

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ ΕΝΕΡΓΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ»

> ΝΑΤΑΛΙΑ ΚΙΤΣΑΤΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I\,\Omega\,A\,N\,N\,I\,N\,A~2\,0\,1\,7$



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ ΕΝΕΡΓΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ»

> ΝΑΤΑΛΙΑ ΚΙΤΣΑΤΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I\,\Omega\,A\,N\,N\,I\,N\,A~2\,0\,1\,7$

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κιτσάτη Ναταλίας: 25-11-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 700^α/21-12-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα, Λέκτορας Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-2-2011

«Διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών δράσης των δραστικών μορφών οζυγόνου: Ο ρόλος των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου σε σχέση με τη διατροφή και την υγεία»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 796^α/29-3-2017

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Γεροθανάσης Ιωάννης	Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη Φυσική- Θεωρητική Χημεία και Φασματοσκοπία του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Κωνσταντή Μαρία	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Μπαϊρακτάρη Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Ντουνούση Ευαγγελία	Επίκουρη Καθηγήτρια Νεφρολογίας με έμφαση στις Μεταμοσχεύσεις του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα	Λέκτορας Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-7-2017

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Αφιερωμένο

στην οικογένειά μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την έμπνευση, τις εύστοχες υποδείξεις, την ακούραστη καθοδήγηση και το αμείωτο ενδιαφέρον του που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Υπήρξε πολύτιμος σύμβουλος και αρωγός, παρέχοντας μου όλα εκείνα τα απαραίτητα εφόδια και γνώσεις που οδήγησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους και για τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Μεταδιδάκτορα Μιχάλη Μάντζαρη για την πραγματικά απλόχερη βοήθεια που μου προσέφερε, αλλά κυρίως για την άψογη και φιλική συνεργασία που είχαμε και ήταν πάντα παρόν να ακούει με προσοχή κάθε απορία ή δυσκολία που αντιμετώπιζα. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Λέκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε στο ξεκίνημά μου. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας των Ελευθέρων Ρίζων και Οξειδωτικού Στρες για τη συνεργασία που είχαμε κατά αυτό το διάστημα καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για τη βοήθειά τους στην αντιμετώπιση προβλημάτων που παρουσιάστηκαν και το όμορφο κλίμα που δημιουργούσαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου Βασίλη και Άρτεμις και τον αδελφό μου Βαγγέλη για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν καθώς και για τη διαρκή ενθάρρυνση χωρίς την οποία δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	i
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Μεσογειακή δίαιτα και υγεία	1
1.1.1 Συστατικά της Μεσογειακής δίαιτας	2
1.1.2 Φαινολικές ενώσεις της διατροφής	3
1.1.2.1 Φαινολικά Οξέα	3
1.1.2.2 Φαινολικές Αλκοόλες	5
1.1.3 Απορρόφηση και Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων	6
1.1.3.1 Φαινολικά Οξέα	7
1.1.3.2 Φαινολικές Αλκοόλες	7
1.1.4 Βιολογική δράση Φαινολικών ενώσεων και Υγεία	8
1.1.4.1 Φαινολικά Οξέα	9
1.1.4.2 Φαινολικές Αλκοόλες	10
1.1.5 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων	10
1.1.6 Φαινολικές ενώσεις και Απόπτωση	13
1.1.7 Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύων μέταλλα	13
1.2 Ελεύθερες Ρίζες και Οζειδωτικό Στρες	15
121 Λοαστικές Μορωές Οξυνόνου (Λ Μ Ο)	15
1.2.1 Δραστικος πορφος στο στο στο των κυττάρων	13
1.2.2 Καταλυτικά Ενεονός Σίδηρος (Labile Iron Pool J IP)	19
1 3 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος-Απόπτωση	21
1.3.1 Μοριακοί μηγανισμοί αποπτωτικού θανάτου	21
- Ωκαταρράκτης των καστασών	22 22
- Μηγανισμός ενεονοποίησης των κασπασών	22
- Μηχανισμός ενεργοποιησης των κασπασων	22 23
$1.3.2$ H or α is a top MAPK	23 24
c. Jun N terminal Kinases (INK) και απόπτωση	24 26
- c-juli N-terminal Kinases (jNK) kut unontwolj	20
140 sól sz zen zistésen zza β sol szuká znazáugza	7 0
1.4 Ο μοιοστασία σιδήρου σα στίπεδο οριστηματά	20 مد
	20 مد
- Κατανομή και απορροφήση του σισηρου στον οργανισμο	
- Μεταφορά του οιοήρου άπο τον εντερικό άυλο ότην κυκλοφορία του αίμ	$\alpha \tau 0 \zeta$
	00
- Ανακυκλωση του σιοηρου στον οργανισμο	32
- O ρολος της ηπατιοινης	34
- O ρολος της τρανσφερρινης στον ορο του αιματος	38
1.4.2 Ομοιοστασια σιοηρού σε κυτταρικό επιπεδο	39
- Προσληψη του σιδηρου στα κυτταρα	39
- Ρυθμιση επιπεδων μεσου του αζονα IRP-IRE	43
1.4.3 Καταλυτικα ενεργος σιδηρος (LIP) και παθολογικές καταστάσεις	44
1.4.3.1 Χορηγηση σιδηρου σε αιμοκαθαιρομενους νεφροπαθείς	45
ΣΚΟΠΟΣ	49
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51

2.1 Υλικά
2.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών53
2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών53
2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας54
2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων
2.2.4 Επώαση των κυττάρων55
2.3 Μέθοδοι
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel
Electrophoresis ń Comet assay)
2.3.2 Μέτοηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του οξειδοαναγωγικά ενεργού
σιδήρου (LIP)
2.3.3 Ανάλυση δεινμάτων με κυτταρομετρία ροής
2.3.3.1 Σήμανση με Ανεξίνη και Ιωδιούγο ποοπίδιο
2.3.4 Απομόνωση ποωτεϊνικών εκνηλισμάτων 63
2.3.5 History π_{0} History π_{0}
2.3.6 Ανοσοαποτύπωση ποωτεϊνών σε μεμβοάνη νιτροκινταρίνης κατά Western66
2.3.0 Ανοσοαλοτολωση πρωτείνων σε μεμερανή ντεροκοτταρινής κατά ττ εsternoo
2.3.7 Δειγματά ατόμων
2.5.8 Avaluation two orapopulation opposed in the product of th
2.3.0 Métonga and arguite (Hope) story océ tory diugtos
$2.3.9$ Mitipilot til filtation (Tepe) otov opo too atputo $\frac{1}{2}$
2.5.10 21atiotikij avazbolj
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ73
31 Φαινολικά Οξέα 73
3.1.1 Διερεώνηση της προστατευτικής δράσης των φαινολικών οξέων σε συνθήκες
$5.1.1 \Delta Growthout the sector of the sect$
312 Συσγέτιση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεονών ιώντων
79
3.1.3 Διερεύνηση της προστατευτικής δράσης παραγώνων του καωεϊκού οξέος σε
3.1.5 Διερευνήση της προστατευτικής σρασής παραγωγών του καφεικου όζεος σε
$3 1 3 1 \Sigma$ Sympton the prostatential definition of $3 1 3 1 \Sigma$
$5.1.5.1$ 20 ykpiol ily hoo interneting options to quivalond-corepu μc to $-$
314 Συσγέτιση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ευεργών ιώντων
$5.1.4$ 200χ cm 100χ cm 10χ m 10χ
3.15 Iranéznya zen aguno) rén oktor va sizén na sizén va sizén sen sizén si
$\frac{316}{216} \frac{4}{216} \frac{1}{216} $
$5.1.0$ Ψ anomia o cea kai anomia o filico filic
$32 \Phi_{\alpha}$
3.2 Φαινολικές πικουλές
$3.2.1$ $\exists c \rho c \sigma r q \rho \sigma r $
2211 Licenérate and where the proposition into the contract state 320
$3.2.1.1$ Travorita ing objectopologitopologitopologita value soletita o tov evolvoritapio χ apologitopologitopologita ing soletita o tov evolvoritapio χ apologitopologitopologita ing soletitapio evolvoritapio χ apologitopologitapio evolvoritapio χ apologitapio evolvoritapio e
$5.2.2$ 200 χ erion the kuttaponpootateotiking opaone the topoetateotiking opaone the topoetateotiking opaone topoetateotikin
ικανοτητά της να οεσμευει ενοοκυτταριο «οζειοσαναγωγικά ενεργο» σιοηρο
5.2.2.1 Αναστολή της αυζήσης των επιπεσών των καταλυτικά ενεργών ιοντών
σιόπρου από το H_2O_2 εντός των κυττάρων από την υδροζυτυροσολη101
3.2.3 Επιδραση της υδροξυτυροσολης στην απόπτωση που προκαλείται από το
$H_2 O_2 \dots \dots$
3.2.4 Η υδροζυτυροσολη αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των
κασπασων106

3.2.5 Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από
3.2.6 Αναστολή της ενεργοποίησης των ΜΑΡ κινασών που προκαλείται από το H ₂ O ₂ από την υδροξυτυροσόλη
3.3 Ομοιοστασία σιδήρου σε συστημικό επίπεδο
3.3.1 Ανίχνευση του κορεσμού της τρανσφερρίνης με την τεχνική της U-PAGE
3.3.2 Ανίχνευση των διάφορων ισομορφών της τρανσφερρίνης στον ορό περιφερικού αίματος
3.3.3 Μεταβολές στον κορεσμό της τρανσφερρίνης σε αιμοκαθαιρόμενους πριν και
120 3.3.4 Αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της ηπατιδίνης του ορού μετά από ενδοφλέβια χορήνηση σιδήρου
3.3.5 Μεταβολές των επιπέδων κορεσμού της τρανσφερρίνης και της ηπατιδίνης
στον ορο μετα απο χορηγηση οιαφορετικών ποσοτητών σιοηρου127
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
4.1 Καταλυτικά ενεργός σίδηρος (Labile Iron)129
4.2 Σχέσεις διατροφής και καταλυτικά ενεργού σιδήρου
4.2.3Μηχανισμος προστατευτικης δρασης της υδροξυτυροσολης εναντία στην απόπτωση
4.3 Μηχανισμός δράσης του διαθέσιμου καταλυτικά ενεργού σιδήρου σε συστημικό επίπεδο
4.3.1 Μεταβολές στον κορεσμό της τρανσφερρίνης και στα επίπεδα της ηπατιδίνης στον ορό, αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου σε ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση
5. ПЕРІЛНҰН
6. SUMMARY
7. ВІВЛІОГРАФІА 151
8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Apaf-1: apoptotic-protease activating factor APS: ammonium persulfate, (υπερ-θειϊκό αμμώνιο) **BSA:** Bovine serum albumin, (αλβουμίνη ορού βοός) CA-AM: Calcein-acetomethoxy ester (ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης) CAPE: caffeic acid propyl ester (προπυλο-εστέρας του καφεϊκού οξέος) **CAT**: Catalase, (καταλάση) **CRP:** C- Reactive protein (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) Δ.Μ.Ο.: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου Dcvtb: Duodenal cytochrome b DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium DMT1: Divalent Metal Transporter (μεταφορέας δισθενών μετάλλων 1) DMSO: Dimethyl Sulfoxide, (διμεθυλο-σουλφοξείδιο) **DTT:** Διθειοθρεϊτόλη EDTA: Ethylenetriamineteteraacetic acid, (αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ) **ERK:** Extracellular signal-regulated kinases **ESA:** Erythropoiesis-Stimulating-Agents **FACS:** Fluorescence Activated Cell Scanner FBS: Fetal Bovine Serum **FPN:** Ferroportin (πρωτεΐνη φερροπορτίνη) GO: Glucose oxidase, (οξειδάση της γλυκόζης) GP: Glutathione Peroxidase, (ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) **HCP1**: Heme Carrier Protein, (μεταφορέας της αίμης) Hepc: hepcidin, (ηπατιδίνη) **HO-1:** Heme Oxygenase-1 (οξυγονάση της αίμης-1) HTy: Hydroxytyrosol, (υδροξυτυροσόλη) IRE: Iron Responsive Element, (ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στο σίδηρο) **IRP:** Iron Regulating Protein, ($\pi\rho\omega\tau\epsilon$ ίνη ρύθμισης σιδήρου) JNK: c-Jun-terminal kinases LIP: Labile Iron Pool MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase NTBI: Non transferrin bound iron (σίδηρος μη προσδεδεμένος στην τρανσφερρίνη) **PARP:** poly (ADP-ribose) polymerase, (ένζυμο poly (ADP-ριβόζη) πολυμεράση) **PBS:** Phosphate buffer saline

PRx: περοξυρεδοξίνες

ROS: Reactive Oxygen Species, (Δραστικές Μορφές Οξυγόνου)

RPMI: Roswell Park Memmorial Institute

SDS: Sodium dodecacyl sulphate, (δωδεκυλοθειϊκό νάτριο)

SIH: Salicyaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone

SOD: Superoxide Dismutases, (δισμουτάση του σουπεροξειδίου)

TEMED: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, (N, N, N', N'-

τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη)

Tf: Transferrin, (τρανσφερρίνη)

TfR1: Transferrin Receptor-1, (υποδοχέας της τρανσφερρίνης 1)

TfR2: Transferrin Receptor-2, (υποδοχέας της τρανσφερρίνης 2)

Tf-Sat: transferrin saturation, (κορεσμός της τρανσφερρίνης)

TIBC: Total Iron Binding Capacity, (ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα)

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane, (Τρις-υδροξυμεθυλένο-διαμίνη)

Ty: Tyrosol, (τυροσόλη)

UPAGE: Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, (ηλεκτροφόρηση ουρίαςπολυακρυλαμιδίου)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή δίαιτα και υγεία

Η διατροφή είναι μια σημαντική παράμετρος στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας. Από επιδημιολογικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η κατανάλωση διατροφής Μεσογειακού τύπου είναι εξαιρετικά ωφέλιμη για τη διατήρηση της υγείας των ανθρώπων, αν και οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι παραμένουν άγνωστοι και χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Η Μεσογειακή διατροφή αναφέρεται στον τρόπο διατροφής των λαών που περιβάλλουν τη Μεσόγειο. Πρόκειται για έναν υγιεινό τρόπο διατροφής που προέρχεται από τις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Ελλάδας (κυρίως των κατοίκων της Κρήτης), της Ιταλίας, της Ισπανίας και των χωρών στα παράλια της Μέσης Ανατολής, περιοχές που βρέχονται από τη Μεσόγειο Θάλασσα. Βέβαια, υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις από χώρα σε χώρα της Μεσογείου, που σχετίζονται με την παραγωγή, τις διατροφής με την υγεία αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος και πολύχρονης έρευνας από την επιστημονική κοινότητα.

