

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΝΙΚΗΤΕΑΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Χρονική κατανομή οξειδωτικών μεταβολών του εντερικού βλεννογόνου σε αποφρακτικό ίκτερο. Επίπτωση στον εντερικό φραγμό.*

**ΑΓΓΕΛΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2023**

**Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου: 26/6/2015**

**Ημερομηνία ορισμού της τριμελούς επιτροπής: 16/7/2015**

**Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 5/10/2015**

**Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 19/10/2023**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Βαγιανός Κωνσταντίνος, τ. Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής (επιβλέπων)

Κουράκλης Γρηγόριος, ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής (μέλος)

Καρατζάς Θεόδωρος, τ.Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής (μέλος)

## **ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Αρκαδόπουλος Φ. Νικόλαος Καθηγητής

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Βαγιανός Κωνσταντίνος, τ.Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

Κουράκλης Γρηγόριος, ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής

Καρατζάς Θεόδωρος, τ.Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

Νικητέας Νικόλαος, Καθηγητής Χειρουργικής

Δημητρούλης Δημήτριος, Καθηγητής Χειρουργικής

Τσουρούφλης Γεράσιμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

Κύκαλος Στυλιανής, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

**Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα**



## ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστωρας ποιεύμενος, ἐπιτελεᾶ ποιήσεις κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἑμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χηρίζωσι μαθηταῖσιν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἑμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοιςί τε καὶ ὠρκεισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρῃσιν. Οὐ δῶσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσὼν φθορίον δῶσω. Ἄγνως δὲ καὶ ὄσιως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ὄν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφοροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ κρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεᾶ ποιέοντι, καὶ μὴ συγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης ἀθεασομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκούντι, τάναντία τούτων

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- Apostolos Angelis, Ioannis D Kostakis, Konstantinos Lilimpakis, Electra Kalaitzopoulou, Polyxeni Papadea, Marianna Skipitari, Christos D Georgiou, Costas Vagianos. Time-related Evidence of Intestinal Oxidative Stress in Obstructive Jaundice-Induced **Rats**. **Eur Surg Res. 2023**  
**Mar15.doi:10.1159/000530087**

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ

- Angelis Apostolos, Vagianos Costantinos, Zisimopoulos Dimitrios, Kalaitzopoulou Electra, Georgiou D. Christos. **Time related enteric mucosa oxidative stress in experimental obstructive jaundice**

52<sup>nd</sup> International Meeting of the European Society for Surgical Research (ESSR), Beurs van Berlage, Amsterdam, Nederland. June 2017.

## Πρόλογος

Η διαδικασία εκπόνησης μιας διδακτορικής διατριβής είναι μια μακρά και επίπονη εργασία που συχνά χρειάζεται υπομονή και επιμονή. Σίγουρα είναι μια διαδικασία διδακτική για τον υποψήφιο διδάκτορα καθώς τον φέρνει αντιμέτωπο με καταστάσεις που πολλές φορές δεν φαντάζεται καθώς ξεκινά για το ταξίδι του αυτό.

Σίγουρα κι εγώ σε αυτή μου την πορεία ήρθα αντιμέτωπος με αρκετές αντιξοότητες αλλά και με τον ίδιο μου τον εαυτό.

Ωστόσο θα έλεγα ότι δεν είναι μόνο το τελικό αποτέλεσμα που δημιουργεί ένα αίσθημα επίτευξης αλλά άλλο και η συνολική διαδικασία και η εμβάθυνση σε ένα πεδίο καθώς και η γενικότερη εκπαίδευση στη συγγραφή μίας διδακτορικής διατριβής.

Η πραγματοποίηση αυτής της διδακτορικής διατριβής δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη στήριξη και τη συμβολή των δασκάλων μου καθώς και άξιων συναδέλφων με τους οποίους συνεργάστηκα και θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς.

Στον επιβλέποντα τη διατριβή μου τ.Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής κ. Κώστα Βαγιανό, ο οποίος με προέτρεψε στο να ακολουθήσω αυτόν τον ακαδημαϊκό δρόμο σχεδιάζοντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Η αφοσίωση του στην αριστεία, η προσοχή στη λεπτομέρεια και το πάθος του για την πρόοδο στον τομέα της χειρουργικής με έχουν εμπνεύσει πολύ. Η ακλόνητη δέσμευση του για την επιτυχία των μαθητών του, σε συνδυασμό με την προθυμία του να επενδύσει σε χρόνο και προσπάθεια στην ανάπτυξη τους, είναι πραγματικά αξιέπαινη. Είμαι ευγνώμων για τις αμέτρητες ώρες που αφιέρωσε για να με καθοδηγήσει, να παρέχετε εποικοδομητικά σχόλια και να με ωθήσει να πετύχω το καλύτερο μου εαυτό.

Εκτιμώ βαθύτατα την προθυμία του να μοιραστεί την τεχνογνωσία του και να μου παρέχει ανεκτίμητες ευκαιρίες να μάθω και να συνεισφέρω στον τομέα. Η καθοδήγηση του όχι μόνο έχει εμπλουτίσει το ακαδημαϊκό μου ταξίδι, αλλά έχει ενσταλάξει μέσα μου ένα βαθύ αίσθημα ευθύνης, επαγγελματισμού και αφοσίωσης στο να έχω ουσιαστικό αντίκτυπο στον τομέα της χειρουργικής.

Στον τ.Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής κ. Θεόδωρο Καρατζά, θα ήθελα να εκφράσω την εγκάρδια ευγνωμοσύνη μου που υπηρέτησε ως μέλος της επιτροπής διατριβής μου. Οι πολύτιμες γνώσεις, τα σχόλια του και η τεχνογνωσία του συνέβαλαν καθοριστικά στη

διαμόρφωση της κατεύθυνσης και της ποιότητας της έρευνας μου. Τον ευχαριστώ για άλλη μια φορά για την πολύτιμη συνεισφορά του και για την συμμετοχή του στην επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής. Η αφοσίωση του στον ακαδημαϊκό χώρο και η δέσμευσή σας να προωθήσετε την ανάπτυξη επίδοξων ερευνητών όπως εγώ είναι πραγματικά αξιόπαινη. Είμαι ευγνώμων για τον αντίκτυπο που είχε στο ακαδημαϊκό μου ταξίδι.

Στον ομότιμο Καθηγητή Χειρουργικής κ. Γρηγόρη Κουράκλη θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη για τη συμμετοχή του ως μέλος της επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής. Η εμπειρία του στον τομέα της χειρουργικής ήταν ανεκτίμητη σε όλη αυτή τη διαδικασία. Τα σχόλια και η καθοδήγησή του έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της ποιότητας της έρευνάς μου. Τον ευχαριστώ για τη δέσμευσή του στην ακαδημαϊκή αριστεία και για τον χρόνο που αφιερώσατε για να αναθεωρήσει και να αξιολογήσει τη δουλειά μου. Οι συνεισφορές του είχαν ουσιαστικό αντίκτυπο και εκτιμώ πραγματικά την υποστήριξη και την καθοδήγηση του.

Τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την εξαιρετική συνεργασία και την υποστήριξη κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της διατριβής μου εκφράζω επίσης στους δύο συνεργάτες μου, τον κ. Κωνσταντίνο Λιλιμπάκη και την κ. Τόνια Τσεπελάκη. Η τεχνογνωσία και η αφοσίωση τους συνέβαλαν στην επιτυχία του ερευνητικού μας έργου. Η συνεργασία μαζί τους ήταν μια πραγματικά εμπλουτισμένη εμπειρία. Οι γνώσεις, οι δεξιότητες τους και η ακλόνητη δέσμευσή τους για την εκτέλεση του εγχειρήματος μας όχι μόνο συνέβαλαν στην ομαλή εκτέλεση των πειραμάτων αλλά έχουν επίσης ανεβάσει την ποιότητα των ευρημάτων μας. Η προθυμία τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους, να ανταλλάξουν ιδέες και να προσφέρουν πολύτιμες προτάσεις έχουν ενισχύσει σημαντικά το βάθος και την εγκυρότητα της έρευνας μας. Είμαι ειλικρινά ευγνώμων για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, για την αντιμετώπιση προβλημάτων, την ανάλυση δεδομένων και τη συζήτηση των παρατηρήσεών μας. Ο επαγγελματισμός, η ομαδική εργασία και η προθυμία τους να κάνουν την παραπάνω προσπάθεια έχουν επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα της έρευνας μας. Θέλω να εκφράσω την ειλικρινή μου εκτίμηση για την υποστήριξη και τη συνεργασία τους. Η συνεισφορά τους ήταν ανεκτίμητη και είμαι ευγνώμων για την ευκαιρία να δουλέψω δίπλα σε τέτοια ταλαντούχα και αφοσιωμένα άτομα. Η καθοδήγηση τους έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη μου ως ερευνητής και είμαι προνομιούχος που είχα την ευκαιρία να μάθω από εσάς.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον κ.Στέλιο Ασημακόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας στο Πανεπιστήμιο Πατρών, για την πρωτοποριακή εργασία του με τη δική του διδακτορική διατριβή. Η έρευνα του συνέβαλε καθοριστικά στη διαμόρφωση της κατανόησής μου για το θέμα και ενέπνευσε τη δική μου ερευνητική διεργασία. Τον ευχαριστώ για τη σημαντική συνεισφορά του στον τομέα.

Στον κ. Χρήστο Γεωργίου και την ομάδα του ένα ευχαριστώ από καρδιάς για την ανεκτίμητη καθοδήγηση σας και την τεράστια υποστήριξη που παρείχε η ομάδα σας σε όλη τη διάρκεια της έρευνας της διατριβής μου. Η βαθιά του γνώση στο θέμα και η βοήθεια του με στις τεχνικές μετρήσεις συνέβαλαν στην επιτυχία του έργου μου. Είμαι επίσης ευγνώμων για την ευκαιρία να συνεργαστούμε για τη δημοσίευση του άρθρου μας, που αποτέλεσε σημαντικό ορόσημο στην ακαδημαϊκή μου διαδρομή. Τον ευχαριστώ για την ακλόνητη αφοσίωση και καθοδήγηση του.

Επίσης ένα ευχαριστώ και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας κ.Στέλιο Χατζηπαναγιώτου και την ομάδα του που πραγματοποίησαν τις αιματολογικές μετρήσεις.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλη την ομάδα του Πειραματικού Εργαστηρίου του Λαϊκού Νοσοκομείου για την πολύτιμη υποστήριξη και βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου διαδρομής. Η αφοσίωση τους, η τεχνογνωσία και η προθυμία τους να βοηθήσουν είχαν σημαντικό αντίκτυπο στην πρόοδο και το αποτέλεσμα της δουλειάς μου. Είμαι πραγματικά ευγνώμων για την ευκαιρία να γίνω μέρος ενός τέτοιου περιβάλλοντος συνεργασίας. Τους ευχαριστώ για τη συνεχή ενθάρρυνση και για τη δημιουργία μιας ευνοϊκής ατμόσφαιρας για μάθηση και ανάπτυξη.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMP	Antimicrobial Peptides
SIRS	Systematic Inflammatory Responce Syndrome
OS	Oxidative Stress
ROS	Reactive Oxygen Species
EBM	Εντερική βακτηριακή μετακίνηση
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
TNF-a	Tumor Necrosis Factor-a
GI	Gastrointestinal tract
TJ	Tight Junctions
ZO	Zonula Ocludens
JAM	Junctional Adhesion Molecules
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBS	Irritable Bowel Syndrome
LPS	Lipopolyscharides
TLR4	Toll-like Receptor 4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
CRP	C-reactive protein
MAC	Membrane Attack Complex
NO	Nitrogen Monoxide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SOD	Superoxide Dismutases
RNM	Reactive Nitrogen Metabolite
ΧΑΠ	Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια
MDA	Μηλονική διαλδεύδη
GST	S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης
MT	Μεταλλθειονίνες

GALT

Gastrointestinal Lymphoid Tissue

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Πρόλογος</b>	4
<b>Συνομογραφίες</b>	7
<b>Εισαγωγή</b>	12
<b>Γενικό μέρος</b>	14
Κεφάλαιο 1: ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ	15
Φυσιολογία του γαστρεντερικού συστήματος	15
Δομικά συστατικά του εντερικού φραγμού	18
Επιθηλιακά κύτταρα	19
Αποφρακτικές συνδέσεις (Tight Junctions)	20
Το σύστημα ανόσιας του εντέρου	21
Η φυσιολογία της εντερικής διαπερατότητας	23
Κεφάλαιο 2: ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΑΙΜΙΑ	26
Η βιοχημική δομή της ενδοτοξίνης	26
Η βιολογική δραστηριότητα της ενδοτοξίνης	27
Αλληλουχία γεγονότων στην αιματική κυκλοφορία	29
Δεσμευτική πρωτεΐνη της λιποπολυσακχαρίδης (LBP)	31
CD14: Υποδοχέας της ενδοτοξίνης	31
Κυτταρική αντίδραση στην ενδοτοξίνη.	32
Αλληλουχία γεγονότων στο σηπτικό σοκ από gram (-) μικρόβια.	33
Κεφάλαιο 3: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΟΥ ΙΚΤΕΡΟΥ ΣΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ	36
Βακτηριακή μετακίνηση και οι επιπτώσεις της	37
Σύνδεση οξειδωτικού στρες και βακτηριακή μετακίνησης	39
Κεφάλαιο 4: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	40
Βιοχημεία και χαρακτηριστικά μεταβολικών οξυγόνου	41
Ανιόν υπεροξειδίου του οξυγόνου (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	41

Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	42
Ρίζα υδροξυλίου (OH <sup>-</sup> )	43
Μονήρες οξυγόνο - Singlet Oxygen ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	44
Δραστικοί μεταβολίτες του αζώτου	44
Κυτταρικοί στόχοι των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου	45
Μεμβρανικά λιπίδια	46
Πρωτεΐνες	47
DNA	48
Αντιοξειδωτική άμυνα	49
Μη-ενζυματικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	49
Γλουταθειόνη	50
Μεταλλοθειονίνες	51
Αντιοξειδωτικά ένζυμα	52
Οξειδοαναγωγική ισορροπία	54
Το σύστημα της γλουταθειόνης	55
Πρωτεϊνικές σουλφυδρυλικές ομάδες και οξειδοαναγωγική ισορροπία	57
Οξειδοαναγωγική κατάσταση και μείζονα κυτταρικά γεγονότα	59
Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση	60
Κυτταρικός θάνατος	60
Απόπτωση	61
Ορισμός, μορφολογία και βιοχημεία της απόπτωσης.	61
Επαγωγή της απόπτωσης και μεταγωγή σήματος	62
Απόπτωση στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο	63
Απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις του εντερικού επιθήλιου	65
α. Βακτηριακές λοιμώξεις.	65

β.Ισχαιμία-επαναιμάτωση	66
γ.Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	67
δ.Ακτινική εντερίτιδα	68
ε.Επίδραση κυτταροστατικών φαρμάκων	69
στ.Επίδραση των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων	70
ζ.Καρκίνος παχέος εντέρου	71
<b>Ειδικό μέρος</b>	<b>73</b>
Υλικά - Μέθοδοι	74
1.Πειραματόζωα	74
2.Σχεδιασμός πειραματικού πρωτοκόλλου	75
3. Χειρουργική τεχνική και αναισθησία	75
4.Μετρήσεις	76
5.Ανάλυση του οξειδωτικού στρες	78
6.Στατιστική ανάλυση	78
Αποτελέσματα	79
Συμπεράσματα - Συζήτηση	81
Περίληψη	98
Summary	99

## Εισαγωγή

Ο αποφρακτικός ίκτερος (AI) είναι ένα κοινό κλινικό σύνδρομο που προκαλείται από διάφορες ασθένειες του ήπατος και των χοληφόρων, που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης ορού και εναπόθεση σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένου του εντέρου. [1] Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο αποφρακτικό ίκτερο μπορεί να προκαλέσει εντερικό οξειδωτικό στρες, σχετιζόμενο με σημαντικές δομικές και λειτουργικές αλλαγές. [2,3] Ωστόσο, τα χρονικά στοιχεία του εντερικού οξειδωτικού στρες σε αρουραίους που προκαλούνται από αποφρακτικό ίκτερο παραμένουν ασαφή.

Το έντερο είναι ένα κρίσιμο όργανο για τη διατήρηση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών και της λειτουργίας φραγμού στο σώμα. [4] Το εντερικό οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του εντερικού βλεννογόνου, συμπεριλαμβανομένης της ατροφίας των λαχνών, της υπερπλασίας των κρυπτών και του οιδήματος του βλεννογόνου. [5] Αυτές οι αλλαγές μπορεί να προκαλέσουν δυσαπορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και να αυξήσουν την εντερική διαπερατότητα, οδηγώντας σε ενδοτοξιναιμία και σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS). [6] Ως εκ τούτου, η διερεύνηση των ενδείξεων του εντερικού οξειδωτικού στρες που σχετίζονται με το χρόνο σε αρουραίους και που προκαλούνται από τον αποφρακτικό ίκτερος είναι σημαντική για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του και την ανάπτυξη αποτελεσματικών παρεμβάσεων.

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στο έντερο σε διάφορα ζωικά μοντέλα. [7,8,9] Ωστόσο, από όσο γνωρίζουμε, καμία μελέτη δεν έχει διερευνήσει συγκεκριμένα τα χρονικά στοιχεία του εντερικού οξειδωτικού στρες σε αρουραίους που προκαλούνται από αποφρακτικό ίκτερο. Ως εκ τούτου, ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να διερευνήσει τις σχετιζόμενες με το χρόνο αλλαγές στο εντερικό οξειδωτικό στρες σε αρουραίους που προκαλούνται από αποφρακτικό ίκτερο και να παράσχει μια βάση για την ανάπτυξη νέων παρεμβάσεων σε αυτή την οντότητα.

Ο αποφρακτικός ίκτερος (AI) είναι μια κοινή κλινική πάθηση που προκαλεί απόφραξη του ηπατικού και του εξωηπατικού χοληδόχου πόρου. Χαρακτηρίζεται από υπερχολερυθριναιμία, φλεγμονή και οξειδωτικό στρες (oxidative stress - OS) σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος και του εντέρου. [10,11,12] Το OS, μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS) και της αντιοξειδωτικής άμυνας, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη, υπεροξείδωση λιπιδίων και φλεγμονή. [13] Το έντερο, το μεγαλύτερο όργανο με εκτεταμένη επαφή με περιβαλλοντικούς παράγοντες, είναι πολύ ευαίσθητο στο OS. [14,15] Το εντερικό OS μπορεί να βλάψει τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, να προωθήσει τη βακτηριακή μετατόπιση και να οδηγήσει σε συστηματική φλεγμονή. [16] Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τη χρονική σχέση μεταξύ του αποφρακτικού ικτέρου και του εντερικού OS. Σε αυτή τη μελέτη, στοχεύουμε να διερευνήσουμε τη χρονική σχέση μεταξύ του αποφρακτικού ικτέρου και του εντερικού OS σε αρουραίους.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ

#### **Φυσιολογία Γαστρεντερικού Σωλήνα.**

Το έντερο έχει πάψει πλέον να θεωρείται μόνο ως ένα όργανο μεταφοράς, επεξεργασίας και απορρόφησης θρεπτικών συστατικών και έχει αναγνωριστεί ο σημαντικός ρόλος της μεταβολικής, ενδοκρινικής και ανοσολογικής του λειτουργίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο εντερικός βλεννογόνος αποτελεί μείζονα ανατομικό και λειτουργικό φραγμό ο οποίος εμποδίζει τη διαφυγή ενδοαυλικών βακτηριδίων και ενδοτοξινών προς εξωεντερικούς ιστούς και τη συστηματική κυκλοφορία. [17] Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως σε shock, σήψη, ενδοτοξιναιμία, μείζονα τραύματα, εγκαύματα, παγκρεατίτιδα, εκτεταμένες ηπατεκτομές, ακτινοβολήση του εντέρου, κατάχρηση αντιβιοτικών, ολική παρεντερική διατροφή και ανοσοκαταστολή η επάρκεια του «εντερικού φραγμού» μειώνεται με αποτέλεσμα τη μετακίνηση εντεροβακτηριδίων και των προϊόντων τους (ενδοτοξίνη) σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς (μεσεντέριοι λεμφαδένες, ήπαρ, σπλήνας, νεφροί, πυλαία και συστηματική κυκλοφορία), ένα φαινόμενο που προσδιορίζεται με τον όρο «εντερική βακτηριακή μετακίνηση (EBM) ή αλλόθεση». [18-22] Η δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού και η EBM μπορούν να προκαλέσουν υπερμεταβολικές καταστάσεις, λοιμώξεις, σήψη και ανάπτυξη του συνδρόμου πολυοργανικής ανεπάρκειας επηρεάζοντας δυσμενώς την πρόγνωση των ασθενών αυτών. [23]

Το φαινόμενο της EBM και η ανάπτυξη σηπτικών επιπλοκών και πολυοργανικής ανεπάρκειας συνδέονται με τη θεωρία της «σήψης εντερικής προέλευσης». [23] Η θεωρία αυτή αναπτύχθηκε με βάση την παρατήρηση ότι σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών που κατέληξαν λόγω σήψης δεν ανευρίσκεται συγκεκριμένη εστία λοίμωξης κατά τη νεκροτομή. [24]

Οι ασθενείς με αποφρακτικό ίκτερο, ιδιαίτερα όταν εκτίθενται στο επιπρόσθετο stress ενός επεμβατικού διαγνωστικού ή θεραπευτικού χειρισμού, είναι επιρρεπείς

στην ανάπτυξη σηπτικών επιπλοκών και νεφρικής δυσλειτουργίας που οδηγούν σε υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. [25] Οι επιπλοκές αυτές έχουν συσχετιστεί με την παρουσία συστηματικής ενδοτοξιναιμίας, η οποία κινητοποιεί τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση οδηγώντας σε απελευθέρωση διαφόρων ευοδωτικών της φλεγμονής μεσολαβητών (IL-1, IL-6, TNF-α, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, NO), οι οποίοι επηρεάζουν δυσμενώς τη λειτουργία διαφόρων οργάνων. [26]

Η έλλειψη χολής προκαλεί ατροφία του εντερικού βλεννογόνου δεδομένου ότι αυτός αποστερείται της τροφικής επίδρασης των χολικών αλάτων. Παράλληλα, αυξάνεται η ελεύθερη ενδοαυλική ενδοτοξίνη λόγω μειωμένης δέσμευσης, καθώς τα χολικά άλατα έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν μη απορροφήσιμα συμπλέγματα με την ενδοτοξίνη, και αυξημένης παραγωγής της από την υπεράνπτυξη gram (-) εντερικών βακτηριδίων ελλείπει της βακτηριοστατικής δράσης των χολικών αλάτων. [27,28] Οι μεταβολές αυτές ευοδώνουν τη μετακίνηση ενδοαυλικών βακτηριδίων και ενδοτοξινών σε εξωεντερικές θέσεις και τη συστηματική κυκλοφορία, ενώ η ίδια η ενδοτοξιναιμία με τη σειρά της επιδρά δυσμενώς επί του εντερικού βλεννογόνου μειώνοντας περαιτέρω την επάρκεια του εντερικού φραγμού. [29]. Η αύξηση της εντερικής διαπερατότητας και το φαινόμενο της EBM έχει δειχθεί όχι μόνο σε πειραματικά μοντέλα αποφρακτικού ικτέρου αλλά και στην περίπτωση ασθενών. Πειραματικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την ανάπτυξη βακτηριδίων εντερικής προέλευσης σε εξωεντερικούς ιστούς με τη διενέργεια καλλιέργειών σε δείγματα λαμβανόμενα κατά τη λαπαροτομία, παρά τη χρήση κατάλληλης προεγχειρητικής αντιβιοτικής αγωγής. [30] Επίσης, ασθενείς με αποφρακτικό ίκτερο παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, η οποία έχει πιστοποιηθεί με εκτίμηση του δείκτη λακτουλόζη/μαννιτόλη καθώς και με μετρήσεις τόσο της ενδοτοξίνης στην πυλαία και τη συστηματική κυκλοφορία όσο και του τίτλου των παραγόμενων κατά της ενδοτοξίνης αντισωμάτων. [31] Η παθοφυσιολογία του φαινομένου της EBM, ανεξαρτήτως της παθολογικής κατάστασης στην οποία παρατηρείται και του πρωταρχικού βλαπτικού ερεθίσματος, συνδέεται με τη διαταραχή ενός ή περισσότερων από τους ακόλουθους τρεις παράγοντες: (α) της ισορροπίας της φυσιολογικής ενδογενούς εντερικής χλωρίδας, (β) της επαρκούς τοπικής και συστηματικής ανοσολογικής απάντησης και (γ) της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του εντερικού φραγμού. [29] Από τους παράγοντες αυτούς τον πιο κρίσιμο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η επάρκεια του εντερικού βλεννογόνου.

Η γαστρεντερική οδός (gastrointestinal tract - GI) χρησιμεύει ως κρίσιμη επαφή μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και του ξενιστή. Ο φραγμός του εντέρου, που αποτελείται από διάφορα συστατικά, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, το βλεννογόνο στρώμα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του περιεχομένου του αυλού και των ιστών του ξενιστή. Ο φραγμός του εντέρου παρέχει επίσης επιλεκτική διαπερατότητα για να επιτρέψει την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, ενώ αποτρέπει την είσοδο επιβλαβών μικροοργανισμών και τοξινών στην κυκλοφορία. [32,33]

Τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν την γαστρεντερική οδό σχηματίζουν ένα φυσικό φράγμα που ενισχύεται από τις αποφρακτικές συνδέσεις (Tight Junctions - TJs) μεταξύ των κυττάρων. [34] Οι TJ λειτουργούν ως φύλακας, ρυθμίζοντας την παρακυτταρική μεταφορά διαλυμένων ουσιών και ιόντων. Οι TJs αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως οκλουδίνη, κλαουδίνες και μόρια σύνδεσης προσκόλλησης, τα οποία αλληλεπιδρούν με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες zonula occludens (ZO), για να διατηρήσουν την ακεραιότητα του φραγμού. [35,36]

Εκτός από το φυσικό φράγμα, το έντερο έχει επίσης ένα χημικό φράγμα με τη μορφή του βλεννογόνου στρώματος που εκκρίνεται από τα κύλικά κύτταρα. Η βλεννογόνος στιβάδα περιέχει γλυκοπρωτεΐνες, όπως η βλεννίνη, οι οποίες εμποδίζουν την προσκόλληση και τη διείσδυση επιβλαβών ουσιών και μικροοργανισμών στο επιθηλιακό στρώμα. [37]

Ο φραγμός του εντέρου έχει επίσης μια σημαντική ανοσοποιητική λειτουργία, με διάφορα ανοσοκύτταρα, όπως δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, που κατοικούν στον λεμφικό ιστό που σχετίζεται με το έντερο (GALT). Αυτά τα ανοσοκύτταρα παρακολουθούν συνεχώς το περιεχόμενο του αυλού και παρέχουν προστασία από εισβάλλοντα παθογόνα και τοξίνες. [38]

Ο φραγμός του εντέρου μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο από διάφορους παράγοντες, όπως λοιμώξεις, φλεγμονές, στρες και φάρμακα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη εντερική διαπερατότητα, επιτρέποντας τη μετατόπιση του περιεχομένου

του αυλού στην κυκλοφορία, οδηγώντας σε συστηματική φλεγμονή και ανοσολογική ενεργοποίηση. [39]

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού έχει επίσης μελετηθεί εκτενώς. Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών στο σώμα. Τα ROS μπορούν να βλάψουν τα επιθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αυξημένη εντερική διαπερατότητα και φλεγμονή. [40,41]

Συμπερασματικά, ο φραγμός του εντέρου είναι ένα πολύπλοκο σύστημα που χρησιμεύει για τη διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και του ξενιστή. Αποτελείται από διάφορα φυσικά και χημικά συστατικά που συνεργάζονται για να παρέχουν επιλεκτική διαπερατότητα και προστασία από επιβλαβείς ουσίες και μικροοργανισμούς. Η δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και συστηματική φλεγμονή. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών που εμπλέκονται στη λειτουργία και τη δυσλειτουργία του φραγμού του εντέρου.

### **Δομικά συστατικά του εντερικού φραγμού**

Ο βλεννογόνος είναι το έσω στρώμα του γαστρεντερικού φραγμού και αποτελείται από ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων, ένα στρώμα συνδετικού ιστού γνωστό ως lamina propria και ένα λεπτό στρώμα λείου μυός γνωστό ως muscularis mucosae. [42] Τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών και νερού και την έκκριση βλέννας, ενζύμων και ορμονών που βοηθούν στην πέψη. [43] Η lamina propria περιέχει κύτταρα του ανοσοποιητικού και αιμοφόρα αγγεία που παρέχουν θρεπτικά συστατικά στα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ο muscularis mucosae βοηθά στην ανάμειξη και την προώθηση της τροφής μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα. [42]

Ο υποβλεννογόνος είναι ένα στρώμα συνδετικού ιστού που περιέχει αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά αγγεία και νεύρα. [44] Τα αιμοφόρα αγγεία παρέχουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στον βλεννογόνο, ενώ τα λεμφικά αγγεία μεταφέρουν απορροφημένα θρεπτικά συστατικά και άχρηστα προϊόντα. Τα νεύρα του

υποβλεννογόνου ελέγχουν την έκκριση βλέννας και ενζύμων, καθώς και τη συστολή του έξω μυϊκού ιστού.

Το muscularis externa είναι ένα στρώμα λείου μυός που περιβάλλει τον υποβλεννογόνο και είναι υπεύθυνο για τη σύσπαση και τη χαλάρωση του γαστρεντερικού σωλήνα. Το muscularis externa αποτελείται από δύο στρώματα μυών: ένα εσωτερικό κυκλικό στρώμα και ένα εξωτερικό διαμήκη στρώμα. [45] Αυτοί οι μύες συνεργάζονται για να αναμειγνύουν και να προωθούν την τροφή μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα μέσω του περισταλτισμού.

