

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265189





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ
ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ DNA ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ
ΣΤΡΕΣ**

**ΛΑΜΠΡΟΣ ΝΟΥΣΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Νούση Λάμπρου: 30-11-2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 424^α/9-1-2001

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:
Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Μέλη

Τσελέπης Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Φρλίγγος Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-1-2001

«Μελέτη των μοριακών μηχανισμών πρόκλησης βλαβών στα κυτταρικά συστατικά μετά από έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικό στρες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 613^α/2-10-2007

1. Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Σκαλτσούνης Λεάνδρος, Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
4. Φρλίγγος Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Τσελέπης Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σταλίκας Κων/νος, Επίκουρος Καθηγητής Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» στις 17-12-2007



ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Βαρβάρα

Στην αδελφή μου Ροζαλία



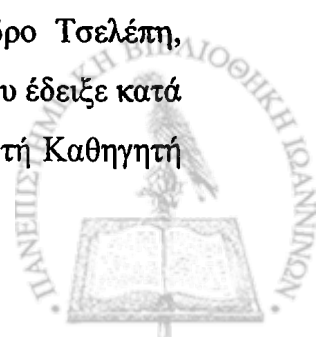
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων για τη θεραπεία των διαφόρων ασθενειών είναι γνωστή από την αρχαιότητα. Σύγχρονες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως οι διατροφικές συνήθειες μπορούν να επηρεάσουν την υγεία και την φυσική κατάσταση του οργανισμού. Η ελιά και το ελαιόλαδο αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής και φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και από ορισμένες μορφές καρκίνου. Σήμερα υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα αναφορικά με τις ιδιότητες και τις δυνατότητες πολυφαινολικών μορίων με αντιοξειδωτική δράση που παράγονται από τα ελαιόδεντρα. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δράσης αυτών των ενώσεων παραμένουν ασαφείς.

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2001 έχοντας ως στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων ελαιόλαδου, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις, που προκαλούνται σε αυτό μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ελαιόλαδου, ενώ στη συνέχεια απομονώθηκαν τα συστατικά του ή και αγοράστηκαν από το εμπόριο καθαρές ενώσεις οι οποίες να μην εμπεριέχουν προσμίξεις με άλλες. Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη των βιολογικών δράσεων των ενώσεων αυτών με την ευαίσθητη μέθοδο του "comet assay". Η έρευνα μας προχώρησε περαιτέρω δίνοντας έμφαση στη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίον οι φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται στα κύτταρα μετά από έκθεση σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και για το αμείωτο και ακούραστο ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θέλω να ευχαριστήσω πολύ τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για το ενδιαφέρον και τη στήριξη που έδειξε κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή



Βιολογικής Χημείας κ. Ευστάθιο Φρυλίγγο μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Άγγελο Ευαγγέλου για το ενδιαφέρον του αλλά και την άψογη συνεργασία που είχαμε καθώς και τον Λέκτορα Βιολογικής Χημείας κ. Σάββα Χριστοφορίδη για το συνεχές του ενδιαφέρον. Ιδιαίτερη συμβολή στην εκπόνηση της διατριβής είχε η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας κ. Σοφία Μητάκου, Επιστημονική Υπεύθυνος του προγράμματος ΠΕΝΕΔ, για το ενδιαφέρον της και τις συμβουλές όποτε τις χρειάστηκα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Θ. Φώτση, τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Λ. Σκαλτσούνη, τον Επίκουρο Καθηγητή Χημικού Τμήματος κ. Κ. Σταλικά καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κ. Θ. Τζαβάρα για τις συμβουλές και τα επικοδομητικά τους σχόλια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στη διδάκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη για τις χρήσιμες συμβουλές της και τη συμπαράσταση της καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες, δρ. Μαρία Μελίδου, δρ. Μαργαρίτα Τενοπούλου, δρ. Πάσχαλη-Θωμά Δούλια, Ζωή Μητρογιάννη και Χρήστο Αμοργιανιώτη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν, καθώς και τα νέα μέλη της ομάδας Βασιλική Σκιαδά, Χαρά Βλάχου και Μιχάλη Μάντζαρη. Ευχαριστώ επίσης και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για τη βοήθειά τους στα διάφορα προβλήματα που παρουσιάστηκαν αλλά και τη συμπαράστασή τους και ιδιαίτερα την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον δρ. Ιωάννη Μήτσιο για την πολύτιμη βοήθεια του στο χειρισμό του μηχανήματος FACS που μου έδωσε τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσω ο Καθηγητής Βιοχημείας κ. Τσελέπης.

Περισσότερο από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Βαρβάρα και την αδερφή μου Ροζαλία για την συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη, δίνοντας μου τη βάση για την περάτωση της Διατριβής μου.

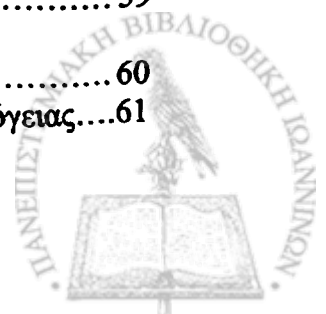


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ	I
ΠΙΝΑΚΕΣ	V
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	VI
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Ελαιόλαδο και Μεσογειακή Δίαιτα	
1.1.1 Ο ρόλος της Μεσογειακής Δίαιτας στην υγεία.....	3
1.1.2 Συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας.....	4
1.2 Ελιά	5
1.2.1 Ιστορική αναδρομή.....	5
1.2.2 Το δέντρο της ελιάς.....	6
1.2.3 Παραγωγή ελαιόλαδου.....	7
1.3 Βιολογικές δράσεις των προϊόντων της ελιάς	8
1.3.1 Φύλλα ελιάς.....	8
1.3.2 Καρπός ελιάς.....	9
1.3.3 Ελαιόλαδο.....	10
1.3.4 Απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου.....	11
1.4 Φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου	12
1.4.1 Υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη.....	13
1.4.2 Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν μέταλλα.....	14
1.5 Οξειδωτικό Στρες και Ελεύθερες Ρίζες	15
1.5.1 Το παράδοξο του οξυγόνου.....	16
1.5.2 Υπεροξειδίο του υδρογόνου.....	19
1.5.2.1 Δημιουργία ριζών του υδροξυλίου (·OH) από το H ₂ O ₂	20
1.5.3 Λιπδιακή υπεροξείδωση.....	21
1.5.4 Βλάβες στις πρωτεΐνες.....	21
1.5.5 Βλάβες στο DNA.....	23
1.5.6 Ο ρόλος του H ₂ O ₂ στη μεταγωγή σήματος.....	24
1.6 Απόπτωση	27
1.6.1 Ο ρόλος των κασπασών στην απόπτωση.....	28
1.6.1.1 Υποστρώματα των κασπασών.....	31
1.6.1.2 Αναστολείς των κασπασών.....	32
1.6.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση.....	33



1.6.3 Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2.....	35
1.7 Σκοπός της μελέτης.....	41
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.1 Υλικά.....	45
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	48
2.2.1 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	48
2.2.2 Διατήρηση κυτταρικής σειράς.....	48
2.2.3 Μέτρηση βιωσιμότητας των κυττάρων.....	49
2.2.4 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	49
2.3 Έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂	49
2.4 Μέτρηση του ρυθμού παραγωγής H₂O₂ απο την οξειδάση της γλυκόζης	50
2.5 Μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο του MTT	50
2.6 Ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης(comet assay).....	50
2.6.1 Πειραματική διαδικασία.....	51
2.6.2 Υπολογισμός της βλάβης.....	52
2.7 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.....	53
2.8 Βαφή του DNA κυττάρων με τη χρωστική Hoechst.....	55
2.9 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	55
2.9.1 Απομόνωση κυτταρικού DNA.....	55
2.9.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA.....	56
2.9.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	56
2.10 Μέτρηση της ενεργότητας της κασπάσης-3.....	57
2.11 Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων.....	58
2.11.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.....	58
2.12 Ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και ανίχνευση πρωτεϊνών.....	59
2.12.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	59
2.12.2 Μεταφορά πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε νιτροκυταρίνη.....	60
2.12.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.....	61



2.13 Μέτρηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού	62
2.14 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων.....	62
2.15 Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου.....	63
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
3.1 Εξέταση ενώσεων από το ελαιόλαδο με την τεχνική comet assay.....	65
3.1.1 Εξέταση εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς, καρπούς ελιάς, ελαιόλαδο και τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου.....	65
3.1.2 Εξέταση ελαιόλαδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος.....	66
3.1.3 Δράση των απομονωμένων συστατικών του ελαιόλαδου στην προστασία του πυρηνικού DNA.....	70
3.2 Προστατευτική ικανότητα των ενώσεων που προέρχονται από το φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου.....	77
3.3 Εξέταση της ικανότητας των φαινολικών ενώσεων να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες.....	86
3.4 Ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο.....	89
3.5 Αναλογίες σιδήρου-υδροξυτυροσόλης και προστατευτική δράση.....	91
3.6 Υδροξυτυροσόλη και απόπτωση.....	93
3.6.1 Επιπτώσεις της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση.....	93
3.6.2 Επιπτώσεις στη μορφολογία των πυρήνων.....	94
3.6.3 Εξέταση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση που προκαλεί το H ₂ O ₂ με την τεχνική ladder pattern.....	94
3.6.4 Αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 από την υδροξυτυροσόλη....	98
3.6.5 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην σχάση της πρωτεΐνης PARP που προκαλεί το H ₂ O ₂	100
3.6.6 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που προκαλεί το H ₂ O ₂	101
3.6.7 Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης στην προστασία του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων σε κύτταρα που εκτίθενται σε H ₂ O ₂	103
3.6.8 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην έκφραση της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.....	105
3.6.9 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών παραγόντων Bid και Bax από H ₂ O ₂	107
3.6.10 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στην προστασία της μεμβράνης των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H ₂ O ₂	111



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	115
4.1 Μελέτη της πρόκλησης βλαβών στο DNA κυττάρων από το H_2O_2	115
4.2 Δράσεις των εκχυλισμάτων του ελαιόλαδου.....	116
4.3 Φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου.....	118
4.3.1 Προστατευτική δράση απομονωμένων ενώσεων του ελαιόλαδου.....	118
4.3.2 Προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου.....	118
4.3.3 Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων.....	119
4.4 Ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει σίδηρο.....	120
4.5 Τοξική δράση των φαινολικών ενώσεων.....	121
4.6 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην απόπτωση.....	122
4.6.1 Υδροξυτυροσόλη και απόπτωση.....	122
4.6.2 Προστατευτική δράση της υδροξυτυροσόλης στα λυσοσωμάτια.....	125
4.7 Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της υδροξυτυροσόλης.....	126
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	129
6. SUMMARY.....	131
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	133



ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1. Ελαιόδεντρα κατά την περίοδο συγκομιδής του ελαιόκαρπου

Σχήμα 2. Δομές των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη

Σχήμα 3. Διαδοχικά βήματα αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια

Σχήμα 4. Η αντίδραση τύπου Fenton

Σχήμα 5. Μοριακοί στόχοι των ριζών υδροξυλίου

Σχήμα 6. Αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στην υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

Σχήμα 7. Αποπτωτικός και νεκρωτικός θάνατος

Σχήμα 8. Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος

Σχήμα 9. Διαγραμματική απεικόνιση της μιτοχονδριακής πορείας του αποπτωτικού θανάτου

Σχήμα 10. Δομικές αναλογίες των προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2

Σχήμα 11. Μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις στην τεχνική 'comet assay'



Σχήμα 12. Προστατευτικές αλλά και τοξικές επιπτώσεις από εκχυλίσματα παραγώγων της ελιάς

Σχήμα 13. Δράση των εκχυλισμάτων ελαιόλαδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2

Σχήμα 14. Χημικές δομές απομονωμένων συστατικών από εκχυλίσματα ελαιόλαδου

Σχήμα 15. Δράση των απομονωμένων φλαβονοειδών από το ελαιόλαδο ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA

Σχήμα 16. Προστασία του κυτταρικού DNA από τη δράση των απομονωμένων σκεκοϊροειδών ενώσεων του ελαιόλαδου

Σχήμα 17. Δράση των απομονωμένων φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA

Σχήμα 18. Χημικές δομές των φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν

Σχήμα 19. Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 1) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2

Σχήμα 20. Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 2) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2

Σχήμα 21. Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 3) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2

Σχήμα 22. Συσχέτιση των τιμών TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) και των τιμών IC_{50} (ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2)



Σχήμα 23: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου

Σχήμα 24: Αναλογίες υδροξυτυροσόλης-σιδήρου και επίδραση στη βλάβη του DNA των κυττάρων από το H_2O_2

Σχήμα 25: Δομές των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη

Σχήμα 26: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στη συμπύκνωση και θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA που προκαλεί το H_2O_2

Σχήμα 27: Επίδραση της τυροσόλης στη συμπύκνωση και θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA που προκαλεί το H_2O_2

Σχήμα 28: Εξέταση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 με την τεχνική ladder pattern

Σχήμα 29: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3

Σχήμα 30: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης στην σχάση του ενζύμου poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) από το H_2O_2

Σχήμα 31: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που προκαλείται από το H_2O_2

Σχήμα 32: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στη διαταραχή του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων από το H_2O_2

Σχήμα 33: Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας και αποπτωτικά 'μονοπάτια' μετά από διάφορα ερεθίσματα



Σχήμα 34: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των αντι-αποπτωτικών παραγόντων Bcl-2 και Bcl-xl από το H_2O_2

Σχήμα 35: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών παραγόντων Bid και Bax από το H_2O_2

Σχήμα 36A: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση τους σε H_2O_2

Σχήμα 36B: Διάγραμμα αναπαράστασης της επίδρασης της υδροξυτυροσόλης στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση τους σε H_2O_2

Σχήμα 37: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης στην απόπτωση.



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g}/\text{ml}$) πολυφαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στα ελαιόλαδα από τις διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος

Πίνακας 3: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και τιμές IC_{50} των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ac-DEVD-AMC: Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin

AO: Acridine orange

A.I.F. Apoptosis inducing factor

Apaf-1: Apoptotic-protease activating factor

APS: Ammonium persulfate, υπερ-θειικό αμμώνιο

ASK 1: Apoptosis Signal-regulating kinase 1

BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

CARD: Caspase Recruitment Domain

CAT: Catalase, καταλάση

CHAPS: (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate

ΔMO: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

DED: Death Effector Domain

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DFO: Desferrioxamine mesilate, δεσφεριοξαμίνη

DTT: Διθειοθρεϊτόλη

EDTA: Ethylenetriamineteteraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ

EGF: Epidermal Growth Factor

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FADD: Fas associated death domain

FACS: Fluorescence Activated Cell Scanner, κυτταρομετρία ροής

FCS: Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου

GO: Glucose oxidase, οξειδάση της γλυκόζης

GP: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

IAPs: Inhibitors of Apoptotic Proteases

ICAD: Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease

JC-1: 5,5', 6,6'-Tetrachloro-1,1', 3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

JNK: c-Jun N-terminal kinases

mRNA: Messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase



- PARP:** poly (ADP-ribose) polymerase
- PBS:** Phosphate buffer saline
- PDGF:** Platelet Derived Growth Factor
- PI:** Propidium Iodide, ιωδιούχο προπίδιο
- PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase
- PKC:** Πρωτεϊνική Κινάση C
- PMSF:** Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride
- Prx:** Περοξειεδοξίνη
- RIP:** Receptor-interacting Protein
- RPMI-1640:** Roswell Park Memorial Institute Media RPMI 1640
- SAPK:** Stress Activated Protein Kinases
- SCGE:** Single Cell Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αгарόζης
- SD:** standard deviation, τυπική απόκλιση
- SDS:** Sodium Dodecacyl Sulphate, δωδεκύλοθειϊκό νάτριο
- SIH:** Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone
- SOD:** Superoxide Dismutase, δισμουτάση του σουπεροξειδίου
- STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription
- tBID:** truncated BID
- TEMED:** N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'- τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
- TNF- α :** Tumor Necrosis Factor- α
- TRADD:** TNF receptor associated death domain
- Tris:** Τρις-υδροξυμεθυλένο-διαμίνη
- Trolox:** 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
- Trypan blue:** Κυανούν του τροπανίου
- UV:** ultraviolet, υπεριώδες



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελαιόλαδο και Μεσογειακή Δίαιτα

1.1.1 Ο ρόλος της Μεσογειακής Δίαιτας στην υγεία

Ο ρόλος της Μεσογειακής δίαιτας ήρθε στην επιφάνεια από επιδημιολογικές μελέτες και ιδιαίτερα τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 7 χώρες (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, Φινλανδία, Ολλανδία, Ιταλία, πρώην Γιουγκοσλαβία, Ιαπωνία και Ελλάδα) μετά από 25 χρόνια συνεχούς παρατήρησης, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάστηκαν τη δεκαετία του 1970. Στην έρευνα αυτή συνδέθηκαν οι διατροφικές συνήθειες των διαφόρων περιοχών της Μεσογείου και κυρίως της Κρήτης, με το μειωμένο ποσοστό καρδιαγγειακών παθήσεων σε σχέση με τους πληθυσμούς των άλλων περιοχών. Παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά θνησιμότητας λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων, στις περιοχές της Μεσογείου και ιδιαίτερα της Κρήτης, ήταν 5 με 10 φορές χαμηλότερα από ότι σε χώρες με άλλες διατροφικές συνήθειες (Keys et al., 1970,).

Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην περαιτέρω μελέτη των διατροφικών συνηθειών των λαών της Μεσογείου. Έτσι, στη συνέχεια, έγιναν νέες μελέτες σε ασθενείς που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε ομάδες με διαφορετική διατροφή επιλεγμένη από διαφορετικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ομάδα που η διατροφή της είχε ως βάση την Κρητική διαίτα, είχε 75% μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες, ενισχύοντας έτσι την άποψη πως η Μεσογειακή διαίτα παίζει σημαντικό ρόλο έναντι ασθενειών όπως είναι η στεφανιαία νόσος (Renaud et al., 1995).

Ο όρος 'Μεσογειακή Δίαιτα' αναφέρεται στις διατροφικές συνήθειες των πληθυσμών των χωρών, που περιβάλλουν τη Μεσόγειο. Όμως μελέτες, σε πληθυσμούς σε χώρες της Μεσογείου έδειξαν μεγάλες διαφορές στις διατροφικές συνήθειες αλλά και την κατάσταση της υγείας τους αυτών των πληθυσμών, κάνοντας έτσι γνωστό πως η Μεσογειακή διαίτα έχει πολλές παραλλαγές και ότι επηρεάζεται από οικονομικούς, θρησκευτικούς και πολιτιστικούς παράγοντες της κάθε περιοχής (Simopoulos, 2000). Οι δίαιτες των περιοχών αυτών αναλύθηκαν και βρέθηκε ότι διαφέρουν ως προς την



κατανάλωση ελαιόλαδου, κρασιού, τύπο κρέατος αλλά και φρούτων και λαχανικών (Simopoulos, 2001). Ακόμη και στην ίδια χώρα οι διατροφικές συνήθειες διαφέρουν όπως για παράδειγμα οι διαφορές στη βόρεια και στη νότια Ιταλία (Hill, 1992, Lupo, 1997). Έτσι, τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών έδειξαν πως οι περιοχές με τον μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων ήταν η Κρήτη, ένα μέρος της νότιας Ελλάδας και η νότια Ιταλία (Keys et al., 1970, Trichopoulou, 1997, Willett et al., 1995), περιορίζοντας έτσι το εύρος των ωφέλιμων συστατικών της Μεσογειακής διαίτας προς μελέτη. Οι ομοιότητες στις διατροφικές συνήθειες των περιοχών αυτών έγινε αντικείμενο μελέτης για πολλές ερευνητικές ομάδες που προσπαθούν να κατανοήσουν τις υγιεινές επιδράσεις της Μεσογειακής διατροφής (de Longenil et al., 1998, Lasheras et al., 2000, Martinez-Gonzalez et al., 2002, Robertson, 2001, Renaud et al., 1995, Trichopoulou 1999).

Τα τελευταία χρόνια, πλήθος νέων μελετών επιβεβαίωσαν τις αρχικές παρατηρήσεις και επιπλέον ενίσχυσαν την άποψη ότι η Μεσογειακή διαίτα συνδέεται με το γενικό χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας (Trichopoulou et al., 1995, 2003, de Longenil et al., 1998, Lasheras et al., 2000) αλλά και το μειωμένο κίνδυνο από καρδιαγγειακές παθήσεις (Martinez-Gonzalez et al., 2002, Renaud et al., 1995, de Longenil et al., 1999) και ότι προστατεύει από διάφορα νεοπλάσματα (Bosetti et al., 2003, Braga et al., 1998, Franceschi et al., 1996, La vecchia et al., 2001, Tavani, 1995, , Trichopoulou et al., 2000, Psaltopoulou et al., 2004).

1.1.2 Συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας

Τα κύρια χαρακτηριστικά της διαίτας των περιοχών αυτών περιλαμβάνουν τα εξής:

1. Υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών
2. Χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος
3. Χαμηλή με μέση κατανάλωση ψαριών
4. Υψηλή κατανάλωση κρασιού
5. Πολύ υψηλή κατανάλωση ελαιόλαδου

Η μεσογειακή διαίτα είναι πλούσια σε μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες και ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και φτωχή σε κορεσμένα λίπη. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της Μεσογειακής διαίτας αποδόθηκαν κατά κύριο λόγο στην αυξημένη κατανάλωση ορισμένων τροφίμων, τα οποία υπήρχαν σε χαμηλές ποσότητες ή ακόμη και απουσίαζαν από τις διατροφικές συνήθειες άλλων περιοχών. Η ανάλυση των



συστατικών των τροφίμων αυτών έδειξε πως είναι πολύ πιθανό οι δράσεις τους να οφείλονται στον μεγάλο αριθμό φαινολικών αλλά και άλλων συστατικών που αυτά περιέχουν. Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής των περιοχών της Μεσογείου και είναι πολύ πιθανό τα συστατικά που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο να παίζουν σημαντικό ρόλο στις επιπτώσεις της διατροφής των περιοχών αυτών στην υγεία. Έτσι ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τον τελευταίο καιρό μελέτες που σχετίζονται με το ελαιόλαδο αλλά και με τα προϊόντα που σχετίζονται με την ελιά.

1.2 Ελιά

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Από την αρχαία Ελλάδα ως και σήμερα η ελιά αποτελεί το ιερότερο δέντρο του τόπου μας συνδεδεμένο άμεσα με την κουλτούρα και τις διατροφικές συνήθειες της χώρας μας. Η παρουσία του ξεκινάει από τη νεολιθική εποχή ενώ για την καταγωγή και την προέλευσή της έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις. Γραπτές μαρτυρίες αναφέρουν ως πιθανό τόπο προέλευσης τη Βόρεια Συρία όπου και ανακαλύφθηκαν κείμενα τα οποία χρονολογούνται από τα μέσα της 3ης χιλιετίας π.Χ. και αναφέρονται στην παραγωγή λαδιού. Άλλες επιστημονικές απόψεις δίνουν ως πατρίδα της ελιάς την Αφρική και πιο συγκεκριμένα την Αίγυπτο όπου υπάρχουν ιστορικές αναφορές για την καλλιέργειά της (Standish, 1960). Οι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν από τους πρώτους την ελιά και τα προϊόντα της στην καθημερινή ζωή και τις τελετουργίες τους. Κείμενα της εποχής του Ραμσή III (1184-1153 π.Χ.) μαρτυρούν ότι ο Φαραώ είχε αφιερώσει εκλεκτό ελαιόλαδο στο θεό του ήλιου Ρα για τους λύχνους του ναού του. Επίσης η αιγυπτιακή λατρεία των νεκρών περιελάμβανε, εκτός από την επάλειψη του σώματος με ελαιόλαδο, το στολισμό τους με περιδέραια στα οποία χρησιμοποιούσαν κλαδιά ελιάς.

Στην Ελλάδα οι ρίζες του δέντρου φτάνουν μέχρι την αρχαιότητα. Στην Μινωική Κρήτη η ελιά ήταν μία από τις σημαντικότερες πηγές ευημερίας ενώ χαρακτηριστική είναι η παρουσία της ελιάς στις μινωικές τοιχογραφίες. Στο πέρασμα των χρόνων οι πληροφορίες για την ελιά πολλαπλασιάζονται και φαίνεται πως η διατροφή, η θρησκεία και η τέχνη των αρχαίων Ελλήνων περιείχαν στοιχεία της ελιάς, το κλαδί της οποίας, χρησιμοποιούνταν ως



σύμβολο ειρήνης, σοφίας και νίκης. Οι νικητές των Ολυμπιακών αγώνων έπαιρναν ως έπαθλο της νίκης τους ένα κλαδί αγριελιάς.

Το δένδρο της ελιάς αναφέρεται συχνότατα και στην ελληνική μυθολογία με χαρακτηριστικότερη αναφορά αυτήν της προέλευσης του ονόματος της πόλης των Αθηνών. Σύμφωνα με το μύθο η θεά της σοφίας Αθηνά φιλονικούσε με το θεό της θάλασσας Ποσειδώνα για την κυριαρχία της πόλης. Το δώρο της θεάς Αθηνάς στην πόλη ήταν ένα ελαιόδεντρο, ενώ αυτό του Ποσειδώνα, ένας πίδακας από αλάτι. Οι πολίτες αποφάσισαν ότι το ελαιόδεντρο ήταν χρησιμότερο και έτσι η πόλη ονομάστηκε Αθήνα.

Το ελαιόδεντρο αναφέρεται συχνά και στην Παλαιά Διαθήκη όπου συμβολίζει το δέντρο της ειρήνης. Επίσης υπάρχουν αναφορές που δείχνουν το λάδι σημαντικό για διάφορες χρήσεις όπως αυτή του φωτισμού της σκηνής όπου φυλάσσεται η Διαθήκη ή αναφορές για τη χρήση αρωματικών ελαίων στις θρησκευτικές τελετές.

Αργότερα το δένδρο της ελιάς εξαπλώθηκε στη βόρεια Ιταλία μέσω των ελληνικών αποικιών. Οι Ρωμαίοι καλλιέργησαν το ελαιόδεντρο σε όλη την έκταση της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας και το χρησιμοποίησαν και ως καλλυντικό και καύσιμο. Η καλλιέργεια του δέντρου της ελιάς παρουσίασε έντονη αύξηση σε ολόκληρο τον κόσμο καθώς και στην Ελλάδα κατά την διάρκεια του 19ου αιώνα. Στα τέλη του αιώνα αυτού, το λιμάνι της Καλαμάτας ήταν ένα από τα πέντε κυριότερα ελληνικά λιμάνια με 185 πλοία γραμμένα στο νηολόγιό του. Πρωτεύουσα θέση στα εξαγόμενα προϊόντα του, είχε το ελαιόλαδο με εξαγωγές που έφθαναν ετησίως τα 6.000 βαρέλια.

1.2.2 Το δέντρο της ελιάς

Το ελαιόδεντρο (*Olea Europea*) είναι ένα δέντρο αειθαλές που ευδοκμεί σε ξηροθερμικές περιοχές (Σχήμα 1). Είναι ένα από τα λίγα δέντρα που ακόμη και σε πετρώδη και άγονα εδάφη, μπορεί να παράγει καρπό. Επίσης, έχει ως κύρια χαρακτηριστικά του τη μακροζωία και την διατήρηση της παραγωγικότητας. Είναι από τα σημαντικά στοιχεία της ελληνικής οικονομίας καθώς υπάρχουν πάνω από 91.000.000 ελαιόδεντρα καλύπτοντας έκταση 6 περίπου εκατομμυρίων στρεμμάτων. Αναλογικά καταλαμβάνει σε έκταση το 20% περίπου της καλλιεργούμενης γης. Το 30% της συνολικής καλλιεργούμενης έκτασης βρίσκεται στην Πελοπόννησο. Στον Ελλαδικό χώρο λειτουργούν 2.800 ελαιοτριβεία, 50 πυρηνελαιουργεία και 200 επιχειρήσεις τυποποίησης ελαιολάδου.





Σχήμα 1: Ελαιόδεντρα κατά την περίοδο συγκομιδής του ελαιόκαρπου.

1.2.3 Παραγωγή ελαιόλαδου

Η επεξεργασία του καρπού της ελιάς από τη συγκομιδή μέχρι την παραγωγή του ελαιόλαδου περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες: 1) Συγκομιδή καρπού, που μπορεί να γίνει με φυσιολογική πτώση, με ραβδισμό ή με μηχανήματα 2) Μεταφορά στο ελαιουργείο όπου γίνεται η παραλαβή του καρπού και το ζύγισμα, 3) Αποφύλλωση, μια διαδικασία απαραίτητη διότι η σύνθλιψη μεγάλης ποσότητας φύλλων μαζί με τον ελαιόκαρπο, προσδίδει πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και το εμπλουτίζει με χλωροφύλλη η οποία επιδρά αρνητικά στη διατήρηση της ποιότητάς του, 4) Πλύσιμο για την απομάκρυνση ξένων



υλικών (σκόνη, χώμα, κ.α.), 5) Σπάσιμο και άλεση, όπου ο ελαιόκαρπος υπόκειται σε άλεση για να ομογενοποιηθεί,

6) Μάλαξη, μια πολύ σημαντική διεργασία όπου διαχωρίζεται το ελαιόλαδο από τα υπόλοιπα φυτικά υγρά, 7) Παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη που πραγματοποιείται με 2 τρόπους: με πίεση και με φυγοκέντριση ή εκλεκτική διήθηση, 8) Τελικός διαχωρισμός και καθαρισμός του ελαιόλαδου, όπου απομακρύνονται οποιαδήποτε στερεά σωματίδια έχουν παραμείνει στο υγρό ελαιόλαδο, 9) Τυποποίηση. Το τυποποιημένο ελαιόλαδο διατίθεται στην κατανάλωση ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του σε τρεις βασικές κατηγορίες:

Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο: αυτό είναι ο φιλτραρισμένος φυσικός χυμός της ελιάς με τέλειο άρωμα και γεύση και με οξύτητα που δεν ξεπερνά το 0,8%.

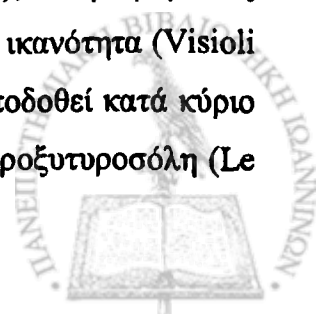
Παρθένο ελαιόλαδο: έχει σχεδόν τα ίδια χαρακτηριστικά με το εξαιρετικό παρθένο, αλλά η οξύτητά του κυμαίνεται από 1,1% ως 2%.

Ελαιόλαδο: μίγμα παρθένου και εξευγενισμένου (ραφινέ) ελαιόλαδου. Έχει ελαφριά, ευχάριστη γεύση και οσμή, χρώμα ανοιχτό κιτρινοπράσινο και η οξύτητά του δεν πρέπει να ξεπερνά το 1,5%.

1.3 Βιολογικές δράσεις των προϊόντων της ελιάς

1.3.1 Φύλλα ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί στην ιατρική κατά το πέρασμα του χρόνου ως αγγειοδιασταλτικά, διουρητικά, αντιπυρετικά αλλά και σε πολλές άλλες δερματικές κυρίως παθήσεις. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι τα φύλλα της ελιάς φαίνεται ότι έχουν αντιοξειδωτικές (Le Tutour and Gudeon, 1992, Owen et al 2000), αντιμικροβιακές (Ghisalberti, 1998) ιδιότητες αλλά και να παρουσιάζουν αντιυπερτασική ικανότητα (Visioli and Galli, 1998) κ.α. Οι ιδιότητες αυτές των φύλλων της ελιάς έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στα ιριδοειδή και ειδικότερα στα σεκοϊροειδή ολεωρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη (Le



Tutour and Gudeon, 1992, Benavente-Garcia et al, 2000). Η ολευρωπαϊνή βρίσκεται στην ελιά γνωστή ως το πικρό συστατικό της ελιάς. Το εκχύλισμα των φύλλων όμως εμπεριέχει πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ένωσης αυτής ενώ παράλληλα σε αυτή αποδίδεται η προστασία και αντοχή του ελαιόδεντρου σε διάφορα έντομα και βακτήρια. Επίσης η ολευρωπαϊνή φαίνεται να προστατεύει τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας από την οξείδωση συμβάλλοντας έτσι στην μείωση της εμφάνισης της αθηροσκλήρωσης (Visioli and Galli 1994), να αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη που προκαλεί στο μυοκάρδιο η ισχαιμία-επαναιμάτωση (Andreadou et al., 2006, Manna et al., 2004), να παίζει ρόλο στην αντιμετώπιση φλεγμονών (Puel et al., 2004) ενώ φαίνεται να έχει την ικανότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Visioli et al., 1998). Τα φύλλα της ελιάς φαίνεται να αποτελούν μια πολύ φθηνή πρώτη ύλη για την απομόνωση και χρησιμοποίηση ενώσεων για φαρμακευτικούς σκοπούς σύμφωνα με τις ιδιότητες που φαίνεται να παρουσιάζουν.

1.3.2 Καρπός ελιάς

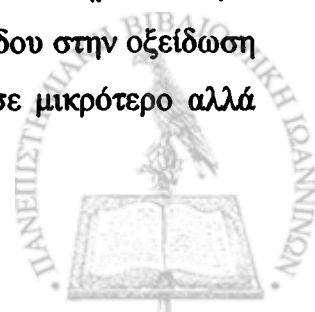
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως κεντρικό ρόλο στις ευεργετικές δράσεις της Μεσογειακής διαίτας φαίνεται να παίζει η επιτραπέζια ελιά και το ελαιόλαδο. Η επιτραπέζια ελιά είναι μια από τις σημαντικότερες τροφές για τις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και λιγότερο για τις άλλες περιοχές του Δυτικού κόσμου. Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη με επικάρπιο μεμβρανώδες και λείο, μεσοκάρπιο σαρκώδες και ενδοκάρπιο ξυλώδες το οποίο περικλείει το σπέρμα. Οι ελιές είναι πλούσιες σε νερό, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου βρίσκεται στο μεσοκάρπιο Στην υψηλή βιολογική αξία της επιτραπέζιας ελιάς συμβάλλουν οι λιπαρές ουσίες, οι πρωτεΐνες αλλά και οι φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται σε αυτή. Το κύριο ακόρεστο λιπαρό οξύ το οποίο περιέχεται στη σάρκα της ελιάς είναι το ολεϊκό οξύ σε ποσοστό περίπου 80%. Η πιο σημαντική φαινολική ένωση του καρπού είναι η ολευρωπαϊνή. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της ολευρωπαϊνης είναι ότι βρίσκεται μόνο στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς και όχι σε κάποιο άλλο φυτικό ιστό. Η ένωση αυτή κατέχει το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος και είναι σημαντική καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και άλλες βιολογικές ιδιότητες (Benavente-Garcia et al., 2000, Hamdi et al., 2005).



1.3.3 Ελαιόλαδο

Οι ευεργετικές για την υγεία δράσεις του ελαιόλαδου, είναι γνωστές από την αρχαιότητα. Οι μεγάλοι γιατροί της αρχαιότητας (Ιπποκράτης, Γαληνός) χωρίς να γνωρίζουν τη χημική σύσταση του ελαιόλαδου, πίστευαν στην ευεργετική του επίδραση στην υγεία του ανθρώπου ενώ οι φαρμακευτικές χρήσεις του ελαιόλαδου ήταν πάνω από 60. Ειδικότερα τα τελευταία χρόνια επιστημονικά τεκμηριωμένες έρευνες αποδεικνύουν τα οφέλη του παρθένου ελαιόλαδου και συνιστούν τη χρήση του στην καθημερινή διατροφή. Ενδεικτικά αναφέρεται, ότι η κατανάλωση του ελαιόλαδου, μειώνει τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων καθώς μειώνει τη συγκέντρωση της LDL στο αίμα χωρίς να επηρεάζει εκείνη της HDL (Katan et al., 1995, Wahrburg, 2004), του καρκίνου του στήθους, του εντέρου κ.α. (Franceschi et al., 1995, Braga et al., 1998).

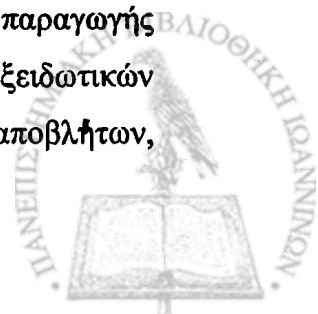
Τα τελευταία χρόνια μελέτες δείχνουν πως τα επιμέρους συστατικά του ελαιόλαδου είναι αυτά που οδηγούν σε προστασία από τις διάφορες παθήσεις που προαναφέρθηκαν. Έχει βρεθεί πως στα συστατικά του εμπεριέχονται υδρογονάνθρακες και λιπαρές αλκοόλες, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια. Έχει ιδιαίτερα ισορροπημένη σύνθεση σε λιπαρά οξέα: 18% κορεσμένα (κυρίως παλμιτικό), 6-9% πολυακόρεστα, 60-80% ελαϊκό οξύ (μονοακόρεστο) το οποίο είναι ανθεκτικό στο φως, τη θερμότητα και το οξυγόνο που μπορούν να προσβάλλουν το λάδι. Επίσης στο ελαιόλαδο εμπεριέχονται και άλλες σημαντικές ουσίες όπως στερόλες, υδρογονάνθρακες, όπως το σκουαλένιο και το β-καροτένιο το οποίο έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, και αρωματικές ουσίες που καθιστούν το ελαιόλαδο ευχάριστο στη γεύση και εύπεπτο. Ένα σημαντικό μέρος του ελαιόλαδου αποτελείται από φαινόλες, φαινολικά οξέα και πολυφαινόλες. Το ελαιόλαδο φαίνεται να οφείλει τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητές του στα επιμέρους συστατικά του ενώ σημαντικό ρόλο παίζουν τα λιπαρά του συστατικά τα οποία είναι στο μεγαλύτερο ποσοστό μονοακόρεστα σε αντίθεση με τα λιπαρά των ζωικών λιπών. Αξίζει να τονιστεί εδώ πως το ελαιόλαδο είναι μοναδικό καθώς σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες λαδιών προς κατανάλωση όπως το σπορέλαιο, φαίνεται ότι εμπεριέχει υψηλές συγκεντρώσεις συστατικών όπως το ολεϊκό οξύ ή και ενώσεων αντιοξειδωτικών που είναι σημαντικά για την υγιεινή δράση του (Owen et al., 2000). Η σταθερότητα του ελαιόλαδου στην οξείδωση οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση ολεϊκού οξέος που περιέχει και σε μικρότερο αλλά



σημαντικό βαθμό σε φαινόλες όπως οι τοκοφερόλες και ιδίως η βιταμίνη E αλλά και σε άλλα φαινολικά συστατικά.

1.3.4 Απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου

Οι σύγχρονες διαδικασίες παραγωγής βρώσιμων ελιών και του ελαιόλαδου έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγάλου όγκου αποβλήτων που δημιουργούνται λόγω των εκλύσεων του. Κατά την επεξεργασία παράγονται υγρά απόβλητα, η ποσότητα και η σύσταση των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο αλλά και την ποικιλία της ελιάς και τη μέθοδο επεξεργασίας. Υπολογίζεται ότι τα εργοστάσια επεξεργασίας βρώσιμων ελιών παράγουν από 1,18 m³ έως 1,68 m³ υγρών αποβλήτων για κάθε τόνο ελαιόκαρπου. Το υγρό απόβλητο που προέρχεται από τη συνολική επεξεργασία των βρώσιμων ελιών και του ελαιόλαδου είναι ένα θολό, σκουρόχρωμο υγρό με υψηλό οργανικό φορτίο και αυξημένες συγκεντρώσεις πολυφαινολικών συστατικών. Το οργανικό κλάσμα αποτελείται από σάκχαρα και φαινολικά συστατικά, όπως τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, κάποιες οργανικές ενώσεις αζώτου (κυρίως αμινοξέα), οργανικά οξέα, τανίνες, πηκτίνες, καροτενοειδή και λιπαρές ουσίες. Το ανόργανο κλάσμα περιέχει χλωριούχα, θειικά και φωσφορικά άλατα του καλίου, σίδηρο, μαγνήσιο κ.α. Τα απόβλητα αυτά απορρίπτονται σε θάλασσες, ποτάμια, το έδαφος, κ.α. Έτσι, με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις όπως ρύπανση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων, ρύπανση των ακτών και της θάλασσας, καταστροφή γεωργικών καλλιεργειών κ.α. Το κύριο χαρακτηριστικό της κατεργασίας είναι η κατανάλωση μεγάλου όγκου νερού σε μικρό χρονικό διάστημα, που συνεπάγεται και την παραγωγή μεγάλου όγκου αποβλήτων. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι με τη διαδικασία αυτή απομακρύνεται ένα μεγάλο μέρος φαινολικών συστατικών. Χαρακτηριστικό είναι ότι μόνο 1-2% των αντιοξειδωτικών ενώσεων της ελιάς περνάνε στο ελαιόλαδο καθώς το υπόλοιπο χάνεται κατά τη διαδικασία των εκπλύσεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρόλο που τα συστατικά των απόβλητων της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου έχουν ισχυρές ρυπαντικές ιδιότητες, εμπεριέχονται σε αυτά και άλλα συστατικά κυρίως φαινολικά, τα οποία θεωρούνται ισχυροί αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν πως τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και θα αποτελούσαν μια φθηνή και πλούσια, λόγω του τεράστιου όγκου των αποβλήτων,



λύση στην έρευνα για φυσικές αντιοξειδωτικές ενώσεις (Agalias et al., 2007, Capasso et al., 1992, Nousis et al., 2005, Rodis et al., 2002, Visioli et al., 1995a)

1.4 Φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου

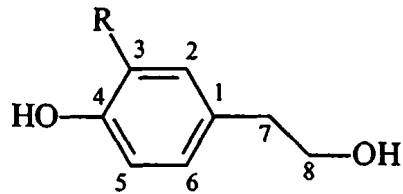
Τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου και οι αντιδράσεις στις οποίες λαμβάνουν μέρος αυτά, σχετίζονται με τη γεύση, το άρωμα και το χρώμα του όπως επίσης και για την οξειδωτική σταθερότητα του. Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο δεν είναι σταθερές αλλά αλλάζουν ανάλογα με το είδος του ελαιόλαδου, την επεξεργασία που έχουν υποστεί οι ελιές ως τη δημιουργία του τελικού προϊόντος, από τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος κ.α. Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στο ρόλο των συστατικών του φαινολικού κλάσματος του ελαιόλαδου (Montedoro et al., 1992, Tuck, 2002, Ucella, 2001). Μελέτες έχουν αναδείξει το σημαντικό βιολογικό ρόλο των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου καθώς έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την οξείδωση των ανθρώπινων λιποπρωτεϊνών (LDL) (Frankel et al., 1993, Visioli et al., 1995) έχουν θετικές επιδράσεις απέναντι στην αθηροσκλήρωση (Noguchi, 2000) μειώνουν τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Hertog et al., 1993) ενώ φαίνεται να έχουν θετική δράση απέναντι στον καρκίνο (Owen et al., 2000). Επίσης έχει βρεθεί ότι έχουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση και εκεί έχει αποδοθεί η ικανότητά τους να αναστέλλουν τις παθήσεις που αναφέρθηκαν (Owen et al., 2000, Visioli et al., 1998, Visioli et al., 2004, Vissers et al., 2004). Μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια ή κουνέλια έχουν δείξει πως οι οργανισμοί που η διατροφή τους περιείχε ελαιόλαδο, είναι πιο ανθεκτικοί απέναντι στην οξείδωση της LDL (Wiseman et al., 1996). Επίσης φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου φαίνεται να αναστέλλουν την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Petroni et al., 1995), και την παραγωγή θρομβοξανίων και λευκοτριενίων (Kohyama et al., 1997, Petroni et al., 1995, de la Puerta et al., 1999).

Ο τρόπος όμως με τον οποίο δρουν τα φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου δεν έχει κατανοηθεί πλήρως ακόμη. Έτσι στη συνέχεια, το πολικό κλάσμα του ελαιόλαδου, εκεί δηλαδή που εμπεριέχονται τα φαινολικά συστατικά του αναλύθηκε και μελετήθηκαν ξεχωριστά οι φαινολικές αυτές ενώσεις.



1.4.1 Υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη

Μεταξύ των ενώσεων που βρέθηκαν και μελετήθηκαν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν δύο ενώσεις που εμπεριέχονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο: η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη. Οι ενώσεις αυτές έχουν παρόμοια δομή με τη διαφορά ότι η τυροσόλη υπολείπεται ένα υδροξύλιο στο φαινολικό της δακτύλιο (Σχήμα 2)



R=H: Tyrosol

R=OH: Hydroxytyrosol

Σχήμα 2: Δομές των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη

Η μέση κατανάλωση ελαιόλαδου στις Μεσογειακές χώρες υπολογίζεται περίπου στα 30-50 γραμ./ημέρα ενώ η κατανάλωση από τις φαινόλες υπολογίζεται γύρω στα 9 mg την ημέρα. Η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί ότι βρίσκεται σε ποσότητα της τάξεως των 2,8 mg, από τα συνολικά 9 mg που καταναλώνονται από τον άνθρωπο ημερησίως (Vissers et al., 2004).

Οι δύο ενώσεις φαίνεται να έχουν διαφορετικές ιδιότητες καθώς έχει αναφερθεί ότι η υδροξυτυροσόλη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα να εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες (Aeschbach et al, 1994, Deiana et al. 1999, Ajuoma et al., 1998), να αναστέλλει την

οξείδωση της LDL (Salami et al. 1995, Visioli et al., 1995), τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Togna et al, 2003 Petroni et al) να αναστέλλει την 5- και την 12-λιπooξυγονάση (De la Puerta et al. 1999, Kohyama et al. 1997) και να προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση οξειδωτικών παραγόντων (Manna et al., 1997, 1999). Άλλες μελέτες έδειξαν πως η υδροξυτυροσόλη μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση διάφορων



μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι ο NF-kB, ο STAT-1a και ο IRF, παράγοντες οι οποίοι είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων (Maiuri et al. 2005, Carluccio et al. 2003). Βρέθηκε επίσης ότι η υδροξυτυροσώλη μεταφέρεται στα κύτταρα παθητικά με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Manna et al., 2000). Μελέτες σε ανθρώπους επίσης έδειξαν πως η υδροξυτυροσώλη περνάει στην κυκλοφορία του ανθρώπινου οργανισμού και αποβάλλεται μέσω των ούρων (Visioli et al., 2000, Vissers et al., 2001). Παρόλα αυτά οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της ένωσης αυτής δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί.

