοίως, έχει χαμηλότερες σε σχέση με το πλάσμα συγκεντρώσεις αλβουμίνης, τρανσφερίνης και σερουλοπλασμίνης, ενώ το υγρό των πνευμονικών κυψελίδων παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, αλλά εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέως και πιθανόν, σε αντίθεση με τα άλλα εξωκυττάρια υγρά, περιέχει σημαντικές ποσότητες γλουταθειόνης ²⁰. Το σπερματικό υγρό φαίνεται να έχει πτωχή αντιοξειδωτική ικανότητα αν και χρειάζεται να γίνουν περισσότερες μελέτες στο θέμα αυτό ²¹.

Οι κυτταρικές μεμβράνες επίσης επιδεικνύουν ιδιαίτερη αντιοξειδωτική άμυνα, η οποία εκφράζεται με ουσίες όπως η α-τοκοφερόλη (βιτ E), τα β-καροτένια (βιτ A) και η ουβικινόλη-10.

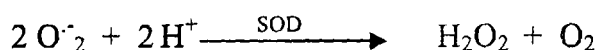


1.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.

ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

1- Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs).

Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (M.B. περίπου 32000 daltons) έχει ανιχνευθεί σε όλους σχεδόν τους αερόβιους οργανισμούς. Η SOD καταλύει την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε οξυγόνο, δείχνοντας εξειδίκευση μόνο για το υπόστρωμα O_2^-



Πρόκειται για αντίδραση η οποία μπορεί να λάβει χώρα αυτόματα και χωρίς την βοήθεια του ενζύμου, σε στενή όμως εξάρτηση από το pH του διαλύματος (ευνοϊκότερο pH=7,4)^{22, 23}. Η SOD αυξάνει τον ενδοκυττάριο ρυθμό της αντίδρασης κατά 10.000 φορές γιατί παρακάμπτει την ηλεκτροστατική άπωση των αρνητικά φορτισμένων υπεροξειδικών ανιόντων²⁴. Με την δράση τους αυτή οι SODs εξουδετερώνουν το O_2^- και έτσι αποφεύγονται εκτεταμένες βλάβες στα βιομόρια. Γι' αυτό θεωρούνται ένζυμα απαραίτητα για την ανάπτυξη της αερόβιας ζωής, γεγονός που εξηγεί την παρουσία τους σε όλα τα ζωικά κύτταρα. Ορισμένοι ιστοί, μάλιστα, όπως το ήπαρ, οι νεφροί και τα επινεφρίδια, περιέχουν σχετικά μεγαλύτερες ποσότητες των ενζύμων αυτών²⁵.

Στα ζωικά κύτταρα έχουν βρεθεί δύο διαφορετικές μορφές του ενζύμου. Η μία περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (Cu/Zn- SOD) και ανιχνεύεται κυρίως στο κυτοδιάλυμα, ενώ η άλλη έχει μαγγάνιο (Mn-SOD) και ανιχνεύεται κυρίως στα μιτοχόνδρια²⁶. Ένας άλλος τύπος ο οποίος περιέχει σίδηρο έχει ανιχνευτεί σε πολλά βακτηρίδια. Όλα αυτά τα ένζυμα παρά τις διαφορές τους στα μέταλλα και στην αλληλουχία των αμινοξέων, καταλύουν την ίδια αντίδραση με την ίδια ταχύτητα. Η Mn-SOD και η Fe-SOD έχουν ομοιότητες στην αλληλουχία των αμινοξέων, ενώ η Cu/Zn-SOD διαφέρει. Να σημειωθεί ότι ο Zn δεν συμμετέχει στην καταλυτική αντίδραση, αλλά μόνον στην σταθεροποίηση του ενζύμου²². Η βιοσύνθεση των Cu/Zn-SOD και Fe-SOD είναι συνεχής, ενώ της Mn-SOD, ο ρόλος της οποίας φαίνεται να είναι σημαντικός στην προστασία των μιτοχονδρίων από το οξειδωτικό stress, επαγόμενη. Η SOD έχει βραχύ χρόνο ημιζωής στο αίμα (4-5 min), γεγονός που περιορίζει την δυνατότητα θεραπευτικής της χρησιμοποίησης in vivo. In vitro όμως, έχουν γίνει με επιτυχία πειράματα²⁷.

Πρόσφατα περιγράφεται και εξωκυττάρια SOD (EC- SOD), η οποία, αν και περιέχει στο μόριό της Cu και Zn διαφέρει από την ενδοκυττάρια Cu/Zn-SOD κατά το ότι έχει υψηλότερο μοριακό βάρος (περίπου 135000), και κατά το ότι εμφανίζει συνδεδεμένες μορφές υδατανθράκων²⁸. Ο βιολογικός της ρόλος δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Φαίνεται ότι η EC-SOD εν μέρει τουλάχιστον συνδέεται με ηπαρίνη, πολύ πιθανόν δε *in vivo* να συσχετίζονται με την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων λειτουργώντας ως προστατευτικό αντιοξειδωτικό στρώμα πάνω στα κύτταρα. Έτσι η EC-SOD ελαττώνοντας τη συγκέντρωση του $O^{\cdot -}$ στο πλάσμα του αίματος, ελαττώνει και την ταχύτητα σχηματισμού του υπεροξυνιτρώδους ($ONOO^{\cdot -}$) που σχηματίζεται από το NO και το $O^{\cdot -}$ και κατ' αυτόν τον τρόπο αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής του μονοξειδίου του αζώτου²⁹. Το NO, ως γνωστόν, έχει ταυτοποιηθεί ως ο «ενδοθηλιοπαραγόμενος παράγοντας χάλασης» (ERDF), ο οποίος παρουσιάζει αγγειοδιασταλτική δράση, αναστέλλει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και υπάρχουν ενδείξεις ότι δρα και ως αντιοξειδωτικό (σημ 5). Οι εξωκυττάρια SODS έχουν ανιχνευθεί συνδεδεμένες στην επιφάνεια των κυττάρων πολλών ιστών, ώστε ο όρος «εξωκυττάρια» να μην υποδηλώνει στην πραγματικότητα την υπό την τρέχουσαν έννοια, αυστηρά εξωκυττάρια χωροθέτηση των ενζύμων αυτών.

2.- Καταλάσες

Οι καταλάσες, όπως και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, είναι τα κυρίαρχα ένζυμα στη ρύθμιση των επιπέδων H_2O_2 μέσα στα κύτταρα. Καταλύουν την αντίδραση:



Έχουν ανιχνευθεί σε όλους σχεδόν τους αερόβιους οργανισμούς. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ χαμηλότερες έχουν βρεθεί στον εγκέφαλο, καρδιά και μυς³¹. Ανευρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα υπεροξυσωμάτια, τα οποία είναι κυστίδια διαμέτρου 0,25-0,5 μm που περιβάλλονται από μια απλή μεμβράνη και εντοπίζονται στο κυτόπλασμα. Στα υπεροξυσωμάτια βρίσκονται επίσης τα ένζυμα οξειδάση του ουρικού, οξειδάση των D-αμινοξέων και οξειδάση των υδροξυοξέων. Στις αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα αυτά παράγεται H_2O_2 , η γειννιάσή τους όμως με την καταλάση εξασφαλίζει την γρήγορη και αποτελεσματική διάσπαση του επικίνδυνου υπεροξειδίου του υδρογόνου⁶.

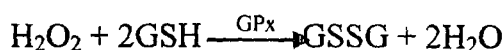
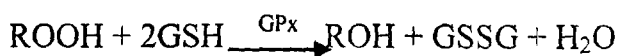


Οι πιο πολλοί τύποι καταλάσης αποτελούνται από τέσσερις υπομονάδες με ένα μόριο αίμης [Fe(III)- πρωτοπορφυρίνη] στην ενεργό περιοχή κάθε υπομονάδας. Μόνο το τετραμερές είναι ενεργό, ενώ η διάσπαση σε υπομονάδες συνεπάγεται και απώλεια της ενεργητικότητας του ενζύμου. Η σταθεροποίηση της ενεργού περιοχής της κάθε υπομονάδας διασφαλίζεται από την παρουσία ενός στενά συνδεδεμένου με αυτήν μορίου NADPH. Ο με διάφορους τρόπους διαχωρισμός του NADPH από τις τέσσερις υπομονάδες έχει σαν αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ενζύμου ³². Κατά τις αντιδράσεις, στις οποίες λαμβάνει μέρος, το ένζυμο χρησιμοποιεί το μόριο του H₂O₂ τόσο ως δότη όσο και ως δέκτη ηλεκτρονίων

Συνεπώς, το ένα μόριο H₂O₂ οξειδώνεται με δύο ηλεκτρόνια σε O₂, ενώ ταυτόχρονα το άλλο ανάγεται με δύο ηλεκτρόνια σε H₂O. Δεδομένης της εντόπισης του ενζύμου στα υπεροξυσωμάτια, παραμένει αδιευκρίνιστος ο ρόλος του ως αντιοξειδωτικού για το κυτοδιάλυμα. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι υφίσταται και μη υπεροξυσωματική καταλάση, εντοπιζόμενη κυρίως στο ήπαρ ³².

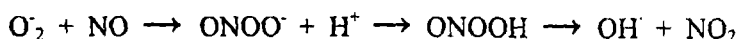
3- Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, Gp_x)

Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του H₂O₂ με GSH σε H₂O, καθώς και την αντίδραση των υδροϋπεροξειδίων (ROOH) με την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH),



Οπότε σχηματίζονται οξειδωμένη γλουταθειόνη και αλκοόλες ως προϊόν αναγωγής του υδροϋπεροξειδίου.

- σημ 5. Κατά τα φαινόμενα ισχαιμίας / επαναιμάτωσης αν και η παραγωγή NO αυξάνεται κατά την επαναιμάτωση, φαίνεται τελικά ότι όχι μόνο δεν μπορεί να ασκήσει την προστατευτική του δράση, αλλά και σε πολλές περιπτώσεις δρα τοξικά αντιδρώντας με το O⁻₂:



Έτσι όχι μόνον εξαλείφεται το NO, αλλά ταυτόχρονα παράγονται τα εξαιρετικά τοξικά ONOOH και OH[·] ³⁰

Το ένζυμο δείχνει σχεδόν απόλυτη ειδικότητα όσον αφορά στον δότη του ατόμου υδρογόνου, που μπορεί να είναι μόνο η GSH, όχι όμως για το υδροϋπεροξειδίο, που μπορεί να είναι από το υπεροξειδίο του υδρογόνου έως τα λιποϋδροϋπεροξειδία ³³. Προφανώς το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα τόσο για την καταλάση όσο και για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, γεγονός που αποδίδεται στην κατανομή των δύο αυτών ενζύμων στους ίδιους υποκυτταρικούς χώρους ³⁴.

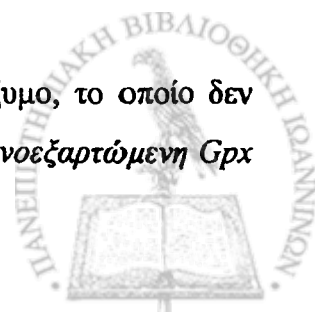
Σε φυσιολογικές συνθήκες η GPx αναγεννάται με την αναγωγή της GSSG που καταλύεται από την GSSG- οξειδοοδουκτάση, η οποία δρα μόνο παρουσία NADPH και βρίσκεται στις ίδιες θέσεις που βρίσκεται η GPx.

Ο μηχανισμός, με τον οποίο καταλύουν την μετατροπή του υποστρώματος δεν είναι καλά γνωστός και μάλλον είναι πολύπλοκος. Φαίνεται ότι τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) πρέπει πρώτα να διασπαστούν υδρολυτικά από τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂. Στον κύκλο των αντιδράσεων συμμετέχουν η GSH, η αναγωγή της γλουταθειόνης, και το NADPH που προέρχεται από την μεταβολική οδό των φωσφορικών πεντοζών. Κατά τις αντιδράσεις αυτές η γλουταθειόνη αναγεννάται ³⁵.

Η δράση των ενζύμων αυτών, τα οποία ανακαλύφθηκαν το 1957 από τον Mills, ασκείται κυρίως στο κυτοδιάλυμα. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 76.000- 100.000 και το μόριό τους αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες (τετραμερές), σε κάθε μια από τις οποίες υπάρχει ένα άτομο σεληνίου (Se) συνδεδεμένο με ένα υπόλειμμα κυστεΐνης της ενεργού περιοχής ⁽³⁴⁾. Υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου βρέθηκε στο ήπαρ, στα ερυθροκύτταρα και στους νεφρούς, σχετικά δε χαμηλότερη στους μυς, στους πνεύμονες και στον εγκέφαλο.

Την τελευταία δεκαπενταετία βρέθηκε στα θηλαστικά ένα ένζυμο διαφορετικό από την κλασσική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η PH-GPx (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase- φωσφολιπιδική υδροϋπεροξειδική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) μπορεί και καταλύει την αναγωγή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων στις θέσεις παραγωγής τους, δηλαδή στις εσωτερικές δομές των κυτταρικών μεμβρανών, χωρίς να χρειάζεται η υδρολυτική διάσπασή τους από τα φωσφολιπίδια ³⁶. Συνεπώς η συνήθης GPx φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη κυρίως για την αναγωγή του H₂O₂ στο υδρόφιλο περιβάλλον του κυτοπλάσματος και των μιτοχονδρίων.

Επίσης, από το ήπαρ και τους νεφρούς απομονώθηκε ένα άλλο ένζυμο, το οποίο δεν χρειάζεται σελήνιο για να δράσει. Το ένζυμο αυτό αναφέρεται ως *μη σεληνοεξαρτώμενη Gpx* και ανάγει αποκλειστικά τα ROOH ³⁷.



4- Τρανσφεράσες – S της γλουταθειόνης (glutathione -S- transferases: GSTs).

Καταλύουν κυρίως την σύζευξη της GSH με ηλεκτρονιόφιλες εξωγενώς χορηγούμενες ουσίες ή με ένα ηλεκτρονιόφιλο μεταβολίτη, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση από τον οργανισμό εξωγενώς χορηγουμένων ηλεκτρονιόφιλων ουσιών ³⁸. Απομονώθηκαν στο κυτόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην κυτταρική μεμβράνη ηπατικών κυττάρων επίμυος. Ορισμένες από αυτές ενεργούν όπως και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, ανάγουν δηλαδή τα ROOH στις αντίστοιχες αλκοόλες, όχι όμως και το H₂O₂ ³⁹.

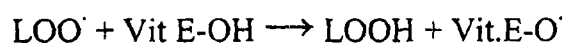


ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

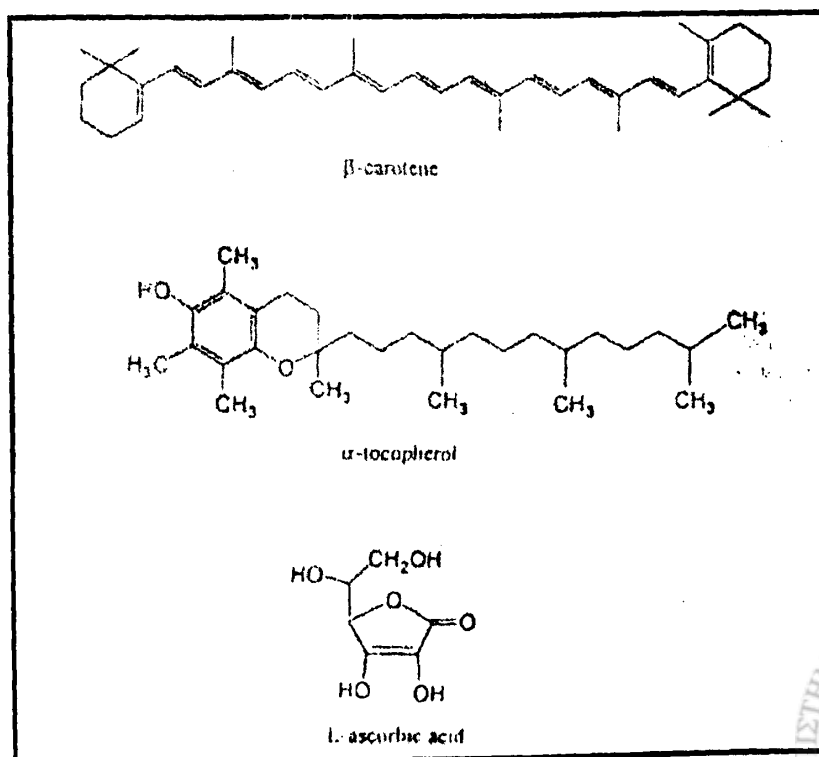
Στα συστήματα αυτά ανήκουν λιπόφιλες και υδρόφιλες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως είναι η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ, το β-καροτένιο («αντιοξειδωτικές βιταμίνες» σχ. 1), το ουρικό οξύ, η γλυκόζη, η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η απτοσφαιρίνη, η αιμοπεξίνη, θειόλες, μεταξύ των οποίων η GSH, η ουμπικινόλη και η βιλιρουβίνη. Σε πολλές περιπτώσεις τα συστήματα αυτά συνεργάζονται με τα προηγούμενα, με αποτέλεσμα την αναγέννηση των συμμετεχόντων μορίων χωρίς την παραγωγή νέων ριζών. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στα κυριότερα εξ αυτών.