Η σημασία της διατροφής ήταν γνωστή από την αρχαιότητα. Στις αρχές της δεκαετίας του '60 ξεκίνησε η λεγόμενη «Μελέτη των Επτά Χωρών (Seven Country Study) από τον Αμερικανό φυσιολόγο Ancel Keys και τους συνεργάτες του. Η μελέτη διήρκησε 30 χρόνια και συμμετείχαν συνολικά περίπου 13.000 άνδρες, οι οποίοι επιλέχθηκαν από 16 διαφορετικές περιοχές 7 χωρών (Φιλλανδία, Ολλανδία, Ιαπωνία, Ηνωμένες Πολιτείες, Ιταλία, Γιουγκοσλαβία και Ελλάδα). Στόχος της έρευνας ήταν να διερευνηθεί η ασαφής μέχρι τότε σχέση μεταξύ της δίαιτας και της εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι οι κάτοικοι της Μεσογείου (ιδιαίτερα της Κρήτης και της νότιας Ιταλίας) είχαν γενικά καλύτερη υγεία και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής από τους κατοίκους των υπόλοιπων χωρών (Keys, 1970). Είχαν τα μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο και καρκίνο και το μεγαλύτερο μέσο όρο ζωής απ' όλους όσους συμμετείχαν στην έρευνα. Τις τελευταίες δεκαετίες, η επιστημονική κοινότητα έχει αναγνωρίσει, μέσα από πληθώρα κλινικών και επιδημιολογικών μελετών, τον σημαντικό ρόλο της Μεσογειακής Διατροφής, τόσο στην πρόληψη όσο και στην έκβαση διάφορων παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών (Trichopoulou et al., 2005), όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Covas et al., 2009; Ferria and Grassib, 2003; Lorgeril and Salen, 2000), ο καρκίνος (Martinez-Gonzalez and Estruch, 2004), η ανάπτυξη και η εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου (Panagiotakos et al., 2004), ο σακχαρώδης διαβήτης (Salas-Salvado et al., 2011; Biesalski, 2004), η αθηροσκλήρωση (Kok and Kromhout, 2004), η νόσος Αλτσχάιμερ (Steele et al., 2006), αλλά ακόμα και η γήρανση (Aravanis et al., 1970; Gerber, 1994; Battino and Ferreiro, 2004). Οι εν λόγω έρευνες έδειξαν, επίσης, ότι ο λεγόμενος Μεσογειακός τύπος διατροφής μπορεί να μειώσει δραστικά την εμφάνιση των παραπάνω ασθενειών (Sofi et al., 2013; Knoops et al., 2004; Linos et al., 2007; Trichopoulou et al., 2003; Willett, 2006). Είναι κατανοητό λοιπόν ότι το μοντέλο της Μεσογειακής Διατροφής είναι το πλέον ιδανικό για την διατήρηση της καλής υγείας και της μακροζωίας.

1.1.1 Συστατικά της Μεσογειακής Δίαιτας

Η μεσογειακή δίαιτα είναι πλούσια σε μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες και ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ είναι φτωχή σε κορεσμένα λίπη. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της δίαιτας αυτής αποδόθηκαν στα διατροφικά χαρακτηριστικά της και συγκεκριμένα στην υψηλή κατανάλωση ελαιόλαδου, χορταρικών, δημητριακών, φρούτων και λαχανικών, τη μέτρια με υψηλή κατανάλωση ψαριών, τη μέτρια κατανάλωση κρασιού και γαλακτοκομικών και τη χαμηλή κατανάλωση κρέατος. Το κύριο συστατικό της Μεσογειακής δίαιτας είναι το ελαιόλαδο, το οποίο αποτελεί το βασικό και σε ορισμένες περιπτώσεις το αποκλειστικό μαγειρικό λίπος. Πρόσφατα προτάθηκε ότι τα συστατικά που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο καθώς και μεγάλος αριθμός πολυφαινολών της Μεσογειακής δίαιτας είναι δυνατόν να συνεισφέρουν ευεργετικά στη διατήρηση της υγείας (Del Weerdt, 2011; Dilis and Trichopoulou, 2010; Simopoulos, 2005). Η ανάλυση των συστατικών των παραπάνω τροφίμων και η αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων καταδεικνύουν ότι οι ευεργετικές επιδράσεις τους οφείλονται πιθανά στο μεγάλο αριθμό φαινολικών ενώσεων, που αυτά περιέχουν.

1.1.2 Φαινολικές ενώσεις της διατροφής

Οι πολυφαινόλες, μια ομάδα ενώσεων, που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός ή περισσότερων υδροξυλίων απευθείας συνδεδεμένων σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Σήμερα είναι γνωστές πάνω από 8000 τέτοιες ενώσεις. Είναι τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στη διατροφή μας και είναι πολύ διαδεδομένες ως συστατικά των φρούτων, των λαχανικών, των δημητριακών και της ελιάς. Συναντώνται επίσης, και στα ξηρά όσπρια, στη σοκολάτα και στο τσάι, τον καφέ και το κρασί. Παρά την ευρεία κατανομή τους, μόλις τα τελευταία χρόνια έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των διατροφολόγων.

Οι πολυφαινόλες ως κοινά συστατικά των τροφίμων φυτικής προέλευσης, ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τους φαινολικούς δακτύλιους που φέρουν και τα δομικά τους στοιχεία με τα οποία συνδέονται οι δακτύλιοι μεταξύ τους. Περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία μορίων, που έχουν δομή πολυφαινόλης δηλαδή αρκετές ομάδες υδροξυλίου επί των αρωματικών δακτυλίων, όπως φλαβονοειδή, λιγνάνες και στιλβένια, αλλά επίσης και μόρια με ένα δακτύλιο φαινόλης, όπως τα φαινολικά οξέα και οι φαινολικές αλκοόλες.

Η πληθώρα των ενδείξεων για τον κεντρικό ρόλο των φαινολικών ενώσεων (όπως φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες) στην ανθρώπινη υγεία, μας ώθησε στην εις βάθος μελέτη των μοριακών μηχανισμών, μέσω των οποίων δρουν οι ενώσεις αυτές, σε ανέπαφα κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες.

1.1.2.1 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και βρίσκονται σε αφθονία στα τρόφιμα. Ταξινομούνται σε δύο τάξεις, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κιναμικού οξέος (Εικόνα 1). Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα ανήκουν το γαλλικό και το πρωκατεχουϊκό οξύ, ενώ στα υδροξυκιναμικά οξέα το καφεϊκό, το φερουλικό, το κουμαρικό και το συναπικό οξύ (Wang et al., 2013).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τόσο ελεύθερα όσο και εστεροποιημένα, βρίσκονται σε βρώσιμα φυτά και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Αντιθέτως, τα υδροξυκιναμικά οξέα αποτελούν μία από τις κύριες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων που σπάνια βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, εκτός των μεταποιημένων τροφίμων που έχουν υποστεί κατάψυξη, αποστείρωση ή ζύμωση.



Εικόνα 1: Χημικές δομές των υδροξυβενζοϊκών (Α) και των υδροξυκιναμικών (Β) οξέων. Στα υδροξυβενζοϊκά οξέα κύριοι εκπρόσωποι είναι το γαλλικό και το πρωκατεχουϊκό οξύ, ενώ στα υδροξυκιναμικά οξέα το κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, και το συναπικό οξύ (Wang et al., 2013).

Είναι παρόντα επίσης σε μια μεγάλη ποικιλία φρούτων και λαχανικών (Clifford, 1999, 2000; Manach et al., 2004), αν και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τους συναντώνται στα εξωτερικά τμήματα των ώριμων φρούτων.

Ο κύριος εκπρόσωπος των υδροξυκιναμικών οξέων στα τρόφιμα είναι το καφεϊκό οξύ (3,4-dihydroxy-cinnamic acid). Το καφεϊκό οξύ είναι μια φαινολική ένωση που παράγεται από το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και αποτελεί το κύριο υδροξυκιναμικό οξύ στη διατροφή του ανθρώπου (Shi et al., 2003). Συναντάται συνήθως σε αρκετά φρούτα, λαχανικά, βότανα (κυρίως θυμάρι, φασκόμηλο και δυόσμο σε αναλογία περίπου 20 mg ανά 100 γραμμάρια), σε μέτρια επίπεδα στο κόκκινο κρασί, στο λάδι και στους κόκκους του καφέ, ένα από τα σημαντικότερα αγαθά που καταναλώνονται στη δυτική διατροφή (Shi et al., 2003). Επίσης, τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εστεροποιημένη μορφή, είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75% με 100% της συνολικής περιεκτικότητας υδροξυκιναμικών οξέων στα περισσότερα φρούτα (D' Archivio et al., 2007, Manach et al., 2004). Το

φερουλικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται από το καφεϊκό οξύ και ανήκει στην οικογένεια των υδροξυκιναμικών οξέων, βρίσκεται σε αφθονία στους σπόρους των δημητριακών, κυρίως στα εξωτερικά μέρη τους. Το συναντάμε σε υψηλότερη συγκέντρωση στο ρύζι, το σιτάρι, και τη βρώμη όπως και στα κυτταρικά τοιχώματα φρούτων και λαχανικών όπως είναι τα σταφύλια, τα πορτοκάλια, ο μαϊντανός και το σπανάκι. Σε δεσμευμένη όμως μορφή με υδροξυλικά οξέα.

Μια άλλη φυσική φαινολική ένωση του καφεϊκού οξέος είναι ο φαιναιθυλοεστέρας του καφεϊκού (CAPE), ο οποίος συναντάται σε μεγάλη ποικιλία φυτών και αποτελεί κύριο συστατικό της πρόπολης (Εικόνα 2). Η πρόπολη είναι μια κολλώδης ουσία, που παράγουν οι μέλισσες, η οποία προκύπτει από την συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων από τους φλοιούς φυτών, εμπλουτισμένη με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες. Χρησιμοποιείται από τις μέλισσες για να στεγανοποιήσουν και να απολυμάνουν το εσωτερικό της κυψέλης.



Εικόνα 2: Χημική δομή του φαιναίθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE)

1.1.2.2 Φαινολικές Αλκοόλες

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής των περιοχών της Μεσογείου και οι ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία αποδίδονται στα συστατικά που αυτό περιέχει. Η ευεργετική του δράση αποδίδεται συχνότερα στην υψηλή του περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Αξίζει όμως να σημειώσουμε ότι το ελαιόλαδο είναι πλούσιο και σε φαινολικές ενώσεις, όπως φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή, σεκοστεροειδή και λιγνάνες (Romero and Brenes, 2012; Rodríguez-Morato et al., 2015) οι οποίες έχουν εξεταστεί εκτενώς για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Visioli et al., 2003; Nousis et al., 2005).

Η υδροξυτυροσόλη (3, 4- dihydroxyphenylethanol, HTy) και η τυροσόλη (3hydroxyphenylethanol, Ty) θεωρούνται οι πιο άφθονες και αντιπροσωπευτικές φαινολικές αλκοόλες του ελαιολάδου (Granados-Principal et al., 2010). Πρόκειται για υδρόφιλες ενώσεις με παρόμοιες μοριακές δομές, που διαφέρουν μόνο στη θέση 3 του φαινολικού δακτυλίου, όπου το άτομο υδρογόνου της τυροσόλης έχει αντικατασταθεί από μία ομάδα υδροξυλίου στην υδροξυτυροσόλη (Εικόνα 3). Περιέχονται κυρίως στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (40,2 και 3,8 mg ανά kg αντίστοιχα) (Cabrini et al., 2001). Η τυροσόλη είναι επίσης παρούσα στο κόκκινο και το λευκό κρασί, καθώς και στη μπύρα (Covas et al., 2003). Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται επίσης στο κόκκινο κρασί (De la Torre et al., 2006). Σε παγκόσμιο επίπεδο η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 200 έως 1000 mg/kg ανάλογα με την ποικιλία, την επεξεργασία που έχει υποστεί κ.τ.λ.



Εικόνα 3: Χημικές δομές της υδροξυτυροσόλης, ΗΤy (A) και της τυροσόλης, Τy (B) που αποτελούν τα κύρια συστατικά των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου.

1.1.3 Απορρόφηση και Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις δε βρίσκονται στη φυσική τους ελεύθερη μορφή στα τρόφιμα, αλλά σε εστεροποιημένη, γλυκοσυλιωμένη μορφή ή ως πολυμερή. Κατά τη διαδικασία της απορρόφησής τους υπόκεινται σε εκτενείς τροποποιήσεις όπως μεθυλίωση, θείωση και γλυκουρονιδίωση (D'Archivio et al., 2007). Κατά συνέπεια, οι μορφές στις οποίες βρίσκονται, φθάνοντας στην κυκλοφορία και στους ιστούς είναι διαφορετικές από εκείνες που υπάρχουν στα τρόφιμα. Επίσης, ο προσδιορισμός της ακριβούς πρόσληψης των φαινολικών ενώσεων από τον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί ιδιαίτερα πολύπλοκο θέμα, αφού διαφοροποιείται ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες του κάθε ατόμου. Για αυτό το λόγο, είναι δύσκολο να αξιολογηθεί η βιολογική δράση των φαινολικών ενώσεων καθώς και ο μηχανισμός ή οι μηχανισμοί της απορρόφησης και του μεταβολισμού τους (Day and Williamson, 2001; Natsume et al., 2003; Setchell et al., 2003; Zhang et al., 2003).