1.4.2 Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν μέταλλα

Αυτό που πιστεύεται είναι ότι η αντιοξειδωτική δράση ενώσεων όπως η υδροξυτυροσώλη αλλά και άλλων φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου είναι η αιτία της προστασίας των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι τέτοιες ενώσεις μπορούν να δρουν μέσω της δέσμευσης ιόντων μετάλλων όπως του χαλκού ή του σιδήρου, ιόντα δηλαδή που λαμβάνουν μέρος στις αντιδράσεις σχηματισμού πολύ δραστικών μορφών ελευθέρων ριζών. Η ικανότητά τους να δεσμεύουν μέταλλα έχει αποδοθεί στη δομή τους και κυρίως στην ύπαρξη της όρθο- δϋδροξυ δομής στο φαινολικό δακτύλιο (Mira et al, 2002, Andjelkovic et al, 2005, Le Nest et al, 2004, Brown et al, 1998, Khokhar et al., 2003). Η κύρια αντίληψη για την προστασία των κυττάρων αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα ενώ ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι πιθανό η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά να οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει την προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης μέσω της δέσμευσης του σιδήρου στα λυσοσωμάτια όπως και την προστατευτική δράση διάφορων φλαβονοειδών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ενδοκυττάρια μόρια σιδήρου (Doulias et al 2003, Melidou et al. 2005, Tenopoulou et al. 2005).



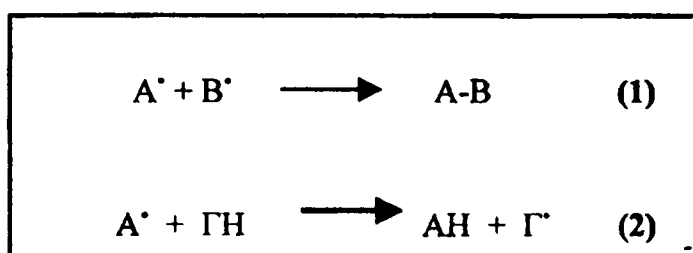
1.5 Οξειδωτικό Στρες και Ελεύθερες Ρίζες

Ο ρόλος του οξυγόνου στη ζωή είναι γνωστός εδώ και πολλά χρόνια. Η τοξική του δράση όμως σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο, μελετάται έντονα αφού παρατηρήθηκε ότι διάφορες παθολογικές καταστάσεις μπορεί να οφείλονται στη δράση του οξυγόνου ή σε δραστικά παράγωγα τα οποία προέρχονται από αυτό. Η αναφορά, δραστικά παράγωγα, οδηγεί συνήθως σε μια ομάδα ατόμων, που ονομάζονται ελεύθερες ρίζες. Τι είναι όμως μια ελεύθερη ρίζα; Εκ του ορισμού ο όρος ρίζα στη χημεία συνήθως εκφράζει ομάδες ατόμων τα οποία συμπεριφέρονται σαν μία μονάδα, π.χ. η ρίζα του ανθρακικού (CO_3^{2-}) ή η ρίζα του νιτρικού (NO_3^-). Για τις συγκεκριμένες όμως ρίζες, ο ορισμός διαφοροποιείται ως εξής: *Ελεύθερη ρίζα* (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin). Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είτε από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όπου τα ηλεκτρόνια τα οποία αποτελούσαν πριν τον δεσμό μοιράζονται από ένα σε κάθε ομάδα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά δραστικές, λόγω της τάσης του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους να αποσπάσει ένα ακόμη ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπληρώνοντας έτσι την ηλεκτρονιακή τους στοιβάδα, και για το λόγο αυτό ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ σύντομος. Υπάρχουν όμως και λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες προλαβαίνουν να διαχυθούν και να αντιδράσουν εξειδικευμένα με ορισμένα μόρια. Τέλος υπάρχουν και μερικές εξαιρέσεις σχετικά σταθερών ελεύθερων ριζών, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των αερόβιων οργανισμών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με τα βασικά συστατικά του κυττάρου προκαλώντας πολύ σημαντικές βλάβες. Έτσι μπορούν να αντιδράσουν με λιπίδια, πρωτεΐνες αλλά και το DNA των κυττάρων οδηγώντας σε υπεροξείδωση, αποδιάταξη και κατακερματισμό, μεταλλάξεις και σχάσεις αντίστοιχα.

Μετά από την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα μόριο μη-ελεύθερη ρίζα, τουλάχιστον ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης είναι εκ νέου ελεύθερη ρίζα (λόγω της αφαίρεσης ενός ηλεκτρονίου από ένα ζεύγος ηλεκτρονίων). Η νέα ελεύθερη ρίζα αντιδρά περαιτέρω με την σειρά της σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες. Έτσι οι αλυσιδωτές αυτές αντιδράσεις, αν δεν ανασταλούν με κάποιο τρόπο, έχουν σαν αποτέλεσμα την πλήρη καταστροφή του βιολογικού υλικού. Γνωστοί τρόποι αναστολής της δράσης τους είναι οι



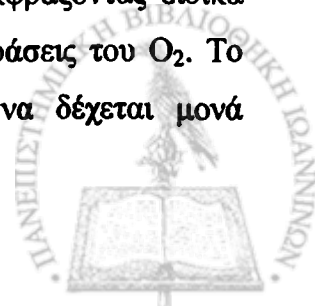
εξής: (1) Δύο μόρια-ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους συνεισφέροντας από ένα ηλεκτρόνιο η κάθε μια και σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό, (2) Η ελεύθερη ρίζα (A[•]) αντιδρά με ένα άλλο μόριο Γ σχηματίζοντας μία νέα ελεύθερη ρίζα (Γ[•]). Σε αυτή την περίπτωση όμως η ελεύθερη ρίζα της ένωσης Γ είναι μία από τις εξαιρέσεις οι οποίες δεν είναι δραστικές και έτσι διακόπτεται η ακολουθία των αντιδράσεων. Οι πιθανότητες για την περίπτωση (1) είναι εξαιρετικά μειωμένες λόγω του ότι τα A[•] και B[•] είναι πολύ δραστικά μόρια και κατά συνέπεια η συγκέντρωσή τους δεν είναι ποτέ τόσο υψηλή ενώ υπεύθυνες για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών είναι οι αντιδράσεις του τύπου (2).



Οι ενώσεις τύπου Γ ονομάζονται αντιοξειδωτικές ή εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών καθώς έχουν την ιδιότητα να τερματίζουν τις αντιδράσεις που δημιουργούν προϊόντα επιβλαβή για την βιωσιμότητα και σωστή λειτουργία των κυττάρων. Τέτοιες ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία στη φύση όπως η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ οι οποίες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ανενεργές ρίζες οι οποίες όμως δεν είναι επιβλαβείς για τα κυτταρικά συστατικά.

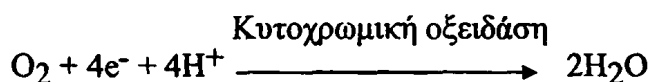
1.5.1 Το παράδοξο του οξυγόνου

Η συσσώρευση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα επέτρεψε την εξέλιξη ενός πολύ μεγάλου αριθμού αερόβιων οργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τον τελικό δέκτη των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, παράγοντας ένα μεγάλο ποσοστό ενέργειας. Ο ρυθμός πορείας της εξέλιξης από τις αναερόβιες προς τις αερόβιες συνθήκες έδωσε την ευκαιρία σε ορισμένες μορφές ζωής να προσαρμοσθούν εκφράζοντας ειδικά αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία προστάτευαν από τις τοξικές επιδράσεις του O₂. Το μοριακό οξυγόνο είναι σχετικά ανενεργό, η ικανότητά του όμως να δέχεται μονά



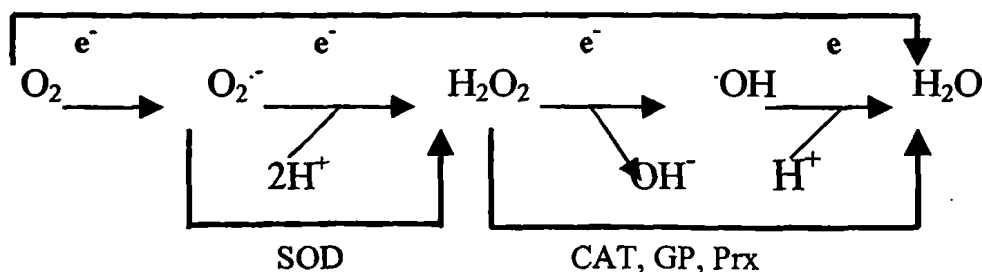
ηλεκτρόνια το καθιστούν τον σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Ames et al., 1993, Balentine 1982, Fridovich, 1999). Η κατάσταση αυτή έχει ονομαστεί *το παράδοξο του οξυγόνου*.

Όπως αναφέρθηκε πριν, οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποίησαν το O_2 σαν τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων τα οποία προέρχονται από οξειδωτικές διαδικασίες του καταβολισμού. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αναγωγή του O_2 σε 2 μόρια νερού με την πρόσληψη 4 ηλεκτρονίων. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο 'κυτοχρωμική οξειδάση'. Το ένζυμο αυτό παίρνει μέρος στις αντιδράσεις του τελευταίου συμπλόκου στην ακολουθία των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας.



- Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων αυτών ένα ποσοστό της τάξης περίπου 85-90% του O_2 καταναλώνεται από τους οργανισμούς για τη δημιουργία ενέργειας μέσω του ATP, ένα άλλο μέρος (10-15%) καταναλώνεται από τις αντιδράσεις που καταλύουν οι υδροξυλάσες, οι οξειδάσες και οι μονοξυγονάσες ενώ ένα μικρό ποσοστό της τάξεως περίπου 2 % του προσλαμβανόμενου O_2 ανάγεται ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια (Σχήμα 3).

Κυτοχρωμική οξειδάση ($4e^-$)



Σχήμα 3: Διαδοχικά βήματα αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.

Οι συντημήσεις SOD, CAT, GP, Prx, συμβολίζουν τα ένζυμα δισμουτάση του σουπεροξειδίου, καταλάση, περοξειδάση της γλνταθειόνης, και περοξειρεδοξίνη αντίστοιχα.



Έτσι όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα το O_2 ανάγεται με ένα ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Αναγωγή με ένα ακόμη ηλεκτρόνιο οδηγεί στη δημιουργία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ενώ η περαιτέρω αναγωγή του H_2O_2 στη δημιουργία της ιδιαίτερα δραστηκής ρίζας του υδροξυλίου ($\cdot OH$), ενώσεις οι οποίες θεωρούνται κανονικά προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Όταν όμως η παραγωγή των ελευθέρων ριζών αυξάνεται στους οργανισμούς τότε πιστεύεται πως οδηγούν στη δημιουργία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) αναφέρεται μία σειρά ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του O_2 οι οποίες μπορεί να γίνουν τοξικές για τα κύτταρα και ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ).

Ένωση	Όνομα
<i>Ελεύθερες ρίζες</i>	
$O_2^{\cdot-}$	ανιόν σουπεροξειδίου
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
HO_2^{\cdot}	υδροϋπεροξειδική ρίζα
RO^{\cdot}	ρίζα αλκοξειδίου
ROO^{\cdot}	ρίζα υπεροξειδίου
<i>Μη-ελεύθερες ρίζες</i>	
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υδροπεροξείδια
1O_2	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου



Οι ΔΜΟ δημιουργούνται συνέχεια στα κύτταρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και απομακρύνονται συνεχώς από αυτά με αμυντικούς μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει, κυρίως μέσω ενζύμων, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να βρίσκεται συνεχώς σε μία ισορροπία (Chance et al., 1979). Αυτή η λεπτή ισορροπία αποκαλείται 'οξειδοαναγωγική ισορροπία'. Στις περιπτώσεις που η ισορροπία αυτή διαταράσσεται προς όφελος των οξειδωτικών παραγόντων, προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως 'οξειδωτικό στρες' (Sies, 1985).

Στις Βιολογικές και τις Ιατρικές επιστήμες η σημασία των ελευθέρων ριζών και ειδικότερα αυτών οι οποίες σχετίζονται με το οξυγόνο εκτιμήθηκε πρόσφατα, μετά την ανακάλυψη της συμμετοχής τους σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων καθώς και στο μηχανισμό δράσης διαφόρων τοξικών ουσιών.

1.5.2 Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Το δεύτερο προϊόν αναγωγής του O_2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Παρ'όλο που το μόριο αυτό είναι ένα ασθενές οξειδωτικό μέσο, μπορεί να οξειδώσει βιολογικά μόρια όπως αυτά που εμπεριέχουν σουλφυδρικές ομάδες (Winterboun et al., 1999) ή σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Flint et al., 1993) στη δομή τους.

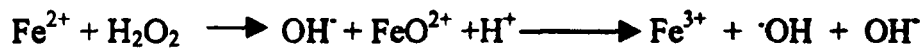
Λόγω του ότι δεν έχει ηλεκτρικό φορτίο μπορεί εύκολα να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, μια ιδιότητα η οποία είναι πολύ σημαντική για τη φυσιολογική του δράση. Έχει βρεθεί ότι όταν προστεθεί στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων σε συγκεντρώσεις 10 με 100 μM προξενεί βλάβες καθώς η οξειδωτική τροποποίηση των βασικών κυτταρικών συστατικών όπως π.χ. DNA, πρωτεΐνες, μεμβράνες, κ.τ.λ. οδηγούν σε μεταβολικές και δομικές διαφοροποιήσεις οι οποίες τελικά καταλήγουν στο θάνατο του κυττάρου. Κάποιες από τις βλάβες μπορεί να είναι άμεσες αλλά οι περισσότερες είναι έμμεσες μιας και το H_2O_2 δεν αντιδρά απευθείας με τα μόρια αυτά, αλλά πιστεύεται ότι αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα κέντρα μετάλλων μετάπτωσης (κυρίως Fe αλλά και Cu) δημιουργώντας δραστικές ρίζες υδροξυλίου ή άλλους παράγοντες με παρόμοια υψηλή δραστικότητα (Barbouti et al., 2001, Imley, 2003, Halliwell et al., 1991, Menenghini, 1997, Τεπορουλου et al., 2005). Το H_2O_2 είναι ένα μικρό μόριο που παράγεται ενδογενώς σε μικρές συγκεντρώσεις, διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και δημιουργείται και



καταστρέφεται πολύ γρήγορα ενώ τα τελευταία χρόνια θεωρείται ότι συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος των κυττάρων (Finkel, 1998, Rhee, 1999, Rhee et al., 2000, Suzuki, 1999). Η άποψη αυτή ενισχύεται από πειραματικές μελέτες που δείχνουν ότι η απομάκρυνσή του οδηγεί στην αναστολή διαφόρων παραγόντων όπως ο παράγοντας PDGF, ο EGF και η αγγειοτενσίνη II (Bae et al., 1997, Sundaresan et al., 1995, Ushio-Fukai et al., 1999). Οι ακριβείς μηχανισμοί της δράσης αυτής όμως δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί.

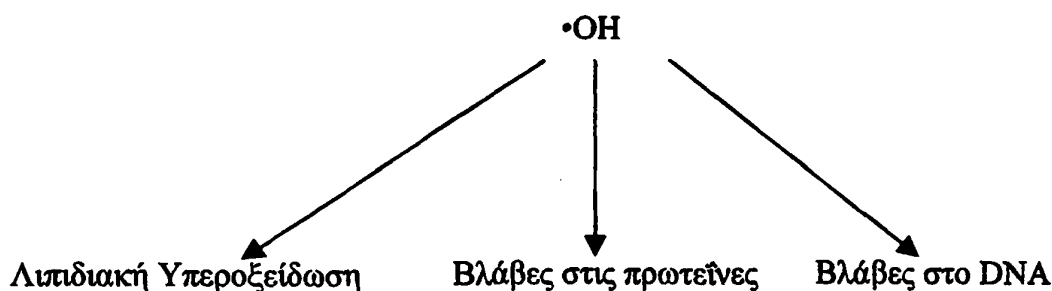
1.5.2.1 Δημιουργία ριζών του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) από το H_2O_2 .

Η αντίδραση του Σχήματος 4 είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton παίρνοντας το όνομά της από τον H.J.H. Fenton που πρώτος την περιέγραψε. Πραγματοποιείται όταν το H_2O_2 προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από το δισθενή σίδηρο δίνοντας έτσι τις πολύ δραστικές ρίζες του υδροξυλίου.



Σχήμα 4: Η αντίδραση Fenton

Οι ρίζες του υδροξυλίου αντιδρούν σχεδόν με όλα τα οργανικά μόρια που θα βρεθούν δίπλα τους όταν σχηματίζονται (Σχήμα 5). Έτσι μπορούν να αντιδράσουν με πρωτεΐνες, λιπίδια καθώς και με το DNA των κυττάρων, καθιστώντας αυτές υπεύθυνες για μεταλλάξεις αλλά και τον κυτταρικό θάνατο (Halliwell, 1990, Halliwell, 1999, Ryan, 1992, Eaton, 2002, Stohs et al., 1995, Valko et al., 2005).



Σχήμα 5: Μοριακοί στόχοι των ριζών υδροξυλίου.



1.5.3 Λιπιδιακή υπεροξειδωση

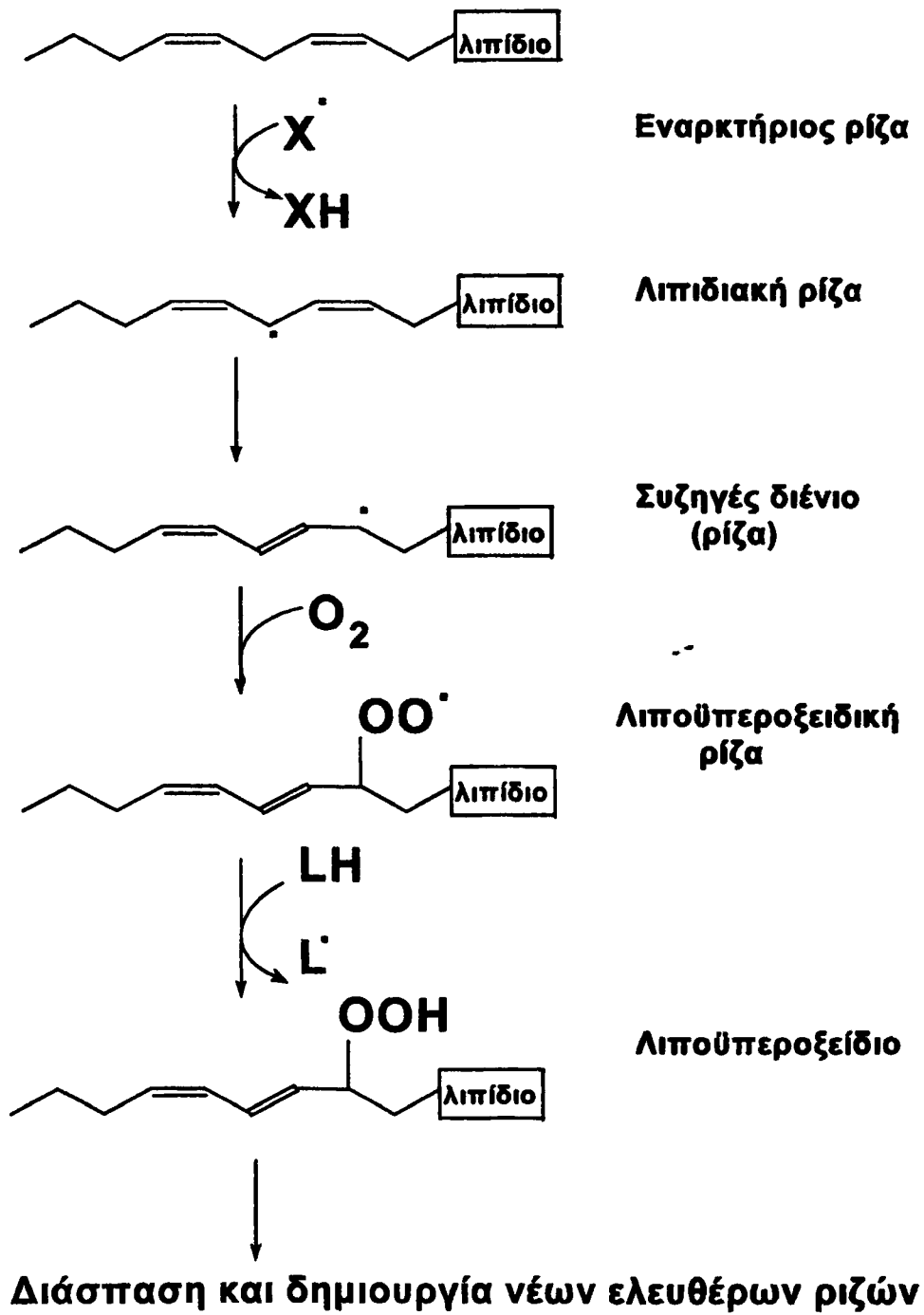
Από τους πλέον γνωστούς μηχανισμούς αντίδρασης των OH και γενικότερα των ελευθέρων ριζών με κυτταρικά συστατικά είναι αυτός με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται «λιπιδιακή υπεροξειδωση» και παρατηρείται όταν η δημιουργία ελευθέρων ριζών υπερισχύει των κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών. Η έναρξη μπορεί να προκληθεί από μια ελεύθερη ρίζα η οποία είναι ικανή να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου (H) από ένα λιπαρό οξύ. Η αντίδραση αυτή ενισχύεται από την ύπαρξη διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα καθώς η ισχύς του δεσμού του H με τον αντίστοιχο άνθρακα εξασθενεί σημαντικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ενός H από μεθυλομάδες μεταξύ δύο διπλών δεσμών ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) δημιουργώντας μία νέα ελεύθερη ρίζα στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η ρίζα του λιπαρού οξέος, ανασυνδυάζεται γρήγορα με ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς σχηματίζοντας συζυγή διένια (conjugated dienes, αλληλουχία διπλού-μονού-διπλού δεσμού) αλλά και μία νέα ελεύθερη ρίζα στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η νέα ελεύθερη ρίζα είναι σχετικά σταθερότερη και προλαβαίνει να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας μία ρίζα υπεροξειδίου η οποία με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ δημιουργώντας μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος (Σχήμα 6). Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αυτών είναι επιβλαβή στις διάφορες μεμβράνες, οδηγώντας ακόμη και στον κυτταρικό θάνατο.

Τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης επηρεάζουν σημαντικά διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και οδηγούν σε διαταραχές στη ρευστότητα αλλά και στη μείωση του μεμβρανικού δυναμικού των κυτταρικών μεμβρανών.

1.5.4 Βλάβες στις πρωτεΐνες

Οι ελεύθερες ρίζες πέραν της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, έχουν επίδραση και στις κυτταρικές πρωτεΐνες μέσω της τροποποίησης της δομής τους. Οι επιπτώσεις της δημιουργίας ελευθέρων ριζών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτώνται: 1) από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αμινοξέα 2) το πόσο σημαντικά είναι αυτά τα αμινοξέα





Σχήμα 6: Λιπιδιακή υπεροξείδωση



για την δράση της πρωτεΐνης και 3) από την ικανότητα των κυττάρων να διορθώσουν τις βλάβες στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Κάποια αμινοξέα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων επηρεάζονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών κάτι που οδηγεί σε αλλαγή ολόκληρης της δομής της πρωτεΐνης. Έτσι βλάβες σε διάφορα ένζυμα, υποδοχείς, σε πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, οδηγούν σε βλάβες στη λειτουργία του κυττάρου ή ακόμη και στο θάνατο.

1.5.5 Βλάβες στο DNA

Το DNA των κυττάρων υπόκειται σε βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Από τις δραστικές μορφές οξυγόνου τα O_2^- και H_2O_2 δεν φαίνεται να αντιδρούν σε σημαντικό βαθμό με τις βάσεις των DNA και RNA καθώς και με τη ριβόζη και δεοξυριβόζη. Αντίθετα οι $\cdot OH$ οδηγούν στη δημιουργία μεγάλου αριθμού βλαβών στο DNA όπως είναι η σχάση των αλυσίδων (μονών και διπλών), η τροποποίηση των βάσεων του DNA, η ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων. Οι $\cdot OH$ είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους όταν δημιουργούνται. Ειδικότερα στα κύτταρα μπορεί να αντιδράσουν και να οξειδώσουν το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα σάκχαρα και γενικά όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά. Επίσης βλάβες προκαλούνται και στις πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA (διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών).

Οι επιπτώσεις των βλαβών που δημιουργούνται στο DNA είναι πολλαπλές και δεν έχουν πάντα τα ίδια αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι σχάσεις στο DNA προκαλούν την ενεργοποίηση του ενζύμου πολύ-(ADPριβόζη) πολυμεράση (PARP) με αποτέλεσμα τη χρησιμοποίηση μεγάλου μέρους από τα αποθέματα NAD^+ , την μειωμένη ικανότητα σύνθεσης νέου ATP και τελικά το θάνατο. Αυτή η αντίδραση ονομάζεται 'αντίδραση αυτοκτονίας'. Επίσης βλάβες παρατηρούνται και στο μιτοχονδριακό DNA όπου πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ασθενειών όπως στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, στην αρτηριοσκλήρυνση και σε άλλες.



1.5.6 Ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην μεταγωγή του σήματος

Η δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε μια πληθώρα αντιδράσεων του κυττάρου, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η γήρανση, η απόπτωση κ.α. (Alder et al., 1999). Τα τελευταία χρόνια όμως πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η δράση του H_2O_2 συνδέεται και με φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου καθώς φαίνεται να εμπλέκεται σε αρκετές περιπτώσεις μεταγωγής σήματος ενδοκυττάρια είτε ως απόκριση στην οξειδωτική βλάβη είτε ως δεύτερος διαβιβαστής σήματος στα κύτταρα (Bae et al., 1997, Mahadev et al., 2001, Sundaresan et al., 1995). Παρόλο που η εμπλοκή του H_2O_2 στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς έχει μελετηθεί αρκετά, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης του παραμένουν άγνωστοι. Η δράση του H_2O_2 σαν σηματοδοτικό μόριο φαίνεται να έχει σχέση με την οξείδωση σουλφυδρυλικών ομάδων στα κυστεϊνικά κατάλοιπα ορισμένων πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα της οξείδωσης της κυστεϊνης είναι ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών (-S-S), σουλφενικού οξέως (-SOH), σουλφινικού οξέως (-SO₂H) και σουλφονικού οξέως (-SO₃H) (Reth, 2002). Με αυτό τον τρόπο φαίνεται ότι πολλές πρωτεΐνες οξειδώνονται με επακόλουθο να τροποποιείται ή να αναστέλλεται η λειτουργία τους. Η ενδοκυττάρια αύξηση του H_2O_2 επηρεάζει άμεσα τη δράση κάποιων μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι η p53, η AP-1 και η p50 υπομονάδα του NF-kB (Sun, 1996) με συνέπεια την επαγωγή ή την αναστολή της έκφρασης δεκάδων γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται να είναι η επίδραση που έχει στις τυροσινικές πρωτεϊνικές φωσφατάσες (Caselli et al., 1998, Xu et al., 2002).

Επίσης το οξειδωτικό στρες και ιδιαίτερα το H_2O_2 έχει ιδιαίτερη επίδραση στις MAP κινάσες (Mitogen Activated Proteins kinases). Οι MAP κινάσες είναι μια κατηγορία κινασών που εμπλέκονται σε μια σειρά βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση κ.α. Διαχωρίζονται σε τρεις υποοικογένειες: την JNK (c-Jun N-terminal kinase), την ERK (extracellular signal-regulated kinase) και τις p38 κινάσες. Οι MAP κινάσες χρειάζονται φωσφορυλίωση στα υποστρώματα σερίνης αλλά και θρεονίνης για να ενεργοποιηθούν. Η JNK και η p38 κινάσες αναφέρονται συχνά και ως SAPK (stress activated protein kinases) καθώς μπορούν να ενεργοποιηθούν από διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα (Davis, 2000). Φαίνεται πως η ενεργοποίηση της JNK συνδέεται με τη διαδικασία της απόπτωσης στα κύτταρα. Μελέτες

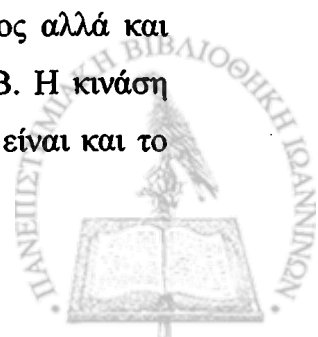


σε ποντίκια που είχαν υποστεί μετάλλαξη στα γονίδια της JNK ($JNK1^{-/-}$ και $JNK2^{-/-}$) έδειξαν πως η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και η ενεργοποίηση της κασπάσης-3, χαρακτηριστικά της απόπτωσης, σε MEF κύτταρα (mouse embryo fibroblasts) είναι μικρότερη από ότι σε κύτταρα μάρτυρες, τονίζοντας έτσι την απαραίτητη παρουσία της JNK κινάσης στην απόπτωση (Tournier et al., 2000). Άλλες μελέτες που ενισχύουν την παραπάνω άποψη, έχουν γίνει σε κύτταρα που προέρχονται από το θύμο αδέν, στα οποία έχουν κατασταλεί τα γονίδια JNK1 και JNK2, όπου παρατηρείται μια αναστολή στην πρόκληση της απόπτωσης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Sabarathy et al., 2001). Οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της JNK σε σχέση με την απόπτωση δεν είναι πλήρως κατανοητοί αλλά υπάρχουν ενδείξεις που συσχετίζουν την κινάση αυτή με την απόπτωση που προκαλείται μέσω των μιτοχονδρίων (Tournier et al., 2000, Aoki et al., 2002).

Η ERK κινάση εμπλέκεται σε πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από διάφορους παράγοντες ανάπτυξης, στον πυρήνα των κυττάρων (Kolch 2000). Οι υποδοχείς διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης όπως είναι ο EGF (epidermal growth factor), ο PDGF (platelet-derived growth factor) φαίνεται να ενεργοποιούνται από τη δράση του H_2O_2 με αποτέλεσμα και την ενεργοποίηση της κινάσης ERK (Schieven et al., 1994, Huang et al., 1996). Η δράση της συγκεκριμένης κινάσης δεν έχει αποσαφηνιστεί καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι λειτουργεί ως προαποπτωτικός παράγοντας όταν το κύτταρο υπόκειται σε οξειδωτικό στρες (Petrache et al., 1999) αλλά υπάρχουν και αποτελέσματα που υποδεικνύουν την άποψη ότι η ERK κινάση δρα ως αντιαποπτωτικός παράγοντας μετά από οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα (Guyton et al., 1996).

Το H_2O_2 εμπλέκεται όμως και σε άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως είναι αυτό στο οποίο ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB. Ο NF-kB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργό μορφή συνδεδεμένος με τον αναστολέα του, τον Iκ-B. Όταν ορισμένα κύτταρα εκτίθενται σε H_2O_2 τότε ο αναστολέας φωσφορυλιώνεται και ο NF-kB απελευθερώνεται και ενεργοποιείται (Janssen-Heininger et al., 2000). Σε μακροφάγα κύτταρα του ήπατος, η παραγωγή του παράγοντα TNF-a (tumor necrosis factor a) εξαρτάται από την ενεργοποίηση του NF-kB που προκαλείται από το H_2O_2 (Rose et al., 2000).

Το H_2O_2 όμως εμπλέκεται και σε άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος αλλά και στην ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων όπως είναι η πρωτεϊνική κινάση B. Η κινάση αυτή, γνωστή και ως Akt, ενεργοποιείται μέσω διαφόρων ερεθισμάτων όπως είναι και το



H_2O_2 και φαίνεται να λειτουργεί ως ένας σημαντικός αντιαποπτωτικός παράγοντας μέσω της αναστολής διαφόρων αποπτωτικών παραγόντων όπως είναι το BAD, η κασπάση 9 κ.α. (Kandel and Hay, 1999).

Η πρωτεϊνική κινάση C αποτελεί μια οικογένεια κινασών που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος που ρυθμίζουν λειτουργίες όπως είναι η κυτταρική ανάπτυξη, ο κυτταρικός θάνατος κ.α. (Gopalakrishna and Jaken, 2000). Έχει βρεθεί ότι το H_2O_2 ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C ενώ οι μελέτες προσδίδουν στην κινάση αυτή προαποπτωτικό αλλά και αντιαποπτωτικό χαρακτήρα.



1.6 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το H_2O_2 αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων κυρίως μέσω της οδού των μιτοχονδρίων (Barbouti et al., 2002, Barbouti et al., 2007, Hampton et al., 1997, Stridh et al., 1998). Τι είναι όμως η απόπτωση; Ο όρος αναφέρεται στο περιοδικό φαινόμενο της φυσιολογικής πτώσης σε ορισμένη εποχή και ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα ορισμένων ιστών ζωικών ή φυτικών οργανισμών. Τέτοια μέρη είναι τα φύλλα των δέντρων, τα φτερά των πουλιών, τα κέρατα των ελαφιών, τα δόντια ορισμένων ζώων. Η απόπτωση χρησιμεύει είτε για την αντιμετώπιση δυσμενών συνθηκών είτε για ανανέωση και αύξηση. Η απόπτωση προήλθε από την έννοια 'πίπτω' και χρησιμοποιήθηκε πριν από αρκετά χρόνια τονίζοντας την ύπαρξη ενός διαφορετικού τύπου θανάτου από τη γνωστή έως τότε νέκρωση (Lockshin and Williams, 1964, Kerr et al., 1972). Η διαδικασία αυτή τονίζει την ανάγκη της ζωντανής ύλης να οδηγείται σε θάνατο για την αρμονική λειτουργία των οργανισμών. Ενώ η νέκρωση είναι μια παθητική διεργασία του κυττάρου όπου τα κύτταρα διογκώνονται, διαλύεται η κυτταρική μεμβράνη και τα συστατικά τους εκχύνονται στο περιβάλλον, η απόπτωση είναι μια διαδικασία που προϋπάρχει κωδικοποιημένη σε όλα τα κύτταρα ενώ χρειάζεται ενέργεια για να πραγματοποιηθεί. Κύρια χαρακτηριστικά της είναι η συρρίκνωση του κυττάρου, η δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων σε κλάσματα των 180 βάσεων και η δημιουργία κυστιδίων μέσα σε μεμβράνη με τη χαρακτηριστική ονομασία 'αποπτωτικά σωματίδια' (Σχήμα 7). Τα αποπτωτικά σωματίδια εγκολλώνονται και καταστρέφονται από μακροφάγα κύτταρα χωρίς έτσι να δημιουργείται φλεγμονή στους διαφόρους ιστούς σε αντίθεση με το νεκρωτικό θάνατο που οδηγεί σε βλάβες των γειτονικών κυττάρων και τη δημιουργία φλεγμονής. Συνεπώς η απόπτωση αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία των κυττάρων καθώς χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση κυττάρων που έχουν βλάβη και κατά συνέπεια για τη φυσιολογική λειτουργία των ιστών και οργανισμών. Τέτοιο παράδειγμα είναι η ανάπτυξη του εγκεφάλου όπου μισοί από τους νευρώνες που δημιουργούνται, πεθαίνουν αργότερα όταν ο ενήλικας εγκέφαλος ολοκληρώνει το σχηματισμό του (Hutchins, 1998)

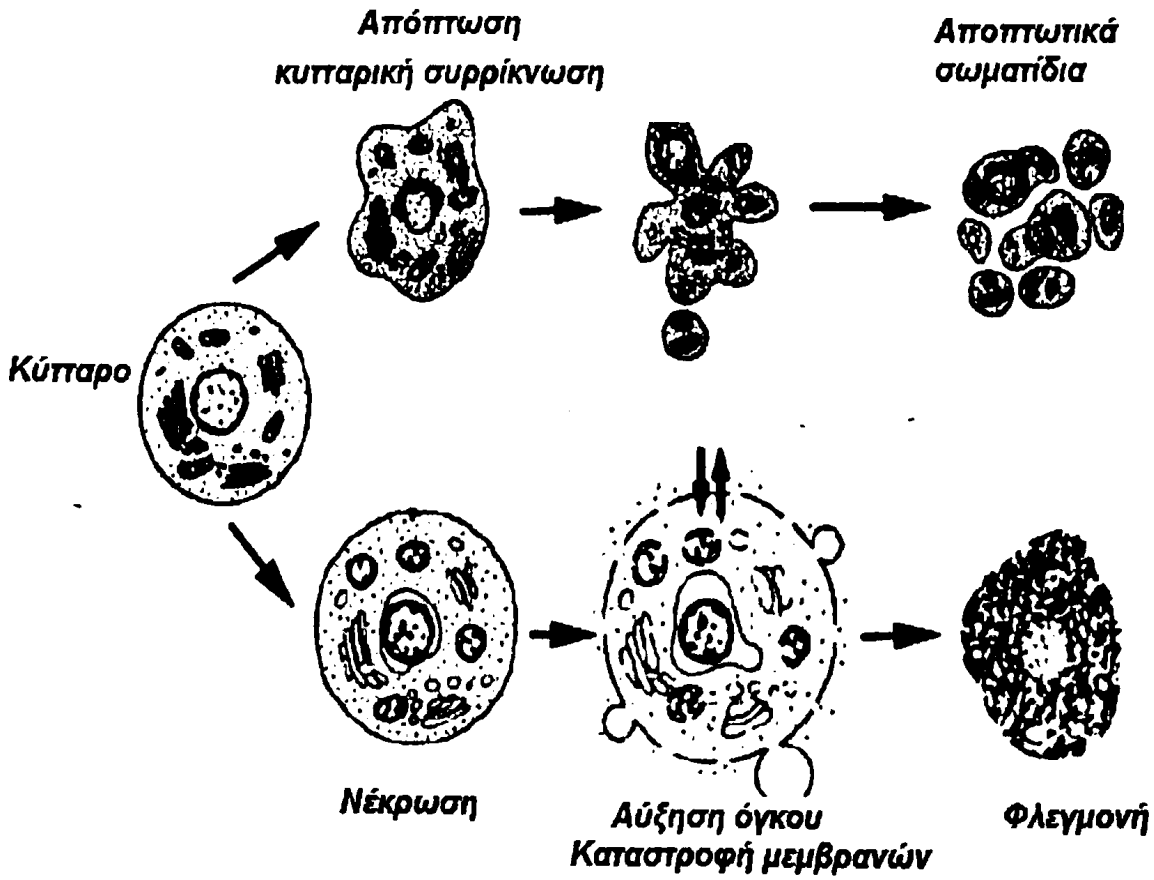


Αντίθετα, η λανθασμένη λειτουργία της απόπτωσης οδηγεί στην πρόκληση κάποιων ασθενειών. Για παράδειγμα τα κύτταρα που δεν καταφέρνουν να ενεργοποιήσουν τη διαδικασία της απόπτωσης, υφίσταται μεταλλάξεις που οδηγούν σε προκαρκινικά στάδια (Krammer, 2000). Επίσης η προγραμματισμένη μορφή του κυτταρικού θανάτου που συμβαίνει φυσιολογικά στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, σε περίπτωση δυσλειτουργίας της μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως είναι η νόσος του Alzheimer (Le blank, 2005) ενώ η μειωμένη λειτουργία της φαίνεται να παίζει ρόλο στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Rieux-Laucat et al., 2003). Για τη ρύθμιση της είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση διαφόρων γενετικά κωδικοποιημένων παραγόντων, από κάποιο ερέθισμα. Η απόπτωση ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα, εξωτερικά ή από το εσωτερικό του κυττάρου, όπως είναι η επίδραση κάποιου χημικού κυτταροτοξικού παράγοντα ή ακτινοβολίας, από βλάβη του DNA λόγω δυσλειτουργίας των επιδιορθωτικών του μηχανισμών, από λανθασμένη μεταγωγή σήματος στον κυτταρικό κύκλο κ.α. Παρόλο που τα ερεθίσματα αυτά έχουν διαφορετικές προελεύσεις, φαίνεται να ενεργοποιούν ένα κοινό μονοπάτι αποπτωτικού θανάτου, αυτό μέσω της οδού των κασπασών. Θα πρέπει να τονιστεί εδώ, ότι πέρα από την απόπτωση που είναι η πιο συνηθισμένη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, υπάρχουν και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου σημαντικής βιολογικής σημασίας (Leist, 2001).

1.6.1 Ο ρόλος των κασπασών στην απόπτωση

Οι πρώτες ενδείξεις για την συμμετοχή των πρωτεασών στην απόπτωση προήλθαν από μελέτες που έδειξαν σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ του γονιδίου *ced-3* του νηματόδου σκώληκα της *C. elegans*, το οποίο ονομάζεται και γονίδιο θανάτου, και του ενζύμου που βρίσκεται στα θηλαστικά και ονομαζόταν ICE (interleukin-1-converting enzyme). Στη συνέχεια τα ένζυμα αυτά ονομάστηκαν κασπάσες (Miura et al., 1993). Το γονίδιο *ced-3* είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στη *C. elegans*. Τον ίδιο όμως ρόλο φαίνεται να έχει τώρα και το γονίδιο ICE στα θηλαστικά. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν την συμμετοχή και άλλων κασπασών στη διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου στα κύτταρα (Alnemri et al., 1997).





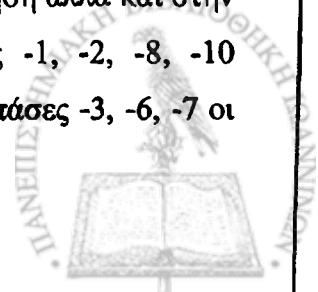
Σχήμα 7: Διαφορές αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου



Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο αποπτωτικό μονοπάτι θανάτου του κυττάρου. Η ονομασία τους προέρχεται από την ικανότητά τους να 'κόβουν' σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (cysteine-dependent aspartate-specific proteases). Η καταλυτική τους δράση οφείλεται σε ένα κυστεϊνικό κατάλοιπο που βρίσκεται μέσα σε μια συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων QACRG. Πριν την ενεργοποίησή τους, βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων και ονομάζονται προκασπάσες. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η ύπαρξη στο αμινοτελικό άκρο μιας προ-περιοχής που είναι συνδεδεμένη με μια μεγάλη υπομονάδα (20 kDa, p20) η οποία με τη σειρά της συνδέεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο με μια μικρή υπομονάδα (10 kDa, p10). Η προπεριοχή απομακρύνεται κατά την ενεργοποίηση των κασπάσων. Στην περίπτωση των κασπασών -1, -8 και -10 η μεγάλη υπομονάδα της προπεριοχής εμπλέκεται στη διαδικασία της ενεργοποίησής τους (Dobo et al., 2006). Η τρισδιάστατη ανάλυση των ενεργών κασπασών έδειξε ότι υπάρχουν τετραμερή που αποτελούνται από δυο p20 και δυο p10 υπομονάδες οι οποίες είναι απαραίτητες για την καταλυτική δραστηριότητα των κασπασών. Η συντηρημένη ενεργή αλληλουχία των 5 αμινοξέων βρίσκεται στην p20 υπομονάδα (Chereau et al., 1994).

Διαφορετικά ερεθίσματα οδηγούν στην ενεργοποίηση ξεχωριστών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που τελικά καταλήγουν στην εκτελεστική φάση της απόπτωσης. Έτσι ο καταρράκτης των κασπασών μπορεί να ενεργοποιηθεί από το Granzyme B το οποίο εκκρίνουν τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, ενεργοποιώντας τις κασπάσες -3 και -7. Επίσης μπορεί να ενεργοποιηθεί από τους υποδοχείς θανάτου, όπως είναι ο προσδέτης του υποδοχέα Fas (Fas ligand) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF- α , tumor necrosis factor α), οι οποίοι ενεργοποιούν τις κασπάσες -8 και -10 ενώ άλλο μονοπάτι ενεργοποίησης των κασπασών είναι μέσω του αποπτωσώματος, η δράση του οποίου ρυθμίζεται από το κυτόχρωμα c και την οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση -9. Η έναρξη του καταρράκτη των αντιδράσεων οδηγεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κασπασών, π.χ. η κασπάση -9 που έχει ενεργοποιηθεί από το αποπτώσωμα, σχάζει και ενεργοποιεί την κασπάση -3 η οποία με τη σειρά της σχάζει τις πρωτεΐνες-στόχους της αλλά και την κασπάση -9, κάνοντας έτσι βέβαιο ότι το κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση.

Οι κασπάσες φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση αλλά και στην εκτέλεση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Οι κασπάσες -1, -2, -8, -10 θεωρούνται οι ενεργοποιητές της πρωτεολυτικής διαδικασίας ενώ οι κασπάσες -3, -6, -7 οι



εκτελεστικές κασπάσες. Οι κασπάσες -4, -5, -11, -12, -13 και -14 φαίνεται να παίζουν ρόλο στη φλεγμονή (Talanian et al., 1997). Η ομάδα των ενεργοποιητών περιέχει την περιοχή που οδηγεί στο θάνατο (DED, death effector domain) και την περιοχή στρατολόγησης των κασπασών (CARD, caspase recruitment domain) (Hofmann et al., 1997). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο καταρράκτης των κασπασών φαίνεται να ενεργοποιείται είτε μέσω της σύνδεσης στην κυτταρική μεμβράνη υποδοχέων όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF- α) (εξωτερική ενεργοποίηση) είτε σε απόκριση κάποιου σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου (εσωτερική ενεργοποίηση).

1.6.1.1 Υποστρώματα των κασπασών

Κατά τη διάρκεια της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης πολλές πρωτεΐνες 'σχάζονται' έχοντας ως αποτέλεσμα το λεγόμενο 'θάνατο των χιλιάδων κοιμημάτων'. Στόχοι των κασπασών μπορεί να είναι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (nuclear lamins, gelsolin, actin), πρωτεΐνες μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (poly-ADP ribose polymerase PARP), πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου κ.α. Οι κασπάσες είναι υπεύθυνες για τη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η κασπάση-1 που 'κόβει' την κυτοκίνη pro-IL-1 beta, η κασπάση-6 που είναι η μόνη γνωστή κασπάση που 'σχάζει' τη lamin A προκαλώντας έτσι τη συμπύκνωση της χρωματίνης, ενώ από τα πιο γνωστά υποστρώματα της κασπάσης-3 αλλά και της κασπάσης-7, οι οποίες έχουν παρόμοια εξειδίκευση για τα σημεία 'σχασίματος', είναι η πυρηνική πρωτεΐνη PARP. Και οι δυο κασπάσες σχάζουν την πρωτεΐνη στην περιοχή DEVD (Martin and Green, 1995). Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε όλα τα υποστρώματα που σχάζονται από την κασπάση-3 και για αυτό δημιουργήθηκε το τετραπεπτίδιο AC-DEVD-CHO το οποίο έδειξε ότι αναστέλλει τη δράση και των δυο κασπασών. Άλλο ένα τετραπεπτίδιο, είναι το AC-DEVD-AMC το οποίο συντέθηκε και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ενεργότητας της κασπάσης-3. Η ενεργοποίηση των υποστρωμάτων οδηγεί στα γνωρίσματα της απόπτωσης όπως είναι η χαρακτηριστική συρρίκνωση των κυττάρων, η θραυσματοποίηση του κυτταρικού DNA κ.α. (Saraste et al., 2000).