1- Α-τοκοφερόλη (α-Toc-OH)

Είναι το πλέον δραστικό χημικά και βιολογικά ισομερές της βιταμίνης E και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και στις λιποπρωτεΐνες. Φέρει στο μόριό της μια υδροξυλομάδα (σχ. 1), της οποίας το άτομο του υδρογόνου αποσπάται εύκολα, και έτσι οι ρίζες που σχηματίζονται ως ενδιάμεσα προϊόντα κατά την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων αντιδρούν εκλεκτικά με την α-Toc-OH και μετατρέπονται σε λιπουδροϋπεροξειδία τερματιζομένης της αλυσιδωτής αντίδρασης και αναστελλομένης κατ' αυτόν τον τρόπο της λίαν επικίνδυνης λιπιδικής υπεροξειδωσης⁴⁰⁻⁴¹:



ΣΧΗΜΑ 1.



Η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται στην ακίνδυνη α-τοκοφερυλική ρίζα (Vit.E-O'), η οποία είναι υδατοδιαλυτή και μετεφέρεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή στο κυτοδιάλυμα. Σε υδρόφιλο περιβάλλον η Vit.E αναγεννάται καθώς η α-τοκοφερυλική ρίζα αντιδρά με το ασκορβικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε ασκορβυλική ρίζα (AH'), που είναι σχετικά αδρανής και ακίνδυνη για τον οργανισμό. Η ρίζα αυτή αναγεννάται σε ασκορβικό οξύ από την NADH-ρεδουκτάση⁴²⁻⁴³.

Η περιεκτικότητα των LDL λιποπρωτεϊνών του πλάσματος σε α-τοκοφερόλη αποτελεί δείκτη της άμυνάς τους στην υπεροξειδωση των λιπιδίων και συνεπώς της άμυνας έναντι της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας.

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έδειξαν ότι ο χρόνος καθυστέρησης (lag time) στην in vivo με ιόντα Cu^{2+} οξειδωση των LDL λιποπρωτεϊνών, που προέρχονται από το πλάσμα αίματος του ιδίου ατόμου, μετά από εμπλουτισμό τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης, παρουσίαζε θετική συσχέτιση με την ποσότητα α-τοκοφερόλης που είχε ενσωματωθεί σ' αυτές⁴⁴.

Οι τοκοφερόλες εκτός από την δράση τους ως εκκαθαριστών ριζών, αντιδρούν με το μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen) και το αδρανοποιούν⁴⁵. Πιστεύεται ότι συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης υψηλότερες των φυσιολογικών ενδέχεται να προωθούν την οξειδωση των λιπαρών οξέων και να προκαλούν τον σχηματισμό λιποξυ-ριζών⁴⁶.

Παρόμοιου τύπου προστασία με αυτήν της α-τοκοφερόλης έχει αποδοθεί στο Trolox, το οποίο είναι ένα υδροφιλικό ανάλογο της βιταμίνης E¹⁰⁷

2- Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η βιταμίνη αυτή (σχ. 1) αποτελεί το υδατοδιαλυτό σύστημα παροχής και μεταφοράς ηλεκτρονίων στο κυτόπλασμα και στο εξωκυττάριο υγρό. Οι συγκεντρώσεις της στο πλάσμα υγιών ατόμων κυμαίνονται από 50-200 μM . Παρουσιάζει πολλαπλές αντιοξειδωτικές δράσεις (πίνακας 2)^{47,48,49,50,51}.

Το ασκορβικό οξύ σε συνδυασμό με δισθενή ή τρισθενή σίδηρο, μπορεί να παρουσιάσει ισχυρές προοξειδωτικές ιδιότητες, διεγείροντας έντονα την λιπιδική υπεροξειδωση. Η ασκορβυλική ρίζα που προκύπτει, αν δεν αναγεννηθεί από την NADH-αναγωγή του ασκορβικού, μπορεί να ανάγει ένα άλλο ιόν τρισθενούς σιδήρου, ενώ παράλληλα σχηματίζεται επίσης υπεροξειδίο του υδρογόνου. Παρά την ασφαλή, και σε υψηλές ακόμα δόσεις, χορήγησή της σε υγιή άτομα, γεγονός που υπογραμμίζει τον σημαντικό αντιοξειδωτικό της ρόλο στα άτομα αυτά, η χορήγησή της σε παθολογικές καταστάσεις

όπως η υπερφόρτιση με σίδηρο, για τους εκτεθέντες λόγους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή⁵².

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος

- Εκκαθαριστής του $O^{\cdot\cdot}_2$ και του $HO^{\cdot}_2$.
- Εκκαθαρίζει τις υδατοδιαλυτές περοξυλικές ρίζες ($RO^{\cdot}_2$), όπως επίσης και τις θειλικές και τις σουλφενυλικές.
- «Επανορθώνει» και έτσι παρεμποδίζει τις βλάβες από τις ρίζες που παράγονται από την επίδραση του $HO^{\cdot}$ στο ουρικό οξύ.
- Μειώνει τις καρκινογόνες νιτροζαμίνες σε αδρανή προϊόντα.
- Ισχυρός εκκαθαριστής του $HOCl$ και δυνητικά, υπόστρωμα του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση.
- Αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση από την δράση αιμοσφαιρίνης / μυοσφαιρίνης- H_2O_2 , και παρεμποδίζει την διάσπαση της αίμης και απελευθέρωση ιόντων Fe , οξειδούμενο κατά προτεραιότητα από τις φερυλικές πρωτεΐνες.
- Ισχυρός εκκαθαριστής του μονήρους O_2 σε υδατικά διαλύματα.
- Αναγεννά την α-τοκοφερόλη.
- Εκκαθαριστής των λίαν επικίνδυνων υδροξυλικών ριζών.
- Προστατεύει τα λιπίδια του πλάσματος από την υπεροξειδωση συνεπεία της δράσης των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων.
- Δρα προστατευτικά έναντι των οξειδωτικών ουσιών του καπνού του τσιγάρου

3- Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή (σχ. 1), απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από εκείνες των τοκοφερολών. Η καλή διαλυτότητα που παρουσιάζουν, τους επιτρέπει να προστατεύουν υδρόφοβα μόρια, τα οποία δεν είναι προσεγγίσιμα από τις τοκοφερόλες⁵³. Το λυκοπένιο, το πλησιέστερο πρόδρομο μόριο του β-καροτενίου, αποτελεί τον αποτελεσματικότερο βιολογικό εκκαθαριστή του μονήρους οξυγόνου, καθώς ένα μόριο λυκοπενίου μπορεί να απενεργοποιήσει εκατοντάδες μόρια μονήρους O_2 με ένα μηχανισμό φυσικής απόσβεσης⁵⁴. Το β-καροτένιο παρουσιάζει ασθενέστερη δράση⁵⁵.

Σε μεγάλη πολυκεντρική μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα β-καροτένια δρουν προστατευτικά όσον αφορά στην εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου, περιορίζοντας την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων⁵⁶. Η σύνοψη, εξάλλου, των αποτελεσμάτων κλινικών δοκιμών με μεγάλο αριθμό ασθενών, περισσότερων των 1000 η καθεμία, με προδιαθεσικούς παράγοντες για τη εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, στους

οποίους χορηγήθηκαν βιταμίνη Ε σε δόση 30-50 mg ημερησίως και β-καροτένια σε δόση 20-50 mg ημερησίως, ανέδειξε σημαντική μείωση κατά 17-29% της συνολικής θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο, μετά από μακρά παρακολούθηση, μεγαλύτερη των 6 ετών⁵⁷.

4- Απτοσφαιρίνες, αιμοπεξίνη

Η αιμοσφαιρίνη, όπως επίσης και η μυοσφαιρίνη, μπορούν να επιταχύνουν την οξειδωση των λιπιδίων. Η αντίδραση του δακτυλίου της αίμης με ισομοριακές συγκεντρώσεις H_2O_2 παράγει δραστικές μορφές, πιθανώς φερυλικές, ο σχηματισμός των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε λιπιδική υπεροξειδωση⁵⁸. Σε μια άλλη περίπτωση η περίσσεια H_2O_2 δυνατόν να προκαλέσει αποδόμηση των δακτυλίων της αίμης απελευθερώνοντας ιόντα σιδήρου, τα οποία είναι ικανά να διεγείρουν την παραγωγή $OH^\cdot$ και συνεπώς να προάγουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων⁵⁹. Αυτή καθ' εαυτή η αίμη, η οποία απελευθερώνεται από τις προσβεβλημένες αιμοπρωτεΐνες, είναι επίσης ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας.

Η σύνδεση της αιμοσφαιρίνης με τις αιμοσφαιρινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες του πλάσματος απτοσφαιρίνες ή της αίμης με την αιμοπεξίνη, ελαττώνει την αποτελεσματικότητα αυτών των συμπλόκων του σιδήρου. Τα συμπλέγματα αιμοσφαιρίνης – απτοσφαιρίνης και αίμης – αιμοπεξίνης, εκκαθαρίζονται ταχέως από την κυκλοφορία⁶⁰. Αδυναμία απομάκρυνσης της αιμοσφαιρίνης, όπως π.χ. στην υποαπτοσφαιριναιμία, πιστεύεται ότι μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του εγκεφάλου²⁹.

5- Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη δεσμεύει ισχυρώς τα ιόντα μονοσθενούς χαλκού και ασθενώς τα ιόντα δισθενούς σιδήρου.

Τα δεσμευμένα στο μόριό της ιόντα μονοσθενούς χαλκού, μπορούν να συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton (σημ 6) ώστε να σχηματίζεται υδροξυλική ρίζα από υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η σχηματιζόμενη υδροξυλική ρίζα δεσμεύεται αμέσως από την αλβουμίνη και δεν ελευθερώνεται στο πλάσμα. Έτσι η δραστική αυτή ρίζα ασκεί την δράση της στην αλβουμίνη και δεν καταστρέφει άλλα μόρια μεγαλύτερης βιολογικής σημασίας. Η δράση αυτή του Cu αποτελεί παράδειγμα ειδικής βιολογικής αντίδρασης, στην οποία η αλβουμίνη λειτουργεί ως αντιοξειδωτική ουσία, η οποία «θυσιάζεται» (sacrificial antioxidant)⁶¹. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης στο πλάσμα και η ταχεία ανακύκλωσή της αντιρροπούν τις απώλειες από την θυσία της πρωτεΐνης, και έτσι τις καθιστούν βιολογικά

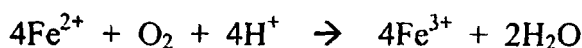
ασήμαντες. Η αλβουμίνη, είναι επίσης ένας ισχυρός εκκαθαριστής του υποχλωρικού οξέος HOCl στο πλάσμα.

6- Τρανσφερίνη

Η τρανσφερίνη του πλάσματος δεσμεύει τον δισθενή σίδηρο, με αποτέλεσμα να παύει ή να μετριάζεται η συμμετοχή του ιόντος στην λιπιδική υπεροξειδωση και σε αντιδράσεις τύπου Haber - Weiss, υπό τη αυτονόητη προϋπόθεση ότι θα υπάρχει διαθέσιμη επαρκής σιδηροδεσμευτική ικανότητα της πρωτεΐνης ⁶². Η λακτοφερίνη, η οποία ευρίσκεται στις ανθρώπινες εκκρίσεις και απελευθερώνεται από τα ουδετερόφιλα, δρα σαν αντιοξειδωτικό δεσμεύοντας επίσης ιόντα σιδήρου.

7- Σερουλοπλασμίνη

Η σερουλοπλασμίνη παρουσιάζει δράση σιδηρο-οξειδάσης, οξειδώνοντας τον Fe^{2+} σε Fe^{3+} , ενώ ανάγει το οξυγόνο σε νερό:



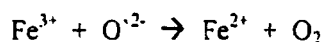
Κατ' αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες κατακρατούνται στα ενεργά κέντρα της πρωτεΐνης. Η σιδηρο-οξειδωτική δραστηριότητα της σερουλοπλασμίνης, της επιτρέπει να αποτρέπει την εκ των ιόντων σιδήρου εξαρτώμενη λιπιδική υπεροξειδωση, καθώς και τον σχηματισμό $OH^\cdot$ από το H_2O_2 , και αυτή φαίνεται να είναι η πλέον σημαντική αντιοξειδωτική της δράση ⁶³. Επιπρόσθετα αντιδρά στοιχειομετρικά με το H_2O_2 και με το $O^\cdot$. Η σερουλοπλασμίνη, περιέχουσα στο μόριό της μεγάλη ποσότητα ιόντων χαλκού, συνδεδεμένη μαζί του κατά τρόπο μη ειδικό, τον αποκλείει ως διαθέσιμο υλικό, από τις αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης και τις αντιδράσεις σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου.

Αποτελεί τον κύριο αμυντικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό στο πλάσμα ⁶².

-σημ 6. Πρώτος ο Fenton το 1984 υποστήριξε ότι η υδροξυλική ρίζα ($^\cdot OH$) σχηματίζεται κατά την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου:



Η αντίδραση Fenton τροποποιήθηκε για να περιλάβει την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου από το ανιόν του σουπεροξειδίου. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε δύο στάδια κατά τους Haber και Weiss:



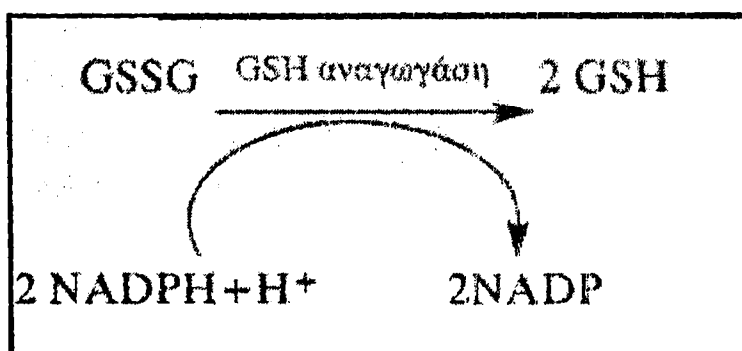
8- Χολερυθρίνη – Ουρικό οξύ

Έχει δειχθεί *in vitro* ότι η **χολερυθρίνη** ενεργεί ως αντιοξειδωτικός αναστολέας της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Είναι πιθανόν να προστατεύει *in vivo* από την υπεροξειδωση τα λιπαρά οξέα που συνδέονται με την αλβουμίνη ⁶⁴.

Το **ουρικό οξύ** δρα ως αντιοξειδωτικό δεσμεύοντας τα ιόντα σιδήρου και χαλκού αφ' ενός, αφ' ετέρου δε εκκαθαρίζοντας οξειδωτικές μορφές όπως το μονήρες O_2 , το $HOCl$ και ρίζες περοξυλίου ⁶⁵. Πάντως σε ορισμένες περιπτώσεις η αντίδραση του ουρικού οξέως με το $OH^\cdot$ ή τις ρίζες περοξυλίου, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ριζών ουρικού οξέως, οι οποίες είναι σε θέση να προκαλέσουν βιολογική δράση απενεργοποιώντας π.χ. ορισμένα ένζυμα. Οι ρίζες αυτές του ουρικού οξέως ανάγονται τελικά από το ασκορβικό οξύ, και αποσοβείται έτσι ο κίνδυνος αυτός.

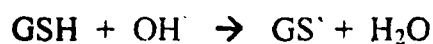
9- Θειόλες- Γλουταθειόνη

Οι **θειόλες** διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού. Η **γλουταθειόνη** (GSH), ένα τριπεπτίδιο (γ -Glu-Cys-Gly), αποτελεί την κύρια μικρού μοριακού βάρους θειόλη. Βρίσκεται σε όλα τα ζωικά κύτταρα και πέρα από τον πολυσήμαντο ρόλο της στην φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου ⁶⁶, σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις είναι μια από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ουσίες τους. Δρα ως εκκαθαριστής του υπεροξειδίου του υδρογόνου, των λιποϋδροϋπεροξειδίων και των φωσφολιποϋδροϋπεροξειδίων συμμετέχοντας σε αντιδράσεις που καταλύονται από τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης που περιέχουν σελήνιο. Η δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG) που σχηματίζεται κατά τις αντιδράσεις αυτές, ανάγεται στη συνέχεια σε GSH (αναγέννηση της γλουταθειόνης) με το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης, το οποίο χρησιμοποιεί ως αναγωγικό ισοδύναμο το $NADPH$, το οποίο προέρχεται κυρίως από την γλυκόζη μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών ⁶⁷:



Η μεταφορά του NADPH γίνεται δια μέσου του FAD (φλαβινοαδενινονουκλεοτίδιο). Η αναγέννηση της GSH είναι απαραίτητη ώστε να διατηρείται σταθερός ο λόγος GSH / GSSG (σημ 7). Στα περισσότερα κύτταρα η σχέση αυτή είναι μεγαλύτερη από 500 ⁶⁸.

Παράλληλα με τις ενζυμικές αντιοξειδωτικές δράσεις η GSH λειτουργεί και ως άμεσος εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, χωρίς την παρουσία ενζύμων:



Η σουλφυδρυλική ρίζα (GS[·]) αν και λιγότερο δραστική από την υδροξυλική (HO[·]), είναι δυνατόν να πυροδοτήσει την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών ³². Επίσης βραδεία αντίδραση της GSH με το O[·]₂ (ανιόν του σουπεροξειδίου) δυνατόν να οδηγήσει στον σχηματισμό του μονήρους οξυγόνου (¹O₂) ⁶⁹.