1.1.3.1 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα μεταβολίζονται στο ήπαρ, στο έντερο και μετατρέπονται με διαδικασίες όπως η μεθυλίωση, η γλυκουρονιδίωση και η σουλφενυλίωση σε άλλους παράγοντες. Οι αλλαγές αυτές μπορούν και επηρεάζουν δραματικά τις βιολογικές δράσεις των φαινολικών οξέων (Cano et al., 2002; Ohta et al., 1997). Όταν προσλαμβάνονται σε ελεύθερη μορφή απορροφούνται από το λεπτό έντερο. Ωστόσο οι ενώσεις αυτές στα φυτικά προϊόντα είναι εστεροποιημένες. Οι ανθρώπινοι ιστοί όπως ο βλενογόννος του εντέρου, το ήπαρ, καθώς και βιολογικά υγρά όπως το πλάσμα, το γαστρικό υγρό και το υγρό στο δωδεκαδάχτυλο δε διαθέτουν εστεράσες ικανές να υδρολύουν εστέρες φαινολικών οξέων (Plumb et al., 1999; Olthof et al., 2001; Rechner et al., 2001). Μόνο η μικροχλωρίδα στο κόλον είναι σε θέση να πραγματοποιεί την υδρόλυση αυτή (Manach et al., 2004). Η εντερική απορρόφηση στα περισσότερα φαινολικά οξέα, όπως καφεϊκό, φερουλικό, πκουμαρικό, γαλλικό και ροσμαρινικό οξύ έχει μελετηθεί εκτενώς στην κυτταρική σειρά Caco-2 αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (Konishi and Shimizu, 2003, Konishi and Kobayashi, 2004, 2005). Λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τα μεταβολικά γαρακτηριστικά του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος in vitro και in situ (Lafay et al., 2006; Adam et al., 2002; Kern et al., 2003; Mateos et al., 2006). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η εντερική απορρόφηση των υδροξυκιναμικών οξέων μεταβάλλεται όταν οι ενώσεις αυτές είναι εστεροποιημένες.

1.1.3.2 Φαινολικές Αλκοόλες

Ο τρόπος με τον οποίο προσλαμβάνονται τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου δεν έχει ακόμη πλήρως κατανοηθεί. Για πρώτη φορά ο μηχανισμός απορρόφησης της υδροξυτυροσόλης εξετάστηκε από την ερευνητική ομάδα Manna et al., 2000 και συνεργάτες, στη διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος Caco-2, αποδεικνύοντας ότι η υδροξυτυροσόλη εισέρχεται εντός των κυττάρων μέσω μηχανισμού παθητικής διάχυσης και απορροφάται στο έντερο (Manna et al., 2000). Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μοντέλο αρουραίων από την ομάδα του Visioli αποδεικνύει ότι η υδροξυτυροσόλη απορροφάται δοσοεξαρτώμενα και εκκρίνεται στα ούρα ως συζευγμένο γλυκουρονίδιο (Visioli et al., 2001). Περαιτέρω ερευνητικές προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους όσο αφορά τη

βιοδιαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης μετά τη χορήγηση ελαιολάδου (Caruso et al., 2001; Miro-Casas et al., 2001, 2003; Weinbrenner et al., 2004). Όμως, ενώ η απορρόφηση των ενώσεων αυτών ήταν αρκετά καλή, η βιοδιαθεσιμότητα τους ήταν σχετικά φτωχή λόγω εκτεταμένου μεταβολισμού στο έντερο και στο ήπαρ, αφού οι συγκεντρώσεις αυτών των φαινολικών ενώσεων στα ούρα ήταν εξαιρετικά χαμηλές (Caruso et al., 2001).

Η φαρμακοκινητική ανάλυση ενδοφλέβια μετά από χορήγηση υδροξυτυροσόλης σε αρουραίους έδειξε μια εκτεταμένη και γρήγορη πρόσληψη αυτού του αντιοξειδωτικού από διαφορετικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών, των νεφρών, του ήπατος, των πνευμόνων, της καρδιάς και του εγκεφάλου (D'Angelo et al., 2001). Επίσης, σε μια μελέτη σε αρουραίους, η από του στόματος χορήγηση αυξανόμενων δόσεων της ένωσης αυτής, έδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη διανέμεται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο όχι μόνο στα ούρα και στο πλάσμα, αλλά επίσης και στο ήπαρ, τα νεφρά και τον εγκέφαλο (Lopez de las Hazas et al., 2015), με τα νεφρά και το ήπαρ να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές απορρόφησης σε υδροξυτυροσόλη και στους μεταβολίτες της.

1.1.4 Βιολογική δράση Φαινολικών ενώσεων και Υγεία

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές δείχνουν σταδιακά αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις της διατροφής, καθώς και για τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα. Ο κύριος λόγος για το ενδιαφέρον αυτό είναι η μεγάλη αφθονία τους στη διατροφή και ο πιθανός ρόλος τους στην προστασία από την εμφάνιση και ανάπτυξη εκφυλιστικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Knoops et al., 2004; Linos et al., 2007; Trichopoulou et al., 2003; Willett, 2006). Οι μελέτες αυτές συνοδεύτηκαν από μεγάλο αριθμό προτάσεων σχετικά με τον ακριβή μοριακό μηχανισμό δράσης των φαινολικών ενώσεων, ο οποίος παρόλα αυτά παραμένει εν πολλοίς άγνωστος.

8

1.1.4.1 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα από βιολογικής άποψης παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τις αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντϊικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών. Συγκεκριμένα το καφεϊκό οξύ καθώς και οι συνθετικοί του εστέρες εμφανίζουν αντιοξειδωτικές (Maurya and Devasagayam, 2010; Hwang, et al., 2012), αντιφλεγμονώδεις (Chiang et al., 2005; Shin et al., 2004) και αντικαρκινικές (Lee et al., 2012) ιδιότητες. Πειραματική μελέτη, που έχει πραγματοποιηθεί σε καρκινική κυτταρική σειρά ινοβλαστώματος HT-1080, έχει δείξει την ικανότητα του καφεϊκού οξέος να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Prasaud et al., 2011). Επιπλέον, το φερουλικό οξύ, έχει φανεί ότι προστατεύει από το σακχαρώδη διαβήτη, τον καρκίνο, τη νόσο του Αλτσχάιμερ και καρδιαγγειακές παθήσεις (Balasubashini et al., 2004; Sultana et al., 2005; Perluigi et al., 2006; Kawabata et al., 2000; Zhao and Moghadasian, 2008).

Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται ότι ο φαιναιθυλο-εστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE) έχει αντϊκές (Erdemli et al., 2015; Fesen et al., 1994), αντιοξειδωτικές (Son and Lewis, 2002), αντιφλεγμονώδεις (Fitzpatrick et al., 2001) και αντικαρκινικές ιδιότητες (Chen et al., 2001; Liao et al., 2003; Kudugunti et al., 2010), ενώ συμβάλλει και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Akyol et al., 2013). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η προστατευτική του δράση σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η ισχαιμία (Tan et al., 2005; Wei et al., 2004) και η αθηροσκλήρωση (Hishikawa et al., 2005). Ο καθηγητής Wang και οι συνεργάτες του, έδειξαν στην κυτταρική σειρά HUVE, ότι ο φαιναίθυλο-εστέρας του καφεϊκού οξέος ενεργοποιεί την έκφραση της οξυγονάσης της αίμης 1, HO-1 (Wang et al., 2008, 2010).

Η πραγματική βιοχημική βάση όμως των μηχανισμών αυτών παραμένει ελάχιστα κατανοητή και τα συσσωρευμένα πειραματικά δεδομένα είναι ιδιαίτερα αμφιλεγόμενα, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροπροστατευτικών και κυτταροτοξικών επιδράσεων, που ασκούνται από τις ίδιες ενώσεις σε διαφορετικές συνθήκες (Nakayama et al., 1996; Yang et al., 2010; Natarajan et al., 1996; Wang et al., 2010; Scapgnini et al., 2002; Zhong et al., 2011).

1.1.4.2 Φαινολικές Αλκοόλες

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης ελαιολάδου και την πρόληψη του καρκίνου (Pérez-Jiménez et al., 2005) και έχουν αναδείξει τον σημαντικό βιολογικό ρόλο των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου. Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών (Frankel et al., 1993), έχουν θετικές επιδράσεις απέναντι στην αθηροσκλήρωση (Noguchi and Niki, 2000) και μειώνουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων (Hertog et al., 1993). Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να μειώσει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (Carluccio et al., 2007), την παραγωγή θρομβοξάνης-Α2 προκαλώντας τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, την παραγωγή λευκοτριενίων, προφλεγμονωδών μορίων και τη δραστηριότητα της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού οξέος (Visioli et al., 2002). Επίσης, αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Gonzalez-Correa et al., 2008), έχει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Manna et al., 2005; Granados-Principal et al., 2010; Scoditti et al., 2012) και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων μαστού (Siriani et al., 2010; Bulotta et al. 2011; Bouallagui et al., 2011), καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Guichard et al., 2006), του μελανώματος (D'Angelo et al., 2005) και του προστάτη (Quiles et al., 2002). 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 (Mauri et al., 2005, Carluccio et al., 2003).

1.1.5 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων

Οι περισσότεροι ερευνητές αποδίδουν τις σημαντικές ευεργετικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων στην ικανότητά τους να δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, την οποία όμως αναφέρουν απλώς ως αντιοξειδωτική ικανότητα και με αυτό τον τρόπο πιστεύεται ότι συνεισφέρουν στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας και στην πρόληψη εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων. Έτσι, επικράτησε μια θεωρία η λεγόμενη «θεωρία των αντιοξειδωτικών» η οποία έγινε γρήγορα αποδεκτή και κυριάρχησε χωρίς όμως να βασίζεται σε επαρκή πειραματικά δεδομένα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι φαινολικές ενώσεις που δρουν ως αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στον ανθρώπινο οργανισμό και προστατεύουν έτσι τα βασικά κυτταρικά συστατικά από τις ανεξέλεγκτες οξειδώσεις των ελευθέρων ριζών.

Όμως, οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την επαλήθευση της θεωρίας αυτής έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα (Warnholtz and Munzel, 2000). Επομένως, θα μπορούσε να υποστηρίζει κανείς ότι ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος προστασίας από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες in vivo είναι η αναστολή της δημιουργίας τους. Αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί είτε με αναστολή της ομολυτικής διάσπασης των υπεροξειδίων (αναγωγή ενός ηλεκτρονίου), που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου, όπως θα δούμε παρακάτω, είτε με την ενίσχυση της ενζυμικής ικανότητας των κυττάρων για τη γρήγορη απομάκρυνση των υπεροξειδίων (δηλαδή αναγωγή δύο ηλεκτρονίων του H₂O₂ σε H₂O και των οργανικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες) (Forman et al., 2014; Ursini et al., 1995). Οι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται σε πλήθος τροφίμων της Μεσογειακής διατροφής, θα μπορούσαν πιθανόν να συνεισφέρουν και στους δύο παραπάνω μηχανισμούς προστασίας από τα υπεροξείδιω.

Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το ότι ορισμένες ενώσεις της διατροφής έχουν ιδιότητες, που αφενός μεν επιτρέπουν την προστασία των κυττάρων από τις ανεξέλεγκτες οξειδώσεις, αφετέρου δε ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία προκαλούν την έκφραση πρωτεϊνών, που ενισχύουν την ενζυμική προστατευτική ικανότητα των ίδιων των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Finkel and Holbrook, 2000). Συγκεκριμένα όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό διεγερτών, που προέρχονται από το περιβάλλον, έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται, αυξάνοντας την αμυντική τους ικανότητα, ώστε να είναι καλύτερα προετοιμασμένα σε μια ενδεχόμενη νέα έκθεση. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι κεντρικό ρόλο στο μοριακό μηχανισμό αυτής της προσαρμογής των κυττάρων παίζει ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2).

Ο μοριακός μηχανισμός ενεργοποίησης του Nrf2 περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση μιας ηλεκτρόφιλης ένωσης με ευαίσθητα κατάλοιπα κυστεϊνών στην πρωτεΐνη Keap1, η οποία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένη με τον Nrf2 και προκαλεί το συνεχή κατακερματισμό του μέσω του πρωτεασώματος (Tong et al., 2006) (Εικόνα 4). Η διασύνδεση της ηλεκτρόφιλης ένωσης με την Keap1 οδηγεί στην αποδέσμευσή της από τον Nrf2, ο οποίος σταθεροποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου έχει την ικανότητα να συνδέεται σε ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο DNA

(AREs, antioxidant response elements, ή EpREs, electrophile response elements), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο, την έκφραση γονιδίων, σχετικών με την άμυνα και την επιβίωση των κυττάρων.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ένας αριθμός από ενώσεις της Μεσογειακής διατροφής έχουν την ικανότητα να προκαλούν ενεργοποίηση του Nrf2 και την επαγωγή της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων (Hur and Gray, 2011). Είναι ενδιαφέρον να τονίσουμε, όμως, ότι αρκετές από τις πυρηνόφιλες ενώσεις της διατροφής θα μπορούσαν να οξειδωθούν και να μετατραπούν σε ηλεκτρόφιλα μόρια, για να έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως ενεργοποιητές του Nrf2.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του Keap1/Nrf2 σηματοδοτικού μονοπατιού από οξειδωμένες πολυφαινόλες της διατροφής. Μια οξειδωμένη πολυφαινόλη (ορθο-κινόνη) αντιδρά με μια ευαίσθητη κυστεΐνη στην πρωτεΐνη Keap1 και συνδέεται ομοιοπολικά μ' αυτήν (προσθήκη κατά Michael). Η εν λόγω σύνδεση αποσπά την Keap1 από τον παράγοντα Nrf2, ο οποίος απελευθερώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο DNA (AREs, antioxidant response elements, ή EpREs, electrophile response elements), ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015).