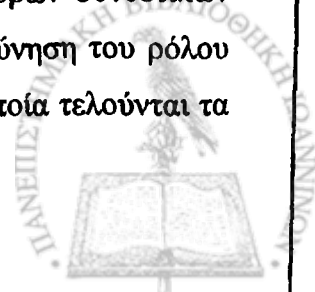


1.6.1.2 Αναστολείς των κασπασών

Η λειτουργία των κασπασών, ακόμη και μετά την ενεργοποίησή τους, μπορεί να ανασταλεί από άλλους φυσιολογικούς αναστολείς των κασπασών, έτσι ώστε να αποφευχθεί κάποια ανεπιθύμητη πρωτεόλυση. Πρωτεΐνες όπως η CpmA, η οποία αναστέλλει τις κασπάσες -1 και -8, η FLIP (FLICE-inhibitory protein) αναστολέας της κασπάσης-8 καθώς και οι πρωτεΐνες αναστολής της απόπτωσης IAP (inhibitors of apoptosis proteins) ρυθμίζουν τη λειτουργία της απόπτωσης. Στις IAP περιλαμβάνονται η NIAP (neuronal IAP), IAP1, IAP2, XIAP και survivin. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν επαναλαμβανόμενα τμήματα των 70 αμινοξέων που ονομάζονται BIR (baculovirus IAP repeat) και μια καρβοξυτελική αλληλουχία που ονομάζεται RING (LaCasse et al., 1998, Takahashi et al., 1998). Οι IAP1, IAP2 και XIAP αναστέλουν το σχάσιμο των κασπασών -3, -6, -7, μέσω της αναστολής της προ-κασπάσης-9. Οι τρεις αυτοί αναστολείς αλλά και η survivin μπορούν να δράσουν απευθείας και στην ενεργοποιημένη κασπάση-3 αναστέλλοντας τη δράση της. Η survivin και η XIAP έχει βρεθεί ότι δρουν στο επίπεδο της εκτελεστικής κασπάσης-3 και όχι στις ανενεργές μορφές των κασπασών. Η survivin είναι ο πρώτος αναστολέας κασπασών που εκφράζεται στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου. Αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ survivin και τουμπουλίνης με διάφορα μέσα έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της κασπάσης-3 και στην επαγωγή της απόπτωσης. Ενώ η survivin δεν βρίσκεται σε ιστούς σε κανονικές συνθήκες, σε περίπτωση δημιουργίας καρκίνου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της.

Μια άλλη οικογένεια αναστολέων της απόπτωσης, η v-FLIP (viral-FLICE-inhibitory proteins) φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 που ενεργοποιείται μέσω του προσδέτη του υποδοχέα Fas (Fas ligand). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στην δέσμευση των FADD και την αποκάλυψη των περιοχών DED (death effector domains) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της προ-κασπάσης-8. Η αντίστοιχη πρωτεΐνη στα θηλαστικά ονομάζεται FLIP (Imler et al., 1997). Η FLIP σχηματίζει ετεροδιμερή με την κασπάση-8 και σχάζεται από αυτή οδηγώντας έτσι σε αναστολή της πρωτεολυτικής δράσης της κασπάσης-8.

Αξίζει να αναφερθεί εδώ η σύνθεση και η χρησιμοποίηση διαφόρων συνθετικών πεπτιδικών αναστολέων οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διερεύνηση του ρόλου των κασπασών στην απόπτωση καθώς και τη μελέτη της σειράς με την οποία τελούνται τα



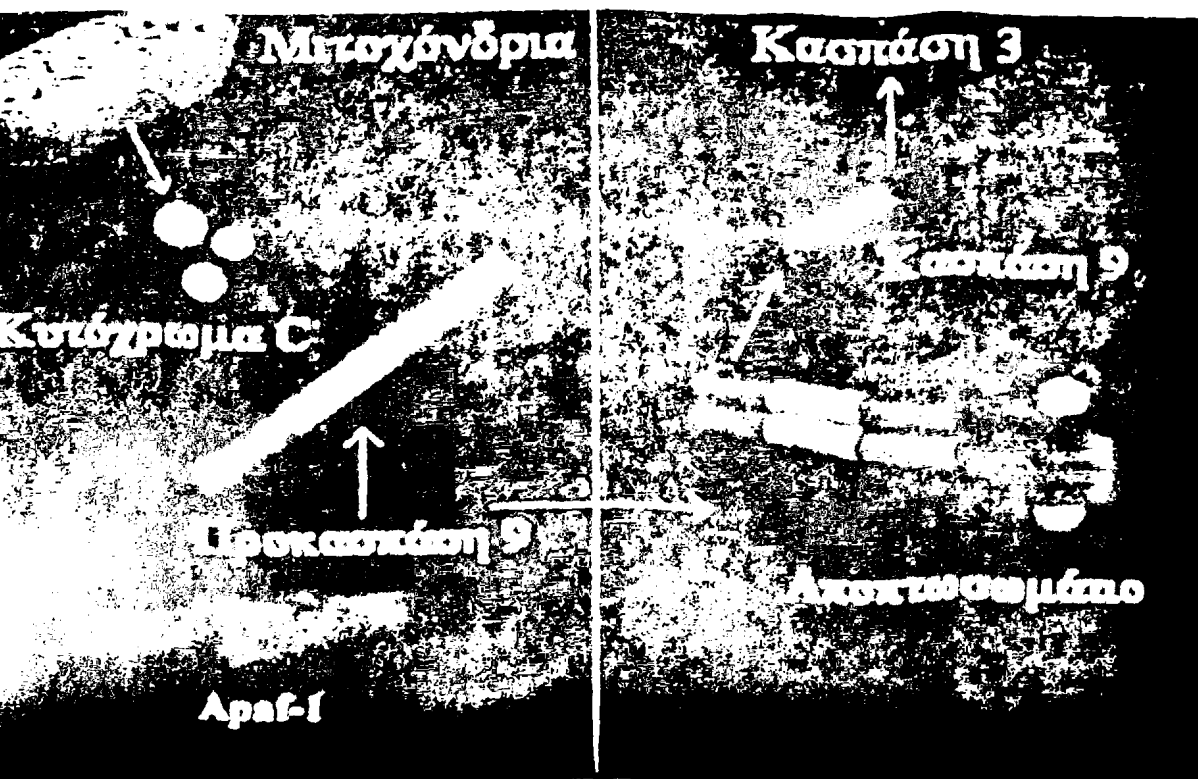
γεγονότα στον καταρράκτη των κασπασών. Διάφοροι αναστολείς έχουν σχεδιαστεί έχοντας ως βάση τις αλληλουχίες των υποστρωμάτων που σχάζονται από συγκεκριμένες κασπάσες. Τέτοια παραδείγματα είναι, το τετραπεπτίδιο AC-YVAD-CHO το οποίο είναι αναστολέας της κασπάσης-1, το τετραπεπτίδιο C-DEVD-CHO το οποίο περιέχει την αλληλουχία σχασίματος της PARP, είναι αναστολέας της κασπάσης-3 ενώ το πεπτίδιο z-VAD-fmk είναι ένας αναστολέας ευρέος φάσματος των κασπασών.

1.6.2 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόπτωση

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στο ρόλο των μιτοχονδρίων στην απόπτωση καθώς φαίνεται από εκεί να ξεκινά ο καταρράκτης των κασπασών για την πρόκληση της απόπτωσης μετά από κάποιο ερέθισμα όπως είναι το H_2O_2 . Η επίδραση του συγκεκριμένου ερεθίσματος οδηγεί στην ενεργοποίηση διαφόρων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που επιδρούν στα μιτοχόνδρια τα οποία με τη σειρά τους ανοίγουν πόρους διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και επιφέρουν αλλαγές στο διαμεμβρανικό δυναμικό (Σχήμα 8). Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η απελευθέρωση διαφόρων παραγόντων με μικρό μοριακό βάρος από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα c, ο παράγοντας AIF (apoptosis inducing factor) ο οποίος έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε ένα διαφορετικό είδος αποπτωτικού θανάτου (Susin et al., 1999) κ.α. Το κυτόχρωμα c είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 12 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Όταν απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια οδηγείται στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί σύμπλοκα με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1 και την προ-κασπάση -9 δημιουργώντας έτσι το αποπτώσωμα (Σχήμα 8).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι στην πρωτεΐνη Araf-1 προσδένεται και το νουκλεοτίδιο dATP για να ολοκληρωθεί η δημιουργία του συμπλόκου. Αποτέλεσμα του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης -9 η οποία με τη σειρά της σχάζει και ενεργοποιεί τις κασπάσες -3, -6 και -7 οδηγώντας έτσι στο μονοπάτι της απόπτωσης (Li et al., 1997).



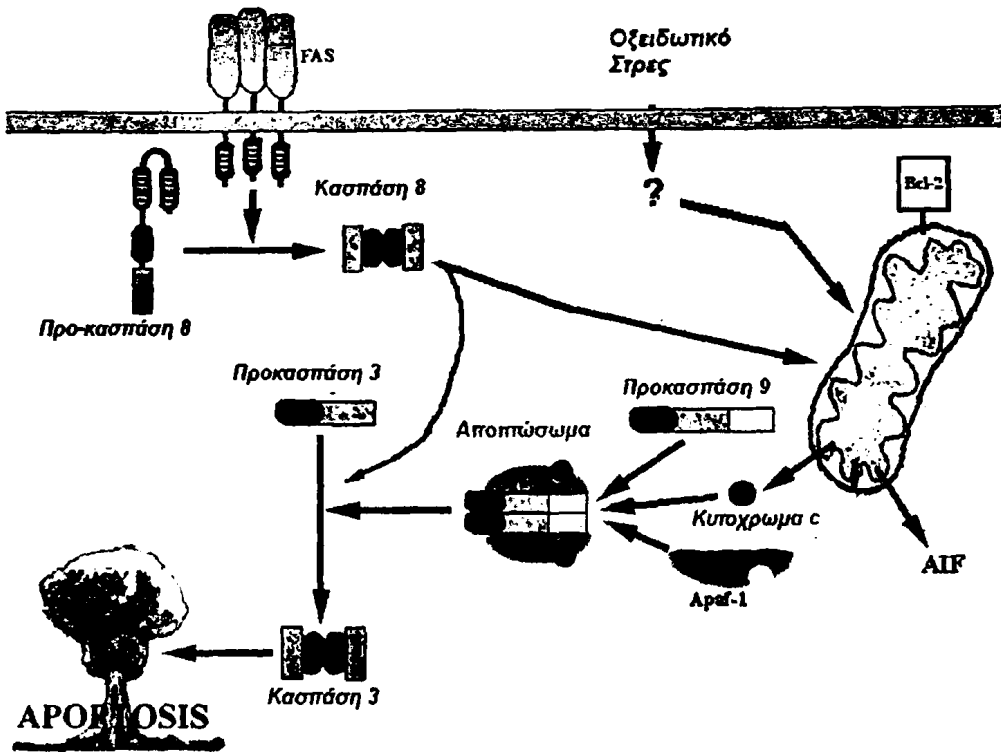


Εχθήμα 8: Ο σχηματισμός του αποπτωσώματος

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 9 η εναρκτήρια προ-κασπάση -8 μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαφορετική πορεία. Η ενεργοποιημένη κασπάση είτε σχάζει άμεσα την κασπάση -3 και ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών ή μπορεί να ενεργοποιήσει το Bid που αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2, το οποίο επιδρά στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την έναρξη της οδού των μιτοχονδρίων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι η διάνοιξη της μεμβράνης των μιτοχονδρίων μετά την επίδραση κάποιου ερεθίσματος, έχει ως αποτέλεσμα πέρα από την απελευθέρωση των παραγόντων που αναφέρθηκαν, την αποδόμηση του διαμεμβρανικού δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Αυτό οδηγεί στη χάλαση της βιοχημικής ομοιόστασης του μιτοχόνδριου καθώς σταματάει η σύνθεση του ATP ενώ αναγωγικά μόρια όπως το NADH, ADPH, και η γλουταθειόνη οξειδώνονται και δημιουργούνται Δ. Μ. Ο. (Kroemer et al., 1997).





Σχήμα 9: Μιτοχόνδρια και απόπτωση (Antonsson et al., 2000)

1.6.3 Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Ιδιαίτερο ρόλο στην εκτέλεση της οδού των μιτοχονδρίων καθώς και στην ενεργοποίηση των κασπασών φαίνεται να παίζει μια οικογένεια ογκοπρωτεϊνών με την ονομασία Bcl-2. Η οικογένεια αυτή παίρνει το όνομά της από το *B*-κυτταρικό λέμφωμα 2, καθώς είναι το δεύτερο μέλος μιας σειράς πρωτεϊνών που αρχικά περιγράφηκαν σε μια χρωμοσομική μετάθεση στα χρωμοσώματα 14 και 18 που αποτελούν την πιο συχνή χρωμοσομική μετάθεση στις ανθρώπινες λεμφικές κακοήθειες και συγκεκριμένα αποτελεί το μοριακό χαρακτηριστικό του λεμφοζιδιακού λεμφώματος. Μετά από έρευνες όμως στο νηματοειδή σκώληκα *C. Elegans*, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη Ced-9 αποτελεί λειτουργικό

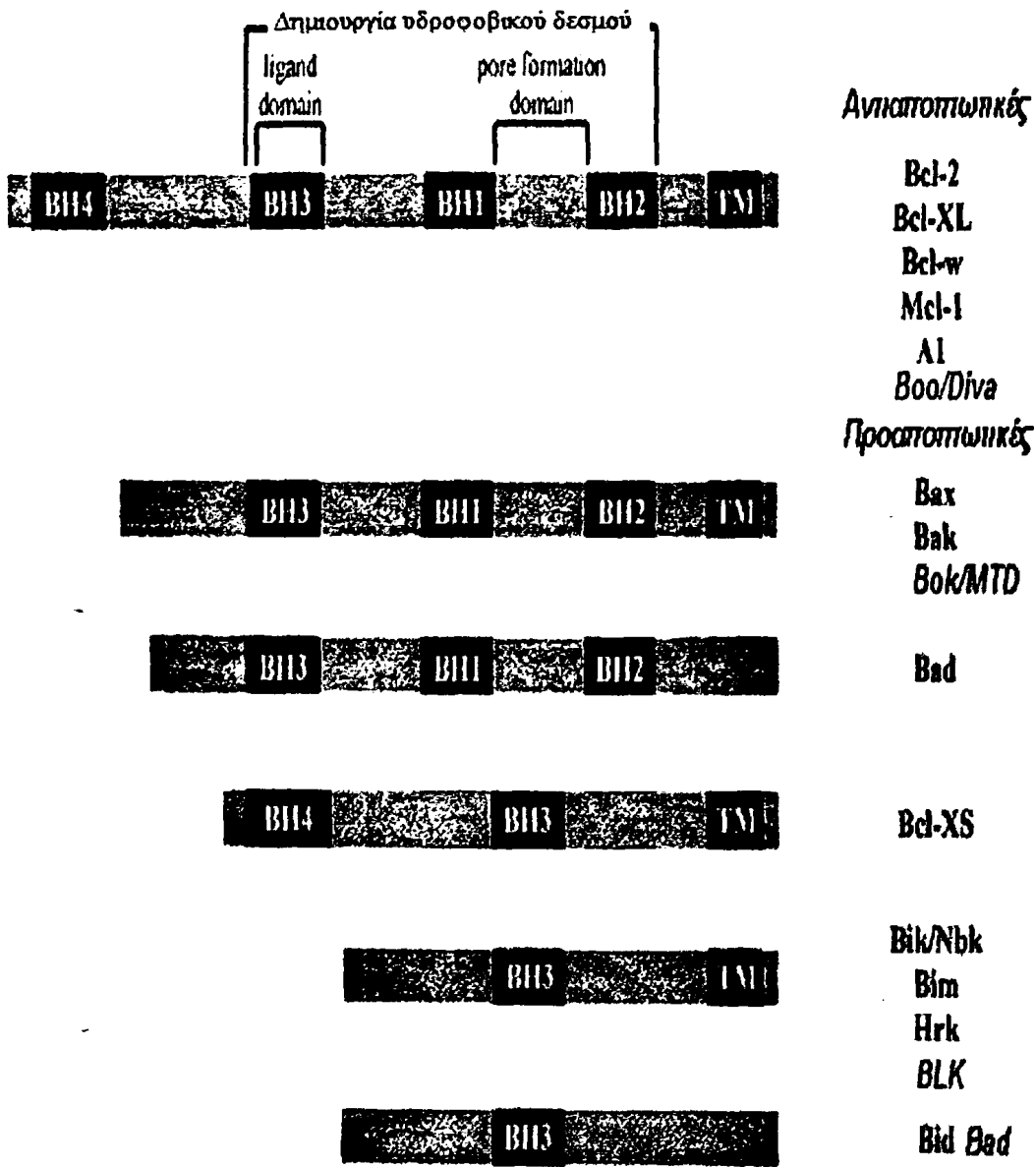


ομόλογο της Bcl-2, όπως και η πρωτεΐνη Ced-3 ανάλογο των κασπασών, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί τουλάχιστον 30 πρωτεΐνες με συγγενή δράση οι οποίες φαίνεται να λειτουργούν είτε ως αναστολείς, είτε ως ενισχυτές της απόπτωσης (Bonnet, 2003). Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας μοιράζονται από 1 ως και 4 συντηρημένες περιοχές (BH). Οι BH1, BH2 και η BH3 βρίσκονται στις πρωτεΐνες με αντι- και προαποπτωτικές ιδιότητες ενώ η περιοχή BH4 μόνο μεταξύ των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Οι περιοχές αυτές φαίνεται να είναι σημαντικές για τη δράση των πρωτεϊνών καθώς αφαίρεση τους ή τροποποίηση τους οδηγεί σε αλλαγή των αναλογιών επιβίωσης/απόπτωσης. Οι BH1 και BH2 βρίσκονται σε όλες τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες και σε κάποιες προαποπτωτικές και φαίνεται να εμπλέκονται στη δημιουργία πόρων ή καναλιών στις μεμβράνες, η BH3 βρίσκεται σε όλες τις Bcl-2 πρωτεΐνες και φαίνεται να παίζει ρόλο στη δημιουργία ετεροδιμερών και η BH4 βρίσκεται στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες και εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες εκτός της Bcl-2 οικογένειας. Έτσι οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η Bcl-2, Bcl-x1, διαθέτουν και τις 4 περιοχές συντηρημένης αλληλουχίας ενώ οι πρωτεΐνες με προαποπτωτική δράση χωρίζονται σε δυο υποκατηγορίες: οι Bax-like πρωτεΐνες, δηλαδή Bax, Bak, Bok/MTD, οι οποίες περιέχουν τις περιοχές BH1-BH3, και οι BH3-only πρωτεΐνες, Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, BNIP3, Blk, οι οποίες περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 (Σχήμα 10).

Η οικογένεια Bcl-2 έχει μια γενική δομή που αποτελείται από μια υδρόφοβη έλικα που περιβάλλεται από αμφιπαθητικές έλικες. Πολλά μέλη της οικογένειας έχουν και διαμεμβρανικές περιοχές κυρίως στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Λειτουργικά οι ομόλογες αυτές περιοχές (BH) επιτρέπουν τον όμο- ή έτερο-διμερισμό μεταξύ των μελών της οικογένειας Bcl-2. Θεωρείται ότι η επιβίωση ή ο θάνατος των κυττάρων, μετά την εφαρμογή ενός αποπτωτικού ερεθίσματος, εξαρτάται από την επικρατούσα αναλογία επαγωγικών και ανασταλτικών διμερών.

Πώς όμως δρουν οι πρωτεΐνες αυτές και πώς εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόπτωσης; Τα αντιαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα. Η Bcl-2 και η Bcl-x1 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και προσδένονται εκεί με το υδρόφοβο καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι πρωτεΐνες αυτές ετεροδιμερίζονται με τα προαποπτωτικά μέλη με αποτέλεσμα να αναστέλλονται τα μιτοχονδριακά γεγονότα της





Σχήμα 10: Δομικές αναλογίες των προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 (Kohler et al., 2002)

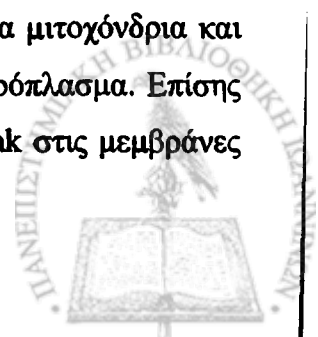


απόπτωσης δηλαδή η χάλαση του διαμεμβρανικού δυναμικού και η απελευθέρωση διαφόρων παραγόντων όπως είναι το κυτόχρωμα c, ο AIF κ.α. (Sattler et al., 1997). Συνεπώς η προκαθορισμένη αναλογία των μορίων που αναχαιτίζουν την απόπτωση, προς τα μόρια που την προάγουν αποτελεί ένα αυτόνομο ροοστάτη που καθορίζει και την απάντηση του κυττάρου στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Δηλαδή όταν υπερεκφράζεται η Bcl-2, τα κύτταρα προστατεύονται, ενώ όταν αυξάνει η έκφραση κάποιου προαποπτωτικού παράγοντα όπως της Bax, και επικρατούν τα ομοδιμερή Bax, τότε τα κύτταρα αποπίπτουν.

BH3-only πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής έχει βρεθεί ότι δρουν στην εκκίνηση και στη διαδικασία της απόπτωσης σε διάφορα είδη, από το νηματόδιο της *C. Elegans*, μέχρι και τα ανώτερα θηλαστικά. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών (Huang and Strasser, 2000). Τα μέλη της ομάδας αυτής φαίνεται πως δρουν μέσω της έλικας της περιοχής BH3 και συνδέονται με τα μέλη των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2. Οι πρωτεΐνες Noxa και Puma έχουν βρεθεί ότι προκαλούν την επαγωγή του γονιδίου της p53 ((Han et al., 2001, Nakano and Wousden, 2001, Oda et al., 2000) με αποτέλεσμα να θεωρούνται σημαντικά για την απόπτωση που προκαλείται λόγω της βλάβης στο DNA. Άλλο αποπτωτικό ερέθισμα προκαλεί την αύξηση στην έκφραση του mRNA των hrk/dp5 και bim στους νευρώνες μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη MAP κινάση JNK (Imaizumi et al., 1997, Inohara et al., 1997). Το Bad από την άλλη, φωσφορυλιώνεται από την ενεργοποιημένη Akt/PKB μετά από ερέθισμα που προκαλείται από μια κυτοκίνη (Datta et al., 1997). Η πρωτεΐνη Bid βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, αφού ενεργοποιηθεί από την κασπάση-8,

μετά από τη δράση κάποιου αποπτωτικού ερεθίσματος (Fas, TNF-α). Το χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης αυτής είναι ότι σχάζεται από την κασπάση-8 δημιουργώντας ένα πολυπεπτιδικό κομμάτι, το p15 (15 kDa, t-bid) το οποίο μετακινείται στα μιτοχόνδρια και είναι απαραίτητο για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Επίσης σημαντική θεωρείται η δράση του στον ολιγομερισμό του Bax ή του Bak στις μεμβράνες



των μιτοχονδρίων. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η δράση των BH3-only πρωτεϊνών εξαρτάται από την παρουσία των Bax και Bak καθώς δεν είναι εφικτό να προκαλέσουν απόπτωση όταν απουσιάζουν τα μέλη αυτής της ομάδας.

Bax-like πρωτεΐνες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι Bax-like πρωτεΐνες περιέχουν από μια έως τρεις συντηρημένες περιοχές BH1-BH3. Οι πιο γνωστές είναι οι πρωτεΐνες Bax (Bcl associated X protein) και Bak. Το Bax, το οποίο εξετάζεται και στην παρούσα μελέτη, φυσιολογικά βρίσκεται ως μονομέρες στο κυτταρόπλασμα (Hsu et al., 1997) ενώ τα μόρια του Bak βρίσκονται προσδεμένα στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας το Bax αλλάζει διαμόρφωση και μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και ολιγομερίζεται (Hsu et al., 1997, Wolter et al., 1997). Παρόλο που λιγότερα είναι γνωστά για τη δράση του Bak, φαίνεται πως και αυτό πραγματοποιεί παρόμοια αλλαγή διαμόρφωσης και ολιγομερίζεται (Griffiths et al., 1999, Nechushtan et al., 2001). Φαίνεται πως το καρβοξυτελικό άκρο της α -έλικας του Bax παίζει σημαντικό ρόλο στη μετατόπιση του στα μιτοχόνδρια. Μελέτες στη δομή του Bax, έχουν δείξει ότι το καρβοξυτελικό του άκρο είναι τοποθετημένο πάνω στην αύλακα που σχηματίζουν τα τμήματα του BH1,-2,-3 μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την έκθεση προς τα έξω των υδρόφοβων τμημάτων του (Suzuki et al., 2000). Επίσης αλλαγές φαίνεται να υπάρχουν και στο αμινοτελικό άκρο του Bax κατά τη διάρκεια ενός αποπτωτικού ερεθίσματος. Στη συνέχεια, το Bax προκαλεί τη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων από όπου μπορούν να απελευθερωθούν στο κυτταρόπλασμα μόρια όπως είναι το κυτόχρωμα c, ο AIF κ.α. Φαίνεται πως η πρωτεΐνη Bax είναι ικανή, είτε να σχηματίσει πόρους στη μεμβράνη (Antonsson et al., 1997, Eskes et al., 1998, Nechushtan et al., 2001) είτε να δεθεί και να τροποποιήσει τα ήδη υπάρχοντα μιτοχονδριακά κανάλια (Marzo et al., 1998, Narita et al., 1998).

Το ερώτημα όμως που παραμένει είναι ποιο είναι το μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση και τη μετατόπιση του παράγοντα Bax στα μιτοχόνδρια. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, όμως η θεωρία που φαίνεται να ισχύει είναι αυτή στην οποία εμπλέκεται η MAP κινάση JNK (Lei et al., 2002). Έτσι μια εκδοχή είναι αυτή όπου φωσφορυλιώνονται οι πρωτεΐνες 14-3-3 οι οποίες φυσιολογικά δένονται και κρατούν



το Βαχ στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή του (Nomura et al., 2003). Παράλληλα έχουν διατυπωθεί και άλλες θεωρίες όπως αυτή που σχετίζει τα λυσοσωμάτια με την ενεργοποίηση του προαποπτωτικού παράγοντα Βαχ. Είναι πιθανό τα λυσοσωμάτια μετά την επίδραση κάποιου οξειδωτικού ερεθίσματος να απελευθερώνουν στο κυτταρόπλασμα ουσίες οι οποίες μπορούν με κάποιο τρόπο να ενεργοποιήσουν το Βαχ (Roberg et al., 1999, Bidere et al., 2003).



1.7 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2001 έχοντας ως γενικό στόχο τη συστηματική φυτοχημική μελέτη των Ελληνικών ποικιλιών ελιάς, σε ότι αφορά την περιεκτικότητα και τη δράση αντιοξειδωτικών μορίων. Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης αυτού του προγράμματος τέθηκαν επιπλέον στόχοι που είχαν ως σκοπό την κατανόηση σε βάθος των μοριακών μηχανισμών δράσεως των συστατικών του ελαιόλαδου. Έτσι, οι επιμέρους στόχοι της δικής μας ερευνητικής ομάδος ήταν: α) Η εκτίμηση και η σύγκριση των προστατευτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα φύλλα, τον καρπό της ελιάς, το ελαιόλαδο και τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου, β) Η εκτίμηση της προστασίας που προσφέρουν τα εκχυλίσματα του ελαιόλαδου που προέρχονται από διάφορες περιοχές, γ) Η εκτίμηση της κυτταροπροστατευτικής ικανότητας απομονωμένων συστατικών του ελαιόλαδου, δ) Η διερεύνηση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού της κυτταροπροστατευτικής ικανότητας της ενώσεως υδροξυτυροσόλη και ε) Η εκτίμηση της ικανότητας των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου να αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλεί στα κύτταρα η δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Sigma Company, St Louis, MO, USA

RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, δισκία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), οξειδάση της γλυκόζης (*Aspergillus niger*, 18000 Units/g), πεπστατίνη A (pepstatin A), λουπεπτίνη (leupeptin), Hoechst 33342, κυανούν της βρωμοφαινόλης, τετρακυκλίνη, πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO), διθειοθρεϊτόλη, τυροσόλη, Trolox, 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (γεντισικό οξύ), 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ), 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχουϊκό οξύ), 4-υδροξυ-3-μεθόξυ-φαινυλοξικό οξύ (ομοβανιλικό οξύ), p-κουμαρικό οξύ, p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυ-3-μεθόξυβενζοϊκό οξύ (βανιλικό οξύ), 4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ (συριγγικό οξύ), trans-2-υδροξυκινναμικό οξύ, 3,5-διμεθόξυ-4-υδροξυκινναμικό οξύ (σιναπινικό οξύ), ([-]3α, 4α, 5β-Τριυδροξυ-1-κυκλοεξένιο-1-καρβοξυλικό οξύ ([-] σικιμικό οξύ), 4-υδροξυ-3-μεθόξυκινναμικό οξύ (φερουλικό οξύ), 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός εμβρύου μόσχου (FCS), πλαστικά καλλιεργειών, αγαρόζη χαμηλού σημείου πήξεως, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, πουρομυκίνη, πρωτεϊνάση K, PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride).

Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Το φθορίζον υπόστρωμα για την κασπάση-3, Ac-DEVD-AMC, το αντίσωμα κατά των επιτόπων του κυτοχρώματος c, της PARP, της Bcl-2, εναντίον της Bcl-x1 και της Bid. Αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP).

Extra-Synthese, Genay Cedex, France

2-(3,4-διυδροξυφαινυλική)αιθανόλη (Υδροξυ-τυροσόλη)



Aldrich Company, Steinheim, Germany*trans*-κινναμικό οξύ**DakoCytomation, Glostrup Denmark**

Πρωτοταγές αντίσωμα κατά του επιτόπου της πρωτεΐνης Βακ.

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USAΤα υλικά της ηλεκτροφόρησης: ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, αντιδραστήριο Bradford.**Illmenau Company, Germany**

Neubauer Improved Hematocytometer

Merck Company, Darmstadt, GermanyΥπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), βρωμιούχο αιθίδιο, κυανούν του τροπανίου (trypan blue).**Molecular Probes Company, Eugene, OR, USA**

Ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1), ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM).

Boehringer Mannheim Company, Mannheim, Germany

RNase-A

Roche Diagnostics Company, Mannheim, Germany

Απροτινίνη (Aprotinin)

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)



Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides)

Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England

Αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

Το salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) ήταν μία προσφορά του κ. Κωνσταντίνου Παντόπουλου (McGill University, Montreal, Canada).

Ελαιόλαδο και συστατικά της ελιάς

Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, καρπού ελιάς, ελαιόλαδου και απόνερων της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου προετοιμάστηκαν από τον δρ. Αγάλια Απόστολο στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκαλτσούνη. Επίσης οι ενώσεις που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ξεχωριστά προετοιμάστηκαν από το δρ. Αγάλια.

Τα υπόλοιπα χημικά ήταν αναλυτικής ποιότητας του εμπορίου.



2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

2.2.1 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Η κυτταρική σειρά Jurkat προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σαν εναιώρημα σε RPMI-1640 το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.

Οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται κάτω από άσηπτες συνθήκες σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37 °C, επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

2.2.2 Διατήρηση κυτταρικής σειράς

Τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατεψυγμένα σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο (-196 °C). Η διαδικασία κατάψυξης τους πραγματοποιείται ως εξής: Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους, συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στα 700 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 10 λεπτά. Επαναιωρούνται σε 5 ml PBS και φυγοκεντρώνονται όπως και προηγούμενα. Το κυτταρικό ίζημα, επαναιωρείται στο μίγμα κατάψυξης που αποτελείται από 90% εμβρυϊκού ορού μόσχου (FCS) και 10% διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ένα ml του παραπάνω μίγματος (5-7 x 10⁶ κύτταρα) μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης τα οποία ψύχονται σταδιακά. Αρχικά τοποθετούνται σε δοχείο με πάγο για 10 περίπου λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη -80 °C και 48 ώρες αργότερα τοποθετούνται στο δοχείο υγρού αζώτου όπου και διατηρούνται.

Η απόψυξη τους γίνεται γρήγορα με τη μεταφορά του σωληναρίου κατάψυξης στους 37 °C. Το περιεχόμενο του μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρείται στα 700 x g για 10 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και καλλιεργούνται στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας τους για 24 ώρες.



2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

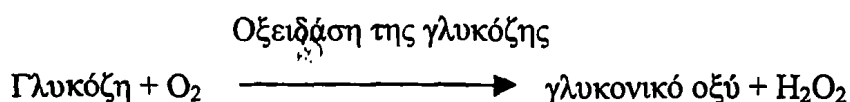
Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαινόταν φωτεινά και διάφανα ενώ τα νεκρά εμφανιζόταν βαθύ μπλε. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν.

2.2.4 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τέσσερα ml εναιωρήματος κυττάρων Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο πλαστικού πλακιδίου έξι θέσεων και καλλιεργήθηκαν για 24 περίπου ώρες στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων (37°C , 5% CO_2). Ακολούθως, το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από φρέσκο που περιείχε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης. Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν ο όγκος τους προσαρμόστηκε στο 1 ml και ο αριθμός τους προσδιορίστηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Η γραφική αναπαράσταση του αριθμού των κυττάρων ανά ml σε συνάρτηση με το χρόνο δίνει την καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων ενώ από την κλίση της ευθείας προσδιορίζεται ο ρυθμός ανάπτυξης τους.

2.3 Έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 το οποίο παραγόταν με συνεχή και σταθερό ρυθμό με τη δράση του ενζύμου “οξειδάση της γλυκόζης”. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη και το O_2 και παράγει γλυκονικό οξύ και H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:



Στα περισσότερα πειράματα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ το οποίο προστέθηκε άμεσα στην κυτταρική καλλιέργεια.

2.4 Μέτρηση του ρυθμού παραγωγής H₂O₂ από την οξειδάση της γλυκόζης

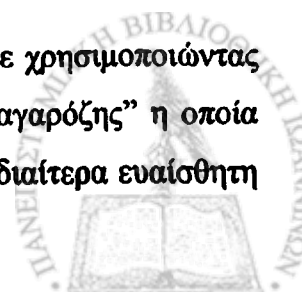
Ο ρυθμός παραγωγής H₂O₂ από την οξειδάση της γλυκόζης προσδιορίστηκε σε φωτόμετρο (Shimadzu UV-3000, Kyoto, Japan). Διάφορες ποσότητες του ενζύμου προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος γλυκόζης (5 mM γλυκόζη σε PBS) σε θερμοκρασία 37 °C και καταγράφηκε η απορρόφηση του μίγματος στα 240 nm για 15 περίπου λεπτά. Από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ (εκφρασμένος σε μM ανά λεπτό). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του H₂O₂ στα 240 nm είναι 43.6 M⁻¹cm⁻¹.

2.5 Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο του MTT

Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Στηρίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ανάγει την ένωση MTT (3-(4,5-διμέθυλο)-2,5-διφαινύλο βρωμίδιο του τετραζολίου) και να παράγει ένα μπλε προϊόν το οποίο ονομάζεται φορμαζάνη. Τα κύτταρα μετά από επώαση με τις διάφορες ενώσεις, επώαστηκαν με το διάλυμα του MTT (αρχική συγκέντρωση 5 mg/ml σε RPMI το οποίο δεν περιείχε κόκκινη φαινόλη, φιλτραρίστηκε σε 0.2μm φίλτρο στο σκοτάδι πριν χρησιμοποιηθεί). Η τελική συγκέντρωση του MTT ήταν 0.2 mg/ml. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 80 μl 10 % SDS σε κάθε φρεάτιο για να διαλυθούν οι μεμβράνες των κυττάρων για άλλες 8 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε φρεατίου σε αυτόματο ELISA φωτόμετρο σε μήκος κύματος 550 nm και τα 690 nm ως μήκος κύματος αναφοράς.

2.6 Ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης (comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H₂O₂ έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική της “ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης” η οποία είναι γνωστή και ως “comet assay”. Η comet assay είναι μία απλή και ιδιαίτερα ευαίσθητη



μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μία αλυσίδα του κυτταρικού DNA. Ένα επίσης σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι έχει τη δυνατότητα να μελετηθεί η βλάβη του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η comet assay περιγράφηκε αρχικά από τους Ostling και Johanson οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Ostling and Johanson, 1984). Λίγα χρόνια αργότερα οι Singh και συνεργάτες (Singh et al., 1988) τροποποίησαν την αρχική μορφή των Ostling και Johanson εξέλιξαν τη μέθοδο. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η comet assay ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή τις διπλές αλυσίδες του DNA αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά από επώαση με κατάλληλα ένζυμα που τις αναγνωρίζουν απομακρύνονται και με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σχάσεις στο DNA οι οποίες στη συνέχεια ανιχνεύονται με την comet assay.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Προκειμένου να γίνει αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 13$) με αποτέλεσμα τη μετουσίωση του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει την μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση επανασηματίζονται. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA είναι στην πράξη “θηλιές” του DNA που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικομένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

2.6.1 Πειραματική διαδικασία της ‘comet assay’

Με την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 , τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 450 x g (centrifuge 5415D,



Erpendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1% σε PBS), και σκεπάστηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για δέκα λεπτά ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια επικαλύφθηκαν για 60 λεπτά με διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 μM Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 10) στους 4 °C. Έτσι απομακρύνονται τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά αλλά το DNA παραμένει υπερελικομένο και συσκευασμένο σε μία πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Στο επόμενο στάδιο, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μία οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40. Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30V, 300 mA) για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS (3 φορές από 5 λεπτά η κάθε μία) (Panayiotidis et al., 1999).

2.6.2 Υπολογισμός της βλάβης

Το κυτταρικό DNA βιάστηκε με την προσθήκη 40 μl ανά πλάκα, διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (2,5 μg/ml σε PBS) και την παραμονή στο σκοτάδι για 10 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα. Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400. Η βλάβη δεν ήταν ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα βασίστηκε στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Κάθε σχηματισμός κατατάχτηκε σε μία από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (Σχήμα 11). Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε ολικά πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκε και εκφράζοντας τη βλάβη σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA λαμβάνει τιμές από 0 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 0) έως 400 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 4) αυθαίρετες μονάδες (Panayiotidis et al., 1999).



2.7 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

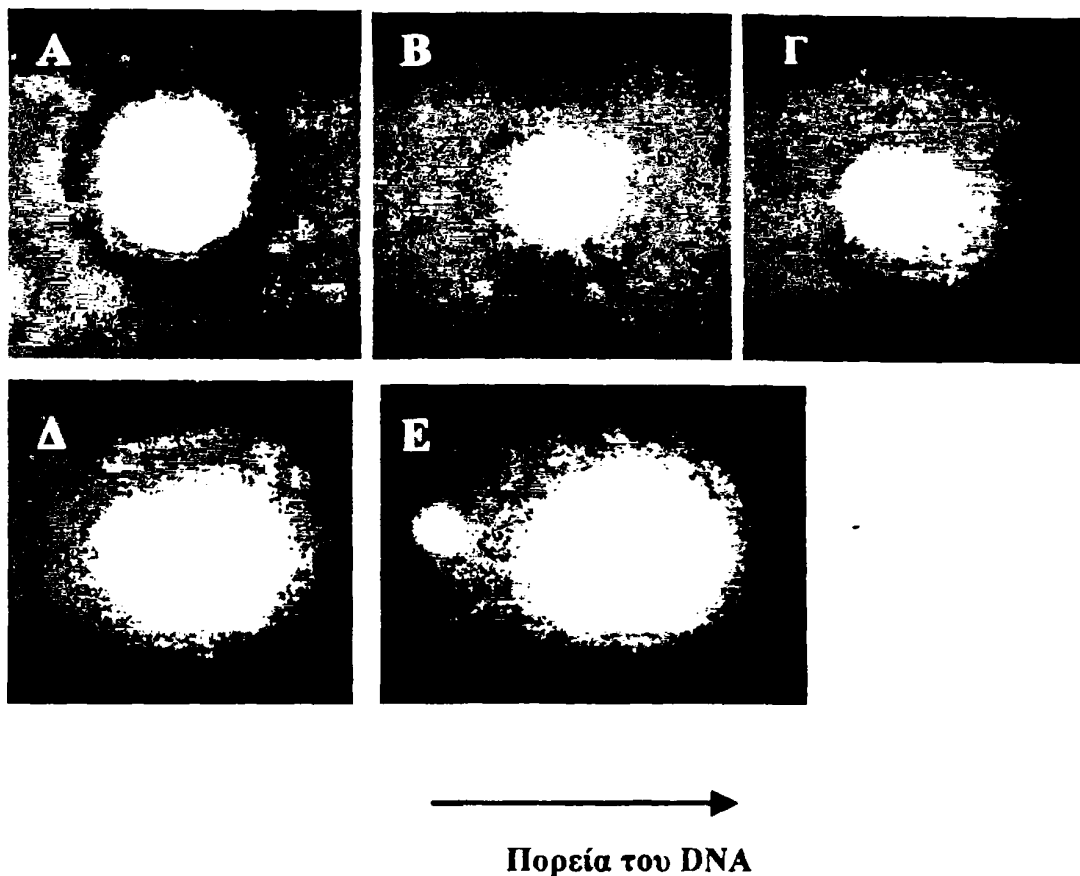
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων προσδιορίστηκε με φωτομετρικό τρόπο βασισμένο στην ικανότητα της κάθε ένωσης να ελαττώνει την οξείδωση του ABTS στην κατιονική του ρίζα που προκαλείται από τις ρίζες σιδήρου-μυογλοβίνης, που παράγονται από την αντίδραση του H_2O_2 με τη met-μυογλοβίνη (Rice-Evans et al., 1994). Η οξείδωση του $ABTS^+$ μετρήθηκε ακολουθώντας την απορρόφηση στα 600 nm. Έτσι μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα αντίστοιχη της ένωσης Trolox, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) των ενώσεων, δηλαδή υπολογίστηκε η μοριακή ενεργότητα των ενώσεων σε σχέση με το Trolox. Σε κυψελίδα τύπου *Quartz*, η οποία περιείχε 1 ml από το χρωμογόνο διάλυμα (φερρυλική-μυοσφαιρίνη και $ABTS^+$), προστέθηκαν 10 μM από τη φαινολική ένωση ή την πρότυπη ένωση Trolox. Ακολούθησε προσθήκη H_2O_2 και μετά την πάροδο 3 λεπτών η απορρόφηση καταγράφηκε στα 600 nm. Τέλος η τιμή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) της κάθε ουσίας, η οποία εκφράζει την ικανότητά της να εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες σε ισοδύναμα του Trolox, ενός υδατοδιαλυτού αναλόγου της βιταμίνης E, υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\mu M \text{ Trolox} = \text{Factor} \times (\Delta A \text{ τυφλού} - \Delta A \text{ δείγματος})$$

οπού $\text{Factor} = 10 \mu M / (\Delta A \text{ τυφλού} - \Delta A \text{ προτύπου})$ και

ΔA τυφλού, η μεταβολή της απορρόφησης απουσία αντιοξειδωτικού





Σχήμα 11: Μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις. Επιλεγμένοι μορφολογικοί σχηματισμοί που δείχνουν αυξανόμενη βλάβη του DNA Jurkat κυττάρων πριν και μετά την έκθεσή τους σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 για 10 λεπτά (απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.2 $\mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης ικανή να δημιουργεί περίπου 4 μM H_2O_2 ανά ml). (A) τάξη 0, (B) τάξη 1, (Γ) τάξη 2, (Δ) τάξη 3, (E) τάξη 4

2.8 Βαφή του DNA των κυττάρων με τη χρωστική Hoechst

Με τη μέθοδο αυτή εξετάζεται η μορφολογία των πυρήνων κυττάρων και η κατάταξη τους σε αποπτωτικούς ή μη σχηματισμούς. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή αποτελείται από τα εξής στάδια. Τα κύτταρα μετά την επώαση με τους διάφορους παράγοντες ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν για 15 λεπτά με διάλυμα παραφορμαλδεύδης (4% σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με PBS και η ελεύθερη παραφορμαλδεύδη αδρανοποιήθηκε με επώαση για 15 λεπτά με διάλυμα NH_4Cl (50 mM σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα βάφτηκαν με τη χρωστική Hoechst 33342 σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ για 15 λεπτά. Στο τέλος εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus IX70-FL, Tokyo, Japan). Η χρωστική είχε διέγερση μήκους κύματος στα 340 nm και η εκπομπή φιλτραρίστηκε με φίλτρο των 510-nm. Για να ποσοτικοποιηθεί η αποπτωτική διαδικασία μετρήθηκαν κύτταρα με κατακερματισμένους και συμπυκνωμένους πυρήνες καθώς και πυρήνες κυττάρων μαρτύρων.

2.9 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης

2.9.1 Απομόνωση κυτταρικού DNA

Με την τεχνική αυτή εξετάζονται βλάβες στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την απομόνωση του, το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης (συσκευή της Life Technologies, GIBCO BRL) και στη συνέχεια εξετάζεται σε λάμπα φθορισμού. Το DNA των κυττάρων μαρτύρων παραμένει ακίνητο κατά την ηλεκτροφόρηση, ενώ το DNA των αποπτωτικών κυττάρων μετακινείται και ανιχνεύονται σε αυτό χαρακτηριστικές ζώνες (laddering), οι οποίες είναι τμήματα DNA πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων και σχηματίζονται εξαιτίας της δράσης ειδικών ενδονουκλεασών (Enari et al., 1998). Αντίθετα, στο DNA νεκρωτικών κυττάρων προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφόρηση του DNA να μην παρατηρείται το χαρακτηριστικό laddering.

Μετά την έκθεση σε διάφορους παράγοντες (H_2O_2 , υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη κ.α.), τα κύτταρα συλλέχθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 700 x g. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης (0.1 M NaCl, 10



mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1% SDS, 0,2 mg/ml πρωτεΐνάσης K) και αφέθηκαν στους 55 °C για 12 ώρες. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με 2 ml TEN (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) 4ml φαινόλης και 4 ml μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναδεύτηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 700 x g με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση (περιείχε το DNA), η οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες. Η υδατική φάση αναμείχθηκε στη συνέχεια με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και το τελικό μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από νέα φυγοκέντρηση συλλέχθηκε η υδατική φάση και το DNA κατακρημνίσθηκε με την προσθήκη δύο όγκων ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και μεταφορά των δειγμάτων στους -20 °C για τουλάχιστον 4 ώρες. Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 13000 x g στους 4 °C και αφού απομακρύνθηκε η αιθανόλη επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε ορισμένο όγκο TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν με 2 mg/ml RNase-A για 60 λεπτά στους 37 °C έτσι ώστε να απομακρυνθεί το RNA.

2.9.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε από την τιμή της απορρόφησης στα 260 nm γνωρίζοντας ότι η τιμή της απορρόφησης για 50 μg/ml DNA ισούται με ένα. Ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 και 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) δίνει προσεγγιστικά την καθαρότητα του δείγματος. Οι τιμές του για καθαρά δείγματα DNA κυμαίνονται μεταξύ 1.8 και 2.0 ενώ παρουσία πρωτεϊνών ή φαινόλης ο λόγος λαμβάνει μικρότερες τιμές.

2.9.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στη συνέχεια το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (89 mM Tris, 89 mM βορικό οξύ, 2 mM EDTA). Η θέση του DNA στην πηκτή εντοπίστηκε με τη χρησιμοποίηση βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο παρουσία υπεριώδους



ακτινοβολίας φθορίζει. Η κινητικότητα του DNA σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του, την μορφή του και από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2% στην οποία προστέθηκαν 0.2 $\mu\text{g/ml}$ βρωμιούχου αιθιδίου. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την ηλεκτροφόρηση ως εξής: Δεκαπέντε μg DNA κάθε δείγματος αναμίχθηκαν με 3 μl διαλύματος χρώσης (50% γλυκερόλη, 1 mM EDTA, 0.4% κυανού της βρωμοφαινόλης) και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 20 μl με δις-απεσταγμένο νερό. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 100 V. Η πηκτή παρατηρήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφήθηκε με ηλεκτρονική κάμερα Kodak (Kodak DC 120).