Επομένως, παρά την καταξιωμένη αντιοξειδωτική της δράση, πιθανόν η γλουταθειόνη να μπορεί να προκαλέσει και ανεπιθύμητες οξειδωτικές αντιδράσεις.

Η GSH, τέλος είτε μόνη της είτε μέσω του ασκορβικού οξέως φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας διατήρησης της α-τοκοφερόλης και πιθανώς και άλλων ιστικών αντιοξειδωτικών στην αναγωγική τους μορφή ⁷⁰.

Ανεπάρκεια της GSH σε νεογέννητα και ενήλικα ποντίκια συσχετίστηκε με σημαντική ελάττωση των επιπέδων του ασκορβικού οξέως ⁷¹.

-σημ 7. Ο λόγος GSH / GSSG έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές ως δείκτης της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και οι μεταβολές του πιστεύεται ότι εκφράζουν αριθμητικά το ιστικό οξειδωτικό stress.



Εν κατακλείδι, ο οργανισμός προκειμένου να προστατευθεί από τις τοξικές δράσεις των δραστικών μορφών του οξυγόνου, η παραγωγή των οποίων έχει στενή σχέση με την αερόβια ζωή, έχει αναπτύξει μια πλειάδα αντιοξειδωτικών συστημάτων, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις συνεργάζονται και αλληλοϋποστηρίζονται. Η αντιοξειδωτική σύσταση ενός βιολογικού υγρού από αυτήν ενός άλλου μπορεί να διαφέρει. Έτσι π.χ. στο πλάσμα η κύρια δράση των συστημάτων αυτών κατευθύνεται στην παρεμπόδιση των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης από την ανάπτυξη καταστροφικών αντιδράσεων, όπως της λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενώ σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως στο εγκεφαλονωτιαίο ή στο αρθρικό υγρό, η έναντι των μετάλλων αυτών αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να είναι πτωχότερη. Όλα όμως τα αντιοξειδωτικά συστήματα, ενδοκυττάρια, εξωκυττάρια και κυτταρικών μεμβρανών, κατατείνουν στον ίδιο στόχο: τις ROS. Και με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, υπό φυσιολογικές συνθήκες τον επιτυγχάνουν.



1.4. Παραγωγή-απελευθέρωση ΕΡΟ κατά το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Βάσει προηγούμενων μελετών προκύπτει ότι κατά το σύνδρομο ισχαιμίας επαναιμάτωσης παρατηρείται αθρόα έκλυση ΕΡΟ, με δυσμενή για τον οργανισμό αποτελέσματα.⁸⁷

Παρά το γεγονός ότι η ΕΡΟ υφίστανται μόνο για κλάσματα του δευτερολέπτου μετά τη γένεσή τους, η παραγωγή τους συνεχίζεται για αρκετό χρονικό διάστημα μετά την έναρξη της επανακυκλοφορίας. Επίσης οι αλλοιώσεις δεν προκαλούνται στην φάση της ισχαιμίας, αλλά στη φάση της επαναιμάτωσης-επανακυκλοφορίας⁷⁶.

Έχει δειχθεί (Cross et al) ότι σε αρκετές περιπτώσεις η υποξία που οφείλεται σε ισχαιμία μπορεί να είναι λιγότερο επιβλαβής για τους ιστούς, από την αθρόα παραγωγή ΕΡΟ που παρατηρείται κατά τη φάση επαναιμάτωσης με την επανείσοδο του οξυγόνου στους ισχαιμικούς ιστούς.⁷⁴

Οι ίδιοι υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός παραγωγής ΕΡΟ ξεκινά από τα μιτοχόνδρια, από την οξειδάση της ξανθίνης, από το αραχιδονικό οξύ και από τα συσσωρευμένα στον ισχαιμο ιστό πολυμορφοπύρηνα.⁷⁴

Κατά τη φάση επαναιμάτωσης ισχαιμούντων ιστών και οργάνων διαπιστώνεται αυξημένη παραγωγή ΕΡΟ (McCord JM) και υποδεικνύεται ως κυριότερη πηγή παραγωγής υπεροξειδίων η δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης.⁷⁵ (σχ. 2).

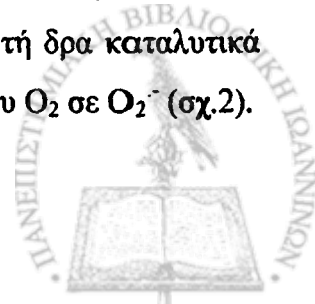
Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και ο Granger DN.⁸⁶

Πρόσφατες μελέτες αποδίδουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ΕΡΟ και σχηματισμό ROS κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση διαδραματίζουν το ένζυμο NADPH- οξειδάση, τα κύτταρα KUPFFER και τα ουδετερόφιλα. Ιδιαίτερα δε σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος του δισθενούς σιδήρου Fe^{2+} .¹⁰⁸

Οξειδάση της Ξανθίνης

Το ένζυμο αυτό δραστηριοποιείται από τα ιόντα Ca^{++} που δρουν πρωτεολυτικά επί της δεϋδρογενάσης της ξανθίνης.

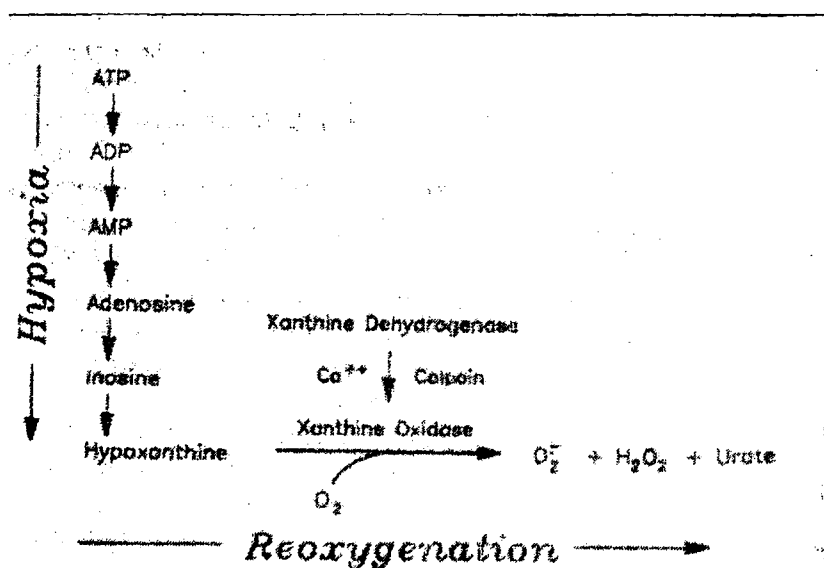
Σημαντικό ποσοστό δεϋδρογενάσης της ξανθίνης XDH μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης XO κατά τις περιόδους παρατεταμένης ηπατικής ισχαιμίας. Αυτή δρα καταλυτικά επί της υποξανθίνης και τη μετατρέπει σε urate με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε O_2^- (σχ.2).



Ενώ η ΧΟ παράγεται ενδοκυττάρια, έχει επίσης ανιχνευτεί στην κυκλοφορία και θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για επιβλαβή αποτελέσματα σε όργανα και ιστούς μακριά από το σημείο της αρχικής ισχαιμίας.

Πρόσφατα έχουν δημοσιευθεί μελέτες που αμφισβητούν το ρόλο του ενζύμου αυτού κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση του ήπατος, διότι στον αναστολέα της ΧΟ, αλλοπουρινόλη, (που χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την προστασία των ηπατικών κυττάρων), αποδίδεται και άλλη δράση εκτός της αναστολής της ΧΟ. Διαφαίνεται δηλαδή ότι η αλλοπουρινόλη παρουσιάζει αφ' εαυτής σαφείς ιδιότητες δέσμευσης των $O_2^{\cdot -}$.^{112,113}

Σχήμα 2. Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού ΕΡΟ από την δράση της ΧΟ, κατά το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.



Μιτοχόνδρια

Ενδιάμεσα στοιχεία της διεξαγόμενης στα μιτοχόνδρια αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και άλλων συστημάτων τα οποία καταναλώνουν O_2 , υφίστανται μεγάλου βαθμού αναγωγή κατά την περίοδο της ισχαιμίας, λόγω της έλλειψης οξυγόνου. Αυτό επιφέρει μεγάλης έκτασης παραγωγή ελευθέρων ριζών. Παρατηρήθηκε επίσης παροδική έξαρση σχηματισμού ROS κατά την επανοξυγόνωση, οφειλόμενη στην άφθονη παρουσία O_2 . Αποτέλεσμα αυτών είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών $O_2^{\cdot -}$.¹⁰⁸

NADPH-οξειδάση

Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να ανάγει το O_2 , προκαλώντας έτσι παραγωγή $O_2^{\cdot -}$, αντλώντας ηλεκτρόνια από τις ενδοκυττάριας NADPH και NADH¹¹⁴. Αυτό συμβαίνει τόσο σε φαγοκύτταρα όσο και σε ενδοθηλιακά και ηπατικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι οι

αναστολείς της φαγοκυττάριας NADPH-οξειδάσης, diphenyleneiodonium και apocynin, προκαλούν αναστολή παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την φάση της επανοξυγόνωσης, γεγονός που επιβεβαιώνει την εμπλοκή του ενζύμου αυτού στο οξειδωτικό stress.

Κύτταρα KUPFFER

Τα μακροφάγα αυτά κύτταρα του ήπατος, αποτελούν μια από τις σοβαρότερες πηγές παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ με τη δράση τους κατά την πρώτη φάση της επαναιμάτωσης, με αποτέλεσμα βλάβες των ηπατικών κυττάρων κατά την ισχαιμία και κατά τις μεταμοσχεύσεις του ήπατος ¹¹⁵. Ο σχηματισμός των $O_2^{\cdot -}$ σε συνδυασμό με τη δράση του ενζύμου NADPH-οξειδάσης, ενοχοποιείται και για τις αγγειακές και παρεγχυματικές κυτταρικές βλάβες του ήπατος.

Ουδετερόφιλα

Τα κύτταρα αυτά προσκολλώνται στο ενδοθήλιο κατά την πρώτη φάση της επαναιμάτωσης και προκαλούν φλεγμονή και παραγωγή $O_2^{\cdot -}$, το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 , σε υποχλωρικό οξύ και άλλα δραστικά μόρια με την δράση ειδικών ενζύμων. Κατά τις πρώτες ώρες μετά την επαναιμάτωση παρατηρήθηκε και δράση τους στο υπενδοθήλιο ¹¹⁵. Αποτέλεσμα των βλαβών είναι η προσέλευση και νέων ουδετερόφιλων με περαιτέρω επέκταση των επιβλαβών φαινομένων.

Ο ρόλος του σιδήρου Fe^{2+} στον μηχανισμό τοξικής δράσης των EPO

Γενικά ούτε το ανιόν του σουπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$, ούτε το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 είναι ισχυρά οξειδωτικά. Παρουσία όμως δισθενούς σιδήρου Fe^{2+} , λαμβάνει χώρα η αντίδραση κατά Fenton και σχηματίζεται η άκρως δραστική ρίζα υδροξυλίου $HO^{\cdot}$.

Το μεγαλύτερο ποσοστό του σιδήρου είναι δεσμευμένο υπό μορφή φερριτίνης ή σε μόρια ενζύμων και έτσι δεν μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση Fenton. (σημ 6)

Ένα ελάχιστο όμως ποσοστό Fe^{2+} , το οποίο βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή στα λυσοσώματα μετά την φαγοκυττάρωση πρωτεϊνών, είναι σε θέση να αντιδράσει με τα υπεροξείδια. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, καθιστώντας τον Fe^{2+} ιδιαίτερα απειλητικό ¹⁰⁸.

Εκτός των ανωτέρω, το H_2O_2 μπορεί να αντιδράσει και με το σίδηρο του μορίου των πρωτεϊνών που περιέχουν αίμη, με παραγωγή μιας ασταθούς ελεύθερης ρίζας ^{116,117}.

Παρουσία επαρκούς ποσότητας αντιοξειδωτικών, όπως ασκορβικού οξέος, τα οξειδωμένα

πρωτεϊνικά μόρια αποκαθίστανται ^{117,118,119,120}. Ελλείψει όμως αντιοξειδωτικής άμυνας η οξείδωση επεκτείνεται, με αποτέλεσμα αποδέσμευση της αίμης από τα πρωτεϊνικά μόρια και απελευθέρωση Fe^{2+} , ο οποίος δυνητικά υπεισέρχεται πάλι στην αντίδραση Fenton.(σημ 6) ^{117,121}



1.5 Στρατηγικές αντιμετώπισης της τοξικής δράσης των Ελευθέρων Ριζών

Οι προσπάθειες αντιμετώπισης των επιβλαβών δράσεων των ΕΡΟ μπορούν να συμπεριληφθούν σε τρεις γενικούς στόχους

- να ενισχυθεί η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού
- να αδρανοποιηθούν δραστικά μόρια και ρίζες
- να παρεμποδισθεί ο σχηματισμός δραστικών μορφών Οξυγόνου (ROS) προστατεύοντας έτσι τις κυτταρικές δομές ¹⁰⁸.

Preconditioning

Αποτελεί νεώτερη μέθοδο αντιμετώπισης των επιβλαβών αποτελεσμάτων του συνδρόμου ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, πολλά υποσχόμενη.

Η μέθοδος στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι ίδιες οι ROS, σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προκαλούν ενδοκυττάριας διαδικασίες οι οποίες αυξάνουν την ικανότητα των κυττάρων να αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό stress.

Συνίσταται στην αύξηση της ανεκτικότητας των διαφόρων οργάνων στην ισχαιμία – επαναιμάτωση.

Επιτυγχάνεται με την έκθεση οργάνων (κυριότερες μελέτες σε ηπατικά κύτταρα) σε περιοδικούς σύντομους κύκλους παροδικής ισχαιμίας, περιορισμένης διάρκειας, έτσι ώστε να μην προκαλούνται μη αναστρέψιμες αλλοιώσεις στα κύτταρα των οργάνων ¹²². Διαφαίνεται ότι η έκθεση του κυττάρου σε χαμηλές συγκεντρώσεις ROS (όπως O_2^- και H_2O_2) το οδηγεί στην χρήση νέων μεταβολικών οδών, με αποτέλεσμα την σταδιακή προσαρμογή του. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται να αυξάνεται η ανοχή και η αντοχή του οργάνου σε επεισόδια παρατεταμένης ισχαιμίας ¹⁰⁸.

Ο πιθανός μηχανισμός που αποδίδεται στο φαινόμενο, συνίσταται στην διάνοιξη των διαύλων K^+ των μιτοχονδρίων, που παρατηρείται κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση του κυττάρου.

Ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα

Όπως αναφέρθηκε, τα ένζυμα SODs, καταλάσες, περοξιδάσες της γλουταθειόνης, περοξυρεδοξίνες, αποτελούν την ενδογενή άμυνα του οργανισμού στο οξειδωτικό stress.

Έχουν γίνει σε πειραματόζωα, προσπάθειες για γενετικές παρεμβάσεις στα ένζυμα αυτά, ώστε να ενισχυθεί η δραστηριότητά τους. Επίσης πειραματικά, έχει μελετηθεί η εξωγενής χορήγηση απομονωμένων ενζύμων ¹⁰⁸.

Βιταμίνες E και C

Έχουν μελετηθεί τα αποτελέσματα χορήγησης υψηλών δόσεων βιταμίνης E (α- τοκοφερόλης) σε πειραματόζωα και δείχθηκε ότι μειώθηκε σε σημαντικό βαθμό η υπεροξειδωση των λιπιδίων κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση ⁶¹.

Παρόμοιου τύπου προστασία με αυτήν της α-τοκοφερόλης έχει αποδοθεί στο Trolox, το οποίο είναι ένα υδροφιλικό ανάλογο της βιταμίνης E. ¹⁰⁷

Εκτός από την ιδιότητά της ως εκκαθαριστή (scavenger) ελευθέρων ριζών, αποδίδονται και άλλες ιδιότητες στην βιτ. E, όπως αναστολή της protein kinase C και μέσω αυτής αναστολή της δράσης του H₂O₂.

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένα υδατοδιαλυτό ισχυρό ενδογενές αντιοξειδωτικό (πιν 2). Πολύ καλά αποτελέσματα διαφαίνεται ότι επιτυγχάνονται με την σύγχρονη χορήγηση βιτ E και βιτ C. Διαπιστώθηκε σημαντική μείωση των δεικτών οξειδωτικού stress κατά την μεταμόσχευση ήπατος ¹²³.

Αντιοξειδωτικά με σουλφωδρυλικές ομάδες

Παρουσιάζουν ευεργετικά αποτελέσματα κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση καθώς και στις μεταμοσχεύσεις ήπατος. Έχει μελετηθεί η χορήγηση γλουταθειόνης (GSH) σε πειραματόζωα ¹²⁴ και N-ακετυλκυστεΐνης ¹²⁵ καθώς και βουκυλαμίνης και gamma-glutamylcysteine.

Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

Πολλές φυσικές ουσίες έχουν μελετηθεί in vitro κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση ήπατος με θετικά αποτελέσματα: quercetin, cyanidin 3-O-beta-D-glucoside, melatonin, ergothioneine, picroliv, καθώς επίσης και συνθετικές: 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Tempol, idebenone και άλλες.