Ο ορογόνος είναι το πιο εξωτερικό στρώμα του γαστρεντερικού φραγμού και αποτελείται από συνδετικό ιστό και μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ένα λιπαντικό υγρό που μειώνει την τριβή μεταξύ της γαστρεντερικής οδού και άλλων οργάνων, και επίσης προστατεύει και ενισχύει την γαστρεντερική οδό. [46]

Εκτός από αυτά τα δομικά συστατικά, ο γαστρεντερικός φραγμός περιλαμβάνει επίσης αποφρακτικές ενώσεις (tight junctions) και κύτταρα του ανοσοποιητικού. Οι αποφρακτικές ενώσεις είναι εξειδικευμένες δομές πρωτεΐνης που σφραγίζουν τα κενά μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, αποτρέποντας τη διαρροή πεπτικών ενζύμων, τοξινών και επιβλαβών ουσιών από τον αυλό της γαστρεντερικής οδού στον υποκείμενο ιστό. [47] Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, παίζουν ρόλο στην προστασία από λοιμώξεις και επιβλαβείς ουσίες, καθώς και στη διατήρηση της ανοχής σε αβλαβείς ουσίες και στην πρόληψη ακατάλληλων ανοσολογικών αποκρίσεων. [48]

### **Επιθηλιακά κύτταρα**

Τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν βασικό δομικό συστατικό του γαστρεντερικού φραγμού. [49,50] Σχηματίζουν μια σφιχτά συσκευασμένη μονοστιβάδα που χωρίζει τον αυλό της γαστρεντερικής οδού από το υποκείμενο lamina propria. Η κύρια λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων είναι να λειτουργούν ως φυσικός φραγμός, αποτρέποντας την είσοδο επιβλαβών παθογόνων και τοξινών ενώ παράλληλα επιτρέπει την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών και νερού. [50]

Τα επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού χαρακτηρίζονται από την πολωμένη δομή τους, η οποία περιλαμβάνει διακριτές κορυφαίες και βασεοπλευρικές περιοχές.[50] Η κορυφαία περιοχή βλέπει στον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα και είναι εξοπλισμένη με διάφορες εξειδικευμένες δομές όπως μικρολάχνες και γλυκοκάλυκες, οι οποίες αυξάνουν την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και επίσης χρησιμεύουν ως φυσικός φραγμός για την πρόληψη της εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών[51]. Η βασεοπλάγια περιοχή αντιμετωπίζει την υποκείμενη lamina propria και εμπλέκεται στην επικοινωνία κύτταρο σε κύτταρο και στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων[50].

Η ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού διατηρείται από αποφρακτικές συνδέσεις, οι οποίες είναι εξειδικευμένες δομές που σχηματίζουν σφράγιση μεταξύ γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων[52]. Οι αποφρακτικές συνδέσεις αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η οκλουδίνη και οι κλαουδίνες, καθώς και από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες zonula occludens (ZO), οι οποίες συνδέουν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης[52]. Οι στενοί σύνδεσμοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας του επιθηλιακού φραγμού και στην πρόληψη της εισόδου επιβλαβών παθογόνων και τοξινών[53].

Εκτός από το ρόλο τους στη διατήρηση του φυσικού φραγμού, τα επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων[54]. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με διάφορους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) όπως υποδοχείς τύπου toll (Toll-like Receptors), οι οποίοι τους επιτρέπουν να αναγνωρίζουν και να ανταποκρίνονται σε παθογόνα και άλλα ξένα μόρια. [54] Τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν επίσης διάφορες κυτοκίνες και χημειοκίνες που στρατολογούν τα ανοσοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης και προάγουν την επίλυση της φλεγμονής. [54]

### **Αποφρακτικές συνδέσεις (Tight Junctions)**

Οι αποφρακτικές ενώσεις (tight junctions) είναι ένας τύπος μεσοκυττάρου συνδέσμου που βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα. Αποτελούνται από εξειδικευμένες δομές πρωτεΐνης που σχηματίζουν μια σφράγιση μεταξύ γειτονικών κυττάρων, αποτρέποντας τη διαρροή μορίων και ιόντων στον μεσοκυττάρου χώρο. Η πρωταρχική λειτουργία των αποφρακτικών ενώσεων είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού φραγμού, ο οποίος διαχωρίζει τον αυλό της γαστρεντερικής οδού από τους υποκείμενους ιστούς.

Η δομή και η λειτουργία των αποφρακτικών ενώσεων έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια. Είναι γνωστό ότι οι αποφρακτικές ενώσεις αποτελούνται από πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των claudins, occludin και μορίων σύνδεσης προσκόλλησης (junctional adhesion molecules - JAMs), καθώς και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες zonula occludens (ZO), που αγκυρώνουν τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στον κυτταροσκελετό ακτίνης των κυττάρων.[55]

Μία από τις βασικές λειτουργίες των αποφρακτικών ενώσεων είναι η πρόληψη της διαρροής πεπτικών ενζύμων, τοξινών και επιβλαβών ουσιών από τον αυλό της γαστρεντερικής οδού στους υποκείμενους ιστούς. Για παράδειγμα, στο λεπτό έντερο, οι αποφρακτικές ενώσεις εμποδίζουν τη διαρροή παγκρεατικών ενζύμων και χολικών αλάτων, τα οποία μπορεί να βλάψουν τα επιθηλιακά κύτταρα και να προκαλέσουν φλεγμονή.[56] Επιπλέον, οι αποφρακτικές ενώσεις στο παχύ έντερο εμποδίζουν τη διαρροή επιβλαβών βακτηρίων και βακτηριακών τοξινών από τον αυλό στην κυκλοφορία του αίματος, η οποία μπορεί να προκαλέσει σήψη και άλλες συστηματικές λοιμώξεις. [57,58]

Η διαταραχή των αποφρακτικών ενώσεων έχει εμπλακεί σε διάφορες γαστρεντερικές παθήσεις, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), η κοιλιοκάκη και το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (IBS). [59,60] Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση και ο εντοπισμός των πρωτεϊνών των αποφρακτικών ενώσεων μπορεί να μεταβληθεί σε αυτές τις ασθένειες, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα του επιθηλιακού φραγμού και τη μετατόπιση επιβλαβών ουσιών στους υποκείμενους ιστούς.[61]

### **Το σύστημα ανοσίας του εντέρου**

Ο γαστρεντερικός φραγμός δεν είναι μόνο υπεύθυνος για την πέψη των τροφών και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, αλλά παίζει επίσης ζωτικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από λοιμώξεις και επιβλαβείς ουσίες. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού είναι ένα βασικό συστατικό αυτού του φραγμού και υπάρχουν σε διαφορετικές περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα.

Τα λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που υπάρχουν στο γαστρεντερικό φραγμό και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία από παθογόνα και στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα Τ κύτταρα είναι ένας από τους κύριους τύπους λεμφοκυττάρων που υπάρχουν στη γαστρεντερική οδό και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικά υποσύνολα με βάση τη λειτουργία τους. Για παράδειγμα, τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοχής σε αβλαβείς ουσίες καταστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση εναντίον τους. Από την άλλη πλευρά, τα τελεστικά Τ κύτταρα, όπως τα Th1, Th2 και Th17 κύτταρα, εμπλέκονται στην εξάλειψη παθογόνων και άλλων επιβλαβών ουσιών από το γαστρεντερικό σωλήνα [62].

Εκτός από τα Τ κύτταρα, τα Β κύτταρα είναι επίσης παρόντα στο γαστρεντερικό φραγμό και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων κατά των εισβολέων παθογόνων. Αυτά τα αντισώματα μπορούν να εξουδετερώσουν τα παθογόνα και να τα εμποδίσουν να εισέλθουν στο σώμα, παίζοντας έτσι κρίσιμο ρόλο στην προστασία από λοιμώξεις. [63]

Τα μακροφάγα είναι ένας άλλος τύπος ανοσοκυττάρων που υπάρχει στον γαστρεντερικό φραγμό. Αυτά τα κύτταρα εμπλέκονται στη φαγοκυττάρωση και στην εξάλειψη επιβλαβών ουσιών όπως βακτήρια και τοξίνες από το γαστρεντερικό σωλήνα. Συμμετέχουν επίσης στην έναρξη και τη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων παράγοντας κυτοκίνες και παρουσιάζοντας αντιγόνα σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού.[64]

Επιπλέον, τα δενδριτικά κύτταρα είναι επίσης παρόντα στον γαστρεντερικό φραγμό και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτά τα κύτταρα εμπλέκονται στη σύλληψη αντιγόνων από τη γαστρεντερική οδό και στην παρουσίασή τους σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ξεκινώντας και ρυθμίζοντας έτσι τις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι επιβλαβών ουσιών.[65]



### Πίνακας Α: Παράγοντες που συμμετέχουν στη δημιουργία του εντερικού φραγμού

Παράγοντες	Μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί	Ανοσολογική άμυνα
Ενδοαυλικοί	<ul style="list-style-type: none"><li>- Εντερική χλωρίδα</li><li>- Κινητικότητα</li><li>- Πρωτεολυτικά ένζυμα - Όξινο pH</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Εκκριτική IgA</li></ul>
Επιθηλιακοί	<ul style="list-style-type: none"><li>- Ακίνητο υδάτινο στρώμα - Στρώμα βλέννης</li><li>- Μικρολάχνες</li><li>- Επιθηλιακά κύτταρα</li><li>- Αποφρακτικές ενώσεις</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Κύτταρα Μ</li><li>- Λεμφοκύτταρα</li></ul>
Υποβλεννογόνοι	<ul style="list-style-type: none"><li>- Συνδετικός ιστός</li><li>- Ενδοθήλιο τριχοειδών - Αιματική ροή</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Λεμφοκύτταρα</li><li>- Σιτευτικά κύτταρα - Μακροφάγα</li><li>- Ουδετερόφιλα</li><li>- Ηωσινόφιλα</li></ul>

### Η φυσιολογία της εντερικής διαπερατότητας

Ο γαστρεντερικός σωλήνας παίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος. Μία από τις βασικές του λειτουργίες είναι να ρυθμίζει την επιλεκτική διαπερατότητα του επιθηλιακού φραγμού του. Η φυσιολογία της εντερικής διαπερατότητας είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει μια ποικιλία κυτταρικών και μοριακών διεργασιών.

Το εντερικό επιθήλιο αποτελείται από ένα ενιαίο στρώμα εξειδικευμένων κυττάρων που συνδέονται με αποφρακτικές ενώσεις, προσκολλημένες συνδέσεις και δεσμοσώματα. Οι αποφρακτικές ενώσεις, ειδικότερα, είναι υπεύθυνες για τη σφράγιση των κενών μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, αποτρέποντας τη διαρροή πεπτικών ενζύμων, τοξινών και επιβλαβών ουσιών από τον αυλό της γαστρεντερικής οδού στους υποκείμενους ιστούς.[66] Ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες,

συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών, των αυξητικών παραγόντων και των διατροφικών συστατικών, και η δυσλειτουργία τους σχετίζεται με διάφορες ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD) και της κοιλιοκάκης. [67,68]

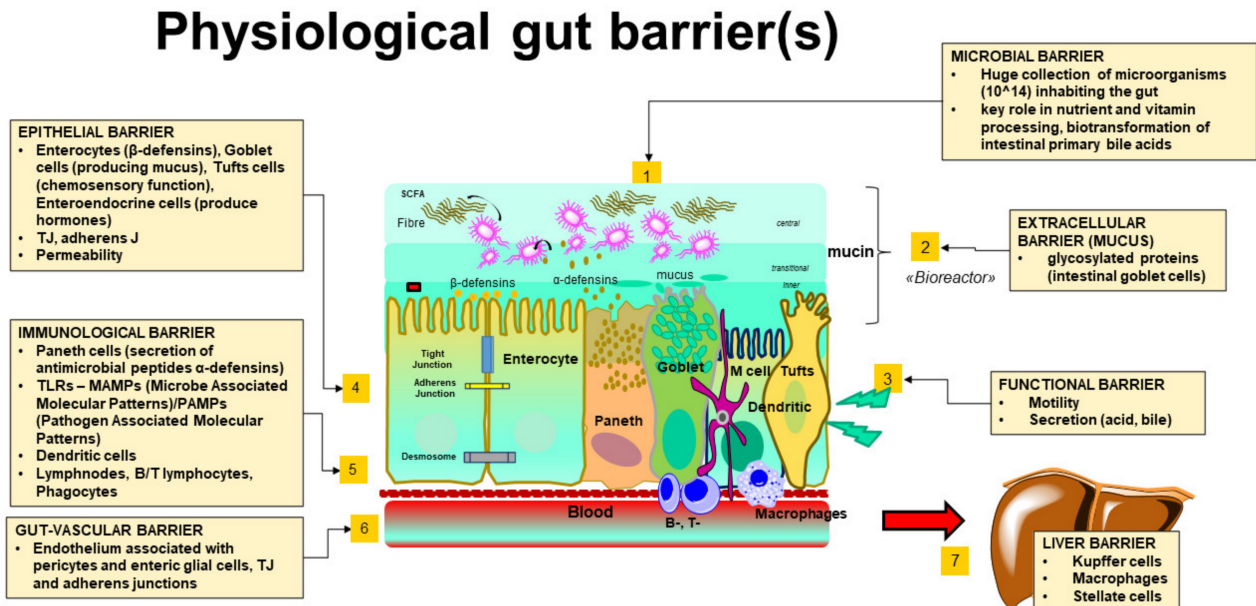
Η διαπερατότητα των αποφρακτικών ενώσεων για μη φορτισμένα μόρια εξαρτάται από το συντελεστή ανακλάσεώς τους (εκφράζει το κλάσμα της ωσμωτικής ροής της συγκεκριμένης ουσίας προς τη θεωρητικά μεγίστη ωσμωτική ροή), ενώ για τα ιόντα εξαρτάται από το φορτίο τους και είναι μεγαλύτερη για τα θετικά παρά για τα αρνητικά ιόντα, για τα οποία υπάρχει μερική μόνο διαπερατότητα. Έτσι δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού (δυναμικό διαχύσεως) που συμβάλλει στη διαμόρφωση της διεπιθηλιακής διαφοράς δυναμικού, μεταξύ των δύο πλευρών του επιθηλίου. Μία άλλη συνιστώσα του δυναμικού αυτού αποτελεί η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται από τη μεταφορά διαμέσου των αποφρακτικών ενώσεων περισσότερων κατιόντων παρά ανιόντων (δυναμικό ροής), με το μηχανισμό της έλξης διαλύτη (solvent drag, η τάση του νερού να παρασύρει και να μεταφέρει διαλυμένες ουσίες καθώς διέρχεται διαμέσου του επιθηλίου). Η σημαντικότερη όμως αιτία της διεπιθηλιακής διαφοράς δυναμικού είναι το δυναμικό μεταφοράς που οφείλεται στην ενεργητική μεταφορά  $\text{Na}^+$  από τον αυλό του εντέρου προς το διάμεσο χώρο, εξαιτίας της οποίας η ενδοαυλική πλευρά του επιθηλίου διατηρείται αρνητικά φορτισμένη σε σχέση με τη βασική. Η διεπιθηλιακή διαφορά δυναμικού αυξάνεται από το δωδεκαδάκτυλο προς το ορθό (νήστις: 0-3 mV, ειλεός: 1-5 mV, παχύ έντερο: 20-40 mV).

Η διακυττάρια διεργασία απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και εξυπηρετεί τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και ηλεκτρολυτών. Η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών συμβαίνει με σχηματισμό πινοκυττωτικών κυστιδίων στο κορυφαίο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης ανάμεσα από τις μικρολάχνες της ψυκτροειδούς παρυφής. Τα κυστίδια αυτά μεταφέρονται διαμέσου του κυτταροπλάσματος και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στην πλαγιοβασική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ηλεκτρολύτες απορροφώνται και εκκρίνονται με απλή μετακίνηση χωρίς τη παρεμβολή κυστιδίων. Κάθε φορά που ένα θετικά φορτισμένο ιόν μεταφέρεται διακυττάρια ένα αντίθετα φορτισμένο ιόν μεταφέρεται από την παρακυττάρια οδό μέσω των αποφρακτικών ενώσεων ώστε να διατηρηθεί η διαφορά δυναμικού.

Εκτός από τα παραπάνω, η εντερική διαπερατότητα ρυθμίζεται επίσης από διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς είναι η έκκριση βλέννας από τα κύλικά κύτταρα. Η βλέννα σχηματίζει ένα φυσικό φράγμα που προστατεύει το επιθήλιο από το περιεχόμενο του αυλού και αποτρέπει την προσκόλληση των βακτηρίων. [69]

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός είναι η έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (antimicrobial peptides - AMPs) από τα κύτταρα Paneth. Τα AMP παίζουν κρίσιμο ρόλο στην άμυνα ενάντια στα επιβλαβή βακτήρια και συμβάλλουν στη διατήρηση ενός υγιούς μικροβιώματος του εντέρου. [70]

Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού του GI. Ο γαστρεντερικός φραγμός περιέχει μια ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, που προστατεύουν από λοιμώξεις και επιβλαβείς ουσίες. Συμμετέχουν επίσης στη διατήρηση της ανοχής σε αβλαβείς ουσίες και στην πρόληψη ακατάλληλων ανοσολογικών αντιδράσεων. [71,72]



Σχήμα 1: Απεικόνιση του εντερικού βλεννογόνου και της φυσιολογίας του εντερικού φραγμού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΕΝΔΟΤΟΞΙΝΑΙΜΙΑ

Η ενδοτοξίνη, ή λιποπολυσακχαρίτης (LPS), αποτελεί αέριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των gram (-) βακτηρίων. Η απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος επάγει την έκφραση διαφόρων κυτταροκινών, η οποία μπορεί να είναι ευεργετική για την άμυνα του οργανισμού όταν συμβαίνει κατά έναν ελεγχόμενο τρόπο. Πολλές φορές όμως συμβαίνει υπέρμετρη ενεργοποίηση της ίδιας αλληλουχίας γεγονότων από την ενδοτοξίνη, με αποτέλεσμα εξαιρετικά δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό όπως υπόταση, πολυοργανική ανεπάρκεια, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και σηπτικό shock.

#### **Η βιοχημική δομή της ενδοτοξίνης.**

Η ενδοτοξίνη, επίσης γνωστή ως λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide - LPS), είναι ένα κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το λιπίδιο A, έναν πυρήνα ολιγοσακχαρίτη και έναν πολυσακχαρίτη O-αντιγόνου. [73]

Το λιπίδιο A είναι η υδρόφοβη άγκυρα του LPS, η οποία αγκυρώνει το μόριο στην βακτηριακή εξωτερική μεμβράνη. Αποτελείται από έναν δισακχαρίτη φωσφορυλιωμένης γλυκοζαμίνης με συνδεδεμένες πολλαπλές αλυσίδες λιπαρών οξέων, η οποία ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό είδος. Ο αριθμός και το μήκος των αλυσίδων λιπαρών οξέων μπορεί να επηρεάσει την τοξικότητα του μορίου. [74]

Η περιοχή του πυρήνα ολιγοσακχαρίτη συνδέει το λιπίδιο A με τον πολυσακχαρίτη O-αντιγόνου. Περιέχει πολλά υπολείμματα σακχάρου, συμπεριλαμβανομένης της επτόζης, της γλυκόζης και του 2-κετο-3-δεοξυοκτονικού (KDO), τα οποία διατηρούνται μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Η

περιοχή του πυρήνα ολιγοσακχαρίτη μπορεί επίσης να ποικίλλει σε δομή και σύνθεση, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ανοσολογική απόκριση. [75]

Ο πολυσακχαρίτης Ο-αντιγόνου είναι το πιο εξωτερικό μέρος του LPS και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες υπολειμμάτων σακχάρου, τα οποία μπορεί να ποικίλλουν σε δομή και μήκος μεταξύ των διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Το Ο-αντιγόνο είναι βασικός καθοριστικός παράγοντας του βακτηριακού ορότυπου και μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανοσολογική απόκριση. [76]

Η ενδοτοξίνη μπορεί να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα δεσμεύοντας τον υποδοχέα τύπου Toll 4 (Toll-like receptor 4 - TLR4) στα ανοσοκύτταρα, πυροδοτώντας έναν καταρράκτη σηματοδότησης που οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών. Αυτή η απόκριση μπορεί να είναι προστατευτική σε περίπτωση βακτηριακής λοίμωξης, αλλά μπορεί επίσης να συμβάλει στην παθογένεση φλεγμονωδών ασθενειών όπως η σήψη. [77]

### **Η βιολογική δραστηριότητα της ενδοτοξίνης.**

Οι ενδοτοξίνες είναι γνωστό ότι έχουν μια σειρά βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να ενεργοποιούν κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Ένας από τους κύριους υποδοχείς για την ενδοτοξίνη είναι ο υποδοχέας 4 (TLR4), ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των ανοσοκυττάρων καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του TLR4 από την ενδοτοξίνη οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι TNF-άλφα, IL-1 βήτα και IL-6, καθώς και χημειοκινών και άλλων ανοσομεσολαβητών. Αυτά τα μόρια εμπλέκονται στη στρατολόγηση πρόσθετων ανοσοκυττάρων στο σημείο της μόλυνσης ή του τραυματισμού και στην προώθηση της ενεργοποίησης και της λειτουργίας τους. [77]

Οι ενδοτοξίνες έχει επίσης αποδειχθεί ότι διαταράσσουν την ακεραιότητα του εντερικού επιθηλιακού φραγμού, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα και την πιθανότητα διαρροής επιβλαβών ουσιών στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό συμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών της ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και των μονοπατιών πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β (NF-κΒ). [78,79] Αυτό μπορεί να προκαλέσει συστηματική φλεγμονή και να συμβάλει στην

ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η σήψη και οι μεταβολικές διαταραχές. [80]

Επιπλέον, η ενδοτοξίνη έχει εμπλακεί στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, καθώς μπορεί να προάγει την ανάπτυξη αφρωδών κυττάρων και να συμβάλλει στο σχηματισμό πλάκων στο αρτηριακό τοίχωμα.[81] Η παρουσία ενδοτοξίνης στην κυκλοφορία έχει επίσης συσχετιστεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2. [82] Επίσης, μπορούν να προκαλέσουν ηπατική βλάβη προκαλώντας την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και ενεργοποιώντας τα ηπατικά αστερικά κύτταρα [83]. Μπορούν επίσης να προκαλέσουν τραυματισμό των πνευμόνων προκαλώντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών. [84]

**Πίνακας Β: Επίδραση της ενδοτοξίνης σε διάφορα κύτταρα Κυτταρικός τύπος Επίδραση LPS (συνοπτικά)**

Μονοκύτταρα / μακροφάγα	<p>Παραγωγή κυτταροκινών (IL-1, -6, -8, TNF-α) Παραγωγή αυξητικών παραγόντων Φαγοκυττάρωση</p> <p>Παραγωγή <math>O_2^{\cdot-}</math></p> <p>Παραγωγή παραγόντων πήξεως (ιστικός παράγων, παράγων XII)</p>
Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα	<p>Παραγωγή ενζύμων, λιπιδίων, ορμονών</p> <p>Ενεργοποίηση παραγωγής formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)</p>
Ενδοθηλιακά κύτταρα	<p>Παραγωγή κυτταροκινών (IL-1, RA)</p> <p>Έκφραση μορίων προσκόλλησης (ICAM, VCAM)</p>
Ινοβλάστες	<p>Παραγωγή κυτταροκινών (IL-8)</p> <p>Παραγωγή κυτταροκινών (IL-1)</p>
B-κύτταρα	<p>Παραγωγή IgG επιφανείας</p>

**Αλληλουχία γεγονότων στην αιματική κυκλοφορία.**

Όταν οι ενδοτοξίνες απελευθερώνονται από τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα, μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά γεγονότων στην κυκλοφορία του αίματος που μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική φλεγμονή και δυσλειτουργία οργάνων.

Το πρώτο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι η αναγνώριση των ενδοτοξινών από τους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors - PRRs) στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα μονοκύτταρα και τα

μακροφάγα. Ένα από τους πιο σημαντικούς PRR για την αναγνώριση ενδοτοξίνης είναι ο υποδοχέας 4 (Toll-like receptor - TLR4).[85]

Μόλις οι ενδοτοξίνες αναγνωριστούν από τα PRRs, πυροδοτούν την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β), από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. [86] Αυτές οι κυτοκίνες μπορούν στη συνέχεια να διεγείρουν την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το αμυλοειδές A του ορού (SAA), από το ήπαρ.[87]

Οι ενδοτοξίνες μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν το σύστημα του συμπληρώματος, το οποίο είναι μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που βοηθά στην απομάκρυνση των παθογόνων από την κυκλοφορία του αίματος. Η ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλέγματος επίθεσης μεμβράνης (Membrane attack complex - MAC), το οποίο μπορεί να καταστρέψει τα βακτηριακά κύτταρα και να προκαλέσει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών. [88]

Καθώς οι ενδοτοξίνες συνεχίζουν να κυκλοφορούν στην κυκλοφορία του αίματος, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τα αιμοφόρα αγγεία, οδηγώντας σε ανοδική ρύθμιση των μορίων προσκόλλησης και στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού στο σημείο της μόλυνσης ή τραυματισμού ιστού. [89] Αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (SIRS), το οποίο χαρακτηρίζεται από πυρετό, λευκοκυττάρωση και αλλαγές στην αγγειακή διαπερατότητα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η συστηματική απελευθέρωση ενδοτοξινών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σήψης, η οποία είναι μια απειλητική για τη ζωή κατάσταση που εμφανίζεται όταν η απόκριση του σώματος στη μόλυνση προκαλεί βλάβη στους ιστούς και τα όργανα του. Η σήψη μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία και ανεπάρκεια οργάνων και είναι μια κύρια αιτία θνησιμότητας σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. [90]



## **Δεσμευτική πρωτεΐνη της λιποπολυσακχαρίδης (LBP)**

Η δεσμευτική πρωτεΐνη της λιποπολυσακχαρίδης (LBP) είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης που παίζει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση στα Gram-αρνητικά βακτήρια διευκολύνοντας την αναγνώριση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), επίσης γνωστή ως ενδοτοξίνη, από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η LBP συντίθεται κυρίως σε ηπατοκύτταρα και εκκρίνεται στην κυκλοφορία, όπου δεσμεύεται με LPS με υψηλή συγγένεια και την παραδίδει στο CD14 και στον υποδοχέα τύπου toll 4 (TLR4) σε κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Αυτή η διαδικασία δέσμευσης και χορήγησης ενισχύει την ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων και προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας άλφα νέκρωσης όγκου (TNF-α). [91]

Η LBP έχει επίσης εμπλακεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα LBP έχουν παρατηρηθεί στη σήψη, μια δυνητικά απειλητική για τη ζωή κατάσταση που χαρακτηρίζεται από συστηματική φλεγμονή και δυσλειτουργία οργάνων που προκαλείται από μόλυνση. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα LBP είναι αυξημένα σε ασθενείς με σήψη και σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα. [92,93] Επιπλέον, η LBP έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, μιας χρόνιας φλεγμονώδους νόσου των αρτηριών που αποτελεί κύρια αιτία καρδιαγγειακών παθήσεων. [94]

## **CD14: Υποδοχέας της ενδοτοξίνης**

Το CD14 είναι μια πρωτεΐνη αγκυρωμένη με γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη που χρησιμεύει ως βασικός υποδοχέας στην αναγνώριση και δέσμευση ενδοτοξινών, γνωστών και ως λιποπολυσακχαρίτες (LPS). [95] Διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην έναρξη της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης κατά των βακτηριακών λοιμώξεων. Το CD14 εκφράζεται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού,

συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων.[96]

Η κύρια λειτουργία του CD14 είναι να διευκολύνει τη σύνδεση των ενδοτοξινών στον υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4), έναν άλλο σημαντικό υποδοχέα που εμπλέκεται στην αναγνώριση της ενδοτοξίνης. Το CD14 δρα ως συν-υποδοχέας για το TLR4, ενισχύοντας τη δέσμευση των ενδοτοξινών στο TLR4 και εκκινώντας συμβάντα σηματοδότησης στο υπόλοιπο μονοπάτι. Η δέσμευση των ενδοτοξινών στο CD14 προάγει τη μεταφορά τους στο TLR4, επιτρέποντας την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης. [96]

Εκτός από το ρόλο του στην αναγνώριση της ενδοτοξίνης, το CD14 εμπλέκεται επίσης στην κάθαρση των ενδοτοξινών από την κυκλοφορία. Το διαλυτό CD14 (sCD14), μια παραλλαγή του CD14 που δεν έχει την άγκυρα γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλης, υπάρχει στον ορό και μπορεί να συνδεθεί με τις κυκλοφορούσες ενδοτοξίνες [97]. Αυτή η αλληλεπίδραση βοηθά στην εξουδετέρωση των επιδράσεων των ενδοτοξινών και βοηθά στην απομάκρυνσή τους από το σώμα.[98]

Το CD14 έχει μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο του στην άμυνα του ξενιστή έναντι βακτηριακών λοιμώξεων. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CD14 έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία σε σοβαρές λοιμώξεις[98]. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης CD14 έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη και εξέλιξη φλεγμονωδών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της σήψης και της αθηροσκλήρωσης

### **Κυτταρική αντίδραση στην ενδοτοξίνη.**

Οι ενδοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίου του αζώτου (NO), καθώς και την ενεργοποίηση συστημάτων πήξης και συμπληρώματος.[99,100] Αυτές οι αποκρίσεις ξεκινούν με τη σύνδεση ενδοτοξινών στον υποδοχέα τύπου Toll 4

(TLR4) στην επιφάνεια των ανοσοκυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα.[101] Η ενεργοποίηση του TLR4 οδηγεί στη στρατολόγηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών προσαρμογής, όπως η primary myeloid differentiation response 88 (MyD88) και η πρωτεΐνη Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein-(TIRAP), και η ακολούθως ενεργοποίηση των υπολοίπων οδών σηματοδότησης, όπως το μιτογόνο - μονοπάτια ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και nuclear factor-κB (NF-κB).[102,103]

Η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας άλφα νέκρωσης όγκου (TNF-α), η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), είναι μια βασική κυτταρική απόκριση στις ενδοτοξίνες.[104] Αυτές οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση των ανοσοκυττάρων στο σημείο της μόλυνσης, καθώς και στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων.[105] Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική φλεγμονή, βλάβη ιστού και δυσλειτουργία οργάνων, τα οποία είναι χαρακτηριστικά της σήψης και του σηπτικού σοκ.[106]

Οι ενδοτοξίνες μπορούν επίσης να προκαλέσουν την παραγωγή ROS και NO, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης και της ομοιόστασης.[107] Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ROS και NO μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και βλάβη των ιστών.[108] Επιπλέον, η επαγόμενη από την ενδοτοξίνη ενεργοποίηση των συστημάτων πήξης και συμπληρώματος μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη θρόμβωσης και δυσλειτουργίας οργάνων στη σήψη.  
[109]

### **Αλληλουχία γεγονότων στο σηπτικό σοκ από gram (-) μικρόβια.**

Το σηπτικό σοκ είναι μια απειλητική για τη ζωή κατάσταση που χαρακτηρίζεται από συστηματική φλεγμονώδη απόκριση σε λοίμωξη, που συχνά προκαλείται από gram-αρνητικά μικρόβια. Η αλληλουχία των γεγονότων που οδηγεί σε σηπτικό σοκ περιλαμβάνει διάφορες αλληλένδετες διαδικασίες που συμβάλλουν στη σοβαρότητα της κατάστασης.