Μελέτες αναφέρουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του καφεϊκού, φερουλικού οξέος (Maurya and Devasagayam, 2010; Hwang et al., 2012; Kikuzaki et al., 2002), καθώς και το ρόλο του φαιναιθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος να δρα ως εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών (Wu et al., 2007) και να ρυθμίζει τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως καταλάση, SOD και GPx (Uysal et al., 2015; Akyol et al., 2014). Πρόσφατες αναφορές αποδεικνύουν το ρόλο του καφεϊκού οξέος στην ενεργοποίηση του Nrf2 μεταγραφικού παράγοντα (Sirota et al., 2015), καθώς και την προστατευτική δράση του φαιναιθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος και του φερουλικού οξέος, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα του μονοπατιού Nrf2-Keap1

(Kim et al., 2013; Kim et al., 2014; Song et al., 2016). Άλλες μελέτες αναφέρουν τη δράση της υδροξυτυροσόλης ως εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Hashimoto et al., 2004; Rietjens et al., 2007; Goya et al., 2007; Schaffer et al., 2010; Bernini et al., 2012; De La Cruz et al., 2015; Peng et al., 2015) και την ικανότητα αυτής να επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της οξυγονάσης της αίμης 1 (HO-1), μέσω του μονοπατιού Nrf2-Keap1 (Nguyen et al., 2004; Martin et al., 2010; Zrelli et al., 2011; Zou et al., 2012; Peng et al., 2015).

1.1.6 Φαινολικές ενώσεις και Απόπτωση

Η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπως περιγράφεται εκτενώς παρακάτω, εμπλέκεται σε ποικίλες καταστάσεις, που έχουν σχέση με την ομοιοστασία των κυττάρων. Πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών αναφέρουν την πρόκληση της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων από τα φαινολικά οξέα και τις φαινολικές αλκοόλες και προσπαθούν να εξηγήσουν το μηχανισμό δράσης τους. Ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης της απόπτωσης από τις φαινολικές ενώσεις αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης, αφού είναι πιθανό η προαποπτωτική τους ικανότητα να αποτελεί τη βάση της αντικαρκινικής τους δράσης (Chen et al., 1996; Wang et al., 2005; Kampa et al., 2004; Erdemli et al., 2016).

Πρόσφατα, προτάθηκε η προαποπτωτική δράση του καφεϊκού οξέος και του φαιναίθυλο-εστέρα του, η οποία φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα αυτών να μεταβάλλουν την έκφραση μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (Chang et al., 2010), ή ενεργοποιώντας την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax (Chen et al., 2001) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Άλλη μελέτη υποστηρίζει την προαποπτωτική δράση του φαιναιθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος, δρώντας μέσω της αναστολής του παράγοντα NF-kB και της ενεργοποίησης του παράγοντα Fas (Watabe et al., 2004), ή ενεργοποιώντας την p38-MAPK ή επάγοντας την έκφραση της πρωτεΐνης p53 (Lee et al., 2003). Επίσης, έχει αναφερθεί η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να επάγει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους (Fabiani et al., 2006, 2009, 2011; Ragione et al., 2000).

13

Εξίσου σημαντική είναι η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να προστατεύουν από την απόπτωση (Khanduja et al., 2006; Erboga et al., 2016; Buratini et al., 2013), αλλά παρόλα αυτά η βιβλιογραφία, όσον αφορά στο θέμα αυτό είναι σαφώς πιο περιορισμένη. Η αντιαποπτωτική δράση του φαιναίθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος αποδόθηκε στην ικανότητά του να μπλοκάρει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και να αναστέλλει την ενεργοποίηση των κασπασών (Amodio et al., 2003). Άλλη έρευνα έχει δείξει την προστατευτική δράση της υδροξυτυροσόλης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ρυθμίζοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια ERK, Akt και JNK (Incani et al., 2010). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της ικανότητας των φαινολικών οξέων και των αλκοολών να προστατεύουν από την απόπτωση δεν είναι γνωστός και η περαιτέρω διερεύνηση είναι αναγκαία.

1.1.7 Ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να δεσμεύουν μέταλλα

Ένας διαφορετικός μηχανισμός δράσης των φαινολικών ενώσεων, ο οποίος παρά τη μεγάλη του σημασία, συνήθως δε λαμβάνεται υπ' όψιν στην εξήγηση των βιολογικών τους δράσεων, είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, ιδιαιτέρως σιδήρου και χαλκού. Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων όπως του καφεϊκού οξέος και της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύουν μέταλλα έχει αποδοθεί στη δομή τους και κυρίως στην ύπαρξη της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας στο φαινολικό τους δακτύλιο (Genaro-Mattos et al., 2015; Ikeda et al., 2011; Sestili et al., 2002; Mira et al., 2002; Andjelkovic et al., 2006; Le Nest et al., 2004; Khokhar and Apenten, 2003). Πάντως πιθανολογείται, ότι η δέσμευση μετάλλων μετάπτωσης και ιδιαίτερα του σιδήρου μπορεί να επιδράσει θετικά στις ευεργετικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στην αντίδραση Fenton και συνεπώς την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου από το H₂O₂. Όμως, παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα σε αυτό το πεδίο, η σημασία της δέσμευσης σιδήρου σε ζωντανά ανέπαφα κύτταρα δεν έχει μέχρι σήμερα διευκρινιστεί.
1.2 Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό Στρες

1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ. Μ. Ο.)

Με την εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα υπήρξε σταδιακή μετατροπή των αναερόβιων συνθηκών σε αερόβιες, η οποία είχε ως συνέπεια την εξελικτική ανάπτυξη μηχανισμών προστασίας ενάντια στην τοξικότητα του O₂. Η χρησιμοποίηση του οξυγόνου από τους οργανισμούς, ως τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, έκανε εφικτή την αποδέσμευση και ταυτόχρονα την εκμετάλλευση πολύ μεγαλύτερων ποσοτήτων ενέργειας από τον καταβολισμό των τροφών κατά την κυτταρική αναπνοή. Παρά το γεγονός ότι η παρουσία του οξυγόνου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξης της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα, σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια, τον καθιστούν το σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Bruyninckx et al., 1978, Shigenaga et al., 1994).

Το μοριακό οξυγόνο (O₂) προσλαμβάνοντας 4 ηλεκτρόνια ανάγεται σε δύο μόρια ύδατος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο «κυτοχρωμική οξειδάση», η οποία αποτελεί το τελευταίο σύμπλοκο στην ακολουθία των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (αντίδραση 1).



Το ενζυμικό σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει ειδική δομή (2 μόρια αίμης και 2 άτομα Cu στο ενεργό του κέντρο), η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων στο O₂, πριν τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης (δύο μόρια H₂O) αφεθούν ελεύθερα. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας, πρωτόνια από το εσωτερικό της μιτοχονδριακής μήτρας μεταφέρονται στο διαμεμβρανικό χώρο, σχηματίζοντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό. Το δυναμικό αυτό χρησιμοποιείται από μια ειδική πρωτεΐνη (σύμπλοκο V), την ΑΤΡαση των μιτοχονδρίων, για τη φωσφορυλίωση του ADP και το σχηματισμό ATP. Με τον τρόπο αυτό καταναλώνεται περίπου το 85% με 90% του προσλαμβανόμενου από τον οργανισμό O₂. Το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου που δε χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια (10-15%), συμμετέχει σε αντιδράσεις που καταλύονται από τις οξειδάσες (D-άμινο-οξειδάση, οξειδάση της ξανθίνης κ.α.), τις υδροξυλάσες (λυσίνης, προλίνης και τυροσίνης) καθώς και από διάφορες μονοξυγονάσες (κυτοχρώματα P-450). Όμως, ένα μικρό ποσοστό του O₂ που καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια (υπολογίζεται μεταξύ του 0.2 και του 2%) ανάγεται, ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια, δίνοντας μια σειρά από παραπροϊόντα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με μονά ηλεκτρόνια σε H_2O και οι δράσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT, GP και Prx.

Τα προϊόντα αυτά, όπως το ανιόν του σουπεροξείδιου (O_2) , το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2) και οι ρίζες υδροξυλίου (OH), αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες μέσα στο περιβάλλον του κυττάρου και για αυτό το λόγο ονομάζονται και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.). Οι Δ.Μ.Ο. (Reactive Oxygen Species, ROS) σχηματίζονται συνεχώς, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα βιολογικά μακρομόρια είτε άμεσα είτε έμμεσα προκαλώντας οξειδωτικές τροποποιήσεις. Αυξημένη δημιουργία αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του οξυγόνου θεωρείται υπεύθυνη για μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς (Ames, 1983; Fridovich, 1999; Griendling and Harrison, 1999; McCord, 1974). Έτσι κατά την αργή πορεία της εξέλιξης από τις αναερόβιες στις αερόβιες συνθήκες, οι περισσότεροι οργανισμοί προσαρμόστηκαν, εκφράζοντας ειδικά αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία προστατεύουν από τις τοξικές επιδράσεις του οξυγόνου. Τα ένζυμα δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) και οι περόξυρεδοξίνες (Prx) χρησιμοποιούνται ως η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις Δ.M.O.

1.2.2 Κατάσταση οξειδωτικού στρες των κυττάρων

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, εξισορροπείται κατά κανόνα στους αερόβιους οργανισμούς από τη δράση των ενδοκυττάριων αντιοξειδωτικών συστημάτων. Η ισορροπία αυτή είναι δυναμική με δυνατότητα αλλαγής προς την μία ή την άλλη πλευρά. Σε περιπτώσεις διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τα επίπεδα των προοξειδωτικών παραγόντων αυξάνονται πέρα από τα φυσιολογικά, είτε λόγω επιτάχυνσης του ρυθμού δημιουργίας τους, είτε λόγω μείωσης της ικανότητας απομάκρυνσής τους, τότε λέμε ότι το κύτταρο εισέρχεται σε μια κατάσταση γνωστή ως "οξειδωτικό στρες" (Oxidative Stress) (Sies, 2015). Στην κατάσταση αυτή η οξειδοαναγωγική ισορροπία έχει μετατοπιστεί στο εσωτερικό περιβάλλον των κυττάρων και έτσι τα κυτταρικά τους συστατικά είναι ευάλωτα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις (Sies and Cadenas, 1985). Τέτοιες διαταραχές είναι δυνατόν να προκληθούν είτε από εξωγενείς (ακτινοβολίες, τραυματισμοί, χορήγηση φαρμάκων, ανοξία κ.τ.λ.) είτε από ενδογενείς παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να συνδέονται και με παθολογικές καταστάσεις.

Η πρώτη Δ.Μ.Ο. που δημιουργείται στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το O_2^{-7} , το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 μέσω των ενζύμων SODs. Ωστόσο, ούτε το O_2^{-7} ούτε το H_2O_2 είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και επομένως από μόνοι τους δεν μπορούν να οξειδώσουν, παρά μόνο ελάχιστα ενδοκυττάρια συστατικά. Το 1894 ο H.J.H. Fenton περιέγραψε την αντίδραση ενός μείγματος H_2O_2 με άλατα δισθενούς σιδήρου τα προϊόντα της οποίας μπορούσαν να οξειδώσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών μορίων (Fenton, 1894). Αν και είναι πιθανό να εμπλέκονται αρκετοί ενδιάμεσοι παράγοντες, η αντίδραση καταλήγει στη δημιουργία της εξαιρετικά δραστικής ρίζας του υδροξυλίου ('OH) (αντίδραση 2) :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow ενδιάμεσα προϊόντα \longrightarrow Fe^{3+} + OH + OH$$
(2)

Οι ΌΗ, λόγω της μεγάλης δραστικότητας τους, δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν και αντιδρούν με οτιδήποτε βρίσκεται δίπλα τους κατά τη στιγμή της δημιουργίας τους. Η δημιουργία των δραστικών αυτών ελευθέρων ριζών στα κύτταρα θα είχε καταστροφικές συνέπειες λόγω της ανεξέλεγκτης οξειδωτικής δράσης τους. Μπορούν να οξειδώσουν οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό και να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA των κυττάρων, λιπιδιακή υπεροξείδωση σε λιπίδια μεμβρανών, αλλοιώσεις στην δομή πρωτεϊνών και βλάβες σε υδατάνθρακες (Chevion, 1988; Gutteridge and Halliwell, 1982; Halliwell and Aruoma, 1991; Halliwell and Gutteridge, 1990; Henle et al., 1999; Meneghini, 1997; Stohs and Bagchi, 1995) (Εικόνα 6). Συνθήκες έντονου και παρατεταμένου οξειδωτικού στρες μπορούν να οδηγήσουν σε μη αντιστρεπτές βλάβες των κυτταρικών συστατικών προκαλώντας κυτταρικό θάνατο είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση (Antunes and Cadenas, 2001; Chandra et al., 2000).



Εικόνα 6: Επιπτώσεις στα βασικά κυτταρικά συστατικά (λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες) μετά από την οξείδωσή τους από δραστικές ελεύθερες ρίζες. (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015)

Μολονότι υπάρχουν και άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός, που μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση Fenton, μακροχρόνια έρευνα στο πεδίο του οξειδωτικού στρες από την ερευνητική μας ομάδα, έχει αποδείξει ότι ο ενδοκυττάριος οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος αποτελεί το βασικό καταλύτη της παραπάνω αντίδρασης στα βιολογικά συστήματα. Επιπλέον, δέσμευση των ενδοκυττάριων ιόντων σιδήρου, με ισχυρά σιδηροδεσμευτικά μέσα όπως η δεσφερριοξαμίνη (DFO), προστατεύει τα κύτταρα από τις δυσμενείς συνέπειες του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Melidou et al., 2005).