Αναστολείς της παραγωγής O₂⁻

NADPH οξειδάση: πρόσφατες μελέτες αποδίδουν σοβαρή υπαιτιότητα στη δράση του ενζύμου αυτού, για τις βλάβες κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση ηπατικών κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι με την χορήγηση αναστολέων του ενζύμου αυτού, επιτυγχάνεται προστασία των κυττάρων. Οι αναστολείς που μελετήθηκαν είναι diphenyleneiodonium, και apocynin (τα οποία φαίνεται να αναστέλλουν την δράση των ουδετερόφιλων και να ελέγχουν την συγκόλληση λευκών αιμοσφαιρίων) και πεπτίδια περιέχοντα προλίνη (proline-rich

peptides) τα οποία αναστέλλουν την δράση της NADPH οξειδάσης τόσο στα φαγοκύτταρα όσο και αλλού ¹⁰⁸.

Οξειδάση της ξανθίνης (XO): ο ρόλος του ενζύμου αυτού αμφισβητείται από την στιγμή που στον αναστολέα του, την αλλοπουρινόλη, αποδίδονται σαφείς αντιοξειδωτικές ιδιότητες ^{112,113}.

Κύτταρα KUPFFER: προκαλούν παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ καθώς και άλλων δραστικών ριζών. Η ουσία που μελετήθηκε για την αδρανοποίηση τους είναι το χλωρικό γαδολίνιο (gadolinium chloride $GdCl_3$), το οποίο φαίνεται να συμβάλλει στην προστασία των ηπατικών κυττάρων ¹²⁶.

Δισθενής Σίδηρος (Redox-active Iron Fe^{2+})

Όπως αναφέρθηκε ο ρόλος του σιδήρου σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, είναι ιδιαίτερα απειλητικός. Προκύπτει ότι η δέσμευση του Fe^{2+} σε σύμπλοκα μόρια, θα πρέπει να αποτελεί πρωταρχικό στόχο για την αντιμετώπιση της τοξικής του δράσης κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση ¹⁰⁸.

Χρησιμοποιήθηκε η desferrioxamine η οποία είναι ισχυρός δεσμευτής του σιδήρου. Παρουσιάζει όμως το μειονέκτημα της αδυναμίας παθητικής διέλευσης από τις κυτταρικές μεμβράνες, λόγω του ότι το μόριο είναι υδρόφιλο και έχει σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος. Με γενετικές παρεμβάσεις επιτεύχθηκε η δυνατότητα εισόδου με ενδοκυττάρωση, οπότε η desferrioxamine φθάνει στα λυσοσώματα όπου και δεσμεύει τον σίδηρο ^{127,128}.

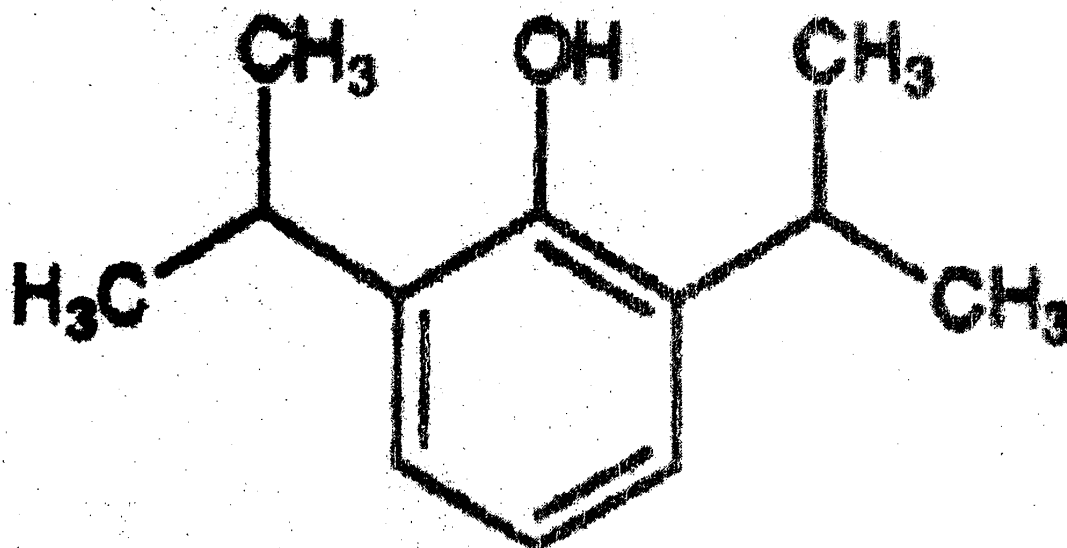
Το N-methyl hexanoylhydroxamic acid, δεσμευτής σιδήρου ανάλογος της desferrioxamine, φαίνεται να παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα, λόγω της ιδιότητας του να διέρχεται τις κυτταρικές μεμβράνες και να δρα ενδοκυττάρια. ¹⁰⁸



Προποφόλη

Propofol, 2,6-Bis(1-methylethyl)phenol. – 2,6-diisopropylphenol.

C₁₂H₁₈O. M.B 178.27 C: 80.85%, H: 10.18%, O: 8.97%.



Το φάρμακο αυτό είναι ευρέως χρησιμοποιούμενος αναισθητικός παράγοντας. Η αντιοξειδωτική δράση της προποφόλης είναι ευρέως τεκμηριωμένη σε πολλές μελέτες.^{88,89,90,91,92}

Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στη δομή του μορίου της, η οποία είναι παρόμοια με των φαινολικών ενώσεων, όπως η βιταμίνη Ε. Οι μηχανισμοί δράσης της είναι πολλαπλοί:

- συμπεριφέρεται ως εκκαθαριστής (scavenger) ελευθέρων ριζών^{89,92}.
- φαίνεται ότι μετριάξει την δράση των ιόντων ασβεστίου Ca²⁺^{129,130}
- αναστέλλει την δράση των ουδετερόφιλων^{131,132}.

Από μελέτες προκύπτει ότι η προποφόλη δρα κατά την φάση της επαναιμάτωσης¹³³, και ότι αδυνατεί να δράσει ως παράγοντας preconditioning⁹⁶.

Ο μηχανισμός δράσης της προποφόλης φαίνεται ότι είναι η διατήρηση της διαβατότητας των διαύλων K_{ATP} τόσο στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων (mitochondrial K_{ATP} channels), όσο και στις σαρκολειμματικές μεμβράνες (sarcolemmal K_{ATP} channels)¹³⁴.

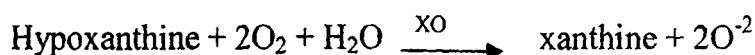
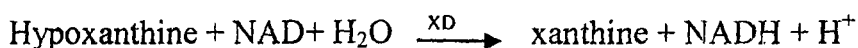
Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η δράση της προποφόλης επί της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου και έχει δειχθεί ότι μετριάξει την δυσλειτουργία των μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από ισχαιμία και περιορίζει την έκταση της εμφραγματικής περιοχής^{91,133,134,135}.

Για τις ιδιότητές της αυτές, η προποφόλη επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και διερευνήθηκε η δράση της επί της παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης μυϊκού ιστού.

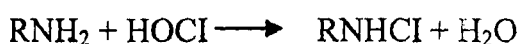
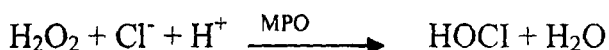


1.6. Παραγωγή-απελευθέρωση EPO κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση μυϊκού ιστού

Ο Cho Y. Pang σε μελέτη του παρατηρεί αυξημένη παραγωγή EPO κατά το σύνδρομο ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε μυϊκούς κρημνούς και το αποδίδει στη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης,



καθώς και στα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα από τα οποία προκύπτουν υποχλωρικό οξύ (HOCl) μέσω του ενζύμου μυελοπεροξειδάσης (MPO) και κατόπιν χλωροαμίνες ⁷⁷.



Οι Concannon et al σε εξειδικευμένη μελέτη συνδρόμου ισχαιμίας επαναιμάτωσης με εφαρμογή Tourniquet σε οπίσθια άκρα κουνελιών υποστηρίζουν ότι α) η αυξημένη παραγωγή EPO είναι ανάλογη του χρονικού διαστήματος της ισχαιμίας και β) ότι οι διακοπές εφαρμογής του Tourniquet με περιοδικές επαναιματώσεις, προκαλούν επιπλέον αύξηση παραγωγής EPO και συνεπάγονται άθροιση των ισχαιμικών βλαβών. (Οπότε κατά συνέπεια οι περιοδικές διακοπές στην εφαρμογή του Tourniquet πρέπει να αποφεύγονται) ⁷⁸.

Περισσότερο εξειδικευμένη είναι η μελέτη των Mali Mathru et al, οι οποίοι μελέτησαν το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε επεμβάσεις κάτω άκρων με χρήση Tourniquet και θεωρούν ότι οι επεμβάσεις αυτού του είδους είναι οι πλέον χαρακτηριστικές για τις εν λόγω μελέτες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι κατά την επαναιμάτωση παρατηρήθηκε αυξημένη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης καθώς και αυξημένη παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (O^{2-}) που προκαλούν με τη σειρά τους αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς επίσης και ριζών υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$) που είναι υπεύθυνα για τις ιστικές βλάβες. Τα προϊόντα αυτά ανευρίσκονται τόσο στην τοπική όσο και στην συστηματική κυκλοφορία

Ειδικότερα, μετά την άρση της ισχαιμής περίδεσης σε ορθοπαιδικές επεμβάσεις άκρων με χρήση tourniquet, αναφέρεται (Kahraman S et al) αυξημένη απελευθέρωση ελευθέρων ριζών. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε in vitro, επί ιστικών τεμαχίων ⁷³.

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται εξειδικευμένα σε χειρουργικές επεμβάσεις ΟΑ γόνατος με χρήση ισχαιμου επιδέσμου (tourniquet), οπότε κατά συνέπεια το κάτω άκρο υπόκειται σε περίοδο παρατεταμένης ισχαιμίας.

Οι μετρήσεις έγιναν in vivo, με αιμοληψίες από την συστηματική κυκλοφορία.

Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μετρήσεων που διενεργήθηκαν, έρχονται να συμφωνήσουν με αυτά προηγούμενων μελετών, επιβεβαιώθηκε δηλαδή αυξημένη απελευθέρωση ελευθέρων ριζών σε χειρουργικές επεμβάσεις ΟΑ γόνατος με χρήση tourniquet.



1.7 Επώδυνα σύνδρομα οφειλόμενα στη δράση των EPO

Κατά το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης οι EPO προκαλούν βλάβες, οι οποίες κατ' αρχήν εκδηλώνονται σε κυτταρικό επίπεδο και κατόπιν επηρεάζουν τους διάφορους ιστούς⁷⁹. Συγκεκριμένες μελέτες συσχετίζουν την δράση των EPO, κατόπιν ισχαιμίας διαφόρων οργάνων και των επώδυνων συνδρόμων που προκαλούν.

Κατά την προσέγγιση του προβλήματος του κοιλιακού άλγους από παγκρεατίτιδα θεωρούνται σαφώς υπεύθυνες οι EPO (Salim A.S.)⁸¹.

Επίσης επισημαίνεται η υπευθυνότητα των EPO στο μηχανισμό του πόνου στο δωδεκαδακτυλικό έλκος (Pascu O., et all)⁸².

Οι Haque M.F., et all, ακολουθώντας την υπόθεση ότι οι EPO είναι υπεύθυνες για την πρόκληση πολλών συστηματικών και τοπικών ιστικών βλαβών οι οποίες εκδηλώνονται ως επώδυνα σύνδρομα, κατέληξαν ότι οι EPO είναι σαφώς εμπελεγμένες στην αιτιολογία του ιδιοπαθούς πόνου του προσωπικού κρανίου⁸³.

Ο Aghabeigi B., et all, σε περαιτέρω μελέτη τους σχετικά με τον ιδιοπαθή πόνο προσωπικού κρανίου έδειξαν ότι κατόπιν αυξημένης δραστηριότητας των EPO έχουμε αυξημένη παραγωγή 2,3-διϋδροβενζοϊκού οξέος. Επιβεβαιώθηκε η αυξημένη παραγωγή EPO σε TMJ aspirates σε ασθενείς με αρθρομυαλγία προσωπικού κρανίου, κατόπιν εύρεσης αυξημένων ποσοτήτων TBA-RS (thiobarbituric acid-reactive substances). Επίσης σε μελέτες αρθρικών υγρών (*synovial aspirates*) διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα του hyperalgesic eicosanoid 15-HETE. Εκτός αυτού θεωρούν πιθανόν υπεύθυνη την τοπική παραγωγή της cytokine⁸⁴.

Ειδικότερα οι EPO επιδρούν στον μυϊκό και νευρικό ιστό, προκαλώντας επώδυνα σύνδρομα. Σε μελέτη του ο T.L. Dormandy υποστηρίζει ότι οι EPO εμπλέκονται στον μηχανισμό του πόνου, λόγω της προσταγλανδινικής τους δράσης στην νευρομυϊκή σύναψη⁸⁰.

Διαπιστώνεται κατόπιν των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών, η επίδραση των EPO στον μηχανισμό του πόνου γενικότερα.

Σε άλλες μελέτες γίνεται σαφής συσχέτιση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου με την αύξηση διάρκειας εφαρμογής του tourniquet (Omeroglu H., et all)⁸⁵. Αυτό έρχεται να συμφωνήσει με την πιθανή υπαιτιότητα των EPO για την αυξημένη ένταση του μετεγχειρητικού πόνου, δεδομένου ότι η αυξημένη παραγωγή και τα επιβλαβή αποτελέσματα από την έκλυση των EPO είναι ανάλογα του χρονικού διαστήματος της ισχαιμίας⁷⁸. (Ίσως θα ήταν δόκιμο να γίνει σύγκριση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου μεταξύ περιστατικών Ολικής Αρθροπλαστικής γόνατος με χρήση tourniquet και άλλων χωρίς χρήση αυτού. Παρ'

ότι οι δεύτερες περιπτώσεις σπανίζουν, επειδή αποφεύγονται λόγω σοβαρής απώλειας αίματος, θα μπορούσαν μελλοντικά να συγκεντρωθούν).

Διαφαίνεται από τα προαναφερθέντα ότι σαν αποτέλεσμα της αύξησης της έκλυσης των ΕΡΟ παρατηρείται αύξηση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση της μελέτης μας, παραβλέπονται οι γενικότερες συστηματικές επιπτώσεις, και εξετάζονται κυρίως οι οφειλόμενες στις ΕΡΟ τοπικές ιστικές βλάβες του ισχαιμούντος άκρου και τα επώδυνα αποτελέσματά τους (τα οποία σαφώς έρχονται να προστεθούν σε αυτά τα αναπόφευκτα της χειρουργικής επέμβασης).



2.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η βασική επιδίωξη της μελέτης αυτής, είναι να διερευνηθεί η επίδραση διεγχειρητικής χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών, στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση στον μετεγχειρητικό πόνο και να συσχετισθεί η δυνατότητα προληπτικής αντιμετώπισης της απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου, – την οποία επιτυγχάνουμε με την χρήση αναισθησιολογικών φαρμάκων με αντιοξειδωτική δράση - με μείωση (περιορισμό) της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου.

Ανιχνεύουμε λοιπόν την έκλυση αυξημένων ποσοτήτων ΕΡΟ, κατόπιν συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στην εδική περίπτωση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος με χρήση ίσχαιμης περιόδου.

Έγιναν για το σκοπό αυτό συγκριτικές μετρήσεις μεταξύ περιστατικών στα οποία διεγχειρητικά χορηγήθηκε αντιοξειδωτική ουσία, με άλλα στα οποία δεν χορηγήθηκε.

Η αντιοξειδωτική ουσία που επιλέχθηκε ήταν το αναισθητικό φάρμακο *προποφόλη*, τόσο για την εισαγωγή, όσο και για την διατήρηση της αναισθησίας, σε bolus και σε στάγδην έγχυση. Η αντιοξειδωτική δράση της προποφόλης είναι ευρέως τεκμηριωμένη σε πολλές μελέτες.^{88,89,90,91,92} Επίσης είναι δεδομένη η ευρεία χρήση της κατά την χορήγηση αναισθησίας, τόσο για την εισαγωγή όσο και για την διατήρηση (βλ. Προποφόλη σελ. 39).

Κατά το δεύτερο (κλινικό) στάδιο της μελέτης, έγινε έρευνα και σύγκριση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου, στις δύο ομάδες περιστατικών.

Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας συγκεκριμένης χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών γενικά, ως μέσων αντιμετώπισης του μετεγχειρητικού πόνου.



Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η έρευνα χωρίζεται σε *εργαστηριακό* και σε *κλινικό* μέρος.

Το εργαστηριακό μέρος περιλαμβάνει μετρήσεις επιπέδων ελευθέρων ριζών οξυγόνου που απελευθερώνονται μετά την άρση της ίσχαιμης περίδεσης σε επεμβάσεις Ολικής Αρθροπλαστικής γόνατος. Ακολούθησε συγκριτική μελέτη των επιπέδων, μεταξύ περιστατικών στα οποία χορηγήθηκε αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά την αναισθησία και άλλων στα οποία δεν χορηγήθηκε.