α.Αναγνώριση και δέσμευση ενδοτοξινών: Τα Gram-αρνητικά βακτήρια απελευθερώνουν λιποπολυσακχαρίτες (LPS), γνωστούς επίσης ως ενδοτοξίνες, οι οποίοι δρουν ως ισχυροί πυροδοτητές της ανοσολογικής απόκρισης. Οι LPS αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4) στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των περαιτέρω οδών σηματοδότησης[110]. Η δέσμευση των ενδοτοξινών με τον TLR4 ξεκινά την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β) και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής.

β.Συστημική φλεγμονώδης απόκριση: Η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών οδηγεί σε συστηματική φλεγμονώδη απόκριση που χαρακτηρίζεται από αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και στρατολόγηση ανοσοκυττάρων στο σημείο της μόλυνσης.[111] Αυτή η ανοσολογική απόκριση προορίζεται για την εξάλειψη των παθογόνων που εισβάλλουν. Ωστόσο, στο σηπτικό σοκ, εμφανίζεται μια υπερβολική και απορυθμισμένη ανοσολογική απόκριση, με αποτέλεσμα εκτεταμένη φλεγμονή και βλάβη των ιστών.

γ.Ενεργοποίηση καταρράκτη πήξης: Οι Gram-αρνητικές ενδοτοξίνες μπορούν επίσης να πυροδοτήσουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης, οδηγώντας σε διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (DIC). Το σύστημα πήξης γίνεται υπερδραστήριο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικροθρόμβων σε μικρά αιμοφόρα αγγεία και την κατανάλωση παραγόντων πήξης, που οδηγεί σε αιμορραγικές επιπλοκές και δυσλειτουργία οργάνων[112].

δ.Υπόταση και δυσλειτουργία οργάνων: Ο συνδυασμός συστηματικής φλεγμονής, αγγειακών αλλαγών και ανωμαλιών πήξης οδηγεί σε υπόταση, μειωμένη αιμάτωση ιστών και δυσλειτουργία οργάνων. Το καρδιαγγειακό σύστημα ανταποκρίνεται στη φλεγμονή και στη μειωμένη αρτηριακή πίεση αυξάνοντας τον καρδιακό ρυθμό και την καρδιακή παροχή, αλλά τελικά οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί κατακλύζονται, οδηγώντας σε υπόταση και ανεπαρκή οξυγόνωση των ιστών.

ε.Πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια: Σε σοβαρές περιπτώσεις σηπτικής καταπληξίας, μπορεί να εμφανιστεί πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια λόγω της παρατεταμένης συστηματικής φλεγμονής, της μειωμένης αιμάτωσης των ιστών και των άμεσων επιδράσεων των ενδοτοξινών σε διάφορα όργανα. Τα όργανα που επηρεάζονται συνήθως περιλαμβάνουν τους πνεύμονες, το συκώτι, τα νεφρά και την καρδιά. Η δυσλειτουργία αυτών των ζωτικών οργάνων επιδεινώνει περαιτέρω τη σοβαρότητα του σηπτικού σοκ και συμβάλλει σε κακή έκβαση των ασθενών[113].

Η κατανόηση της αλληλουχίας των γεγονότων στο σηπτικό σοκ από gram-αρνητικά μικρόβια είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών. Η στόχευση των βασικών βημάτων, όπως η παρεμπόδιση της αναγνώρισης των ενδοτοξινών ή η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, μπορεί να υπόσχεται τη βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών σε σηπτικό σοκ.

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.**

#### **ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΟΥ ΙΚΤΕΡΟΥ ΣΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ**

Ο αποφρακτικός ίκτερος, που χαρακτηρίζεται από την απόφραξη της ροής της χολής, ασκεί επιζήμια αποτελέσματα σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του εντερικού επιθηλίου.[114]

Οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί με τους οποίους ο αποφρακτικός ίκτερος οδηγεί σε βλάβη στο εντερικό επιθήλιο είναι πολυπαραγοντικοί και περιλαμβάνουν διάφορες οδούς.

Ένας από τους βασικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην επιθηλιακή βλάβη στον αποφρακτικό ίκτερο είναι το οξειδωτικό στρες. Η απόφραξη της ροής της χολής έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση χολερυθρίνης και χολικών οξέων, η οποία μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και επακόλουθο οξειδωτικό στρες.[115] Αυτό το οξειδωτικό στρες διαταράσσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας κυτταρική βλάβη και δυσλειτουργία.

Επιπλέον, η τροποποιημένη σύνθεση χολικού οξέος στον αποφρακτικό ίκτερο μπορεί να έχει άμεσες τοξικές επιδράσεις στο εντερικό επιθήλιο. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα υδρόφοβων χολικών οξέων, όπως το λιθοχολικό οξύ, μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση και να διαταράξουν την ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού.[116]

Επιπλέον, η απόφραξη της ροής της χολής στον αποφρακτικό ίκτερο μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριακή υπερανάπτυξη και μετατόπιση βακτηρίων και ενδοτοξινών από τον αυλό του εντέρου στον εντερικό βλεννογόνο. Αυτή η μικροβιακή ανισορροπία και η επακόλουθη ανοσολογική απόκριση μπορεί να συμβάλει σε φλεγμονή και τραυματισμό στο εντερικό επιθήλιο.[117]

#### 1. Διαταραχή λιπιδίων:

Το οξειδωτικό στρες πυροδοτεί την υπεροξείδωση των λιπιδίων, μια αλυσιδωτή αντίδραση που καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες[118]. Τα προϊόντα υπεροξείδωσης λιπιδίων μπορεί να διακυβεύουν τη δομική ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών εντός του εντερικού επιθηλίου[119]. Αυτή η διαταραχή όχι μόνο μεταβάλλει τη ρευστότητα των μεμβρανών αλλά παρεμποδίζει επίσης την επιλεκτική διαπερατότητά τους, επιτρέποντας ενδεχομένως τη διέλευση ανεπιθύμητων ουσιών.

#### 2. Τροποποίηση πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες εντός του εντερικού επιθηλίου δεν είναι άνοσες στις επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες. Η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε δομικές αλλοιώσεις και λειτουργικές βλάβες[120]. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταγωγής σήματος, της μεταφοράς και των ενζυματικών

δραστηριοτήτων[121]. Κατά συνέπεια, η δυσλειτουργία των πρωτεϊνών μπορεί να συμβάλει σε έναν καταρράκτη κυτταρικών διαταραχών εντός του εντερικού επιθηλίου.

### 3. Βλάβη DNA:

Η βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες επεκτείνεται στο γενετικό σχέδιο των κυττάρων, το DNA[122]. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μπορούν να προκαλέσουν διάφορες μορφές βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένων των θραύσεων των κλώνων, των τροποποιήσεων της βάσης και του σχηματισμού διασταυρώσεων DNA-πρωτεΐνης[123]. Τέτοιες βλάβες στο DNA μπορούν να εμποδίσουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA, οδηγώντας δυνητικά σε γονιδιωματική αστάθεια και κυτταρική δυσλειτουργία[124].

### 4. Διαταραχή του εντερικού φραγμού:

Μία από τις πιο κρίσιμες λειτουργίες του εντερικού επιθηλίου είναι η διατήρηση ενός επιλεκτικού φραγμού που ρυθμίζει τη διέλευση των μορίων μεταξύ του αυλού του εντέρου και της κυκλοφορίας του αίματος[125]. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να διαταράξει την ακεραιότητα αυτού του φραγμού επηρεάζοντας τις αποφρακτικές συνδέσεις, εξειδικευμένες δομές πρωτεΐνης που σφραγίζουν τα κενά μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων[126]. Οι δυσλειτουργικές αποφρακτικές συνδέσεις μπορούν να αυξήσουν την παρακυτταρική διαπερατότητα, επιτρέποντας τη μετατόπιση παθογόνων, τοξινών και άλλων επιβλαβών ουσιών από τον αυλό του εντέρου στη συστηματική κυκλοφορία[127]. Αυτή η παραβίαση του εντερικού φραγμού μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή, ανοσολογικές αποκρίσεις και να συμβάλει στην παθογένεση διαφόρων γαστρεντερικών διαταραχών[128].

## **Βακτηριακή μετακίνηση και οι επιπτώσεις της.**

Η βακτηριακή μετακίνηση, ένα φαινόμενο όπου ζωντανά βακτήρια ή τα προϊόντα τους μετακινούνται από τον εντερικό αυλό στη συστηματική κυκλοφορία και σε απομακρυσμένα όργανα, έχει αναδειχθεί ως σημαντική ανησυχία στο πλαίσιο της συνολικής ομοιόστασης του οργανισμού[129]. Αυτό το φαινόμενο αμφισβητεί την παραδοσιακή αντίληψη του γαστρεντερικού σωλήνα ως ασφαλούς φραγμού μεταξύ του σώματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Η βακτηριακή μετατόπιση μπορεί να έχει βαθιές επιπτώσεις στην υγεία και τις ασθένειες, απαιτώντας μια πιο προσεκτική εξέταση των μηχανισμών της, των παραγόντων που συμβάλλουν και των συναφών καταστάσεων.

### 1. Ορισμός της μετατόπισης βακτηρίων:

Η βακτηριακή μετακίνηση υποδηλώνει τη διέλευση βακτηρίων ή συστατικών τους (π.χ. ενδοτοξίνες) από τον αυλό του εντέρου μέσω του εντερικού επιθηλίου στην κυκλοφορία του αίματος ή σε εξωεντερικές θέσεις[130]. Υπό κανονικές συνθήκες, το έντερο χρησιμεύει ως επιλεκτικός φραγμός, αποτρέποντας τη συστηματική διάδοση δυνητικά επιβλαβών μικροβίων. Ωστόσο, όταν αυτό το φράγμα διακυβεύεται, μπορεί να συμβεί βακτηριακή μετακίνηση, διευκολύνοντας τη διείσδυση μικροβίων ή μικροβιακών προϊόντων στη συστηματική κυκλοφορία[131].

## 2. Παράγοντες που συμβάλλουν:

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στη βακτηριακή μετατόπιση, με την ακεραιότητα του εντερικού επιθηλιακού φραγμού να παίζει κεντρικό ρόλο[132]. Οι βασικοί παράγοντες περιλαμβάνουν:

- **Δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού:** Η διαταραχή των αποφρακτικών συνδέσεων, που σφραγίζουν τα κενά μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, μπορεί να αυξήσει την παρακυτταρική διαπερατότητα, επιτρέποντας στα βακτήρια να παραβιάσουν το φράγμα[133].
- **Αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου:** Η ανισορροπία στη μικροβιακή κοινότητα του εντέρου, μπορεί να δημιουργήσει ένα περιβάλλον που ευνοεί την υπερανάπτυξη και τη μετατόπιση του παθογόνου [134].
- **Καταστολή του ανοσοποιητικού:** Καταστάσεις ή θεραπείες που αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως ανοσοκατασταλτικά φάρμακα ή κρίσιμες ασθένειες, μπορούν να βλάψουν την ικανότητα του σώματος να ελέγχει τη μικροβιακή μετακίνηση[135].

## 3. Συνέπειες και συναφείς συνθήκες:

Η βακτηριακή μετατόπιση δεν είναι απλώς μια θεωρητική έννοια. έχει συγκεκριμένες κλινικές επιπτώσεις. Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό σε διάφορες ασθένειες και καταστάσεις, όπως:

**Σήψη:** Η βακτηριακή μετατόπιση μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της σήψης, μιας απειλητικής για τη ζωή κατάστασης που χαρακτηρίζεται από συστηματική φλεγμονή και δυσλειτουργία οργάνων[136].

**Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD):** Οι ασθενείς με IBD, όπως η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο βακτηριακής μετατόπισης λόγω χρόνιας εντερικής φλεγμονής και επιθηλιακής βλάβης[137].

**Κίρρωση:** Σε άτομα με προχωρημένη κίρρωση του ήπατος, αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου και αυξημένη εντερική διαπερατότητα μπορεί να οδηγήσουν σε βακτηριακή μετατόπιση, συμβάλλοντας σε επιπλοκές όπως η αυθόρμητη βακτηριακή περιτονίτιδα[138].



Τραύμα και χειρουργική επέμβαση: Οι χειρουργικές επεμβάσεις, ειδικά αυτές που αφορούν τη γαστρεντερική οδό, μπορούν να διαταράξουν τον εντερικό φραγμό και να διευκολύνουν τη βακτηριακή μετατόπιση, οδηγώντας δυνητικά σε μετεγχειρητικές επιπλοκές.

### **Σύνδεση οξειδωτικού στρες και βακτηριακή μετακίνησης.**

Αρκετές μελέτες έχουν παράσχει σημαντικά στοιχεία για τη συσχέτιση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της αυξημένης ευαισθησίας στη βακτηριακή μετακίνηση[139,140]. Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού να τα εξουδετερώνει. Αυτή η ανισορροπία μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική βλάβη σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εντερικού επιθηλίου.

Το εντερικό επιθήλιο χρησιμεύει ως κρίσιμος φραγμός που κανονικά αποτρέπει τη μεταφορά επιβλαβών βακτηρίων και των προϊόντων τους στη συστηματική κυκλοφορία[141]. Ωστόσο, η βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στον επιθηλιακό φραγμό μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ακεραιότητά του, καθιστώντας τον πιο διαπερατό στη διέλευση των βακτηρίων. Μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να διαταράξει τις αποφρακτικές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων[142]. Αυτές οι αποφρακτικές συνδέσεις παίζουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της επιλεκτικής διαπερατότητας του εντερικού φραγμού.

Αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν πώς το οξειδωτικό στρες αποδυναμώνει τον επιθηλιακό φραγμό. Πρώτον, το ROS μπορεί να βλάψει άμεσα τις δομικές πρωτεΐνες των αποφρακτικών συνδέσεων, όπως η occludin και οι claudins[143]. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις, οδηγώντας στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών που διαταράσσουν περαιτέρω την ακεραιότητα του επιθηλίου[144]. Επιπλέον, η υπεροξειδωση των λιπιδίων που προκαλείται από το ROS μπορεί να αλλάξει τη σύνθεση και τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζοντας δυνητικά τη σταθερότητα των επιθηλιακών κυττάρων[145].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.**

### **ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής αντιδραστικών ειδών ριζών οξυγόνου (ROS) και της ικανότητας του σώματος να τα αποτοξινώσει ή να επιδιορθώσει την προκύπτουσα βλάβη. Τα ROS, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι ρίζες υδροξυλίου, είναι φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σηματοδότηση των κυττάρων και την άμυνα έναντι των παθογόνων. Ωστόσο, όταν η παραγωγή ROS υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του σώματος, μπορεί να προκαλέσουν βλάβη σε κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA.

Αυτή η οξειδωτική βλάβη έχει εμπλακεί σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών διαταραχών, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του καρκίνου. Τα αντιοξειδωτικά συστήματα στο σώμα, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση και μορίων όπως η γλουταθειόνη, βοηθούν στον μετριασμό του οξειδωτικού στρες εξουδετερώνοντας τα ROS και επιδιορθώνοντας την κυτταρική βλάβη. Η κατανόηση του οξειδωτικού στρες και των επιπτώσεών του στην κυτταρική υγεία είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.[146,147]

## **Βιοχημεία και χαρακτηριστικά μεταβολικών οξυγόνου**

### Ανιόν υπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^-$ )

Το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) είναι ένα εξαιρετικά αντιδραστικό είδος οξυγόνου που παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση κυτταρικής οξειδοαναγωγής και στο οξειδωτικό στρες. Παράγεται ως υποπροϊόν του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνοής και των ενζυματικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν οξειδάσες NADPH και οξειδάση ξανθίνης.[148] Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τροχιά του ανιόντος υπεροξειδίου το καθιστά εξαιρετικά αντιδραστικό και ικανό να ξεκινήσει επιβλαβείς οξειδωτικές αντιδράσεις μέσα στο κύτταρο.

Η παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου συμβαίνει μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό  $O_2^-$ . Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από διάφορα ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των οξειδασών NADPH, οι οποίες αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής υπεροξειδίου στα φαγοκυτταρικά κύτταρα.[149] Επιπλέον, τα σύμπλοκα μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων I και III συμβάλλουν σημαντικά στη δημιουργία υπεροξειδίου εντός των μιτοχονδρίων.[150]

Το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί εύκολα να αντιδράσει με άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA, οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και δυσλειτουργία. Μία από τις κρίσιμες πτυχές της βιολογίας των ανιόντων υπεροξειδίου είναι η εμπλοκή του στη δημιουργία άλλων δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ρίζα υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ), μέσω ενζυματικών και αυθόρμητων αντιδράσεων μετάλλαξης.[151] Αυτά τα δευτερεύοντα ROS μπορούν περαιτέρω να συμβάλουν στο οξειδωτικό στρες και στην κυτταρική βλάβη.

Για την εξουδετέρωση των βλαβερών επιπτώσεων του ανιόντος υπεροξειδίου, τα κύτταρα διαθέτουν μια σειρά αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών. Τα ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλύουν

τη διάσπαση του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, περιορίζοντας την αντιδραστικότητα και πιθανή βλάβη.[152] Άλλα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών C και E, της γλουταθειόνης και των φλαβονοειδών, μπορούν να καθαρίσουν το ανιόν υπεροξειδίου και να μειώσουν τα επίπεδα του στο κύτταρο.[153]

Οι ανισορροπίες στην παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου και στα συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας μπορεί να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπερβολικά ROS και κυτταρική βλάβη. Η απορρύθμιση της παραγωγής ανιόντων υπεροξειδίου ή η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει εμπλακεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, των καρδιαγγειακών διαταραχών και του καρκίνου. [154]

#### Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) είναι ένα αντιδραστικό είδος οξυγόνου (ROS) που παίζει διπλό ρόλο στις κυτταρικές διεργασίες. Είναι ταυτόχρονα ένα τοξικό υποπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού και ένα σημαντικό μόριο σηματοδότησης που εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγεται στα κύτταρα μέσω της δράσης ενζύμων όπως οι οξειδάσες NADPH, η οξειδάση της ξανθίνης και οι υπεροξεισωμικές οξειδάσες, καθώς και από την αυθόρμητη μετάλλαξη του ανιόντος υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) μέσω της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide dismutase - SOD).[155,156]

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα χαμηλά επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ενεργούν ως μόριο σηματοδότησης που εμπλέκεται σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και οι ανοσολογικές αποκρίσεις.[157] Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα διαφόρων οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνικών κινασών, φωσφατάσης και παραγόντων μεταγραφής. Μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση.[158]

Ωστόσο, η υπερβολική ή ανεξέλεγκτη παραγωγή  $H_2O_2$  μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και βλάβη σε κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA.[159] Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία και να συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και τον καρκίνο.[160]

### Ρίζα υδροξυλίου ( $OH\cdot$ )

Η ρίζα υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ) είναι μια από τις πιο δραστικές και καταστροφικές ελεύθερες ρίζες σε βιολογικά συστήματα. Είναι εξαιρετικά αντιδραστικό λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου του, γεγονός που το καθιστά εξαιρετικά ασταθές και ικανό να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε διάφορα κυτταρικά συστατικά. Η  $OH\cdot$  σχηματίζεται μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ή της αντίδρασης Fenton, που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) με ιόντα μετάλλων μεταπτώσεως, όπως ο σίδηρος ( $Fe^{2+}$ ) ή ο χαλκός ( $Cu^+$ ).[159]

Μόλις δημιουργηθεί, η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να ξεκινήσει μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης λιπιδίων, που οδηγεί στην αποδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες.[161] Αυτή η διαδικασία δημιουργεί λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες, οι οποίες μπορούν να διαδώσουν περαιτέρω την οξειδωτική βλάβη. Το  $OH\cdot$  μπορεί επίσης να επιτεθεί απευθείας στο DNA, προκαλώντας σπασίματα του κλώνου του DNA και σχηματισμό προσθηκών στο DNA.[162] Τέτοιες βλάβες στο DNA μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και γονιδιωματική αστάθεια.

Επιπλέον, η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να οξειδώσει πρωτεΐνες, οδηγώντας σε κατακερματισμό τους, διασταυρούμενη σύνδεση και τροποποιήσεις υπολειμμάτων αμινοξέων. Αυτό μπορεί να βλάψει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, επηρεάζοντας τις κυτταρικές διεργασίες και τις οδούς σηματοδότησης.[163]

Λόγω της υψηλής αντιδραστικότητάς της, η ρίζα υδροξυλίου έχει μικρή διάρκεια ζωής και περιορισμένο εύρος διάχυσης. Κατά συνέπεια, δρα κυρίως σε κοντινή απόσταση από το σημείο παραγωγής της, προκαλώντας εντοπισμένη βλάβη εντός των κυττάρων και των ιστών.[164]

### Μονήρες οξυγόνο - Singlet Oxygen ( $^1O_2$ )

Το μονήρες οξυγόνο - singlet oxygen - ( $^1O_2$ ) είναι μια εξαιρετικά αντιδραστική και βραχύβια μορφή μοριακού οξυγόνου. Παράγεται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ευαισθητοποίηση μονήρους οξυγόνου, η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά ενέργειας από διεγερμένα μόρια στο οξυγόνο βασικής κατάστασης[165]. Το μονήρες οξυγόνο είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές και χημικές διεργασίες.

Στα βιολογικά συστήματα, το μονήρες οξυγόνο μπορεί να παραχθεί κατά τη φωτοσύνθεση, καθώς και παρουσία ορισμένων ενζύμων και μεταβολικών αντιδράσεων[166]. Μπορεί επίσης να δημιουργηθεί μέσω της αλληλεπίδρασης του φωτός με ενδογενείς ή εξωγενείς φωτοευαισθητοποιητές[167]. Μόλις σχηματιστεί, το μονήρες οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα ευρύ φάσμα βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων.

Η αντιδραστικότητα του απλού οξυγόνου προκύπτει από τη μοναδική ηλεκτρονική του διαμόρφωση. Έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του περίβλημα, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο στην αντίδραση με μόρια πλούσια σε ηλεκτρόνια[168]. Το μονήρες οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά συστατικά, οδηγώντας σε δυσλειτουργία των κυττάρων και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Το μονήρες οξυγόνο εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της γήρανσης, της φλεγμονής και των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες[169]. Μπορεί να προκαλέσει υπεροξειδωση λιπιδίων, οξειδωση πρωτεϊνών και βλάβη του DNA, που σχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και των νευροεκφυλιστικών καταστάσεων

### Δραστικοί μεταβολίτες του αζώτου

Οι αντιδραστικοί μεταβολίτες αζώτου (Reactive Nitrogen Metabolite - RNM) είναι μια ομάδα μορίων υψηλής αντίδρασης που περιλαμβάνουν μονοξείδιο του αζώτου (NO), υπεροξυνιτρώδη (ONOO-) και διοξείδιο του αζώτου (NO<sub>2</sub>).[170] Αυτά τα είδη δημιουργούνται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες και παίζουν

σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, τις ανοσολογικές αποκρίσεις και τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή.[171]

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα βασικό μόριο σηματοδότησης που εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η αγγειοδιαστολή, η νευροδιαβίβαση και η ανοσολογική ρύθμιση. Παράγεται από ένζυμα συνθάσης μονοξειδίου του αζώτου (NOS), τα οποία καταλύουν τη μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και NO. Το NO ασκεί τα αποτελέσματά του ενεργοποιώντας τη γουανυλική κυκλάση και αυξάνοντας τα επίπεδα κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP).[172]

Το υπεροξεινιτρώδες (ONOO-) είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ του NO και του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ). Μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Το ONOO- έχει εμπλακεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως φλεγμονές, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρδιαγγειακές διαταραχές.[173]

Το διοξειδίο του αζώτου (NO<sub>2</sub>) είναι ένα εξαιρετικά αντιδραστικό αέριο που μπορεί να δημιουργηθεί από την οξείδωση του NO παρουσία οξυγόνου. Μπορεί να αντιδράσει με διάφορα βιομόρια και να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. Η έκθεση σε υψηλά επίπεδα NO<sub>2</sub> σχετίζεται με συμπτώματα του αναπνευστικού και μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη αναπνευστικών παθήσεων, όπως το άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).[174]

Η μέτρηση και η ανίχνευση των αντιδραστικών μεταβολιτών του αζώτου είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση του ρόλου τους σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Διάφορες αναλυτικές τεχνικές, όπως η φασματοφωτομετρία, η φθοριομετρία και η φασματομετρία μάζας, χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ανάλυση των επιπέδων RNM σε βιολογικά δείγματα.[175]

### **Κυτταρικοί στόχοι των δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου**

Οι αντιδραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (Reactive Oxygen Metabolites - ROM) μπορούν να στοχεύσουν διάφορα κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών, των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των οργανιδίων. Οι ROM

μπορούν να προκαλέσουν υπεροξειδωση λιπιδίων, καταστροφή πρωτεϊνών, τροποποιήσεις του DNA και δυσλειτουργία των οργανιδίων του κυττάρου. Αυτές οι οξειδωτικές τροποποιήσεις μπορούν να διαταράξουν τις κυτταρικές διεργασίες, να βλάψουν την ενζυμική δραστηριότητα, να πυροδοτήσουν αντιδράσεις στο στρες και να συμβάλουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Οι βλάβες που προκαλούνται από το ROM στα βιομόρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και στην κυτταρική δυσλειτουργία.

### Μεμβρανικά λιπίδια

Οι αντιδραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (ROM) μπορούν να έχουν βαθιές επιδράσεις στα λιπίδια της μεμβράνης. Αυτά τα εξαιρετικά αντιδραστικά είδη μπορούν να προκαλέσουν υπεροξειδωση λιπιδίων, μια διαδικασία κατά την οποία οι ROM επιτίθενται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών.[176] Η υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίων λιπιδίων, τα οποία μπορούν περαιτέρω να αντιδράσουν με άλλα λιπίδια και πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα μια αλυσιδωτή αντίδραση οξειδωτικής βλάβης.