2.10 Μέτρηση της ενεργότητας της κασπάσης-3

Είναι γνωστό πως τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης προκύπτουν από την ενεργοποίηση μιας εξειδικευμένης οικογένειας πρωτεασών που περιέχουν κυστεΐνη και ασπαρτικό οξύ και ονομάζονται κασπάσες (cysteine aspartic-acid proteases). Οι κασπάσες που συμμετέχουν στην αποπτωτική διαδικασία εκφράζονται συνεχώς σε όλα τα κύτταρα σαν ανενεργά προένζυμα. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε στη συνέχεια η ενεργότητα της κασπάσης -3 φθορισμομετρικά. Χρησιμοποιήθηκε το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin). Το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται από την ενεργοποιημένη κασπάση -3 της οποίας αποτελεί υπόστρωμα και απελευθερώνεται η φθορίζουσα ουσία AMC. Επειδή το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται σε μικρότερο ποσοστό και από άλλες ενεργοποιημένες κασπάσες (-7,-6,-8,-10) η ενεργότητα που μετρείται με τη μέθοδο αυτή καλείται και caspase-3-like ή ενεργότητα DEVDase.

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών 150 μg ολικού ή κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος επώαστηκε για 1 ώρα στους 37 °C με το διάλυμα αντίδρασης (100 μM HEPES, pH: 7.5, 10 % sucrose, 0.1 % CHAPS και 10 mM DTT), που περιείχε 100 μM φθορογόνου υποστρώματος Ac-DEVD-AMC. Η πυκνότητα του φθορισμού από το AMC που απελευθερώνεται μετρήθηκε στο φθορισμόμετρο (HITACHI, F2500, Japan) με διέγερση στα 380 nm και εκτομή στα 460 nm.



2.11 Παρασκευή ολικών, πρωτεϊνικών, μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων.

Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα

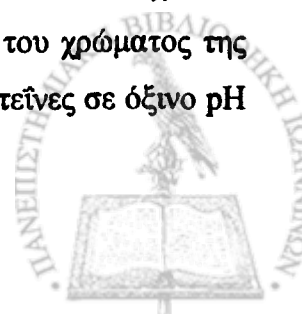
Τα κύτταρα πλύθηκαν μία φορά με PBS και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 700 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 100 mM EDTA, 1mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin A, 10 μg/ml aprotinin, 20 μg/ml leupeptin) και παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά. Εν συνεχεία το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στα 16000 x g στους 4 °C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες.

Μιτοχονδριακό και κυτταροπλασματικό εκχύλισμα

Τα κύτταρα (80×10^6) πλύθηκαν δύο φορές με PBS και επαναιωρήθηκαν για 30 λεπτά στους 4 °C στο διάλυμα απομόνωσης (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM sodium EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μM leupeptin, 10 μM aprotinin) σε 250 mM διαλύματος σουκρόζης. Στη συνέχεια πέρασαν 20 φορές από ομογενοποιητή διαλύματος. Τα κύτταρα που δεν είχαν σπάσει και οι πυρήνες των κυττάρων καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 700 x g για 6 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στα 10,000 x g για 15 λεπτά για να διαχωριστούν οι βαριές μεμβράνες που περιείχαν το μιτοχονδριακό κλάσμα (M-10) και το κυτταροδιάλυμα (S-100). Το μιτοχονδριακό κλάσμα στη συνέχεια ξεπλύθηκε και καταβυθίστηκε με φυγοκέντρηση στα 12,000 x g για 20 λεπτά. Το κλάσμα του κυτταροδιαλύματος (S-100) φυγοκεντρήθηκαν στα 100,000 x g για 1h στους 4 °C για να απομακρυνθούν οι ελαφρές μεμβράνες και το τελικό κλάσμα αποθηκεύτηκε ως κλάσμα κυτταροδιαλύματος.

2.11.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford η οποία στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής coomassie brilliant blue G-250 όταν αυτή συνδέεται στις πρωτεΐνες σε όξινο pH



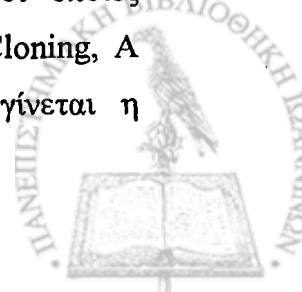
(Bradford, 1976). Μικρός όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος (3-5 μl) αραιώθηκε με νερό μέχρι όγκου 800 μl και το μίγμα αυτό αναμίχθηκε με 200 μl αντιδραστηρίου Bradford υπό έντονη ανάδευση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm σε φωτόμετρο. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη ορού βοός (0-16 μg/ml).

2.12 Ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και ανίχνευση πρωτεϊνών

2.12.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσα στους πόρους του πολυακρυλαμιδίου υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η πηκτή σχηματίζεται με συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και N,N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Η πρώτη ουσία με πολυμερισμό δημιουργεί το πολυακρυλαμίδιο, ενώ η δεύτερη συνδέει τις αλυσίδες του πολυακρυλαμιδίου δημιουργώντας το τρισδιάστατο πλέγμα της πηκτής. Για την έναρξη του πολυμερισμού χρησιμοποιείται το $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ενώ για την επιτάχυνση του πολυμερισμού χρησιμοποιείται η N,N,N',N'-τετραμέθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED). Χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες παρουσία δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να δεσμεύεται μ' αυτές σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης) σχηματίζοντας επιμήκη σύμπλοκα με καθορισμένη δομή. Η δέσμευση αυτή προσδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό αρνητικό φορτίο που είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σ' αυτό το σύστημα είναι ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης που εφαρμόστηκε ασυνεχές σύστημα και αποτελούνταν από την πηκτή επιστοιβαξης και την πηκτή διαχωρισμού οι οποίες παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook et al., 1989). Στην πηκτή επιστοιβαξης γίνεται η



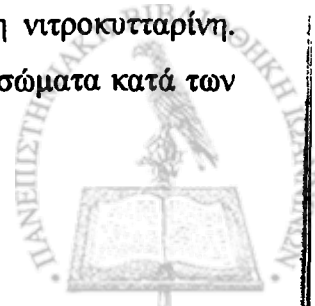
συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος πριν αυτές εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού και περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH=6,8 και 0,1% (w/v) APS και 0.1% SDS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού η οποία έχει την κατάλληλη ποσότητα πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό τους. Εκτός του πολυακρυλαμιδίου η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 0,39 M Tris pH=8,8, 0.1% SDS και APS. Συγκεκριμένα, για την PARP χρησιμοποιήθηκε πηκτή SDS-ακρυλαμιδίου 10%, για το κυτόχρωμα c και την Bid 12% ενώ για τις Bcl-2, Bcl-xl και Bax 15%.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (50 µg) μεταφέρθηκαν στην πηκτή αφού προηγουμένως μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 5 λεπτά στους 100 °C, με το διάλυμα διαλυτοποίησης (0,25 M Tris pH=6.8, 9,2% SDS, 40% (v/v) γλυκερόλη, 0,2% κυανούν της βρωμοφαινόλης) παρουσία 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε διάλυμα που περιείχε 0,025 M Tris, 0,192 M γλυκίνη, 0,1% SDS, στα 120 V μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σε συσκευή της BioRad.

2.12.2 Μεταφορά πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε νιτροκυτταρίνη

Με το πέρας του διαχωρισμού, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε πάνω στην πηκτή και τα δύο μαζί τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε διπλό χαρτί Whatman. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συσκευή μεταφοράς με τη μεμβράνη προς το θετικό πόλο. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από την πηκτή στη μεμβράνη με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος (100 mA, για 120 λεπτά), σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Στο τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη πλύθηκε με PBS και έγινε χρώση με 0.2 % Ponceau S σε 1% οξικό οξύ για 5 λεπτά προκειμένου να επιβεβαιωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών. Ο αποχρωματισμός των πρωτεϊνών έγινε με πλύση της μεμβράνης με απεσταγμένο νερό και επώαση για 10 λεπτά με PBS. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε για 1-2 ώρες με το διάλυμα δέσμευσης (blocking buffer) που περιείχε 5% άπαχο γάλα σε TBST (20 mM Tris, 0,9% NaCl, 0,5% Tween 20) προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες θέσεις πάνω στη νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης και αιώρησή της για 1 ώρα με αντισώματα κατά των



πρωτεϊνών PARP, κυτοχρώματος c, Bcl-2, Bcl-xl, Bid και Bax ενώ ακολούθησε πλύσιμο 3 φορές από 5 λεπτά και 2 φορές από 10 λεπτά με TBST και στη συνέχεια επώαση για 1 ώρα με τα δεύτερα αντισώματα τα οποία ήταν συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP). Στη συνέχεια η μεμβράνη πλύθηκε όπως και προηγουμένως.

2.12.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση:



Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διηγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωση της σε φιλμ.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για 1-5 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR). Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτηση του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak AL 4, X-ray fixer).



2.13 Μέτρηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού

Για την εκτίμηση του $\Delta\psi_m$ χρησιμοποιούνται συνήθως κατιονικές λιπόφιλες φθορίζουσες χρωστικές ουσίες οι οποίες συσσωρεύονται στην εσωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης εξαιτίας του αρνητικού της φορτίου (Kroemer et al. 1997). Έτσι χρησιμοποιήθηκε το λιπόφιλο κατιόν 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) και ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από την Cossarizza και τους συνεργάτες (Cossarizza et al., 1993). Μετά την έκθεση σε H_2O_2 , τα κύτταρα πλύθηκαν αρχικά με PBS και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 0.3 ml διαλύματος χρώσης (1 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 σε PBS). Η επώαση με το διάλυμα χρώσης πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια τα κύτταρα αφού φυγοκεντρήθηκαν επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και παρέμειναν στον πάγο μέχρι την ανάλυση τους με κυτταρομετρία ροής. Στα φυσιολογικά κύτταρα όπου το μεμβρανικό δυναμικό είναι υψηλό το JC-1 συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και σχηματίζει συσσωματώματα (JC-1 aggregates) φθορίζοντας έντονα στο κόκκινο ενώ όταν το μεμβρανικό δυναμικό είναι χαμηλό η συγκέντρωση του JC-1 στα μιτοχόνδρια μειώνεται. Στην περίπτωση αυτή το JC-1 βρίσκεται στη μονομερή του μορφή φθορίζοντας στο πράσινο.

2.14 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων

Η σταθερότητα των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής εξετάζοντας την μετατόπιση της φθορίζουσας ουσίας πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, A.O.) από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα (Doulias et al., 2003, Person et al., 2003). Το A.O. είναι μια φθορίζουσα ουσία η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνει κόκκινο φθορισμό ενώ σε χαμηλές πράσινο (metachromatic fluorophore). Το A.O. είναι μία ασθενής βάση (pK_a περίπου 10) η οποία πρωτονιώνεται ελάχιστα σε φυσιολογικό pH, όμως σε οργανίδια που έχουν χαμηλό pH όπως τα λυσοσωμάτια, πρωτονιώνεται και συσσωρεύεται (pH περίπου 4.5). Σε ανέπαφα κύτταρα, το μεγαλύτερο μέρος του A.O. συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτια και φθορίζει έντονα κόκκινο και μόνο ένα μικρό του μέρος υπάρχει στο κυτταρόπλασμα έχοντας ασθενή πράσινο φθορισμό. Επομένως, ο πράσινος φθορισμός του AO μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της σταθερότητας των

λυσσοσωματίων αφού η αύξηση του θα σημαίνει τη μετανάστευση του ΑΟ από τα λυσσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια την αποσταθεροποίηση των οργανιδίων αυτών.

Η πειραματική πορεία είναι η εξής: Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 λεπτά με 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ΑΟ (προστέθηκε απευθείας στο καλλιεργητικό υλικό) στους 37 $^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για περίπου 45 λεπτά σε θρεπτικό μέσο χωρίς ΑΟ έτσι ώστε να δοθεί χρόνος για τη συσσώρευση του ΑΟ στα λυσσοσωμάτια και ακολούθησε η έκθεση των κυττάρων στις διάφορες ενώσεις και στο H_2O_2 . Με το πέρας της έκθεσης αυτής, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι την ανάλυση τους. Η ανάλυση έγινε σε κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) και ο φθορισμός του ΑΟ καταγράφηκε με το πρόγραμμα CellQuest.

2.15 Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου

Μετρήθηκαν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου σε φθορισμόμετρο εξετάζοντας την αύξηση του φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνης, μετά την προσθήκη του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH (Epsztejn et al., 1997). Η καλσεΐνη αποτελείται από ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδεδεμένο με ένα μόριο EDTA. Το μόριο αυτό φέρει μία εστερική ομάδα (ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης) προκειμένου να διαπερνάει την κυτταρική μεμβράνη. Στο εσωτερικό του κυττάρου, ο εστερικός δεσμός υδρολύεται από μη εξειδικευμένες εστεράσες και αναστέλλεται η ικανότητα της καλσεΐνης να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση της αλλά και την ικανότητά της να φθορίζει. Η σύνδεση της καλσεΐνης με ιόντα μετάλλων, κυρίως δισθενή, (αναλογία 1:1) έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Με προσθήκη ισχυρότερων δεσμευτών σιδήρου από αυτή, η καλσεΐνη χάνει το σίδηρο που έχει προηγουμένως δεσμεύσει και τότε αυξάνεται ο φθορισμός της ανάλογα με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (Kakhlon et al., 2002).

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής: Το καλλιεργητικό υλικό απομακρύνθηκε, τα κύτταρα πλύθηκαν μία φορά με PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά σε διάλυμα καλσεΐνης (0.15 μM καλσεΐνη-AM, 1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES pH 7.3, σε



PBS) στους 37 °C. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων, φυγοκέντρηση στα 450 x g για 5 λεπτά και πλύσιμο τους με το παραπάνω διάλυμα χωρίς καλσεΐνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2.2 ml του παραπάνω διαλύματος (1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES pH 7.3 σε PBS) και μεταφέρθηκαν στο φθορισμόμετρο (HITACHI, F2500, Japan). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C και τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 488 nm και 517 nm αντίστοιχα. Τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου εκτιμήθηκαν από την αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης μετά την προσθήκη 11 μΜ του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH έτσι ώστε να καταγραφεί το ποσό του σιδήρου που παρέμεινε δεσμευμένος στην καλσεΐνη, μετά την προσθήκη των φαινολικών ενώσεων.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

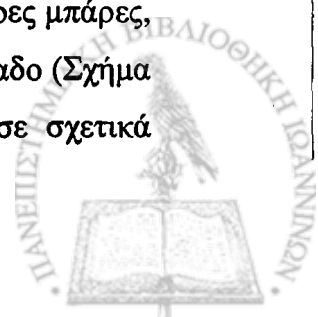
ΕΝΟΤΗΤΑ Α

3.1 Εξέταση ενώσεων από το ελαιόλαδο με την τεχνική comet assay.

3.1.1 Εξέταση εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς, καρπούς ελιάς, ελαιόλαδο και τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου

Σε μια πρώτη προσέγγιση, εξετάστηκε η ικανότητα εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα φύλλα ελιάς, καρπούς ελιάς, το ελαιόλαδο καθώς και τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του να προστατεύσουν το πυρηνικό DNA από τις βλάβες που προκαλούνται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες υπο την μορφή του H_2O_2 . Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν κύτταρα Jurkat (μια T-λεμφοκυτταρική σειρά) τα οποία προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τα παραπάνω εκχυλίσματα πριν εκτεθούν σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 μέσω της δράσης του ενζύμου 'οξειδάση της γλυκόζης'. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 600 ng/ml ικανή να παράγει 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της επί τοις εκατό μείωσης της βλάβης, που προκλήθηκε μετά από προεπάωση 15 λεπτών με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις από το κάθε εκχύλισμα. Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη, που προκαλείται στο DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά απουσία εκχυλίσματος σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα μάρτυρες είχαν σχάσεις στο DNA, πριν ακόμη εκτεθούν σε εξωγενές H_2O_2 (102 ± 4 αυθαίρετες μονάδες). Οι σχάσεις στο DNA αυξήθηκαν μετά από σύντομη έκθεση σε H_2O_2 , φτάνοντας πάνω από τις 300 αυθαίρετες μονάδες, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης.

Προεπάωση των κυττάρων όμως για 15 λεπτά πριν την προσθήκη του H_2O_2 , με εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς (Σχήμα 12A) και καρπό ελιάς (Σχήμα 12B), μείωσε την ικανότητα του H_2O_2 να προκαλεί βλάβη στο DNA των κυττάρων. Τα ίδια εκχυλίσματα όμως προκαλούν σχάσεις στις μόνες αλυσίδες του DNA απουσία του H_2O_2 (άσπρες μπάρες, σχήματα 12 A,B) ($p < 0.001$). Επάωση των κυττάρων με εκχυλίσματα από ελαιόλαδο (Σχήμα 12Γ) ανέστειλε σημαντικά τη δράση του H_2O_2 σε ποσοστό περίπου 60% σε σχετικά

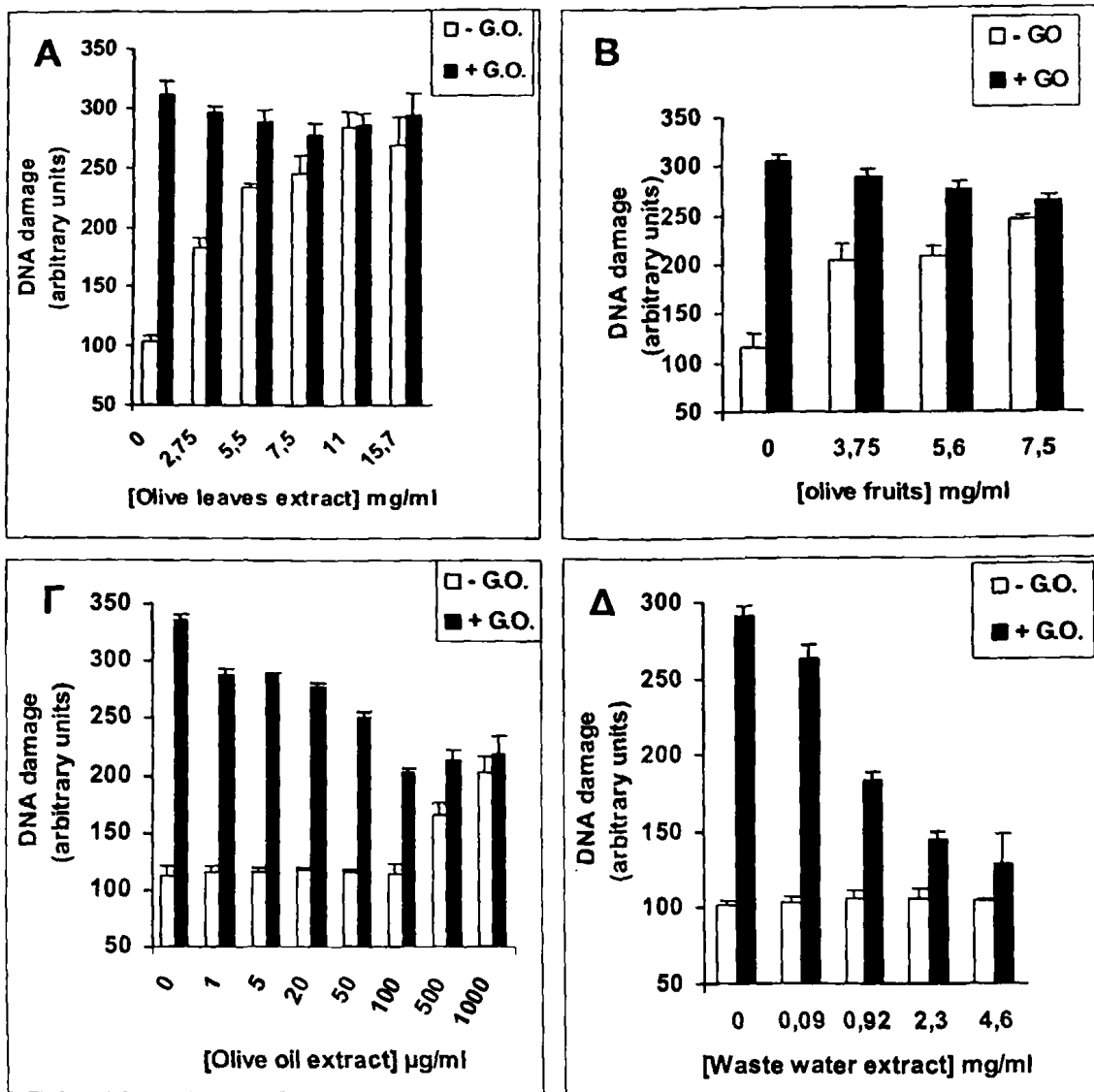


χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 75 $\mu\text{g/ml}$) ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (100 $\mu\text{g/ml}$ και άνω) τα εκχυλίσματα παρουσίαζαν τοξικό χαρακτήρα από μόνα τους. Τα εκχυλίσματα που προερχόταν από τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου (Σχήμα 12Δ) παρείχαν μια σημαντική προστασία της τάξεως των 58 και 84% σε συγκεντρώσεις 0.92 και 4.6 mg/ml αντίστοιχα ενώ οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν δεν ήταν τοξικές από μόνες τους. Είναι φανερό ότι τα εκχυλίσματα από τα φύλλα ελιάς, καρπό ελιάς και ελαιόλαδου περιέχουν προστατευτικές αλλά και τοξικές ενώσεις ενώ το εκχύλισμα που προέρχεται από τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής περιείχε προστατευτικές ενώσεις ενώ φαίνεται να μην έχει τοξικό χαρακτήρα στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι ενώσεις που εμπεριέχονται σε διάφορα εκχυλίσματα που προέρχονται από φυσικές πηγές, έχουν προστατευτική αλλά και κυτταροτοξική δράση (Ames B.N., 1983).

3.1.2 Εξέταση ελαιόλαδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος

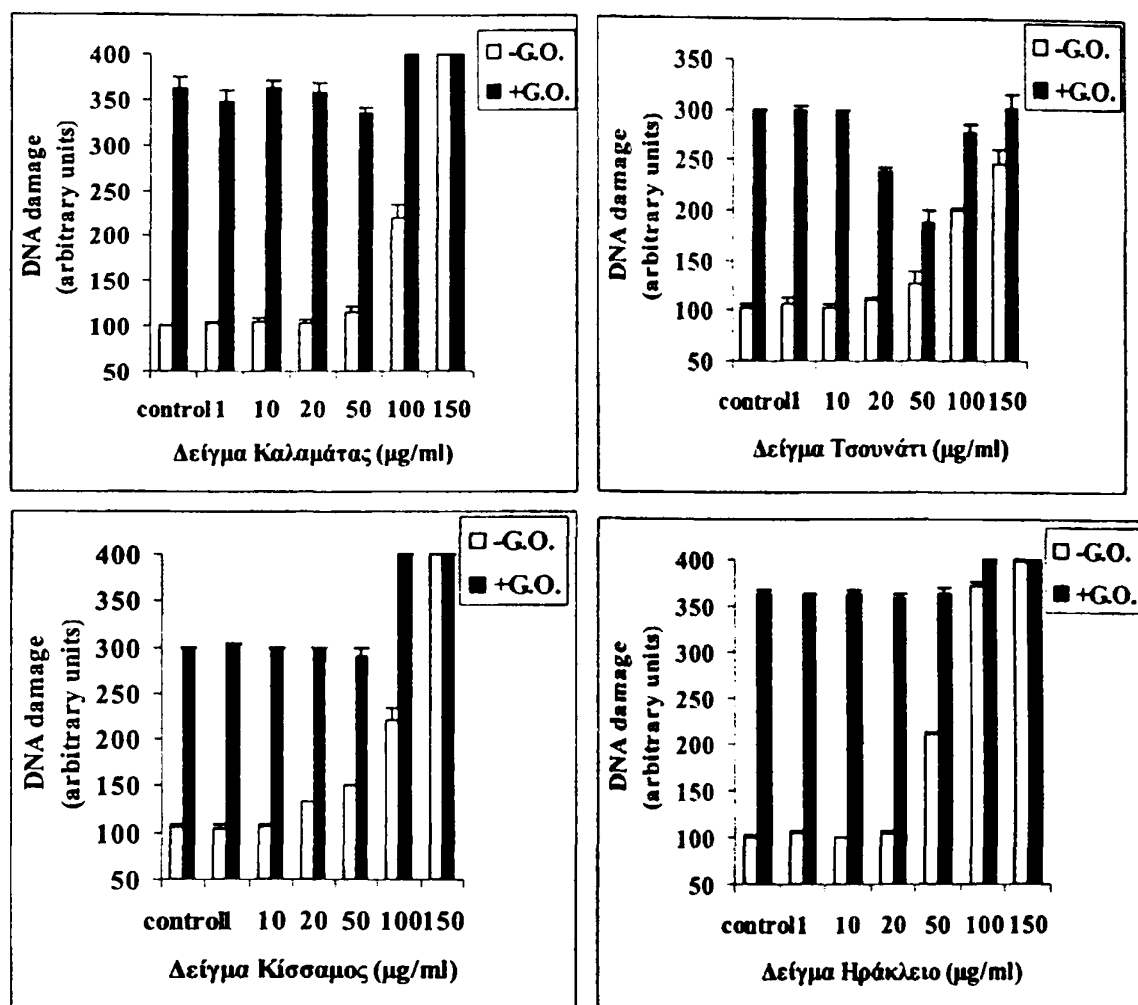
Έχει αναφερθεί ότι εκχυλίσματα που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές περιέχουν διαφορετικά συστατικά στη σύσταση του ελαιόλαδου. Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκαν εκχυλίσματα ελαιόλαδου που προέρχονται από 4 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα απομονώθηκαν με τον ίδιο τρόπο και αναλύθηκαν ως προς τα συστατικά τους με υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) στο εργαστήριο της κ. Μάργαρη-Τασιούλα στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 . Τα δείγματα που εκχυλίστηκαν από ελαιόλαδο των περιοχών Κισσάμου και Ηρακλείου (Σχήματα 13 Γ και Δ) δεν παρείχαν κάποια προστασία στα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 ενώ παράλληλα σε συγκεντρώσεις άνω των 50 $\mu\text{g/ml}$ παρουσίαζαν τοξικό χαρακτήρα από μόνα τους. Τα εκχυλίσματα από τις περιοχές της Καλαμάτας και του Τσουνάτη φαίνεται να προστατεύουν το DNA των κυττάρων από τη δράση του H_2O_2 ενώ ταυτόχρονα αρχίζει να γίνεται τοξικά από μόνα τους (Σχήματα 13 Α και Β). Σε ανάλυση των συστατικών των τεσσάρων ελαιολάδων με HPLC, βρέθηκε ότι το δείγμα που προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 εμπεριείχε σε αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση την ένωση υδροξυτυροσόλη (Πίνακας 2), κάτι που εξετάστηκε αναλυτικά στα επόμενα πειράματα της παρούσης εργασίας.





Σχήμα 12: Προστατευτικές αλλά και τοξικές επιπτώσεις από εκχυλίσματα παραγώγων της ελιάς. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (A), καρπού ελιάς (B), ελαιόλαδου (Γ) και αποβλήτων της διαδικασίας παραγωγής ελαιόλαδου (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες που είχαν προκληθεί στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.





Σχήμα 13: Δράση των εκχυλισμάτων ελαιόλαδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα (1.5×10^6 ανά ml) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος από ελαιόλαδο Καλαμάτας (Α), Τσουνάτιου (Β), Κισσάμου (Γ) και Ηρακλείου (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Δείγμα $\mu\text{g/ml}$	ΚΙΣΣΑΜΟΣ	ΤΣΟΥΝΑΘΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ	1,90	76	-	-
ΤΥΡΟΣΟΛΗ	9,61	46,91	4,08	8,24
ΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	0,34	-	-	0,21
p-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	0,43	0,12	0,08	0,25
ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ	0,10	-	-	0,24
DA-ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗ	170,67	50,49	0,31	-
ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ	158,32	31,88	13,88	95,19
ΠΙΝΟΡΕΣΙΝΟΛΗ	-	8,44	-	5,56
1- ΑΚΕΤΟΞΥΠΙΝΟΡΕΣΙΝ ΟΛΗ	30,20	25,23	5,84	28,5
ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ	-	1,90	-	1,06
A-ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗ	51,32	42,76	1,11	-
ΑΠΗΓΕΝΙΝΗ	4,63	4,92	11,99	4,18
ΚΑΦΕΙΚΟ ΟΞΥ	117,41	52,57	20,26	74,1

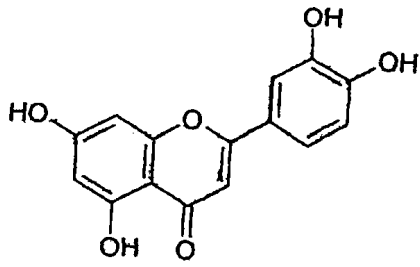
Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις ($\mu\text{g/ml}$) πολυφαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στα ελαιόλαδα από τις διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος



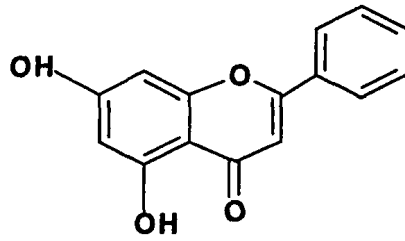
3.1.3 Δράση των απομονωμένων συστατικών του ελαιόλαδου στην προστασία του πυρηνικού DNA

Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψαν δύο ερωτήματα. Το πρώτο αφορά την παρουσία των δραστικών συστατικών που περιέχονται στο ελαιόλαδο και ευθύνονται για την προστατευτική του δράση και το δεύτερο ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός της προσφερόμενης προστασίας. Για το σκοπό αυτό, από τα εκχυλίσματα μελιού που έδειξαν προστασία απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή και ταυτοποιήθηκαν διάφορα συστατικά του στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι δομές των ενώσεων που απομονώθηκαν φαίνονται στο σχήμα 14. Έτσι τα απομονωμένα συστατικά ελέγχθηκαν για την προστατευτική τους δράση απέναντι στις βλάβες που προκαλεί στα κύτταρα το H_2O_2 . Όπως φαίνεται στο σχήμα 15 η λουτεολίνη, μια πολυφαινολική ένωση που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, φαίνεται να προστατεύει το κυτταρικό DNA. Εντύπωση προκαλεί ότι η προστασία αυτή παρέχεται στα κύτταρα σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις του συστατικού αυτού. Παρά τη μεγάλη ομοιότητα που διαθέτει η δομή της λουτεολίνης με τις δομές των άλλων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο, κανένα από τα φλαβονοειδή αυτά δεν προσέφερε προστασία στις υπό μελέτη συγκεντρώσεις. Αντίθετα μάλιστα η χρυσίνη μπορούσε να προκαλέσει βλάβη στο κυτταρικό DNA απουσία της έκθεσης σε H_2O_2 . Οι ενώσεις αυτές έχουν όμοια δομή με αυτή της λουτεολίνης, έχοντας όμως γλυκοσυλιωμένες τις θέσεις των υδροξυλίων τους, διαφορετικού σε κάθε ένωση, αφαιρώντας έτσι από την λουτεολίνη την ικανότητα να προστατεύει τα κύτταρα ενώ παράλληλα η ένωση 3'-μέθυλο-7-γλυκοσυλιωμένη λουτεολίνη έχει και ένα υδροξύλιο μεθυλιωμένο από τα δύο που βρίσκονται μεταξύ τους σε όρθο-θέση. Ένα πρώτο στοιχείο για την προστασία που παρέχουν οι ενώσεις του ελαιόλαδου φαίνεται να είναι οι θέσεις των υδροξυλίων στο φαινολικό δακτύλιο του φλαβονοειδούς καθώς η ικανότητά του να προστατεύει φαίνεται να χάνεται όταν τα υδροξύλια αντικατασταθούν με γλυκοζίτες ή μεθύλια. Σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων φαίνεται να παίζει η ικανότητα του φλαβονοειδούς να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Είναι πιθανό η παρουσία της γλυκόζης στο μόριο του φλαβονοειδούς να αφαιρεί την ικανότητά του να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 .

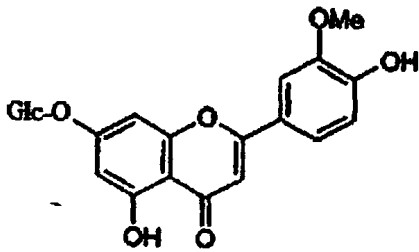


ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

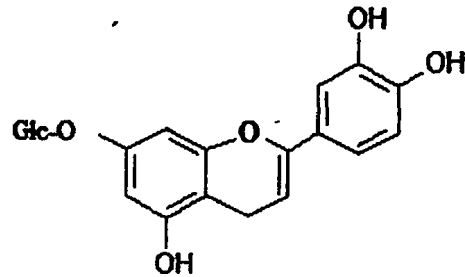
Λουτεολίνη



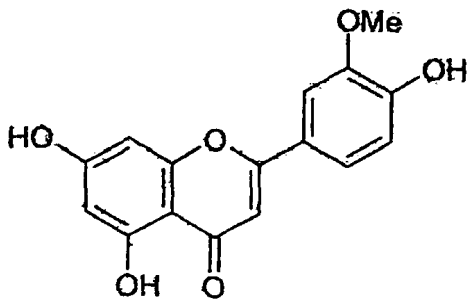
Χρυσίνη



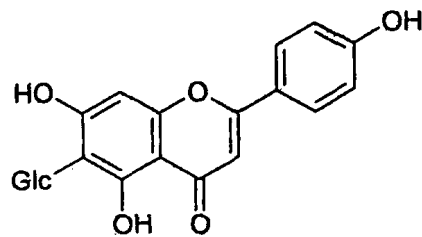
3'-Μέθυλο-7-γλυκοσυλιωμένη λουτεολίνη



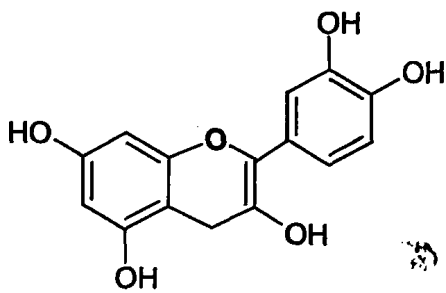
7- γλυκοσυλιωμένη λουτεολίνη



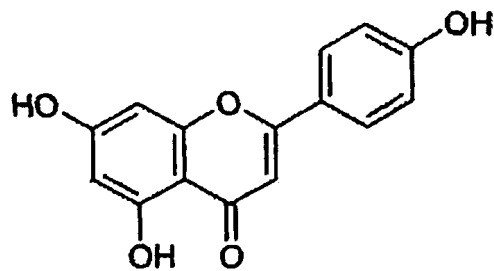
3-Μέθυλο-λουτεολίνη



6-O-γλυκοσίδιο απιγενίνης

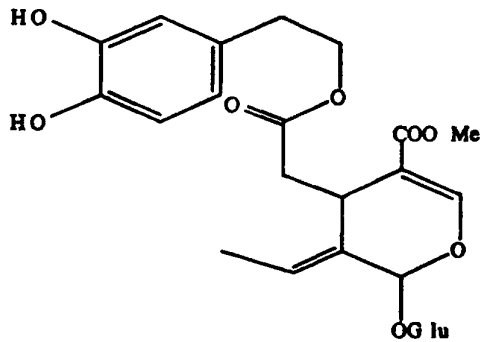
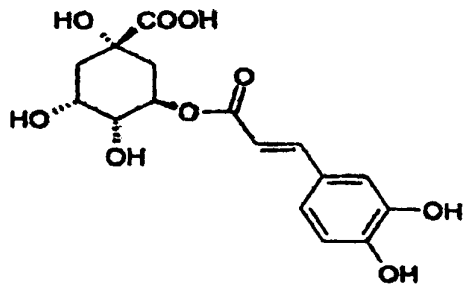
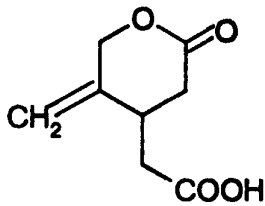
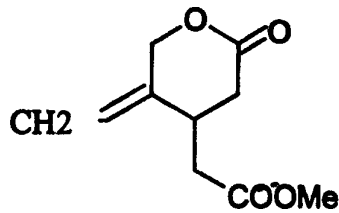
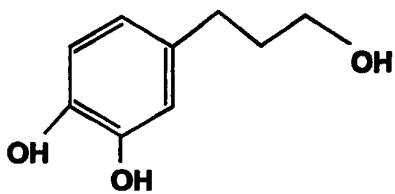
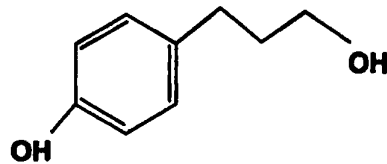
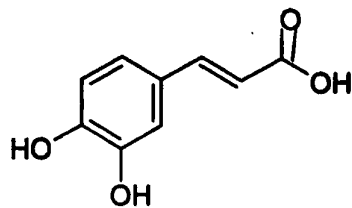


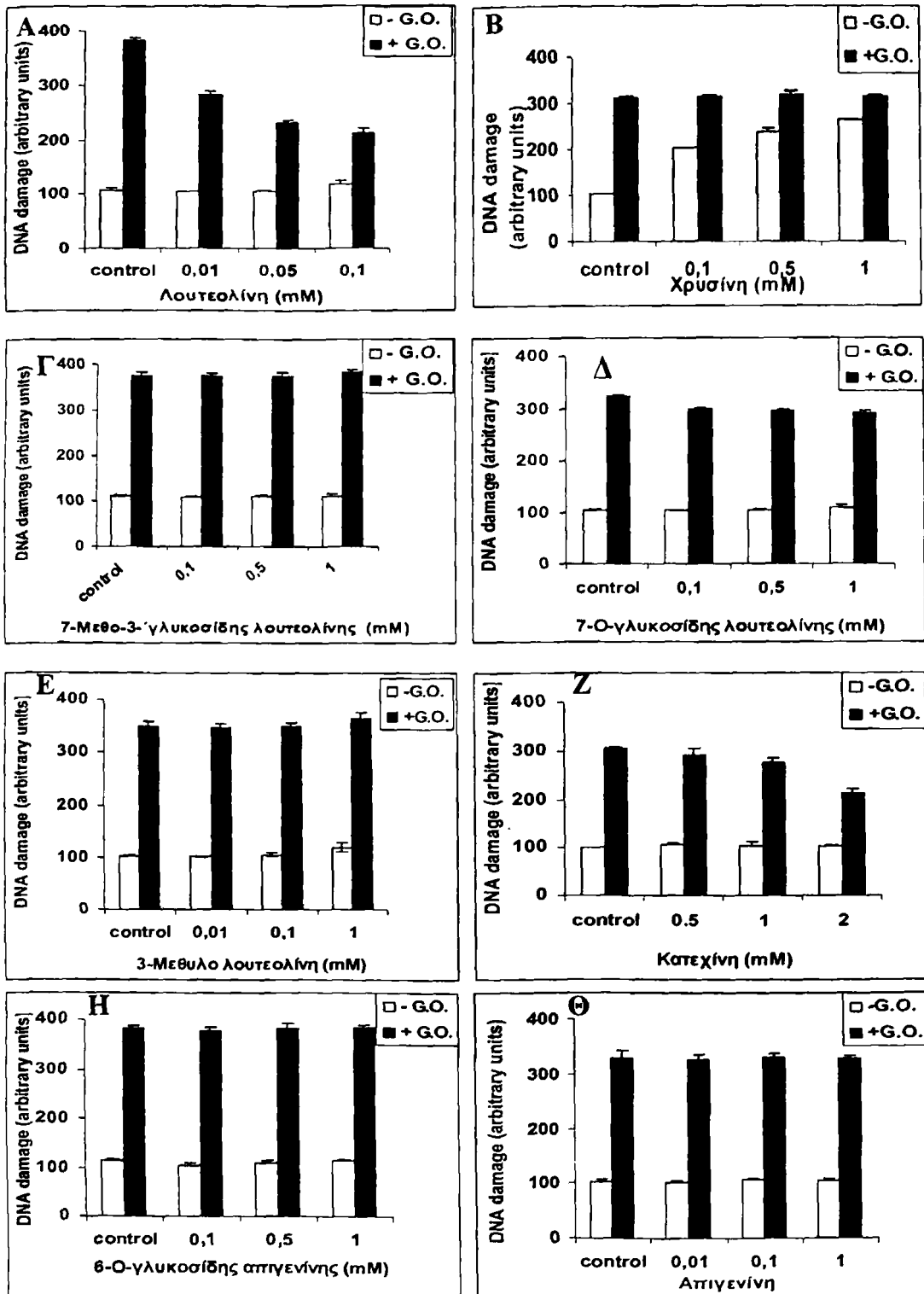
Κατεχίνη



Απιγενίνη



ΣΕΚΟΙΡΟΕΙΔΗ**Ελευρωπαίνη****Ελενολικό οξύ****Λακτόνη****Μεθυλιωμένη Λακτόνη****ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ****Υδροξυτυροσόλη****Τυροσόλη****Καφεικό οξύ****Σχήμα 14: Χημικές δομές απομονωμένων συστατικών από εκχυλίσματα ελαιόλαδου**



Σχήμα 15: Δράση των απομονωμένων φλαβονοειδών από το ελαιόλαδο κατά της βλάβης που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπεώσθησαν για 15 λεπτά με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων ενώσεων και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

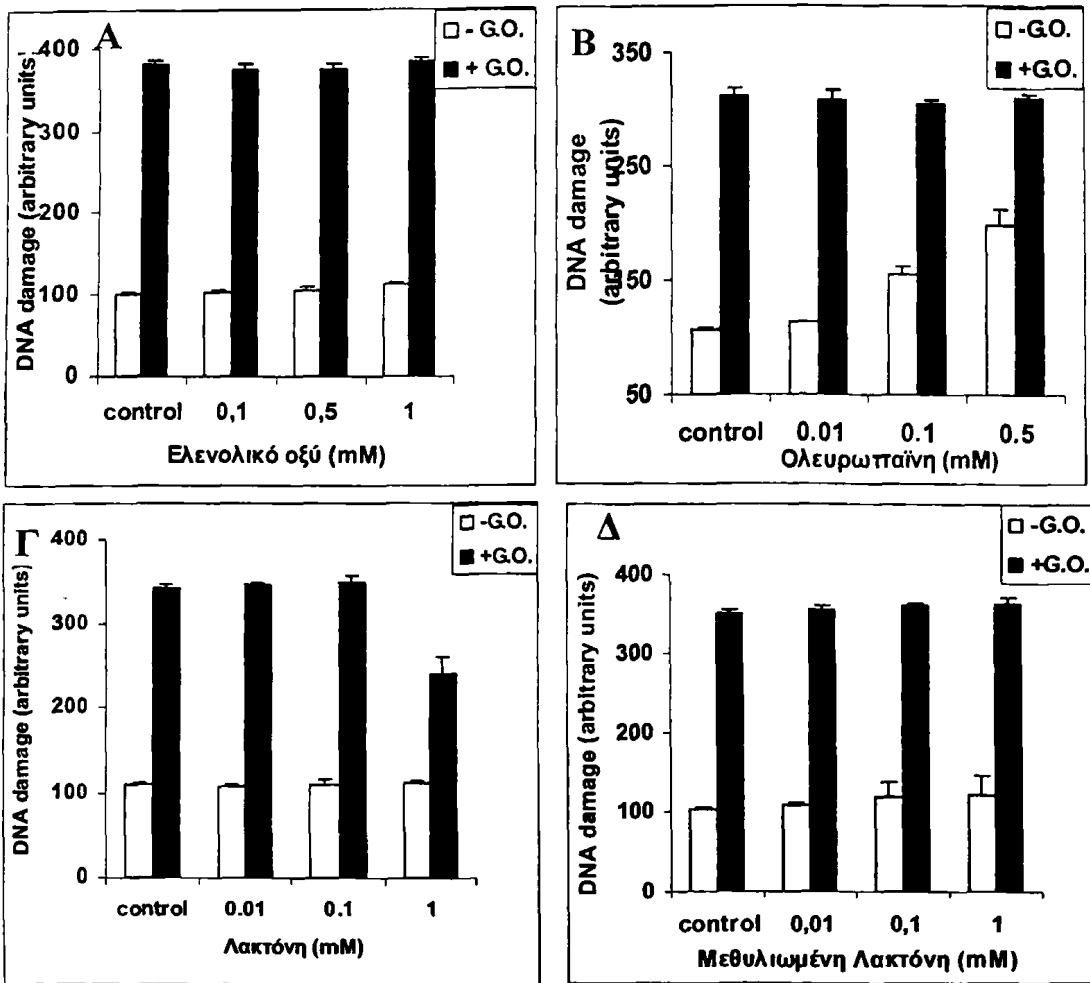


Τα δύο επόμενα φλαβονοειδή που απομονώθηκαν ήταν η κατεχίνη (Z), η οποία φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερη όμως συγκέντρωση σε σχέση με αυτή της λουτεολίνης (1mM έναντι 20 μM) ενώ ο γλυκοζίτης της απιγενίνης (H) όπως και η απιγενίνη (Θ) δεν προσέφεραν προστασία στο κυτταρικό DNA από τη δράση του H₂O₂.