Το κλινικό μέρος περιλαμβάνει καταγραφή της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου στα εν λόγω περιστατικά, καθώς επίσης και συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων μεταξύ των περιστατικών στα οποία χορηγήθηκε αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά την αναισθησία και των άλλων στα οποία δεν χορηγήθηκε.

Η αντιοξειδωτική ουσία που επιλέχθηκε ήταν το αναισθητικό φάρμακο *προποφόλη*, τόσο για την εισαγωγή, όσο και για την διατήρηση της αναισθησίας, σε bolus και σε στάγδην έγχυση.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες, 20 ατόμων: Την Ομάδα I (PROPOFOL) και την ομάδα II (CONTROL).

Στα περιστατικά της ομάδας I χορηγήθηκε αναισθητικό φάρμακο με σαφείς αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τόσο κατά την εισαγωγή όσο και για τη διατήρηση της αναισθησίας. Στα περιστατικά της ομάδας II κατά τη χορήγηση αναισθησίας δεν περιελήφθησαν φάρμακα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (Πλήρης περιγραφή της χορηγηθείσας αναισθησίας ακολουθεί στο κλινικό μέρος της μελέτης).



2.0 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Από κάθε ασθενή έγιναν διεγχειρητικά τρεις αιμοληψίες, από την συστηματική κυκλοφορία (περιφερική φλέβα).

Η πρώτη (Α), ακριβώς πριν την άρση του ισχαιμου επιδέσμου.

Η δεύτερη (Β) 5' min μετά την άρση του ισχαιμου επιδέσμου.

Η τρίτη (C) 30' min μετά την άρση του ισχαιμου επιδέσμου.

Η ποσότητα αίματος ήταν 5cc και συλλεγόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα με προσθήκη αντιπηκτικού (EDTA 5%), σε αναλογία 1:10.

Κατόπιν έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων, στις 2500 στροφές ανά λεπτό, επί 4' min σε 4°C και ακολουθούσε λήψη 200μL υπερκειμένου πλάσματος από κάθε δείγμα.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη, (-70°C) έως την στιγμή της επεξεργασίας τους.

Στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας έγινε η επεξεργασία των δειγμάτων σύμφωνα με την μέθοδο «Colorimetric Assay for Lipid Peroxidation» (OXFORD BIOMEDICAL RESEARCH, Catalog 7, σελ. 103).

Μετρήθηκαν τα προϊόντα TBA RS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) λιπιδιακής υπεροξειδωσης, τα οποία προκύπτουν από την δράση των ελευθέρων ριζών.

Τα προϊόντα αυτά είναι αλδεΐδες, (μαλονική αλδεΐδη- MDA, 4-υδροξειδο-ρενάλη και άλλα παράγωγα όπως 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE).

Η μέθοδος μέτρησης είναι φασματοσκοπική.

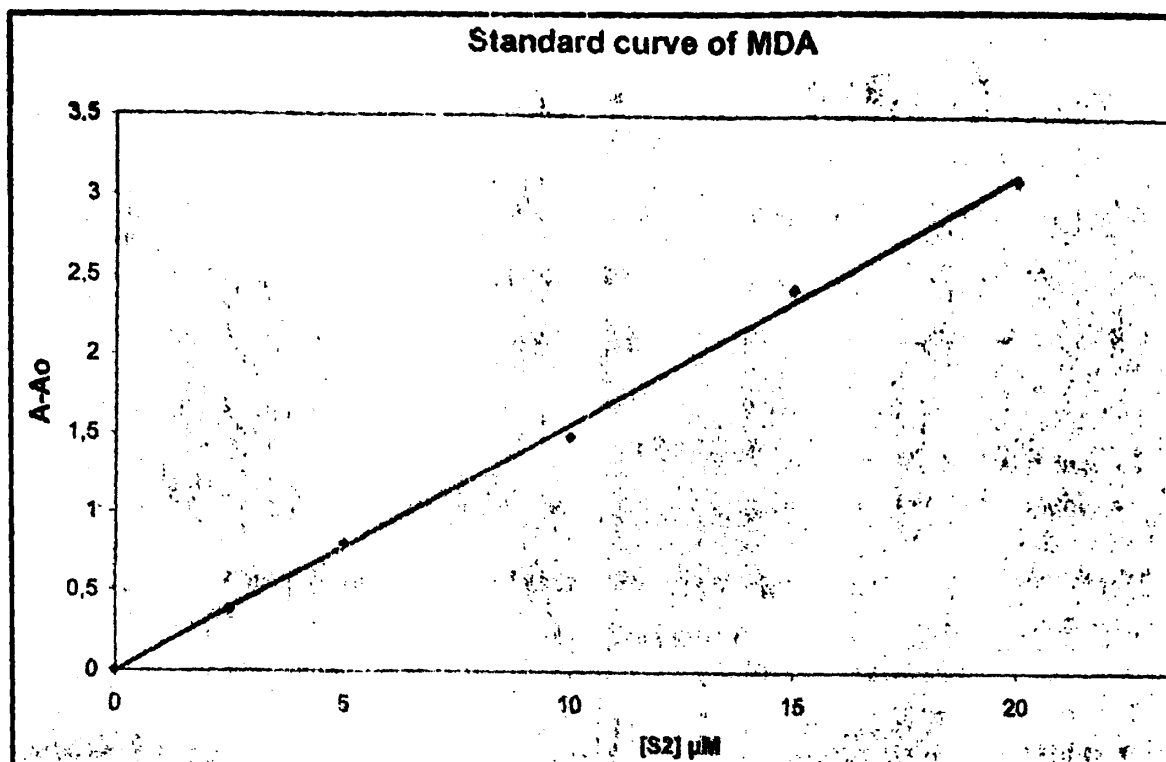
Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αντίδραση του χρωμογενικού αντιδραστηρίου R1 (N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile) με την MDA και τα 4-υδροξυ-αλκένια, σε θερμοκρασία 45°C.

Κατά την αντίδραση, ένα μόριο MDA αντιδρά και δεσμεύεται από 2 μόρια R1 οπότε σχηματίζεται μια σταθερά χρωμοφόρος ένωση με μέγιστη απορρόφηση του φωτός σε μήκος κύματος 586 nm.

Οι καμπύλες αναφοράς της μέτρησης έγιναν με διαλύματα S2: 1,1,3,3-tetramethoxypropane σε 20Mm Tris-HCL buffer, με Ph 7.4 (παρατίθεται η standard curve). $R^2 = 0.9982$. (Σχ. 3)



Σχήμα 3.



Ακολουθήσαν μετρήσεις επί των δειγμάτων.

Ο υπολογισμός έγινε βάσει του τύπου:

$$A - A_o = y$$

$$y = 0.1566x - 0.0065$$

όπου A_o είναι η απορρόφηση φωτός σε δείγμα ύδατος και A είναι η απορρόφηση φωτός παρουσία δείγματος υπό εξέταση.

Παρατίθεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων ο αναλυτικός πίνακας καταγραφής των τιμών των μετρήσεων (Πιν. 5), καθώς και πίνακας στατιστικής σύγκρισης μεταξύ των τιμών των δύο ομάδων στα αντίστοιχα χρονικά σημεία μέτρησης A, B, C (Πιν. 6).

3.0 ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν μέρος στην έρευνα ενημερώθηκαν για τον σκοπό αυτής και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Στην έρευνα έλαβαν μέρος 40 ασθενείς ηλικίας 64 έως 77 ετών, (μέση ηλικία 69,9), 14 άνδρες και 26 γυναίκες.

Πίνακας 3

Βιομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών				
Αριθμός ασθενών		40		
			Ομάδα I	Ομάδα II
Φύλο	Άνδρες	14	6	8
	Γυναίκες	26	14	12
Ηλικία	Μέση τιμή	69,9	69,15	70,8
	Σταθερή απόκλιση	+,- 5		
Βάρος	Μέση τιμή	73,8 kg	71,05	76,6
	Σταθερή απόκλιση	+,- 10 kg		

Κριτήρια Επιλογής: Ασθενείς κατηγορίας κινδύνου ASA I και II που επρόκειτο να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος.

Από την έρευνα αποκλείστηκαν:

- ασθενείς της κατηγορίας κινδύνου ASA III και IV,
- ασθενείς που αρνήθηκαν να δώσουν την έγγραφη συγκατάθεσή τους για την έρευνα,
- ασθενείς με αντενδείξεις στην γενική αναισθησία,
- άρνηση του ασθενή για γενική αναισθησία,
- αλλεργίες ή αντένδειξη στα φάρμακα που θα χρησιμοποιούνταν,
- τοξικομανείς, έγκυες γυναίκες,
- ασθενείς με παχυσαρκία,
- ασθενείς με χρόνιο αλκοολισμό,
- χρόνια χρήση βαρβιτουρικών,
- ασθενείς με ηπατοπάθειες ή νεφροπάθειες.



3.1 Προεγχειρητική αξιολόγηση ασθενών

Σε όλους τους ασθενείς έγινε την προηγούμενη ημέρα του χειρουργείου κατά τη διάρκεια της προαναισθητικής επίσκεψης η αξιολόγηση κινδύνου των ασθενών σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά ASA.

Μετά την αξιολόγηση των ευρημάτων οι ασθενείς ενημερώθηκαν για το είδος της αναισθησιολογικής τεχνικής που θα χρησιμοποιούνταν. Σε όλους τους ασθενείς χορηγήθηκε ως προαναισθητική αγωγή το βράδυ πριν την επέμβαση 1,5 – 3 mg Λοραζεπάμης από το στόμα ανάλογα με την ηλικία και την γενική κατάσταση.

3.2 Αναισθησία

Κατά την άφιξη του ασθενούς στο χειρουργείο έγινε μέτρηση της αρτηριακής πίεσης με την αυτόματη συσκευή μέτρησης DINAMAP της εταιρείας Criticon και απαγωγή ηλεκτροκαρδιογραφήματος στο monitor (απαγωγή V κατά Kaplan). Τοποθετήθηκε ένας περιφερικός φλεβοκαθετήρας διαμέτρου 18 G της εταιρείας Braun και έγινε προοξυγόνωση του ασθενούς με 100% οξυγόνο με την βοήθεια προσωπίδας για 10 λεπτά.

Η εισαγωγή στην αναισθησία έγινε σε όλους τους ασθενείς με χορήγηση φεντανύλης σε δοσολογία 100 µg. Όταν οι ασθενείς άρχισαν να αισθάνονται ζάλη χορηγήθηκε ενδοφλέβια: - στην ομάδα I προποφόλη σε δοσολογία 2 mg/Kg, και - στην ομάδα II θειοπεντάλη σε δοσολογία 5 mg/kg. Για τη διασωλήνωση χορηγήθηκε cis-ατρακούριο σε δοσολογία 0,15 mg/Kg ενδοφλεβίως. Μετά τη διασωλήνωση οι ασθενείς ετέθησαν σε μηχανικό αερισμό με οξυγόνο και υποξείδιο του αζώτου σε σχέση 1:2 σε ημίκλειστο σύστημα (Julian, Draegerwerk, Luebeck). Οι συνθήκες αερισμού των ασθενών ήταν: Εισπνευστικός όγκος (tidal volume) = 10 ml/Kg ιδανικού βάρους σώματος, συχνότης αναπνοών = 10 – 12 /min, σχέση εισπνοής: εκπνοής = 1:2 και μέση μέγιστη πίεση αεραγωγών / plateau = 20/ 16 mBar.

Ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκαν οι ασθενείς χορηγήθηκε επιπλέον για τη διατήρηση της αναισθησίας στην Ομάδα I προποφόλη σε δοσολογία 4 mg/Kg/h και στην Ομάδα II σεβοφλουράνιο σε τελοεκπνευστική συγκέντρωση 2%. Μεταβολές στη χορήγηση προποφόλης ή σεβοφλουρανίου ήταν ανάλογες με τις ανάγκες του ασθενούς και την αιμοδυναμική κατάσταση του ασθενούς όπως αύξηση μέσης αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής συχνότητας >25% των αναμενόμενων τιμών για τον κάθε ασθενή. Περαιτέρω σημεία ανεπαρκούς αναισθησίας ήταν το δάκρυσμα, το κοκκίνισμα και η εμφάνιση ιδρώτα. Η αρχική αύξηση της προποφόλης ή του σεβοφλουρανίου ήταν 1 mg/Kg/h και 1% αντίστοιχα. Όταν η μέση αρτηριακή πίεση ή η καρδιακή συχνότητα παρέμειναν αυξημένες (>25% από τις αναμενόμενες τιμές) μετά

από 5 λεπτά γινόταν και δεύτερη αύξηση στη χορήγηση προποφόλης ή σεβοφλουρανίου. Σε περίπτωση ανεπαρκούς απάντησης στις παραπάνω αυξήσεις γινόταν αύξηση στη χορήγηση της φεντανύλης της τάξεως του $0,1 \mu\text{g} / \text{Kg} / \text{min}$. Σε περίπτωση πτώσεως της καρδιακής συχνότητας με σφύξεις $<45/\text{min}$ χορηγούνταν ατροπίνη σε δοσολογία $0,5 \text{ mg}$ ενδοφλέβια. Μείωση της δοσολογίας των αναισθητικών ήταν επιτρεπτή μόνο σε περίπτωση υπότασης και βραδυκαρδίας μη ανατάξιμες στην χορήγηση υγρών ή στην χορήγηση ατροπίνης.

Η διεγχειρητική αναλγησία έγινε με χορήγηση φεντανύλης, σε συνολική δοσολογία $\sim 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (βλ Αριθμητικά δεδομένα μελέτης, Πιν. 4).

Στο τέλος της χειρουργικής επέμβασης έγινε διακοπή των αναισθητικών χωρίς σταδιακή μείωση ενώ ο αερισμός του ασθενούς γινόταν με 100% Οξυγόνο σε ροή 6 λίτρα το λεπτό.

Η αποσωλήνωση του ασθενούς γινόταν όταν η αυτόματη αναπνοή ήταν επαρκής ($V_t > 4 \text{ ml/Kg}$), ο ασθενής είχε ανακτήσει πλήρως τα αντανακλαστικά του και υπήρχε απάντηση σε λεκτικά ερεθίσματα.

3.3 Μετεγχειρητική αναλγησία

Στο πρωτόκολλο μετεγχειρητικής αναλγησίας ακολουθήθηκε συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα για όλους τους ασθενείς, ούτως ώστε να υπάρχει η δυνατότητα συγκριτικής μελέτης.

Μετά την αφύπνιση, στην αίθουσα ανάνηψης χορηγήθηκαν σε όλους τους ασθενείς 1200 mg Apotel σε στάγδην έγχυση εντός 100 ml φυσιολογικού ορού σε διάστημα 20 λεπτών.

Κατά τον υπόλοιπο χρόνο νοσηλείας στην ορθοπαιδική κλινική το δοσολογικό σχήμα της αναλγησίας ήταν πετιδίνη $0,5 \text{ mg} \times 4$ (ανά 6ωρο) ενδομυϊκά.

Στον Πιν.3 καταγράφονται αναλυτικά τα βιομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών καθώς επίσης η χρονική διάρκεια εφαρμογής του ισχαιμου επίδεσμου (tourniquet) σε λεπτά (min) και η συνολική ποσότητα αναλγητικού φαρμάκου που χορηγήθηκε (fentanyl σε μικρογραμμάρια).



Πίνακας 4

ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΒΑΡΟΣ (kg)	Χρόνος (min) Tournique	Χορήγηση Fentanyl
ομάδα I (Propofol)	A	69	75	69'	400μg
	A	77	80	90'	400μg
	A	65	70	100'	400μg
	A	70	65	75'	350μg
	A	66	70	80'	350μg
	A	70	77	100'	400μg
	Θ	65	85	64'	350μg
	Θ	75	60	60'	350μg
	Θ	67	77	53'	350μg
	Θ	67	67	90'	400μg
	Θ	70	70	80'	400μg
	Θ	69	65	80'	350μg
	Θ	68	75	100'	350μg
	Θ	66	60	75'	350μg
	Θ	65	75	60'	400μg
	Θ	72	70	75'	400μg
	Θ	72	72	65'	400μg
	Θ	72	68	110'	350μg
	Θ	69	68	85'	350μg
	Θ	69	72	70'	350μg
ομάδα II (Control)	A	71	70	100'	350μg
	A	74	75	55'	350μg
	A	66	90	85'	450μg
	A	65	105	100'	500μg
	A	74	95	100'	450μg
	A	67	90	75'	400μg
	A	68	77	65'	400μg
	A	73	80	75'	400μg
	Θ	67	72	75'	350μg
	Θ	72	72	125'	400μg
	Θ	75	67	80'	350μg
	Θ	74	60	65'	350μg
	Θ	72	70	100'	350μg
	Θ	75	70	90'	350μg
	Θ	69	70	100'	350μg
	Θ	69	80	100'	400μg
	Θ	73	75	90'	350μg
	Θ	71	65	90'	300μg
	Θ	71	69	80'	350μg
	Θ	70	80	85'	350μg



3.4 Διερεύνηση έντασης μετεγχειρητικού πόνου

Η καταγραφή της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου στους ασθενείς και των δύο ομάδων, έγινε με βάση την NOMINAL SCALE, με διαβάθμιση 1-10 (όπου 1=καθόλου πόνος και 10=μέγιστος πόνος).

Η καταγραφή άρχισε αμέσως μετά την αφύπνιση, συνεχιζόταν κατά την παραμονή του ασθενούς στην Ανάνηψη καθώς και κατά την μετεγχειρητική παραμονή του στην Ορθοπαιδική Κλινική.