Τα αποτελέσματα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που προκαλείται από τους ROM στα λιπίδια της μεμβράνης είναι πολύπλευρα. Μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης, τη διαπερατότητα και τη μεταφορά ιόντων, θέτοντας σε κίνδυνο την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα της μεμβράνης.[177] Επιπλέον, προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων όπως η μηλονική διαλδεύδη (MDA) και η 4-υδροξυενεάλη (4-HNE) μπορούν να λειτουργήσουν ως μόρια σηματοδότησης και να ρυθμίσουν τις κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και του κυτταρικού θανάτου.[178]

Η διάσπαση των λιπιδίων της μεμβράνης από τους ROM έχει εμπλακεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, των καρδιαγγειακών παθήσεων και της γήρανσης.[179] Επιπλέον, η υπεροξειδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τους ROM μπορεί να προκαλέσει μια σειρά γεγονότων που επιδεινώνουν το οξειδωτικό στρες.[180]



## Πρωτεΐνες

Οι αντιδραστικοί μεταβολίτες οξειγόνου (ROM) μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στις κυτταρικές πρωτεΐνες. Αυτά τα εξαιρετικά αντιδραστικά είδη μπορούν να οξειδώσουν και να τροποποιήσουν τα υπολείμματα αμινοξέων στις πρωτεΐνες, οδηγώντας σε δομικές αλλαγές και λειτουργικές αλλοιώσεις.[181] Ένας από τους κύριους στόχους των ROM είναι τα υπολείμματα κυστεΐνης, τα οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση λόγω της υψηλής αντιδραστικότητάς τους. Η οξείδωση των υπολειμμάτων κυστεΐνης μπορεί να διαταράξει τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, να βλάψει την ενζυματική δραστηριότητα και να παρέμβει στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.[182]

Επιπλέον, οι ROM μπορούν να προκαλέσουν καρβονυλίωση πρωτεΐνης, μια διαδικασία κατά την οποία οι πρωτεΐνες τροποποιούνται με την προσθήκη καρβονυλικών ομάδων σε συγκεκριμένα υπολείμματα αμινοξέων, όπως η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη και η θρεονίνη.[183] Η καρβονυλίωση της πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της πρωτεϊνικής λειτουργίας, αυξημένη αποικοδόμηση πρωτεϊνών και σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωμάτων.[184]

Τα αποτελέσματα της οξείδωσης και της καρβονυλίωσης πρωτεϊνών που προκαλούνται από τους ROM είναι ποικίλα και μπορούν να επηρεάσουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να διαταράξουν τις οδούς σηματοδότησης, να αλλάξουν τις ενζυμικές δραστηριότητες, να επηρεάσουν την αναδίπλωση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών και να συμβάλουν στην ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.[185]

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα έχουν εξελίξει περίπλοκα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, για να εξουδετερώσουν τις επιβλαβείς επιδράσεις των ROM στις κυτταρικές πρωτεΐνες. Ωστόσο, υπό συνθήκες υπερβολικής παραγωγής ROS ή μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας, οι βλαβερές επιδράσεις των ROM στις πρωτεΐνες μπορεί να κατακλύσουν τους μηχανισμούς κυτταρικής επιδιόρθωσης και να συμβάλουν στην κυτταρική δυσλειτουργία και την εξέλιξη της νόσου.[186]

## DNA

Οι αντιδραστικοί μεταβολίτες οξυγόνου (ROM) μπορούν να ασκήσουν καταστροφικές επιδράσεις στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, οδηγώντας σε διάφορες κυτταρικές συνέπειες. Η εξαιρετικά αντιδραστική φύση των ROM μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικές τροποποιήσεις στο DNA, συμπεριλαμβανομένων τροποποιήσεων βάσης, θραύσεων κλώνων DNA και διασταυρώσεων DNA-πρωτεΐνης. [187]

Στο πυρηνικό DNA, οι τροποποιήσεις βάσης που προκαλούνται από το ROM, όπως η οξείδωση της γουανίνης σε 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνη (8-οχοG), μπορούν να οδηγήσουν σε αλλοιώσεις του DNA και να προάγουν τη γονιδιωματική αστάθεια. [188] Θραύσματα κλώνου DNA, τόσο μονόκλωνα όσο και δίκλωνα, μπορεί να συμβούν λόγω της άμεσης επίθεσης των ROM στα μόρια του DNA. [189] Αυτές οι αλλοιώσεις του DNA μπορούν να επηρεάσουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA, να θέσουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα του γονιδιώματος και να συμβάλουν στην ανάπτυξη μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. [190]

Ομοίως, οι ROM μπορούν να στοχεύσουν το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) και να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη. Το mtDNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες λόγω της στενής του γειτνίασης με τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ROM. [191] Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις στο mtDNA μπορούν να οδηγήσουν σε εξασθενημένη μιτοχονδριακή λειτουργία, μειωμένη παραγωγή ATP και αυξημένη παραγωγή ROS, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο οξειδωτικού στρες. [192]

Η συσσώρευση βλάβης του DNA που προκαλείται από τους ROM τόσο στο πυρηνικό όσο και στο mtDNA μπορεί να έχει επιζήμια αποτελέσματα στην κυτταρική ομοιόσταση και να συμβάλει στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και της γήρανσης. [193] Επιπλέον, οι εξασθενημένοι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA και η μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα μπορούν να επιδεινώσουν τον αντίκτυπο των ROM στην ακεραιότητα του DNA και στην κυτταρική υγεία. [194]

## **Αντιοξειδωτική άμυνα**

Είναι προφανές ότι μια μη ελεγχόμενη παραγωγή δραστικών μεταβολιτών οξειγόνου ή αζώτου και/ή διαταραχές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης επηρεάζουν ποικίλες παθοφυσιολογικές διεργασίες μέσω οξειδωσης και καταστροφής σημαντικών κυτταρικών δομών και μακρομορίων. Συνεπώς, προβάλλει επιτακτική η ανάγκη ύπαρξης αμυντικών αντιοξειδωτικών συστημάτων ώστε τα κύτταρα και οι ιστοί να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους. Γενικώς, υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών, οι μη-ενζυμικοί και οι ενζυμικοί.

### *Μη-ενζυματικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί*

Οι μη ενζυματικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν μια ποικιλία μικρών μορίων που καθαρίζουν και εξουδετερώνουν τα αντιδραστικά είδη οξειγόνου (ROS) και άλλα επιβλαβή οξειδωτικά στοιχεία.

Μια σημαντική ομάδα μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών αντιπροσωπεύεται από βιταμίνες, όπως η βιταμίνη E (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) και η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ). Η βιταμίνη E, όντας λιποδιαλυτή, δρα κυρίως εντός των κυτταρικών μεμβρανών, όπου δωρίζει ηλεκτρόνια στις λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες, διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσης των λιπιδίων.[195] Η βιταμίνη C, από την άλλη πλευρά, είναι υδατοδιαλυτή και λειτουργεί τόσο μέσα όσο και έξω από τα κύτταρα, καθαρίζοντας αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα ROS και αναγεννώντας τη βιταμίνη E.[196]

Ένα άλλο σημαντικό μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό είναι η γλουταθειόνη, ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από κυστεΐνη, γλουταμικό και γλυκίνη. Η γλουταθειόνη δρα ως ισχυρός αναγωγικός παράγοντας και αντιδρά άμεσα με τους ROS, προστατεύοντας τα κυτταρικά συστατικά από την οξειδωτική βλάβη. Παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης άλλων αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E.[197]

Οι πολυφαινόλες, οι οποίες είναι άφθονες στα φρούτα, τα λαχανικά και τα φυτικά τρόφιμα, είναι επίσης σημαντικά μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Αυτές οι ενώσεις

διαθέτουν ισχυρές ιδιότητες δέσμευσης ελεύθερων ριζών και μπορούν να χηλώσουν τα μεταλλικά ιόντα που προάγουν το οξειδωτικό στρες. Παραδείγματα πολυφαινόλων περιλαμβάνουν τη ρεσβερατρόλη, που βρίσκεται στα σταφύλια και το κόκκινο κρασί, και την κερσετίνη, άφθονη σε διάφορα φρούτα και λαχανικά.[198]

Εκτός από τις βιταμίνες, τη γλουταθειόνη και τις πολυφαινόλες, άλλα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν καροτενοειδή, όπως το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, που μπορούν να “σβήσουν” το οξυγόνο και άλλα είδη διεγερμένης κατάστασης, και το συνένζυμο Q10, το οποίο συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και δρα ως λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό.[199,200]

Αυτά τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν συνδυαστικά για να διατηρήσουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία και να προστατεύσουν από την οξειδωτική βλάβη. Η παρουσία και τα επαρκή επίπεδα τους είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική υγεία και την πρόληψη διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

### Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα ζωτικής σημασίας αντιοξειδωτικό μόριο που παίζει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα έναντι των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από τρία αμινοξέα: κυστεΐνη, γλουταμικό και γλυκίνη. Η γλουταθειόνη δρα ως ισχυρός αναγωγικός παράγοντας και συμμετέχει στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας εντός των κυττάρων.[201]

Μία από τις κύριες λειτουργίες της γλουταθειόνης είναι να καθαρίζει απευθείας τους ROS, συμπεριλαμβανομένων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), των ριζών υδροξυλίου (OH·) και των υπεροξειδίων των λιπιδίων. Η γλουταθειόνη αντιδρά με αυτά τα επιβλαβή οξειδωτικά, εξουδετερώνοντας τις βλαβερές επιδράσεις τους σε κυτταρικά συστατικά όπως το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.[202]

Επιπλέον, η γλουταθειόνη είναι ένας απαραίτητος συμπαράγοντας για πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στις διαδικασίες κυτταρικής αποτοξίνωσης. Συμμετέχει στην αποτοξίνωση ξενοβιοτικών και επιβλαβών ενώσεων μέσω των S-τρανσφερασών της

γλουταθειόνης (GSTs). Οι GST καταλύουν τη σύζευξη της γλουταθειόνης σε τοξικά μόρια, διευκολύνοντας την αποβολή τους από το κύτταρο.[203]

Επιπλέον, η γλουταθειόνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E. Μέσω ενζυματικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την αναγωγή της γλουταθειόνης, η γλουταθειόνη βοηθά στη διατήρηση των ενεργών μορφών αυτών των αντιοξειδωτικών, ενισχύοντας περαιτέρω το κυτταρικό σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας.[204]

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της γλουταθειόνης ρυθμίζεται αυστηρά και τα επίπεδά της μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και γενετικούς παράγοντες. Οι ανισορροπίες στα επίπεδα γλουταθειόνης έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, του καρκίνου και της γήρανσης.[205]

### Μεταλλοθειονίνες

Οι μεταλλοθειονεΐνες (MTs) είναι μια οικογένεια μικρών, πλούσιων σε κυστεΐνη πρωτεϊνών που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική άμυνα έναντι των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Αυτές οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από την υψηλή τους συγγένεια για τη δέσμευση ιόντων μετάλλων, όπως ο ψευδάργυρος και ο χαλκός, και την ικανότητά τους να καθαρίζουν τα ROS, ενεργώντας ως ισχυρά αντιοξειδωτικά.[206]

Μία από τις κύριες λειτουργίες των μεταλλοθειονεΐνων είναι η προστασία από το οξειδωτικό στρες ρυθμίζοντας την ομοιόσταση των μεταλλικών ιόντων μέσα στο κύτταρο. Με στενή σύνδεση με μεταλλικά ιόντα, οι μεταλλοθειονεΐνες εμποδίζουν τη συμμετοχή τους σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που δημιουργούν επιβλαβή ROS, όπως ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και ρίζα υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ).[207]

Επιπλέον, οι μεταλλοθειονεΐνες μπορούν να καθαρίσουν άμεσα τα ROS, συμπεριλαμβανομένων των ριζών υδροξυλίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω των ομάδων θειόλης τους (-SH). Τα υπολείμματα κυστεΐνης που υπάρχουν στις μεταλλοθειονεΐνες έχουν υψηλή αντιδραστικότητα προς τα ROS, εξουδετερώνοντας αποτελεσματικά αυτά τα επιβλαβή οξειδωτικά.[208]

Οι μεταλλοθειονεΐνες παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στην προστασία των κυτταρικών συστατικών, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, από οξειδωτική βλάβη. Μπορούν να δεσμεύουν και να δεσμεύουν τα ROS, αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή τους με αυτά τα βιομόρια και μειώνοντας τον κίνδυνο οξειδωτικών τροποποιήσεων.[209]

Επιπλέον, οι μεταλλοθειονεΐνες συμβάλλουν στη ρύθμιση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Συμμετέχουν στον έλεγχο των ενδοκυτταρικών επιπέδων αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη, και η αλληλεπίδρασή τους με μεταλλικά ιόντα επηρεάζει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης.[210]

Επιπλέον, οι μεταλλοθειονεΐνες εμπλέκονται στην ομοιόσταση των μεταλλικών ιόντων, χρησιμεύοντας ως ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση των κατάλληλων συγκεντρώσεων βασικών μετάλλων όπως ο ψευδάργυρος και ο χαλκός. Αυτά τα μέταλλα είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζουν κρίσιμο ρόλο στις διεργασίες οξειδοαναγωγής των κυττάρων.[211]

Η έκφραση των μεταλλοθειονεΐνων μπορεί να προκληθεί από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ROS, των βαρέων μετάλλων και των φλεγμονωδών κυτοκινών. Η ανοδική τους ρύθμιση ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες ενισχύει περαιτέρω την κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα και βοηθά στην εξουδετέρωση των καταστροφικών επιπτώσεων των ROS.[212]

### Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην άμυνα έναντι των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο. Αυτά τα ένζυμα βοηθούν στη διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής με το να καθαρίζουν και να

εξουδετερώνουν τα ROS, προστατεύοντας έτσι τα κυτταρικά συστατικά από την οξειδωτική βλάβη.

Μια σημαντική ομάδα αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι οι δισμουτάσες υπεροξειδίου (SODs).[213] Οι SOD καταλύουν τη μετατροπή του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ). Υπάρχουν τρεις κύριες ισομορφές των SOD: SOD χαλκού-ψευδάργυρου (Cu-Zn SOD), SOD μαγγανίου (Mn SOD) και εξωκυτταρικό SOD (EC SOD).[214] Κάθε ισομορφή εντοπίζεται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και συμβάλλει στην εξάλειψη των ριζών υπεροξειδίου που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών.

Ένα άλλο βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στην καταπολέμηση του ROS είναι η καταλάση.[215] Η καταλάση είναι υπεύθυνη για την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό ( $H_2O$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), αποτρέποντας τη συσσώρευση  $H_2O_2$  και τις πιθανές επιβλαβείς επιπτώσεις του. Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξισώματα, όπου παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτοξίνωση του  $H_2O_2$ .

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)[216] είναι ένα άλλο σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που παίζει ρόλο στην κυτταρική άμυνα έναντι των ROS. Το GPx χρησιμοποιεί γλουταθειόνη (GSH) ως συμπάρονο για να καταλύσει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους, αποτρέποντας την οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά συστατικά.

Εκτός από αυτά τα ένζυμα, το κύτταρο βασίζεται επίσης σε άλλα αντιοξειδωτικά συστήματα, όπως το σύστημα θειορεδοξίνης[217], το οποίο περιλαμβάνει ένζυμα όπως η αναγωγή της θειορεδοξίνης και οι υπεροξιδιοξειδίνες. Αυτά τα συστήματα συνεργάζονται για να διατηρήσουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία και να προστατεύσουν από το οξειδωτικό στρες.

Συνολικά, η παρουσία αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο να εξουδετερώνει τις βλαβερές συνέπειες των ROS και να διατηρήσει την κυτταρική ομοιόσταση.

## **Οξειδοαναγωγική ισορροπία**

Η οξειδοαναγωγική ισορροπία αναφέρεται στη λεπτή ισορροπία μεταξύ των αντιδράσεων οξείδωσης και αναγωγής μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα. Παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των μορίων, οδηγώντας στη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και στην παραγωγή αντιοξειδωτικής άμυνας.

Σε ένα υγιές κύτταρο, η παραγωγή και η αποβολή των ROS είναι ισορροπημένες, διασφαλίζοντας την ελαχιστοποίηση του οξειδωτικού στρες. Τα ROS, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ρίζα υδροξυλίου ( $OH\cdot$ ), είναι φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν σημαντικούς ρόλους στη σηματοδότηση και την κυτταρική λειτουργία. Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ROS ή η ανεπαρκής αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να διαταράξει την ισορροπία οξειδοαναγωγής και να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Μπορεί να προκύψει από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων, τοξινών, φλεγμονών και μεταβολικής απορρύθμισης. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να βλάψει τα κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία και στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών.

Για να διατηρήσουν την ισορροπία οξειδοαναγωγής, τα κύτταρα χρησιμοποιούν ένα πολύπλοκο δίκτυο αντιοξειδωτικών συστημάτων. Αυτά περιλαμβάνουν ενζυμικά αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία καθαρίζουν και εξουδετερώνουν τα ROS. Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες C και E, και διάφορα φυτοχημικά, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής παρέχοντας ισοδύναμα μείωσης ή άμεσα αντιδρώντας με το ROS.



Η ισορροπία οξειδοαναγωγής είναι κρίσιμη για την κυτταρική υγεία και παίζει ζωτικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σηματοδότησης, του μεταβολισμού και της ανοσολογικής απόκρισης. Οι ανισορροπίες στην οξειδοαναγωγική κατάσταση έχουν εμπλακεί σε πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και της γήρανσης. Η κατανόηση και η διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής είναι επομένως απαραίτητη για την πρόωση της κυτταρικής ανθεκτικότητας και της συνολικής ευημερίας.

### Το σύστημα της γλουταθειόνης

Το σύστημα γλουταθειόνης παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα. Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη και είναι ένα από τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στα κύτταρα. Λειτουργεί ως ρυθμιστικό οξειδοαναγωγής, διατηρώντας την κυτταρική ισορροπία οξειδοαναγωγής και προστατεύοντας από το οξειδωτικό στρες.[218]

Το βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση της γλουταθειόνης είναι η συνθετάση γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCS), η οποία καταλύει το σχηματισμό γ-γλουταμυλοκυστεΐνης. Ακολουθεί η προσθήκη γλυκίνης από συνθετάση γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή γλουταθειόνης.[219]

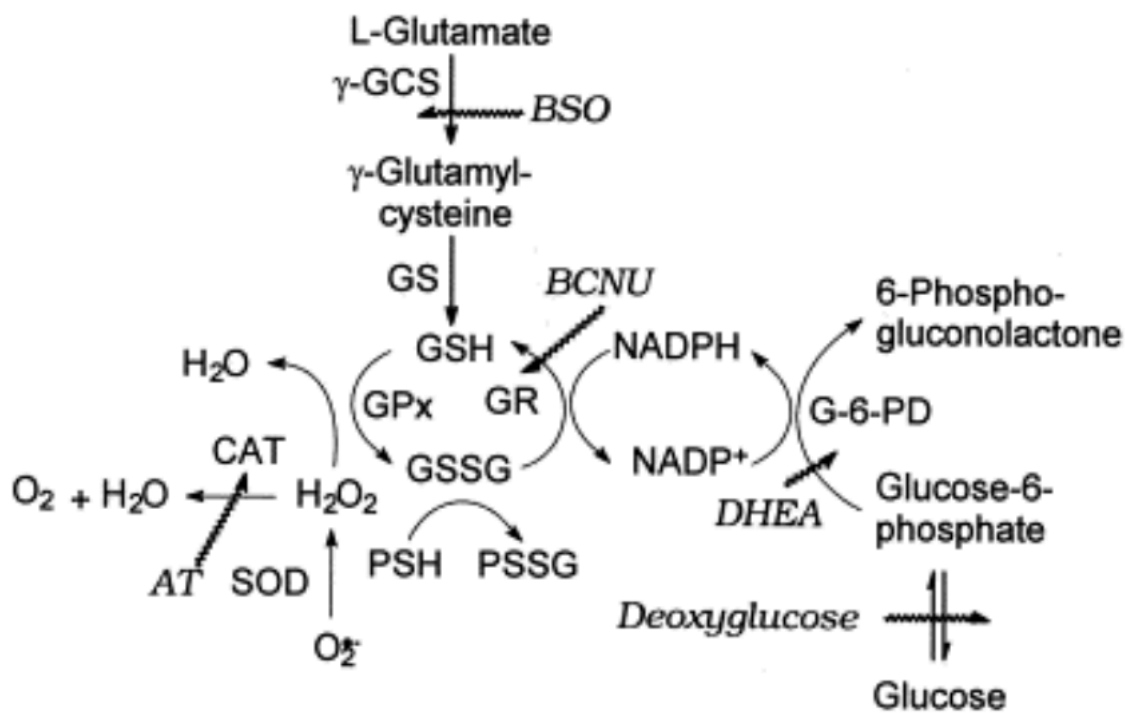
Η γλουταθειόνη δρα ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό καθαρίζοντας άμεσα τα ROS και τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) και χρησιμεύοντας ως συμπαράγοντας για πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η οποία χρησιμοποιεί την GSH για τη μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, μετατρέποντάς τα έτσι σε νερό και λιπιδικές αλκοόλες, αντίστοιχα.[220]

Ένα άλλο κρίσιμο ένζυμο που εμπλέκεται στη ρύθμιση του ROS είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οποία διατηρεί τη διαθεσιμότητα μειωμένης γλουταθειόνης (GSH). Το GR καταλύει τη μείωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) πίσω σε GSH, αναπληρώνοντας τη δεξαμενή της GSH και διατηρώντας την αντιοξειδωτική της δράση.[221]

Εκτός από τον άμεσο αντιοξειδωτικό της ρόλο, η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αποτοξίνωση επιβλαβών ενώσεων μέσω αντιδράσεων σύζευξης. Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη σύζευξη της GSH με ηλεκτροφιλικές ενώσεις, διευκολύνοντας την απέκκρισή τους από το κύτταρο.[222]

Το σύστημα γλουταθειόνης παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην ανακύκλωση άλλων αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) μπορεί να αναγεννηθεί από την οξειδωμένη μορφή της, το δεϋδροασκορβικό οξύ, μέσω της δράσης της GSH.[223] Αυτή η διαδικασία ανακύκλωσης βοηθά στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της βιταμίνης C στο κύτταρο.

**Σχήμα 2: Το σύστημα της γλουταθειόνης**



Το διάγραμμα δείχνει τις σχέσεις μεταξύ γλουταθειόνης και διάφορων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τα συστατικά με πλάγια γράμματα είναι αναστολείς του συστήματος (AT, BCNU, BSO, DHEA, δεοξυγλυκόζη).

Συντομογραφίες: AT= 3-amino- 1,2,4-triazole; BSNU= carmustine; BSO= L-buthionine-SR-sulfoximine; CAT= catalase; DHEA= dehydroepiandrosterone; G-6-PD= glucose-6-phosphate dehydrogenase; γ-GCS= γ-glutamylcystein synthetase; GS= glutathione synthetase; GPx= glutathione peroxidase; GR= glutathione reductase; SOD= superoxide dismutase.

### Πρωτεϊνικές σουλφυδρυλικές ομάδες και οξειδωαναγωγική ισορροπία

Οι πρωτεϊνικές σουλφυδρυλικές ομάδες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής εντός των κυττάρων. Αυτές οι ομάδες θειόλης (-SH), που προέρχονται κυρίως από υπολείμματα κυστεΐνης, είναι ιδιαίτερα αντιδραστικές και ευαίσθητες στην οξείδωση από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και άλλα ηλεκτροφιλικά μόρια.[224] Η κατάσταση οξειδοαναγωγής των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων είναι αυστηρά ρυθμισμένη και χρησιμεύει ως κρίσιμος δείκτης του κυτταρικού οξειδωτικού στρες.[225]

Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεϊνικές σουλφυδρυλικές ομάδες διατηρούνται σε μειωμένη κατάσταση μέσω της δράσης αντιοξειδωτικών συστημάτων όπως η γλουταθειόνη και η θειορεδοξίνη.[219] Αυτά τα συστήματα καθαρίζουν ενεργά τα ROS και διατηρούν τις σουλφυδρυλικές ομάδες στη μειωμένη τους μορφή. Η γλουταθειόνη, συγκεκριμένα, παίζει σημαντικό ρόλο ως ρυθμιστικό κυτταρικού οξειδοαναγωγικού διαλύματος αλληλεπιδρώντας άμεσα με πρωτεϊνικές σουλφυδρυλικές ομάδες και δωρίζοντας ηλεκτρόνια για να διατηρήσουν τη μειωμένη τους κατάσταση.[226]

Ωστόσο, σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες, όπως η έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες ή παθολογικές καταστάσεις, η ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας μπορεί να διαταραχθεί.[227] Η υπερβολική ποσότητα ROS μπορεί να κατακλύσει τα αντιοξειδωτικά συστήματα και να οδηγήσει σε οξείδωση πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (-S-S-), λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεΐνης και απώλεια της πρωτεϊνικής λειτουργίας.[228]

Η οξείδωση των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων μπορεί να έχει βαθιές επιπτώσεις στις κυτταρικές διεργασίες και στα μονοπάτια σηματοδότησης. Μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των ενζύμων, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα, επηρεάζοντας έτσι διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.[229]

Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών ομάδων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αντιδραστηρίων επισήμανσης ειδικών για τη θειόλη και φθορίζοντων ανιχνευτών που είναι ευαίσθητοι στην οξειδοαναγωγή.[230] Αυτές οι προσεγγίσεις επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό και την παρακολούθηση της οξείδωσης της πρωτεϊνικής θειόλης στα κύτταρα και παρέχουν πληροφορίες για την ισορροπία οξειδοαναγωγής και την κατάσταση του οξειδωτικού στρες.

Η κατανόηση της δυναμικής της ισορροπίας της πρωτεΐνης σουλφυδρυλικής οξειδοαναγωγής είναι απαραίτητη για την αποκάλυψη της περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της κυτταρικής λειτουργίας. Διερευνώντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλικών

ομάδων, οι ερευνητές μπορούν να αποκτήσουν γνώσεις για τους μηχανισμούς της νόσου, να αναπτύξουν θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν στη απορρύθμιση της οξειδοαναγωγής και να εξερευνήσουν πιθανούς βιοδείκτες καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.[231]

### **Οξειδοαναγωγική κατάσταση και μείζονα κυτταρικά γεγονότα**

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών συμβάντων. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυνών είναι απαραίτητη για τις κυτταρικές λειτουργίες και τις οδούς σηματοδότησης.[225]

Η κατάσταση οξειδοαναγωγής επηρεάζει σημαντικά κυτταρικά συμβάντα όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και οι ανοσολογικές αποκρίσεις.[232] Τα ROS, συμπεριλαμβανομένου του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και της ρίζας υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ), δρουν ως μόρια σηματοδότησης που ρυθμίζουν τις κυτταρικές διεργασίες οξειδώνοντας συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς στόχους.[233] Αυτή η οξειδωση μπορεί να οδηγήσει σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού αναστρέψιμου δισουλφιδικού δεσμού, σουλφενυλίωσης και S-γλουταθειονυλίωσης, οι οποίες μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών και την κυτταρική σηματοδότηση.[234]

Η σηματοδότηση οξειδοαναγωγής επηρεάζει επίσης τη γονιδιακή έκφραση και τη μεταγραφική ρύθμιση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο πυρηνικός παράγοντας-κάπα Β (NF-κΒ), η πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1 (AP-1) και ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντα-1 (HIF-1) είναι ευαίσθητοι στην οξειδοαναγωγική κατάσταση και μπορούν να ενεργοποιηθούν ή να ανασταλούν από ROS.[235] Επιπλέον, οι ευαίσθητες στην οξειδοαναγωγή μονοπάτια σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιημένων από μιτογόνο πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs) και της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K)/πρωτεϊνικής κινάσης Β (Akt), εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και αποκρίσεις στρες.[236]

### Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση

Γενικώς, η ανάπτυξη των οργανισμών απαιτεί αναγωγικό περιβάλλον. Στους ιστούς του εμβρύου τα επίπεδα της GSH είναι υψηλά, ενώ τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) είναι χαμηλά, ευρήματα συμβατά με την ύπαρξη αναγωγικού περιβάλλοντος.[237-239] Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ημερών της ενδομήτριας ζωής τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων αυξάνονται σημαντικά, ενώ η GSH μειώνεται [240,241], αλλαγές που είναι ενδεικτικές ενός περισσότερο οξειδωτικού περιβάλλοντος, αλλά και της προεργασίας για την αντιμετώπιση των συνθηκών της εξωμήτριας ζωής. Μελέτες in vitro έδειξαν ότι οι PSH ομάδες αυξάνουν στο προμιτωτικό στάδιο, εν συνεχεία καθώς η μιτωτική διεργασία προχωρά μειώνονται, για να αυξηθούν πάλι στο τέλος της κυτταρικής διαίρεσης.[242] Επίσης, τα επίπεδα της ενδοκυττάριας GSH κυμαίνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη φάση M του κυτταρικού κύκλου τόσο η ολική GSH όσο και η οξειδωμένη GSSG αυξάνονται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα σε ηρεμία ή με αυτά που βρίσκονται στη φάση S.[243] Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα οξειδωτικών ουσιών σχετίζονται με διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τα υψηλά με την αναστολή του. Το οξειδωτικό stress μπορεί επίσης να αποτελεί ένα κριτήριο επιλογής μεταξύ των κυττάρων που χρειάζονται για την ανάπτυξη του οργανισμού και αυτών που πλεονάζουν. Μελέτες σε έμβρυα έδειξαν ότι η παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο υγρό της βλαστικής κοιλότητας προκαλεί απόπτωση στα πλεονάζοντα κύτταρα του οπισθίου εξωδέρματος της τροφοβλάστης, ενώ τα κύτταρα που προορίζονται να εξελιχθούν σε εμβρυϊκά κύτταρα και κύτταρα του πλακούντα προστατεύονται από την απόπτωση μέσω της GSH που περιέχουν.[244] Συμπερασματικά, ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων δείχνει ότι η ύπαρξη του αναγωγικού περιβάλλοντος είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [245,246], ενώ του οξειδωτικού περιβάλλοντος για την έναρξη της διαφοροποίησης [247,248].

### Κυτταρικός θάνατος

Η ύπαρξη οξειδωτικού περιβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Η απόπτωση ενεργοποιείται όταν το οξειδωτικό stress είναι ήπιο ή μέσης βαρύτητας, ενώ σε περιπτώσεις σοβαρού οξειδωτικού stress επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος μέσω νέκρωσης. Η διαβάθμιση αυτή έχει μια λογική βάση, δεδομένου ότι, η απόπτωση απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και το σοβαρό οξειδωτικό stress εξαντλεί τα ενεργειακά αποθέματα καταστρέφοντας έτσι το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας.[249-253]

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από τρεις συγκεκριμένες φάσεις: 1) τη φάση έναρξης, όπου γίνεται η λήψη του αποπτωτικού σήματος, 2) τη φάση ενεργοποίησης, όπου τα σήματα ενοποιούνται και λαμβάνεται η απόφαση προς την κατεύθυνση της ζωής ή του θανάτου και 3) τη μη αναστρέψιμη εκτελεστική φάση όπου λαμβάνει χώρα ο κατακερματισμός του DNA και εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές στο κύτταρο. Έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη bcl-2 είναι αυτή που καθορίζει εάν το κύτταρο θα εισέλθει στην εκτελεστική φάση ή όχι.[254] Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, βασικό γεγονός της αποπτωτικής διαδικασίας, προϋποθέτει μείωση της γλουταθειόνης.[255] Η υπερέκφραση της bcl-2, χωρίς να επηρεάζει τη συνολική κατάσταση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθιστά το κυτταρικό περιβάλλον πιο αναγωγικό, αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Έτσι, το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου πιθανόν να αποτελεί τον τελικό καθοριστικό παράγοντα για την εισαγωγή στην τελική φάση της απόπτωσης.

## **Απόπτωση**

### *Ορισμός, μορφολογία και βιοχημεία της απόπτωσης.*

Η απόπτωση, γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη φυσιολογική διαδικασία που παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη, την ομοίωση των ιστών και την εξάλειψη κατεστραμμένων ή ανεπιθύμητων κυττάρων. Χαρακτηρίζεται από διακριτά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά που το διακρίνουν από άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου.