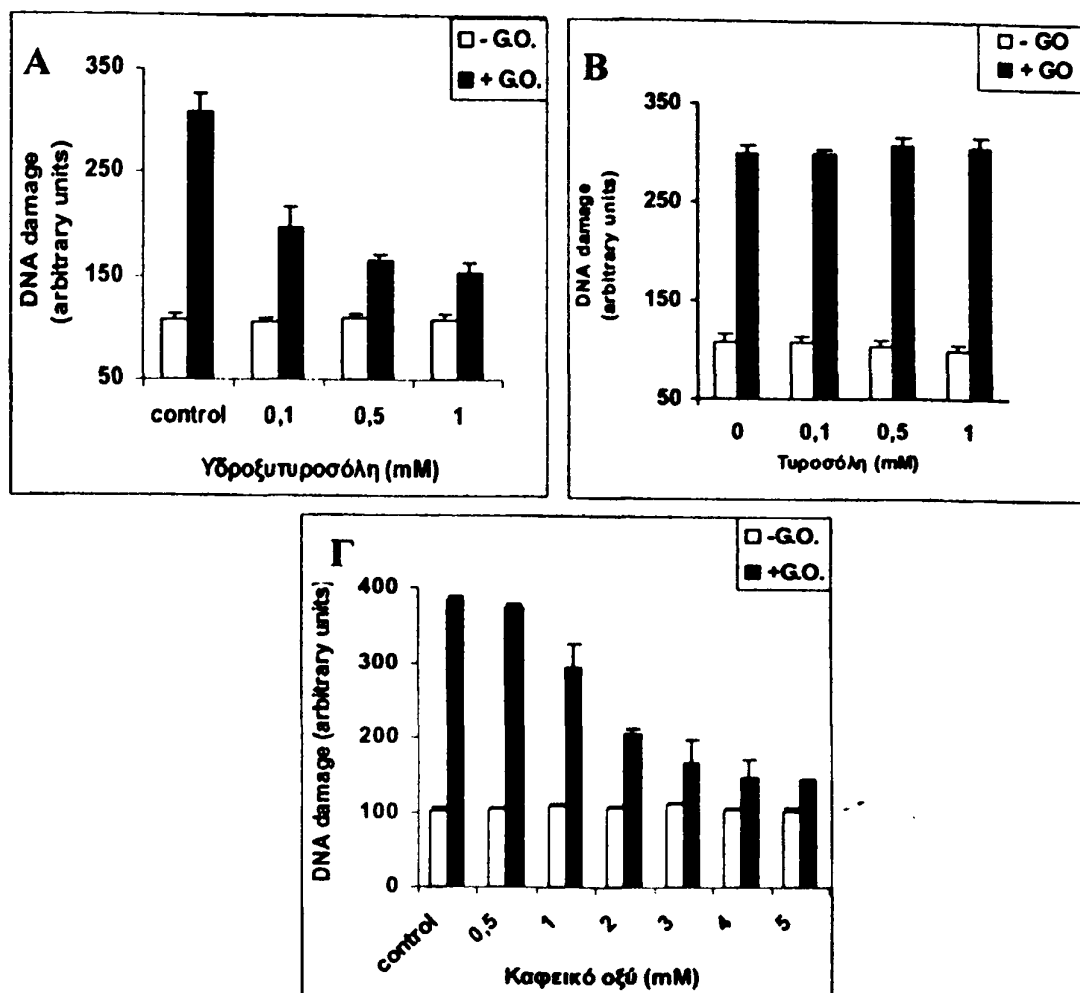
Οι ενώσεις του σχήματος 16 δεν μπόρεσαν να παρέχουν προστασία στα κύτταρα εκτός από τη λακτόνη (Σχήμα 16Γ) η οποία παρέχει μια προστασία περίπου 50% σε συγκέντρωση 1mM. Όταν όμως μεθυλιωθεί το υδροξύλιο το οποίο εμπεριέχεται στη δομή της ενώσεως αυτής, εντύπωση προκαλεί και πάλι η απώλεια της ικανότητας της ένωσης να προστατεύσει το κυτταρικό DNA (Σχήμα 16Δ). Η ελευρωπαϊνή από την άλλη πλευρά, δεν προστατεύει τα κύτταρα από το H₂O₂ ενώ παράλληλα είναι τοξική από μόνη της, στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκε (Σχήμα 16B), κάτι το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι η ελευρωπαϊνή παρόλη τη γνωστή αντιοξειδωτική της ικανότητα έχει και τοξικές ιδιότητες σε κύτταρα σε καλλιέργεια. Θα πρέπει να αναφερθεί πως η ελευρωπαϊνή σε *in vivo* καταστάσεις υδρολύεται όταν βρίσκεται σε όξινο περιβάλλον και δίνει 2 παράγωγες ενώσεις, την υδροξυτυροσόλη και το ελενολικό οξύ.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν ενώσεις οι οποίες ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο. Αυτές είναι η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και το καφεϊκό οξύ οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο οι δύο πρώτες και στα φύλλα και στον καρπό της ελιάς η τελευταία, και θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά και εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (Visioli et al, 1998, Owen et al, 2000, De la Puerta et al, 2001). Η υδροξυτυροσόλη, η οποία έχει ένα φαινολικό δακτύλιο με δύο υδροξύλια σε ορθο-θέση μεταξύ τους, προστατεύει το DNA των κυττάρων από το H₂O₂ (Σχήμα 17A) ενώ η τυροσόλη η οποία έχει ένα υδροξύλιο λιγότερο στη θέση 3 στη δομή της, δεν παρέχει καμία προστασία (Σχήμα 17B), επιβεβαιώνοντας έτσι τα προηγούμενα αποτελέσματα καθιστώντας παράλληλα αναγκαία την παρουσία της ορθο-διυδροξυ δομής για την προστασία των κυττάρων. Το καφεϊκό οξύ έχει παρόμοια δομή με αυτή της υδροξυτυροσόλης έχοντας ένα φαινολικό δακτύλιο με τα υδροξύλια να βρίσκονται σε ορθο-θέση μεταξύ τους, αλλά στην επιμηκυσμένη αλυσίδα έχει επιπλέον έναν διπλό δεσμό και το υδροξύλιο της αλυσίδας αντικαθίσταται από ένα καρβοξύλιο. Έτσι η ένωση αυτή όπως φαίνεται και στο σχήμα 17Γ προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση του H₂O₂ σε πολύ μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις (άνω του 1 mM) σε σχέση με τα 100μM της υδροξυτυροσόλης.





Σχήμα 16: Προστασία του κυτταρικού DNA από τη δράση των απομονωμένων σεκοϊροειδών ενώσεων του ελαιόλαδου. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων ενώσεων και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 17: Δράση των απομονωμένων φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπώσθησαν για 15 λεπτά με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων ενώσεων (ανοιχτόχρωμες μπάρες) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (σκουρόχρωμες μπάρες). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Φαίνεται πως τα χαρακτηριστικά αυτά ελαττώνουν την ικανότητα της ένωσης να δράσει με προστατευτικό τρόπο.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, τα χαρακτηριστικά των παραγώγων της ελιάς αλλά και των ελαιόλαδων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος φαίνεται να επηρεάζονται από τη δράση των επιμέρους συστατικών που εμπεριέχονται σε αυτά. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των επιμέρους ενώσεων φαίνεται να προσδίδουν άλλοτε προστατευτικό και άλλοτε τοξικό χαρακτήρα στα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Σημαντική φαίνεται να είναι η δομή των ενώσεων και κυρίως η ύπαρξη υδροξυλίων σε όρθο- θέση μεταξύ τους, καθώς μικρές αλλαγές σε αυτή οδηγεί στην αλλαγή της δράσης των ενώσεων.

3.2 Προστατευτική ικανότητα των ενώσεων που προέρχονται από το φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου

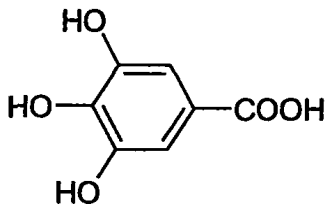
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στο φαινολικό κλάσμα εμπεριέχονται σύμφωνα με μελέτες, ενώσεις που παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Ανάμεσα στις φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο, επιλέχθηκαν ορισμένες με ελάχιστες χαρακτηριστικές δομικές διαφορές δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να συσχετιστούν οι μικρές αυτές διαφορές με τις ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων που παρέχουν προστασία στα κύτταρα. Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκαν ενώσεις που εμπεριέχονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου, απέναντι στη δράση του H_2O_2 . Οι ενώσεις αγοράστηκαν από το εμπόριο έτσι ώστε να μην υπάρχουν προσμίξεις με άλλες ενώσεις αγνώστου ταυτότητας. Στο σχήμα 18 αναπαρίστανται οι δομές των ενώσεων που εξετάστηκαν ενώ κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τη δομή τους σε μια προσπάθεια δημιουργίας μιας συσχέτισης της δομής με τη λειτουργία τους.



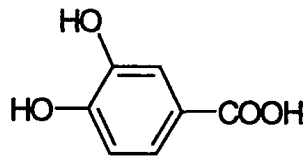
Ομάδα 1

Η εξέταση των ενώσεων έγινε όπως και στις προηγούμενες, με την ίδια μέθοδο, την comet assay. Όπως φαίνεται στο σχήμα 19 αρχικά εξετάστηκαν ενώσεις οι οποίες έχουν ένα φαινολικό δακτύλιο, μια καρβοξυλομάδα και διαφορετικό αριθμό υδροξυλίων στις θέσεις του δακτυλίου. Τα κύτταρα προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ενώσεων μόνες τους (λευκές μπάρες) και στη συνέχεια για 10 λεπτά με συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (μαύρες μπάρες). Όπως φαίνεται στα γραφήματα του σχήματος 19 το γαλλικό οξύ (Σχήμα 19A) προσφέρει προστασία στο DNA των κυττάρων από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 (περίπου 75%, $IC_{50}=1,5$ mM) ενώ στη συγκέντρωση 1 mM έχει και τοξικές επιδράσεις από μόνο του. Το πρωτοκατεχουϊκό οξύ (Σχήμα 19B) προστατεύει τα κύτταρα (42% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες και $IC_{50}=2$ mM) χωρίς όμως να γίνεται τοξικό από μόνο του. Η διαφορά των 2 αυτών ενώσεων οφείλεται στην ύπαρξη ενός παραπάνω υδροξυλίου στη δομή του γαλλικού οξέος.

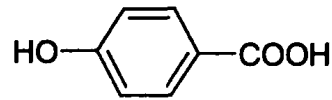


Ομάδα 1

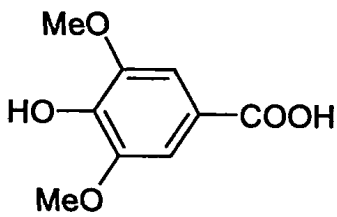
Γαλλικό οξύ



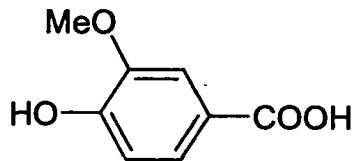
Πρωτοκατεχουικό οξύ



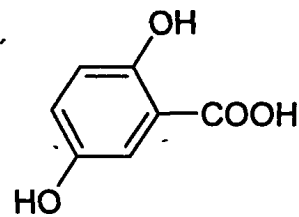
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ



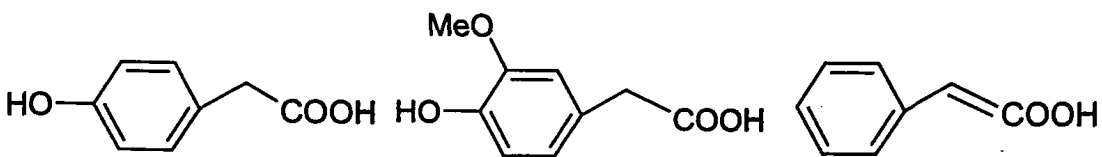
Συγγγικό οξύ



Βανιλλικό οξύ



Γεντισικό οξύ

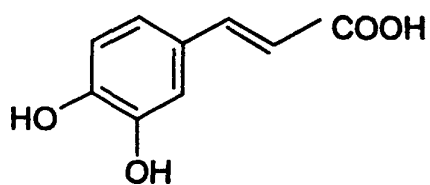
Ομάδα 2

p-υδροξυφαινυλοακετοξικό οξύ

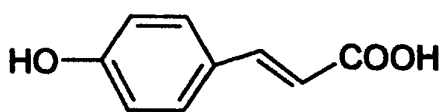
Ομοβανιλλικό οξύ

Κινναμικό οξύ

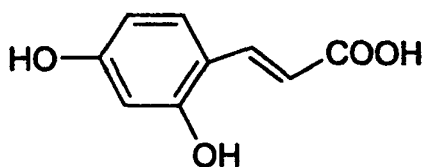


Ομάδα 3

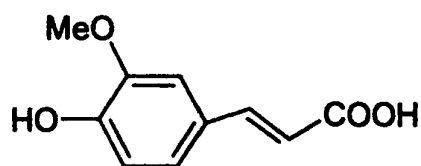
Καφεϊκό οξύ



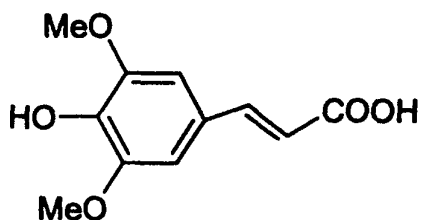
p-κουμαρικό οξύ



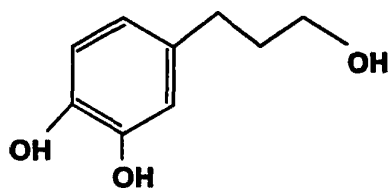
o-κουμαρικό οξύ



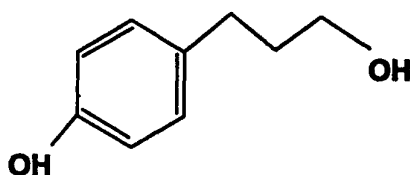
Φερουλικό οξύ



Σιναπικό οξύ

Ομάδα 4

Υδροξυτυροσόλη



Τυροσόλη

Σχήμα 18: Χημικές δομές των φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν



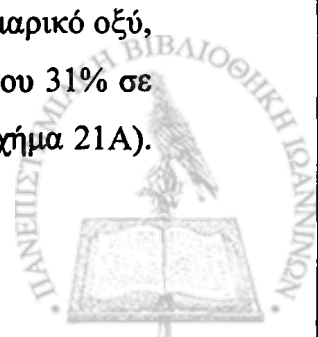
Πρέπει να επισημανθεί εδώ ότι η όρθο- θέση των υδροξυλίων του πρωτοκατεχουϊκού οξέος φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 . Εξετάζοντας λοιπόν τις επόμενες 4 ενώσεις της ίδιας ομάδας (Σχήμα 19) παρατηρείται ότι δεν παρέχουν κάποια προστασία στα κύτταρα. Παρατηρώντας προσεχτικά τη δομή τους διαπιστώνεται ότι οι ενώσεις συριγγικό οξύ (Σχήμα 19Γ) και βανιλικό οξύ (Σχήμα 19Ε) έχουν μεθυλιωμένα ένα ή και τα δύο υδροξύλια της όρθο- θέσης τους. Στην περίπτωση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, η ένωση υπολείπεται ένα υδροξύλιο (Σχήμα 18) σε σχέση με το γαλλικό οξύ και δεν προστατεύει τα κύτταρα (Σχήμα 19Δ) ενώ το γεντισικό οξύ, παρότι έχει 2 υδροξύλια αυτά δεν βρίσκονται σε όρθο- θέση μεταξύ τους (Σχήμα 18) και δεν προστατεύει τα κύτταρα (Σχήμα 19Ζ).

Ομάδα 2

Οι επόμενες τρεις ενώσεις διαφέρουν από τις προηγούμενες ως προς την ύπαρξη ενός επιπλέον ατόμου άνθρακα στη δομή τους πριν από την καρβοξυλική ομάδα (Σχήμα 18). Όπως φαίνεται στα γραφήματα του σχήματος 20 καμία από τις ενώσεις αυτές δεν μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 . Παρατηρώντας τις δομές των ενώσεων αυτών φαίνεται ότι το p-υδροξυφαινοξικό οξύ έχει ένα υδροξύλιο στο φαινολικό δακτύλιο και δεν προστατεύει τα κύτταρα (Σχήμα 20Α), το ομοβανιλικό οξύ έχει 2 υδροξύλια σε όρθο- θέση το ένα εκ των οποίων είναι μεθυλιωμένο και επίσης δεν προστατεύει τα κύτταρα (Σχήμα 20Β). Το κιναμικό οξύ δεν έχει κανένα υδροξύλιο στο φαινολικό δακτύλιο και όπως φαίνεται στο γράφημα δεν μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 (Σχήμα 20Γ).

Ομάδα 3

Στις επόμενες ενώσεις που εξετάστηκαν, εμπεριέχεται ένα ακόμη άτομο άνθρακα πριν από την καρβοξυλική ομάδα καθώς και ένας διπλός δεσμός σε σχέση με την πρώτη ομάδα (Σχήμα 18). Οι επιμέρους διαφορές τους έγκειται στη θέση και στον αριθμό των υδροξυλίων που περιβάλλουν το φαινολικό δακτύλιο. Η πρώτη ένωση, το p-κουμαρικό οξύ, με ένα υδροξύλιο στο φαινολικό δακτύλιο παρέχει μια προστασία της τάξεως του 31% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες ($IC_{50} > 2 \text{ mM}$), απέναντι στη δράση του H_2O_2 (Σχήμα 21Α).

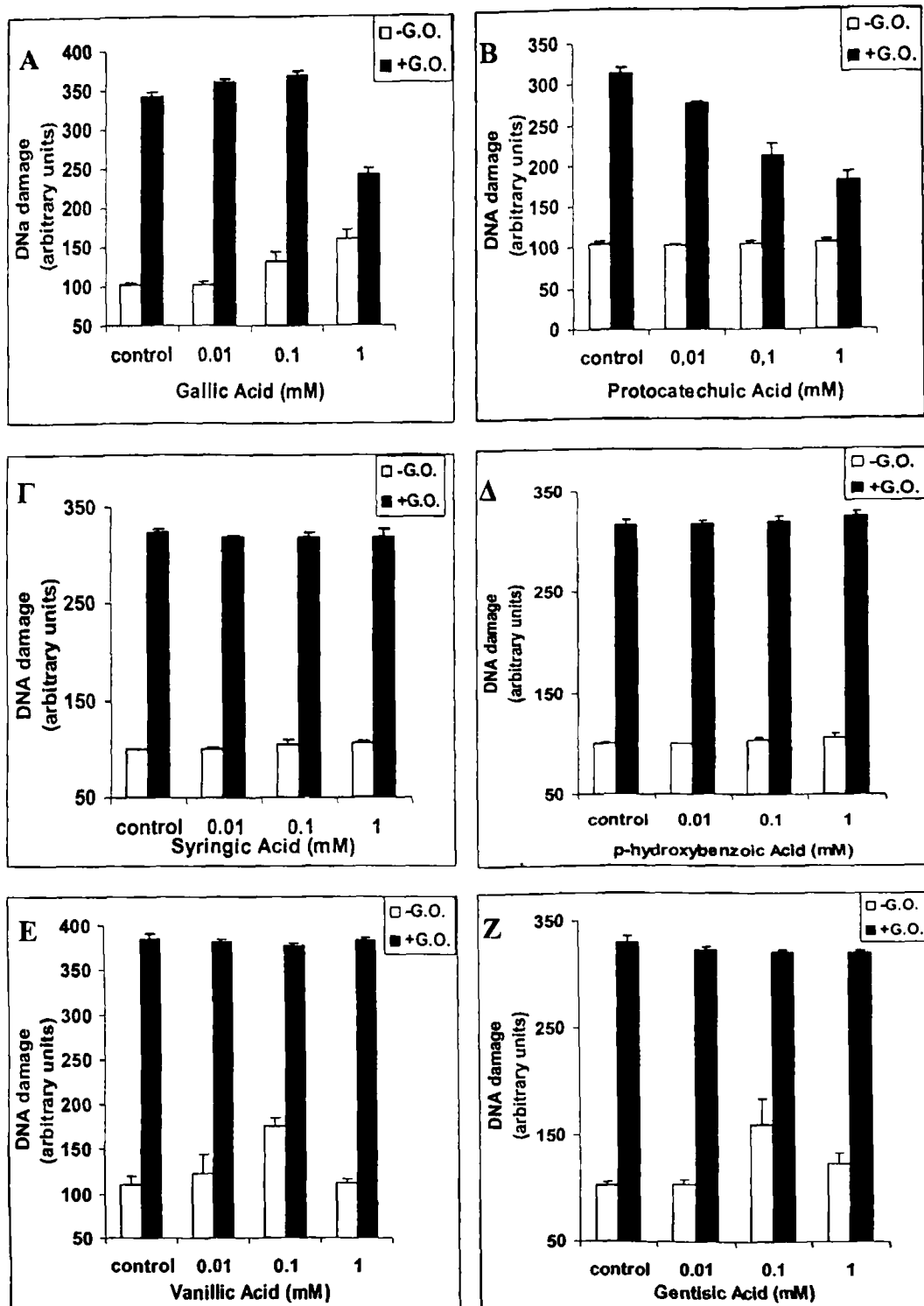


Η δεύτερη ένωση, το καφεϊκό οξύ, με 2 υδροξύλια σε ορθο θέση μεταξύ τους στο φαινολικό δακτύλιο φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα (76% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες) (Σχήμα 21B). Αντίθετα το φερουλικό οξύ, με όμοια δομή με αυτή του καφεϊκού οξέος με μόνη διαφορά τη μεθυλίωση του ενός εκ των υδροξυλίων αδυνατεί να προστατεύσει τα κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 (Σχήμα 21Γ). Η ένωση οκουμαρικό οξύ, η οποία επίσης έχει 2 υδροξύλια στο δακτύλιο της σε πάρα- θέση όμως, παρέχει κάποια προστασία στο DNA των κυττάρων σε μικρότερο ποσοστό όμως σε σχέση με τις προηγούμενες 2 ενώσεις (18% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες και $IC_{50}=2 \text{ mM}$) (Σχήμα 21Δ). Η ένωση σιναπικό οξύ παρότι έχει μεθυλιωμένα τα δύο εκ των τριών υδροξυλίων του φαινολικού δακτυλίου, παρείχε στο κυτταρικό DNA προστασία από τη δράση του H_2O_2 κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη για να εξηγηθεί η προστατευτική δράση της συγκεκριμένης ένωσης.

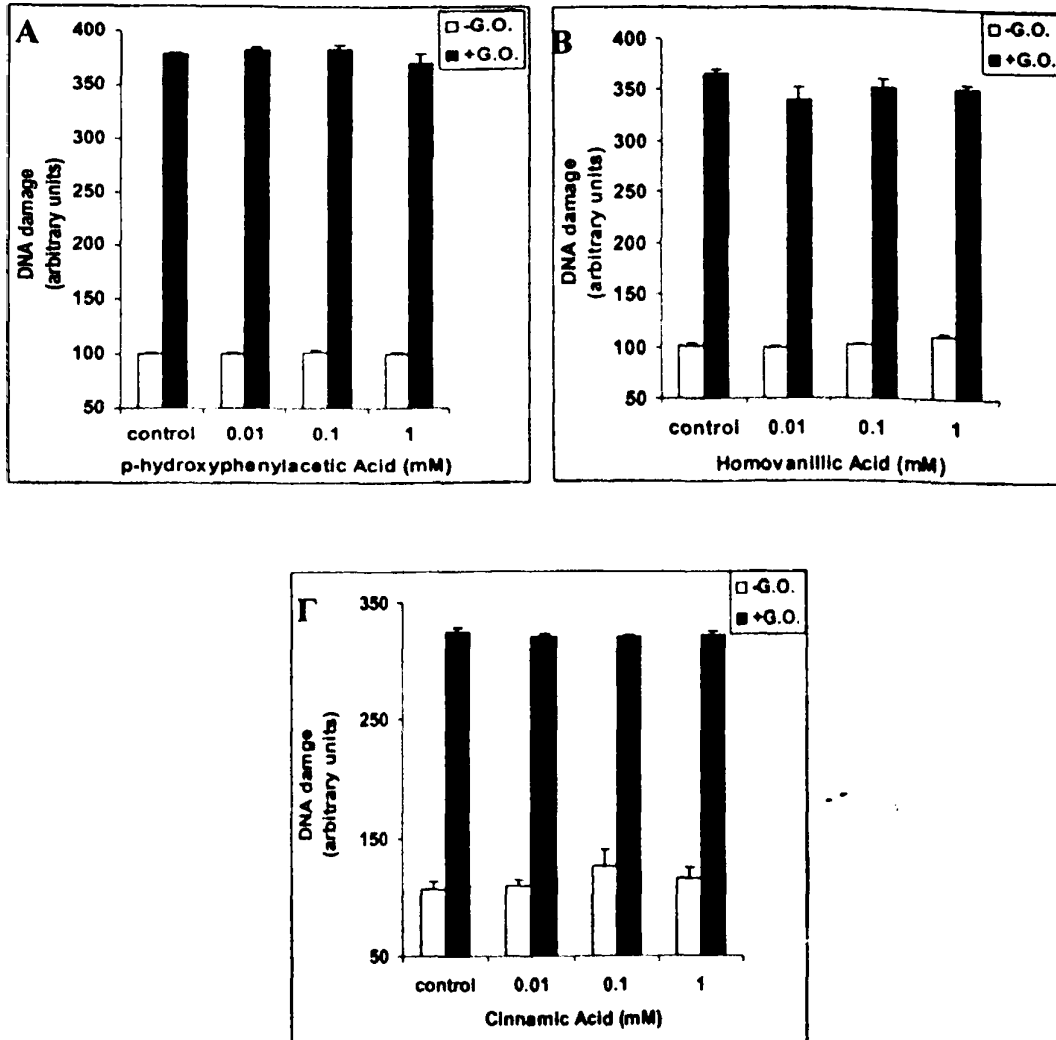
Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι οι ενώσεις υδρόξυτυροσόλη και τυροσόλη οι οποίες είχαν απομονωθεί από τα εκχυλίσματα του ελαιόλαδου, αγοράστηκαν και εξετάστηκαν, έτσι ώστε να μην υπάρχουν πιθανές προσμίξεις, με σχεδόν ίδια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν με τις ενώσεις που απομονώσαμε από το ελαιόλαδο (Σχήμα 17A και B).

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως η ύπαρξη των υδροξυλίων σε όρθο- θέση στο φαινολικό δακτύλιο των ενώσεων, να παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητά τους να προστατεύουν τα κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA τους. Έτσι ενισχύεται η υπάρχουσα άποψη που αναφέρει ότι ενώσεις που περιέχουν κατεχολικούς δακτυλίους και ιδιαίτερα την 3,4 όρθο- θέση υδροξυλίων, έχουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων που σχετίζεται με την ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά ή και να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου (Sestili et al, 2002). Ο σίδηρος είναι απαραίτητο στοιχείο για όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς, Κι ενώ σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις θεωρείται απαραίτητο για τη ζωή, σε περίσσεια την απειλεί (Tam et al., 2003).

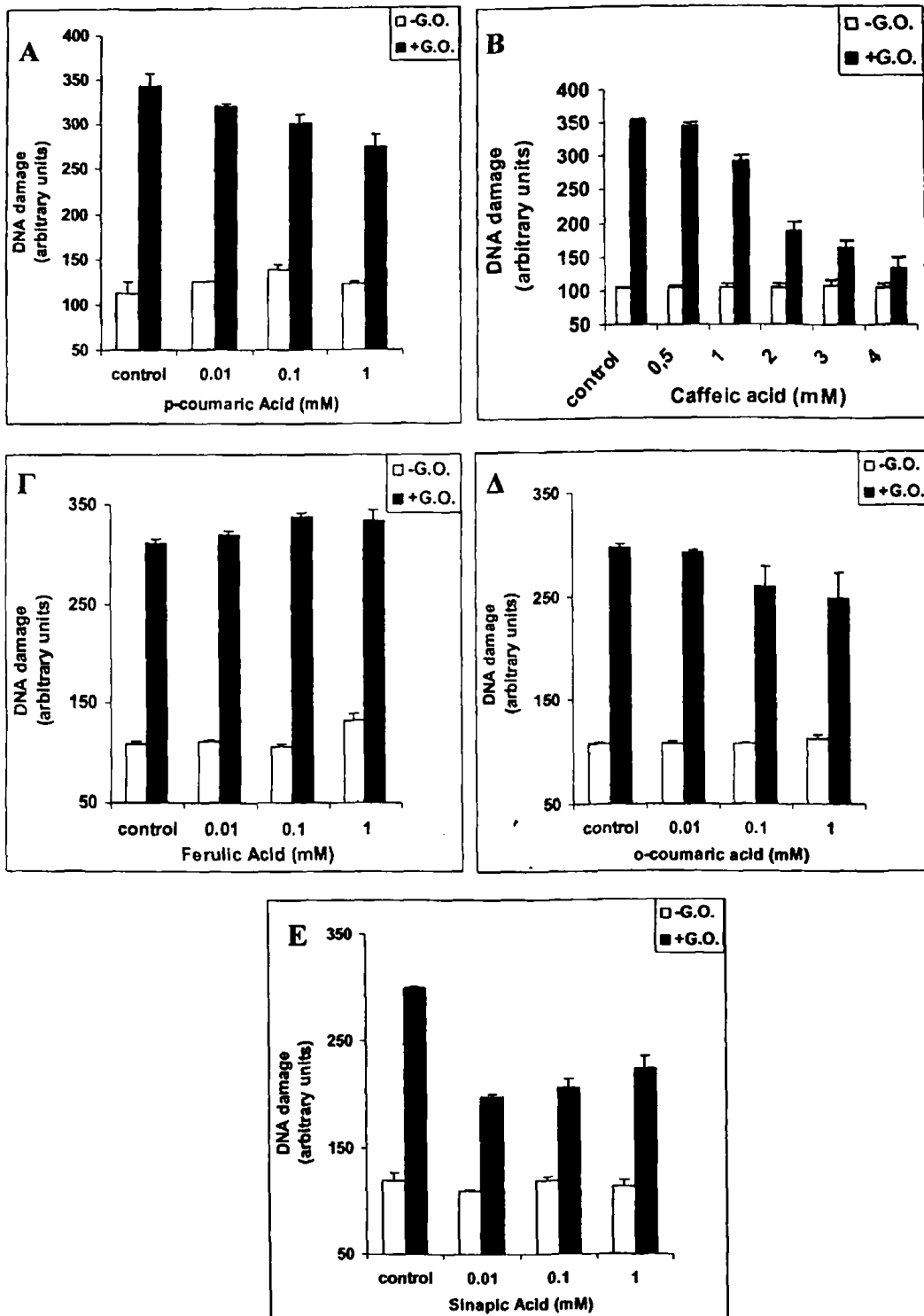




Σχήμα 19: Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 1) στην προστασία του DNA κοτάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπεξεργάστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος (A), πρωτοκατεχουϊκού οξέος (B), συριγγικού οξέος (Γ), p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Δ), βανιλικού οξέος (E) και γεντισικού οξέος (Z) και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 20: Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 2) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπεώσθησαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις p-υδροξυφαινοξικού οξέος (A), ομοβανιλλικού οξέος (B) και κινναμικού οξέος (Γ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 21: Δράση των φαινολικών ενώσεων (Ομάδα 3) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπελάστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις p-κουμαρικού οξέος (A), καφεϊκού οξέος (B), φερουλικού οξέος (Γ), o-κουμαρικού οξέος (Δ) και σιναπικού οξέος (E) και στη συνέχεια συνεχώς εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (ανοιχτόχρωμες μπάρες) για 10 λεπτά σε H_2O_2 μέσω της προσθήκης στο καλλιεργητικό υγρό 60 ng/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.3 Εξέταση της ικανότητας των φαινολικών ενώσεων να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή η δράση των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αποδέκτες των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, έχοντας έτσι προστατευτική δράση απέναντι στις βλαβερές για τους οργανισμούς δράσεις των οξειδωτικών παραγόντων (Owen et al., 2000, Rice-Evans et al., 1996 Visioli et al., 1998, Visioli et al., 2004, Vissers et al., 2004). Έτσι επόμενο βήμα της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της δράσης των φαινολικών ενώσεων στην εκκαθάριση ελευθέρων ριζών και η πιθανή συσχέτιση της ιδιότητας αυτής με την προστασία του DNA των κυττάρων από το H_2O_2 . Η δράση αυτή εξετάστηκε με μια απλή χημική μέθοδο την TAS (Total Antioxidant Status), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι τιμές TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) καθώς και οι τιμές προστατευτικής δράσης (τιμές IC_{50}) των φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής δεν μπορούσαν από μόνα τους να οδηγήσουν σε κάποια συμπεράσματα για τη δράση των φαινολικών ενώσεων, σε σύγκριση όμως με την δράση τους ως προς την προστασία του κυτταρικού DNA φάνηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση και η δράση απέναντι στις βλάβες που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA δεν μπορούν να συσχετιστούν. Η υδροξυτυροσόλη, ενώ φαίνεται να παρέχει στα κύτταρα πολύ καλή προστασία απέναντι στη δράση του H_2O_2 ($IC_{50}=110 \mu M$), έχει μια σχετικά χαμηλή τιμή TEAC ($1,88 \pm 0,12$), ενώ ενώσεις όπως η τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη παρόλο τον υψηλό αντιοξειδωτικό τους χαρακτήρα ($2,64 \pm 0,21$ και $2,96 \pm 0,15$ αντίστοιχα) αδυνατούν να παρέχουν προστασία στο κυτταρικό DNA.

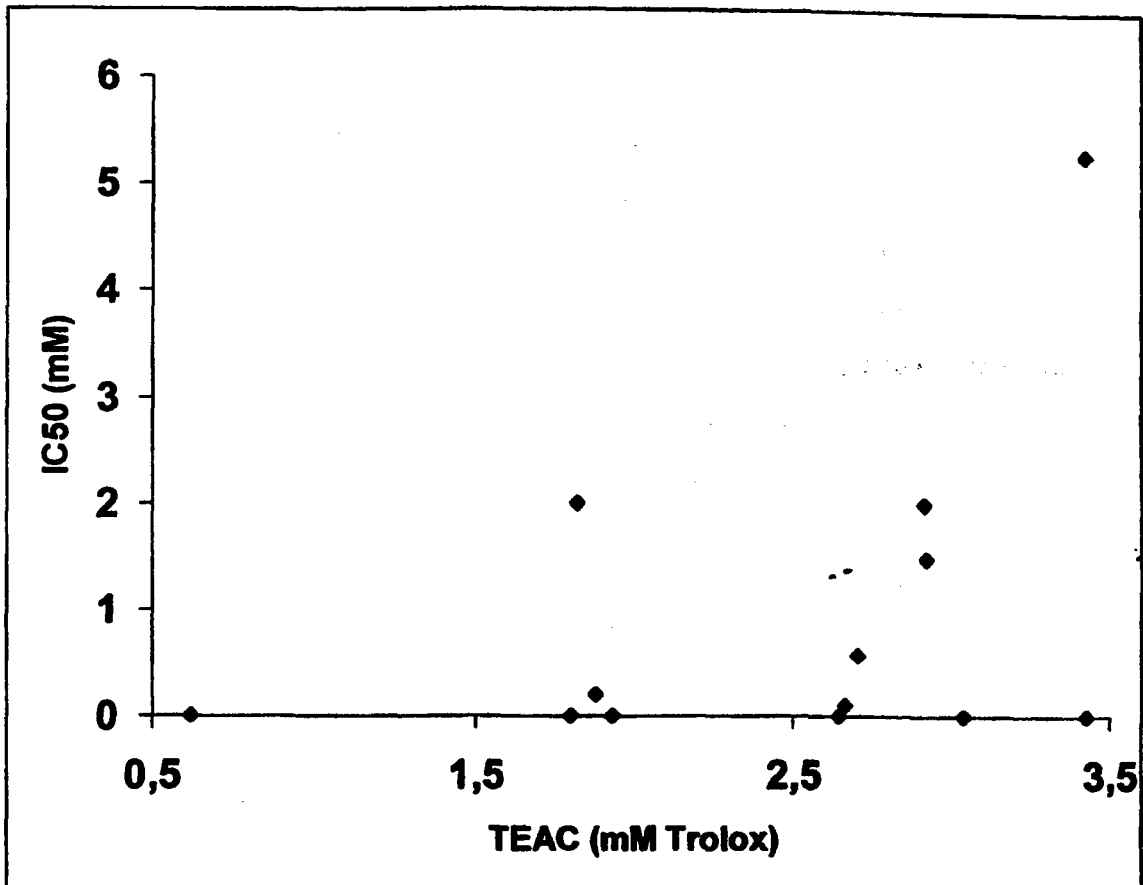
Συμπερασματικά προκύπτει, πως σε αντίθεση με τη γενική αντίληψη ότι η προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι, τουλάχιστον στο παρόν σύστημα, η ιδιότητα αυτή δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό προστασίας ενάντια στις βλάβες του DNA.



ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	TEAC (mM Trolox)	IC₅₀ (mM)
ΟΜΑΔΑ 1		
Γαλλικό οξύ	2,91±0,14	1,5
Πρωτοκατεχουικό οξύ	2,92 ± 0,11	2
Συριγγικό οξύ	3,04 ± 0,22	(Δ.Π.)
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	0,62 ± 0,12	(Δ.Π.)
Βανιλλικό οξύ	1,84 ± 0,13	(Δ.Π.)
Γεντισικό οξύ	1,93 ± 0,04	(Δ.Π.)
ΟΜΑΔΑ 2		
p-υδροξυφαινυλοακετοξικό οξύ	0,33 ± 0,07	(Δ.Π.)
Ομοβανιλλικό οξύ	3,43 ± 0,31	(Δ.Π.)
Κιναμικό οξύ	0,2 ± 0,04	(Δ.Π.)
ΟΜΑΔΑ 3		
p-κουμαρικό οξύ	2,7 ± 0,22	2
Καφεϊκό οξύ	1,82 ± 0,17	1,58±0,42
Φερουλικό οξύ	3,04 ± 0,23	(Δ.Π.)
ο-κουμαρικό οξύ	2,66 ± 0,23	>2
Σιναπικό οξύ	3,43 ± 0,34	10 μM
ΟΜΑΔΑ 4		
Υδροξυτυροσόλη	1,88 ± 0,12	0,1±0,07
Τυροσόλη	2,64 ± 0,21	(Δ.Π.)
Ελευρωπαΐνη	2,96 ± 0,15	(Δ.Π.)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και τιμές IC₅₀ των φαινολικών συστατικών του ελαιόλαδου. Οι τιμές TEAC υπολογίστηκαν με το σύστημα μυοσφαιρίνης/H₂O₂-ABTS, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ±SD μετά από τριπλή καταμέτρηση σε δύο διαφορετικά πειράματα. Οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν από τριπλή μέτρηση τριών διαφορετικών πειραμάτων εκφράζοντας τη συγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για να προστατεύσει τα κύτταρα κατά 50% από τη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂. (Δ.Π.=Δεν προστατεύει).





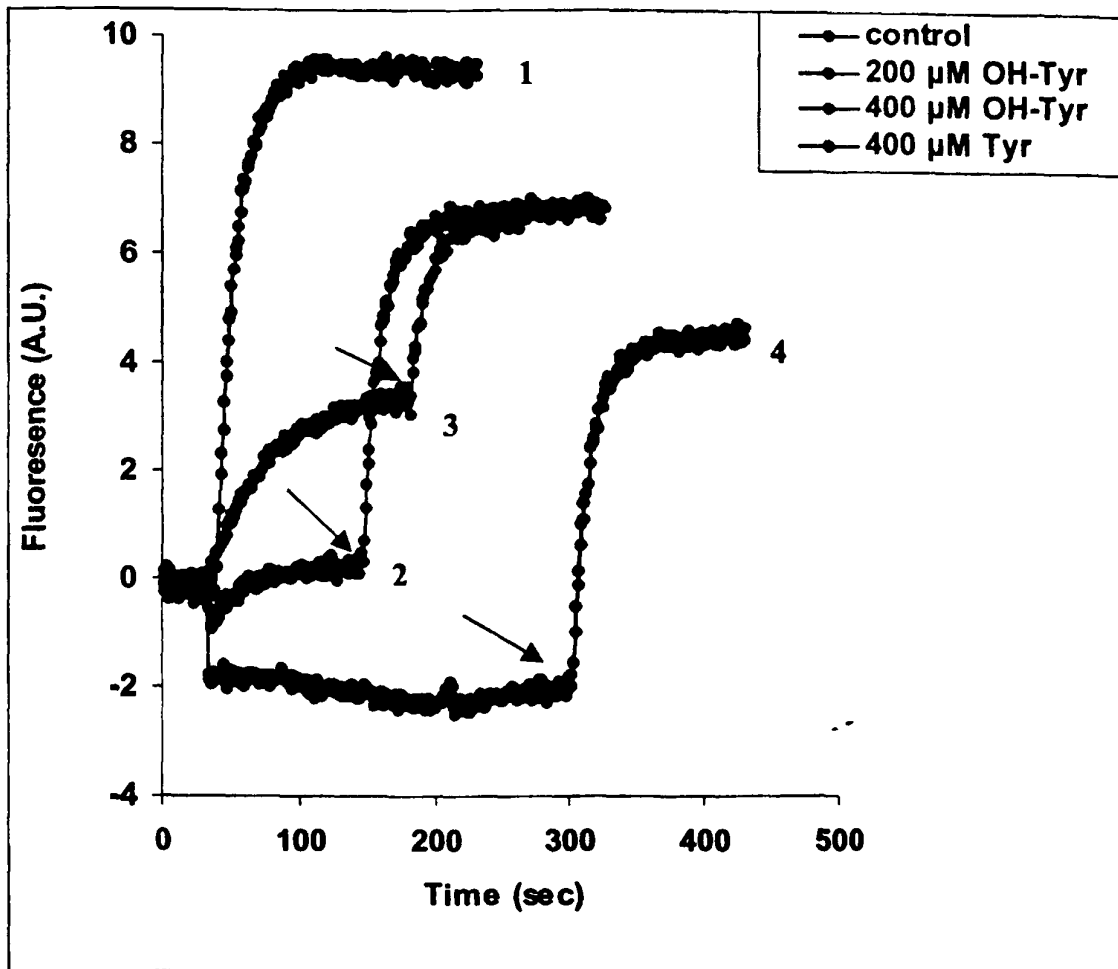
Σχήμα 22: Μη ύπαρξη συσχέτισης των τιμών TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) και των τιμών IC_{50} (ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2).

3.4 Ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο.

Στη συνέχεια, για να αποδειχθεί ο ρόλος της σιδηροδέσμευσης στο μηχανισμό προστασίας, εξετάστηκε η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει ενδοκυττάρια μόρια σιδήρου. Τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου προσδιορίστηκαν με φθορισμόμετρο εξετάζοντας την αύξηση της φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνης, μετά την προσθήκη του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH (Σχήμα 23). Παρατηρήθηκε ότι προσθήκη υδροξυτυροσόλης στα κύτταρα οδήγησε σε αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση αύξησε το φθορισμό της καλσεΐνης, δείχνοντας έτσι την απομάκρυνση του σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη. (Σχήμα 23). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παρόμοιες με αυτές που προστατεύουν τα κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 . Αντίθετα όταν στα κύτταρα προστέθηκε η ένωση τυροσόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την υδροξυτυροσόλη, τότε δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου (Σχήμα 23). Για να επιβεβαιωθεί η σιδηροδεσμευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης στη συνέχεια προστέθηκε SIH όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στο φθορισμό, αποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό ότι η αύξηση του φθορισμού οφείλεται στην σιδηροδεσμευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η παρουσία της ορθο-διυδροξυ δομής στο μόριο της υδροξυτυροσόλης την καθιστά ικανή την να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, κάτι που φαίνεται να οδηγεί και στην προστασία του κυτταρικού DNA από τη δράση του H_2O_2 . Στις ίδιες συνθήκες η τυροσόλη δεν μπορεί να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο σίδηρο ενώ παράλληλα δεν προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 , ενισχύοντας την άποψη ότι η προστατευτική ικανότητα οφείλεται στην σιδηροδεσμευτική ιδιότητα της υδροξυτυροσόλης.





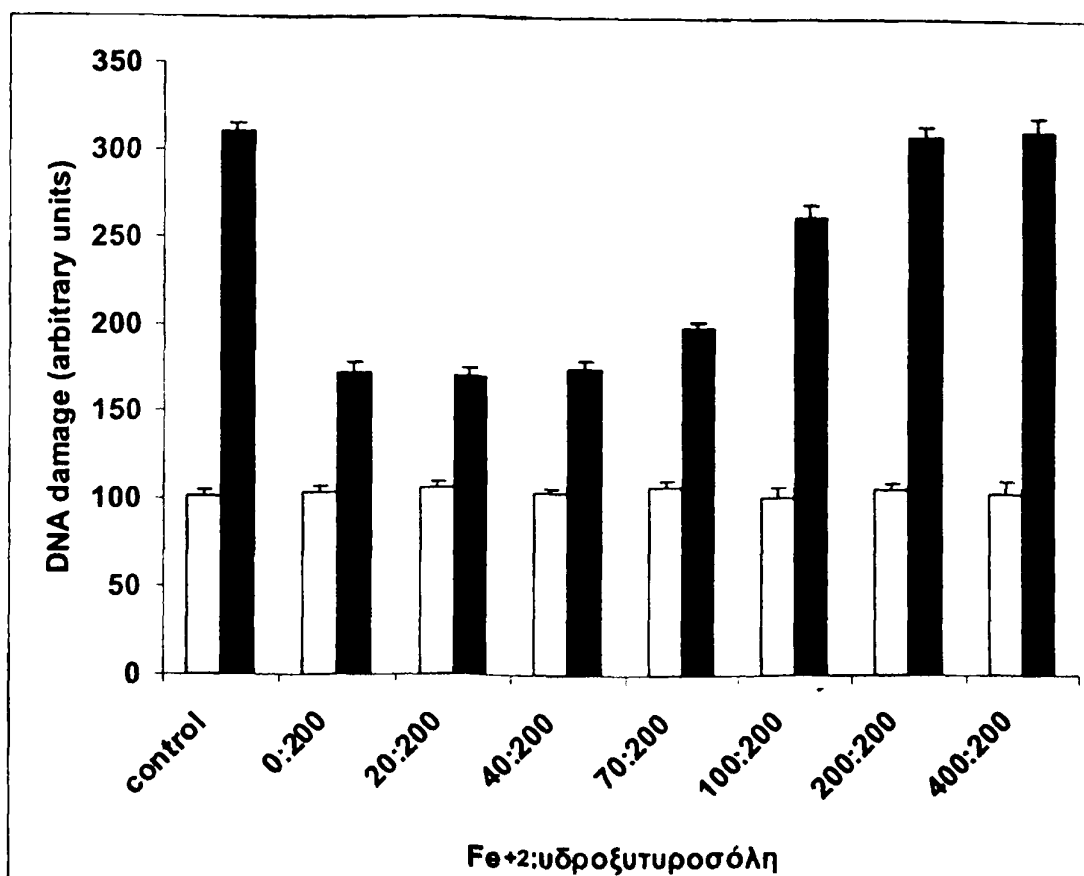
Σχήμα 23: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) επώαστηκαν για 10 λεπτά με διάλυμα καλσεΐνης στους 37°C . Στη συνέχεια συλλέχθηκαν και τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου εξετάστηκαν σε φθορισμόμετρο (HITACHI, F2500) μετά από έκθεση σε $11 \mu\text{M}$ SIH (1) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης $200 \mu\text{M}$ (2), $400 \mu\text{M}$ (3) ή $200 \mu\text{M}$ τυροσόλης (4) οι οποίες προστέθηκαν απευθείας στην κυψελίδα. Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε δυο ακόμη φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

3. 5 Αναλογίες σιδήρου και υδροξυτυροσόλης και προστατευτική δράση.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει σίδηρο σε κύτταρα. με την τεχνική της comet assay. Έτσι στα κύτταρα προστέθηκε εξωγενώς σίδηρος σε δισθενή μορφή Fe^{2+} , ο οποίος όμως από μόνος του δεν επηρέασε τη δημιουργία μονών σχάσεων στο πυρηνικό DNA. Όπως φαίνεται στο σχήμα 24, η προστασία, που παρείχε η υδροξυτυροσόλη, βαθμιαία μειώθηκε, καθώς η ποσότητα του σιδήρου στο σύμπλοκο σιδήρου:υδροξυτυροσόλης αυξανόταν. Η προστασία εξαφανίστηκε τελείως, όταν ο λόγος Fe^{2+} : υδροξυτυροσόλης ήταν ίσος ή μεγαλύτερος του 1. Πιθανή εξήγηση για τη μείωση της προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης είναι το γεγονός ότι ο σχηματισμός συμπλόκου σε αναλογία 1:1 πριν την επώαση οδηγεί στην έλλειψη δυνατότητας για περαιτέρω σιδηροδέσμευση, κάτι το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική προστασία του κυτταρικού DNA. Έτσι η βαθμιαία αύξηση της ποσότητας του σιδήρου στο σύμπλοκο Fe^{2+} : υδροξυτυροσόλης μειώνει την 'ελεύθερη' υδροξυτυροσόλη, που είναι ικανή να δεσμεύσει ενδοκυττάριο σίδηρο και να προστατέψει το κυτταρικό DNA.