1.2.3 Καταλυτικά Ενεργός Σίδηρος (Labile Iron Pool, LIP)

Η ικανότητα του σιδήρου να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση προσλαμβάνοντας ή αποδίδοντας ηλεκτρόνια τον καθιστά ένα από τα πιο απαραίτητα στοιχεία για τη ζωή. Ταυτόχρονα όμως, αυτή η ικανότητα είναι υπεύθυνη και για τη συμμετοχή του σιδήρου σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών με τοξικές για το κύτταρο συνέπειες (Galaris and Pantopoulos, 2008). Για το λόγο αυτό, οι οργανισμοί διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς για τη δέσμευση του σιδήρου προκειμένου να αποφευχθούν οι τοξικές επιπτώσεις του.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, στον ορό του αίματος ο σίδηρος βρίσκεται εξ ολοκλήρου συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη τρανσφερρίνη, ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων αποθηκεύεται κατά κύριο λόγο στη φερριτίνη στη μη οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή Fe³⁺. Ωστόσο, στο κυτταρόπλασμα υπάρχει μια μικρή ποσότητα του σιδήρου που είναι δεσμευμένη με μικρή συγγένεια με χηλικούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους (κιτρικό, ATP, AMP, πυροφωσφορικό), πολυπεπτίδια και συστατικά μεμβρανών (φωσφολιπίδια) (Epsztejn et al., 1997). Λόγω της ασθενούς δέσμευσής του με τους προαναφερθέντες παράγοντες, ο σίδηρος αυτός θεωρείται οξειδοαναγωγικά ενεργός, ή καταλυτικά ενεργός καθώς δύναται να συμμετέχει σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οι οποίες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οδηγούν στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών με τοξικές επιπτώσεις για το κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό, οι δεσμευμένοι με τον οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο χηλικοί παράγοντες καθίστανται ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη δράση των ελεύθερων ριζών υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Στη βιβλιογραφία, ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος παρουσιάζεται ως συνώνυμο του όρου «Labile Iron Pool, LIP». Ο όρος αυτός προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Greenberg and Wintrobe το 1946 (Greenberg and Wintrobe, 1946) ενώ το 1977 τροποποιήθηκε σε «transient iron pool» (Jacobs A., 1977). Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε ο όρος «chelatable iron», καθώς οι περισσότερες μέθοδοι για την ανίχνευσή του στηρίζονταν στη χρήση εξειδικευμένων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων (Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002). Άλλοι όροι που του έχουν αποδοθεί είναι «ελεύθερος σίδηρος», «μεταβολικά και καταλυτικά ενεργός σίδηρος», «σίδηρος χαμηλού μοριακού βάρους» κ.ά. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλοι

αυτοί οι όροι χρησιμοποιούνται σήμερα ως συνώνυμα, αν και δεν ταυτίζονται απόλυτα μεταξύ τους.

Το LIP αποτελεί πηγή άμεσα διαθέσιμου σιδήρου για μεταβολικές διεργασίες, όπως είναι η σύνθεση της αίμης και των συμπλόκων σιδήρου-θείου στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, η παρουσία του ενέχει και σοβαρό κίνδυνο, καθώς η αντίδρασή του με το υπεροξείδιο του υδρογόνου αλλά και άλλα οργανικά υπεροξείδια, που αποτελούν μόρια με χαμηλή δραστικότητα, οδηγεί στην παραγωγή των ιδιαίτερα δραστικών 'OH (Gutteridge and Halliwell, 2000). Για το λόγο αυτό, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται ομοιοστατικοί μηχανισμοί του οργανισμού, τόσο σε συστημικό (ηπατιδίνη), όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (IRP-IRE σύστημα) (Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002) που περιορίζουν τα επίπεδά του. Η διατήρηση του LIP σε χαμηλά επίπεδα αποτελεί βασικό και αναπόσπαστο κομμάτι της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων η οποία όμως εξασφαλίζεται και μέσω διαφόρων ενζύμων που εξουδετερώνουν τις Δ.Μ.Ο. στα διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου (Kakhlon and Cabantchik, 2002; Breuer et al., 2008).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος μπορεί να εντοπιστεί και σε άλλα διαμερίσματα του κυττάρου, όπως στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρήνα (Petrat et al., 2002; Eaton and Quian, 2002; Tenopoulou et al., 2007). Όσον αφορά την παρουσία του LIP στον πυρήνα και το ρόλο που διαδραματίζει στις οξειδωτικές βλάβες του DNA, έχει παρατηρηθεί σε λεμφοκύτταρα ανθρώπου ότι υπάρχει μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του LIP και της 80xodGuo (8-0x0-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine), ενός τυπικού δείκτη οξειδωτικής βλάβης του DNA (Gackowski et al., 2002).

1.3 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος - Απόπτωση

Η ανακάλυψη ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι μία διαδικασία η οποία ελέγχεται βιοχημικά και είναι τόσο πολύπλοκη όσο άλλες σημαντικές βιολογικές διαδικασίες έχει προκαλέσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον. Οι Wyllie και Kerr διαπίστωσαν το 1970 την ύπαρξη ενός τύπου κυτταρικού θανάτου, διακριτού από τη νέκρωση, τον οποίο ονόμασαν απόπτωση (Kerr et al., 1972). Έτσι, ενώ η νέκρωση είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης και αποτελεί παθητική διαδικασία, η απόπτωση πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα και είναι ενεργητική διαδικασία. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη μορφολογία των νεκρωτικών κυττάρων η οποία χαρακτηρίζεται από διόγκωση, διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης και έκχυση των κυτταρικών συστατικών τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η αποπτωτική διαδικασία διακρίνεται από κυτταρική συρρίκνωση και εξωτερίκευση ενός φωσφολιπιδίου της πλασματικής μεμβράνης, της φωσφατιδυλοσερίνης, προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στον πυρήνα πραγματοποιείται συμπύκνωση της χρωματίνης, καθώς και πρόκληση ενδο-νουκλεοσωμικών σχάσεων με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του DNA σε κλάσματα πολλαπλάσια των 180 ζευγών βάσεων. Ο κατακερματισμένος πυρήνας και τα κυτταροπλασματικά κατάλοιπα σγηματίζουν κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια, στη συνέχεια, απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν την εξωτερίκευση κατάλοιπων της φωσφατίδυλο-σερίνης στην πλασματική μεμβράνη (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995).

Ο φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης, τόσο στην ανάπτυξη του οργανισμού όσο και στην ενήλικη ζωή του, αποτελεί αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας. Απορρύθμιση της απόπτωσης δύναται να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι αυξημένα ή συσσώρευση των ανεπιθύμητων κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι ανεπαρκή. Η αυξημένη απόπτωση έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Αλτζχάϊμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Hass, 2003) ενώ, η παρεμπόδιση της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να είναι σημαντική για την ανάπτυξη όγκων και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Thompson, 1995).

1.3.1 Μοριακοί μηχανισμοί αποπτωτικού θανάτου

Ο καταρράκτης των κασπασών

Η διαδικασία της απόπτωσης προκαλείται από μια σειρά σημάτων που ενεργοποιούνται ως απόκριση των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα σήματα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, ο οποίος αποτελεί το τελικό στάδιο της εκτέλεσης της απόπτωσης. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών με υψηλή ομολογία και είναι όλες κυστεϊνικές πρωτεάσες εξειδικευμένες να υδρολύουν κυρίως πεπτίδια σε σημεία καταλοίπων ασπαρτικού οξέος, ενώ περιέχουν μια συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων Gln-Ala-Cys-X-Gly (το X μπορεί να είναι R,Q ή D). Πριν την ενεργοποίησή τους βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων, τα οποία ονομάζονται πρωτεολυτική σχάση στο καρβοζυτελικό άκρο συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέος. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή, που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης και μικρής υπομονάδας (Liang and Fesik, 1997; Launay et al., 2005).

Οι κασπάσες διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη δομική τους ομολογία και τη λειτουργία τους. Στους ενεργοποιητές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10 (εναρκτήριες κασπάσες), στους εκτελεστές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -3, -6 και -7 (εκτελεστικές κασπάσες), και στους μεσολαβητές της φλεγμονής, που είναι οι κασπάσες -1, -4, -5, -11, -12, -13 και -14.

Μηχανισμός ενεργοποίησης των κασπασών

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο στο οποίο συγκλίνουν τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση αποτελώντας την κύρια οδό μέσω της οποίας ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών. Έτσι, όταν υπάρχει κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, επηρεάζονται τα μιτοχόνδρια και προκαλείται διάνοιξη πόρων διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Mitochondrion Permeability Transition Pores, MPTPs). Άμεσο αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται συνήθως απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων (ΔΨm), διόγκωση της

μιτοχονδριακής μήτρας και αύξηση της συγκέντρωσης των Δ.Μ.Ο.

Επακόλουθο της αποσταθεροποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι η απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι αυστηρά περιορισμένες στο μιτογονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα C (cyt-C). Το κυτόχρωμα C είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα ΙΙΙ (UQH2-αναγωγάση του κυτοχρώματος C) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος C) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έχει φυσιολογικό ρόλο ανεξάρτητο από την αποπτωτική του δράση. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα C παίρνει μέρος στο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου που καλείται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα Apaf-1 (apoptotic-protease activating factor), από το κυτόχρωμα C και από την προκασπάση-9, ενώ ο σχηματισμός του εξαρτάται από την παρουσία ΑΤΡ. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, με την σειρά της σχάζει και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές προκασπάσες -3, -6 και -7, ενώ η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να λειτουργήσει ενισχυτικά στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 μέσω ενός μηγανισμού ανατροφοδότησης του φαινομένου (Jiang and Wang, 2000; Shi, 2002).

1.3.2 Το Υπεροξείδιο του Υδρογόνου προκαλεί προαποπτωτική σηματοδότηση

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, ότι μικρές αλλαγές της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων που σχετίζονται με βασικές λειτουργίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο (Martindale and Holbrook, 2002). Έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων (Barbouti et al., 2002; Borutaite and Brown, 2001; Chandra et al., 2000; Hampton and Orrenius, 1997; Stridh et al., 1998). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι το H_2O_2 προκαλεί την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα επόμενα βήματα αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου (Alnemri, 1997; Stridh et al., 1998).

Παρόλο που η εμπλοκή του Η2O2 στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς έχει μελετηθεί αρκετά, οι ακριβείς μοριακοί μηγανισμοί παραμένουν άγνωστοι. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η δράση του H2O2 σαν σηματοδοτικό μόριο σχετίζεται με την οξείδωση σουλφυδρυλικών ομάδων σε κυστεϊνικά κατάλοιπα ορισμένων πρωτεϊνών (Gotoh and Cooper, 1998; Saitoh et al., 1998). Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεϊνών, το H2O2 δεν οξειδώνει οποιαδήποτε, αλλά δρα επιλεκτικά μόνο σε ορισμένες από τις κυστεΐνες αυτές. Σημαντικό ρόλο, στο αν μια κυστεΐνη θα οξειδωθεί, παίζει το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται και συγκεκριμένα η παρουσία φορτισμένων αμινοξέων σε γειτονικές θέσεις. Ανάμεσα στις ποικίλες πρωτεΐνες που επηρεάζονται από το H₂O₂ περιλαμβάνονται οι ΜΑΡ κινάσες, οι πρωτεϊνικές κινάσες Β και C, καθώς και ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες. Επίσης, πρόσφατες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από την πρόκληση απόπτωσης, υψηλές συγκεντρώσεις του H2O2 έχουν την ικανότητα και να αναστέλλουν τη διαδικασία της απόπτωσης στο στάδιο της ενεργοποίησης της κασπάσης-9, με συνέπεια την εκτροπή από τον κλασικό τύπο απόπτωσης σε ένα είδος θανάτου το οποίο προκαλείται από την έκλυση του AIF (Apoptosis Inducing Factor) από τα μιτοχόνδρια (Barbouti et al., 2002, 2007).

1.3.3 Η οικογένεια των ΜΑΡΚ

Οι ΜΑΡΚ (Mitogen Activated Protein Kinases) συνθέτουν μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε μονοπάτια μεταγωγής διαφόρων σημάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που οδηγούν στην απόπτωση. Οι ΜΑΡΚs φωσφορυλιώνοντας ειδικά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος κ.ά (Chang and Karin, 2001). Η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων των MAPKs λειτουργεί ως διακόπτης διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη δραστικότητα των καθοδικών πρωτεϊνών-στόχων τους. Επιπλέον, η διάρκεια και η ένταση φωσφορυλίωσης των ίδιων των MAPKs επηρεάζεται καθοριστικά από τη δράση των αντίστοιχων φωσφατασών τους. Το μονοπάτι των ΜΑΡΚs αποτελεί μέρος ενός καταρράκτη, που ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα, και περιλαμβάνει τρία διαδοχικά βήματα ενεργοποίησης (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, οι ΜΑΡΚs, φωσφορυλιώνονται από τις ΜΑΡ2Κ (Mitogen Activated Kinases Kinases), οι οποίες με την σειρά τους φωσφορυλίωνονται από τις ΜΑΡ3Κ, που αποτελούν την τρίτη συνιστώσα του σηματοδοτικού καταρράκτη. Στα θηλαστικά, οι ΜΑΡ κινάσες διαχωρίζονται σε τέσσερις βασικές υποοικογένειες ως εξής: 1) Κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα (ERK 1/2, Extracellular signal Regulated Kinases), 2) c-Jun N-terminal Kinases (JNK1,JNK2,JNK3,) 3) p38 κινάσες (p38α, p38β, p38γ και p38δ) και 4) ERK5 ή αλλιώς BMK1.



Εικόνα 7: Υπερ-οικογένεια MAP κινασών. Το μονοπάτι των MAPKs ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα. Οι MAPKs φωσφορυλιώνονται από τις MAP2K (Mitogen Activated Kinases Kinases), οι οποίες με την σειρά τους φωσφορυλίωνονται από τις MAP3K. Οι MAPKs διαχωρίζονται σε τέσσερις βασικές υποοικογένειες: ERK 1/2, SAPK/JNK 1,2,3 και p38 κινάσες (Morrison, 2012).