Τα χρονικά σημεία καταγραφής έντασης μετεγχειρητικού πόνου ήσαν:

-a:	αμέσως	μετά την αφύπνιση	
-b:	30'λεπτά	» » »	
-c:	1 ώρα	» » »	
-d:	12 ώρες	» » »	
-e:	24 ώρες	» » »	

Παρατίθεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, πίνακας με τα αποτελέσματα καταγραφής της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου (Πιν. 7) καθώς και πίνακας σύγκρισης των αποτελεσμάτων καταγραφής έντασης μετεγχειρητικού πόνου στα αντίστοιχα χρονικά σημεία καταγραφής του (Πιν. 9).



4.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Εργαστηριακές μετρήσεις συγκεντρώσεων TBARS

Παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των συγκεντρώσεων των TBARS στον ορό. Τα υπεροξειδία τα οποία σχηματίζονται κατά την λιπιδιακή υπεροξείδωση μετατρέπονται σε αλδεύδες π.χ. μαλονοδιαλδεύδη (MDA) και αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σχηματίζοντας ένα έγχρωμο σύμπλεγμα. Ο βαθμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων προσδιορίζεται σαν αντιδρών υπόστρωμα με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reacting substances, TBARS). Οι συγκεντρώσεις των TBARS στον ορό υπολογίζονται σε μM (Πιν. 5).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA και unpaired t test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν τιμές $P < 0,05$. (Πιν. 6)



Πίνακας 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ (σε μM)

<u>ΟΜΑΔΑ Ι (Προποφύλη)</u>		
Α/Α ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
2	A	x=1,52
	B	x=2,00
	C	x=1,66
4	A	x=2,25
	B	x=2,50
	C	x=2,04
6	A	x=1,95
	B	x=1,90
	C	x=1,03
7	A	x=2,08
	B	x=1,89
	C	x=1,88
9	A	x=1,91
	B	x=2,22
	C	x=1,54
10	A	x=2,28
	B	x=2,29
	C	x=1,34
13	A	x=2,03
	B	x=2,09
	C	x=1,81
16	A	x=2,33
	B	x=2,58
	C	x=2,30
17	A	x=2,22
	B	x=2,22
	C	x=2,30
19	A	x=2,79
	B	x=2,83
	C	x=2,81
23	A	x=0,91
	B	x=0,60
	C	x=2,06
24	A	x=0,53
	B	x=0,08
	C	x=0,14
25	A	x=0,25
	B	x=1,64
	C	x=1,29
27	A	x=1,39
	B	x=2,03
	C	x=0,60
28	A	x=0,14
	B	x=0,60
	C	x=0,50

30	A	x=1,62
	B	x=2,14
	C	x=1,91
33	A	x=1,24
	B	x=0,83
	C	x=1,13
36	A	x=1,83
	B	x=1,92
	C	x=1,22
37	A	x=2,01
	B	x=2,23
	C	x=1,87
38	A	x=2,72
	B	x=2,79
	C	x=2,03

<u>ΟΜΑΔΑ ΙΙ (Ελέγχου)</u>		
Α/Α ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1	A	x=2,01
	B	x=1,83
	C	x=2,05
3	A	x=1,80
	B	x=1,39
	C	x=1,61
5	A	x=1,50
	B	x=1,65
	C	x=1,90
8	A	x=2,12
	B	x=1,93
	C	x=2,50
11	A	x=2,22
	B	x=1,63
	C	x=2,20
12	A	x=2,35
	B	x=2,15
	C	x=1,60
14	A	x=2,38
	B	x=1,74
	C	x=2,35
15	A	x=2,63
	B	x=2,40
	C	x=2,45
18	A	x=2,58
	B	x=3,08
	C	x=2,83
20	A	x=1,84
	B	x=0,75
	C	x=3,08

21	A	x=0,57
	B	x=2,58
	C	x=0,69
22	A	x=2,19
	B	x=0,71
	C	x=0,90
26	A	x=0,05
	B	x=0,80
	C	x=0,74
29	A	x=1,85
	B	x=1,58
	C	x=1,87
31	A	x=2,31
	B	x=2,12
	C	x=2,49
32	A	x=0,92
	B	x=2,70
	C	x=2,06
34	A	x=1,58
	B	x=1,83
	C	x=1,99
35	A	x=2,04
	B	x=1,87
	C	x=2,07
39	A	x=1,29
	B	x=1,23
	C	x=1,51
40	A	x=2,10
	B	x=2,01
	C	x=2,26

Χρονικά σημεία μέτρησης TBARS

A: πριν την άρση του ισχαιμου επίδεσμου

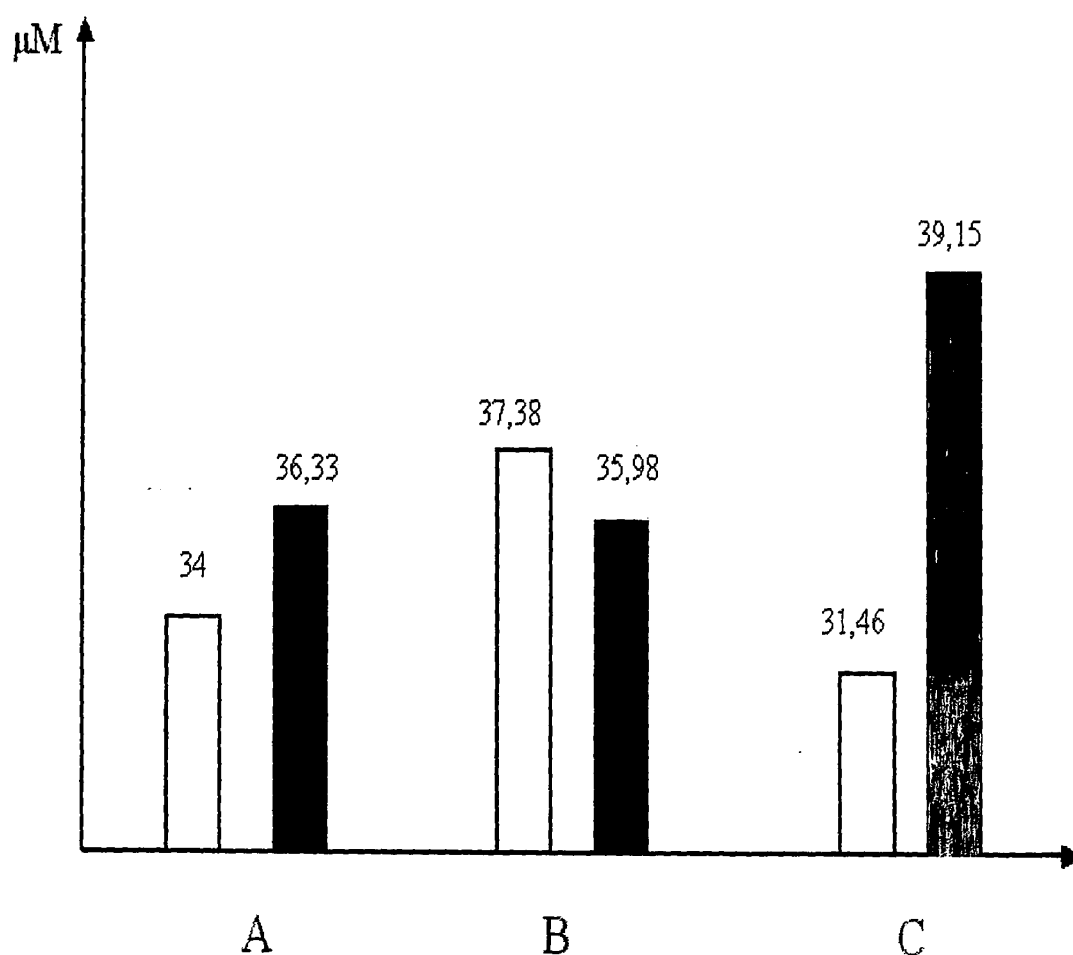
B: 5' min μετά την άρση του ισχαιμου επίδεσμου

C: 30' min μετά άρση του ισχαιμου επίδεσμου



Πίνακας 6

**Πίνακας στατιστικής συγκριτικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων
των μετρήσεων.**



{Λευκές στήλες: ομάδα I

Μαύρες στήλες: ομάδα II

A, B, C: χρονικά σημεία μέτρησης TBARS}



4.2 Αποτελέσματα διερεύνησης έντασης μετεγχειρητικού πόνου

Η καταγραφή της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου στους ασθενείς και των δύο ομάδων, έγινε με βάση την NOMINAL SCALE, με διαβάθμιση 1-10 (όπου 1=καθόλου πόνος και 10=μέγιστος πόνος). (Πιν. 7)

Πίνακας 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΟΥ ΠΟΝΟΥ

ΟΜΑΔΑ Ι (Προποφύλη)		
Α/Α ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ	SCORE
2	a	4
	b	3
	c	4
	d	5
	e	6
4	a	7
	b	6
	c	6
	d	5
	e	6
6	a	5
	b	6
	c	6
	d	7
	e	6
7	a	5
	b	6
	c	6
	d	7
	e	7
9	a	5
	b	5
	c	5
	d	5
	e	5
10	a	3
	b	3
	c	4
	d	4
	e	4
13	a	5
	b	6
	c	7



	d	6
	e	6
16	a	3
	b	3
	c	3
	d	4
	e	4
17	a	3
	b	3
	c	5
	d	4
	e	4
19	a	4
	b	5
	c	5
	d	4
	e	4
23	a	4
	b	5
	c	5
	d	4
	e	4
24	a	5
	b	5
	c	5
	d	6
	e	5
25	a	3
	b	4
	c	5
	d	5
	e	5
27	a	8
	b	7
	c	4
	d	4
	e	4
28	a	4
	b	6
	c	3
	d	4
	e	4
30	a	5
	b	4
	c	4
	d	6
	e	5
	a	6



33	b	5
	c	5
	d	5
	e	6
36	a	7
	b	5
	c	4
	d	6
37	e	6
	a	7
	b	5
	c	4
38	d	6
	e	5
	a	4
	b	3
	c	5
	d	6
	e	6

ΟΜΑΔΑ II (Προποφύλη)		
Α/Α ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ	SCORE
1	a	5
	b	5
	c	4
	d	5
	e	6
3	a	8
	b	6
	c	6
	d	7
	e	6
5	a	7
	b	8
	c	6
	d	5
	e	5
8	a	7
	b	8
	c	8
	d	7
	e	6
11	a	5
	b	6
	c	6



	d	7
	e	6
12	a	6
	b	7
	c	8
	d	8
	e	7
14	a	5
	b	6
	c	7
	d	6
	e	6
15	a	5
	b	6
	c	7
	d	7
	e	7
18	a	3
	b	3
	c	5
	d	4
	e	4
20	a	4
	b	5
	c	6
	d	6
	e	6
21	a	6
	b	6
	c	5
	d	6
	e	6
22	a	5
	b	6
	c	6
	d	6
	e	6
26	a	4
	b	5
	c	6
	d	6
	e	6
29	a	4
	b	5
	c	5
	d	6
	e	7
	a	6



31	b	6
	c	5
	d	5
	e	5
32	a	5
	b	5
	c	4
	d	6
34	e	6
	a	6
	b	5
	c	5
35	d	7
	e	6
	a	4
	b	3
39	c	4
	d	5
	e	6
	a	4
40	b	4
	c	5
	d	4
	e	4

Χρονικά σημεία καταγραφής έντασης μετεγχειρητικού πόνου

-a:	αμέσως	μετά την αφύπνιση
-b:	30'λεπτά	» » »
-c:	1 ώρα	» » »
-d:	12 ώρες	» » »
-e:	24 ώρες	» » »

Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων η οποία έγινε με τη μέθοδο ANOVA και unpaired t test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν τιμές $P < 0,05$. (Πιν. 9)



4.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά την ηλικία (μ.ο. Ομ. I 69,15 – Ομ. II 70,8), το βάρος (μ.ο. Ομ. I 71,05 – Ομ. II 76,6) (Πιν. 3) και τη διάρκεια της εφαρμογής της ισχαιμης περιίδεσης (μ.ο. Ομ. I 79,05' – Ομ. II 86,75') (Πιν. 4). Επίσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά τις τιμές της MDA πριν την άρση της εφαρμογής της ισχαιμης περιίδεσης (1,7 $\mu\text{mol/l}$ στην ομάδα I της προποφόλης και 1,82 $\mu\text{mol/l}$ στην ομάδα II Control). (Πιν.8)

Πέντε λεπτά μετά την άρση της ισχαιμης περιίδεσης στην ομάδα της προποφόλης η συγκέντρωση της MDA στο πλάσμα παρουσίασε μία μικρή αύξηση σε σχέση με τις τιμές πριν την εφαρμογή της ισχαιμης περιίδεσης (1,87 $\mu\text{mol/l}$ και 1,7 $\mu\text{mol/l}$ αντίστοιχα, $P > 0,05$), ενώ στην ομάδα Control δεν παρουσιάστηκε καμία μεταβολή (1,8 $\mu\text{mol/l}$ και 1,82 $\mu\text{mol/l}$ αντίστοιχα).

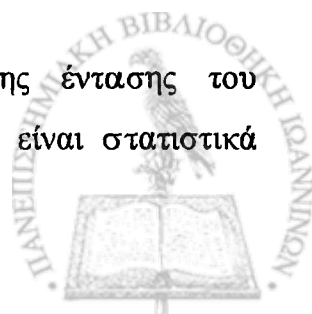
Τριάντα λεπτά μετά την άρση της ισχαιμης περιίδεσης η συγκέντρωση της MDA στο πλάσμα μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα της προποφόλης σε σχέση με τη συγκέντρωση 5 λεπτά μετά την άρση (1,57 $\mu\text{mol/l}$ και 1,87 $\mu\text{mol/l}$ αντίστοιχα, $P = 0,036$). Αντίθετα στην ομάδα Control παρατηρήθηκε μία μικρή μη σημαντική αύξηση ($P > 0,05$) σε σχέση με τις τιμές πριν την εφαρμογή της ισχαιμης περιίδεσης και 5 λεπτά μετά την άρση. (Πίνακας 1).

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων φαίνεται ότι τα επίπεδα των τιμών της MDA 30 λεπτά μετά την άρση της ισχαιμης περιίδεσης μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα της προποφόλης σε σχέση με την ομάδα Control (1,57 $\mu\text{mol/l}$ και 1,96 $\mu\text{mol/l}$ αντίστοιχα, $P=0,026$).

Από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων καταγραφής του μετεγχειρητικού πόνου, παρατηρείται σαφώς μικρότερη ένταση αυτού στους ασθενείς της ομάδας I (Propofol) στα αντίστοιχα χρονικά σημεία καταγραφής, με τη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να καταγράφεται στο χρονικό σημείο c (1 ώρα μετά την αφύπνιση). (Πιν. 9)

Και στις δύο ομάδες παρατηρείται μία ελαφρά προοδευτική αύξηση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου, προϊόντος του χρόνου (χρονικά σημεία a, b, c, d), ενώ η ένταση αρχίζει να μειώνεται στο χρονικό σημείο e (24 ώρες).

Διαφαίνεται θετική επίδραση της προποφόλης, δηλαδή μείωση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου, όμως η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Πίνακας 8

**Τιμές MDA ($\mu\text{mol/l}$) πριν την άρση της εφαρμογής της ισχαιμης περιόδου
καθώς 5 και 30 λεπτά μετά**

Τιμές MDA ($\mu\text{mol/l}$) στις δύο ομάδες ασθενών [mean(SD)]		
	Ομάδα I Propofol	Ομάδα II Control
Πριν την εφαρμογή	1,7 (0,76)	1,82 (0,67)
5 λεπτά μετά την άρση	1,87 (0,76)	1,8 (0,63)
30 λεπτά μετά την άρση	1,57 (0,67)*, #	1,96 (0,64)

*= $p < 0,05$, σύγκριση με την προηγούμενη τιμή (κάθετη σύγκριση)

#= $p < 0,05$ οριζόντια σύγκριση

Πίνακας 9

Σύγκριση αποτελεσμάτων καταγραφής έντασης μετεγχειρητικού πόνου

Χρονικό σημείο	Ομάδα I	Ομάδα II
a	M.O.= 4.85	M.O.=4.60
b	M.O.=4.75	M.O.=5.0
c	M.O.=4.75	M.O.=5.15
d	M.O.=5.15	M.O.=5.30
e	M.O.=5.10	M.O.=5.25



5.0 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μολονότι οι σκελετικοί μύες είναι γενικά ανθεκτικοί στην ισχαιμία (σε σχέση με άλλα όργανα), το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης έχει τεκμηριωθεί σε προηγούμενες μελέτες. Οι Concannon και συνεργάτες⁷² απέδειξαν μια σημαντική αύξηση σε προϊόντα MDA εντός 2 ωρών, προκαλώντας σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης με χρήση ισχαιμου επίδεσμου, σε σκελετικούς μύες κουνελιών. Το ίδιο επιβεβαιώνει και η μελέτη των S. Kahraman και συνεργατών.⁷³

Επίσης πολλές μελέτες στο παρελθόν έχουν αναδείξει τη βλάβη η οποία προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μετά την επαναιμάτωση στους σκελετικούς μύς.^{72, 100, 101}

Θεωρήσαμε σκόπιμο να εξετάσουμε την επίδραση της προποφόλης επί της υπεροξειδωσής λιπιδίων, σε σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σκελετικών μυών, η οποία δεν είχε ερευνηθεί. Επιλέχθηκαν σαν τυπικά αντιπροσωπευτικές οι επεμβάσεις ολικής αρθροπλαστικής γόνατος με χρήση ισχαιμου επίδεσμου. Οι ορθοπαιδικές επεμβάσεις, οι οποίες γίνονται με την εφαρμογή ισχαιμης περιδέσης, αποτελούν ένα ανθρώπινο μοντέλο για την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και μερικά αναισθητικά φάρμακα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες θα μπορούσαν να προσφέρουν σημαντικά οφέλη.