Η απόπτωση ορίζεται ως μια διαδικασία κυτταρικής αυτοκτονίας που ελέγχεται από ένα γενετικά προγραμματισμένο μονοπάτι.[256] Είναι μια εξαιρετικά ενορχηστρωμένη διαδικασία που περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων, συμπεριλαμβανομένης της συρρίκνωσης των κυττάρων, της συμπύκνωσης χρωματίνης, του πυρηνικού κατακερματισμού, του σχηματισμού φυσαλίδων μεμβράνης και του σχηματισμού αποπτωτικά σώματα.[257] Οι μορφολογικές αλλαγές στα αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να απεικονιστούν χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία και οι φθορίζουσες βαφές που χρωματίζουν επιλεκτικά τα αποπτωτικά κύτταρα.

Σε βιοχημικό επίπεδο, η απόπτωση ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο οδών σηματοδότησης. Ένας από τους βασικούς παράγοντες στην απόπτωση είναι μια οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης γνωστές ως κασπάσες. Οι κασπάσες υπάρχουν αρχικά στα κύτταρα ως ανενεργά ζυμογόνα και ενεργοποιούνται ως απόκριση σε αποπτωτικά σήματα.[258]

Μόλις ενεργοποιηθούν, οι κασπάσες διασπούν συγκεκριμένα υποστρώματα μέσα στο κύτταρο, οδηγώντας στην αποσυναρμολόγηση των κυτταρικών συστατικών και τελικά στον κυτταρικό θάνατο.

Η εγγενής οδός της απόπτωσης ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2.[259] Προ-αποπτωτικά μέλη, όπως το Bax και το Bak, προάγουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, οδηγώντας στην απελευθέρωση το κυτόχρωμα c στο κυτοσόλιο.[260] Το κυτόχρωμα c σχηματίζει τότε ένα σύμπλοκο με το Araf-1 και την προκασπάση-9 (procaspase-9), ενεργοποιώντας την κασπάση-9(caspase-9) και στη συνέχεια την κασπάση-3(caspase-3), η οποία εκτελεί την αποπτωτική διαδικασία.[261]

Η εξωτερική οδός της απόπτωσης ξεκινά με τη δέσμευση εξωκυτταρικών προσδεμάτων θανάτου, όπως ο συνδέτης Fas ή ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF), στους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου στην κυτταρική επιφάνεια.[262] Αυτή η δέσμευση πυροδοτεί τη στρατολόγηση πρωτεϊνών προσαρμογής και ο σχηματισμός του συμπλέγματος σηματοδότησης που προκαλεί θάνατο (death-inducing signaling complex - DISC), που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και του καταρράκτη κασπάσης.[263]

Η ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων καθορίζει τη μοίρα του κυττάρου. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας οδηγεί είτε σε υπερβολικό κυτταρικό θάνατο είτε σε εξασθενημένη απόπτωση, τα οποία έχουν σημαντικές επιπτώσεις σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών.[264]

### Επαγωγή της απόπτωσης και μεταγωγή σήματος

Οι οδοί σηματοδότησης που οδηγούν στην απόπτωση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε εξωγενείς και ενδογενείς οδούς. Η εξωτερική οδός ξεκινά με τη δέσμευση υποδοχέων θανάτου, όπως ο Fas ή ο υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNFR), από τους αντίστοιχους συνδέτες τους. Αυτή η εμπλοκή οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8, η οποία στη συνέχεια ξεκινά έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπάσης που τελικά καταλήγει σε κυτταρικό θάνατο. Οι βασικοί παράγοντες στην εξωτερική οδό περιλαμβάνουν τον τομέα θανάτου που σχετίζεται με Fas (FADD) και τον σχηματισμό του συμπλέγματος σηματοδότησης που προκαλεί θάνατο (DISC).[265,266]



Από την άλλη πλευρά, η εγγενής οδός ενεργοποιείται από σήματα ενδοκυτταρικού στρες, όπως βλάβη του DNA ή κυτταρικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες. Αυτή η οδός περιλαμβάνει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης 1 (Apaf-1) και την προκασπάση-9, γνωστή ως αποπτόσωμα. Αυτό το συγκρότημα ενεργοποιεί την κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κατάντη τελεστές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, οδηγώντας σε απόπτωση. [267,268]

Τόσο η εξωτερική όσο και η εγγενής οδός συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των τελεστών κασπασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική διάσπαση συγκεκριμένων κυτταρικών υποστρωμάτων, οδηγώντας στις χαρακτηριστικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που σχετίζονται με την απόπτωση. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν την πυρηνική συμπύκνωση, τον κατακερματισμό του DNA, τη δημιουργία φυσαλίδων μεμβράνης και το σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων.[269]

Η πρόκληση απόπτωσης ρυθμίζεται στενά από μια ισορροπία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων. Οι βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης περιλαμβάνουν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2. Τα προ-αποπτωτικά μέλη, όπως το Bax και το Bak, προάγουν την απόπτωση μέσω της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης και απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα c, ενώ τα αντι-αποπτωτικά μέλη, όπως το Bcl-2 και το Bcl-xL, αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και προάγουν την κυτταρική επιβίωση.[270]

Οι οδοί μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην απόπτωση επηρεάζονται επίσης από μια ποικιλία άλλων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (π.χ., p53), των ενεργοποιούμενων από το στρες πρωτεϊνικών κινασών (π.χ., JNK και p38) και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ., πρωτεΐνες της οικογένειας IAP). Αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν την ευαισθησία των κυττάρων στα αποπτωτικά σήματα και παίζουν κρίσιμους ρόλους στο συντονισμό των αποφάσεων για την τύχη των κυττάρων.[271-273]

### Απόπτωση στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο

Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του φυσιολογικού εντερικού επιθηλίου. Το εντερικό επιθήλιο

είναι ένας ταχέως ανανεούμενος ιστός που χαρακτηρίζεται από μια σταθερή εναλλαγή κυττάρων. Αυτός ο κύκλος εργασιών ρυθμίζεται αυστηρά για να διασφαλιστεί η ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και του κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση δρα ως βασικός μηχανισμός για την αφαίρεση γηρασμένων ή κατεστραμμένων κυττάρων, επιτρέποντας την ανανέωση και την αναγέννηση του εντερικού επιθηλίου.

Στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, η απόπτωση εμφανίζεται κυρίως στον άξονα κρύπτης-λάχνης, όπου τα βλαστοκύτταρα βρίσκονται στις κρύπτες και τα διαφοροποιημένα κύτταρα μεταναστεύουν προς τις λάχνες. Η αποπτωτική διαδικασία στο εντερικό επιθήλιο ρυθμίζεται στενά από διάφορες οδούς σηματοδότησης και μοριακούς παίκτες. Πολλοί παράγοντες, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, επηρεάζουν την απόφαση των κυττάρων να υποστούν απόπτωση ή να επιβιώσουν.

Η έναρξη της απόπτωσης στο εντερικό επιθήλιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κασπασών, μιας οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης που εκτελούν το αποπτωτικό πρόγραμμα. Οι κασπάσες ενεργοποιούνται μέσω δύο κύριων οδών: της ενδογενούς (μιτοχονδριακής) οδού και της εξωγενούς οδού (υποδοχέας θανάτου). Η εγγενής οδός πυροδοτείται από κυτταρικές πιέσεις, όπως βλάβη του DNA ή οξειδωτικό στρες, που οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και στην επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών.[274] Η εξωτερική οδός, από την άλλη πλευρά, ξεκινά με τη δέσμευση συνδετών θανάτου, όπως ο παράγοντας-άλφα νέκρωσης όγκου (TNF-α), με τους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου στην κυτταρική επιφάνεια, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των κασπασών.[275]

Στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, η απόπτωση εξυπηρετεί αρκετές σημαντικές λειτουργίες. Πρώτον, βοηθά στη διατήρηση της σωστής ισορροπίας μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και του κυτταρικού θανάτου, διασφαλίζοντας την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα του εντερικού φραγμού. Δεύτερον, η απόπτωση παίζει ρόλο στην αφαίρεση κατεστραμμένων ή μολυσμένων κυττάρων, προστατεύοντας τον ιστό από πιθανή βλάβη. Τρίτον, η απόπτωση εμπλέκεται στην εξάλειψη περίσσειας ή περιττών κυττάρων κατά την αναδιαμόρφωση και την ανάπτυξη των ιστών.

Η απορρύθμιση της απόπτωσης στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες. Η υπερβολική απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη των ιστών και διάσπαση του επιθηλιακού φραγμού, ενώ η ανεπαρκής απόπτωση μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση κατεστραμμένων ή γηρασμένων κυττάρων. Και τα δύο σενάρια μπορούν

να συμβάλουν στην ανάπτυξη διαφόρων εντερικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και του καρκίνου του παχέος εντέρου.

### Απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις του εντερικού επιθήλιου

Η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων του γαστρεντερικού σωλήνα αυξάνοντας ή μειώνοντας το ρυθμό κυτταρικού θανάτου των επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων που συμμετέχουν στην τοπική ανοσολογική αντίσταση. Η αυξημένη απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο σχετίζεται με φυσικό τραυματισμό του βλεννογόνου, επιθηλιακή ατροφία και δυσλειτουργία του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού, οδηγώντας σε αυξημένη εντερική διαπερατότητα. Η μειωμένη απόπτωση έχει κυρίως συσχετιστεί με την ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασιών. Παραδείγματα μεταβολών της απόπτωσης στο γαστρεντερικό επιθήλιο αποτελούν τα παρακάτω:

#### α. Βακτηριακές λοιμώξεις.

Οι βακτηριακές λοιμώξεις μπορούν να διαταράξουν τη λεπτή ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης, οδηγώντας σε απορρυθμισμένο κυτταρικό θάνατο και συμβάλλοντας στην παθογένεση των εντερικών ασθενειών.

Κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων, διάφοροι μηχανισμοί μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο. Τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν απευθείας απόπτωση σε μολυσμένα κύτταρα ως μέσο αποφυγής της άμυνας του ξενιστή και προώθησης της επιβίωσης και της αναπαραγωγής τους εντός του ιστού του ξενιστή.

[275] Οι βακτηριακές τοξίνες, όπως αυτές που παράγονται από το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC) ή τα είδη *Shigella*, μπορούν να στοχεύσουν άμεσα τις οδούς σηματοδότησης των κυττάρων-ξενιστών και να πυροδοτήσουν αποπτωτικούς καταρράκτες.

[276]

Εκτός από τις άμεσες βακτηριακές επιδράσεις, η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή σε βακτηριακές λοιμώξεις μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο. Τα ανοσοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) ως απόκριση στη βακτηριακή εισβολή. Αυτοί οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορούν να ενεργοποιήσουν αποπτωτικές οδούς στα γύρω επιθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε βλάβη των ιστών και διάσπαση του εντερικού φραγμού.[277]

Η απόπτωση στις παθολογικές καταστάσεις του εντερικού επιθηλίου κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες. Η υπερβολική απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της λειτουργίας του φραγμού του εντερικού επιθηλίου, επιτρέποντας στα βακτήρια και τα προϊόντα τους να διεισδύσουν βαθύτερα στον ιστό και να πυροδοτήσουν περαιτέρω φλεγμονή.[278] Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καταστάσεων όπως η λοιμώδης κολίτιδα ή η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου.

Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της απόπτωσης κατά τη διάρκεια βακτηριακών λοιμώξεων μπορεί επίσης να έχει επιζήμια αποτελέσματα. Η εξασθενημένη απόπτωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη επιβίωση των μολυσμένων κυττάρων, παρέχοντας μια θέση για βακτηριακή επιμονή και προάγοντας τη χρόνια φλεγμονή. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί σε χρόνιες βακτηριακές λοιμώξεις, όπως η λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού στο στομάχι, όπου η αναστολή της απόπτωσης συμβάλλει στην επιμονή του βακτηρίου και στην ανάπτυξη γαστρίτιδας και γαστρικών ελκών.[279]

#### β.Ισχαιμία-επαναιμάτωση

Η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Ischemia/Reperfusion) στο εντερικό επιθήλιο.[280] Κατά τη διάρκεια της I/R, η προσωρινή διακοπή της ροής του αίματος στο έντερο ακολουθούμενη από την αποκατάσταση της παροχής αίματος οδηγεί σε έναν καταρράκτη γεγονότων που μπορεί να πυροδοτήσουν απόπτωση στα επιθηλιακά κύτταρα.

Η διαδικασία της I/R προκαλεί οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και απελευθέρωση διαφόρων προαποπτωτικών παραγόντων, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών οδών στο εντερικό επιθήλιο. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης μπορούν να ξεκινήσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, βλάβη του DNA και κυτταρικό στρες, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών οδών σηματοδότησης.[281]

Αρκετοί βασικοί μεσολαβητές εμπλέκονται στην απόπτωση που προκαλείται από I/R στο εντερικό επιθήλιο. Αυτές περιλαμβάνουν κασπάσες, πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, p53 και διάφορες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες.[282,283] Οι κασπάσες, ιδιαίτερα η κασπάση-3, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην εκτέλεση της απόπτωσης διασπώντας κυτταρικά υποστρώματα.[284] Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 ρυθμίζουν την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων και ελέγχουν την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων.[285] Η p53, μια

ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ως απόκριση στο κυτταρικό στρες.[286]

Επιπλέον, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια του I/R, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β), μπορούν να προάγουν την απόπτωση ενεργοποιώντας αποπτωτικές οδούς και ενισχύοντας την κυτταρική ευαισθησία σε αποπτωτικά ερεθίσματα.[287]

### γ.Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου (IBD), συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας, είναι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ανώμαλες ανοσοαποκρίσεις στη γαστρεντερική οδό. Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση των ΙΦΝΕ ιδιαίτερα στο εντερικό επιθήλιο.[288]

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η απόπτωση βοηθά στη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης εξαλείφοντας τα κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα, συμβάλλοντας στην ανανέωση του επιθηλιακού φραγμού. Ωστόσο, στις ΙΦΝΕ, εμφανίζεται απορύθμιση της απόπτωσης, που οδηγεί σε υπερβολικό κυτταρικό θάνατο ή μειωμένη κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων, επιδεινώνοντας έτσι τη φλεγμονώδη απόκριση και τη βλάβη των ιστών.[289]

Πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην απορρυθμισμένη απόπτωση που παρατηρείται στις ΙΦΝΕ. Ανισορροπία στα προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μονοπάτια σηματοδότησης, αλλοιωμένη έκφραση των αποπτωτικών ρυθμιστών και ελαττώματα στην κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων έχουν ενοχοποιηθεί.[290] Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη έκφραση προ-αποπτωτικών μορίων όπως το Fas, ο παράγοντας άλφα νέκρωσης όγκου (TNF-α) και οι κασπάσες στο εντερικό επιθήλιο ασθενών με ΙΦΝΕ.[291,292]

Επιπλέον, μια ανισορροπία στη μικροχλωρίδα του εντέρου, έχει συσχετιστεί με ΙΦΝΕ και μπορεί να επηρεάσει την απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο. Η δυσλειτουργική μικροχλωρίδα μπορεί να προκαλέσει υπερβολική απόπτωση, να διαταράξει την ακεραιότητα του επιθηλίου και να ενεργοποιήσει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις.[293]

Το φλεγμονώδες περιβάλλον στις ΙΦΝΕ, που χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), συμβάλλει περαιτέρω στη άναρχη απόπτωση.[294] Αυτές οι κυτοκίνες μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, να προάγουν τη δυσλειτουργία του επιθηλιακού φραγμού και να διαιωνίσουν τη χρόνια φλεγμονή.

Εκτός από τη μη ρυθμισμένη απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, η αλλοιωμένη απόπτωση των ανοσοκυττάρων εντός του εντερικού βλεννογόνου συμβάλλει επίσης στην παθογένεση των ΙΦΝΕ. Η μειωμένη κάθαρση των αποπτωτικών ανοσοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε δευτερογενή νέκρωση, απελευθέρωση ενδοκυτταρικού περιεχομένου και διαιώνιση της φλεγμονώδους απόκρισης.[295]

#### δ.Ακτινική εντερίτιδα

Η ακτινική εντερίτιδα αναφέρεται στη φλεγμονή και τη βλάβη του εντερικού επιθηλίου που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της ακτινοθεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο. Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ακτινικής εντερίτιδας, ιδιαίτερα στο εντερικό επιθήλιο.[296]

Η ακτινοθεραπεία στοχεύει να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσει τους κοντινούς υγιείς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εντερικού επιθηλίου. Υψηλές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA και να πυροδοτήσουν αποπτωτικές οδούς στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.[297] Η απόπτωση χρησιμεύει ως προστατευτικός μηχανισμός για την εξάλειψη των σοβαρά κατεστραμμένων κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών.

Η αποπτωτική απόκριση στην ακτινοεντερίτιδα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση διαφόρων οδών σηματοδότησης. Η βλάβη του DNA που προκαλείται από την ακτινοβολία ενεργοποιεί την p53, μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης.[298] Η οδός p53 προάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας προ-αποπτωτικά γονίδια και αναστέλλοντας αντι-αποπτωτικούς παράγοντες.

Επιπλέον, η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών και αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που συμβάλλουν στην απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο.[299] Η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε βλάβη του DNA και πυροδοτώντας μονοπάτια απόπτωσης.

Η απόπτωση στην ακτινική εντερίτιδα επηρεάζει κυρίως τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της κρύπτης στο εντερικό επιθήλιο.[300] Η απώλεια αυτών των κυττάρων βλάπτει την αναγεννητική ικανότητα του επιθηλίου και διαταράσσει την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού.

Η σοβαρότητα της εντερίτιδας από ακτινοβολία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της δόσης ακτινοβολίας, της κλασματοποίησης και της ατομικής ευαισθησίας. Οι υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας και η αυξημένη έκθεση σε ακτινοβολία οδηγούν σε πιο έντονη απόπτωση και βλάβη των ιστών.

#### ε.Επίδραση κυτταροστατικών φαρμάκων

Τα κυτταροστατικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται συνήθως στη χημειοθεραπεία, μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στο εντερικό επιθήλιο, συμπεριλαμβανομένης της πρόκλησης απόπτωσης. Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του εντερικού επιθηλίου στα κυτταροστατικά φάρμακα. [301]

Τα κυτταροστατικά φάρμακα στοχεύουν τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν υγιείς ιστούς με υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού, όπως το εντερικό επιθήλιο. Αυτά τα φάρμακα ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση παρεμβαίνοντας στην αντιγραφή του DNA, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA.

Η πρόκληση απόπτωσης από κυτταροστατικά φάρμακα στο εντερικό επιθήλιο είναι ένα δίκικο μαχαίρι. Από τη μία πλευρά, η απόπτωση εξαλείφει τα καρκινικά κύτταρα και τα κατεστραμμένα κύτταρα, συμβάλλοντας στα θεραπευτικά αποτελέσματα των κυτταροστατικών φαρμάκων. Από την άλλη πλευρά, η υπερβολική απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του βλεννογόνου και να βλάψει την αναγεννητική ικανότητα του ιστού.

Διάφορα κυτταροστατικά φάρμακα προκαλούν απόπτωση μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Για παράδειγμα, παράγοντες που βλάπτουν το DNA, όπως η σισπλατίνη και η ετοποσίδη, προκαλούν σπασίματα του κλώνου του DNA και πυροδοτούν αποπτωτικές οδούς στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα.[302,303] Άλλα φάρμακα, όπως οι αντιμεταβολίτες και οι αναστολείς μικροσωληνίσκων, παρεμβαίνουν στη σύνθεση νουκλεοτιδίων ή διαταράσσουν

τη μιτωτική άτρακτο, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση.

[304,305]

Η έκταση της απόπτωσης στο εντερικό επιθήλιο εξαρτάται από τη δόση, τη διάρκεια και τον προγραμματισμό της χορήγησης του κυτταροστατικού φαρμάκου. Υψηλές δόσεις ή παρατεταμένη έκθεση σε κυτταροστατικά φάρμακα μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη απόπτωση και σοβαρή βλάβη του βλεννογόνου, οδηγώντας σε εντερικές επιπλοκές.

Η απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο κατά τη διάρκεια της θεραπείας με κυτταροστατικά φάρμακα μπορεί να έχει τόσο οξείες όσο και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις. Οξεία, η υπερβολική απόπτωση διαταράσσει τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, οδηγώντας σε βλεννογονίτιδα, διάρροια και δυσαπορρόφηση θρεπτικών συστατικών.[306] Χρόνια, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι θεραπείας με κυτταροστατικά φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν αθροιστική βλάβη στο εντερικό επιθήλιο, με αποτέλεσμα χρόνια εντερική δυσλειτουργία.

Οι προσπάθειες για τον μετριασμό των αρνητικών επιπτώσεων των κυτταροστατικών φαρμάκων στο εντερικό επιθήλιο και την ενίσχυση της αποκατάστασης των ιστών εστιάζονται σε στρατηγικές για την προώθηση της επιβίωσης και της αναγέννησης των επιθηλιακών κυττάρων. Αυτά περιλαμβάνουν τη χρήση αυξητικών παραγόντων, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων (KGF), οι οποίοι προάγουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και ενισχύουν την επούλωση του βλεννογόνου.[307,308]

#### στ.Επίδραση των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) χρησιμοποιούνται ευρέως για τις αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, αλλά μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο εντερικό επιθήλιο. Τα ΜΣΑΦ αναστέλλουν τα ένζυμα της κυκλοοξυγενάσης (COX), μειώνοντας έτσι τη σύνθεση των προσταγλανδινών, οι οποίες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας και της ομοιόστασης του εντερικού βλεννογόνου. Η παρατεταμένη χρήση ή υψηλές δόσεις ΜΣΑΦ μπορεί να οδηγήσει σε εντερική βλάβη, που χαρακτηρίζεται από διάβρωση του επιθηλίου, εξέλκωση, ακόμη και διάτρηση.Ο τραυματισμός του εντερικού επιθηλίου που προκαλείται από ΜΣΑΦ



περιλαμβάνει πολλαπλούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της διάρρηξης του προστατευτικού στρώματος της βλέννας, του εξασθενημένου πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων, της μειωμένης λειτουργίας φραγμού και της αυξημένης ευαισθησίας στο οξειδωτικό στρες και την απόπτωση. Αυτές οι επιδράσεις συμβάλλουν στην επαγόμενη από ΜΣΑΦ εντεροπάθεια, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ως κοιλιακό άλγος, διάρροια και γαστρεντερική αιμορραγία.[309,310] Διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες, της αλλοιωμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας και των φλεγμονωδών μεσολαβητών στην εντερική βλάβη που προκαλείται από ΜΣΑΦ.[311,312] Η κατανόηση των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από τον τραυματισμό του εντερικού επιθηλίου από τα ΜΣΑΦ είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών για την ελαχιστοποίηση αυτών των ανεπιθύμητων ενεργειών, μεγιστοποιώντας παράλληλα τα θεραπευτικά οφέλη των ΜΣΑΦ.

### ζ. Καρκίνος παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μια από τις πιο κοινές κακοήθειες παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαταραγμένη απόπτωση στο εντερικό επιθήλιο. Η απόπτωση, ως μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και στην πρόληψη της συσσώρευσης κατεστραμμένων ή μεταλλαγμένων κυττάρων.[313] Στο φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο, η απόπτωση δρα ως προστατευτικός μηχανισμός εξαλείφοντας κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA ή έχουν αποκτήσει ογκογόνες μεταλλάξεις.[314] Ωστόσο, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης διαταράσσεται, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και ανάπτυξη όγκου.[315] Η απορρύθμιση των αποπτωτικών οδών, συμπεριλαμβανομένων των ελαττωμάτων στην ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών παραγόντων και της υπερέκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, συμβάλλει στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.[316]

Πολλά μονοπάτια σηματοδότησης εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει κεντρικό ρόλο στην προαγωγή της απόπτωσης ενεργοποιώντας γονίδια που εμπλέκονται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης.[317] Αλλαγές στην οδό p53, όπως μεταλλάξεις ή απώλεια λειτουργίας, παρατηρούνται συχνά στον καρκίνο του παχέος εντέρου, οδηγώντας σε εξασθενημένη απόπτωση και αυξημένη κυτταρική επιβίωση.[318]

Επιπλέον, η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, η οποία περιλαμβάνει τόσο προ-αποπτωτικά όσο και αντι-αποπτωτικά μέλη, παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού. Η απορρύθμιση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, όπως η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή η μείωση της ρύθμισης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μπορεί να προάγει την κυτταρική επιβίωση και να συμβάλει στην ογκογένεση στο παχύ έντερο.[319]

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Υλικά - Μέθοδοι

### 1. Πειραματόζωα.

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν 54 ενήλικες αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar βάρους περίπου 300g. Τα ζώα φυλάσσονταν σε ανοξείδωτα ατσάλινα κλουβιά ανά δύο, με ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας, με εναλλασσόμενους κύκλους φωτός και σκότους 12 ωρών, λαμβάνοντας τη τυποποιημένη εργαστηριακή διαίτα και νερό βρύσης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος εκτός της νύχτας πριν την χειρουργική επέμβαση που είχαν στέρηση τροφής.

Οι λόγοι επιλογής των συγκεκριμένων πειραματόζωων είναι οι εξής:

α) Οι επίμυες είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο που σχετίζονται με το ήπαρ και τα χοληφόρα, ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με αυτά συναφών εργασιών.

β) Στερούνται χοληδόχου κύστης και η ανατομική των χοληφόρων είναι προσιτή χωρίς πολλούς διεγχειρητικούς χειρισμούς που πιθανόν να επηρέαζαν ψευδώς τα αποτελέσματά μας.

γ) Είναι ήμερα ζώα, πρακτικά στη διατροφή και στη συντήρηση με σχετικά μικρό κόστος.

δ) Στα αρσενικά που επιλέχθηκαν η ενδοκρινική τους κατάσταση είναι σταθερή και ο ρυθμός ανάπτυξής τους ο κατάλληλος.

ε) Η ιδιαιτερότητά τους (χρήσιμη για τη δική μας μελέτη) είναι η μεγάλη ανθεκτικότητα των επιμύων αυτών στην ενδοτοξίνη (θανατηφόρα δόση 300 φορές μεγαλύτερη από της γάτας και 38 φορές μεγαλύτερη από του σκύλου). Λόγω της ανθεκτικότητάς τους αυτής στην ενδοτοξιναιμία δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητά τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

στ) Η ηλικία των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 14-16 εβδομάδων διότι στην ηλικία αυτή το ζώο θεωρείται ώριμο και έχει βάρος περί τα 250- 300 gr που είναι και το ενδεικνυόμενο μέγεθος. Μικρότερης ηλικίας ζώα έχουν μέγεθος που καθιστά δύσκολους τους ενδοκοιλιακούς χειρισμούς ενώ μεγαλύτερης ηλικίας είναι πιο επιρρεπή σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και έχουν τάση να συσσωρεύουν λίπος ενδο- και οπισθοπεριτοναϊκά.

## 2. Σχεδιασμός του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας διενεργήθηκε power analysis με cut-off point >80% power για τη συγκεκριμένη μελέτη και ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός πειραματοζώων υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε τρεις ομάδες: 1η Control (n:8) Μη χειρουργημένη ομάδα ελέγχου. 2η Sham (n:8) Ομάδα ελέγχου που υποβλήθηκε σε ερευνητική λαπαροτομία και χειρισμούς στην περιοχή του χοληδόχου πόρου. 3η (n:36) Ομάδα απολίνωσης του κοινού χοληδόχου πόρου.

Στη συνέχεια το πείραμα συνεχίστηκε διαιρώντας τις τρεις αυτές ομάδες σε τέσσερις καθορισμένες χρονικές περιόδους. Η πρώτη περίοδος ήταν στις 12 ώρες. Η δεύτερη στις 48 ώρες. Η τρίτη στις 7 ημέρες και η τέταρτη στις 14 ημέρες. Στο τέλος αυτών των καθορισμένων περιόδων όλα τα ζώα χειρουργήθηκαν ή επαναχειρουργήθηκαν για τη λήψη δειγμάτων και ακολούθως θανατώθηκαν με υπερβολική χρήση αιθέρα.