Για την πλήρη ενεργοποίηση των ΜΑΡΚ απαιτείται η διπλή φωσφορυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr) που χωρίζονται από ένα μόνο αμινοξύ, ορίζοντας ένα τριπεπτιδικό μοτίβο, Thr-X-Tyr. Για παράδειγμα, η JNK παρουσιάζει το μοτίβο Thr-Pro-Tyr, ενώ στην p38 μεταξύ Thr και Tyr παρεμβάλλεται γλυκίνη (Gly). Η ικανότητα των MAP2Ks να αναγνωρίζουν διαφορετικές MAPKs εξαρτάται εν μέρει από αυτό το τριπεπτιδικό μοτίβο, συνεισφέροντας στην εξειδίκευση των μηχανισμών με τους οποίους ενεργοποιούνται

οι MAPKs (Pearson et al., 2001). Οι MAPKs ενεργοποιούνται από πληθώρα διεγερτών. Ειδικότερα, οι κινάσες p38 και JNK, οι οποίες αναφέρονται και ως SAPKs (Stress-Activator Protein Kinases) θεωρείται ότι ανταποκρίνονται κυρίως σε στρεσογόνες καταστάσεις (Matsuzawa and Ichijo, 2005) ενώ oi ERKs ενεργοποιούνται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες. Βέβαια αυτή η κατηγοριοποίηση φαίνεται να είναι υπεραπλουστευμένη, μιας και η δράση των ΜΑΡ κινασών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και το εκάστοτε ερέθισμα (Chang and Karin, 2001).

c-Jun N-terminal Kinases (JNK) και απόπτωση

Υπάρχουν τρία μέλη στην οικογένεια των JNKs πρωτεϊνικών κινασών, η JNK1, JNK2 και η JNK3 (Johnson and Nakamura, 2007). Οι δύο πρώτες εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα και τους ιστούς σε αντίθεση με την JNK3 που ανιχνεύεται κυρίως στον εγκέφαλο και λιγότερο στην καρδιά και τους όρχεις. Ο ρόλος τους περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1991 από την ερευνητική ομάδα του Pulverer, η οποία διαπίστωσε ότι η JNK κινάση είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης c-Jun (μέρος του μεταγραφικού παράγοντα AP-1) σε δύο κατάλοιπα σερίνης (Ser-63,-73), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων (Pulverer et al., 1991). Σήμερα είναι ευρέως γνωστό ότι οι JNKs ενεργοποιούνται από διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως είναι το οξειδωτικό στρες, η ιονίζουσα ακτινοβολία, το θερμικό σοκ, η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και η διέγερση από κυτοκίνες (π.χ TNF-a) (Guyton et al., 1996; Iordanov and Magun, 1999; Verheij et al., 1996) και θεωρείται ότι κατέχουν αποφασιστικό ρόλο, μεταξύ άλλων, και στη διαδικασία της απόπτωσης (Cano and Mahadevan, 1995; Chen and Tan, 2000; Chen et al., 1996; Sluss et al., 1994).

Οι JNKs ενεργοποιούνται μέσω διπλής φωσφορυλίωσης από τις MKK4 και MKK7 των MAP2Ks, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιηθούν από 14 διαφορετικές MAP3K, εκ των οποίων η πιο καλά χαρακτηρισμένη και αναγνωρισμένη για την συμμετοχή και τον ρόλο της στην απόπτωση είναι η ASK-1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1) (Matsuzawa and Ichijo, 2001; Nagai et al., 2007). Η πρώτη παρατήρηση που τεκμηρίωσε ξεκάθαρα τον κεντρικό ρόλο που διαδραματίζουν οι JNKs στη διαδικασία της απόπτωσης έγινε το 1996 από την ερευνητική ομάδα του Y.R. Chen, η οποία έδειξε ότι η έκθεση Jurkat κυττάρων σε γακτινοβολία οδήγησε στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK1 και τελικά στην απόπτωση των κυττάρων (Chen et al., 1996). Εν συνεχεία, ακολούθησαν πολλές παρόμοιες μελέτες που επιβεβαίωναν τον ρόλο των JNKs στην απόπτωση (Verheij et al., 1996; Wilson et al., 1996; Zanke et al., 1996).

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, οι JNKs μπορούν να δράσουν μέσω δύο κατευθύνσεων χωρίς να αναιρεί η μια την άλλη. Μπορούν είτε να μετακινηθούν στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων είτε να φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών που επηρεάζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, οδηγώντας στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C, στο κυτταρόπλασμα (Bogoyevitch and Kobe, 2006; Davis, 2000; Dhanasekaran and Reddy, 2008). Πιο συγκεκριμένα, ως προς την δράση της JNK στο επίπεδο των μιτοχονδρίων, έχει αναφερθεί ότι η JNK μπορεί να έχει ως υποστρώματά της τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Aoki et al., 2002; Chauhan et al., 2003; Kharbanda et al., 2000; Schroeter et al., 2003). Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι η φωσφορυλίωση των αντιαποπτωτικών πρωτεΐνων Bcl-2 και Bcl-XL από την JNK οδηγεί σε καταστολή της δράσης τους με αποτέλεσμα η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax να μπορεί να δρα χωρίς περιορισμό προκαλώντας τη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Deng et al., 2001; Kharbanda et al., 2000; Yamamoto et al., 1999). Αντίστοιχα, έχει αναφερθεί ότι προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως το Bim, το Bad και το jBid μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από την JNK. Οι ενεργοποιημένες αυτές προαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες μπορούν εν συνεχεία να ενισχύσουν τη δράση του Bax για την διάνοιξη πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Donovan et al., 2002; Lei and Davis, 2003; Putcha et al., 2003). Σε μια ερευνητική μελέτη αποδείχθηκε ότι η JNK μπορεί να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη Bax σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165), προκαλώντας την ενεργοποίηση και την άμεση μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας τελικά στην απόπτωση (Kim et al., 2006).

1.4 Ο ρόλος του σιδήρου στα βιολογικά συστήματα

Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, διότι αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την εύρυθμη λειτουργία πολλών βασικών διαδικασιών στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως η μεταφορά οξυγόνου, η μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA και ο μεταβολισμός των ξενοβιωτικών ουσιών (Aisen et al., 2001).

Η βιολογική δράση του σιδήρου είναι απόρροια της ικανότητάς του να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση προσλαμβάνοντας ή αποδίδοντας ηλεκτρόνια (Winter et al., 2014). Ωστόσο, από την άλλη πλευρά η ευκολία με την οποία ο σίδηρος μπορεί να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Fenton, αποτελεί τη βασική αιτία για τις περισσότερες τοξικές επιδράσεις του, αφού αποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής δραστικών ελευθέρων ριζών στον οργανισμό και με αυτόν τον τρόπο επάγει το οξειδωτικό στρες (Halliwell and Gutteridge, 1990; Papanikolaou and Pantopoulos, 2005). Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα του σιδήρου τόσο σε κυτταρικό και όσο και σε συστημικό επίπεδο ρυθμίζονται επακριβώς (Ganz, 2013). Η μείωση της διαθεσιμότητας σιδήρου, ούτως ώστε να μην μπορεί να αντιδράσει με υπεροξείδια προς σχηματισμό ισχυρών οξειδωτικών παραγόντων, αποτελεί ζήτημα υψηλής προτεραιότητας για την άμυνα των οργανισμών ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Στην ουσία, είναι η δεύτερη αλλά αποφασιστική γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στην ανεξέλεγκτη οξείδωση των συστατικών του. Γι' αυτό το λόγο, οι οργανισμοί διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς για τη δέσμευση του σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν την ομοιοστασία του σιδήρου στον οργανισμό τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο οργανισμού, προστατεύοντας από την πρόκληση σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, οι περισσότερες από τις οποίες σχετίζονται με βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Kell, 2009).

1.4.1 Ομοιοστασία σιδήρου σε επίπεδο οργανισμού

Κατανομή και απορρόφηση του σιδήρου στον οργανισμό

Η συνολική ποσότητα του σιδήρου ενός ενήλικα στον οργανισμό υπολογίζεται στα 3,5-5 gr και είναι υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες.

Καθημερινά με τη διατροφή προσλαμβάνεται κατά μέσο όρο 1-2 mg σιδήρου. Ο σίδηρος της διατροφής που απορροφάται από τα κύτταρα περιλαμβάνει: (α) το σίδηρο της αίμης, που προέρχεται κυρίως από την αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη που είναι πλούσιες στο κόκκινο κρέας, και (β) τον μη-αιμικό σίδηρο (ανόργανα άλατα σιδήρου), που είναι παρόντα σε πολλά φυτικά και ενισχυμένα προϊόντα διατροφής.

Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων (1800 mg). Ενώ ένα άλλο μεγάλο μέρος είναι αποθηκευμένο στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος (1000 mg) στη φερριτίνη, μία πρωτεΐνη αποθήκευσης του σιδήρου. Από το υπόλοιπο ένα μέρος βρίσκεται στους μυς, συνδεδεμένο κυρίως στην μυοσφαιρίνη (περίπου 300 mg), στο μυελό των οστών (300 mg) και στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (600 mg), ενώ σε μικρότερες ποσότητες συναντάται ως συστατικό άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών και ενζύμων. Ένα μικρό ποσοστό σιδήρου (περίπου 3 mg) κυκλοφορεί στο πλάσμα του αίματος συνδεδεμένο με την κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου στο αίμα, την τρανσφερρίνη του ορού (Εικόνα 8) (Besarab et al., 2009).



Εικόνα 8: Κατανομή του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου χρησιμοποιείται στους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών για τον σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα. Η ίδια ποσότητα σιδήρου ανακυκλώνεται από τα μακροφάγα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος. Η ημερήσια απορρόφηση σιδήρου από τη διατροφή αντιστοιχεί σε 1-2 mg/ημερησίως και αναπληρώνει τις σχετικές απώλειες από τον οργανισμό (Besarab et al., 2009).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει φυσιολογικός μηχανισμός απομάκρυνσης του σιδήρου από τον οργανισμό. Επομένως, τα 1-2 mg σιδήρου που προσλαμβάνονται ημερησίως από τη διατροφή χάνονται μέσω του ιδρώτα, την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα και του δέρματος και με την έμμηνο ρύση στις γυναίκες (Galaris and Pantopoulos, 2008).

Μεταφορά του σιδήρου από τον εντερικό αυλό στην κυκλοφορία του αίματος

Η απώλεια σιδήρου είναι υποχρεωτική και δεν υπάρχουν συγκεκριμένα μέσα για να ρυθμιστεί. Ως εκ τούτου, η ομοιοστασία του σιδήρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αυστηρή ρύθμιση της απορρόφησης. Ο σίδηρος που περιέχεται στις τροφές, απορροφάται στο δωδεκαδάχτυλο (το πρώτο τμήμα του λεπτού εντέρου) και την εγγύς νήστιδα (proximal jejunum, το τμήμα του λεπτού εντέρου αμέσως μετά το δωδεκαδάχτυλο).

Η πρόσληψη του σιδήρου της διατροφής από τα εντεροκύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς μηχανισμούς, είτε με τη μορφή αιμικού ή μη αιμικού σιδήρου. Τα 2/3 του προσλαμβανόμενου σιδήρου της διατροφής (αιμικός σίδηρος) εισέρχονται στα εντεροκύτταρα μέσω ενός ειδικού μεταφορέα της αίμης, τον HCP1 (Heme Carrier Protein 1) (Shayeghi et al., 2005). Μόλις η αίμη εισέλθει εντός των κυττάρων, καταβολίζεται από την οξυγονάση της αίμης 1 (HO-1), προκαλώντας τη διάσπαση της αίμης και απελευθερώνει το Fe^{+2} από αυτή (Ferris et al., 1999) (Εικόνα 9). Το υπόλοιπο 1/3 του προσλαμβανομένου σιδήρου (ανόργανα άλατα σιδήρου) απορροφάται διαφορετικά από τα εντεροκύτταρα. Ο τρισθενής σίδηρος (Fe³⁺) ανάγεται στη δισθενή μορφή του (Fe²⁺) με τη βοήθεια της «σιδηροαναγωγάσης», Dcytb (Duodenal cytochrome b) που εντοπίζεται στη μεμβρανική επιφάνεια των εντεροκυττάρων (Εικόνα 9). Στη συνέγεια, ο δισθενής σίδηρος (Fe²⁺) εισέργεται στα εντεροκύτταρα από το μεταφορέα δισθενών μετάλλων (DMT1) (McKie et al., 2000; Nunez, 2010; Anderson and Frazer, 2005; Elsayed et al., 2016). Μεταλλάξεις του γονιδίου της DMT1 σε μοντέλα πειραματόζωων (m/k-/ποντίκια και Belgrade αρουραίοι) οδηγούν σε σοβαρή υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία λόγω της μειωμένης απορρόφησης και ανακύκλωσης του σιδήρου.



Εικόνα 9: Μεταφορά του σιδήρου από τον αυλό του εντέρου στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντεροκυττάρων. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων που λαμβάνουν χώρα κατά την απορρόφηση του αιμικού και μη αιμικού σιδήρου από τα εντεροκύτταρα. Ο μη αιμικός σίδηρος ανάγεται στον αυλό του εντέρου (πιθανότατα από το κυτόχρωμα Dcytb) και, στη συνέχεια, ο Fe^{2+} μεταφέρεται εντός των κυττάρων μέσω του μεταφορέα δισθενών μετάλλων DMT1. Η μεταφορά του Fe^{2+} στην κυκλοφορία του αίματος γίνεται μέσω της φερροπορτίνης, η οποία είναι συνδεδεμένη με την ηφαιστίνη, που οξειδώνει τον Fe^{2+} σε Fe^{3+} πριν αυτός συνδεθεί στην τρανσφερρίνη του ορού. Αντιθέτως, ο αιμικός σίδηρος εισέρχεται στα εντεροκύτταρα μέσω ενός ειδικού μεταφορέα της αίμης, τον HCP1 (Heme Carrier Protein 1). Στο εσωτερικό του κυττάρου η αίμη καταβολίζεται από την οξυγονάση της αίμης 1 (HO-1) και απελευθερώνει το Fe^{+2} από την αίμη. DCYTB: Duodenal Cytochrome B, DMT1: Divalent Metal Transporter 1, HCP1: Heme Carrier Protein 1, FPN: Ferroportin, Tf: Transferrin, Hp: hephaestin, Cp: ceruloplasmin (Murgia et al., 2012).

Σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν προηγουμένως, στο κυτταρόπλασμα του εντεροκυττάρου προκύπτει μια κοινή «δεξαμενή» δισθενούς σιδήρου (Transit Iron Pool), που προέρχεται τόσο από τον αιμικό όσο και από το μη αιμικό σίδηρο. Από τη «δεξαμενή» αυτή, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού για σίδηρο, τα ιόντα σιδήρου είτε αποθηκεύονται στη φερριτίνη των εντεροκύτταρων είτε μεταφέρονται διαμέσου της βασικής επιφάνειας αυτών στην κυκλοφορία του αίματος, όπου αποδίδονται στην τρανσφερρίνη του πλάσματος, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην αποφυγή των τοξικών επιπτώσεών τους. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται διαμέσου της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης φερροπορτίνης (FPN). Η φερροπορτίνη αποτελεί το κύριο σημείο ελέγχου και ρύθμισης των επιπέδων του σιδήρου στον οργανισμό. Η μεταφορά επιτελείται μόνο στο μέτρο που ο οργανισμός χρειάζεται σίδηρο. Όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι επαρκή, μια ορμόνη, η ηπατιδίνη (hepcidin), εκλύεται από το ήπαρ, συνδέεται η μεταφορά του σιδήρου από το

εσωτερικό των κυττάρων προς το αίμα (Ganz and Nemeth, 2006). Αντίθετα, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι χαμηλά, η ηπατιδίνη μειώνεται και η φερροπορτίνη εισάγει νέο σίδηρο στην κυκλοφορία του αίματος. Ο σίδηρος που μεταφέρεται από την φερροπορτίνη βρίσκεται στην ανηγμένη του μορφή (Fe²⁺) και πρέπει να οξειδωθεί (Fe³⁺) για να προσδεθεί στην τρανσφερρίνη του ορού, την κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου. Η κατάλυση αυτή πραγματοποιείται είτε από την πρωτεΐνη ηφαστίνη (hephaestin), μια διαμεμβρανική οξειδάση που βρίσκεται δίπλα στη φερροπορτίνη (Petrak and Vyoral, 2005), είτε στο αίμα από τη σερουλοπλασμίνη (ceruloplasmin), η οποία και αυτή όπως και ηφαιστίνη οξειδώνουν το δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, ώστε τα ιόντα σιδήρου να δεσμευτούν στην τρανσφερρίνη (Εικόνα 9). Αξίζει να σημειωθεί ότι η στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου της φερροπορτίνης σε εντεροκύτταρα ποντικών οδηγεί σε ταχεία ανάπτυξη αναιμίας και συσσώρευση του σιδήρου στα εντεροκύτταρα, υποδηλώνοντας με τον τρόπο αυτό τη σημασία της φερροπορτίνης στο μεταβολισμό του σιδήρου (Donovan et al., 2005).

Λόγω του ότι δεν υπάρχει φυσιολογικός μηχανισμός απομάκρυνσης του σιδήρου από τον οργανισμό, οποιαδήποτε ανωμαλία παρουσιαστεί στο μηχανισμό μεταφοράς του έχει σοβαρές επιπτώσεις στη γενικότερη ομοιόστασή του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση είτε ανεπάρκειας (αναιμία), είτε υπερφόρτωσης (αιμοχρωμάτωση), ανάλογα με την περίπτωση.

Ανακύκλωση του σιδήρου στον οργανισμό

Ένα μικρό μέρος του σιδήρου που είναι δεσμευμένο στην τρανσφερρίνη προέρχεται από τη διατροφή μέσω των εντεροκυττάρων. Το μεγαλύτερο μέρος προέρχεται από την ανακύκλωση του ενδογενούς σιδήρου στον οργανισμό, μια έντονη και συνεχής διαδικασία (Εικόνα 10).

Οι κύριοι καταναλωτές σιδήρου στον οργανισμό είναι οι ερυθροβλάστες, οι οποίοι προσλαμβάνουν το σίδηρο μέσω ενδοκύττωσης του υποδοχέα της τρανσφερρίνης 1 (TfR1) που εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Περίπου 2-3 εκατομμύρια νέα ερυθροκύτταρα απελευθερώνονται κάθε δευτερόλεπτο στην κυκλοφορία του αίματος από το μυελό των οστών. Φυσιολογικά περίπου 20-30 mg σιδήρου χρειάζονται καθημερινά για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Όπως προαναφέρθηκε ο σίδηρος στον ορό είναι περίπου 3 mg. Αν και αυτό αποτελεί ένα μικρό ποσοστό αποτελεί το πιο δυναμικό τμήμα του σιδήρου στον οργανισμό. Ο προσδεδεμένος σίδηρος στην τρανσφερρίνη έχει την ικανότητα να ανακυκλώνεται περισσότερες από 10 φορές την ημέρα (Cazzola, 1985) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ανακύκλωση του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο σίδηρος του ορού (περίπου 3 mg) είναι προσδεδεμένος στην τρανσφερρίνη και έχει την ικανότητα να ανακυκλώνεται περισσότερες από 10 φορές την ημέρα (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015).

Αυτό είναι κύριας σημασίας καθώς απαιτείται για να προμηθεύσει τον απαιτούμενο σίδηρο για τις καθημερινές απαιτήσεις της ερυθροποίησης. Καθώς η απορρόφηση του σιδήρου από την διατροφή καθημερινά είναι μόνο 1-2 mg, ο σίδηρος που απαιτείται για αυτή τη διεργασία προέρχεται κυρίως από τον κατακερματισμό των γηρασμένων ερυθροκυττάρων που πραγματοποιείται στα μακροφάγα του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος (περίπου 20 mg την ημέρα) (Gudjoncik et al., 2014).

Κατά τη φαγοκύτωση, κατακερματίζεται η αιμοσφαιρίνη και απελευθερώνεται η αίμη, από την οποία, στη συνέχεια, απελευθερώνεται ο σίδηρος μέσω της δράσης της οξυγονάσης της αίμης-1. Σημαντικός ρυθμιστής για τη διαδικασία της ερυθροποίησης είναι η τρανσφερρίνη, η οποία αντιπροσωπεύει τον κύριο μεταφορέα σιδήρου στα κύτταρα και κυρίως στους ερθροβλάστες στο μυελό των οστών. Η τρανσφερρίνη ρυθμίζει την ανακύκλωση και αποθήκευση του σιδήρου μεταφέροντας το σίδηρο στους ιστούς που το χρειάζονται για χρησιμοποίησή του ή για αποθήκευση (Knutson and Wessling-Resnick, 2003).

Ο ρόλος της ηπατιδίνης

Η δυναμική ισορροπία μεταξύ της εισόδου και της απομάκρυνσης του σιδήρου από τον ορό του αίματος, εάν διαταραχθεί, μπορεί εύκολα να δημιουργήσει προβλήματα στη φυσιολογική ροή σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης (ερυθροποίηση). Για αυτό και η ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου καθίσταται κριτικής σημασίας καθώς η διαταραχή της μπορεί να οδηγήσει είτε σε ανεπάρκεια (ανάπτυξη αναιμίας) είτε σε υπερφόρτωση σιδήρου (αιμοχρωμάτωση) με δυσάρεστες επιπτώσεις για τον οργανισμό. Κεντρικό ρόλο στην κατανόηση των μηχανισμών αυτών έπαιξε η ανακάλυψη της ηπατιδίνης (hepcidin), η οποία σε συνδυασμό με τη φερροπορτίνη ρυθμίζει τα επίπεδα του διαθέσιμου σιδήρου στο αίμα (Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001, Abboud and Haile, 2000; Donovan et al., 2000; Krause, et al., 2000; Ganz and Nemeth, 2011, 2012; Ganz, 2013). Η ανακάλυψη της ηπατιδίνης βοήθησε επίσης στην κατανόηση της παθολογίας μιας σειράς διαταραχών που σχετίζονται με το σίδηρο (Munoz-Bravo et al., 2013; Waldvogel-Abramowski et al., 2014).

Η ηπατιδίνη αποτελεί την κύρια ορμόνη ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου σε συστημικό επίπεδο και για το λόγο αυτό θεωρείται ως πιθανός στόχος θεραπευτικών προσεγγίσεων (Rochette et al., 2015). Συντίθεται στο ήπαρ ως ένα προπεπτίδιο 84 αμινοξέων, αλλά απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος ως ενεργό πεπτίδιο 25 αμινοξέων (~2.7 kDa) πλούσιο σε κυστεϊνικά κατάλοιπα, όπου δεσμεύεται στην α2-μακροσφαιρίνη (Peslova et al., 2009), ενώ αποβάλλεται μέσω των νεφρών.



Εικόνα 11: Αλληλουχία και δομή του ώριμου πεπτιδίου της ηπατιδίνης του ανθρώπου. Το ώριμο και ενεργό πεπτίδιο της ηπατιδίνης αλληλουχίας 25 αμινοξέων, σχηματίζει μια δομή απλής φουρκέτας και σταθεροποιείται με τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυστεϊνικών κατάλοιπων του. Το αμινοτελικό Ν-άκρο του (6 αμινοξέα) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη φερροπορτίνη (Rochette et al., 2015).

Το ώριμο ενεργό προϊόν, που αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή του προ-πεπτιδίου, υπάρχει σε τρεις μορφές των 20, 22 και 25 αμινοξέων και ανιχνεύεται στον ανθρώπινο ορό και στα ούρα (Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Ganz, 2003). Σύμφωνα με δομικές μελέτες NMR (Nuclear Magnetic Resonance) περιέχει οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης και σχηματίζει μια δομή απλής φουρκέτας, η οποία σταθεροποιείται με τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεϊνης (Ganz, 2005) (Εικόνα 11).

Η συμμετοχή της ηπατιδίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου διαπιστώθηκε, όταν αποδείχτηκε ότι η έκφρασή της επάγεται από το διαιτητικά προσλαμβανόμενο σίδηρο (Pigeon et al., 2001). Επιπλέον, μελέτες σε μοντέλα ποντικών που δεν εκφράζουν ηπατιδίνη (USF2^{-/-} ποντίκια) καταδεικνύουν την υπερφόρτωση αυτών με σίδηρο και την εκδήλωση φαινοτύπου παρόμοιου με αυτόν της αιμοχρωμάτωσης (Nicolas et al., 2001). Αντίθετα, υπερέκφραση της ηπατιδίνης σε διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρής σιδηροπενικής αναιμίας και ακολούθως σε αυξημένη θνησιμότητα λίγες ώρες μετά τη γέννησή τους (Nicolas et al., 2002). Η εμπλοκή της ηπατιδίνης στην παθογένεση διαταραχών της ομοιοστασίας του σιδήρου στον άνθρωπο αποδείχτηκε μετά την ταυτοποίηση μεταλλάξεων του γονιδίου της ηπατιδίνης σε ασθενείς με νεανική αιμοχρωμάτωση (Roetto et al., 2003; 2004).

Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της ηπατιδίνης αποσαφηνίστηκαν την τελευταία δεκαετία, όταν βρέθηκε ότι η ηπατιδίνη προσδένεται στην πρωτεΐνη φερροπορτίνη (Fpn), η οποία είναι υπεύθυνη για την έξοδο του σιδήρου από τα κύτταρα. Εκφράζεται κυρίως σε τρία είδη κυττάρων, τα ηπατοκύτταρα, τα εντεροκύτταρα και τα μακροφάγα, επιτρέποντας ή διευκολύνοντας την έξοδο του σιδήρου από τα κύτταρα αυτά (Donovan et al., 2000; Nemeth et al., 2004) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Η πρόσδεση της ηπατιδίνης στη φερροπορτίνη αναστέλλει την έξοδο του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα, τα ηπατοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η ηπατιδίνη αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή των επιπέδων σιδήρου στον ορό του αίματος. Παράγεται από το ήπαρ κατόπιν ειδικής σηματοδότησης και αναστέλλει τόσο τη μεταφορά σιδήρου από το έντερο όσο και την έξοδο του σιδήρου από τα μακροφάγα που κατακερματίζουν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015).

Η φερροπορτίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC40A1 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (2q32). Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και από 571 αμινοξικά κατάλοιπα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της φερροπορτίνης οδηγούν σε αυτοσωμικές διαταραγές υπερφόρτωσης σιδήρου (Detivaud et al., 2013). Η ηπατιδίνη προσδένεται ισχυρά σε μια δομική περιοχή της εξωκυττάριας θηλιάς της φερροπορτίνης. Έχει προταθεί ότι η θειολική ομάδα του καταλοίπου Cys326 της φερροπορτίνης σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης της ηπατιδίνης (Clark et al, 2011). Μετάλλαξη του καταλοίπου Cys326S οδήγησε σε αδυναμία πρόσδεσης της ηπατιδίνης στη φερροπορτίνη. Η πρόσδεση αυτή επάγει τη φωσφορυλίωση της φερροπορτίνης και το σύμπλοκο ηπατιδίνη-φερροπορτίνη εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Εκεί η φερροπορτίνη αποφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια ουβικουτυλιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση στα λυσοσωμάτια (De Domenico et al., 2007). Η κινάση η οποία είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της φερροπορτίνης είναι η JAK2 (Janus kinase 2), η οποία προσδένεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της. Αρχικά η ίδια αυτοφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τη φερροπορτίνη, εισάγοντάς την στο ενδοκυττάριο χώρο για αποικοδόμηση (De Domenico et al., 2008) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης της ηπατιδίνης (Hepcidin) στη φερροπορτίνη. Η πρωτεΐνη φερροπορτίνη αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και από 571 αμινοξικά κατάλοιπα. Η ηπατιδίνη προσδένεται ισχυρά σε μια δομική περιοχή της εξωκυττάριας θηλιάς της φερροπορτίνης και επάγει τη φωσφορυλίωση της φερροπορτίνης Υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση αυτή είναι η κινάση JAK2 (Janus kinase 2) (Rochette et al., 2015).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο οργανισμός διατηρεί τα επίπεδα ηπατιδίνης σταθερά. Υψηλά επίπεδα ηπατιδίνης στην κυκλοφορία του αίματος προκαλούν μείωση της πρόσληψης σιδήρου από τα εντεροκύτταρα και μειωμένη απελευθέρωση από τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του σιδήρου σ' αυτά. Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα ηπατιδίνης συνεπάγονται αύξηση της πρόσληψης σιδήρου από το δωδεκαδάκτυλο και της απελευθέρωσης του από τα φαγοκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα (Ganz and Nemeth, 2006).