Είναι γνωστό ότι η προποφόλη έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro*.^{102, 103} Άλλες μελέτες σε απομονωμένα οργανίδια, που έγιναν προκαλώντας οξειδωτικό stress σε μιτοχόνδρια ήπατος, μικροσωμάτια και συναπτοσώματα εγκεφάλου επίμυος, έδειξαν ότι η προποφόλη εμποδίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Οι Green και συν.⁹⁰ και οι Ebel και συν.¹⁰⁴ έδειξαν ότι η προποφόλη σε κλινικές συγκεντρώσεις δεν παρέχει προστασία στο οξειδωτικό stress. Αντίθετα ο Murphy και οι συν.⁸⁹ έδειξαν ότι σε αναισθητικές συγκεντρώσεις η προποφόλη προσφέρει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη μας έδειξαν ότι η προποφόλη (Ομάδα Ι) προκάλεσε σημαντική μείωση των ποσοτήτων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα 30 λεπτά μετά την άρση του αποκλεισμού ($P < 0,05$). Φαίνεται έτσι να αποτελεί ένα καλό αναισθητικό παράγοντα επιλογής για ορθοπαιδικές επεμβάσεις που απαιτούν τη χρήση της ισχαιμης περιδέσης. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν από δύο άλλες πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική γόνατος με ισχαιμη περιδέση. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Kahraman και συν.⁸⁸ η μία ομάδα ελάμβανε προποφόλη για αναισθησία και η δεύτερη ισοφλουράνιο. Οι συγγραφείς από τη μέτρηση της MDA τόσο στο πλάσμα όσο και

στους ιστούς συμπεραίνουν ότι η προποφόλη εμποδίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων που προέρχεται από το σύνδρομο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης και ότι φαίνεται να έχει σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα κατά τη διάρκεια της αναισθησίας. Στους ασθενείς που έλαβαν αναισθησία με προποφόλη οι συγγραφείς παρατήρησαν στο πλάσμα μία μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων της MDA 15, 30 και 45 λεπτά μετά τη λύση της ισχαιμης περιόδου σε σχέση με τις τιμές πριν την επαναιμάτωση. Αντίθετα στην ομάδα του ισοφλουρανίου παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση στη συκέντρωση της MDA στα 5, 15, 30 και 45 λεπτά μετά τη λύση της ισχαιμης σε σχέση με τις τιμές πριν την επαναιμάτωση.

Στη μελέτη των Aldemir και συν.⁹³ παρατηρήθηκε μία μείωση των επιπέδων της MDA στα 1 και 5 λεπτά μετά τη λύση της ισχαιμης περιόδου και στις δύο ομάδες (ομάδα προποφόλης και ομάδα αλοθανίου), με στατιστικά σημαντική τη μείωση μόνο στην ομάδα της προποφόλης. Στη μελέτη αυτή η σύγκριση των επιπέδων της MDA γινόταν σε σχέση με τιμές πριν την εισαγωγή στην αναισθησία. Στη δική μας μελέτη στην ομάδα του σεβοφλουρανίου παρατηρήθηκε μία μικρή, μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της MDA 30 λεπτά μετά τη λύση της ισχαιμης περιόδου σε σχέση με τις τιμές πριν από την άρση της ισχαιμης περιόδου. Πολλές μελέτες αναδεικνύουν την προστατευτική δράση του σεβοφλουρανίου, όπως και των άλλων αλογονωμένων αναισθητικών στο μυοκάρδιο μετά από ισχαιμία, συγκεκριμένα περιορισμός της δυσλειτουργίας και της νέκρωσης του μυοκαρδίου, η οποία συμβαίνει στη φάση της επαναιμάτωσης.^{94,95,96,97,98,99} Πιθανόν η προστασία στα κύτταρα του μυοκαρδίου με τα αλογονωμένα εισπνεόμενα αναισθητικά επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των K_{ATP} καναλιών στα μιτοχόνδρια και λόγω της μειωμένης τάσης για προσκόλληση των πολυμορφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο των αγγείων.^{105,106} Η προποφόλη δεν φαίνεται να έχει το ίδιο σημαντική προστατευτική δράση στο μυοκάρδιο.^{94,95,96} Στη μελέτη μας, φαίνεται η προποφόλη να ελαττώνει περισσότερο το οξειδωτικό stress σε σχέση με το σεβοφλουράνιο. Όμως μεθοδολογικά υπήρξαν δύο περιορισμοί: Η εισαγωγή στην αναισθησία στην ομάδα του σεβοφλουρανίου έγινε με θειοπεντάλη και όχι με σεβοφλουράνιο. Το δεύτερο μεθοδολογικό πρόβλημα στη μελέτη μας είναι ότι δεν υπήρξαν φλεβικά δείγματα για MDA πριν από την εισαγωγή στην αναισθησία, έτσι ώστε να οδηγηθούμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα. Είναι βέβαιο ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να διερευνηθεί η δράση του σεβοφλουρανίου στους περιφερικούς ιστούς οι οποίοι υποβάλλονται σε ισχαιμία και επαναιμάτωση.



Συμπερασματικά, η προποφόλη ελαττώνει το οξειδωτικό stress σε ορθοπαιδικές επεμβάσεις, οι οποίες γίνονται με την εφαρμογή της ισχαιμης περιόδου, ενώ για το σεβοφλουράνιο είναι αναγκαίο να γίνουν επιπλέον μελέτες.

Ελήφθησαν κατόπιν υπ' όψιν μελέτες οι οποίες αναφέρθηκαν, σύμφωνα με τις οποίες οι ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας ιστική βλάβη, είναι άμεσα υπεύθυνες για πρόκληση επώδυνων ερεθισμάτων, τα οποία εκδηλώνονται κατά το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης και προφανώς επιβαρύνουν το επώδυνο της χειρουργικής επέμβασης. Οδηγηθήκαμε στο να πραγματοποιήσουμε το κλινικό μέρος της μελέτης, όπου έγινε καταγραφή της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου και κατόπιν σύγκρισή του, μεταξύ των ασθενών στους οποίους είχε χορηγηθεί προποφόλη και διαπιστώθηκε ότι είχαν μειωμένη παρουσία ελευθέρων ριζών και των άλλων στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί αντιοξειδωτικός παράγοντας.

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι η επίδραση της προληπτικής αντιμετώπισης - με διεγχειρητική χορήγηση αναισθησιολογικών φαρμάκων με αντιοξειδωτική δράση - της έκλυσης ελευθέρων ριζών, για την αντιμετώπιση της έντασης του μετεγχειρητικού πόνου, βάσει των αποτελεσμάτων διαφαίνεται θετική, έστω και αν δεν καταγράφεται ως στατιστικά σημαντική. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες ίσως με μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών, για να τεκμηριωθεί.



6.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: μετά την άρση της ισχαιμης περιίδεσης σε ορθοπαιδικές επεμβάσεις, παρατηρείται αυξημένη έκλυση ελευθέρων ριζών. Είναι αποδεδειγμένο ότι οι ελευθέρων ριζών είναι εμπλελεγμένες στους μηχανισμούς του πόνου. Διερευνήσαμε την επίδραση χορήγησης προποφόλης στην έκλυση ελευθέρων ριζών, σε επεμβάσεις Ολικής Αρθροπλαστικής γόνατος με χρήση ισχαιμης περιίδεσης, σε σχέση με τον μετεγχειρητικό πόνο.

Υλικό και μέθοδος: μελετήθηκαν τα δεδομένα από 40 ασθενείς, ASA I-II, 60 έως 70 ετών, 14 άνδρες και 26 γυναίκες, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε επέμβαση Ολικής Αρθροπλαστικής γόνατος. Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε προποφόλη και φεντανύλη για την εισαγωγή στην αναισθησία και συνεχής έγχυση προποφόλης για την διατήρηση. Στην δεύτερη ομάδα χορηγήθηκε θειοπεντάλη και φεντανύλη για την εισαγωγή και σεβοφλουράνιο για την διατήρηση. Κατά την διάρκεια της επέμβασης χρησιμοποιήθηκε και στις δύο ομάδες φεντανύλη για την διεγχειρητική αναλγησία. Έγιναν τρεις αιμοληψίες από κάθε ασθενή και των δύο ομάδων: την πρώτη πριν την άρση και την δεύτερη και την τρίτη 5' και 30' min μετά την άρση του ισχαιμου επίδεσμου. Η επεξεργασία του υπερκείμενου πλάσματος των δειγμάτων για την μέτρηση της έκλυσης των ελευθέρων ριζών, έγινε με την μέθοδο προσδιορισμού των TBARS. Επίσης καταγράφηκε η ένταση του μετεγχειρητικού πόνου με την μέθοδο της αναλογικής κλίμακας πόνου (VAS of pain, 1-10), αμέσως μετά την αφύπνιση, μετά 30' και μετά 1, 12, 24 ώρες.

Αποτελέσματα και συζήτηση: διαπιστώθηκε ότι η προποφόλη (ομάδα I) ελαττώνει σημαντικά τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών ($p < 0,05$) συγκριτικά με την ομάδα II. Διαπιστώσαμε επίσης ότι στους ασθενείς της ομάδας I (προποφόλη) κατεγράφη ηπιότερη ένταση μετεγχειρητικού πόνου από τους ασθενείς της ομάδας II, όμως η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Συμπεράσματα: η προποφόλη είναι ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας ο οποίος μειώνει σημαντικά την έκλυση των ελευθέρων ριζών σε επεμβάσεις με σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά άλλων μελετητών. Όσον αφορά την επίδραση της προποφόλης στην ένταση του μετεγχειρητικού πόνου, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.



7.0 SUMMARY

INFLUENCE OF PROPOFOL ON THE FORMATION OF FREE RADICALS OF OXYGEN AND ON THE POSTOPERATIVE PAIN IN OPERATIONS WITH ISCHAEMIA-REPERFUSION SYNDROM.

SOULIOTIS DIMITRIOS

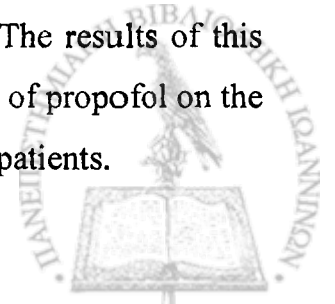
Anaesthesiologist, General Hospital of Ioannina "G. Hatzicosta"

Background of study: After release of tourniquet in orthopaedic operations has been observed an increase of formation of reactive oxygen species. It is known that these are implicated in the mechanism of pain. The influence of administration of propofol in the formation of reactive oxygen species in total knee replacement, in relation to post-operative pain was investigated.

Materials and methods: After obtaining ethics committee approval and informed patients consent we studied 40 patients ASA I – II, 60-70 years old, 14 men and 26 women who underwent an operation of total knee replacement. Patients were randomly allocated in two groups. In group I we administered propofol and fentanyl for induction and continuous propofol for maintaining of anaesthesia. In group II we administered thiopental and fentanyl for induction and sevoflurane for maintaining of anaesthesia. During the operation were given in both groups fentanyl. We took three blood samples from each patient of both groups; one before release and the second and third 5 and 30 minutes after release of tourniquet, respectively. Blood samples elaboration for the measurement of released free oxygen radicals was done by measuring (TBARS). We also measured the intensity of post-operative pain by using the V.A.S of pain 1-10, first at the end of anaesthesia, then after 30 min, 1, 12, and 24h.

Results and Discussion: We found that propofol (group I) attenuates significantly the formation of free oxygen radicals ($p < 0.05$) compared with group II. We also noticed that in the group of propofol was measured lower intensity of postoperative pain than in group II. However these differences are not statistically significant.

Conclusions: Propofol is an antioxidant agent that attenuates significantly the formation of free oxygen radicals in operations with ischaemia-reperfusion syndrome. The results of this study are in accordance with those of other authors. As regard the influence of propofol on the post-operative analgesia are required further studies with higher number of patients.



8.0 ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου απευθύνω στον καθηγητή μου, διευθυντή της Κλινικής Αναισθησιολογίας και Μετεγχειρητικής Εντατικής Θεραπείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθηγητή Dr med habil κ. Γεώργιο Στ. Παπαδόπουλο. Τον ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος αυτής της διατριβής καθώς και για την καθοδήγηση, την βοήθεια και την συμπαράστασή του στην εκπόνησή της. Του οφείλω επίσης τις ευχαριστίες μου για την μετεκπαίδευση μου στα ειδικά αντικείμενα της Αναισθησίας στην Καρδιοχειρουργική και της Αναισθησίας στην Νευροχειρουργική. Η συμβολή του στην πορεία μου σαν αναισθησιολόγου καθώς και στην επιστημονική μου εξέλιξη είναι καταλυτική.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω επίσης στον Αναπληρωτή καθηγητή της Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δημήτριο Γάλαρη, ο οποίος σαν μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, με καθοδήγησε και με βοήθησε να διεκπεραιώσω το εργαστηριακό μέρος αυτής της μελέτης, παρέχοντάς μου τόσο τη χρήση του εργαστηρίου του, όσο και τις γνώσεις και την εμπειρία του, επί του θέματος της μελέτης των ελευθέρων ριζών Οξυγόνου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Επίκουρο Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας κ. Μαρία Καμπίλη, για την βοήθειά της, σαν μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, στην εκπόνηση αυτής της διατριβής, αλλά και για την εκπαίδευσή μου καθώς και για τον τίτλο της ειδικότητας της Αναισθησιολογίας που έλαβα από αυτήν.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Θεόδωρο Ξενάκη, τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Αλέξανδρο Μπερή, τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Αναστάσιο Γεωργούλη, για την συνεργασία τους κατά την διεκπεραίωση των χειρουργικών επεμβάσεων καθώς επίσης για την βοήθεια και την καθοδήγησή τους όσον αφορά το κλινικό μέρος της μελέτης σε σχέση με τον μετεγχειρητικό πόνο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την συνάδελφο Λέκτορα κ. Έλενα Αρναούτογλου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την συγκέντρωση του υλικού της μελέτης και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, για την συνεργασία της στην προώθηση της δουλειάς αυτής και για την συμπαράστασή της κατά την εκπόνηση.

Επίσης ευχαριστώ την συνάδελφο Λουίζα Τέφα για την βοήθειά της κατά την συγκέντρωση και επεξεργασία του υλικού της μελέτης αυτής.



Ευχαριστίες απευθύνω επίσης στη διευθύντριά μου, του Αναισθησιολογικού τμήματος του ΠΓΝΙ «Γ. Χατζηκώστα» κ. Αδαμαντία Μανανάκη, για την υποστήριξη και την βοήθειά της για την εξεύρεση του απαιτούμενου χρόνου που χρειάστηκα για την μελέτη αυτή.



9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

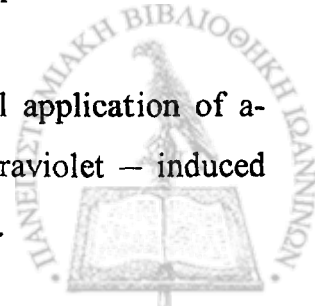
- 1 Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- 2 Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? THE LANCET 1994; 344: 721-724.
- 3 Liochev SI, Fridovich I. The role of $O_2^{\bullet-}$ in the production of $HO^{\bullet}$ in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med 1994; 16: 29-33.
- 4 Camma R. Eletron spin resonance. In: The biochemistry of plants. Academic Press, New York 1987:229-257.
- 5 Κουίδου Σ., Παπαγεωργίου Γ., Τριάντος Α., Καβουκόπουλος Ε., Σημειώσεις Οργανικής Χημείας. Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη: Υπηρεσία δημοσιευμάτων; 1993.
- 6 Τρακατέλλης Α. Βιοχημεία.. Τόμος Α, εκδόσεις Αφων Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1997.
- 7 Andalibi A, Hama S, Imees S, Gates R, Navab M, Fogelman AE. An in vivo approach to study of inflammatory reactions in atherosclerosis. In: Free radikals: From basic Science to Medicine. Poli G, Albano E, Dianzani MU eds, Birkhauser Verlag Berlin, 1993: 349-363.
- 8 Sussman MS, Bulkley GB. Oxygen- derived free radicals in reperfusion injury. Methods Enzymol 190; 186:711-723.
- 9 Kusuoka H, Mardan E. Cellular mechanisms of myocardial stunning. Annu Rev Physiol 1992; 54:243-256.
- 10 Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 1996;313:17-29.
- 11 Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, Visioli O. The occurrence of oxidative stress during reperfusion in experimental animals and men. Cardiovasc Drugs Ther 1991;5:277-288.
- 12 Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radic Biol Med 1995;18:125-126
- 13 Davies KJA. Intracellular antioxidant defense mechanisms, Vol II. CRC Press, Boca Raton 1988;25-27.