## 3. Χειρουργική τεχνική και αναισθησία.

Ως τρόπος αναισθησίας χρησιμοποιήθηκε ο αιθέρας σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, διότι η εφαρμογή του είναι εύκολη χωρίς να προκαλείται τραυματισμός στα ζώα όπως με τα αναισθητικά που χορηγούνται με ενέσεις (κεταμίνη) κάτι που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματά μας. Η αναισθησία γινόταν ως εξής: βαμβάκι εμποτισμένο με μικρή ποσότητα αιθέρα τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο με ευρύ στόμιο που κλείνει. Σε

θερμοκρασία δωματίου δημιουργείται ατμόσφαιρα αιθέρα που χαλαρώνει το ζώο και προκαλεί τη νάρκωση σε μικρό χρονικό διάστημα. Μόλις το ζώο κοιμηθεί βγαίνει από το δοχείο διότι η παρατεταμένη παραμονή του μπορεί να προκαλέσει αναπνευστική καταστολή και θάνατο. Η χορήγηση αιθέρα συνεχίζεται στο χειρουργικό τραπέζι βάζοντας μια προσωπίδα με τρόπο ώστε το ζώο να αναπνέει μίγμα ατμοσφαιρικού αέρα και αιθέρα. Το ζώο ναρκωμένο τοποθετείται πάνω στο χειρουργικό πεδίο ύπτια ενώ τα άκρα του σταθεροποιούνται σε έκταση. Ακολουθεί καλό πλύσιμο του κοιλιακού τοιχώματος με αντισηπτικό διάλυμα ποβιδόνης-ιωδίνης 10%. Εν συνεχεία γίνεται μικρή, ενός εκατοστού, μέση υπερομφάλιος τομή και αναγνώριση του ηπατοδωδεκαδαχτυλικού συνδέσμου. Στην ομάδα sham ο ηπατοδωδεκαδαχτυλικός σύνδεσμος απλά κινητοποιείται χωρίς διατομή του χοληδόχου πόρου. Στις ομάδες 2 και 3 γίνεται παρασκευή του κοινού χοληδόχου πόρου έπειτα από επισταμένη παρατήρηση για την πιθανή ύπαρξη επικουρικών χοληδόχων πόρων και ανατομικών ιδιαιτεροτήτων. Στην ομάδα 3 ο κοινός χοληδόχος πόρος απολινώνεται διπλά στο άνω και κάτω όριο του μέσου τριτημορίου του με ράμμα από μετάξι 4-0 και αφαιρείται το μεταξύ των απολινώσεων τμήμα, για την αποφυγή επανασηραγοποίησης του πόρου. Στο σημείο αυτό απομακρύνεται η προσωπίδα αναισθησίας για να αρχίσει να αποβάλλεται ο αιθέρας και να ξυπνήσει το ζώο. Ακολουθεί σύγκλιση της κοιλιακής τομής σε δυο στρώματα με ράμματα Vicryl 3-0 και μετάξι 2-0 και η κοιλιακή τομή επαλείφεται με διάλυμα ποβιδόνης-ιωδίνης. Με το πέρας της διαδικασίας το ζώο τοποθετείται σε καθαρό κλουβί. Κατά την τελική λαπαροτομία στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα όλα τα δείγματα λαμβάνονται υπό άσηπτες συνθήκες και υπό νάρκωση με αιθέρα.

#### 4. Μετρήσεις

A) Ολική χολερυθρίνη, άμεση και έμμεση χολερυθρίνη, AST, ALT, γ-GT, ALP, LDH, αμυλάση, CRP.

Διατέμνοντας την άκρη της ουράς των πειραματοζώων γίνεται συλλογή 1 ml αίματος. Στον ορό του δείγματος προσδιορίζονται σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή οι συγκεντρώσεις ολικής, άμεσης και έμμεσης χολερυθρίνης AST, ALT, γ-Gt, ALP, LDH και αμυλάσης.

B) Ενδοτοξίνη στην πυλαία και την αορτή

Στο τέλος του πειράματος, μετά τη διενέργεια λαπαροτομίας, παρακεντάται πρώτα η πυλαία και ύστερα η κοιλιακή αορτή και συλλέγονται 1 και 2 ml αίματος αντιστοίχως για τη μέτρηση των επιπέδων ενδοτοξίνης. Η παρακέντηση της κοιλιακής αορτής γίνεται κάτωθεν των νεφρικών αρτηριών διανοίγοντας λίγο το οπισθοπεριτόναιο. Η μέτρηση της ενδοτοξίνης έγινε με τη ποσοτική χρωμογόνο δοκιμασία Limulus Amebocyte Lysate (LAL test) (QCL-1000, BioWhittaker, Walkersville, USA).

## Γ) Ιστοπαθολογική μελέτη

Από κάθε ζώο λαμβάνεται τμήμα εντέρου από τον τελικό ειλεό

Κατά την τελική λαπαροτομία, από κάθε πειραματόζωο αφαιρέθηκε ένα τμήμα ιστού από τον τελικό ειλεό περίπου 1 εκ και πλύθηκαν με φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl) και το καθένα ομογενοποιήθηκε αμέσως σε μεταλλικής λεπίδας ομογενοποιητή (Janke & Kunkel, μοντέλο Ultra-Turrax T-25), ακολουθούμενο με επαναομογενοποίηση σε ένα γυάλινου τύπου Dounce ομογενοποιητή ακολούθως: Δείγμα ιστού αναμειγνύεται με ομογενοποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα σε γυάλινο σωλήνα, ομογενοποιείται από τον μεταλλικό ομογενοποιητή και το τελικό προϊόν μεταφέρεται με μια πιπέτα Pasteur σε δοκιμαστικό σωληνάριο 2 ml μικροφυγόκεντρου. Φυγοκεντρείται σε 16.000g για 5 λεπτά στους 4°C και το τελικό υπερκείμενο (διαυγές ομογενοποιημένο) διάλυμα συλλέγεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μια τροποποίηση ενός προηγούμενα δημοσιευμένου πρωτοκόλλου.[320]

1. Σε 600ml ομογενοποιημένου διαλύματος αναμειγνύεται με 12ml 1% DOC (0,02% τελικής συγκέντρωσης) και επώαζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη 68ml TCA (10% τελικής συγκέντρωσης), επώαση σε μπάνιο παγωμένου νερού για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση σε 16.000g στους 4 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το εναπομείναν πρωτεϊνικό προϊόν εκπλύνεται όπως περιγράφεται στο βήμα 2.

2. Το πρωτεϊνικό προϊόν επεξεργάζεται ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα DOC και TCA. Για το λόγο αυτό εκπλύνεται 3 φορές με 500ml -20 °C- κρύα ακετόνη, ακολουθούμενο κάθε φορά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 16.000g και 4 °C (για την απομάκρυνση της ακετόνης). Οποιαδήποτε υπολείμματα ακετόνης του πρωτεϊνικού προϊόντος εξατμίζονται από το SpeedVac για 5 λεπτά και το τελικό προϊόν με υφή πούδρας αποθηκεύεται στους -40 °C, έως ότου να χρησιμοποιηθεί στο βήμα 3.

3. Η απομονωμένη σκόνη πρωτεΐνης διαλύεται σε ελάχιστη ποσότητα 50mM NaOH και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της υπεροξειδωσής των πρωτεϊνών (επαγώμενη από λιπίδια) και την οξειδωση (δες πιο κάτω), μετά από χρήση δεκαπλάσια αραιώσης για ποσοτικό προσδιορισμό με μια ευαίσθητη μέθοδο που περιγράφεται σε άλλο σημείο.[320]

## 5. Ανάλυση οξειδωτικού στρες

Οξειδωτικές αλλαγές που προκαλούνται από λιπίδια: Η οξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από πρωτεϊνική δέσμευση στη μαλονική δεϋαλδεΐδη (PrMDA) προσδιορίζεται από την ειδική MDA θειοβαρβιτουρική φωτομετρική εκτίμηση (MDA-specific thiobarbituric protein bound malondialdehyde) που περιγράφεται στην βιβλιογραφική αναφορά.[321]

Οξειδωτικές αλλαγές στις πρωτεϊνικές ελεύθερες ρίζες: Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλομάδων (Protein carbonyls - PrC=O) πραγματοποιείται με την ειδική ροδαμίνη Β (specific rhodamine B hydrazine - RBH) βασιζόμενη σε φθοριομετρική ανάλυση που περιγράφεται στην βιβλιογραφική αναφορά.[312]

## 6. Στατιστική ανάλυση

Η μηδενική υπόθεση στην ANOVA είναι ότι οι μέσες τιμές όλων των ομάδων είναι ίσες, ενώ η μηδενική υπόθεση στο τεστ Kruskal-Wallis είναι ότι οι διάμεσες τιμές όλων των ομάδων είναι ίσες. Η αρχική τιμή  $p$ - στους Πίνακες αντιστοιχεί σε αυτήν την υπόθεση. Εάν η τιμή  $p$  είναι μικρότερη από 0,05, τότε η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, πράγμα που σημαίνει ότι τουλάχιστον μία ομάδα έχει σημαντική διαφορά στη μέση ή διάμεση τιμή, σύμφωνα με το τεστ που εφαρμόστηκε. Σε αυτήν την περίπτωση, προχωρήσαμε σε συγκρίσεις ανά ζεύγη post-hoc μεταξύ των διαφόρων ομάδων, εφαρμόζοντας τη διόρθωση Bonferroni για να προσαρμόσουμε το σφάλμα τύπου I λόγω πολλαπλών συγκρίσεων. Συμπεριλάβαμε τις τιμές  $p$  από κάθε σύγκριση ανά ζεύγη στους Πίνακες.

Τα περιγραφικά στατιστικά στοιχεία αναφέρθηκαν είτε ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD) είτε ως διάμεσος (min-max). Η κανονικότητα της κατανομής των δεδομένων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το τεστ Shapiro-Wilk. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) ή τη δοκιμή Kruskal-Wallis, ανάλογα με την περίπτωση, με διόρθωση Bonferroni. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος  $\pm$  SD όταν χρησιμοποιήθηκε η ANOVA και διάμεσος (min-max) όταν χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Kruskal-Wallis. Όλες οι δοκιμές ήταν δύο ουρών. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά εάν η τιμή  $p$  ήταν μικρότερο από 0,05. ( $p < 0,05$ )



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Βιοχημικές παράμετροι και επίπεδα ενδοτοξίνης

#### **Πίνακας 1.**

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων ζώων 12 ώρες μετά την επέμβαση: Η πλειονότητα των ελεγμένων βιοχημικών παραμέτρων έδειξε παρόμοια επίπεδα μεταξύ των control και των sham ζώων, με φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα αλλά υψηλότερα επίπεδα σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου, στις 12 ώρες μετά την επέμβαση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, άμεσης χολερυθρίνης, SGOT, SGPT, GGT και ALP ακολούθησαν αυτή την τάση, ενώ τα επίπεδα της LDH, της αμυλάσης και της CRP δεν έδειξαν αυτήν την τάση. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

#### **Πίνακας 2.**

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων ζώων 2 ημέρες μετά την επέμβαση: Οι περισσότερες από τις βιοχημικές παραμέτρους εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα μεταξύ των control και των sham ζώων, με φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα αλλά υψηλότερα επίπεδα σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου, στις 48 ώρες μετά την επέμβαση. Ειδικότερα, τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, άμεσης χολερυθρίνης, SGOT, SGPT, GGT και ALP ακολούθησαν αυτήν την τάση, ενώ αυτά της LDH, της αμυλάσης και της CRP όχι. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

#### **Πίνακας 3.**

Συγκρίσεις μεταξύ ζωικών ομάδων στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση: Τα επίπεδα των περισσότερων από τις βιοχημικές παραμέτρους ήταν παρόμοια μεταξύ των control και των sham ζώων, με φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα αλλά υψηλότερα επίπεδα σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου, στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση . Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, άμεσης χολερυθρίνης, SGOT, SGPT, GGT και ALP ακολούθησαν αυτή την τάση, ενώ αυτά της LDH, της αμυλάσης και της CRP δεν ακολούθησαν αυτήν την τάση. Επίσης, τα επίπεδα CRP αυξήθηκαν σε ζώα που υποβλήθηκαν σε εικονική επέμβαση και σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

#### **Πίνακας 4.**

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων ζώων 14 ημέρες μετά την επέμβαση: Η πλειονότητα των βιοχημικών παραμέτρων έδειξε παρόμοια επίπεδα μεταξύ των control και των sham ζώων,

με φυσιολογικά ή ελαφρώς αυξημένα επίπεδα αλλά υψηλότερα επίπεδα σε ζώα με απολίνωση του χοληφόρου πόρου, στις 14 ημέρες μετά την επέμβαση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, άμεσης χολερυθρίνης, SGOT, SGPT, GGT και ALP ακολούθησαν αυτήν την τάση, αλλά αυτά της LDH, της αμυλάσης και της CRP όχι. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

#### **Πίνακας 5.**

Συγκρίσεις μεταξύ sham ζώων σε διάφορα χρονικά σημεία: Δεν βρέθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του χρόνου μετά την απολίνωση στην πλειονότητα των δοκιμασμένων βιοχημικών παραμέτρων σε ζώα που υποβλήθηκαν σε απλή λαπαροτομία. Οι μόνες εξαιρέσεις ήταν μια ήπια διακύμανση στα επίπεδα SGPT και μια κορυφή στα επίπεδα CRP στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

#### **Πίνακας 6.**

Συγκρίσεις μεταξύ ζώων με απολίνωση του χοληδόχου πόρου σε διάφορα χρονικά σημεία: Διαφορετικά μοτίβα διακυμάνσεων του επιπέδου παρατηρήθηκαν με την πάροδο του χρόνου, μεταξύ των βιοχημικών παραμέτρων σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου. Τα επίπεδα της ολικής χολερυθρίνης, της άμεσης χολερυθρίνης και της CRP έφτασαν στο μέγιστο στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση, ενώ εκείνα των SGOT, SGPT και ALP έφτασαν στο μέγιστο στις 12 ώρες μετά την επέμβαση. Τα υψηλότερα επίπεδα GGT ανιχνεύθηκαν 14 ημέρες μετά την επέμβαση. Ωστόσο, τα επίπεδα αμυλάσης παρέμειναν σχετικά σταθερά μετά από μια αύξηση, που ανιχνεύθηκε 2 ημέρες μετά την απολίνωση του χοληδόχου πόρου, ενώ τα επίπεδα της LDH δεν έδειξαν σημαντική διακύμανση. Η στατιστική σημαντικότητα (p) φαίνεται στον πίνακα.

Συγκρίσεις μεταξύ ζώων με απολίνωση του χοληδόχου πόρου ως προς τα επίπεδα ενδοτοξίνης: Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του χρόνου μετά την απολίνωση στα επίπεδα ενδοτοξίνης στο περιφερικό αίμα, στο αίμα που συλλέχθηκε από την αορτή ή στο αίμα από την πυλαία φλέβα σε ζώα με απολίνωση του χοληδόχου πόρου, αν και τα μέγιστα επίπεδα για όλα τα δείγματα αίματος παρατηρήθηκαν στις 7 ημέρες μετά την επέμβαση. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα ενδοτοξίνης στο περιφερικό αίμα και στο αίμα που συλλέχθηκε από την αορτή και την πυλαία φλέβα σε κάθε χρονικό σημείο.

### Αξιολόγηση οξειδωτικού στρες

Οι συνολικές πρωτεΐνες στον τελικό ειλεό (εντερικός βλεννογόνος) ζώων με απολίνωση του χοληδόχου πόρου αξιολογήθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα (σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου-control και εικονικά δείγματα-sham). Το Σχήμα 1 απεικονίζει την οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών που προκαλείται από την αντίδρασή τους με το MDA (PrMDA), το προϊόν της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, του οποίου η κορυφή (περίπου 50% μεγαλύτερη από αυτή του ελέγχου/ψευδής -  $p < 0,037$ ) ανιχνεύθηκε στο διάστημα 2 έως 7 ημερών μετά απολίνωση του χοληδόχου πόρου και στη συνέχεια μειώνεται στο 12% (A). Αντίθετα, η οξείδωση των πρωτεϊνών λόγω του σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PrC=O) έδειξε αύξηση περίπου 50% μόνο στις 14 ημέρες (B) ( $p < 0,037$ ).

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε τον εντερικό βλεννογόνο υπό αποφρακτικό ίκτερο σχετικά με το οξειδωτικό στρες (Σχήμα 3.) και ορισμένες κλινικές βιοχημικές παραμέτρους (Πίνακες 1 έως 6) για μια εκτεταμένη χρονική περίοδο (έως 14 ημέρες), μια πειραματική κατάσταση που δεν είχε μελετηθεί προηγουμένως. Συγκεκριμένα οι μετρήσεις μας είχαν σαν στόχο την περιοδική μέτρηση. Το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες φτάνει σε ένα οροπέδιο περίπου στις 10-14 ημέρες υποδηλώνει την ύπαρξη ενδογενών μηχανισμών, οι οποίοι ενεργοποιούνται προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου για να αντιμετωπίσουν πιθανές βιοχημικές αλλοιώσεις στον εντερικό βλεννογόνο που προκαλούνται από ίκτερο.

Η υπεροξειδωσία των λιπιδίων και η οξείδωση των πρωτεϊνών αποτελούν ισχυρούς δείκτες οξειδωτικού στρες. [323] Η υπεροξειδωσία των λιπιδίων οδηγεί σε δημιουργία προϊόντων αποδόμησης τους, όπως αλδεϋδικών υπεροξειδίων των λιπιδίων με κύριο εκπρόσωπο την μαλονική διαλδεϋδη (MDA), η αύξηση των οποίων αποτελεί απόδειξη για την αντίδραση με δραστικούς μεταβολίτες οξυγόνου.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών (αντίδραση με δραστικούς μεταβολίτες οξυγόνου) οδηγεί σε προσθήκη καρβονυλομάδων σε αυτές.

Το ερώτημα που προκύπτει είναι η προέλευση των δραστικών μεταβολιτών του οξυγόνου και των ελεύθερων ριζών στο έντερο σε κατάσταση αποφρακτικού ικτέρου. Μια πιθανή πηγή προέλευσης είναι η αύξηση στο πλάσμα των χολικών οξέων, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν είτε με άμεσο μηχανισμό οξειδωτικό στρες και αστική καταστροφή είτε έμμεσα με ενεργοποίηση των ιστικών μακροφάγων προς παραγωγή δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου.[324]

Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η ηπατική λειτουργία διαταράχθηκε μετά την απολίνωση του κοινού χοληδόχου πόρου όπως αναμενόταν, αλλά δεν ακολούθησαν όλες οι παράμετροι το ίδιο μοτίβο (Γράφημα 1, Γράφημα 2, Γράφημα.3, Γράφημα.4, Γράφημα.5, Γράφημα.6, Γράφημα. 7, Γράφημα.8). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ολικής και άμεσης χολερυθρίνης έφτασαν στο μέγιστο στις 7 ημέρες μετά την απολίνωση, ενώ εκείνα των SGOT, SGPT και ALP έφτασαν στο αποκορύφωμα τους πολύ νωρίτερα, στις 12 ώρες μετά την απολίνωση, και τα επίπεδα GGT συνέχισαν να αυξάνονται έως και 14- ημέρα μετά την απολίνωση τουλάχιστον. Όσον αφορά άλλες βιοχημικές παραμέτρους, η CRP έδειξε επίσης το υψηλότερο επίπεδο την 7η ημέρα, επιστρέφοντας στις φυσιολογικές τιμές έως την 14η ημέρα, το επίπεδο αμυλάσης αυξήθηκε από τις 48 ώρες και παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο τουλάχιστον έως την 14η ημέρα και εμφανίστηκαν επίπεδα LDH να είναι πρακτικά ανεπηρέαστος. Επιπλέον, τα επίπεδα ενδοτοξίνης δεν παρουσίασαν σημαντική διακύμανση με την πάροδο του χρόνου μετά την απολίνωση του κοινού χοληδόχου πόρου και δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα ενδοτοξίνης στο περιφερικό φλεβικό αίμα, στο αρτηριακό αίμα ή στο αίμα της πυλαίας φλέβας. Ως εκ τούτου, το φορτίο των gram-αρνητικών βακτηρίων που διέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος δεν παρουσιάζει αυξητική τάση κατά τις πρώτες 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της απόφραξης του χοληδόχου πόρου και αυτή η τάση ήταν επίσης πρακτικά παρόμοια στην περιφερική φλεβική, αρτηριακή και πυλαία φλεβική κυκλοφορία.

Η απολίνωση του χοληδόχου πόρου προκαλεί οξειδωτικό στρες στην πρόοδο του χρόνου, η οποία ανιχνεύεται τουλάχιστον 14 ημέρες μετά την απολίνωση. Η διακύμανση των επιπέδων των μετρούμενων δεικτών του οξειδωτικού στρες (Σχήμα 3.) μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι το οξειδωτικό στρες είναι πολυπαραμετρικό ως προς τις διάφορες αιτίες του και τις σχετικές μοριακές οξειδωτικές τροποποιήσεις που δημιουργούνται και την αντιοξειδωτική άμυνα που δρα αντίθετα. Επίσης, είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι παραλλαγές στις δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες. Η μείωση του επιπέδου PrMDA σε σύγκριση με την αύξηση του επιπέδου PrC=O κατά 48% στο έντερο στις 14 ημέρες (Σχήμα 1) μπορεί να εξηγείται από την πιο αποτελεσματική αποικοδόμηση του PrMDA από το πρωτεάσωμα από ότι από τις καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους που διαφεύγουν της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα, ενώ οι μέτρια καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται πιο αποτελεσματικά.

Η επίδραση του αποφρακτικού ίκτερου στο εντερικό οξειδωτικό στρες σε αρουραίους, που αξιολογήθηκε επίσης από τα PrMDA και PrC=O, έχει εξεταστεί προηγουμένως μόνο σε ένα μόνο μεσοδιάστημα 10 ημερών μετά την απολίνωση, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς προσδιορισμούς για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες σε ολικές πρωτεΐνες και λιπίδια. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη διερεύνησε μια πιο λεπτομερή χρονικά εξαρτώμενη εξέλιξη αυτής της επίδρασης (έως 14 ημέρες), εστιάζοντας στην οξείδωση πρωτεϊνών με καινοτόμους ειδικούς προσδιορισμούς. Στην προηγούμενη μελέτη, το επίπεδο MDA μετρήθηκε στο διαυγές ομογενοποιημένο έντερο (χρησιμοποιώντας ένα, τώρα γνωστή ως, μη ειδική φωτομετρική δοκιμασία MDA), που αντιπροσωπεύει το συνολικό MDA (ελεύθερο MDA και κυρίως PrMDA), ήταν ~160 pmol MDA/mg για έλεγχο/ψευδή και ~200 pmol MDA/mg, ή μια αύξηση 20%, στις 10 ημέρες. Στην παρούσα μελέτη, το φθοριομετρικά μετρούμενο επίπεδο PrMDA όταν προεκταθεί σε 10 ημέρες δείχνει αύξηση ~30% (σύμφωνα με τα δεδομένα που φαίνονται στο Σχήμα 1). Αναφορικά με τον δείκτη οξειδωτικού στρες PrC=O, η αύξησή του κατά 48% (μετρούμενη με τη χρήση της ειδικής ανάλυσης RBH) στις 14 ημέρες μπορεί να συγκριθεί με εκείνη στις 10 ημέρες στην προηγούμενη μελέτη, η οποία λήφθηκε χρησιμοποιώντας τη μη ειδική ανάλυση stdDNPΗ και παρουσιάζει αύξηση 52%. Ωστόσο, όσον αφορά την τιμή ποσοστού 14 ημερών στην παρούσα μελέτη (ακόμη και αυτή του ~25% όταν προέκταση σε 10 ημέρες (Σχήμα 3.) όταν θεωρηθεί ως απόλυτη τιμή, σε nmoles πρωτεΐνης PrC=O mg<sup>-1</sup>, ήταν ~4 -πλάσια χαμηλότερη από αυτή της απόλυτης τιμής 10 ημερών στην προηγούμενη μελέτη. Μια τέτοια μεγάλη διαφορά στο επίπεδο του δείκτη PrC=O οφείλεται σε ορισμένα, επί του παρόντος γνωστά, προβλήματα υπερεκτίμησης της δοκιμασίας stdDNPΗ (σε αντίθεση με τη χρησιμοποιούμενη δοκιμασία RBH), όπως αναποτελεσματική πλύση DNPΗ που δεν αντέδρασε, παρεμβολή DNA εάν όχι αφαιρέθηκε από την απομονωμένη πρωτεΐνη και η φωτομετρική της ποσοτικοποίηση (στα 280 nm).

Συμπερασματικά, η απολίνωση του χοληδόχου πόρου προκάλεσε οξειδωτικό στρες (αξιολογήθηκε με χρήση σύγχρονων αξιόπιστων μεθοδολογιών) με πρόοδο του χρόνου, η οποία κορυφώθηκε προοδευτικά τουλάχιστον έως και 14 ημέρες μετά την απολίνωση του κοινού χοληδόχου πόρου. Αυτό το φαινόμενο συνοδεύτηκε από διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας μετά την απολίνωση, όπως αναμενόταν, αλλά δεν ακολούθησαν όλες οι παράμετροι, βιοχημικά και επίπεδα ενδοτοξίνης, το ίδιο μοτίβο.

Η πιθανή κλινική σημασία της μελέτης μας, θα αφορούσε την διαπίστωση του οξειδωτικού στρες και κατ' επέκταση της βλάβης του εντερικού βλεννογόνου σε σχέση με την πάροδο του χρόνου σε καταστάσεις αποφρακτικού ίκτερου. Προηγούμενες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών βελτιώνει τόσο την ιστολογία όσο και τη λειτουργία του εντερικού βλεννογόνου αλλά και του ήπατος [325]. Συνεπώς η περαιτέρω μελέτη σε αυτό το πεδίο προσφέρει ένα ευρύ φάσμα έρευνας τόσο σε πειραματικά όσο και κλινικά μοντέλα.

Πίνακας 1. Σύγκριση 12 ώρες μετά την επέμβαση							
Parameter	Control		Sham		Ligation		P-value
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	
T-Bil	0.12 (0.01)	0.12 (0.11-0.13)	0.19 (0.03)	0.19 (0.16-0.22)	3.56 (0.66)	3.48 (2.81-4.81)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
D-Bil	0.02 (0)	0.02 (0.02-0.02)	0.085 (0.035)	0.085 (0.05-0.12)	3.33 (0.59)	3.24 (2.68-4.4)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
SGOT	104 (17)	104 (87-121)	150.5 (32.5)	150.5 (118-183)	2007.9 (1393.1)	1422 (1235-5639)	0.005
	Control vs Sham: p=0.622, Control vs Ligation: p=0.024, Sham vs Ligation: p=0.026						
SGPT	32.5 (2.5)	32.5 (30-35)	41.5 (2.5)	41.5 (39-44)	1202.8 (363.9)	1025 (917-2101)	0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.006, Sham vs Ligation: p=0.006						
GGT	1.5 (0.5)	1.5 (1-2)	4.5 (3.5)	4.5 (1-8)	11 (4)	10.5 (7-20)	0.03
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.052, Sham vs Ligation: p=0.232						
ALP	153.5 (0.5)	153.5 (153-154)	112.5 (12.5)	112.5 (100-125)	642.9 (193.4)	614.5 (343-978)	0.005
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.024, Sham vs Ligation: p=0.015						
LDH	1123 (515)	1123 (608-1638)	2093 (624)	2093 (1469-2717)	1970.4 (848.7)	1985.5 (27-3129)	0.47

Amylase	2309.5 (183.5)	2309.5 (2126-2493)	1869 (88)	1869 (1781-1957)	1494.6 (221.9)	1504 (1130-1781)	0.004
	Control vs Sham: p=0.264, Control vs Ligation: p=0.005, Sham vs Ligation: p=0.209						
CRP	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	0 (0)	0 (0-0)	0 (0)	0 (0-0)	0.004
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.003, Sham vs Ligation: p=0.031						

Πίνακας 2. Σύγκριση 48 ώρες μετά την επέμβαση							
Parameter	Control		Sham		Ligation		P-value
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	
T-Bil	0.12 (0.01)	0.12 (0.11-0.13)	0.14 (0.01)	0.14 (0.13-0.14)	10.29 (3.26)	8.9 (7.87-17.42)	0.025
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.013, Sham vs Ligation: p=0.013						
D-Bil	0.02 (0)	0.02 (0.02-0.02)	0.04 (0.01)	0.04 (0.04-0.05)	9.6 (2.66)	8.59 (7.29-15.14)	0.002
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.006, Sham vs Ligation: p=0.006						
SGOT	104 (17)	104 (87-121)	130 (21)	130 (109-151)	995 (299.2)	1113 (363-1259)	0.005
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.017, Sham vs Ligation: p=0.02						
SGPT	32.5 (2.5)	32.5 (30-35)	39.5 (4.5)	39.5 (35-44)	843.7 (311.3)	1003 (219-1106)	0.01
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.032, Sham vs Ligation: p=0.034						

GGT	1.5 (0.5)	1.5 (1-2)	1 (0)	1 (1-1)	15 (3.1)	14 (11-20)	0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.002, Sham vs Ligation: p=0.002						
ALP	153.5 (0.5)	153.5 (153-154)	117.5 (5.5)	117.5 (112-123)	609.8 (169.4)	563.5 (435-915)	0.007
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.028, Sham vs Ligation: p=0.019						
LDH	1123 (515)	1123 (608-1638)	2111 (882)	2111 (1229-2993)	1359.7 (662)	1357 (543-2594)	0.47
Amylase	2309.5 (183.5)	2309.5 (2126-2493)	1785.5 (189.5)	1785.5 (1596-1975)	1870.2 (330)	1721.5 (1617-2562)	0.278
CRP	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	0.06 (0.06)	0.06 (0-0.12)	0 (0)	0 (0-0)	0.014
	Control vs Sham: p=0.757, Control vs Ligation: p=0.02, Sham vs Ligation: p=0.167						

Πίνακας 3. Σύγκριση 7 ημέρες μετά την επέμβαση

Parameter	Control		Sham		Ligation		P-value
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	
T-Bil	0.12 (0.01)	0.12 (0.11-0.13)	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	13.86 (2.02)	12.86 (11.43-17.25)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
D-Bil	0.02 (0)	0.02 (0.02-0.02)	0.01 (0)	0.01 (0.01-0.01)	11.61 (1.63)	10.65 (9.68-14.37)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
SGOT	104 (17)	104 (87-121)	141.5 (0.5)	141.5 (141-142)	544 (282.9)	490 (253-1275)	0.019



	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.041, Sham vs Ligation: p=0.212						
SGPT	32.5 (2.5)	32.5 (30-35)	49.5; (1.5)	49.5 (48-51)	159.7 (79.6)	127 (91-361)	0.019
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.041, Sham vs Ligation: p=0.212						
GGT	1.5 (0.5)	1.5 (1-2)	2 (0)	2 (2-2)	36.7 (11.4)	35 (20-58)	0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.006, Sham vs Ligation: p=0.006						
ALP	153.5 (0.5)	153.5 (153-154)	122 (2)	122 (120-124)	475.6 (52.9)	485 (393-555)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
LDH	1123 (515)	1123 (608-1638)	2273.5 (29.5)	2273.5 (2244-2303)	1856.6 (871.8)	2032 (465-3327)	0.421
Amylase	2309.5 (183.5)	2309.5 (2126-2493)	2084.5 (35.5)	2084.5 (2049-2120)	1875.6 (192.3)	1829 (1506-2216)	0.048
	Control vs Sham: p=0.865, Control vs Ligation: p=0.06, Sham vs Ligation: p=0.638						
CRP	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	6.05 (0.45)	6.05 (5.6-6.5)	5.3 (2)	5.8 (0-7.3)	0.013
	Control vs Sham: p=0.031, Control vs Ligation: p=0.016, Sham vs Ligation: p=1						