Με τα αποτελέσματα αυτά ενισχύεται η υπόθεση ότι η υδροξυτυροσόλη δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο και κατά συνέπεια η ικανότητα αυτή της δίνει προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στη δράση του H_2O_2 . Τα παρόντα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου κατά την εξέταση άλλων ενώσεων με σιδηροδεσμευτικές ικανότητες όπως οι ενώσεις τροπολόνη και δεσφεριοξαμίνη (DFO) (Doulias et al., 2003, Doulias et al., 2005).





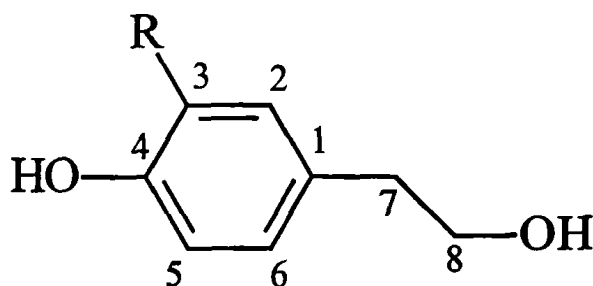
Σχήμα 24: Αναλογίες υδροξυτυροσόλης-σιδήρου και επίδραση στη βλάβη του DNA των κυττάρων από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπεώσθησαν για 15 λεπτά με $50 \mu M$ Fe^{2+} μόνο του ή μαζί με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης. Τα σύμπλοκα σιδήρου και υδροξυτυροσόλης σχηματίστηκαν ακριβώς πριν την προσθήκη στα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επεώσθησαν με 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης για 10 λεπτά, συλλέχθησαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β

3.6 Υδροξυτυροσόλη και απόπτωση

3.6.1 Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση

Στις προηγούμενες ενότητες εξετάστηκε η δράση των φαινολικών ενώσεων στην προστασία του κυτταρικού DNA από τις βλάβες που προκαλεί το H_2O_2 . Στη συνέχεια στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί και ο τρόπος δράσης ενώσεων που προέρχονται από το ελαιόλαδο, στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Χρησιμοποιήθηκαν 2 ενώσεις που βρίσκονται στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την προστασία απέναντι στο οξειδωτικό στρες το οποίο όπως αναφέρθηκε εμπλέκεται στη δημιουργία διαφόρων παθήσεων (Ghiselli et al 1997, Owen et al., 2000α και β, Tuck et al 2000, Visioli et al., 2002). Οι 2 αυτές ενώσεις έχουν παρόμοια δομή με μόνη διαφορά την ύπαρξη μιας διϋδρόξη ομάδας στη θέση 3 του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης (Σχήμα 25). Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι η υδροξυτυροσόλη στα προηγούμενα πειράματα έδειξε ότι προστατεύει τα κύτταρα από τις σχάσεις που προκαλεί το H_2O_2 στις μονές αλυσίδες του DNA ενώ η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν ήταν κυτταροπροστατευτική.



R=H: Tyrosol

R=OH: Hydroxytyrosol

5

Σχήμα 25: Δομές των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη



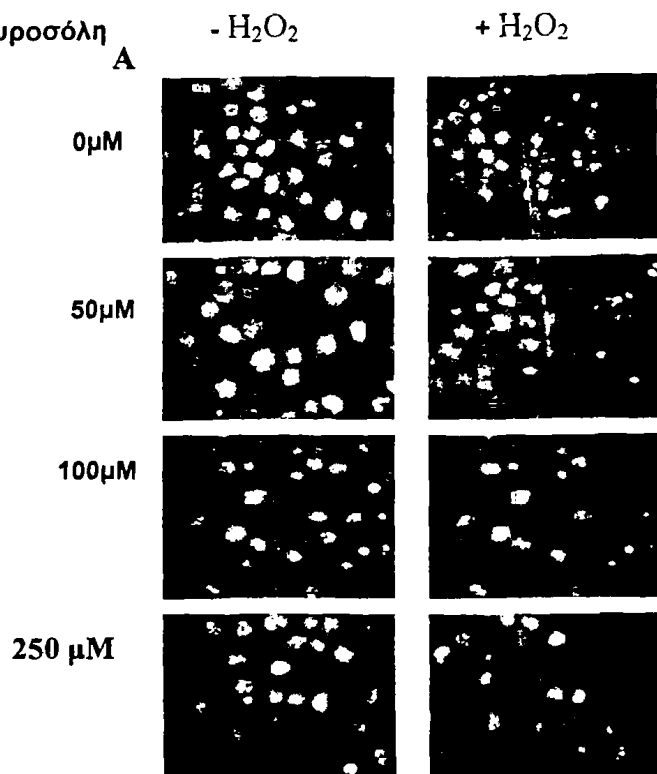
3.6.2 Επιπτώσεις στη μορφολογία των πυρήνων

Προκειμένου να εξεταστεί η δράση των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 , μελετήθηκε η μορφολογία των πυρήνων των κυττάρων μετά από χρώση της χρωματίνης τους με την χρωστική ουσία Hoechst 33342. Η έκθεση των κυττάρων για 6 ώρες σε 250 μM H_2O_2 , οδήγησε σε συμπύκνωση και θραυσματοποίηση της χρωματίνης σε πολύ μεγάλο βαθμό, κάτι το οποίο είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα κυττάρων που οδηγούνται ή βρίσκονται σε απόπτωση (Σχήμα 26A). Μετρήθηκε ο αριθμός των θραυσματοποιημένων και των συμπυκνωμένων πυρήνων και εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό των συνολικών. Προεπάση των κυττάρων με την υδροξυτυροσόλη δεν έδειξε κάποια ιδιαίτερη επίπτωση στη μορφολογία των πυρήνων (Σχήμα 26). Το σημαντικό ήταν ότι η προεπάση των κυττάρων με 100 και 250 μM υδροξυτυροσόλης για 30 λεπτά πριν από την προσθήκη του H_2O_2 , ανέστειλε τον κατακερματισμό της χρωματίνης, δείχνοντας έτσι μια ικανότητα της ένωσης αυτής να αναστέλλει την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Στο σχήμα 26B αναπαρίστανται οι μετρήσεις των σχηματισμών σε ποσοστιαίες μονάδες σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν προστάτευσε τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 (Σχήμα 27). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν αφενός μεν ότι η υδροξυτυροσόλη παρέχει προστασία στα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 , αφετέρου δε η μικρή διαφορά στη δομή των 2 ενώσεων φαίνεται να είναι αυτή που παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση της υδροξυτυροσόλης από την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 .

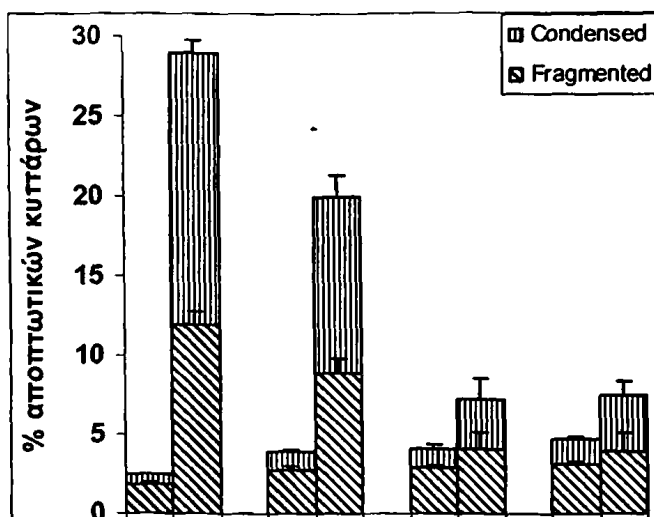
3.6.3 Εξέταση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 με την τεχνική 'θραυσματοποίησης DNA'.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύθηκαν με τα αποτελέσματα μιας ακόμη τεχνικής που εξετάζει το σχηματισμό ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων (ladder pattern). Έκθεση κυττάρων Jurkat σε 250 μM H_2O_2 οδήγησε στο σχηματισμό του χαρακτηριστικού laddering, δηλαδή τη σχάση του DNA σε τμήματα πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων, κάτι που υποδηλώνει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης



Υδροξυτυροσόλη
A

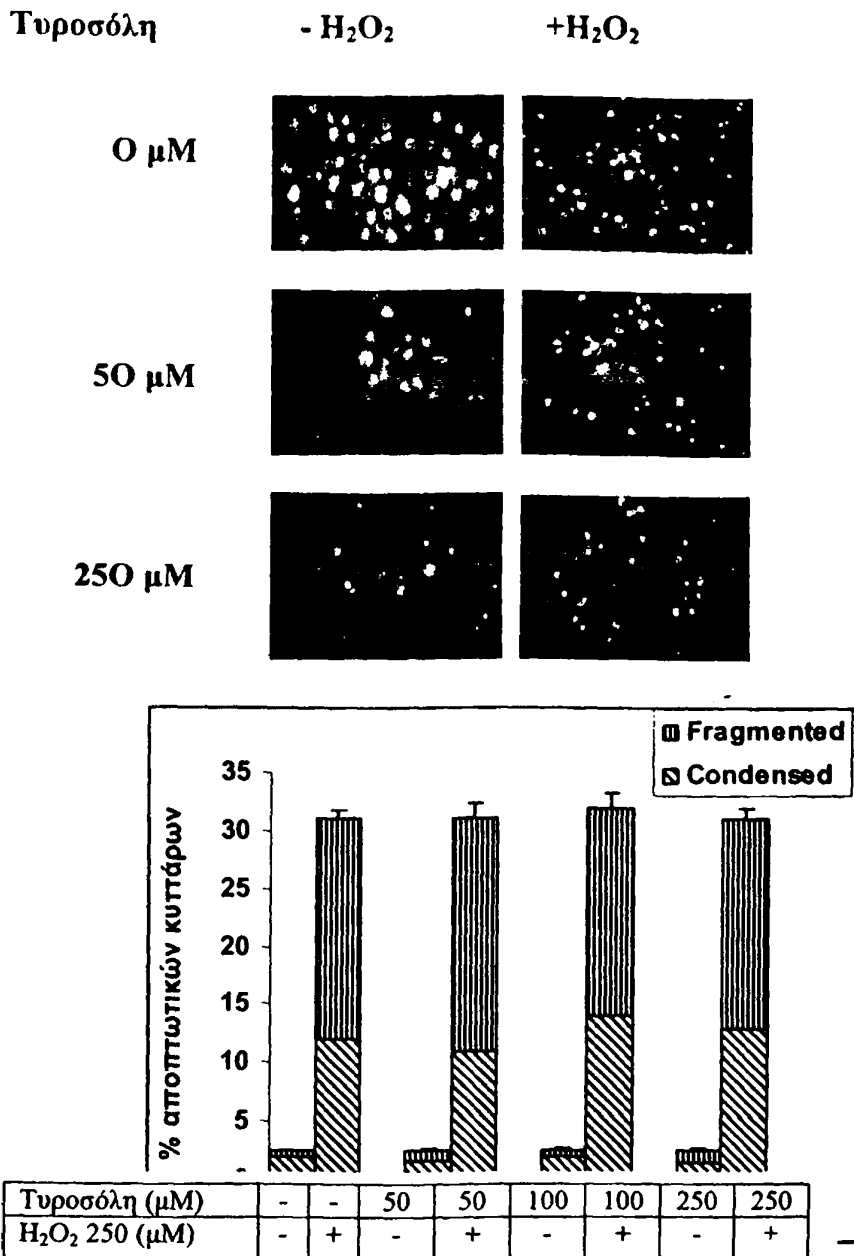
B



Υδροξυτυροσόλη (μM)	-	-	50	50	100	100	250	250
H ₂ O ₂ 250 (μM)	-	+	-	+	-	+	-	+

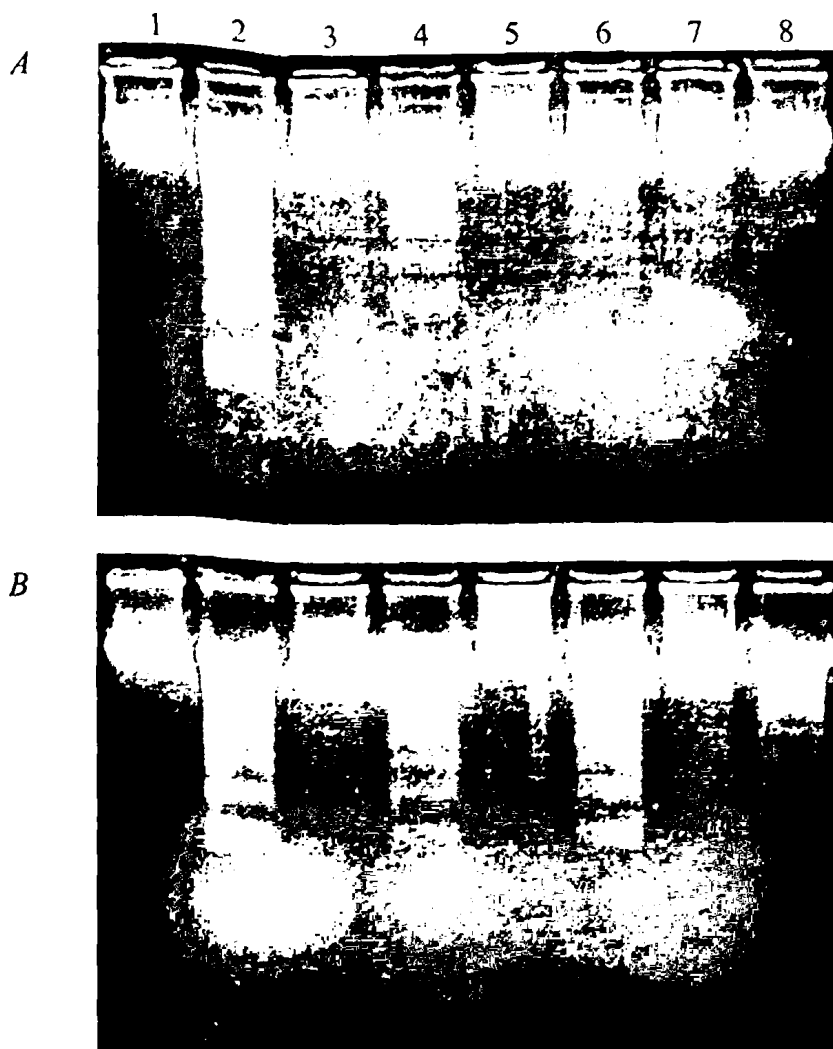
Σχήμα 26: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στη συμπύκνωση και θραυσματοποίηση που προκαλεί το H₂O₂. Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶ cells/ml) προεπώστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της χρωστικής ουσίας Hoechst 33342 και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν οι αλλαγές στους πυρήνες σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus IX70-FL, Tokyo, Japan). (A) Τα κύτταρα μετά από προεπώση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ενώσεων (50,100,250 μM) για 30 λεπτά, επώαστηκαν με 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες. (B) Το διάγραμμα αναπαριστά τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα



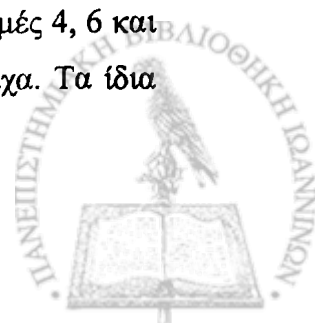


Σχήμα 27: Επίδραση της τυροσόλης στη συμπύκνωση και θραυσματοποίηση που προκαλεί το H₂O₂. Κύτταρα Jurkat προεπώαστηκαν με τις με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της χρωστικής ουσίας Hoechst 33342 και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν οι αλλαγές στους πυρήνες σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus IX70-FL, Tokyo, Japan). Τα κύτταρα μετά από προεπάση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ενώσεων (50,100,250 μM) για 30 λεπτά, επώαστηκαν με 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες. Το διάγραμμα αναπαριστά τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα.





Σχήμα 28: Εξέταση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 με την τεχνική ladder pattern. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) προεπώαστηκαν για 30 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης (A) ή τυροσόλης (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε $250 \mu M H_2O_2$ για 6 ώρες. Στο τέλος της επώασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν και το κυτταρικό DNA απομονώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. (A) Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε H_2O_2 , διαδρομές 3, 5 και 7: 100, 300 και $500 \mu M$ υδροξυτυροσόλης αντίστοιχα. Διαδρομές 4, 6 και 8: $250 \mu M H_2O_2$ υπό την παρουσία 100, 300 και $500 \mu M$ υδροξυτυροσόλης αντίστοιχα. (B) Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε H_2O_2 , διαδρομές 3, 5 και 7: 100, 300 και $500 \mu M$ τυροσόλης αντίστοιχα. Διαδρομές 4, 6 και 8: $250 \mu M H_2O_2$ υπό την παρουσία 100, 300 και $500 \mu M$ τυροσόλης αντίστοιχα. Τα ίδια πειράματα επαναλήφθηκαν δύο ακόμα φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



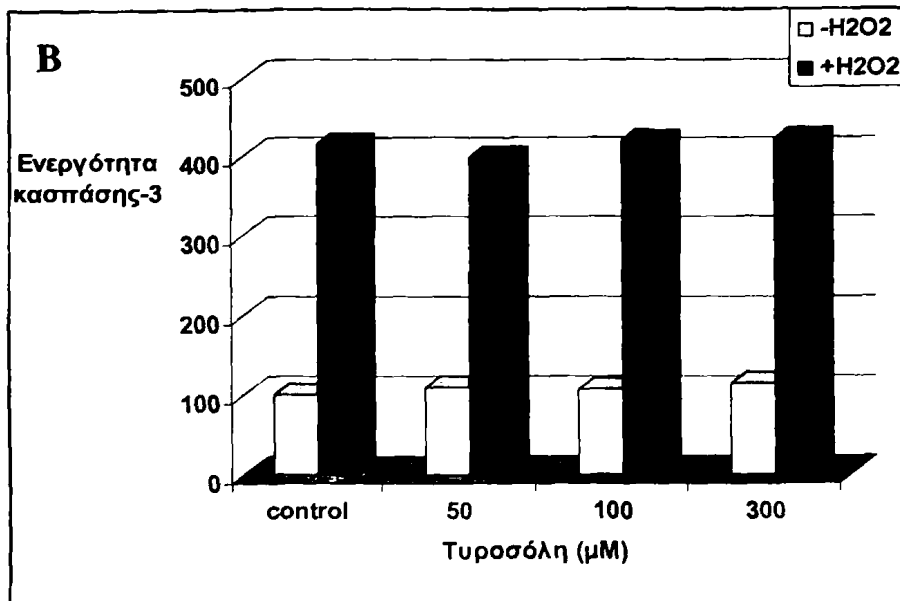
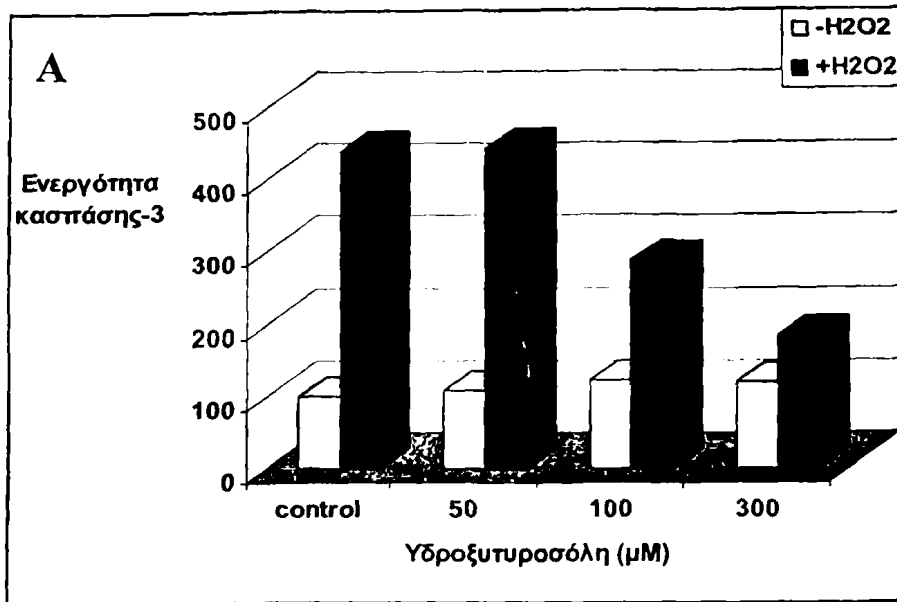
(Σχήμα 28 διαδρομή 2). Προεπάση με υδροξυτυροσόλη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μM (100, 300 και 500) οδήγησε στη μείωση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων που προκαλεί το H_2O_2 (Σχήμα 28A, διαδρομές 4, 6, 8). Η τυροσόλη στις αντίστοιχες συνθήκες δεν προστάτευσε το κυτταρικό DNA από τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις, αφού προεπάση των κυττάρων με 100, 300 και 250 μM τυροσόλης δεν μπόρεσε να μειώσει το χαρακτηριστική εμφάνιση των θραυσμάτων του DNA όπως φαίνεται και στο σχήμα 28B κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις.

3.6.4 Αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 από την υδροξυτυροσόλη

Είναι γνωστό ότι για τη σχάση του DNA σε τμήματα πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων, είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του 'καταρράκτη' των κασπασών (Arnoult et al., 2003). Για το λόγο αυτό εξετάστηκε στη συνέχεια η ενεργότητα της κασπάσης -3 φθορισμομετρικά. Χρησιμοποιήθηκε το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin). Έτσι εξετάστηκαν οι επιπτώσεις των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη στην ενεργοποίηση των κασπασών που προκαλείται από το H_2O_2 . Στο σχήμα 29 φαίνεται ότι η έκθεση κυττάρων σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες οδηγεί τα κύτταρα σε αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 περίπου 4 φορές σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Προεπάση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (50, 100 και 300 μM) υδροξυτυροσόλης για 30 λεπτά πριν την προσθήκη του H_2O_2 οδηγεί σε μια δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης 3 (Σχήμα 29A). Αντίθετα με την υδροξυτυροσόλη, προεπάση των κυττάρων με τυροσόλη πριν από το H_2O_2 , δεν αναστέλλει την αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης 3 (Σχήμα 29B).

Φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η υδροξυτυροσόλη προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και στον καταρράκτη των αντιδράσεων των κασπασών. Μια ένωση με σχεδόν ίδια δομή με αυτή της υδροξυτυροσόλης, η τυροσόλη, στις ίδιες συνθήκες δεν μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 .



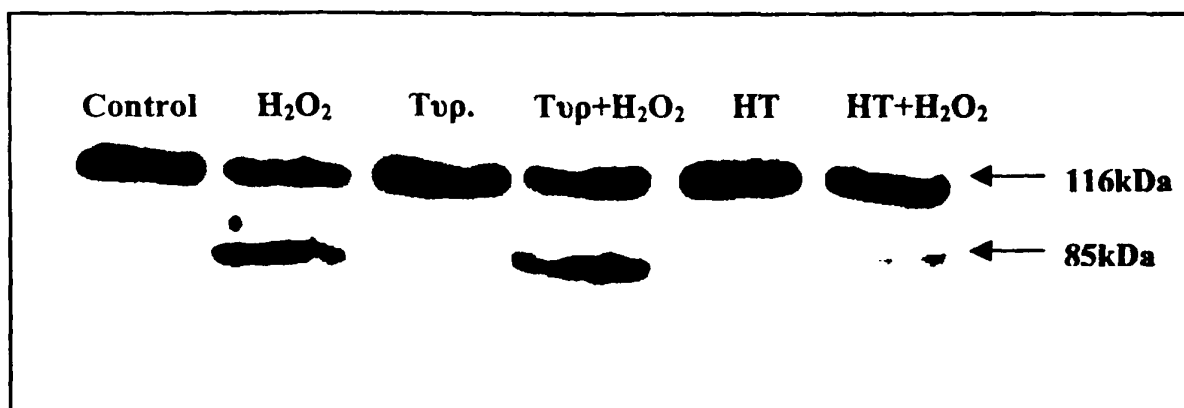


Σχήμα 29: Επίδραση της υδροξυτυροσώλης και της τυροσώλης στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων (άσπρες στήλες) υδροξυτυροσώλης (50, 100 και 300 µM) (A) ή τυροσώλης (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 µM H₂O₂ για 6 ώρες (μαύρες στήλες). Με το πέρας της επώασης τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η ικανότητά τους να απελευθερώνουν την 3-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη μετρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (HITACHI, F2500, Japan) με διέγερση στα 380 nm και εκπομπή στα 460 nm. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 3 διαφορετικών πειραμάτων που δε διέφεραν μεταξύ τους περισσότερο από 10%.



3.6.5 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην σχάση της πρωτεΐνης PARP που προκαλεί το H_2O_2

Ένα εκ των φυσιολογικών υποστρωμάτων που ενεργοποιείται από την ενεργή κασπάση-3 είναι το ένζυμο poly(ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP), το οποίο έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται σε κυτταρικές αντιδράσεις που προέρχονται από γενετικές βλάβες (Yung et al, 2001). Όπως φαίνεται στο σχήμα 30 επώαση των κυττάρων με 250 μM H_2O_2 οδηγεί στη σχάση της PARP δίνοντας έτσι ένα νέο σχασμένο κομμάτι με μοριακό βάρος 85 kDa. Προεπώαση των κυττάρων με 300 μM υδροξυτυροσόλης αναστέλλει τη σχάση του ενζύμου αυτού, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται όταν τα κύτταρα προεπωαστούν με τυροσόλη πριν την έκθεσή τους σε H_2O_2 (Σχήμα 30). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν χωρίς καμία αμφιβολία την ανασταλτική δράση της υδροξυτυροσόλης στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και της PARP από το H_2O_2 καθώς και ότι η ύπαρξη της ορθο-διωδρόξυ δομής παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση αυτή.



Σχήμα 30: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης στην σχάση του ενζύμου poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat επώαστηκαν με 300 μM υδροξυτυροσόλη ή τυροσόλη για 30 λεπτά πριν την έκθεση σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και αναλύθηκαν κατά Western με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

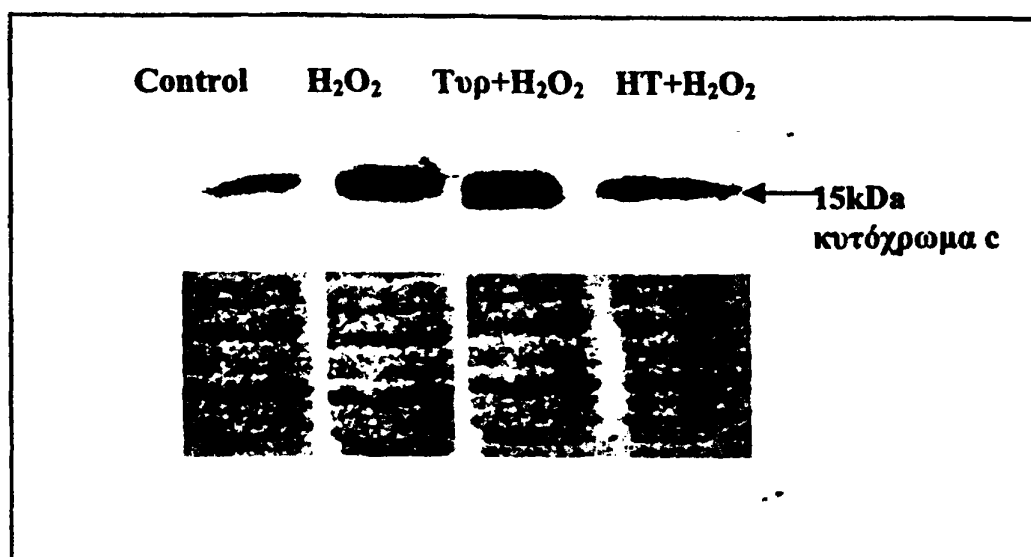


3.6.6 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που προκαλεί το H_2O_2

Είναι γνωστό ότι η παρουσία ενός λειτουργικού αποπτωσώματος είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του 'καταρράκτη' των κασπασών. Απαραίτητη για τη δημιουργία του αποπτωσώματος είναι η απελευθέρωση παραγόντων όπως είναι το κυτόχρωμα c, από τα μιτοχόνδρια στο κυταροδιάλυμα μέσω ανοίγματος των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης και χάλασης του διαμεμβρανικού δυναμικού της ($\Delta\psi M$) (Kim, H., E. et al, 2005). Έτσι, όταν το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια συνδέεται στο κυταροδιάλυμα με τον παράγοντα Araf-1 και την προκασπάση 9 δημιουργώντας έτσι το αποπτώσωμα το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τον 'καταρράκτη' των κασπασών (Li et al, 1997). Στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c που προκαλεί το H_2O_2 . Τα κύτταρα επώαστηκαν με 300 μM υδροξυτυροσόλης ή τυροσόλης για 30 λεπτά πριν εκτεθούν σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες και στη συνέχεια τα κυτταροπλασματικά κλάσματα αναλύθηκαν κατά Western. Το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυταροδιάλυμα μετά από επώαση με H_2O_2 ενώ προεπώαση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη φαίνεται να αναστέλλει τη δράση του H_2O_2 (Σχήμα 31). Προεπώαση των κυττάρων με τυροσόλη δεν αναστέλλει αυτή την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Σχήμα 31).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η υδροξυτυροσόλη προστατεύει τα μιτοχόνδρια των κυττάρων, αφού αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών από τη δράση του H_2O_2 .





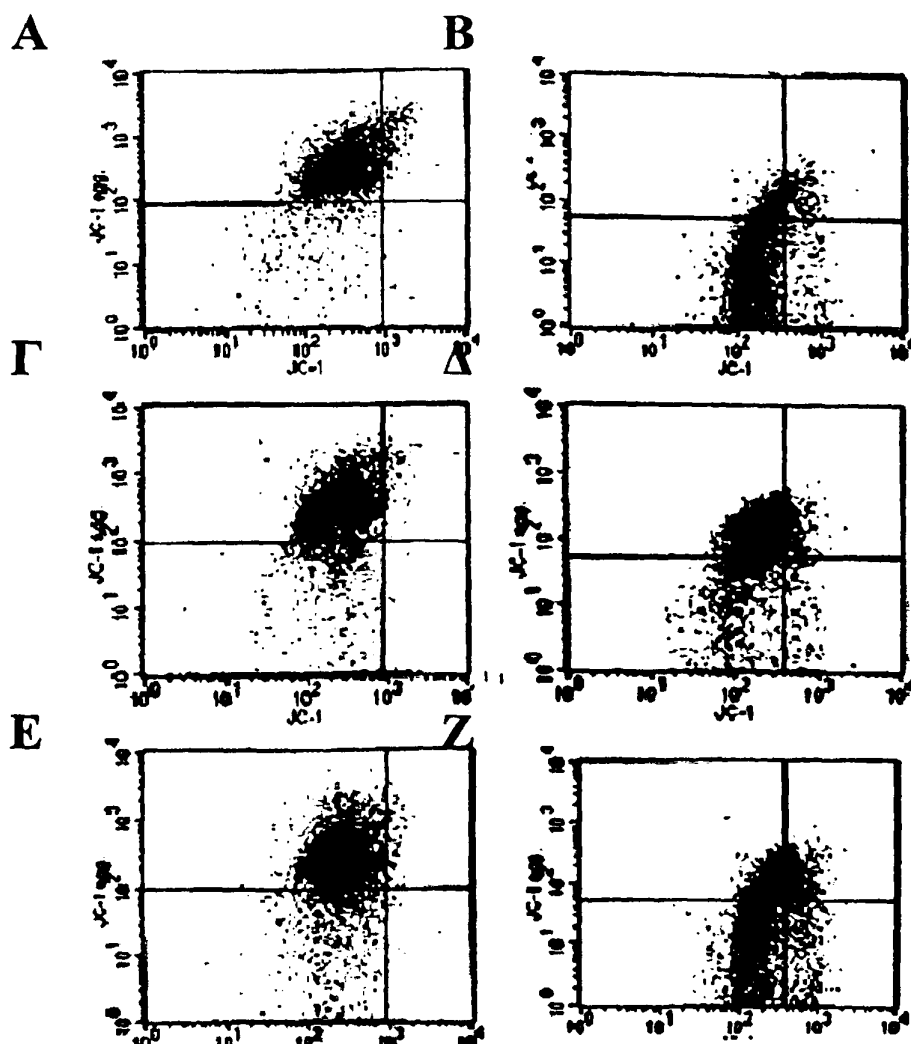
Σχήμα 31: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* που προκαλείται από το H₂O₂. (A) Κύτταρα Jurkat (1.5x10⁶ ανά ml) προεπώαστηκαν με 300 μM υδροξυτυροσόλης (HT) ή τυροσόλης (T) για 30 λεπτά πριν την έκθεσή τους σε 250 μM of H₂O₂. Το κυτταροπλασματικό κλάσμα απομονώθηκε και αναλύθηκε κατά Western για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε H₂O₂, διαδρομή 4: 250 μM H₂O₂ υπό την παρουσία 250μM υδροξυτυροσόλης. Διαδρομή 4: 250 μM H₂O₂ υπό την παρουσία 250μM τυροσόλης. (B) Έλεγχος για ισόποση φόρτωση πρωτεΐνης με χρώση Ponceau. Το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

3.6.7 Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης στην προστασία του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα μιτοχόνδρια φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση κύριων αποπτωτικών δρόμων. Παρόλα αυτά οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι γνωστοί. Επίσης, η κυριαρχούσα άποψη για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ύστερα από την επίδραση κάποιου ερεθίσματος, είναι ότι πρέπει η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων να αποσταθεροποιηθεί έτσι ώστε να σχηματιστούν πόροι στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και να απελευθερωθούν από το εσωτερικό διάφοροι παραγόντες, όπως είναι και το κυτόχρωμα c (Shimizu et al, 1998, Proc. Natl.Acad. Sci). Έτσι στο σχήμα 32 εκτιμήθηκαν οι επιπτώσεις στο μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων μετά από έκθεση κυττάρων στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Επώαση των κυττάρων με συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (προσθήκη $1\mu g/ml$ οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει $20\mu M H_2O_2$ ανά λεπτό) οδήγησε σε μια χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του μεμβρανικού δυναμικού. Στη συνέχεια τα κύτταρα προεπώαστηκαν με $250\mu M$ υδροξυτυροσόλης ή τυροσόλης για μισή ώρα και στη συνέχεια εκτέθηκαν στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης ($1\mu g/ml$ ικανή να παράγει $20\mu M H_2O_2$) για 6 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων για 6 ώρες σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (οξειδάση της γλυκόζης) οδήγησε σε μείωση του μεμβρανικού δυναμικού όπως φαίνεται από τη μετατόπιση του κυτταρικού πληθυσμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (σχήματα 32A και 32B). Προεπώαση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη, φαίνεται να αναστέλλει τη μείωση του δυναμικού που προκαλεί η έκθεση των κυττάρων στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (Σχήμα 32Δ). Στις ίδιες συνθήκες η τυροσόλη δεν μπόρεσε να προστατεύσει τα κύτταρα από τη βλάβη που προκαλεί στα κύτταρα η δράση του H_2O_2 (Σχήμα 32Z).

Φαίνεται λοιπόν πως η υδροξυτυροσόλη παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των μιτοχονδρίων και η προστασία αυτή φαίνεται να προέρχεται όπως αναφέρεται και παραπάνω, από την ικανότητα της φαινολικής αυτής ένωσης να δεσμεύει οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου, αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία πολύ δραστικών παραγόντων όπως είναι οι ρίζες $\cdot OH$.





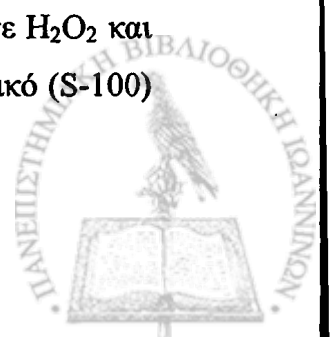
Σχήμα 32: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στη διαταραχή του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) (A: κύτταρα μάρτυρες) προεπώαστηκαν με 250 μM υδροξυτυροσόλης (Γ) ή τυροσόλης (Ε) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 6 ώρες σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (1 $\mu g/ml$ ικανή να παράγει 20 μM H_2O_2) (Δ και Ζ αντίστοιχα). Στο γραφήμα (B) τα κύτταρα έχουν επωαστεί μόνο με οξειδάση της γλυκόζης. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 37 °C με 0.3 ml διαλύματος χρώσης (1 $\mu g/ml$ JC-1 σε PBS). Ο πράσινος (JC-1) και κόκκινος (JC-1 aggregates) φθορισμός του JC-1 μετρήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACSscan Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) ενώ η καταγραφή και ανάλυση του έγινε με το πρόγραμμα CellQuest. Υψηλή ένταση κόκκινου φθορισμού υποδηλώνει κανονικό μεμβρανικό δυναμικό ενώ χαμηλή ένταση κόκκινου φθορισμού και παράλληλα υψηλή πράσινου φθορισμού υποδηλώνει μείωση του μεμβρανικού δυναμικού. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο ακόμα φορές με τα ίδια σχεδόν αποτελέσματα.

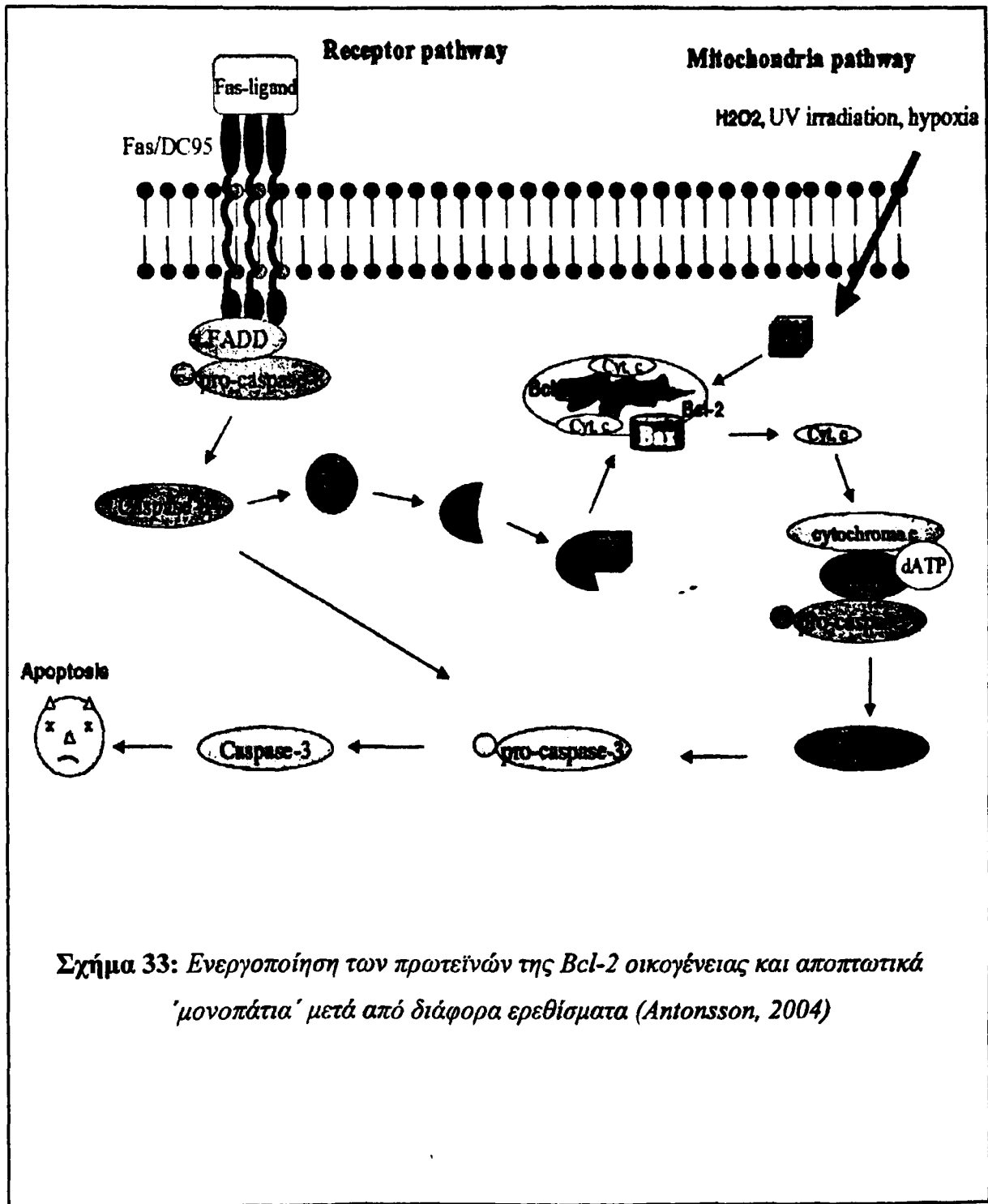


3.6.8 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην έκφραση της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2.

Είναι γνωστό ότι στον κυτταρικό θάνατο και ιδιαίτερα στην απόπτωση που προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα όπως το οξειδωτικό στρες, εμπλέκεται μια οικογένεια πρωτεϊνών με την ονομασία Bcl-2 (Green et al., 1998, Esposti et al., 1999, Cory et al., 2003, Tsujimoto et al., 2003, Antonsson, 2004, Danial, 2004). Έτσι αρκετές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές της απόπτωσης δρώντας σε σημεία όπου από εκεί και πέρα η αναστολή της απόπτωσης είναι μη αναστρέψιμη (Adams et al., 1998). Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 περιέχει χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες: η πρώτη περιέχει αντιαποπτωτικά και η δεύτερη προαποπτωτικά μόρια (Antonsson, 2000). Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L φαίνεται να αναστέλλουν την απόπτωση ενώ πρωτεΐνες όπως η Bid, η Bak, και η Bax έχουν αναφερθεί ότι έχουν προαποπτωτικές ιδιότητες (Kowaltowski et al., 2004, Kim et al., 2000, Valks et al., 2003, Shimizu et al., 1998). Ο τρόπος δράσης των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι πλήρως γνωστός, ενώ στο σχήμα 33 απεικονίζεται ο πιθανός τρόπος δράσης στα κύτταρα των προαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bax και Bid) και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης (Bcl-2). Στη συνέχεια εξετάστηκε ο ρόλος των ενώσεων υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας από το H₂O₂.

Αρχικά εξετάστηκαν οι επιπτώσεις στην ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών παραγόντων της Bcl-2 οικογένειας από το H₂O₂. Κύτταρα επωάστηκαν με 300 μM των ενώσεων για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων τα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν κατά Western. Όπως φαίνεται στο σχήμα 34, έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ για 6 ώρες δεν επηρέασε την έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-x_L σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-2 εξετάστηκαν και μετά από έκθεση σε H₂O₂ για 12 ώρες όπου πάλι δεν υπήρξε διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Προεπάση των κυττάρων με τις ενώσεις και στη συνέχεια έκθεση σε H₂O₂ φαίνεται να μην αλλάζει τα επίπεδα έκφρασης των δύο πρωτεϊνών (Σχήματα 34 Α, Β και Δ). Επιπλέον, κύτταρα προεπάστηκαν με τις δύο ενώσεις πριν την έκθεση σε H₂O₂ και στη συνέχεια εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στο κυτταροπλασματικό (S-100) και στο μιτοχονδριακό κλάσμα (M-10).





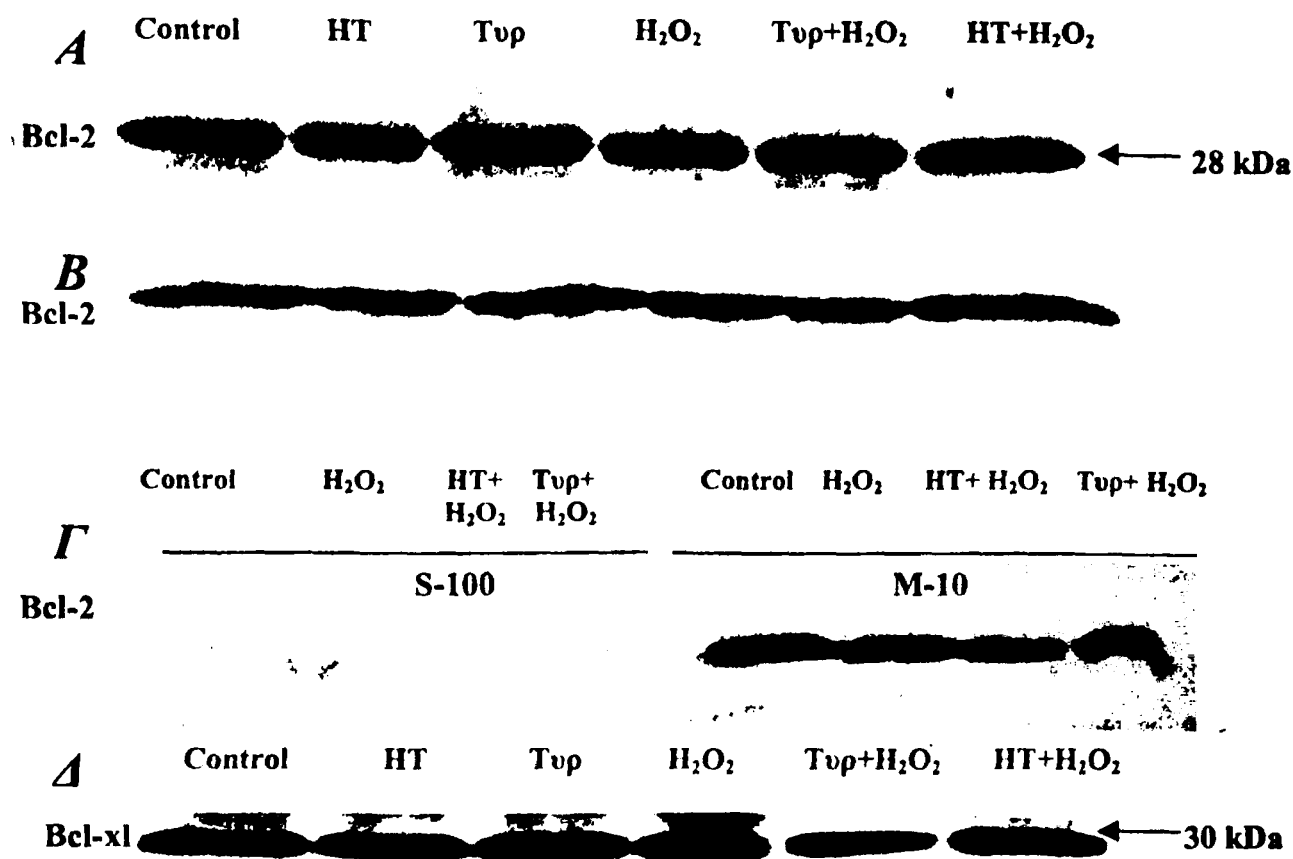
Στο σχήμα 34 Γ φαίνεται ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής δεν επηρεάστηκαν από την προεπάση με τις ενώσεις και την έκθεση σε H_2O_2 , σε κανένα από τα 2 κλάσματα που αναλύθηκαν. Παρατηρείται λοιπόν, ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών να μην επηρεάζονται από την έκθεση των κυττάρων Jurkat στις συγκεντρώσεις του H_2O_2 που βρέθηκε ότι προκαλούν απόπτωση.

3.6.9 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών παραγόντων Bid και Bax από το H_2O_2 .