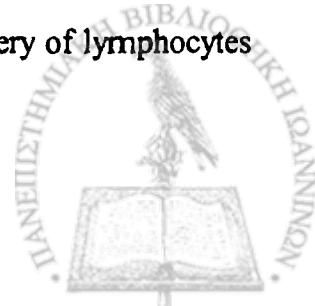
- 14 Etsuo Niki. Antioxidant defenses in eukariotic cells: An overview. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Poli G, Albano E, Dianzani MU eds, Birkhauser Verlag, Basel/ Switzerland 1993;65-79.
- 15 Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun 1990; 9:1-32.
- 16 Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995, 41:1819-1828.
- 17 Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are now? J Lab Clin Med 1992; 119: 598-620.
- 18 Cheesman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. In: Free Radicals in medicine. Cheesman KH, Slater TF eds. British Medical Bulletin, Vol 49, Longman Singapore Publishers, 1993; 481-493.
- 19 Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr Rev 1997; 55: 44-52.
- 20 Bolann BJ, Ulvik RJ. How do antioxidants work? Tidsskr Nor Laegeforen 1997; 117: 1928-32.
- 21 Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. Hum Reprod 1998; 13:1422-24.
- 22 Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide Dismutases. Ann Rev Biochem 1995; 64: 97-112.
- 23 Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn- superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7872-75.
- 24 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). Free Rad Biol Med, 1988; 5: 363-69.
- 25 Ντιούδης Χ. Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην ισχαιμική οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Λιπιδική υπεροξειδωση, ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα, επίδραση της τριμεταζιδίνης.. (Πειραματική μελέτη σε επίμυες). Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη 1998.
- 26 Barra D, Schinina ME, Simmaco M et al. The primary structure of human liver manganese Superoxide dismutase. J Biol Chem 1984; 259:12595-12601.
- 27 Παπαγεωργίου Γ. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα. Θεσσαλονίκη 2000.



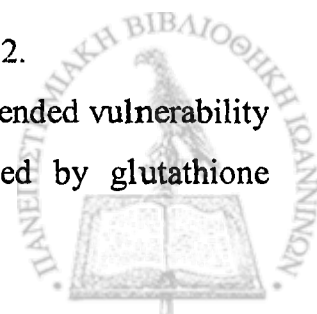
- 28 Fridovich I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutase, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272:18515-18517.
- 29 Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280:1-8.
- 30 Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1620-1624.
- 31 Marklund SL, Westman NG, Landgen E, Roos G. Copper – and zinc – containing superoxide dismutase, manganese – containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982; 42:1955-1961.
- 32 Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. In: *Free Radical Damage and its Control*. Rice-Evans CA, Burdon RH eds, Elsevier Science B.V., London 1994; 113-130.
- 33 Mannervik B., Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1985; 113:490-504.
- 34 Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 1998; 128:1070-1076.
- 35 Grossmann A, Wendel A. Non- reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidised phospholipids. *Eur J Biochem* 1983; 135:549-552.
- 36 Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1985; 839:62-70.
- 37 Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 1988; 23:283-337.
- 38 Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione -S- transferase supergene family: regulation of GST and contribution of the isoenzymes to conserve chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445-600.
- 39 Horbach ME, Sies H, Akerboom TR. Purification of rat liver plasma membrane glutathione transferase. *Eur J Biochem* 1994; 222:91-96.
- 40 Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L. Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet – induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol* 1998; 138:207-215.



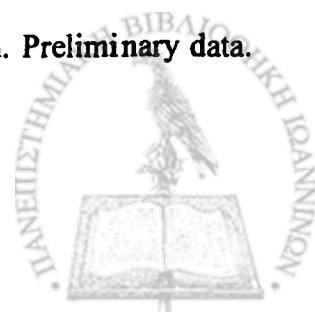
- 41 Murray CA, Lynch MA. Dietary supplementation with vitamin E reverses the age-related deficit in long term potentiation in dentate gyrus. *J Biol Chem* 1998; 273:12161-12168.
- 42 Rego AC, Santos MS, Proenca MT, Oliveira CR. Influence of vitamin E succinate on retinal cell survival. *Toxicology* 1998; 128:113-124.
- 43 Vatassery GT. Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics (Suppl 1)* 1993; 53:S25-27.
- 44 Παπαγεωργίου ΓΕ, Ηλιάδης ΣΝ, Βλάστης Γ, Γούλας Α, Δημητριάδου Α. Απομόνωση και οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών μετά από εμπλουτισμό με α-τοκοφερόλη. *Ελλ Ιατρ.* 1998; 64:387-393.
- 45 Kaiser S, Di Maschio P, Murphy ME, Sies H. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocoferol. *Arch Biochem Biophys* 1990; 227:101-109.
- 46 Ansari KN. The free radicals – the hidden culprits – an update. *Indian J Med Sci* 1997; 51:319-336.
- 47 Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:789-797.
- 48 Alessio HM, Goldfarb AH, Cao G. Exercise – induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 1997; 7:1-9.
- 49 Weters H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 1988; 174:194-224
- 50 Rehman A, Collis CS, Yang M. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:293-298.
- 51 Waters RE, White LL, May JM. Liposomes containing alpha-tocopherol and ascorbate are protected from an external oxidant stress. *Free Radic Res* 1997; 26:373-379.
- 52 Pushpendran CK, Subramanian M, Devasagayam TP, Singh BB. Study on lipid peroxidation potential in different tissues induced by ascorbate – Fe^{2+} : possible factors involved in their differential susceptibility. *Mol Cell Biochem* 1998; 178:187-202.
- 53 Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, Gatta V, Perticone P, De Salvia R. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis* 1997; 18:223-228.
- 54 Fillion L, Collins A, Southon S. Beta-carotene enhances the recovery of lymphocytes from oxidative DNA damage. *Acta Biochim Pol* 1998; 45:183-190.



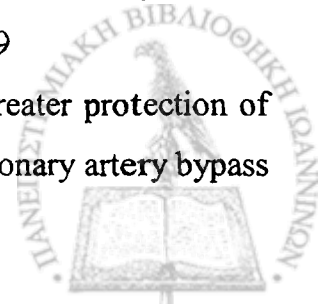
- 55 Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad Biol Med* 1989; 7:617-622.
- 56 Kardinal AF, Aro A, Kark JD et al. Association between betacarotene and acute myocardial infarction depends on polyunsaturated fatty acids status. The EURAMIC study. European study on antioxidants, myocardial infarction, and cancer of the breast. *Arterioscler Thomb Vasc Biol* 1995; 15:726-732.
- 57 Γιαμαρέλλος – Μπουρμπούλης EI, Διονυσίου – Αστερίου Α. Η βιολογική σημασία της υπεροξειδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. *Ιατρ.* 1999; 76:248-255.
- 58 Arduini A, Eddy L, Hochstein P. Detection of ferrylmyoglobin in the isolated rat heart. *Free Radical Biol Med* 1990; 9:511-513.
- 59 Kelman DJ, Grey JA, Mason R. Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *J Biol Chem* 1994; 268:7458-7463.
- 60 Gutteridge JMC, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 1988; 256:861-866.
- 61 Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edition Oxford, Oxford University Press, 1999.
- 62 Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82:291-295.
- 63 Kim IG, Park SY, Kim KC, Yum JJ: Thiol-linked peroxidase activity of human ceruloplasmin. *FEBS Lett* 1998; 431:473-475.
- 64 Daily E, Urien S, Barre J, Reinert P, Tillement JP. Role of bilirubin in the regulation of the total peroxy radical trapping antioxidant activity of plasma in sickle cell disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:303-306.
- 65 Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant – and radical- caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78:6858-6867.
- 66 Deneke SM, Fandurg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, 1989; 163-173.
- 67 Lapenna D, de Giola S, Ciofani G et al. Glutathione – related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97:1930-1934.
- 68 Τρακατέλλης Α. Βιοχημεία. Τόμος Β', Μέρος 1^ο. Θεσσαλονίκη 1992.
- 69 Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation – dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress – induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998; 18:6241-6253.



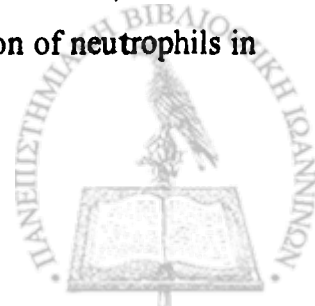
- 70 Cardoso SM, Pereira C, Oliveira CR. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:703-10.
- 71 Martensson J, Meister A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats; ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:4656-60.
- 72 Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL. Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1992; 89: 846-52.
- 73 Kahraman S, Kilinc K, Dal D, Erdem K. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia- reperfusion injury. *Brit J of Anaesthesia* 1997; 78: 279-81
- 74 Cross E.C., Halliwell B, Borish T.E., Pryor A.W., Ames N.B., Saul L.R, McCord M.J., Harman D. Davis Conference: Oxygen Radicals and Human Disease, *Annals of Internal Medicine*. 1987; 107: 526-45.
- 75 McCord J.M., Epstein H.F. Oxygen – derived free radicals in postschermic tissue injury. *New Engl J Med*. 1985; 312:159-63.
- 76 Tsimoyiannis E.C., Lekkas E.T. The role of oxygen – derived free radicals in tissue ischemia/reperfusion injury. *Iatriki* 1991; 59: 267-74.
- 77 Pang Y.Cho. Ischemia – induced reperfusion injury in muscle flaps: pathogenesis and major source of free radicals. *Journal Reconstructive Microsurgery*. 1990; 6: 77-83.
- 78 Concannon J.M., Kester G., Weils F.C., Puckett L.C. Patterns of gree-radical production after Tourniquet Ischemia: Implications for the Hand Surgeon. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1992; 89: 846-52.
- 79 Mathru M, Dries J.D., Barnes L., Tonino P, Sukhani R. Tourniquet – induced Exsanguination in Patients Requiring Lower Limb Surgery. *Anesthesiology, American Society of Anesthesiology*, 1996; 84:14-22.
- 80 Dormandy T.L.. Free-radical oxidation and antioxidants. *The Lancet*, 1978; 647-50.
- 81 Salim AS. Scavengers of oxygen-derived free radicals. A new approach to the problem of pancreatitis-induced abdominal pain. *HPB Surg* 1991; 4: 331-33.
- 82 Pascu O., Dejica D. Oxygen free radicals and duodenal ulcer pain. Preliminary data. *Med Int* 1987; 25: 81-84.



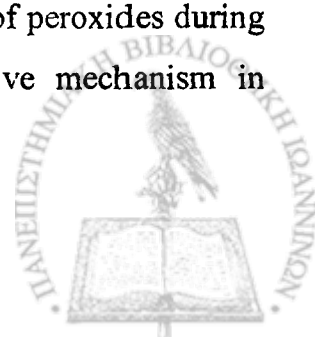
- 83 Haque M.F., Aghabeighi B., Wasil M., Hodges S., Harris M. Oxygen free radicals in idiopathic facial pain. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1994; 20:104-116.
- 84 Aghabeighi B, Haque M, Wasil M, Hodges S.J, Henderson B, Harris M. The role of oxygen free radicals in idiopathic facial pain. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997; 35:161-165.
- 85 Omeroglu H., Gunel U., Bicimoblu A., Tabak AY., Ucaner A., Guney O. The relationship between the use of tourniquet and the intensity of postoperative pain in surgically treated malleolar fractures. *Foot Ankle Int.* 1997; 18:798-802.
- 86 Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-75.
- 87 Halliwell B. Current status review: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70: 737-57.
- 88 Kahraman S, Kininc K, Dal D, Erdem K. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 1997; 78: 279-81.
- 89 Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6 diisopropylphenol). *Br J Anaesth* 1992;68: 613-8.
- 90 Green TR, Bennet SR, Nelson VM. Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;129: 163-9.
- 91 Ko SH, Yu CW, Lee SK, Choe H, Chung MJ et al. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth analg* 1997;85:719-24.
- 92 Kahraman S, Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg* 1997;84:1127-9.
- 93 Aldemir O, Celebi H, Cevik C, Duzgun E. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45:1221-5.
- 94 De Hert SG, Ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 2002; 97: 42-9
- 95 Conzen PF, Fischer S, Detter C, Klaus P. Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2003; 99:826-33.



- 96 Kato R, Foex Pierre. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anesth* 2002; 49: 779-91.
- 97 Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth* 1998; 81: 905-12.
- 98 Preckel B, Thamer V, Schlack W. Beneficial effects of sevoflurane and desflurane against myocardial reperfusion injury after cardioplegic arrest. *Can J Anesth* 1999; 46: 1076-1081.
- 99 Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999; 91:1437-46.
- 100 Friedl HP, Smith DJ, Tiil GO, Thomson PD, Louis DS, Ward PA. Ischaemia-reperfusion in humans, appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 1990; 136:491-495.
- 101 Chopineau J, Sommier MF, Sautou V. Evaluation of free radical production in an ischaemia-reperfusion model in the rabbit using a tourniquet. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 519-20.
- 102 Aarts L, Van Der Hee R, Dekker I, Langemeijer H, Bast A. The widely used anesthetic agent propofol can replace alphotocopherol as an antioxidant. *FEBS Letters* 1995; 357: 83-5.
- 103 Musacchio E, Rizzoli V, Bianchi M, Bindoli A, Galzigna L. Antioxidant action of propofol on liver microsomes, mitochondria and brain synaptosomes in the rat. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69:75-7.
- 104 Ebel D, Schlack W, Comfere T, Preckel B, Thamer V. Laboratory investigation. Effect of propofol on reperfusion injury after regional ischaemia in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1999; 903-8.
- 105 Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial KATP channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002; 97:4-14
- 106 Kowalski C, Zahler S, Becker BF, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, Peter K. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology* 1997; 86: 188-95.



- 107 Eum HA, Lee SH, Lee SM. Trolox C ameliorates hepatic drug metabolizing dysfunction after ischemia / reperfusion. *Arch Pharm Res* 2002; 25:940-5.
- 108 Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharmaceut Des* 2006;12:000-000.
- 109 Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D, Siamopoulos K. Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis. *Am J Kidn Dis* 2004 ; 44: 286-92.
- 110 Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosin nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 776-83.
- 111 Doulias P-T, Barbouti A, Galaris D, Ischiropoulos H. SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 679-85.
- 112 Das DK, Engelman RM, Clement R, Otani H, Prasad MR, Rao PS. Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxipurinol in myocardial salvage. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 314-9.
- 113 Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxipurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987; 213: 23-8.
- 114 Harada H, Hines IN, Flores S, Gao B, McCord J, Scheerens H. Role of NADPH oxidase- derived superoxide in reduced size liver ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 103-8.
- 115 Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-6.
- 116 Galaris D, Mira D, Sevanian A, Cadenas E, Hochstein P. Co-oxidation of salicylate and cholesterol during the oxidation of metmyoglobin by H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 1988; 262: 221-31.
- 117 Galaris D, Korantzopoulos P. On the molecular mechanism of metmyoglobin-catalysed reduction of hydrogen peroxide by ascorbate. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 657-67.
- 118 Galaris D, Cadenas E, Hochstein P. Glutathion-depended reduction of peroxides during ferryl- and met-myoglobin interconversion: a potential protective mechanism in muscle. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 473-8.



- 119 Galaris D, Cadenas E, Hochstein P. Redox cycling of myoglobin and ascorbate: a potential protective mechanism against oxidative reperfusion injury in muscle. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273: 497-504.
- 120 Galaris D, Eddy L, Arduini A, Cadenas E, Hochstein P. Mechanisms of reoxygenation injury in myocardial infarction: implications of a myoglobin redox cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 1162-8.
- 121 Galaris D, Sevanian A, Cadenas E, Hochstein P. Ferrylmyoglobin-catalysed linoleic acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1990; 281: 163-9.
- 122 Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003; 125: 1480-91.
- 123 Biasi F, Poli G, Salizzoni M, Cerutti E, Battista S, Mengozzi G. Effect of perioperative infusion of antioxidants on neutrophil activation during liver transplantation in humans. *Transplant Proc* 2002; 34: 755-8.
- 124 Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW. Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterology* 2004; 10:864-70.
- 125 Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Michailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2004; 91; 1330-9.
- 126 von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 806-13.
- 127 Doulias PT, Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 719-28.
- 128 Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A, Brunk U, Galaris D. The role of compartmentalised redox-active iron on hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 2005; 386: 1-8.
- 129 Nakae Y, Fujita S, Namiki A. Propofol inhibits Ca²⁺ transients but not contraction in intact beating guinea pig hearts. *Anesth Analg* 2000; 90: 1286-92.



- 130 Buljubasic N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Differential effects of etomidate, propofol and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. *Anesthesiology* 1996; 85:1092-9.
- 131 Skoutelis A, Lianou P, Papageorgiou E, Kokkinis K, Alexopoulos K, Bassaris H. Effects of propofol and thiopentone on polymorphonuclear leukocyte functions in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38: 856-62.
- 132 Galley HF, Dubbels AM, Webster NR. The effect of midazolam and propofol on interleukin-8 from human polymorphonuclear leucocytes. *Anesth Analg* 1998; 86: 1289-93.
- 133 Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg* 1998; 86: 252-8.
- 134 Mathur S, Farhangkhgoee P, Karmazyn M. Cardioprotective effects of propofol and sevoflurane in ischemic and reperfused rats. Role of K_{ATP} channels and interaction with the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *Anesthesiology* 1999; 91: 1349-60.
- 135 Janadov SA, Lim KHH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 360-9.