Πίνακας 4. Σύγκριση 14 ημέρες μετά την επέμβαση							
Parameter	Control		Sham		Ligation		P-value
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	
T-Bil	0.12 (0.01)	0.12 (0.11-0.13)	0.08 (0.03)	0.08 (0.06-0.11)	11.77 (2.33)	11.57 (8.2-16)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
D-Bil	0.02 (0)	0.02 (0.02-0.02)	0.09 (0.01)	0.09 (0.01 to 0.17)	9.32 (1.81)	9.22 (6.6-12.54)	<0.001

	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
SGOT	104 (17)	104 (87-121)	129.5 (8.5)	129.5 (121-138)	459.9 (56.2)	453 (371-544)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p<0.001						
SGPT	32.5 (2.5)	32.5 (30-35)	63 (6)	63 (57-69)	112 (16.5)	106 (86-136)	<0.001
	Control vs Sham: p=0.252, Control vs Ligation: p<0.001, Sham vs Ligation: p=0.008						
GGT	1.5 (0.5)	1.5 (1-2)	3 (2)	3 (1-5)	60.3 (15.6)	63 (42-92)	<0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.001, Sham vs Ligation: p=0.002						
ALP	153.5 (0.5)	153.5 (153-154)	150.5 (14.5)	150.5 (136-165)	479.8 (100.9)	496 (292-600)	0.001
	Control vs Sham: p=1, Control vs Ligation: p=0.004, Sham vs Ligation: p=0.004						
LDH	1123 (515)	1123 (608-1638)	1281 (435)	1281 (846-1716)	1641 (608.2)	1463 (722-3069)	0.538
Amylase	2309.5 (183.5)	2309.5 (2126-2493)	1897.5 (420.5)	1897.5 (1477-2318)	1858.8 (159.8)	1877 (1544-2097)	0.125
CRP	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	0 (0)	0 (0-0)	0 (0)	0 (0-0)	0.002
	Control vs Sham: p=0.023, Control vs Ligation: p=0.002, Sham vs Ligation: p=1						

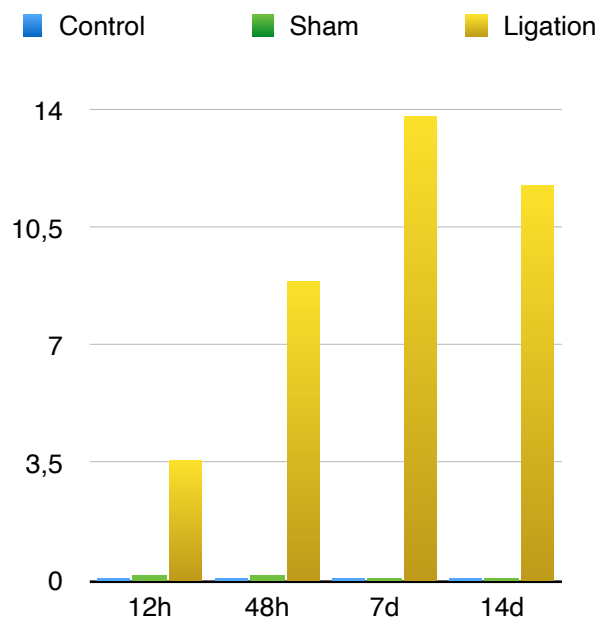
Πίνακας 5. Σύγκριση μεταξύ των sham πειραματοζώων									
Parameter	12 hours		48 hours		7 days		14 days		P-value
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	
T-Bil	0.19 (0.03)	0.19 (0.16-0.22)	0.14 (0.01)	0.14 (0.13-0.14)	0.1 (0)	0.1 (0.1-0.1)	0.08 (0.03)	0.08 (0.06 to 0.11)	0.064

D-Bil	0.085 (0.035)	0.085 (0.05-0.12)	0.04 (0.01)	0.04 (0.04-0.05)	0.01 (0)	0.01 (0.01-0.01)	0.09 (0.01)	0.09 (0.01 to 0.17)	0.702
SGOT	150.5 (32.5)	150.5 (118-183)	130 (21)	130 (109-151)	141.5 (0.5)	141.5 (141-142)	129.5 (8.5)	129.5 (121-138)	0.852
SGPT	41.5 (2.5)	41.5 (39-44)	39.5 (4.5)	39.5 (35-44)	49.5 (1.5)	49.5 (48-51)	63 (6)	63 (57-69)	0.045
12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p=1, 12 hours vs 14 days: p=0.117, 48 hours vs 7 days: p=0.922, 48 hours vs 14 days: p=0.087, 7 days vs 14 days: p=0.46									
GGT	4.5 (3.5)	4.5 (1-8)	1 (0)	1 (1-1)	2 (0)	2 (2-2)	3 (2)	3 (1-5)	0.815
ALP	112.5 (12.5)	112.5 (100-125)	117.5 (5.5)	117.5 (112-123)	122 (2)	122 (120-124)	150.5 (14.5)	150.5 (136-165)	0.165
LDH	2093 (624)	2093 (1469-2717)	2111 (882)	2111 (1229-2993)	2273.5 (29.5)	2273.5 (2244-2303)	1281 (435)	1281 (846-1716)	0.655
Amylase	1869 (88)	1869 (1781-1957)	1785.5 (189.5)	1785.5 (1596-1975)	2084.5 (35.5)	2084.5 (2049-2120)	1897.5 (420.5)	1897.5 (1477-2318)	0.833
CRP	0 (0)	0 (0-0)	0.06 (0.06)	0.06 (0-0.12)	6.05 (0.45)	6.05 (5.6-6.5)	0 (0)	0 (0-0)	<0.001
12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p<0.001, 12 hours vs 14 days: p=1, 48 hours vs 7 days: p<0.001, 48 hours vs 14 days: p=1, 7 days vs 14 days: p<0.001									

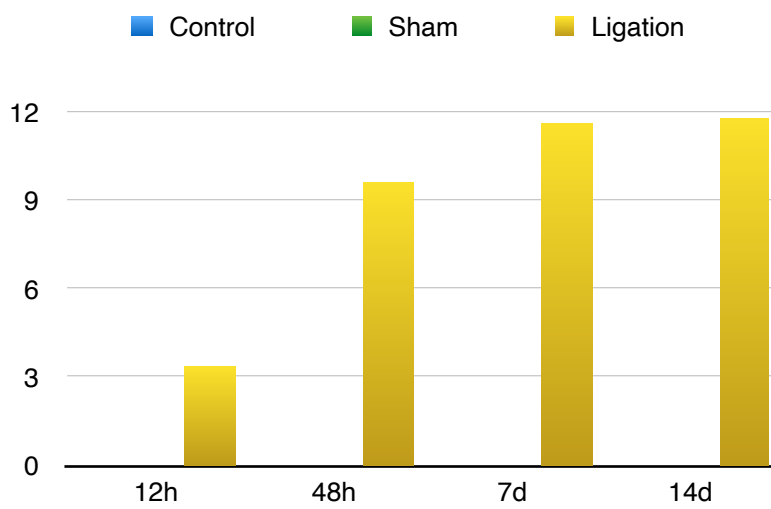
	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	Mean (SD)	Median (min-max)	value
T-Bil	3.56 (0.66)	3.48 (2.81-4.81)	10.29 (3.26)	8.9 (7.87-7.42)	13.86 (2.02)	12.86 (11.43-17.25)	11.77 (2.33)	11.57 (8.2-16)	<0.001
	12 hours vs 48 hours: p=0.179, 12 hours vs 7 days: p<0.001, 12 hours vs 14 days: p=0.006, 48 hours vs 7 days: p=0.364, 48 hours vs 14 days: p=1, 7 days vs 14 days: p=1								
D-Bil	3.33 (0.59)	3.24 (2.68-4.4)	9.6 (2.66)	8.59 (7.29-5.14)	11.61 (1.63)	10.65 (9.68-4.37)	9.32 (1.81)	9.22 (6.6-2.54)	<0.001
	12 hours vs 48 hours: p<0.001, 12 hours vs 7 days: p<0.001, 12 hours vs 14 days: p<0.001, 48 hours vs 7 days: p=0.306, 48 hours vs 14 days: p=1, 7 days vs 14 days: p=0.089								
SGOT	2007.9 (1393.1)	1422 (1235-5639)	995 (299.2)	1113 (363-259)	544 (282.9)	490 (253-275)	459.9 (56.2)	453 (371-544)	<0.001
	12 hours vs 48 hours: p=0.365, 12 hours vs 7 days: p=0.001, 12 hours vs 14 days: p=0.001, 48 hours vs 7 days: p=0.846, 48 hours vs 14 days: p=0.564, 7 days vs 14 days: p=1								
SGPT	1202.8 (363.9)	1025 (917-2101)	843.7 (311.3)	1003 (219-106)	159.7 (79.6)	127 (91-361)	112 (16.5)	106 (86-136)	<0.001
	12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p=0.004, 12 hours vs 14 days: p<0.001, 48 hours vs 7 days: p=0.05, 48 hours vs 14 days: p=0.008, 7 days vs 14 days: p=1								
GGT	11 (4)	10.5 (7-20)	15 (3.1)	14 (11-20)	36.7 (11.4)	35 (20-58)	60.3 (15.6)	63 (42-92)	<0.001
	12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p<0.001, 12 hours vs 14 days: p<0.001, 48 hours vs 7 days: p=0.006, 48 hours vs 14 days: p<0.001, 7 days vs 14 days: p=0.001								
ALP	642.9 (193.4)	614.5 (343-978)	609.8 (169.4)	563.5 (435-15)	475.6 (52.9)	485 (393-55)	479.8 (100.9)	496 (292-600)	0.052
	12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p=0.148, 12 hours vs 14 days: p=0.169, 48 hours vs 7 days: p=0.538, 48 hours vs 14 days: p=0.598, 7 days vs 14 days: p=1								

LDH	1970.4 (848.7)	1985.5 (27-3129)	1359.7 (662)	1357 (543-2594)	1856.6 (871.8)	2032 (465-3327)	1641 (608.2)	1463 (722-3069)	0.529
Amylase	1494.6 (221.9)	1504 (1130-1781)	1870.2 (330)	1721.5 (1617-2562)	1875.6 (192.3)	1829 (1506-2216)	1858.8 (159.8)	1877 (1544-2097)	0.008
12 hours vs 48 hours: p=0.043, 12 hours vs 7 days: p=0.017, 12 hours vs 14 days: p=0.025, 48 hours vs 7 days: p=1, 48 hours vs 14 days: p=1, 7 days vs 14 days: p=1									
CRP	0 (0)	0 (0-0)	0 (0)	0 (0-0)	5.3 (2)	5.8 (0-7.3)	0 (0)	0 (0-0)	<0.001
12 hours vs 48 hours: p=1, 12 hours vs 7 days: p<0.001, 12 hours vs 14 days: p=1, 48 hours vs 7 days: p<0.001, 48 hours vs 14 days: p=1, 7 days vs 14 days: p<0.001									
Endotoxin (peripheral)	9.39 (4.71)	6.9 (5.7-20.8)	8.84 (4.21)	7.3 (5.5-17.1)	10.26 (6.55)	8.3 (5.5-25.9)	10.86 (7.82)	5.9 (5.1-24.9)	0.755
Endotoxin (aorta)	6.61 (1.16)	6.2 (5.5-8.6)	7.03 (1.26)	7.2 (5.2-9.1)	8.83 (4.25)	8.25 (5-17.8)	5.76 (0.51)	5.7 (5.2-6.7)	0.102
Endotoxin (portal)	6.76 (1.09)	6.4 (5.6-8.8)	7.72 (1.85)	7.2 (5.2-10.7)	11.8 (8.56)	7.6 (4.8-30.9)	5.79 (0.78)	5.7 (4.9-7.7)	0.071
Endotoxin (peripheral vs aorta vs portal) (P-value)	P-value: 0.246		P-value: 0.836		P-value: 0.834		P-value: 0.571		

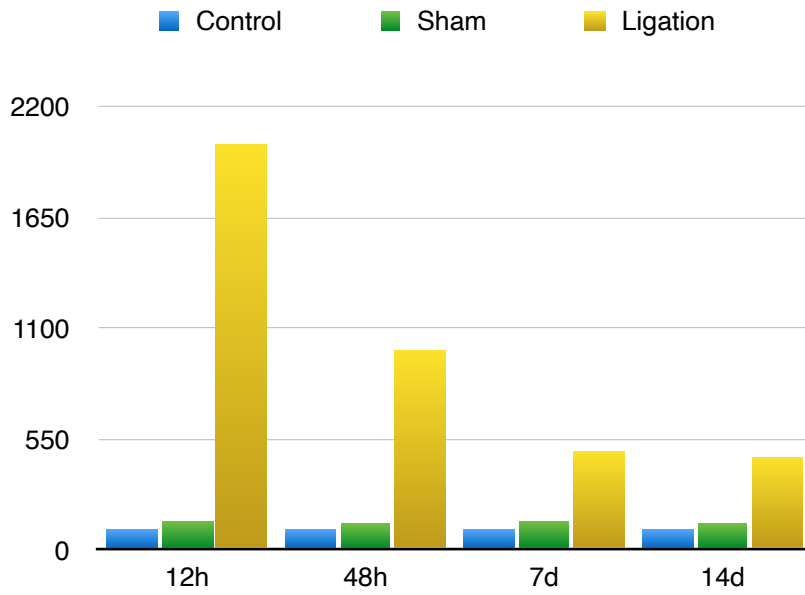
Γράφημα 1. Ολική χολερυθρίνη



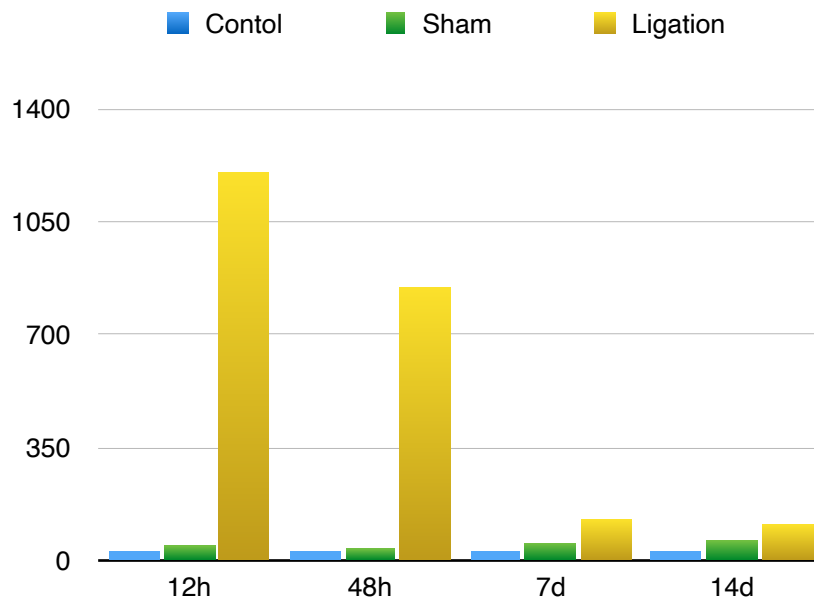
Γράφημα 2. Άμεση Χολερυθρίνη



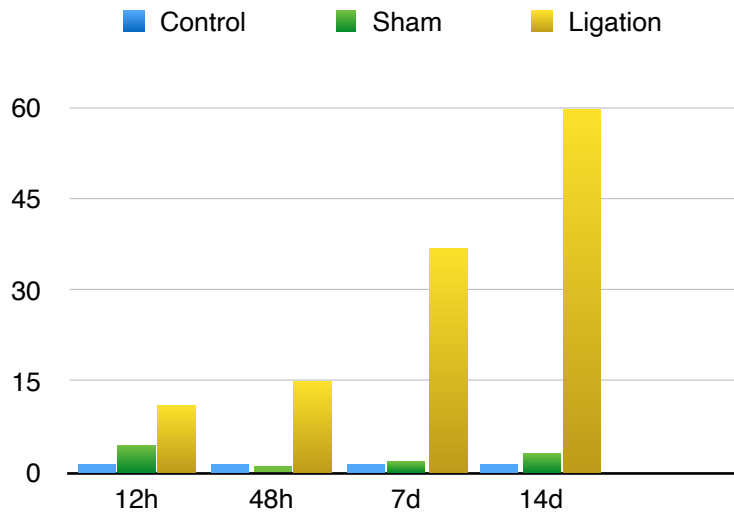
Γράφημα 3. SGOT (IU/L)



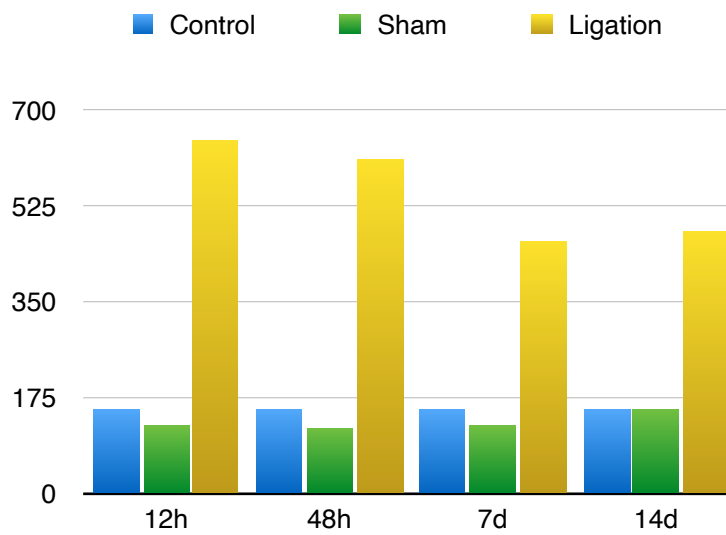
Γράφημα 4. SGPT (IU/L)



Γράφημα 5. GGT (IU/L)

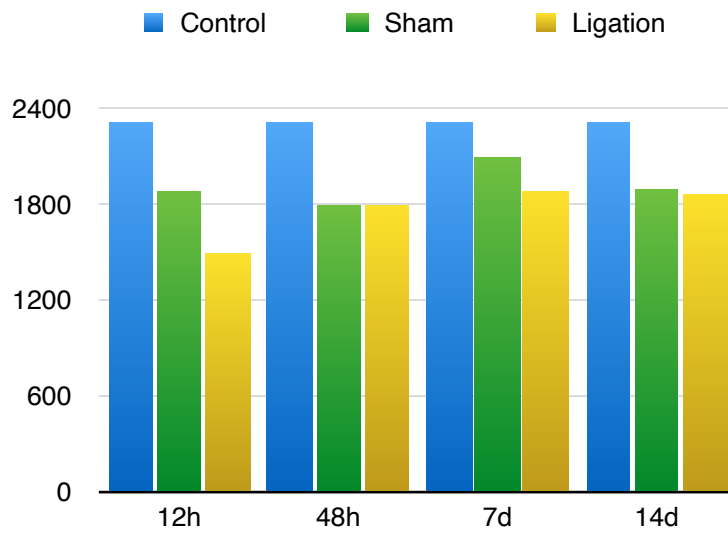


Γράφημα 6. ALP (IU/L)

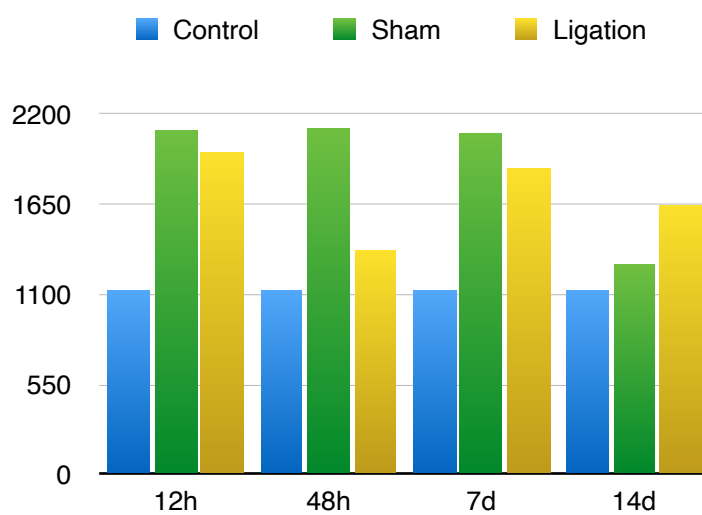




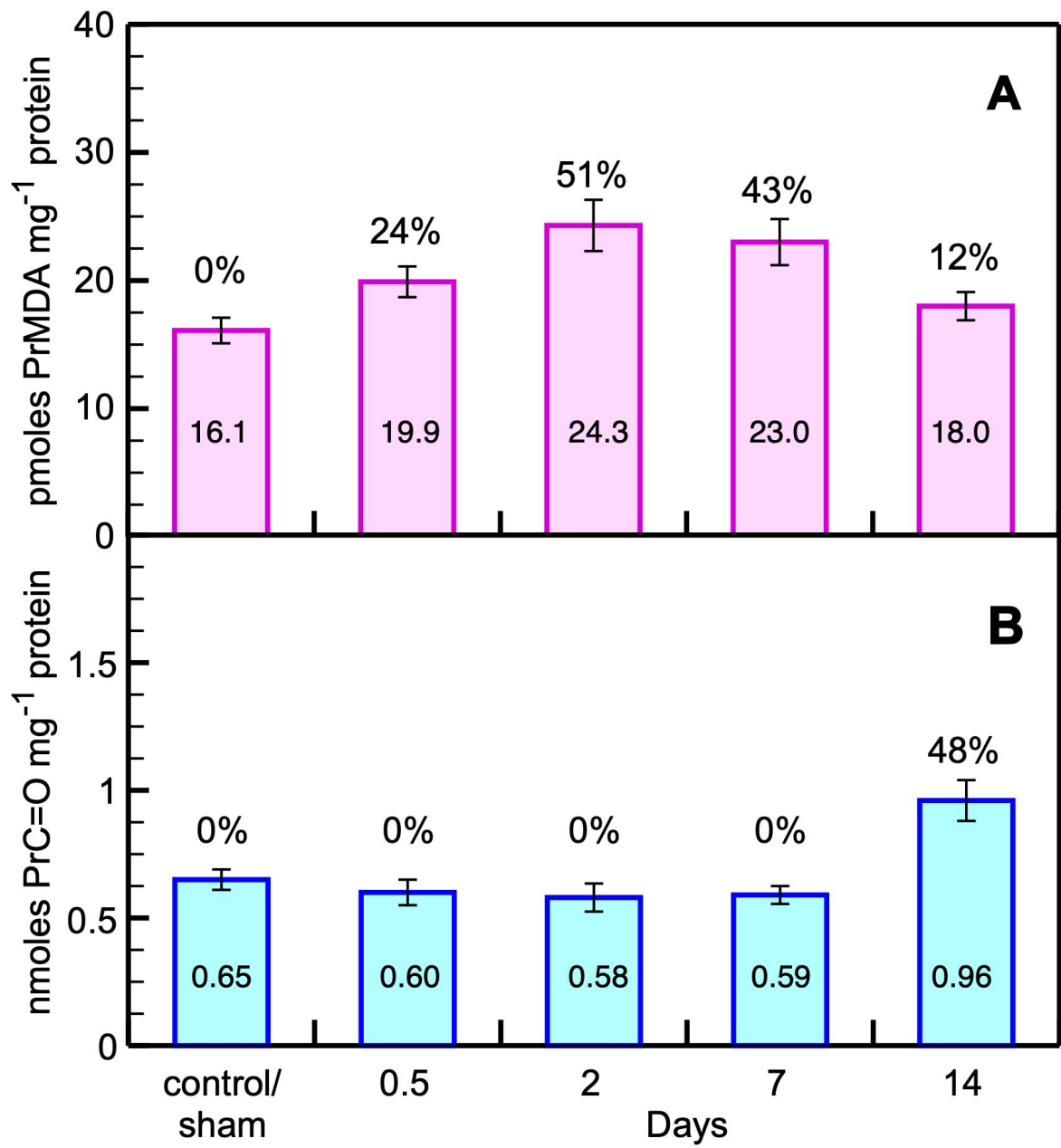
Γράφημα 7. LDH (IU/L)



Γράφημα 8. Amylase (IU/L)



Σχήμα 3. Αξιολόγηση οξειδωτικού στρες στον τελικό ειλεό (εντερικός βλεννογόνος) μεταξύ ζώων με απολίνωση του χοληδόχου πόρου σε διάφορα χρονικά σημεία (σε σχέση με τα control και τα sham). Α. Οξειδωτική τροποποίηση πρωτεΐνης (που προκαλείται από υπεροξειδωμένα λιπίδια) μετά από αντίδραση πρωτεΐνης με MDA (PrMDA). Β. Οξειδωτική τροποποίηση που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες πρωτεΐνης με τη μορφή πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PrC=O). Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SD (μέσοι αριθμοί εντός των ράβδων) και ως % σε σύγκριση με τον μάρτυρα/ψευδή (αμφότερα αποδίδουν στατιστικά παρόμοια μέση τιμή  $\pm$  SD και ορίζονται στο 0%). Στο σχήμα αυτό αναδεικνύεται μια τάση αύξησης του οξειδωτικού στρες, όπως προκύπτει από την παρατήρηση των ομάδων Sham και Control σε σχέση με την ομάδα των 2 ημερών για το PrMDA και την ομάδα των 14 ημερών για το PrC=O. Η αύξηση αυτή και των δύο παραμέτρων ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0,035$ ).



## Περίληψη

Οι ασθενείς με αποφρακτικό ίκτερο, ιδιαίτερα όταν εκτίθενται στο επιπρόσθετο στρες ενός επεμβατικού διαγνωστικού ή θεραπευτικού χειρισμού, είναι επιρρεπείς στην ανάπτυξη σηπτικών επιπλοκών και νεφρικής δυσλειτουργίας που οδηγούν σε υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αποφρακτικός ίκτερος προκαλεί δυσλειτουργία του εντερικού βλεννογόνου και κατ' επέκταση του εντερικού φραγμού, οδηγώντας σε ενδοτοξιναιμία η οποία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των επιπλοκών αυτών. Η απουσία χολής μεταβάλλει τη λειτουργία του εντερικού φραγμού χωρίς να διασπά την συνέχεια του επιθηλίου. Οι μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλουν στο φαινόμενο αυτό δεν έχουν αποσαφηνιστεί.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρεί να διερευνήσει την επίδραση του πειραματικού αποφρακτικού ίκτερου στα επίπεδα οξειδωτικού στρες στον εντερικό βλεννογόνο στην πάροδο του χρόνου. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία χολής ενδοαυτικά, αποστερεί τον εντερικό βλεννογόνο από τις βακτηριοστατικές, αντί-ενδοτοξινικές και τροφικές της ιδιότητες, οδηγώντας σε αύξηση των βακτηριδίων και της ενδοτοξίνης ενδοαυτικά και σε εντερική ατροφία. Οι μεταβολές αυτές προάγουν την μετακίνηση βακτηρίων και ενδοτοξινών στην πυλαία φλέβα και ακολούθως, μέσω μιας κατασταλμένης εκκαθαριστικής ικανότητας των κυττάρων Kupffer, εξαιτίας της χολόστασης, στη συστηματική κυκλοφορία. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν ότι ο αποφρακτικός ίκτερος οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες στο έντερο, όπως τεκμηριώνεται από την αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (PrMDA) και των πρωτεϊνών (PrC=O). Για την οξείδωση των λιπιδίων η μέγιστη τιμή φτάνει στις 7 ημέρες και για τις πρωτεΐνες στις 14 ημέρες, διότι σαν πιο σταθερές δομές χρειάζεται περισσότερος χρόνος για να επιδράσουν οι μεταβολίτες του οξυγόνου πάνω τους. Η ενδοτοξιναιμία και οι αυξημένες συγκεντρώσεις χολικών αλάτων αποτελούν σημαντικούς διεγέρτες της παραγωγής δραστικών μεταβολιτών οξυγόνου. Η παρουσία οξειδωτικού στρες στο έντερο συνεισφέρει στην προαγωγή της αποπτωτικής διεργασίας και στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις κρύπτες, οδηγώντας σε ατροφία του βλεννογόνου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνεται στον αποφρακτικό ίκτερο σε σχέση με την πάροδο του χρόνου σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Οπωσδήποτε απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διευκρίνιση των μηχανισμών δράσης και πιθανής χρήσης αντιοξειδωτικών ουσιών για την αναστροφή της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στον εντερικό βλεννογόνο πριν την περαιτέρω ένταξη των παραμέτρων αυτών στην κλινική πράξη.

## Summary

Patients with obstructive jaundice, particularly when exposed to the added stress of an invasive diagnostic or therapeutic procedure, are prone to develop septic complications and renal dysfunction leading to high rates of morbidity and mortality. Experimental and clinical studies have shown that obstructive jaundice causes a dysfunction of the intestinal mucosa and by extension the intestinal barrier, leading to endotoxemia which seems to play an important role in the development of these complications. The absence of bile alters the function of the intestinal barrier without disrupting the continuity of the epithelium. The molecular mechanisms contributing to this phenomenon have not been elucidated.

This thesis attempts to investigate the effect of experimental obstructive jaundice on the levels of oxidative stress in the intestinal mucosa over time. Previous studies have shown that the absence of intraluminal bile deprives the intestinal mucosa of its bacteriostatic, anti-endotoxin and trophic properties, leading to increased intraluminal bacteria and endotoxin and intestinal atrophy. These changes promote the movement of bacteria and endotoxins into the portal vein and subsequently, through a suppressed clearance capacity of Kupffer cells, due to cholestasis, into the systemic circulation. The results of the present study confirmed that obstructive jaundice led to an increase in oxidative stress in the intestine, as evidenced by an increase in lipid (PrMDA) and protein (PrC=O) peroxidation. For the oxidation of lipids the maximum value reaches 7 days and for proteins 14 days, because as more stable structures it takes more time for the oxygen metabolites to act on them. Endotoxemia and elevated bile salt concentrations are important stimulators of the production of reactive oxygen metabolites. The presence of oxidative stress in the gut contributes to the promotion of the apoptotic process and the inhibition of cell proliferation in the crypts, leading to mucosal atrophy.