Ακολούθως εξετάστηκαν 2 μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών, η Bid και η Bax πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αναφερθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του 'καταρράκτη' των κασπασών (Gogvadze et al., 2001, Polster et al., 2001, Antonsson et al., 2000, Kim et al, 2000, Terrones et al, 2004) και αναλύθηκαν κατά Western (Σχήματα 35A και B). Κύτταρα προεπάστηκαν με υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες. Όπως παρατηρείται, έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 δεν οδηγεί στη δημιουργία του σχασμένου κομματιού της πρωτεΐνης Bid (tBid), στην ενεργοποίησή της δηλαδή. Φαίνεται δηλαδή το H_2O_2 να μην επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του προαποπτωτικού παράγοντα Bid και να μην τον οδηγεί σε ενεργοποίηση. Στο σχήμα 35A, τα κύτταρα, μετά την προεπάση με τις 2 φαινολικές ενώσεις, επώαστηκαν και με το αντίσωμα anti-Fas για 6 ώρες, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας αφού είναι γνωστό ότι το anti-Fas σχάζει την πρωτεΐνη Bid με παράλληλη δημιουργία ενός σχασμένου κομματιού γνωστό και ως truncated Bid (tBid), μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης 8.

Αντίθετα με το H_2O_2 , επώαση των κυττάρων με 0.5 $\mu g/ml$ anti-Fas, οδήγησε στην ενεργοποίηση του παράγοντα Bid και στη δημιουργία του σχασμένου κομματιού του (tBid) (σχήμα 35A). Προεπάση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη για 30 λεπτά, δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bid. Όμως η προεπάση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη ανέστειλλε την ενεργοποίηση της Bid που προκλήθηκε από την επώαση με το αντίσωμα Fas, όπως φαίνεται και στο σχήμα 35A. Αντίθετα η τυροσόλη δεν είχε καμία επίδραση, είτε όταν προεπάστηκε μόνη της, είτε όταν στη συνέχεια της επώασης τα κύτταρα εκτέθηκαν στο αντίσωμα Fas (σχήμα 35A).

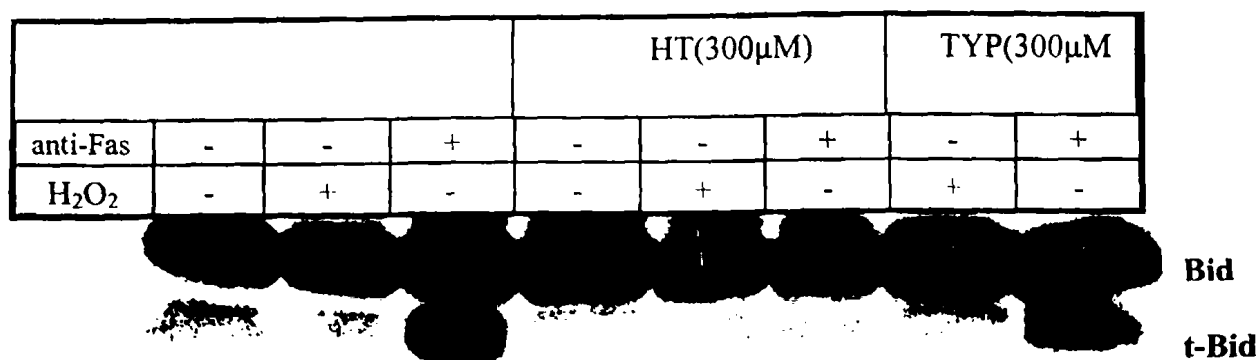




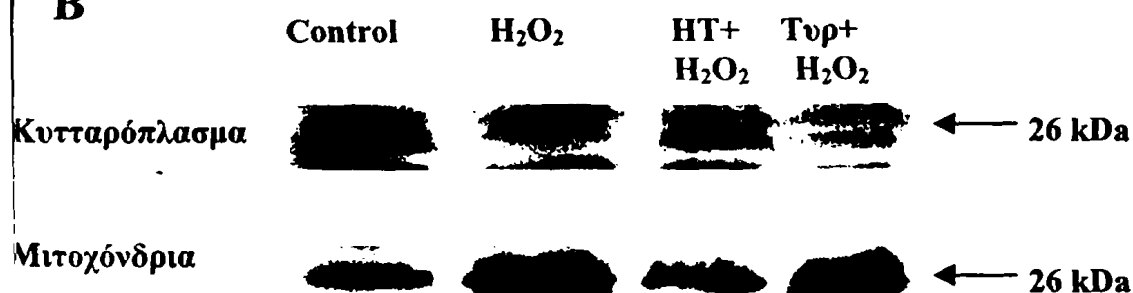
Σχήμα 34: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών παραγόντων *Bcl-2* και *Bcl-x1* από το H_2O_2 . Κύτταρα (1.5×10^6 ανά ml) προεπώσθησαν με 300 μM υδροξυτυροσόλης (HT) ή τυροσόλης (Tyr) για 30 λεπτά πριν την έκθεσή τους σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και αναλύθηκαν κατά Western με αντισώματα εναντίον *Bcl-2* (A, B και Γ) και *Bcl-x1* (Δ). (A) Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που επώσθησαν με 300 μM HT, διαδρομή 3: κύτταρα που επώσθησαν με 300 μM Tyr, διαδρομή 4: κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες, διαδρομή 5: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM HT πριν εκτεθούν σε H_2O_2 , διαδρομή 6: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM Tyr πριν εκτεθούν σε H_2O_2 . (B) Όπως στο A με τη διαφορά ότι η έκθεση σε H_2O_2 διαρκεί 12 ώρες αντί για 6. (Γ) Το κυταροπλασματικό και το μιτοχονδριακό κλάσμα ετοιμάστηκαν και αναλύθηκαν κατά Western όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στις διαδρομές 1-4 αποτυπώνεται το κυταροπλασματικό κλάσμα ενώ στις διαδρομές 5-8 αποτυπώνεται το μιτοχονδριακό κλάσμα. Διαδρομές 1, 5: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομές 2, 6: κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες, διαδρομές 3, 7: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM HT πριν την έκθεσή τους σε H_2O_2 , διαδρομές 4, 8: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM Tyr πριν την έκθεσή τους σε H_2O_2 . (Δ) Όπως στο (A) μόνο που χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης *Bcl-x1*. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν άλλες 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



A



B



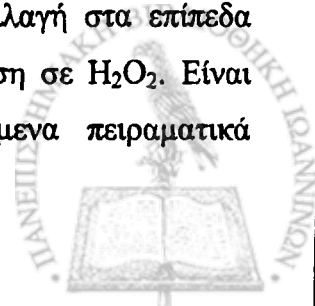
Σχήμα 35: Ο ρόλος της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών παραγόντων Bid και Bax από το H₂O₂. Κύτταρα προεπώσθησαν με 300 μM HT ή Tyr και στη συνέχεια αναλύθηκαν κατά Western με τα κατάλληλα αντισώματα εναντίον των πρωτεϊνών Bid και Bax. (A) Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες, διαδρομή 3: κύτταρα που εκτέθηκαν σε 0.5 μg/ml αντισώματος Fas για 6 ώρες, διαδρομή 4: κύτταρα που επώσθησαν με 300 μM HT, διαδρομή 5: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM HT πριν εκτεθούν σε H₂O₂, διαδρομή 6: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM HT πριν εκτεθούν σε anti-Fas, διαδρομή 7: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM Tyr πριν εκτεθούν σε H₂O₂, διαδρομή 8: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM Tyr πριν εκτεθούν σε anti-Fas. (B) Το κυτταροπλασματικό και το μιτοχονδριακό κλάσμα προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια. Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες, διαδρομή 3: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM HT πριν την έκθεσή τους σε H₂O₂, διαδρομή 4: κύτταρα που προεπώσθησαν με 300 μM Tyr πριν την έκθεσή τους σε H₂O₂. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν άλλες 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bax από το H_2O_2 , στο κυτταροπλασματικό και στο μιτοχονδριακό κλάσμα (Σχήμα 35B). Κύτταρα επώαστηκαν με 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες συλλέχθησαν με φυγοκέντρηση και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στο σχήμα 35B υπήρξε μια μείωση των επιπέδων έκφρασης στο κυτταροπλασματικό κλάσμα της πρωτεΐνης Bax ενώ παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων της στο μιτοχονδριακό κλάσμα σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Προεπάση των κυττάρων για 30 λεπτά με 300 μM υδροξυτυροσόλης και στη συνέχεια έκθεση τους σε H_2O_2 , οδηγεί σε αναστολή της μείωσης των επιπέδων της Bax που προκλήθηκε από το H_2O_2 στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ υπήρξε μία παράλληλη αναστολή της αύξησης τους στο μιτοχονδριακό κλάσμα (Σχήμα 35B). Η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν επηρέασε την ενεργοποίηση της Bax που προκλήθηκε από το H_2O_2 (Σχήμα 35B).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα, δείχνουν ότι :

1. το H_2O_2 φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xl στο σύστημα που μελετήθηκαν
2. το H_2O_2 φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bid ενώ παράλληλα η υδροξυτυροσόλη φαίνεται να αναστέλλει τη δράση του αντισώματος Fas, το οποίο ενεργοποιεί την πρωτεΐνη δημιουργώντας το σχασμένο κομμάτι tBid. Η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν παίζει κάποιο ρόλο στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bid.
3. η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax εμπλέκεται στο μονοπάτι της απόπτωσης που προκαλεί το H_2O_2 αφού τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται στα μιτοχόνδρια μετά από έκθεση κυττάρων σε αυτό με παράλληλη μείωση των επιπέδων της στο κυτταροδιάλυμα. Διαπιστώνεται ότι προεπάση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη αναστέλλει τη μεταφορά της πρωτεΐνης από το κυτταροδιάλυμα στα μιτοχόνδρια αναστέλλοντας έτσι και την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης μέσω των κασπασών.
4. τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν δεν επηρεάζονται από την επώαση των κυττάρων με τυροσόλη ενώ δεν αναστέλλει και την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του προαποπτωτικού παράγοντα Bax όταν ακολουθεί έκθεση σε H_2O_2 . Είναι εμφανές ότι η διαφορά στη δομή που τονίστηκε σε προηγούμενα πειραματικά

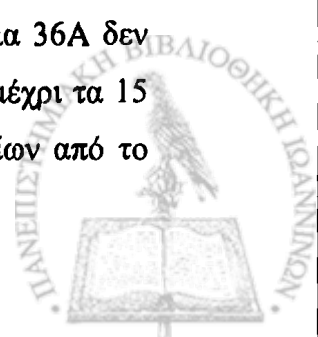


αποτελέσματα, η ύπαρξη δηλαδή της όρθο-διϋδροξυ δομής στην υδροξυτυροσόλη είναι αυτή που της δίνει την ικανότητα να προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 .

3.6.10 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στην προστασία της μεμβράνης των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 .

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει εξεταστεί ο ρόλος των λυσοσωματίων και έχει τονιστεί ο ρόλος του σιδήρου στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 (Doulias et al., 2003, Tenopoulou et al., 2005). Φαίνεται ότι ένα από τα αρχικά στάδια της απόπτωσης είναι η αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης. Επίσης έχει αναφερθεί ότι ενώσεις που διέρχονται τη λυσοσωμική μεμβράνη σε περίπτωση βλάβης της, όπως είναι οι καθεψίνες, ενεργοποιούν μόρια όπως τους προαποπτωτικούς παράγοντες Bax και Bid οδηγώντας έτσι τα κύτταρα σε απόπτωση (Bidere et al., 2003, Kagedal et al., 2005, Cirman et al., 2004). Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκαν οι επιπτώσεις που έχουν στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων η έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 . Η ακεραιότητα των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Εξετάστηκε η απελευθέρωση στο κυτταροδιάλυμα της φθορίζουσας χρωστικής acridine orange (A.O.) η οποία είχε προηγουμένως συσσωρευτεί στα λυσοσωμάτια. Έτσι τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα από 5 λεπτά μέχρι 1 ώρα. Παρατηρήθηκε μετατόπιση του A.O. από το λυσοσωμάτια στο κυτταροδιάλυμα όπως φαίνεται από την αύξηση του πράσινου φθορισμού. Όπως φαίνεται στο σχήμα 36A το H_2O_2 δρα στα λυσοσωμάτια πολύ γρήγορα αφού στα 5 λεπτά υπάρχει μια σημαντική αύξηση του πράσινου φθορισμού η οποία παραμένει σταθερή μέχρι τα 15 λεπτά. Από κει και πέρα, φαίνεται να ξεκινάει μια δεύτερη φάση καταστροφής της λυσοσωμικής μεμβράνης που συνεχίζεται μέχρι τη μια ώρα. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι η αρχική αποσταθεροποίηση, που προκαλείται από το H_2O_2 , φαίνεται να οδηγεί στην απελευθέρωση κάποιων στοιχείων των λυσοσωματίων στο κυτταρόπλασμα, τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν ακόμη μεγαλύτερη βλάβη στη λυσοσωμική μεμβράνη.

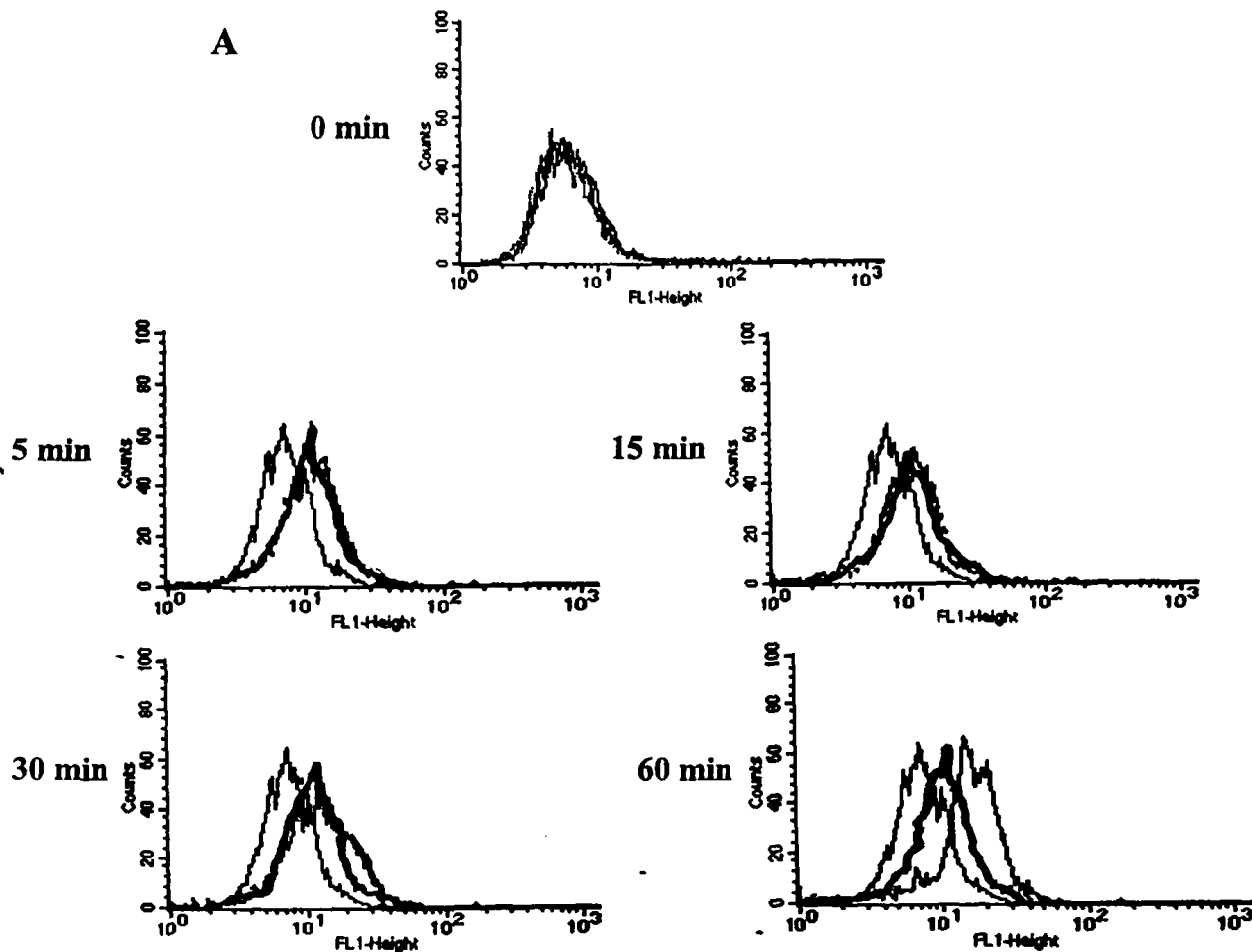
Προεπώαση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη όπως φαίνεται στο σχήμα 36A δεν αναστέλλει τη απελευθέρωση του A.O. από τα λυσοσωμάτια στα πρώτα 5 και μέχρι τα 15 λεπτά. Η δημιουργία όμως της δεύτερης φάσης καταστροφής των λυσοσωματίων από το



H₂O₂ σε χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα των 15 λεπτών, αναστέλλεται σχεδόν πλήρως από τη δράση της υδροξυτυροσόλης. Στο σχήμα 36B απεικονίζεται ποσοτικά η αύξηση του πράσινου φθορισμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες καθώς και η ανασταλτική δράση της υδροξυτυροσόλης απέναντι στη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στα λυσοσωμάτια. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν την ύπαρξη 2 φάσεων καταστροφής των λυσοσωματίων από το H₂O₂ (Zhao et al., 2000). Επίσης, οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Bcl-2, προστατεύουν τη δεύτερη φάση καταστροφής των λυσοσωματίων, με παρόμοιο τρόπο δηλαδή που δρα και η υδροξυτυροσόλη στα παραπάνω πειράματα. Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, ενώσεις που έχουν σιδηροδευσμειτικές ιδιότητες όπως η δεσφεριοξαμίνη, προστατεύει τη μεμβράνη των λυσοσωματίων από τη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η δράση της δεσφεριοξαμίνης οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο αποτρέποντας έτσι τη δημιουργία δραστικών ριζών •OH μέσω των αντιδράσεων τύπου Fenton (Doulias, 2004).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω παρατηρείται ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει τη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στις μεμβράνες των λυσοσωματίων. Η αναστολή αυτή είναι δόσο-εξαρτώμενη και χρόνο-εξαρτώμενη και φαίνεται να συμβαίνει μέσω της δέσμευσης του σιδήρου καθώς όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες η δομή της ένωσης αυτής ευνοεί τη δέσμευση σιδήρου στα κύτταρα (Andjelkovic et al., 2005, Khokhar, 2003).

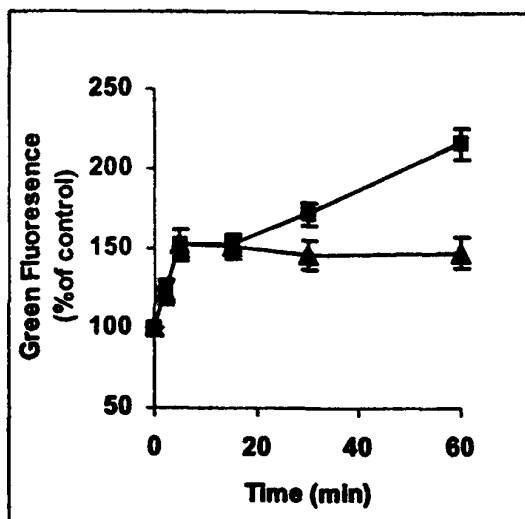




Σχήμα 36Α: Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση τους σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 cells/ml) προεπωάστηκαν με 0.1 $\mu\text{g/ml}$ acridine orange για 15 λεπτά και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό με 200 μM υδροξυτυροσόλης για 30 λεπτά πριν από την έκθεσή τους σε 250 μM H_2O_2 για αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ο φθορισμός του acridine orange στο πράσινο μετρήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACScan ενώ η καταγραφή και ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Cell Quest. Τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 5, 15, 30 και 60 λεπτά απεικονίζονται με τη μετατοπισμένη μαύρη γραμμή ενώ τα κύτταρα που προεπωάστηκαν με 200 μM υδροξυτυροσόλης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα με τη μαύρη έντονη γραμμή. Το πείραμα επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



B

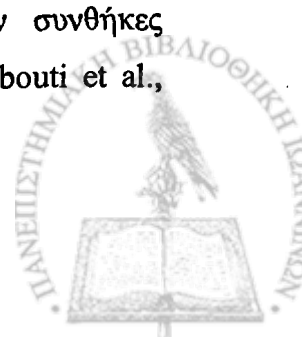


Σχήμα 36 Β: Διάγραμμα αναπαράστασης της επίδρασης της υδροξυτυροσόλης στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση τους σε H_2O_2 . Στο διάγραμμα αναπαρίσταται η αύξηση στον πράσινο φθορισμό σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες του σχήματος 36Α. Κύτταρα που εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 (■) και κύτταρα που προεπώαστηκαν με 200 μM υδροξυτυροσόλης πριν την έκθεσή τους σε H_2O_2 (▲). Η αύξηση στον πράσινο φθορισμό εκφράζεται ως ποσοστό % σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη της πρόκλησης βλαβών στο DNA κυττάρων από το H₂O₂

Το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ-2001, στο οποίο ανήκει και η παρούσα μελέτη είχε ως γενικό στόχο τη συστηματική μελέτη των Ελληνικών ποικιλιών ελιάς και ελαιόλαδου, σε ότι αφορά τη σύσταση και δράση των ενώσεων που εμπεριέχονται σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία εξετάζεται η ικανότητα εκχυλισμάτων ελαιόλαδων Ελληνικής προέλευσης, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις, που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂. Είναι γνωστό ότι η έκθεση κυττάρων σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες οδηγεί στην πρόκληση βλαβών σχεδόν σε όλα τα κυτταρικά συστατικά όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, το DNA κ.α. Το σύστημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής: Σε κύτταρα Jurkat (T-λευχαιμική σειρά) προστίθεται εξωγενώς H₂O₂ το οποίο έχει την ικανότητα να διαχέεται σχεδόν ελεύθερα διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών και να εισέρχεται γρήγορα στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκεί, μέσω των αντιδράσεων τύπου Fenton, οδηγεί στο σχηματισμό ·OH οι οποίες είναι πολύ δραστικές ρίζες και αντιδρούν με όλα σχεδόν τα βιολογικά μόρια, δημιουργώντας τους βλάβες. Οι ·OH αντιδρούν με τις βάσεις του DNA οδηγώντας στην οξειδωτική τους τροποποίηση ενώ όταν αντιδρούν με τη δεοξυριβόζη προκαλούνται σχάσεις στη μια αλυσίδα του DNA. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική η οποία αναπτύχθηκε ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια και είναι ικανή να καταγράψει τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA και ονομάζεται 'ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης' ή comet assay λόγω της δημιουργίας χαρακτηριστικών σχηματισμών που παρομοιάζονται με κομήτες (Panayotidis et al., 1999). Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης το οποίο είναι γνωστό ότι παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H₂O₂, αντί της εξωγενούς προσθήκης H₂O₂ στην καλλιέργεια, έτσι ώστε να υπάρξουν συνθήκες οξειδωτικού στρες που πιθανώς απαντώνται σε ζωντανούς οργανισμούς (Barbouti et al., 2002).



4.2 Δράσεις των εκχυλισμάτων του ελαιόλαδου

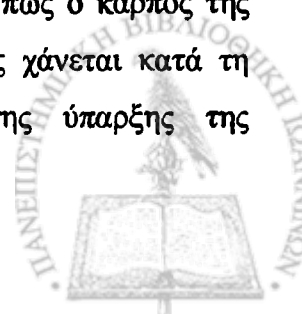
Έντονο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον παγκοσμίως αναφορικά με τα φυσικά συστατικά των τροφών, ιδιαίτερα φυτικής προέλευσης, τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων και βιολογικών διεργασιών. Ο εντοπισμός των δραστικών ουσιών που προκαλούν τα ευεργετικά αυτά αποτελέσματα, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους όμως δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Η ελιά και το ελαιόλαδο αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής και φαίνεται να παίζουν σπουδαίο ρόλο στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και από ορισμένες μορφές καρκίνου. Σήμερα υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις ιδιότητες και τις δυνατότητες χρήσης των πολυφαινολικών μορίων με αντιοξειδωτική δράση που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν εκχυλίσματα που προέρχονται από διαφορετικά τμήματα του δέντρου της ελιάς (φύλλα, καρπός) αλλά και του συστήματος παραγωγής του ελαιόλαδου (ελαιόλαδο, απόβλητα των μονάδων που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία παραγωγής), η αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων αλλά και η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των ενώσεων ξεχωριστά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα εκχυλίσματα του ελαιόλαδων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 . Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ως προς τη σύστασή τους δείχνοντας μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις των συστατικών που βρίσκονται σε αυτά. Ιδιαίτερα καλή προστασία έδειξε το δείγμα Τσουνάτη ενώ η περαιτέρω ανάλυσή του έδειξε πως εμπεριέχει υψηλή συγκέντρωση της φαινολικής ενώσεως υδροξυτυροσόλη. Φαίνεται η σύσταση των εκχυλισμάτων να παίζει σημαντικό ρόλο ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν τα κύτταρα.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν εκχυλίσματα από τα φύλλα της ελιάς, τον καρπό ελιάς, το ελαιόλαδο καθώς και από τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του. Τα εκχυλίσματα αυτά είχαν την ικανότητα να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 . Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν πως ο καρπός της ελιάς εμπεριέχει διάφορες ενώσεις που όμως ένα μεγάλο μέρος τους χάνεται κατά τη διαδικασία παραγωγής ώστε να καταστεί βρώσιμος εξαιτίας της ύπαρξης της



ολευρωπαϊνης, μιας πολυφαινόλης στην οποία οφείλεται η πικρή γεύση του. Είναι γνωστό πως μόνο 1-2% των αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν στον καρπό της ελιάς φτάνουν στο ελαιόλαδο (Owen et al, 2003). Επίσης ανεκμετάλλευτος παραμένει ο μεγάλος όγκος των φύλλων της ελιάς και χαρακτηρίζεται ως 'απόβλητο' παρόλο που εμπεριέχει μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκοσιδίου της ελευρωπαϊνης (Le Tutour, 1992). Τα φύλλα της ελιάς φαίνεται να αποτελούν μια πολύ φθηνή πρώτη ύλη για την απομόνωση και χρησιμοποίηση ενώσεων για φαρμακευτικούς σκοπούς σύμφωνα με τις ιδιότητες που φαίνεται να παρουσιάζουν.

Επίσης ένα εύλογο ερώτημα που προκύπτει από την προστατευτική δράση του εκχυλίσματος που προέρχεται από τα απόνερα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου, είναι ότι η σύγχρονη τεχνολογία παράγει μεν μεγαλύτερες ποσότητες τελικού προϊόντος, αφαιρώντας όμως ένα μεγάλο μέρος των βιολογικών ιδιοτήτων του ελαιόλαδου. Η απομόνωση και η χρησιμοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών από αυτή τη διαδικασία θα έχει διπλή σημασία καθώς περιορίζεται έτσι η ρύπανση του περιβάλλοντος (Moure et al, 2001) αλλά και χρησιμοποιούνται φυσικές ενώσεις για την προστασία της υγείας.

Το επόμενο βήμα ήταν να προσδιοριστούν τα μόρια αυτά που ήταν υπεύθυνα για τις κυτταροπροστατευτικές δράσεις των διαφόρων εκχυλισμάτων αλλά και να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα μόρια αυτά δρουν. Η ύπαρξη μεγάλων συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων στα προστατευτικά εκχυλίσματα μας οδήγησε στη μελέτη των φαινολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο.



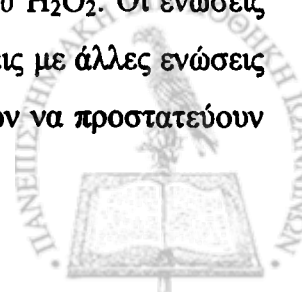
4.3 Φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου

4.3.1 Προστατευτική δράση απομονωμένων ενώσεων του ελαιόλαδου

Μελετήθηκαν ενώσεις που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο, ταυτοποιήθηκαν και εξετάστηκε η ικανότητά τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 . Οι ενώσεις που απομονώθηκαν ανήκαν σε διάφορες κατηγορίες όπως φλαβονοειδή, σκεοϊροειδή φαινολικές ενώσεις, λιγκστροειδή. Εξετάστηκαν ξεχωριστά ένα προς ένα και έγινε σύγκριση των δομών τους με την προστατευτική τους ικανότητα. Η εξέταση των φλαβονοειδών μας έδειξε ότι απαραίτητη για την προστασία είναι η ύπαρξη της ορθο-διωδρόξυ δομής στο δακτύλιο Α ή Β των ενώσεων (Σχήμα 15). Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε από τη μελέτη της κας Μελίδου στα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται στο μέλι ενώ επιπλέον βρέθηκε ότι η παρουσία του Γ2-Γ3 διπλού δεσμού στο δακτύλιο Γ και η ύπαρξη της 3-υδροξυλομάδας στο δακτύλιο Γ σε συνδυασμό με την 4-οξο θέση ενισχύουν την προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών (Melidou et al., 2005). Η εξέταση των τριών φαινολικών ενώσεων μας έδειξε ότι η ύπαρξη της ορθο-διωδρόξυ δομής στο φαινολικό δακτύλιο είναι απαραίτητη για την προστασία ενώ η ύπαρξη διπλού δεσμού και καρβοξυλικής ομάδας στην επιμηκυσμένη αλυσίδα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του IC_{50} των ενώσεων (IC_{50} καφεϊκού οξέος 2 mM, IC_{50} υδροξυτυροσόλης 100μM) (Πίνακας 3).

4.3.2 Προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου

Παρόλο που οι προστατευτικές δράσεις του ελαιόλαδου είναι πιθανό να οφείλονται σε συνδυασμό διαφόρων συνδυασμών διατροφής αλλά και συστατικών που εμπεριέχονται σε αυτό, υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τη δράση ενός συγκεκριμένου μέρους του ελαιόλαδου: του φαινολικού κλάσματος. Στο φαινολικό κλάσμα εμπεριέχονται σύμφωνα με μελέτες ενώσεις που παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Έτσι στη συνέχεια εξετάστηκαν ενώσεις που εμπεριέχονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο φαινολικό κλάσμα ως προς τη δράση τους απέναντι στη δράση του H_2O_2 . Οι ενώσεις αγοράστηκαν από το εμπόριο έτσι ώστε να μην εμπεριέχονται προσμίξεις με άλλες ενώσεις αγνώστου ταυτότητας. Συγκρίνοντας την ικανότητα των ενώσεων αυτών να προστατεύουν



το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 σε σχέση με τη δομή τους, παρατηρείται ότι η ύπαρξη της ορθοδιυδροξυ δομής και ιδιαίτερα η 3,4 θέση στο φαινολικό δακτύλιο κρίνεται απαραίτητη για την προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων.

Έτσι εξετάζοντας προσεκτικά τη δομή των ενώσεων παρατηρείται ότι οι ενώσεις που έχουν τα υδροξύλια σε όρθο- θέση μεταξύ τους στο φαινολικό δακτύλιο έχουν την ικανότητα να προστατεύουν το DNA των κυττάρων (γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχουικό οξύ, καφεϊκό οξύ, υδροξυτυροσόλη). Η μεθυλίωση ή η έλλειψη ενός ή και των 2 υδροξυλίων οδηγεί στην απώλεια της ικανότητας των ενώσεων να προστατεύουν το κυτταρικό DNA.

4.3.3 Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων

Η επικρατούσα αντίληψη για την προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου έδειχνε ως κύριο σημείο την αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αυτών (Owen et al., 2000, Owen et al., 2003, Rice-Evans et al., 1996 Visioli et al., 1998, Visioli et al., 2004, Vissers et al., 2004). Έτσι επόμενο βήμα της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της δράσης των φαινολικών ενώσεων στην εκκαθάριση ελευθέρων ριζών και η πιθανή συσχέτιση της ιδιότητας αυτής με την προστασία του DNA των κυττάρων από το H_2O_2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν μπορεί να αποδοθεί κάποια συσχέτιση στην ικανότητα να προστατεύουν το DNA των κυττάρων, με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα στο σύστημα που μελετάμε. Πρέπει εδώ να σημειωθεί, πως ενώ η προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων υπολογίστηκε ενδοκυττάρια, η ικανότητα τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες αξιολογήθηκε απουσία κυττάρων. Για το λόγο αυτό στην προσπάθεια συσχέτισης τους θα έπρεπε να συμπεριληφθεί και άλλος ένας παράγοντας, η ικανότητα των ενώσεων να διαχέονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

Τα πειράματα αυτά έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου καθώς και άλλα μόρια τα οποία θεωρούνται κλασικές αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως είναι η βιταμίνη E, η N-ακέτυλο-κυστεΐνη το ασκορβικό οξύ κ.α. δεν μπόρεσαν να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 (Doulias et al., 2003). Έτσι το επόμενο βήμα ήταν να εξακριβώσουμε ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης των φαινολικών ενώσεων αφού η ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες φαίνεται να μην είναι η ιδιότητα που καθιστά τις ενώσεις ικανές να προστατεύουν το κυτταρικό DNA.



4.4 Ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει σίδηρο

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων που βρίσκονται στον αρωματικό δακτύλιο καθώς και τη θέση που βρίσκονται μεταξύ τους οι υδροξυλικοί υποκαταστάτες (Masella et al., 1999, Rice-Evans et al., 1996, Sanchez-Moreno et al., 1998). Η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα αποδόθηκε σε ενώσεις που τα υδροξύλια του φαινολικού δακτυλίου βρίσκονται σε όρθο-θέση μεταξύ τους (Rice-Evans et al., 1996). Μια δεύτερη ιδιότητα όμως των φαινολικών ενώσεων είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν σίδηρο. Όπως αναφέρθηκε τα μέταλλα μετάπτωσης όπως ο σίδηρος και ο χαλκός παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς. Είναι πιθανό η ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν σίδηρο να οδηγεί στην προστασία του κυτταρικού DNA απέναντι στη δράση του H_2O_2 στο σύστημά μας.

Το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών ενώσεων επικεντρώνεται σε μελέτες που έχουν γίνει στα φλαβονοειδή. Λίγες μελέτες εξετάζουν τη μεταλλο-δεσμευτική ικανότητα των απλών φαινολικών μορίων (Garcia-Alonso et al., 2006, Garcia-Alonso et al., 2007, Hider et al., 2001, Iwahashi et al., 2000, Rice-Evans et al., 1996) ενώ αυτή η ικανότητα φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία της ορθο-διυδροξύ ομάδας στο φαινολικό δακτύλιο (Khokhar and Arpenten, 2003, Moran et al., 1997), η σημασία όμως της εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών και της ικανότητας των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν μέταλλα, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητά (Sugihara et al., 2001). Για το σκοπό αυτό στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν σίδηρο, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης. Οι ενώσεις αυτές επιλέχθηκαν καθώς έχουν σχεδόν ίδια δομή με μόνη διαφορά ότι η τυροσόλη υπολείπεται ένα υδροξύλιο στο φαινολικό δακτύλιο. Η υδροξυτυροσόλη έχει τους υδροξυλικούς υποκαταστάτες σε όρθο-θέση μεταξύ τους και προστατεύει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 σε αντίθεση με την τυροσόλη. Έτσι εξετάζοντας τη δράση των δύο ενώσεων αναφορικά με το σίδηρο στα κύτταρα, παρατηρείται μια βαθμιαία μείωση της προστασίας από την υδροξυτυροσόλη όταν η ποσότητα του σιδήρου στο σύμπλοκο σιδήρου:υδροξυτυροσόλης αυξανόταν. Είναι πιθανό ο κορεσμός της ενώσεως με σίδηρο να αφαιρεί την προστατευτική της ικανότητα απέναντι στη δράση του H_2O_2 στα κύτταρα.



Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η ικανότητα των ενώσεων αυτών να δεσμεύουν σίδηρο ενδοκυττάρια, στις ίδιες συνθήκες δηλαδή με αυτές που παρατηρήθηκε προστασία ενάντια στις βλάβες του DNA. Οι μέχρι σήμερα μελέτες αναφέρονται στην ικανότητα φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν σίδηρο σε κατάσταση *in vitro*, ενώ η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την ικανότητα των ενώσεων να δεσμεύουν το σίδηρο ενδοκυττάρια. Με τη μέθοδο αυτή φάνηκε ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο σίδηρο ενώ η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν μπόρεσε να δεσμεύσει το σίδηρο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα εξής: την παρουσία της όρθο-διϋδρόξυ δομής μόνο στο δακτύλιο της υδροξυτυροσόλης, την ικανότητα μόνο της υδροξυτυροσόλης να προστατεύει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 την ικανότητά της να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο και τη χαμηλή αντιοξειδωτική της ικανότητα σε αντίθεση με την τυροσόλη (TEAC=1,88 και 2,64 αντίστοιχα), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η σιδηροδεσμευτική ικανότητα είναι αυτή που οδηγεί στην προστατευτική δράση ενάντια στις βλάβες του DNA.

4.5 Τοξική δράση των φαινολικών ενώσεων

Παρατηρώντας προσεκτικά τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας διαπιστώνεται ότι κάποιες από τις ενώσεις ή τα εκχυλίσματα του ελαιόλαδου που εξετάστηκαν, παρουσιάζουν τοξική δράση εναντίον των κυττάρων, προκαλούν δηλαδή βλάβη στο DNA χωρίς την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα. Έντονο είναι το ενδιαφέρον στη βιβλιογραφία αναφορικά με την τοξική δράση των ενώσεων αυτών χωρίς όμως ο μηχανισμός δράσης να έχει πλήρως εξακριβωθεί (Fabiani et al., 2006, Guichard et al., 2006, Della Ragione et al., 2002, Yi et al., 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δεν είναι αρκετά για να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα ως προς το μηχανισμό δράσης της τοξικότητας των ενώσεων. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης τοξικότητας των φαινολικών ενώσεων.



4.6 Ο ρόλος των φαινολικών ενώσεων στην απόπτωση

4.6.1 Υδροξυτυροσόλη και απόπτωση

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία αναγκαία για την ανάπτυξη των οργάνων, την ομοιοστάση των ιστών και την απομάκρυνση των ελαττωματικών ή πιθανώς βλαβερών κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Από την άλλη είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης στα κύτταρα. Έτσι, αφού παραπάνω είδαμε ότι κάποιες από τις φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 στη συνέχεια η μελέτη επεκτάθηκε στους μηχανισμούς δράσης των φαινολικών ενώσεων στα μονοπάτια της απόπτωσης. Για να πραγματοποιηθεί αυτό επιλέχθηκαν δυο φαινολικές ενώσεις με παρόμοια δομή η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη. Η υδροξυτυροσόλη φαίνεται να προστατεύει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 καθώς και να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Από την άλλη, η τυροσόλη έχει παρόμοια δομή με αυτή της υδροξυτυροσόλης με τη διαφορά ότι απουσιάζει η όρθο-διϋδρόξυ δομή από το φαινολικό δακτύλιο. Η ένωση αυτή δεν μπόρεσε να προστατεύσει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 ενώ παράλληλα δεν είχε την ικανότητα να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο σίδηρο κάτι που όπως φάνηκε οφείλεται στη δομική διαφορά των δυο αυτών ενώσεων.

Προεπάση των κυττάρων Jurkat με συγκεντρώσεις από 50 έως 500 μM υδροξυτυροσόλης πριν από την επώαση με H_2O_2 οδήγησε στην αναστολή της απόπτωσης. Στις ίδιες συγκεντρώσεις η τυροσόλη δεν μπόρεσε να προστατεύσει τα κύτταρα από τη δράση του H_2O_2 (Σχήματα 26-28). Είναι φανερό πως η δομική διαφορά των δυο ενώσεων (ύπαρξη όρθο- διϋδρόξυ δομής στο φαινολικό δακτύλιο της υδροξυτυροσόλης) επιδρά στην ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 . Η δομή αυτή όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου αφού η υδροξυτυροσόλη μπορεί να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο σίδηρο σε αντίθεση με το δομικό της ανάλογο, την τυροσόλη. Είναι πιθανό η υδροξυτυροσόλη να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση μέσω της δέσμευσης σιδήρου.

Η απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 μελετήθηκε αρχικά με την εξέταση της μορφολογίας των πυρήνων των κυττάρων όπου η υδροξυτυροσόλη ανέστειλε τη δημιουργία



συμπυκνωμένων και κατακερματισμένων πυρήνων που προκαλεί η δράση του H_2O_2 . Στις ίδιες συνθήκες η τυροσόλη δεν μπόρεσε να αναστείλει τη δράση του H_2O_2 . Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα βήματα της απόπτωσης ένα προς ένα για να εξακριβωθεί το ακριβές σημείο της προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης. Έτσι η υδροξυτυροσόλη φαίνεται να αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και τη δημιουργία του αποπτωσώματος που προκαλούνται από τη δράση του H_2O_2 ενώ η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν μπόρεσε να αναστείλει την ενεργοποίηση των παραπάνω παραγόντων. Ένα πρώτο συμπέρασμα από τα πειράματα αυτά είναι ότι η υδροξυτυροσόλη προστατεύοντας τα μιτοχόνδρια τα οποία όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε H_2O_2 είναι γνωστό ότι απελευθερώνουν μόρια τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης, αναστέλλει την ενεργοποίηση του 'καταρράκτη' των κασπασών.

Έτσι, στη συνέχεια το ενδιαφέρον της μελέτης επικεντρώθηκε στην οικογένεια των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2. Τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης χωρίς όμως να έχουν πλήρως εξακριβωθεί οι μηχανισμοί δράσης (Borner, C. 2003, Cory et al., 2003). Στην οικογένεια Bcl-2 εμπεριέχονται πρωτεΐνες με προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες. Από τις πιο γνωστές αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες είναι η Bcl-2 και η Bcl-xl πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και προσδένονται εκεί με το υδρόφοβο καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι πρωτεΐνες αυτές ετεροδιμερίζονται με τα προαποπτωτικά μέλη με αποτέλεσμα να αναστέλλονται τα μιτοχονδριακά γεγονότα της απόπτωσης (Sattler et al., 1997). Από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες οι πιο γνωστές είναι οι πρωτεΐνες Bax (Bcl associated X protein) και Bak. Το Bax, φυσιολογικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ή προσδεμένο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Hsu et al., 1997). Κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας το Bax ενεργοποιείται με αποτέλεσμα να μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και ολιγομερίζεται (Hsu et al., 1997, Wolter et al., 1997). Στη συνέχεια εξετάστηκε η δράση του H_2O_2 αλλά και η επίδραση της υδροξυτυροσόλης στα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2. Παρατηρήθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με H_2O_2 για 6 ώρες δεν επηρέασε την έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xl. Αντιθέτως η πρωτεΐνη Bax στις ίδιες συνθήκες μετατόπιστηκε από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια (Σχήμα 35). Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα όπου η μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στη μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγεί στο σχηματισμό πόρων



ή στην τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων μιτοχονδριακών καναλιών (Antonsson et al., 1997, Eskes et al., 1998, Nechushtan et al., 2001, Narita et al., 1998), έτσι ώστε να απελευθερωθούν παράγοντες όπως είναι το κυτόχρωμα c ή ο AIF που είναι απαραίτητοι για τη συνέχιση της απόπτωσης που προκαλείται από το H_2O_2 . Η θεωρία που φαίνεται να ισχύει για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bax είναι αυτή στην οποία εμπλέκεται η MAP κινάση JNK (Lei et al., 2002). Είναι πιθανό να φωσφορυλιώνονται οι πρωτεΐνες 14-3-3 οι οποίες φυσιολογικά δένονται και κρατούν το Bax στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή του (Nomura et al., 2003, Tsuruta et al., 2004). Η προεπάση των κυττάρων με 300 μM υδροξυτυροσόλης για μισή ώρα πριν από την έκθεσή τους σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες οδήγησε στην αναστολή της μετατόπισης της πρωτεΐνης Bax ενώ στις ίδιες συνθήκες η τυροσόλη δεν μπόρεσε να αναστείλει την ενεργοποίηση αυτή. Είναι πιθανό η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει σίδηρο να οδηγεί στην αναστολή της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bax.

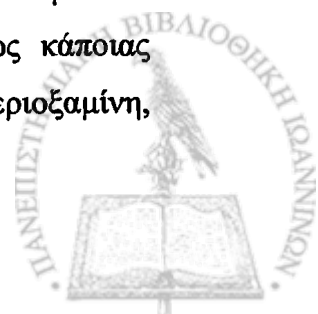
Παράλληλα εξετάστηκε η δράση του H_2O_2 στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bid. Η πρωτεΐνη Bid ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ενώ μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όταν ενεργοποιηθεί από την κασπάση-8, μετά από τη δράση κάποιου αποπτωτικού ερεθίσματος (Fas, TNF- α). Στο παρόν σύστημα μελέτης το H_2O_2 φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bid ενώ η προεπάση των κυττάρων με το αντίσωμα Fas οδήγησε στο χαρακτηριστικό σχάσιμο της Bid με τη δημιουργία ενός πολυπεπτιδικού κομματιού, του p15 (15 kDa, tbid), το οποίο μετακινείται στα μιτοχόνδρια και είναι απαραίτητο για την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το αντίσωμα Fas είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την κασπάση -8 η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bid (Honglin et al., 1998). Στον 'καταρράκτη' των κασπασών, μετά από κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, η κασπάση -6 σχάζει την κασπάση -8 ενισχύοντας έτσι την απόπτωση μέσω των μιτοχονδρίων. Προεπάση των κυττάρων όμως με 300 μM υδροξυτυροσόλης πριν την επάση με το αντίσωμα Fas οδήγησε στην αναστολή της σχάσης της Bid ενώ η τυροσόλη στις ίδιες συνθήκες δεν μπόρεσε να την αναστείλει. Φαίνεται η υδροξυτυροσόλη να αναστέλλει την απόπτωση του μονοπατιού του Fas, τα αποτελέσματα όμως της παρούσης μελέτης δεν είναι αρκετά για να εξακριβωθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης.