In conclusion, the results of the present study show that oxidative stress increases in obstructive jaundice over time in a specific time period. In any case, further studies are needed to clarify the mechanisms of action and the possible use of antioxidant substances to reverse the effect of oxidative stress on the intestinal mucosa before the further inclusion of these parameters in clinical practice.

## Βιβλιογραφία.

- 1.Zhang Y, et al. Obstructive jaundice: from the pathogenesis to clinical treatments. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:7202429.
- 2.Sun Y, et al. Intestinal oxidative stress injury caused by obstructive jaundice in rats. *J Surg Res.* 2014;192(2):507-515.
- 3.Zhu L, et al. Oxidative stress and intestine mucosal epithelial barrier dysfunction in obstructive jaundice rats. *Hepatogastroenterology.* 2014;61(134):1500-1504.
- 4.Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799-809.
- 5.Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002584.
- 6.Plauth M, et al. Endotoxin and tumor necrosis factor-receptor levels in portal and hepatic vein of patients with liver cirrhosis. *Digestion.* 1992;52(2):85-90.
- 7.Wang H, et al. Ischemic preconditioning protects against intestinal ischemia/reperfusion injury via the HIF-1 $\alpha$ /miR-21 axis. *Sci Rep.* 2017;7:42395.
- 8.Zhu Y, et al. Glucagon-like peptide-2 protects integrity of intestinal epithelial barrier via PI3K/Akt-mediated upregulation of ZO-1 in a rat model of obstructive jaundice. *Life Sci.* 2018;203:138-145.
- 9.Fang Y, et al. Oxidative stress induces apoptosis and necrosis in cultured bovine intestinal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;198:34-39.
- 10.Chang YC, Liu JS, Chi TC, et al. Obstructive jaundice-induced gut dysbiosis promotes liver carcinogenesis via activation of Toll-like receptor 4 signaling. *Theranostics.* 2019;9(26):7766-7780. doi:10.7150/thno.37700
- 11.Coimbra J, Gonçalves-Silva I, Figueiredo P, et al. Obstructive cholestasis induces TNF- $\alpha$  release and death by apoptosis in rat hepatocytes. *Pathobiology.* 2014;81(3):99-108. doi:10.1159/000363087
- 12.Demirci C, Yaba A, Aygun C, Tuzcu H, Basar O. Intestinal barrier dysfunction in obstructive jaundice: experimental study in rats. *Hepatogastroenterology.* 2014;61(135):209-215.
- 13.Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- 14.Albillos A, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology.* 2003;37(1):208-217. doi:10.1053/jhep.2003.50041
- 15.Derikx JP, Luyer MD, Heineman E, et al. Gut mucosal permeability in surgical patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(1):41-47. doi:10.1097/MCO.0b013e3282f2bfca

16. Zhang Y, Cao Y, Sun X, Feng X. Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2019;54:172-178. doi:10.1016/j.sleep.2018.11.024
17. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990;125:403-434.
18. Rush BF Jr., Sori AJ, Murphy TF, et al. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1988;207:549-554.
19. Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J, Delaney HP. Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res* 1989;46:104-107.
20. Deitch EA, Winterton H, Berg RD. Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract to mesenteric lymph nodes. *J Infect Dis* 1988;157:1032-1038.
21. Pape HC, Dwenger A, Regel G, et al. Increased gut permeability after multiple trauma. *Br J Surg* 1994;81:850-852.
22. Anderson R, Sun ZW, Wang XD, et al. Effect of a platelet-activating factor antagonist on pancreatitis-associated gut barrier dysfunction in rats. *Pancreas* 1998;17:107-109.
23. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134.
24. Goris RJ, Beekhorst PA, Nuytinck KS. Multiple organ failure: generalized autodestructive inflammation. *Arch Surg* 1985;120:1109-1115.
25. Pain JA, Cahill CJ, Bailey ME. Perioperative complications in obstructive jaundice: therapeutic considerations. *Br J Surg* 1985;72:942-945.
26. Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, et al. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut* 1998;42:293-299.
27. Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Charonis a, et al. Intestinal failure in Obstructive Jaundice. *World J Gastroenterol.* 2005 June 28;11(24):3806-7. doi 10.3748
28. SF Assimakopoulos, KC Thomopoulos, N. Patsoukis, et al. Evidence for intestinal oxidative stress in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest.* 2006 Mar;36(3):181-7. doi: 10.1111/j.1365-2362.2006.01616.x.

29. Clements WD, Parks R, Erwin P, et al. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996;39:587-593.
30. Slocum MM, Sittig KM, Specian RD, Deitch EA. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992;58:305-310.
31. Welsh FK, Ramsden CW, MacLennan K, et al. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann Surg* 1998;227:205-212.
32. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):3-20.
33. Camilleri M. Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med.* 2012;367(17):1626-1635.
34. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799-809.
35. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002584.
36. Shen L, Weber CR, Turner JR. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol.* 2008;181(4):683-695.
37. Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2013 Mar;10(6):352-61. doi: 10.1038/nrgastro.2013.35. PMID: 23507739.
38. Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., & Pigrau, M. (2019). Intestinal barrier function and its relationship to gastrointestinal disease and non-gastrointestinal diseases. *Nutrients*, 11(9), 1933. <https://doi.org/10.3390/nu11091933>
39. Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(1), 3-20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
40. Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799-809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
41. He, Y., Wen, Q., Yao, F., Xu, D., Huang, Y., & Wang, J. (2020). The crosstalk between gut microbiota and gut-brain-liver axis in liver diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(22), 12755-12764. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16063>
42. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004;126(3):693-702. doi: 10.1053/j.gastro.2003.11.055.
43. Potten CS, Booth C, Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: The mucosal governor. *Int J Exp Pathol.* 1997;78(4):219-243. doi: 10.1111/j.1365-2613.1997.tb01018.x.



44. Hafner M, Niehus E, Reischmann N, Hartmann A, Schmitz G, Hofmann C. Intestinal absorption and excretion of cholesterol and its transformation into bile acids in sterol carrier protein 2-null mice. *Hepatology*. 2002;35(5):1090-1097. doi: 10.1053/jhep.2002.32476.
45. Sengupta JN. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009;194:31-74. doi: 10.1007/978-3-540-79090-7\_2.
46. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(5):319-330. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
47. Ivanov AI. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: Current concepts and unanswered questions. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:132-148. doi: 10.1007/978-1-4614-4711-5\_9.
48. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667-685. doi: 10.1038/nri3738.
49. Turner, J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11):799-809. doi: 10.1038/nri2653
50. Bischoff, S.C. (2011) Gut health: a new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9:24. doi: 10.1186/1741-7015-9-24
51. Marchiando, A.M. et al. (2010) Microvilli regulate the localization and activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor 2 (NHERF2). *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47):36486-36496. doi: 10.1074/jbc.M110.143743
52. Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 36:157-165. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.011
53. Zeissig, S. and Blumberg, R.S. (2014) Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nature Immunology*, 15(4):307-310. doi: 10.1038/ni.2847
54. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. and Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2):229-241. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002
55. Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:331-338. doi: 10.1152/physiol.00027.2004
56. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809. doi: 10.1038/nri2653
57. Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF-alpha modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(3):G422-G430. doi: 10.1152/ajpgi.00328.2004
58. Stelios F, Assimakopoulos, Athanasios C Tsamandas, Emanouel Louvros et al. Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients

- with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest*. 2011 Feb;41(2):117-25. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02379.x.
59. Fasano A. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(1):71-78. doi: 10.1007/s12016-011-8291-x
60. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143
61. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):631-659. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x. PMID: 22644152.
62. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-341. doi: 10.1038/nri1057
63. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 2003;21(24):3382-3388. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00336-4
64. Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev*. 2014;260(1):102-117. doi: 10.1111/imr.12192
65. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2011;32(6):256-264. doi: 10.1016/j.it.2011.04.003
66. Stelios F Assimakopoulos, Chrisoula D Scopa, and Constantine E Vagianos. Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice 2007 Dec 28; 13(48): 6458–6464. doi: 10.3748/wjg.v13.i48.6458
67. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):631-659.
68. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
69. Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):352-361.
70. Canny G, McCormick BA. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect Immun*. 2008;76(8):3360-3373.
71. Zeng MY, Inohara N, Núñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2017;10(1):18-26.
72. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-141.
73. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
74. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):467-481. doi: 10.1038/nrmicro3047

75. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:295-329. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
76. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol.* 1983;154(1):269-277. doi: 10.1128/JB.154.1.269-277.1983
77. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384. doi: 10.1038/ni.1863
78. Zhang Y et al. Endotoxin disrupts tight junctions in endothelial cells and causes blood-brain barrier dysfunction. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:204. doi: 10.3389/fncel.2019.00204.
79. Liu W et al. Endotoxin induces disruption of endothelial barrier through MLCK-dependent tight junctions alteration: An implication of cyclic stretch and caveolae involvement. *PLoS One.* 2013;8(1):e54142. doi: 10.1371/journal.pone.0054142.
80. Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermudez-Humaran L, Chatel J, Sokol H, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus kefir* in a mouse model of *Salmonella* infection using molecular approaches. *International Journal of Food Microbiology.* 2013;166(3):249-257.
81. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endotoxin and cardiovascular diseases: chronic endotoxemia in health and disease. *Circulation Journal.* 2009;73(4):625-631.
82. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761-1772.
83. Li W et al. Endotoxin-induced liver injury is regulated by interactions between hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells at the sinusoidal interface. *Liver Int.* 2013;33(9):1324-1336. doi: 10.1111/liv.12220.
84. Hong SB et al. The effect of endotoxin on the production of inflammatory mediators and their receptors in airway epithelial cells. *Korean J Intern Med.* 2010;25(2):168-177. doi: 10.3904/kjim.2010.25.2.168.
85. Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8), 675-680.
86. Opal, S. M. (1992). Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to nephrology*, 101, 170-181.
87. Povoas, P. (2002). C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive care medicine*, 28(3), 235-243.
88. Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1058-1066.
89. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
90. Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., & Pinsky, M. R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*, 29(7), 1303-1310.

91. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1429-1431. doi:10.1126/science.1698311
92. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1584-1589. doi:10.1086/315093
93. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried by normal human plasma and is markedly elevated in patients with gram-negative sepsis. *Clin Res*. 1994;42:Abstract 330.
94. Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1944-1949. doi:10.1161/ATVBAHA.109.194050
95. Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., ... & Ulevitch, R. J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1(6), 509-516. doi: 10.1016/1074-7613(94)90093-0
96. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431-1433. doi: 10.1126/science.1698311
97. Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., ... & Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, 25(2), 187-191. doi: 10.1038/76048
98. Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., & Goyert, S. M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *Journal of Immunology*, 141(2), 547-552. PMID: 2962445
99. Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e66. doi: 10.1038/emm.2013.97
100. Opal, S. M. (2010). Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology*, 167, 14-24. doi: 10.1159/000315914
101. Beutler, B. (2000). Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 3(1), 23-28. doi: 10.1016/s1369-5274(99)00051-0
102. Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499-511. doi: 10.1038/nri1391
103. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863
104. Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917), 885-891. doi: 10.1038/nature01326
105. Schromm, A. B., Lien, E., Henneke, P., Chow, J. C., Yoshimura, A., Heine, H., Latz, E., Monks, B. G., Schwartz, D. A., Miyake, K., Golenbock, D. T. (2001). Molecular genetic

analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 194(1), 79-88. doi: 10.1084/jem.194.1.79

106. Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

107. Mancuso, G. (2011). Midkine: a growth factor that enhances resistance to severe infections by modulating the innate immune response. *Critical Care*, 15(3), 122. doi: 10.1186/cc10121

108. Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 5839-5848. doi: 10.1073/pnas.1714381115

109. Levi, M., & van der Poll, T. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research*, 149, 38-44. doi: 10.1016/j.thromres.2016.11.026

110. Beutler, B. (2000). Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 3(1), 23-28. doi: 10.1016/s1369-5274(99)00051-0

111. Opal, S. M. (2010). Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology*, 167, 14-24. doi: 10.1159/000315914

112. Levi, M., & van der Poll, T. (2010). Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research*, 129(3), 287-292. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.004

113. Hotchkiss, R. S., Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, 348(2), 138-150. doi: 10.1056/NEJMra021333

114. Okuno M, Ueno Y, Zhang ZD, et al. Biliary Obstruction Leads to Delayed Small Intestinal Transit via Reduced Substance P and Increased Nitric Oxide. *J Surg Res*. 2019;245:31-39. doi:10.1016/j.jss.2019.07.034

115. Pereira SP, Oliveira PJ, Tavares LC, et al. Oxidative stress and DNA damage: implications in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2403-2417. doi:10.1097/MIB.0000000000000533

116. Hohenester S, Wenniger LM, Paulusma CC, van Vliet SJ, Jefferson DM, Elferink RP, Beuers U. A biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology*. 2012 Mar;55(3):173-83. doi: 10.1002/hep.24688

117. Lencer WI. Endotoxins make their mark on the intestinal epithelial barrier. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2471-2473. doi:10.1172/JCI95317

118. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219(1):1-14.

119. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.

120. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992;257(5074):1220-1224.
121. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
122. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):361-370.
123. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*. 1996;104 Suppl 3(Suppl 3):465-469.
124. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-247.
125. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
126. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):631-659.
127. Camilleri M. Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(17):1626-1635.
128. Deitch EA. Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care*. 2001;7
129. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473:11-30.
130. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma*. 2001;51(1):S6-S7.
131. Wells CL, Maddaus MA, Reynolds CM, Jechorek RP, Simmons RL. Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. *Infect Immun*. 1988;56(5):1062-1068.
132. Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon*. 2012;10(6):350-356.
133. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(4):631-659.
134. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-1836.
135. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475-487.
136. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-150.
137. Gerova VA, Stoyanov SG, Katsarov DS, Svinarov D. Increased intestinal permeability in inflammatory bowel diseases assessed by iohexol test. *World J Gastroenterol*. 2011;17(17):2211-2215.

138. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014
139. Kowalski C, Beutheu Youmba S, Bobin-Dubigeon C, et al. Increased oxidative and nitrosative stress in the jejunum of patients with leaky gut. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(4): 449-456.
140. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*. 2013;182(2): 375-387.
141. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
142. Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2765-2778.
143. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1 $\beta$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008;180(8):5653-5661.
144. Rao RK, Samak G. Bile duct epithelial tight junctions and barrier function. *Tissue Barriers*. 2013;1(3): e25718.
145. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and human colonic permeability and its significance to drug absorption and delivery. *Int J Pharm*. 2008;364(2): 264-273.
146. Stelios F Assimakopoulos, Adamantios G Mavrakis, Konstantinos Grintzalis et al. Superoxide radical formation in diverse organs of rats with experimentally induced obstructive jaundice. *Redox Rep* 2008;13(4):179-84. doi: 10.1179/135100008X308902.
147. Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand*. 2004 Feb;180(2):177-85. doi: 10.1046/j.0001-6772.2003.01229.x.
148. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322. doi: 10.1104/pp.106.077073
149. Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189. doi: 10.1038/nri1312
150. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1-13. doi: 10.1042/BJ20081386
151. Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
152. SOD, catalyze the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide, limiting its reactivity and potential damage. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26865/>
153. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The*

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(1), 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

154.Cadenas, E. (2018). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 305-329. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012419

155.Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883. doi: 10.1126/science.1130481

156.Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 26(1), 1-14. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.016

157.D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824. doi: 10.1038/nrm2256

158.Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15. doi: 10.1083/jcb.201102095

159.Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press.

160.Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.

161.Pryor, W. A. (1994). Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *The American Journal of Physiology*, 266(4 Pt 1), L599-L608. doi: 10.1152/ajplung.1994.266.4.L599

162.Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a012559. doi: 10.1101/cshperspect.a012559

163.Stadtman, E. R., & Berlett, B. S. (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical Research in Toxicology*, 10(5), 485-494. doi: 10.1021/tx960162x

164.Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278-286. doi: 10.1038/nchembio.85

165.Foote, C. S. (1976). Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2041-2047. doi:10.1016/S0021-9258(17)33527-0

166.Girotti, A. W. (1990). Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6(4), 343-358. doi:10.1016/1011-1344(90)85144-4

167.Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 761-770. doi:10.1016/S0006-291X(03)00889-5



- 168.Sarna, T. (2013). Singlet oxygen, a free radical intermediate in photosensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 130, 1-12. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.09.004
- 169.Redmond, R. W., & Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 70(4), 391-475. doi:10.1562/0031-8655(1999)070<0391:acosoy>2.3.co;2
- 170.Radi, R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26464-26472. doi: 10.1074/jbc.R113.472936
- 171.Kubes, P., & Granger, D. N. (1992). Nitric oxide modulates microvascular permeability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 262(2 Pt 2), H611-H615. doi: 10.1152/ajpheart.1992.262.2.H611
- 172.Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, 329(27), 2002-2012. doi: 10.1056/NEJM199312303292706
- 173.Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006
- 174.Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., & MacNee, W. (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 4), 523-527. doi: 10.1289/ehp.01109s4523
- 175.Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 17(1), 3-8. doi: 10.1023/a:1027368111887
- 176.Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press.
- 177.Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014. doi: 10.1155/2014/360438
- 178.Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology and medicine*, 11(1), 81-128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6
- 179.Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- 180.Sies, H. (2014). Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of biological chemistry*, 289(13), 8735-8741. doi: 10.1074/jbc.R113.544635
- 181.Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x
- 182.Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), 23-38. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2

183. Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93-109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007
184. Dizdaroglu, M. (2003). Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 17-33. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002
185. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687
186. Forman, H. J., Davies, K. J., & Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 24-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045
187. Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*, 401(1), 1-11. doi: 10.1042/BJ20061131
188. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev
189. Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L., & Di Mascio, P. (1999). Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(2), 141-148. doi: 10.1039/a801548i
190. Hegde, M. L., Hazra, T. K., & Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18(1), 27-47. doi: 10.1038/cr.2008.6
191. Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685-698. doi: 10.1038/nrc3365
192. Yang, J. L., Weissman, L., & Bohr, V. A. (2014). Oxidative damage and mitochondrial DNA repair: implications for NRTIs-induced DNA damage. *Mitochondrion*, 17, 130-138. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.007
193. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922. doi: 10.1073/pnas.90.17.7915
194. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687
195. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(1):4-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
196. Carr AC, Maggini S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*. 2017;9(11):1211. doi: 10.3390/nu9111211
197. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431

198. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270-278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498
199. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24(6):345-351. doi: 10.1016/s0098-2997(03)00030-x
200. Bentinger M, Tekle M, Brismar K, Chojnacki T, Swiezewska E, Dallner G. Polyisoprenoid epoxides stimulate the biosynthesis of coenzyme Q and inhibit cholesterol synthesis. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31790-31796. doi: 10.1074/jbc.M300354200
201. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431
- 202.170. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002
203. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
204. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3143-3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008
205. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(3-4):145-155. doi: 10.1016/s0753-3322(03)00043-x
206. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;238(3):215-220. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.011
207. Nordberg M, Nordberg GF. Metallothioneins: historical overview and state of knowledge. *Metallothioneins in Biochemistry and Pathology*. 2018;16:1-12. doi: 10.1007/978-3-319-68137-2\_1
208. Vasák M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19(1):13-17. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.03.004
209. Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*. 1957;79(16):4813-4814. doi: 10.1021/ja01572a063
210. Sutherland DEK, Stillman MJ. The chemistry of mercury-protein complexes. *Coord Chem Rev*. 2011;255(9-10):1177-1187. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.015
211. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J*. 1995;14(4):639-649. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07064.x
212. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003;533(1-2):201-209. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004
213. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-6055. doi: 10.1016/S0021-9258(19)52486-6

214. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1986;58:61-97. doi: 10.1002/9780470122736.ch2
215. Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 1955;2:764-775. doi: 10.1016/S0076-6879(55)02300-8
216. Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci.* 1985;36(17):1569-1575. doi: 10.1016/0024-3205(85)90401-3
217. Hirota K, Nakamura H, Yodoi J. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:865-871. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.014
218. Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431
219. Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3143-3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008
220. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
221. Holmgren, A. (1979). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8), 3672-3678.
222. Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-600. doi: 10.3109/10409239509083491
223. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., & Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: A regulatory node in redox signaling. *Redox Reports*, 14(3), 122-129. doi: 10.1179/135100009x12525712491046
224. Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 549-561. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004
225. Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008
226. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687
227. Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), 158-167. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025
228. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2-18. doi: 10.1104/pp.110.167569

229. Jacob, C., & Holme, A. L. (2007). Fry, F.H. (2007). The chemistry and biology of sulfur-containing molecules. Springer.
230. Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002
231. Lo Conte, M., Carroll, K. S. (2013). The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfynylation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26480-26488. doi: 10.1074/jbc.R113.464600
232. Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
233. Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883. doi: 10.1126/science.1130481
234. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., & Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: A regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(2), 85-96. doi: 10.1016/j.tibs.2008.11.002
235. Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103-115. doi: 10.1038/cr.2010.178
236. Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343-1374. doi: 10.1089/ars.2007.1957
237. Allen RG, Venkatraj VS. Oxidants and antioxidants in development and differentiation. *J Nutr* 1992;122:631–635.
238. Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* 1990;25:499–522.
239. Allen RG, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989;6:631–661.
240. Frank L, Groseclose EE. Preparation for birth into an O<sub>2</sub>-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res* 1984;18:240–244.
241. Frank L. Oxygen toxicity in eukaryotes. In: L.W. Oberley, (Ed), *Superoxide Dismutase*. Vol. III, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 1–44.
242. Sandritter W, Krygier A. Cytophotometrische Bestimmung von proteingebundenen Thiolen in der Mitose und Interphase von HeLa-Zellen. *Z Krebsforsch* 1959;62:596–610.

- 243.Li N, Oberley TD. Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase- overexpressing NIH/3T3 fibroblast during the cell cycle. *J Cell Physiol* 1998;177:148–160.
- 244.Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 1991;46:181–186.
- 245.Romero FJ, Zukowski D, Mueller-Klieser W. Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture. *Am J Physiol* 1997;272:C1507–C1512.
- 246.Post G.B., Keller D.A., Connor K.A. and Menzel D.B. Effects of culture conditions on glutathione content in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983;114:737–742.
- 247.Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, et al. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1208– 1218.
- 248.Alaluf S, Muir-Howie H, Hu HL, Evans A, Green MR. Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. *Differentiation* 2000;66:147– 155
- 249.Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147- 157.
- 250.Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996;378:107–110.
- 251.Searle J, Kerr FJ, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229– 259.
- 252.Lee Y, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 1999;274:19792–19798.
- 253.Lelli JL, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25:694–702.
- 254.Eastman A. The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. In: B. Lippert, (Ed), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, Zurich, Switzerland, 1999, pp. 111–134.

255. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol* 1998;273:11401–11404.
256. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33
257. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
258. Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316. doi: 10.1126/science.281.5381.131
259. Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220
260. Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59. doi: 10.1038/nrm2308
261. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1
262. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308. doi: 10.1126/science.281.5381.1305
263. Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., ... & Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell*, 11(2), 529-541. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00050-0
264. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
265. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308. doi: 10.1126/science.281.5381.1305
266. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81874-7
267. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80434-1
268. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80501-2
269. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33

270. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656. doi: 10.1038/nrc883
271. Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037
272. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239-252. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00116-1
273. Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 897-907. doi: 10.1038/nrm1496
274. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
275. Sansonetti, P. J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4(12), 953-964. doi: 10.1038/nri1499
276. Chassaing, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1720-1728. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.054
277. Dinarello, C. A. (2005). Interleukin-1 $\beta$  and the pathogenesis of the acute-phase response. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1396-1406. doi: 10.1056/NEJMra043967
278. Zhu, H., & Dong, Y. (2007). Reactive oxygen species and the pathogenesis of gastrointestinal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(10), 791-799. doi: 10.3390/i8100791
279. Kim, I. J., & Blanke, S. R. (2012). Remodeling of the host cell cytoskeleton by *Helicobacter pylori*. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1671-1681. doi: 10.1111/cmi.12017
280. Han, J., & Kaufman, R. J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1329-1338. doi: 10.1194/jlr.R067637
281. Kim, R., & Emi, M. (2007). Molecules involved in T-cell costimulation. *Journal of Experimental Medicine*, 204(11), 2549-2553. doi: 10.1084/jem.20070841
282. Schulze-Osthoff, K., & Los, M. (2000). Apoptosis signaling and cellular homeostasis. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1115-1121. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00423-4
283. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
284. Han, J., & Kaufman, R. J. (2008). Measurement of the unfolded protein response to investigate its role in signaling pathways. *Methods in Enzymology*, 442, 29-41. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01402-7
285. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570-1583. doi: 10.1056/NEJMra0901217



- 286.Kumar, S., & Jat, P. (2007). Gene expression profiling of apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 318(1-2), 84-93. doi: 10.1016/j.jim.2006.10.016
- 287.Linkermann, A., Brasen, J. H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T. B., Kunzendorf, U., & Krautwald, S. (2014). Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*, 81(8), 751-761. doi: 10.1038/ki.2011.471
- 288.Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 347(6), 417-429. doi: 10.1056/NEJMra020831
- 289.Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *The New England Journal of Medicine*, 365(18), 1713-1725. doi: 10.1056/NEJMra1102942
- 290.Franke, A., McGovern, D. P., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T.,... Rioux, J. D. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics*, 42(12), 1118-1125. doi: 10.1038/ng.717
- 291.Boirivant, M., Amendola, A., Butera, A., Sanchez, M., & Di Stefano, R. (1999). The selective increase of p53 gene expression in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 11(11), 1189-1196. doi: 10.1097/00042737-199911000-00010
- 292.Yan, F., & Polk, D. B. (2006). Commensal bacteria in the gut: Learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 22(4), 409-414. doi: 10.1097/01.mog.0000228964.47998.7a
- 293.Pott, J., & Hornef, M. (2012). Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Reports*, 13(8), 684-698. doi: 10.1038/embor.2012.96
- 294.Hruz, P., Zinkernagel, A. S., Jenikova, G., Botwin, G. J., Hugot, J. P., Karin, M.,... Vallance, B. A. (2009). NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through  $\alpha$ -toxin-dependent innate immune activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12873-12878. doi: 10.1073/pnas.0902745106
- 295.Rosenstiel, P., Till, A., Schreiber, S., & Kriegel, C. (2009). NOD-like receptors in inflammatory diseases associated with bacterial infections. *Journal of Molecular Medicine*, 87(9), 881-889. doi: 10.1007/s00109-009-0505-0
- 296.Andreyev, H. J. (2005). Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: The past, the present and the future. *Clinical Oncology*, 17(6), 428-440. doi: 10.1016/j.clon.2005.04.007
- 297.Withers, H. R., & Elkind, M. M. (2009). Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 17(3), 261-267. doi: 10.1080/09553007514550821
- 298.Elkind, M. M., & Whitmore, G. F. (1967). The radiobiology of cultured mammalian cells: Two types of radiation-induced DNA damage and their repair. *Radiation Research*, 29(3), 653-680. doi: 10.2307/3572557

299. Xu, Y., Fang, S., Wei, Y., & Kong, J. (2017). Radioprotective agents in radiation therapy: Mechanisms, roles, and clinical implications. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(3), 387-407. doi: 10.1007/s00432-016-2309-6
300. François, A., & Milliat, F. (2012). Guérin, E., & Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *BioMed Research International*, 2013, 1-14. doi: 10.1155/2013/123241
301. Schimmer, A. D., & Thomas, M. P. (2006). Cytostatic drugs and apoptosis in the intestinal epithelium. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15(6), 677-691. doi: 10.1517/13543784.15.6.677
302. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. doi: 10.1038/sj.onc.1206933
303. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00625-6
304. Johnston, P. G., & Kaye, S. B. (2000). Capecitabine: A novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs*, 11(10), 639-646. doi: 10.1097/00001813-200011000-00001
305. Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1), 94-101. doi: 10.1016/j.ccb.2003.11.001
306. Sonis, S. T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 277-284. doi: 10.1038/nrc1318
307. Kozicky, L., & Sly, L. M. (2018). Cytokine and growth factor signaling in T-cell development, homeostasis, and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), a028589. doi: 10.1101/cshperspect.a028589
308. Bonanno, A., & Tuccillo, F. M. (2012). EGF receptor signalling in stem cell and cancer stem cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 8219-8227. doi: 10.3390/ijms13078219
309. Bjarnason, I., & Takeuchi, K. (2009). Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy. *Journal of Gastroenterology*, 44(Suppl 19), 23-29. doi: 10.1007/s00535-008-2280-1
310. Whittle, B. J., Vane, J. R., & Higgs, E. A. (1980). Prostaglandins in the pathogenesis of peptic ulceration. *British Medical Bulletin*, 36(3), 234-238. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071570
311. Wallace, J. L. (2008). Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiological Reviews*, 88(4), 1547-1565. doi: 10.1152/physrev.00004.2008
312. Stichtenoth, D. O., & Thoren, S. (2002). The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on human platelet function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 28(6), 579-585. doi: 10.1055/s-2002-36746

- 313.Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- 314.Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. doi: 10.1038/bjc.1972.33
- 315.Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i
- 316.Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811. doi: 10.1038/sj.onc.1209608
- 317.Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 275-283. doi: 10.1038/nrm2147
- 318.Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-310. doi: 10.1038/35042675
- 319.Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220
- 320.Georgiou CD., Grintzalis K., Zervoudakis G., Papapostolou I., (2008) Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem* 391:391-403.
- 321.Grintzalis K., Zisimopoulos D., Grune T., Weber D., Georgiou CD. (2013) Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 59:27-35.
- 322.Georgiou CD., Zisimopoulos D., Argyropoulou V., Kalaitzopoulou E., Ioannou PV., Salachas G., Grune T. (2018). Protein carbonyl determination by rhodamine B hydrazine-based fluorometric assay. *Redox Biology* 17:236-245.
- 323.Halliwell B, Gutteridge CMJ. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 1999
- 324.Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, et al. Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* 1996;39:475-478.
- 325.Sokol RJ, McKim JM Jr., Goff MC, et al. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* 1998;114:164-174