4.6.2 Προστατευτική δράση της υδροξυτυροσόλης στα λυσοσωμάτια

Έντονο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον τελευταία σχετικά με το ρόλο των λυσοσωματίων στην απόπτωση. Τα λυσοσωμάτια είναι οργανίδια πλούσια σε σίδηρο καθώς σε αυτά κατακερματίζονται πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο αλλά και ολόκληρα οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια (Schafer et al., 2000, Yu et al., 2003, Person et al., 2003, Kurz et al., 2007). Έχουν προταθεί διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των λυσοσωματίων στην απόπτωση. Ο κυριότερος τρόπος είναι εκείνος που προτείνει την αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης και στη συνέχεια την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα κάποιων ενζύμων με κυριότερα ένζυμα τις καθεψίνες. Οι καθεψίνες έχουν προταθεί ότι δρουν σε διάφορους κυτταροπλασματικούς παράγοντες όπως είναι οι πρωτεΐνες Bid και Bax (Stoka et al., 2001, Reiners et al., 2002, Bidere et al., 2003) ή μπορούν να δράσουν απευθείας στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ως το σημείο αναφοράς σχεδόν όλων των αποπτωτικών μονοπατιών, αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των δρόμων αυτών και ιδιαίτερα τα βήματα πριν από τα μιτοχόνδρια δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η λυσοσωμική μεμβράνη αρχίζει να αποσταθεροποιείται από τα 5 πρώτα κίβλας λεπτά επώασης με H_2O_2 (Σχήμα 36). Η προεπώαση των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη οδήγησε στην αναστολή της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης ενώ το δομικό της ανάλογο η τυροσόλη δεν μπόρεσε να προστατεύσει τα λυσοσωμάτια από τη δράση του H_2O_2 . Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και από άλλες πειραματικές μελέτες του εργαστηρίου που δείχνουν πως το μόριο που απελευθερώνεται από τα λυσοσωμάτια και ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης φαίνεται να είναι ο σίδηρος (Doulias et al., 2003, Tenopoulou et al., 2005). Ο σίδηρος των λυσοσωματίων φαίνεται να αντιδρά με το H_2O_2 μέσω των αντιδράσεων τύπου Fenton με αποτέλεσμα το σχηματισμό $\cdot OH$ οι οποίες ως γνωστό είναι πολύ δραστικές και αντιδρούν με διάφορα κυτταρικά μόρια προκαλώντας βλάβες οι οποίες είναι πιθανό είτε να οδηγούν στην ενεργοποίηση του Bax ή μπορεί να αντιδρούν απευθείας στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων δημιουργώντας έτσι προϋποθέσεις για την απελευθέρωση των μιτοχονδριακών παραγόντων που οδηγούν στην απόπτωση. Η ύπαρξη όμως κάποιας σιδηροδεσμευτικής ένωσης όπως είναι η υδροξυτυροσόλη ή η δεσφεριόξαμίνη,

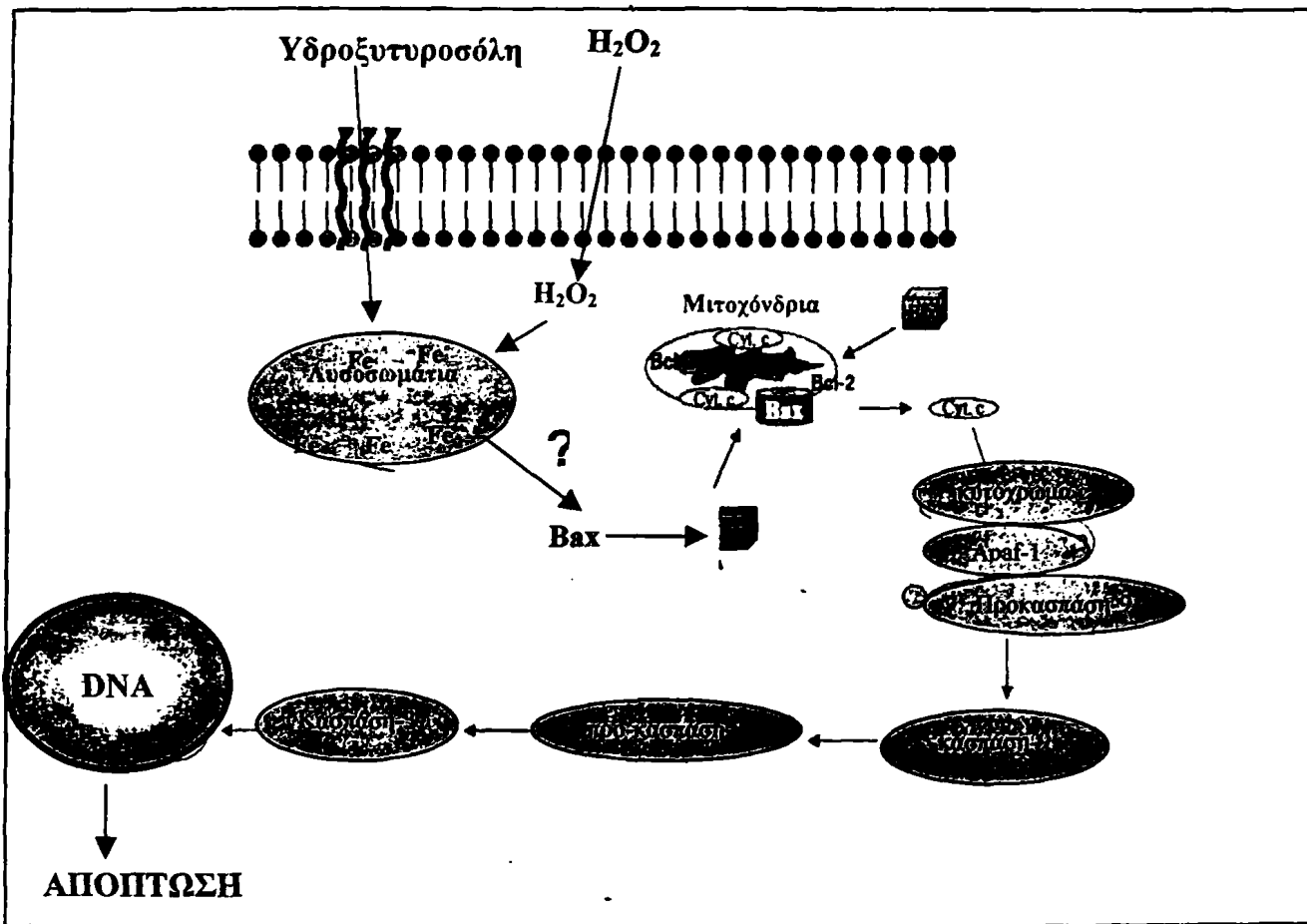


αναστέλλουν την αποσταθεροποίηση των λυσοσωματίων πιθανώς μέσω της δέσμευσης των ιόντων σιδήρου. Έτσι δε δημιουργούνται ρίζες υδροξυλίου και αναστέλλεται η απόπτωση. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα του δομικού αναλόγου της υδροξυτυροσόλης, την τυροσόλη, η οποία δεν είχε την ικανότητα να δεσμεύσει ιόντα σιδήρου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προστατεύσει τα λυσοσωμάτια από τη δράση του H_2O_2 .

4.7 Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της υδροξυτυροσόλης

Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας δείχνουν πως η υδροξυτυροσόλη προστατεύει το κυτταρικό DNA και από την απόπτωση που προκαλεί η δράση του H_2O_2 . Η προστασία αυτή φαίνεται να οφείλεται στη δομή της που της δίνει την ικανότητα να δεσμεύει σίδηρο καθώς το δομικό της ανάλογο η τυροσόλη δεν είναι σιδηροδεσμευτική ένωση και δεν παρέχει κάποια προστασία. Έτσι η υδροξυτυροσόλη προστατεύει τα μιτοχόνδρια αναστέλλοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο 'καταρράκτης' των κασπασών. Η δράση της υδροξυτυροσόλης όμως επικεντρώνεται πιο ψηλά στο μονοπάτι της απόπτωσης καθώς αναστέλλει την μετατόπιση του προαποπτωτικού Bax στα μιτοχόνδρια. Στην προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bax, η έρευνα επικεντρώθηκε στα λυσοσωμάτια που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Η υδροξυτυροσόλη προστατεύει τη λυσοσωμική μεμβράνη από τη δράση του H_2O_2 ενώ η προστασία αυτή φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσης του σιδήρου των λυσοσωματίων καθώς η τυροσόλη δεν προστατεύει στις ίδιες συνθήκες αφού δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο σίδηρο (Σχήμα 37). Είναι απαραίτητο όμως να γίνουν επιπλέον μελέτες έτσι ώστε να γίνει πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο δρα η υδροξυτυροσόλη στην απόπτωση καθώς και να προσδιοριστεί ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Bax από τα λυσοσωμάτια.





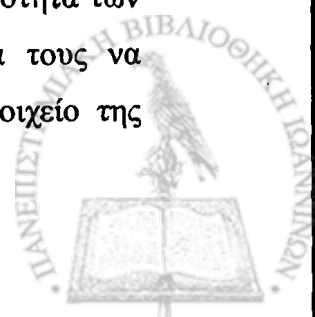
Σχήμα 37: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης στην απόπτωση.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη της δράσης των φαινολικών ενώσεων του ελαιόλαδου στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο DNA και απόπτωσης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2

Είναι γνωστό από την αρχαιότητα και έχει επιβεβαιωθεί από σύγχρονες επιδημιολογικές μελέτες, ότι οι διατροφικές συνήθειες μπορούν να επηρεάσουν την υγεία και την φυσική κατάσταση του οργανισμού. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στην Μεσογειακή διατροφή, για την οποία οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν εντυπωσιακές διαφορές μείωσης ορισμένων παθήσεων. Ο εντοπισμός των δραστικών ουσιών που προκαλούν τα βιολογικά αυτά αποτελέσματα, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Το ελαιόλαδο αποτελεί μείζον συστατικό της Μεσογειακής διαίτας και στα συστατικά του αποδίδονται και πλήθος από ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες. Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την εξέταση ελαιόλαδων από διάφορες περιοχές της Ελληνικής περιφέρειας, αλλά και εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φύλλα ελιάς, τον ελαιόκαρπο, το ελαιόλαδο και τα απόβλητα της διαδικασίας παραγωγής του ελαιόλαδου, ως προς την ικανότητά τους να προστατεύσουν το DNA κυττάρων που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες. Η έρευνα όμως δεν περιορίστηκε εκεί. Τα πιο δραστικά εκχυλίσματα επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν, παρουσιάζοντας μια σύνθεση πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Τα συστατικά αυτά απομονώθηκαν και εξετάστηκαν ξεχωριστά ως προς τη δράση τους απέναντι στο οξειδωτικό στρες.

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν είχαν μικρές δομικές διαφορές και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA κυττάρων Jurkat (ανθρώπινη λεμφοκυτταρική σειρά), τα οποία εκτίθενται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 , προερχόμενου από τη δράση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Παράλληλα οι ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες καθώς και να δεσμεύουν ενδοκυττάριο σίδηρο. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα των ενώσεων να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες δε συνδέεται με την ικανότητά τους να προστατεύουν τα κύτταρα από την δράση του H_2O_2 . Το σημαντικό όμως στοιχείο της



μελέτης ήταν ότι βρέθηκαν ενώσεις με συγκεκριμένη δομή που μπορούσαν να δεσμεύσουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο προστατεύοντας παράλληλα και το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 .

Στη συνέχεια η έρευνα επεκτάθηκε και εξετάστηκε η δράση 2 φαινολικών ενώσεων, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης ως προς την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Οι δυο ενώσεις είχαν παρόμοια δομή, η υδροξυτυροσόλη όμως προστάτευε το κυτταρικό DNA και είχε την ικανότητα να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, αντίθετα με την τυροσόλη. Έτσι, η υδροξυτυροσόλη προστάτευσε τα κύτταρα από την απόπτωση σε αντίθεση με την τυροσόλη η οποία δεν είχε καμία δράση. Για να διαπιστωθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης, εξετάστηκαν αναλυτικά τα βήματα της απόπτωσης, όπου φάνηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης να εστιάζεται στην αναστολή της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης. Στα λυσοσωμάτια είναι γνωστό ότι υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου. Η προστασία των λυσοσωματίων είναι πιθανώς το κλειδί για την προστασία από την απόπτωση καθώς στη συνέχεια αναστέλλεται η μετατόπιση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια. Ο ακριβής μηχανισμός της ενεργοποίησης του Bax μέσω της λυσοσωμικής βλάβης παραμένει ακόμη άγνωστος.

Ο τρόπος δράσης των ενώσεων που εξετάστηκαν στο σύστημά μας φαίνεται να εξαρτάται από την ικανότητά τους να δεσμεύουν ενδοκυττάριο σίδηρο. Περαιτέρω έρευνα όμως είναι απαραίτητη για να εξεταστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρουν και προστατεύουν το κυτταρικό DNA, ενώσεις σαν και αυτές που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.



6. SUMMARY

The role of phenolic compounds of olive oil in the molecular mechanisms of hydrogen peroxide induced DNA damage and apoptosis

It is known from ancient years and it has been proven from new epidemiological studies, that the dietary habits are possible to affect health and the physical state of an organism. More specific, Mediterranean diet has shown an impressive decrease at the rates of several diseases. Olive oil is one of the major constituents of the Mediterranean diet and it is plausible to believe that uptake of compounds through consumption of olive oil may provide resistance toward oxidative stress, which is regarded as major contributor to the development of several diseases. In the present study, the ability of olive oils from different parts of Greece and extracts from olive leaves, olives, olive oil and waste waters to protect cellular DNA against H_2O_2 -induced damage was evaluated. Besides that, the most active compounds among them were further investigated, especially phenolic acids.

The phenolic compounds studied, had very small structural differences and were examined for their ability to protect DNA of Jurkat cells that are exposed to increasing concentrations of H_2O_2 through the enzyme glucose oxidase. Also they were evaluated for their ability to scavenge free radicals and to chelate intracellular iron. The results showed that the ability of the phenolic acids to protect cellular DNA against H_2O_2 induced damage can not be correlated with their ability to scavenge free radicals. On the other hand, the impressive point was that the ability of phenolic acids to chelate iron and their protective ability was excellent correlated.

The next step was to examine the effects of two selected phenolic acids: hydroxytyrosol and tyrosol, against H_2O_2 -induced apoptosis. The selected phenolics had similar structure but hydroxytyrosol was able to protect cellular DNA and to chelate iron while tyrosol could not. Thus, it was shown that hydroxytyrosol could protect against H_2O_2 -induced apoptosis while tyrosol couldn't. In order to examine the exact mechanism of action, the steps of apoptosis were thoroughly examined. It was revealed that the action of



hydroxytyrosol is focused on the protection of lysosomes. It is known that in lysosomes are found high concentrations of iron. By protecting lysosomes hydroxytyrosol does not allow the translocation of the proapoptotic protein Bax from cytosol to mitochondria, a step that leads to apoptosis. Probably the protection of lysosomes through iron chelation is the key to the protective action of hydroxytyrosol against apoptosis.

The mode of action of the phenolic compounds that were examined, seem to depend on their ability to chelate intracellular redox-active iron. The mechanism is still not clear and further experiments are needed to obtain an insight into the exact molecular mechanism.



7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams J.M.; Cory. S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* **281**: 1322–1326.

Adler, V.; Yin, Z.; Tew, K. D.; Ronai, Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**: 6104–611.

Aeschbach, R.; Loliger, J.; Scott, B.C.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B.; Aruoma, O.I. (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food. Chem. Toxicol.*, **32**: 31-36.

Acker, F.; Hageman, J.; Haenen, G.; Vijgh, W.; Bast, A.; Menge, W. (2000) Synthesis of Novel 3,7-substituted-2-(3',4'-dihydroxyphenyl) flavones with improved antioxidant activity. *J. Med. Chem.*, **43**: 3752-3760.

Agalias, A.; Maniatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Mikros, E.; Tzarbopoulos, A.; Gikas, E.; Spanos, I.; Manios, T. (2007) A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.*, **55**: 2671-2676.

Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**: 1256-1264.

Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 7915-22.

Andjelkovic, M.; Van Camp, J.; De Meulenaer, B.; Depaemelaere, G.; Socaciu, C.; Verloo, M.; Verhe R. (2005) Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem., In press*



Andreadou, I.; Iliodromitis, K.; Mikros, E.; Constantinou M.; Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Kremastinos, Th. D. (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.*, **136**: 2213-2219.

Antonsson, B.; Conti, F.; Ciavatta, A.; Montessuit, S.; Lewis, S.; Martinou, I.; Bernasconi, L.; Bernard, A.; Mermod, J.J.; Mazzei, G. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, **277**: 370-372.

Antonsson, B.; Montessuit, S.; Lauper, S.; Eskes, R.; Martinou, J.C. (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, **345**: 271-278.

Antonsson, B.; Martinou, J.C. (2000) The Bcl-2 protein family, *Exp. Cell Res.*, **256**: 50-57.

Antonsson, B. (2004) Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.*, **256**: 141-155.

Aoki, H.; Kaongi, P.M.; Hampe, J.; Yoshimura, K.; Noma, T.; Matsuzaki, M.; Izumo, S. (2002) Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **277**: 10244-10250.

Arnoult, D.; Gaume, B.; Karbowski, M.; Sharpe, J.C.; Cecconi, F.; Youle, R.J. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.*, **22**: 4385-4399.

Aruoma, O.I.; Deiana, M.; Jenner, A.; Halliwell, B.; Harpakash, K.; Banni, S. (1998) Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 5181-5187.



Bae, Y.S.; Kang, S.W.; Seo, M.S.; Baines, I.C.; Tekle, E.; Chock, P.B.; Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **272**: 217-221.

Balentine, J. (1982) Pathology of oxygen toxicity. New York: Academic Press, 305-348.

Barbouti, A.; Doulias, P.T.; Zhu, B.Z.; Frei, B.; Galaris, D. (2001) Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**: 490-498.

Barbouti, A.; Doulias, P.T.; Nouis, L.; Tenopoulou, M.; Galaris, D. (2002) DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 691-702.

Barbouti, A.; Amorgianniotis, C.; Kolettas, E.; Kanavaros, P.; Galaris, D. (2007) Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating caspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**: 1377-1387.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. and Del Rio, J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* **68**: 457-462.

Bennett, C.; Caldwell, S.; McPhail, D.; Morrice, P.; Duthie, G.; Hartley, R. (2004) Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**: 2079-2098.



Bidere, N.; Lorenzo, K.H.; Carmona, S.; Laforge, M.; Harper, F.; Dumont, C.; Senik, A. (2003) Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**: 31401-31411.

Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life or death decisions. *Mol. Immun.*, **39**: 615-647.

Braga, C.; La Vecchia, C.; Franceschi, S. (1998) Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma. *Cancer*, **82**: 448-453.

Brigelius-Flohe, R.; Kelly, J.F.; Sallonen, J.T.; Neuzil, J.; Zingg, J.M.; Azzi, A. (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **76**: 703-716.

Brown, E.J.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties *Free Radic. Biol. Med.*, **330**: 1173-1178.

Burton, G.W.; Ingold, K.U. (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. NY Acad. Sci.*, **570**: 7-22.

Campo, G.M.; Squadrito, F.; Campo, S.; Altavilla, D.; Avenoso, A.; Ferlito, M.; Squadrito, G.; Caputi, G. (1997) Antioxidant activity of U-83836E, a second generation lazaroid, during myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Rad. Res.*, **27**: 577-590.

Cantoni, O.; Sestili, P.; Cattabeni, F.; Bellomo, G.; Pou, S.; Cohen, M.; Cerutti, P. (1989) Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, **182**: 209-212.



Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. (1992) Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochem.*, **31**: 4125-4128.

Carluccio, M.A.; Siculella, L.; Ancora, M.A.; Massaro, M.; Scoditti, M.; Storelli, C.; Visioli, F.; Distanto, A.; De Caterina, R. (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**: 622-629.

Caselli, A. *et al.* (1998) The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.*, **273**: 32554-32560.

Chevion, M. (1988) A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic. Biol. Med.*, **5**: 27-37.

Chereau, D.; Kondadapani, L.; Tomaselli, K.J.; Spada, A.P. and Wu, J.C. (1994) Structural and functional analysis of caspases active sites. *Biochem.*, **42**: 4151-4160.

Cirman, T.; Oresic, K.; Droga-Mazovec, G.; Turk, V.; Reed, C.J.; Myers, M.R.; Salvesen, S. G.; Turk, B. (2004) Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J. Biol. Chem.*, **279**: 3578-3587.

Cory, S.; Huang, D.C.; Adams J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**: 8590-8607.

Cossarizza, A.; Baccaranicontri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. (1993) A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**: 40-45.



Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**: 231-241.

Danial, S.S.; Korsmeyer, S.J.; (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**: 205-219.

Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**: 239-252.

De la Puerta, P.; Ruiz Gutierrez, V.; Hout, J.R. (1999) Inhibition of leucocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.*, **57**: 445-449.

De la Puerta, R.; Dominguez, M.E.M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Flavill, J.A.; Hout, J.R.S. (2001) Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sci.*, **69**: 1213-1222.

De longeril, M.; Salen, P.; Martin, J.L.; Monjaud, I.; Boucher, P.; Mamelie, N. (1998) Mediterranean dietary pattern in a randomized trial. Prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch. Int. Med.*, **158**: 1181-1187.

De Longeril, M; Salen, P. (1999) Wine ethanol, platelets, and Mediterranean diet. *Lancet*, **353**: 1067.

De Longeril, M.; Salen, P.; Martin, J.L.; Monjaud, I.; Delaye, J.; Mamelie, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, **99**: 779-785.

Della Ragione, F.; Cucciolla V.; Criniti, V.; Indaco, S.; Borriello, A.; Zappia V. (2002) Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett.*, **532**: 289-294.



Deiana, M.; Aruoma, I.O.; de Lourdes M.; Bianchi, P.; Spencer, J.P.E.; Kaur, H.; Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Banni, S.; Dessi, M.A.; Corongiu, F.P. (1999) Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**: 762-769.

Dobo, J.; Swanson, R.; Salvesen, G.S.; Olson, S.T. and Gettings, P.G. (2006) Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer. *J. Biol. Chem.*, **50**: 38781-38790.

Doulias, P.T.; Nouis, L.; Zhu, B.Z.; Frei, B.; Galaris, D. (2005) Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radic. Res.*, **39**: 125-135.

Doulias, P.T. (2004) Studies on the role of iron chelators in the molecular mechanisms of DNA damage and apoptosis, ion cells exposed to hydrogen peroxide. Medical School, p. 66.

Doulias, P.T.; Christoforidis, S.; Brunk, U.; Galaris, D. (2003) Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**: 719-728.

Eaton, J.W.; Qian, M. (2002) Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**: 833-840.

Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. A. (1998) Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**: 43-50.

Epsztejn, S.; Glickstein, H.; Picard, V.; Slotki, IN; Breuer, W.; Beaumont, C.; Cabantchik, ZI. (1999) H-Ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood*, **94**: 3593-3603.



Esposti, M.D.; Hatzinisiriou, I.; McLennan, H.; Ralph, S. (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J. Biol. Chem.*, **274**: 29831-29837.

Eskes, R.; Antonsson, B.; Osen-Sand, A.; Montessuit, S.; Richter, C.; Sadoul, R.; Mazzei, G.; Nichols, A.; Martinou, J.C. (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions. *J. Cell Biol.*, **143**: 217-224.

Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servilli, M.; Selvaggini, R.; Montedoro G.; Di Saverio, C.; Morozzi, G. (2006) Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J. Nutr.* **136**: 614-619.

Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **31**: 248-253.

Flint, D.H.; Tuminello, J.F.; Emptage M.H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.*, **268**: 22369-76.

Francheschi, S.; Favero, A.; Decarli, A. (1996) Intake of macronutrients and the risk of breast cancer. *Lancet*, **347**: 1351-1356.

Frankel, E.N.; Kanner, J.; German, J.B.; Parks, E.; Kinsella, J.E. (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, **341**: 1103-1104.

Fridovich, I. (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, **893**: 13-18.

Galey, J. (1997) Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv. Pharmacol.*, **38**: 167-203.



García-Alonso, J., Ros, G.; Periago, M.J. (2006) Antiproliferative and cytoprotective activities of a phenolic-rich juice in HepG2 cells. *Food Res. Inter.*, **39**: 982-991.

García-Alonso, G.J.; Guidarelli, A.; Periago, M.J. (2007) Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation. *J. Nutr. Biochem.*, **18**: 457-466.

Garmichael, J.; DeGraff, W.G.; Gandar, A.F.; Minna, J.B.; Michell, J.B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, **47**: 936-942.

Ghisalberti, E. L.(1998) Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedic.*, **5**: 147-163.

Ghiselli, A.; D' Amicis, A.; Giacosa A. (1997) The antioxidant potential of the Mediterranean diet. *Eur. J. Cancer Prev.*, **6**: 15-19.

Glohessy, J.G.; Zhuang, J.; Deboer, J.; Gil-Gomez, G.; Brady, H.J. (2006) Mcl-1 interacts with tBid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, *In press*.

Gogvadze, V.; Robertson, J.D.; Zhivotovsky, B.; Orreniou, S. (2001) Cytochrome c release occurs via Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms that are regulated by Bax. *J. Biol. Chem.*, **276**: 19066-19071.

Gopalakrishna, R.; Jaken, S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**: 1349-1361.

Grasbon-Frodl, E.; Andersson, A.; Brundin, P. (1996) Lazaroid treatment prevents death of cultured rat embryonic mesencephalic neurons following glutathione depletion. *J. Neuroch.*, **67**: 1653-1660.

Green, D.R.; Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**: 1309-1312.



Guichard, C.; Pedruzzi, E.; Fay, M.; Marie, J.C.; Braut-Boucher, F.; Daniel, F.; Grodet, A.; Gougerot-Pocidalò, M.A.; Chastre, E.; Kotelevets, L.; Lizard, G.; Vandewalle, A.; Driss, F.; Ogier-Denis, E. (2006) Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **9**: 1812-1827.

Guyton, K.Z.; Liu, Y.; Gorospe, M.; Xu, Q.; Holbrook, N.J. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.*, **271**: 4138-4142.

Halliwell, B.; Gutteridge, JMC. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.*, **182**: 1.

Halliwell, B.; Aruoma, OI. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, **281**: 9-19.

Halliwell, B.; Gutteridge, JMC. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*: Oxford Science Press.

Hamdi, H.K.; Castellon, R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**: 769-778.

Hampton, M.B.; Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.*, **414**: 552-556.

Han, J.; Flemington, C.; Houghton, A.B.; Gu, Z.; Zambetti, G.P.; Lutz, R.J.; Zhu, L.; Chittenden, T. (2001) Expression of *bbc3*, a proapoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 11318 -11323.



Hashimoto, T.; Masakazu, I.; Matsuno, K.; Nakashima, S.; Tanigawa, T.; Yoshikawa, T.; Nishimura, C.Y. (2004) An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Rad. Biol. Med.*, **36**: 555-564.

Henle, ES; Han, Z.; Tang, N.; Rai, P.; Luo, Y.; Linn, S. (1999) Sequence-specific DNA cleavage by Fe^{2+} -mediated Fenton reactions has possible biological implications. *J. Biol. Chem.*, **274**: 962-971.

Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**: 1007-1011.

Hider, R.C.; Liu, Z.D.; Khodr, H.H. (2001) Metal chelation of polyphenols, *Flavonoids and Other Polyphenols* **335**: 190-203.

Hill, M.; Giacosa, A. (1992) The Mediterranean diet. *Eur. J. Cancer Prev.* **1**: 339-340.

Hofmann, K.; Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif *Trends Biochem Sci.*, **22**: 155-156.

Honglin, L.; Hong, Z.; Chi-jie, X.; Junying, Y.; (1998) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, **91**: 491-501.

Hsu, Y.T. and Youle, R. J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.*, **273**: 10777 - 10783.



Huang, D.C.S. and Strasser, A. (2000) BH3-only proteins — essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103: 839 -842.

Hutchins, J.B.; Barger, S.W. (1998) Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec.*, 253: 79-90.

Imaizumi, K.; Tsuda, M.; Imai, Y.; Wanaka, A.; Takagi, T.; Tohyama, M. (1997) Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J. Biol. Chem.*, 272: 18842 -18848.

Imley, A.J. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 395-418.

Inohara, N.; Ding, L.; Chen, S.; Núñez, G. (1997) *harakiri*, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X_L. *EMBO J.*, 16: 1686 -1694.

Iwahashi, H. (2000) Some polyphenols inhibit the formation of pentyl radical and octanoic acid radical in the reaction mixture of linoleic acid hydroperoxide with ferrous ions, *Biochemical Journal* 346: 265–273.

Jacobsen, E.; Doornik, F.; Ayer, D.; Belonga, K.; Braugher, M.; Hall, E.; Houser, D. (1992) 2-(aminoethyl)chromans that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma and ischemia. *J. Med. Chem.*, 35: 4464-4472.

Janssen-Heininger, Y.M.; Poynter, M.E.; Bauerle, P.A. (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Free Radic. Biol. Med.*, 28: 1317-1327.

Kagedal, K.; Johansson, A.C.; Johansson, U.; Heimlisc, G.; Roberg, K.; Wang, S.N.; Jurgensmeier, M.J.; Ollinger, K. (2005) Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis-involvement of Bax? *Int. J. Exp. Path.* 86: 309-321.



Kakhlon, O.; Cabantchik, ZI. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 1037-1046.

Kandel, E.S.; Hay, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.*, **253**: 210-229.

Katan, M.B.; Zock, P.L.; Mensick, R.P. (1995) Dietary oils, serum lipoproteins and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**: 1368-1373.

Kerr, J.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**: 239-257.

Keys, A. (1970) Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, **41**: 1-211.

Keys, A.; Menotti, A.; Karvonen, M.J.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Djordjevic, B.S.; Dontas, A.S.; Fidanza, F.; (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.*, **124**: 903-915.

Khokhar, S.; Apenten, R.K.O. (2003) Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem.*, **81**: 133-140.

Kim, H. E.; Du, F.; Fang, M.; Wang, X. (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *In press*

Kim. T.H.; Zhao, Y.; Barber, M.J.; Kuharsky, D.K.; Yin, X.M. (2000) Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J. Biol. Chem.*, **275**:39474-39481.

Kohler, C.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immun Methods*, **265**: 97-110.



Kohyama, N.; Nagata, T.; Fujimoto, S.; Sekiya, K. (1997) Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 347-350.

Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.*, **351**: 289-305.

Kowaltowski, A.J.; Fenton, R.G.; Fiskum, G. (2004) Bcl-2 family regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. *Free Radic Biol. Med.*, **37**: 1845-1853.

Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, SA. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, **18**: 44-51.

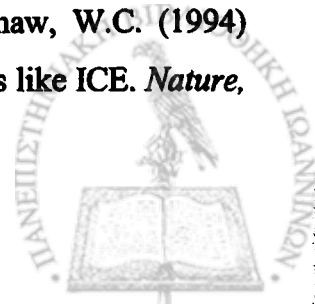
Kurz, T.; Terman, A.; Brunk, U.T. (2007) Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.*, **462**: 420-430.

La Vecchia, C.; Altieri, A.; Tavani, A. (2001) Vegetables, fruit antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur. J. Nutr.*, **40**: 261-267.

Lacasse, E.C.; Baird, S.; Korneluk, R.G.; MacKenzie A.E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, **17**: 3247-3259.

Lasheras, C.; Fernandez, S.; Patterson, A.M. (2000) Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**: 987-992.

Lazebnik, Y.A.; Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Poirier, G.G.; Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**: 346-347.



Le Blank, A.C. (2005) The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr Alzheimer Res.*, **2**: 389-402.

Le Nest, G.; Caille, O.; Woudstra, M.; Roche, S.; Burlat, B.; Belle, V.; Guigliarelli, B.; Lexa, D. (2004) Zn- polyphenol chelation : complexes with quercetin. *In. Chem. Akta*, **357**: 2027-2037.

Le Tutour, B.; Guedon, D. (1992) Antioxidants activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochem.*, **31**: 1173-1178.

Lei, K.; Nimnual, A.; Zong, W.X.; Kennedy, J. N.; Flavell, A.R.; Thompson, B.C.; Barsagi, D.; Davis, R. (2002) The bax subfamily of Bcl-2 related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH2-terminal kinase. *Mol. Cel. Biol.*, **22**: 4929-4942.

Leist, M.; Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**: 589-598.

Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.J.; Yuan, J. (1998) Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**: 491-501.

Li, P.; Nijhanan, D.; Budiharjo, 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**: 479-489.

Lockshin, R.A.; Williams, C.M. (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *J. Insect. Physiol.*, **10**: 643-649.

Lupo, A. (1997) Nutrition in general practice in Italy. *Am. J. Cancer Prev.* **65**: 1963-1966.



Mahadev, K.; Zilbering, A.; Zhu, L.; Goldstein, B. J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein- tyrosine phosphatase 1b *in vivo* and enhances the early insulin action cascade. *J.Biol. Chem.* **276**: 21938–21942.

Maiuri, M.C.; De Stefano, D.; Di Meglio, P.; Irace, C.; Savarese, M.; Sacchi, R.; Cinelli, M.P.; Carnuccio, R. (2005) Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **371**: 457-465.

Manna, C.; Galleti, P.; Cucciola, V.; Molledo, O.; Leone, A.; Zappia, V. (1997) The protective effect of olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, **127**: 286-292.

Manna, C.; Galleti, P.; Cucciola, V.; Montedoro, G.; Zappia, V. (1999) Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*, **10**: 159-165.

Manna, C.; Galleti, P.; Maisto, G.; Cucciola, V.; D' Angelo, S.; Zappia, V. (2000) Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, **470**: 341-344.

Manna, C.; Migliardi, V.; Golino, O.; Scognamiglio, A.; Galleti, P.; Chiarello, P.; Zappia, V. (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J. Nutr. Biochem.*, **15**: 461-466.

Martin, S.J., and Green, D.R. (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, **82**: 349-352.

Martinez-Gonzalez, M.A.; Fernandez-Jarne, E.; Serrano-Martinez, M. (2002) Mediterranean diet and reduction in the risk of acute myocardial infarction. An operational healthy diet score. *Eur. J. Nutr.*, **41**: 153-160.



Marzo, I.; Brenner, C.; Zamzami, N.; Jürgensmeier, J.M.; Susin, S.A.; Vieira, H.L.A.; Prévost, M.C.; Xie, Z.; Matsuyama, S.; Reed, J.C. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**: 2027-2031.

Masella, R.; Cantafora, A.; Modesti, D.; Cardilli, A.; Gennaro L.; Bocca, A. (1999) Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols, *Redox Report* **4**:113-121.

Melidou, M.; Riganakos, K.; Galaris, D. (2005) Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**: 591-600.

Meneghini R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**: 783-792.

Meyer, S.A.; Heinonen, M.; Frankel, N. E. (2000) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chem.*, **61**: 71-75.

Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, R.H. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.*, **36**:1199-1208.

Miura, M.; Zhu, H.; Rotello, R.; Hartwig, E.A.; Yuan, J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. Elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, **75**: 653-660.

Montedoro, G.F.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E.; (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 1571-1576.



Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Numez, M.J.; Parajo, J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, **72**: 145-171.

Nakano, K. and Wousden, K. H. (2001) *PUMA*, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*, **7**: 683 -694.

Nakao, N.; Frodl, E.; Duan, W.; Widner, H.; Brundin, P. (1994) Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Neurobiol.*, **91**: 12408-12412.

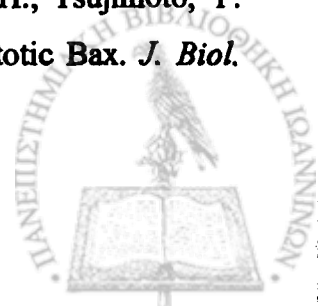
Narita, M.; Shimizu, S.; Ito, T.; Chittenden, T.; Lutz, R.J.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 14681 -14686.

Nechushtan, A.; Smith, C.L.; Hsu, Y.T.; Youle, R. J. (1999) Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.*, **18**: 2330 -2341.

Nechushtan, A.; Smith, C.L.; Lamensdorf, I.; Yoon, S.H.; Youle, R.J. (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.*, **153**: 1265 -1276.

Noguchi, N.; Niki, E. (2000) Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**: 1538-1546.

Nomura, M.; Shimizu, S.; Sugiyama, T.; Narita, M.; Ito, T.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. (2003) 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.*, **278**:2058-2065.



Nousis, L.; Doulias, P.T.; Aligiannis, N.; Bazios, D.; Agalias, A.; Galaris, D.; Mitakou, S. (2005) DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Rad. Res.*, **39**:787-795

Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**: 1053 -1058.

Ostling, O.; Johanson, KJ. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**: 291-298.

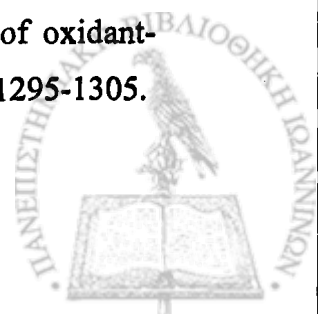
Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxic.*, **38**: 647-659.

Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, **36**: 1235-1247.

Owen, R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2003) Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxic.*, **41**: 703-717.

Panayiotidis, M.; Tsolas, O.; Galaris, D. (1999) Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**: 548-56.

Persson, HL; Yu, Z.; Tirosh, O.; Eaton, JW; Brunk, UT. (2003) Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**: 1295-1305.



Petrache, I. ; Choi, M.E. ; Otterbein, L.E. ; Chin, B.Y. ; Mantell, L.L. ; Horowitz, S. ; Choi, A.M. (1999) Mitogen activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. *Am. J. Physiol.*, **277** : 589-595.

Petroni, A.; Blasevich, M.; Salami M.; Papini. N.; Montedoro, G.; Galli, G. (1995) Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.*, **78**:151-160.

Pezzuto, J., M. (1997) Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol*, **53**:121-133.

Polster, B.M.; Kinnally, W.K.; Fiskum, G. (2001) BH3 domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J. Biol. Chem.*, **276**: 37887-37894.

Psaltopoulou, T.; Naska, A.; Orfanos, P.; Trichopoulos, D.; Mountokalakis, T.; Trichopoulou, A. (2004) Olive oil, the Mediterranean diet and arterial blood pressure: the Greek European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**: 1012-1018.

Puel, C.; Quintin, A.; Agalias, A.; Mathey, J.; Obled, C.; Mazur, A.; Davicco, M.J.; Lebecque, P.; Skaltsounis, A.L.; Coxam, V. (2004) Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br. J. Nutr.*, **92**: 119-127.

Reiners Jr, J.J.; Caruso, J.A.; Mathieu, P.; Chelladurai, B.; Yin, X.M.; Kessel, D. (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ.*, **9**: 934-944.

Renaud, S.; de Longelil, M.; Delaye, J.; Guidollet, J.; Jacquard, F.; Mamelie, N.; Martin, J.L.; Monjaud, I.; Salen, P.; Touboul, P. (1995) Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**: 1360-1367.



Reth, M. (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature Immun.*, **3**: 1129-1134.

Rhee, S.G. (1999) Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.*, **31**: 53-59.

Rhee, S.G.; Bae, Y.S.; Lee, S.R.; Kwon, J. (2000) Hydrogen peroxide: A key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science's stke.*, **53**: PE 1.

Rice-Evans, C.; Miller, J.N.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**: 933-956.

Rieux-Laucat, F.; Le Deist, F.; Fischer, A. (2003) Autoimmune lymphoproliferatives syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ.*, **10**: 124-133.

Roeg, K.; Johansson, U.; Ollinger, K. (1999). Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 1228-1237.

Robertson, R.M.; Smaha, L. (2001) Can a Mediterranean-style diet reduce heart disease? *Circulation*, **103**: 1821-1822.

Rodis, P.S.; Karathanos, V.T.; Mantzavinou, A. (2002) Partitioning of olive antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 596-601.

Rose, M.L.; Rusyn, I.; Boyes H.K.; Belyea, J.; Cattley, R.C.; Thurman, R.G. (2000) Role of Kupffer cells and oxidants in signalling peroxisome proliferators- induced hepatocyte proliferation. *Mutat. Res.*, **448**: 179-192.

Ryan, T.P.; Aust, S.D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**: 119-141.



Sabapathy, K.; Kallunki, T.; David, J.P.; Graef, I.; Karin, M.; Wagner, E.F. (2001) C-Jun NH2-terminal kinase (JNK1) and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J. Exp. Med.*, 193: 317-328.

Sagach, F.V.; Scrosati, M.; Fielding, J.; Rossoni, G.; Galli, C.; Visioli, F. (2002) The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *ex vivo*. A comparison with vitamin E. *Pharm. Res.*, 45: 435-439.

Salami, M.; Galli, C.; De Angelis, L.; Visioli, F. (1995) Formation of F₂-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: Inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharm. Res.*, 31: 275-279.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*.

Sanchez-Moreno, C.; Larrauri A.J.; Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76: 270-276.

Saraste, A. and Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.*, 45: 528-37.

Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Eberstadt, M.; Yoon, H.S.; Shuker, S.B.; Chang, B.S.; Minn, A.J. (1997) Structure of Bcl-x_L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275: 983 -986.

Schieven, G.L.; Mittler, R.S.; Nadler, S.G.; Kirihaara, J.M.; Bolen, J.B.; Kanner, S. B.; Ledbetter, J.A. (1994) ZAP-70 tyrosine kinase, CD-45 and T-cell receptor involvement in UV and H₂O₂ induced T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 269: 20718-20726.



Schoene, N.; Kamara, K.S. (1999) Population doubling time, phosphatase activity, and hydrogen peroxide generation in Jurkat cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 364-369.

Sestili, P.; Diamantini, G.; Bedini, A.; Cenoni, L.; Tommasini, M.; Tarzia, G.; Cantoni, O. (2002) Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem. J.*, **364**: 121-128.

Shimizu, S.; Eguchi, Y.; Kammike, W.; Funahashi, Y.; Mignon, A.; Lacronique, V.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial by regulating proton flux (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **95**: 1455-9.

Simopoulos, A.P.; Visioli, F. (2000) Mediterranean diets. *World Rev. Nutr. Diet*, **87**: 1-184.

Simopoulos, A.P. (2001) The Mediterranean diets: what is so special about diet of Greece? The scientific evidence. *J. Nutr.*, **131**: 3065-3073.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **184**: 461-470.

Standish, R. (1960). The first of trees. The story of the olive. *Phoenix House*

Stohs, SJ; Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**: 321-336.

Stoka, V.; Turk, B.; Schendel. S.L.; Kim, T.H.; Cirman, T.; Snipas, S.J.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; Freeze, H.; Abrahamson, M.; Bromme, D.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Yin, X.M.; Turk, V.; Salvesen, G.S. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.*, **276**: 3149-3157.



Stridh, H.; Kimland, M.; Jones, D.P.; Orrenius, S.; Hampton, M.B. (1998) Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.*, **429**:351-355.

Sugihara, N.; Ohnishi, M.; Imamura, M.; Furuno, K. (2001) Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes, *Journal of Health Science* **47**: 99–106.

Sun, Y.; Oberley, L.W. (1996) Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radical Biol. Med.* **21**: 335–348.

Sundaresan, M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Irani, K.; Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, **270**: 296-299.

Susin, S.A.; Lorenzo, H.K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B.E.; Brothers, G.M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D.R.; Aebersold, R.; Siderovski, D.P.; Penninger, J.M.; Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**: 441-6.

Suzuki, M.; Youle, R.J.; Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**: 645 -654.

Takahashi, R.; Deveraux, Q; Tamm, I.; Welsh, K.; Assa-Munt, N.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. (1998) A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.*, **273**: 7787-90.

Talanian, R.V.; Quinlan, C. and Trautz, S. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.*, **272**: 9677-9682.

Tam, T.; Leung-Toung, R.; Li, W.; Wang, Y.; Karimian, K.; Spino, M. (2003) Iron chelator Research: Past, Present, and Future. *Curr. Med. Chem.*, **10**: 983-995



Tavani, A.; La Vecchia, C. (1995) Fruit and vegetable consumption and cancer risk in a Mediterranean population. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**: 1374-1377.

Tenopoulou, M.; Doulias, P.T.; Barbouti, A.; Brunk, U.; Galaris, D. (2005) The role of compartmentalized redox-active iron on hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.*, **387**: 703-710.

Terrones, O.; Antonsson, B.; Yamagushi, H.; Wang, H.G.; Liu, J.; Lee, M.R.; Herrmann, A.; Basanez, G. (2004) Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic Bax and tBid. *J. Biol. Chem.*, **279**: 30081-30091.

Togna, G.I.; Togna, A.R.; Francomi, M.; Marra, C.; Guiso, M. (2003) Olive oil isochromans inhibit human platelet reactivity. *J. Nutr.*, **133**: 2532-2536.

Tournier, C.; Hess, P.; Yang, D.D.; Xu, J.; Turner, T.K.; Nimmual, A.; Bar-Sagi, D.; Jones, S.N.; Flavell, R.A.; Davis, R.J. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, **288**: 870-874.

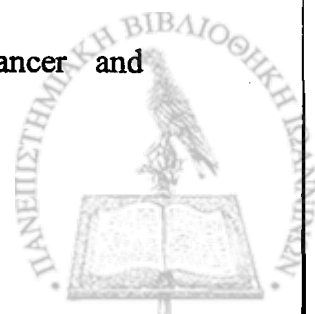
Trichopoulou, A.; Lagiou, P. (1997) Correlating nutrition to recent cancer mortality statistics. *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**: 1725-6.

Trichopoulou, A.; Lagiou, P. (1997) Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history and lifestyle. *Nutr. Rev.*, **55**: 383-389.

Trichopoulou, A.; Vasilopoulou, E.; Lagiou, A. (1999) Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical? *Nutr. Rev.*, **57**: 253-255.

Tsujimoto, Y. (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell Physiol.*, **195**: 158-167.

Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Kuper, H.; Trichopoulos, D. (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, **9**: 869-873.



Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N.; Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.*, **23**: 1889-1899.

Tuck, K.L.; Tan, H.W.; Hayball, P.J. (2000) Synthesis of tritium-labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 4087-4090.

Tuck, K.L.; Hayball, P.J. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.*, **13**: 636-644.

Uccella, N. (2001) Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends Food Sci. Tech.*, **11**: 328-339.

Ushio-Fukai, M.; Alexander, R.W.; Akers, M.; Griendling, K.K. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15022-15029.

Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, **12**: 1161-1208.

Valks, D.M.; Kemp, T.J.; Clerk, A. (2003) Regulation of Bcl-xl by H₂O₂ in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **278**: 25542-25547.

World Health Organization. (1991) World health statistics annual, Geneva, pp. 308-315.

Visioli, F. and Galli, C. (1994) Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci.*, **55**: 1965-1971

Visioli, F.; Vinceri, F.F.; Galli, C. (1995a) "Waste waters' from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, **51**: 32-34.



Visioli, F.; Bellomo, G.; Montedoro, G.; Galli, G. (1995b) Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **117**: 25-32.

Visioli, F.; Bellomo, G.; Galli, C. (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**: 60-64.

Visioli, F. and Galli, C. (1998) The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.*, **56**: 142-147.

Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, C.; Caruso, D.; (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.*, **468**: 159-160.

Visioli, F.; Polli, A.; Galli, C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, **22**: 65-75.

Visioli, F.; Grande, P.; Bogani, P.; Galli, C. (2004) The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, **13**: 337-343.

Vissers, M.N.; Zock, P.L.; Roodenburg, A.J.C.; Leenen, R.; Katan, M.B. (2001) Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.*, **132**: 409-417.

Vissers, M.N.; Zock, P.L.; Katan, M.B. (2004) Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **58**: 955-965.

Warburg, U. (2004) What are the health effects of fat? *Eur. J. Nutr.*, **43**: 6-11.

Willett, W.C.; Sacks, F.; Trishopoulou, A. (1995) Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**: 1402-1406.

Winterbourn, C.C.; Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol groups with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 322-328.



Wiseman S.A.; Mathot J.N.; de Fouw N.J.; Tijburg L.B. (1996) Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*, **120**:15–23.

Wolter, K.G.; Hsu, Y.T.; Smith, C.L.; Nechushtan, A.; Xi, X.G.; Youle, R. J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.*, **139**: 1281 -1292.

Xu, D.; Rovira, I. I.; Finkel, T. (2002) Oxidants painting the cysteine chapel: redox regulation of PTPs. *Dev. Cell*, **2**: 251–252.

Yi, W.; Fischer, J.; Krewer, J.; Akoh, C.C. (2006) Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 7320-7329.

Yung, M.C.T.; Satoh, M.S. (2001) Functional competition between poly(ADP-ribose)polymerase and its 24-kDa apoptotic fragment in DNA repair and transcription. *J. Biol. Chem.*, **276**: 11279-11286.

Zhao, M.; Eaton, W.J.; Brunk, U.T. (2000) Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2? *FEBS Lett.*, **485**: 104-8.

Zing J.M.; Azzi, A. (2004) Nonantioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.*, **11**: 1113-33.