Λόγω του κυρίαρχου ρόλου της ηπατιδίνης στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου, η ηπατιδίνη έχει γίνει στόχος εντατικών βιοχημικών μελετών. Ωστόσο, δυσκολίες που παρατηρούνται στην εκτίμηση των επιπέδων της ηπατιδίνης σε διάφορες ασθένειες οφείλονται στην έλλειψη κατάλληλης δοκιμασίας για τη μέτρησή τους. Οι περισσότερες μέθοδοι στηρίζονται στη χρήση φασματοφωτομετρίας μάζας (SELDITOF-MS ή LCMS/MS) αλλά παρόλο που τα αποτελέσματά τους είναι ελπιδοφόρα, αυτές μέχρι στιγμής είναι ημιποσοτικές και απαιτούν τη χρήση εξειδικευμένων οργάνων. Τελευταία, η ερευνητική ομάδα της κ. Μαμαλάκη στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στην Αθήνα έχει επιτύχει την έκφραση μιας ανασυνδυασμένης μορφής της ηπατιδίνης (Hep-25His) στο ευκαρυωτικό σύστημα του ζυμομύκητα Pichia Pastoris, η οποία είναι λειτουργική ως προς την αντιμικροβιακή δράση και τον κυτταρικό μεταβολισμό του σιδήρου (Koliaraki et al., 2008).

Επίσης, η δράση του άξονα ηπατιδίνης-φερροπορτίνης αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ομοιοστασίας του σιδήρου και έχει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία. Η ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών σκευασμάτων, με σκοπό την τροποποίηση των μοριακών μηχανισμών στους οποίους στηρίζεται η δράση αυτού του άξονα, αποτελεί αντικείμενο έντονων ερευνητικών προσπαθειών. Μόρια ή αντισώματα τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν κάποιο σημείο στη μεταγωγή του σήματος αυτής της συγκεκριμένης διαδικασίας, καθώς και η χρήση αγωνιστικών και ανταγωνιστικών φαρμάκων, δηλαδή ενώσεων που μιμούνται τη δράση της ηπατιδίνης ή αναστέλλουν την πρόσδεση φερροπορτίνης-ηπατιδίνης αντίστοιχα θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέες θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση παθήσεων που σχετίζονται με την ομοιόσταση του σιδήρου.

37

Ο ρόλος της τρανσφερρίνης στον ορό του αίματος

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο σίδηρος στον ορό του αίματος βρίσκεται συνδεδεμένος στην τρανσφερρίνη (transferrin, Tf). Η τρανσφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεϊνη (β-σφαιρίνη ηπατικής προέλευσης), μοριακού βάρους 79.57 kDa και συναντάται στον ορό του αίματος σε συγκεντρώσεις 1.8-3.5 g/dl. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ καθώς και στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και στους ενδοκρινείς αδένες. Στην κυκλοφορία του αίματος δεσμεύεται αντιστρεπτά και με μεγάλη συγγένεια (Kd= 24.2 x 10⁶) με δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου (Fe³⁺) (Evans et al., 2012; Cheng et al., 2004; Chung, 1984; Elsayed et al., 2016), ένα στο κάθε λοβό της τρανσφερρίνης, αμινοτελικό (N) και καρβοζυτελικό (C) άκρο αντίστοιχα (Εικόνα 14). Κρυσταλλογραφική ανάλυση έχει δείξει ότι για την πρόσδεση του σιδήρου εμπλέκονται δύο τυροσίνες, μια ιστιδίνη, ένα ασπαρτικό οξύ και ένα διττανθρακικό ανιόν (CO₃²⁻) (Baker, 1992). Το τελευταίο είναι το κύριο μόριο που βοηθά στη σύνδεση και σταθεροποίηση των ατόμων σιδήρου.



Εικόνα 14: Δομή της τρανσφερρίνης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου. Σε μεγέθυνση αναπαρίσταται ο ακριβής τρόπος σύνδεσης του σιδήρου στην τρανσφερρίνη (Harris, 2012).

Η τρανσφερρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των ατόμων σιδήρου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και την απόδοσή τους σε κύτταρα που χρειάζονται σίδηρο για τις ανάγκες τους (όπως η ερυθροποίηση) και εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα τρανσφερρίνης 1 (TfR1). Μόνο τα μόρια της τρανσφερρίνης που έχουν συνδεδεμένα άτομα σιδήρου και στους δύο λοβούς (δισιδηρική τρανσφερρίνη, Tf-Fe₂) έχουν την ικανότητα να συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς. Αντίθετα τα μόρια της τρανσφερρίνης που έχουν ένα (μονοσιδηρική) ή κανένα άτομο σιδήρου (αποτρανσφερρίνη) πρακτικά δεν συνδέονται με τον υποδοχέα διότι εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με αυτόν.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση της τρανσφερρίνης στον ορό αίματος κυμαίνεται από 25 έως 45 μM και μόνο ένα ποσοστό περίπου 20-30% από τις θέσεις δέσμευσής στην τρανσφερρίνη είναι κατειλημμένες από τα 3 mg σιδήρου του ορού, αφήνοντας τις υπόλοιπες θέσεις διαθέσιμες για τη δέσμευση κάθε νέου ιόντος σιδήρου που θα εμφανιστεί. Ενώ, η συγκέντρωση του σιδήρου που δεν είναι δεσμευμένος στην τρανσφερρίνη στον ορό του αίματος (NTBI, non transferrin bound iron), κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ισούται πρακτικά με μηδέν (<10⁻¹² M), ώστε να μην είναι ικανή να προκαλέσει βλάβες μέσω του σχηματισμού δραστικών ελευθέρων ριζών ακόμα και σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης υπεροξειδίων.

Εκτός από τη μεταφορά και την κατάλληλα διανομή, η δέσμευση των ιόντων σιδήρου στην τρανσφερρίνη παρουσιάζει ενδιαφέρον αφού έχει τη δυνατότητα να στερεί από τους μικροοργανισμούς, που ενδέχεται να εισέλθουν στον οργανισμό, την πρόσβασή τους σε σίδηρο, που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Επίσης, δεν επιτρέπει αντιδράσεις τύπου Fenton να λάβουν χώρα, συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στην προστασία βιολογικών συστημάτων από ανεξέλεγκτες οξειδώσεις και συντελεί στην αύξηση της διαλυτότητας του Fe³⁺, ο οποίος είναι πρακτικά αδιάλυτος στο νερό.

1.4.2 Ομοιοστασία σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο

Πρόσληψη του σιδήρου στα κύτταρα

Η ομοιοστασία του σιδήρου ρυθμίζεται όχι μόνο σε επίπεδο οργανισμού αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο, αφού ο σίδηρος όπως αναφέρθηκε αποτελεί τον κύριο καταλύτη για τη δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών ('OH) (αντίδραση Fenton), που οξειδώνουν όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά.

Η δισιδηρική τρανσφερρίνη (Tf-Fe₂) συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς τρανσφερρίνης (Transferrin Receptor 1, TfR1) στην επιφάνεια των κυττάρων με σκοπό τη μεταφορά του σιδήρου στο εσωτερικό τους (Klausner et al., 1983; Ponka et al., 1998). Όταν κάποιο είδος κυττάρου χρειάζεται επιπλέον σίδηρο, εκφράζει στην επιφάνειά του αυτούς τους υποδοχείς. Οι ερυθροβλάστες στον μυελό των οστών προσλαμβάνουν μ' αυτόν τον τρόπο μεγάλες ποσότητες σιδήρου (περίπου 1 mg την ώρα), τον οποίο χρησιμοποιούν για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης-1 (TfR1) δύναται να δεσμεύσει δύο μόρια δισιδηρικής τρανσφερρίνης, με συγγένεια Kd=1.1 nM (Worthen and Enns, 2014). Το σύμπλεγμα τρανσφερρίνησίδηρος-υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 (Tf-Fe₂³⁺-TfR1) ενδοκυττώνονται μέσα σε κυστίδια επενδεδυμένα με κλαθρίνη (Cheng et al., 2004) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα μέσω του υποδοχέα της τρανσφερρίνης TfR1. Η δισιδηρική τρανσφερρίνη συνδέεται στον υποδοχέα TfR1 στην επιφάνεια των κυττάρων και ενδοκυττώνεται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης. Η οξέωση των κυστιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του σιδήρου από την τρανσφερρίνη και τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα μέσω του DMT1. Ο προσλαμβανόμενος σίδηρος χρησιμοποιείται κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ η περίσσεια αποθηκεύεται στη φερριτίνη. Ένα μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου παραμένει χαλαρά συνδεδεμένο σε διάφορες θέσεις και είναι καταλυτικά ενεργό (LIP, labile iron pool) (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015).

Στη συνέχεια, τα κυστίδια συντήκονται με τα ενδοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα, κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (πρώιμα ενδοσωμάτια) και αργότερα κοντά στον πυρήνα (όψιμα ενδοσωμάτια). Στη μεμβράνη των ενδοσωματίων υπάρχουν αντλίες H⁺, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μείωση του pH των οργανιδίων αυτών. Το χαμηλό pH (pH~5.5) οδηγεί στην αποδέσμευση τόσο του τρισθενούς σιδήρου από την τρανσφερρίνη όσο και της τρανσφερρίνης από τον υποδοχέα της (Dautry-Varsat et al., 1983). Στη συνέχεια, ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή από την πρωτεΐνη Steap3, μέλος της οικογένειας των μεταλλοαναγωγασών STEAP (six-transmembrane epithelial antigen of prostate protein) (Ohgami et al., 2005, 2006) και ακολούθως μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα σιδήρου DMT1 (Fleming et al., 1998; Su et al., 1998; Canonne-

Hergaux et al., 2001). Παράλληλα, ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 και η αποτρανσφερρίνη επιστρέφουν στην επιφάνεια του κύτταρου με το μηχανισμό της εξωκύττωσης, όπου ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-1 παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ η αποτρανσφερρίνη ελευθερώνεται στην κυκλοφορία ώστε να δεσμεύσει εκ νέου ιόντα σιδήρου (Εικόνα 15). Η συγκεκριμένη ακολουθία γεγονότων αποτελεί την κύρια οδό πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα μέσω του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1.

Ο νεοεισερχόμενος στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σίδηρος μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο όπως η αίμη, αλλά και για τη σύνθεση συμπλόκων σιδήρου-θείου, είτε να αποθηκευτεί στη φερριτίνη. Η μεταφορά του σιδήρου για τη σύνθεση της αίμης και των συμπλόκων σιδήρου-θείου στα μιτοχόνδρια, πραγματοποιείται μέσω ενός μεταφορέα, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, την πρωτεΐνη «μιτοφερρίνη» (mitoferrin) (Shaw et al., 2006).

Η περίσσεια του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεν αξιοποιείται για μεταβολικές διαδικασίες αποθηκεύεται στη φερριτίνη του κυτταροπλάσματος σε μια βιοδιαθέσιμη και μη οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή, προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα από τις τοξικές επιπτώσεις του σιδήρου. Η φερριτίνη αποτελείται από 24 υπομονάδες βαριών (heavy chain) και ελαφριών αλυσίδων (light chain) που δημιουργούν μια κοίλη σφαίρα ικανή να αποθηκεύσει περίπου 4500 ιόντα τρισθενούς σιδήρου (Arosio and Levi, 2010).

Ωστόσο, υπάρχει μια μικρή ποσότητα σιδήρου (<5% του συνολικού σιδήρου) στο κυτταρόπλασμα, η οποία είναι «ελεύθερη» και οξειδοαναγωγικά ενεργή (Labile Iron Pool, LIP) καθώς δύναται να συμμετέχει σε τοξικές για το κύτταρο αντιδράσεις (Epsztejn et al., 1997) (Εικόνα 15). Για το λόγο αυτό, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται ομοιοστατικοί μηχανισμοί του οργανισμού, τόσο σε συστημικό (ηπατιδίνη), όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (IRP-IRE σύστημα) (Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002) που περιορίζουν τα επίπεδά του.

Αντιθέτως, ο υποδοχέας τρανσφερρίνης-2, που είναι ομόλογος του πρώτου και εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα ηπατοκύτταρα και στα αιμοποιητικά κύτταρα (Kawabata et al., 1999), δε δύναται να εξισορροπήσει την ανεπάρκεια σιδήρου που προκαλείται από την απουσία του υποδοχέα τρανσφερρίνης-1. Ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης-2 (TfR2) ρυθμίζει την απορρόφηση του σιδήρου στον οργανισμό. Η

ικανότητά του για πρόσδεση της δισιδηρικής τρανσφερρίνης είναι 25 φορές μικρότερη από αυτή του υποδοχέα της τρανσφερρίνης-1 (Kawabata et al., 1999; Sposi et al., 2000). Αυτή η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης στην τρανσφερρίνης, ενισχύει την υπόθεση για τη δράση του υποδοχέα της τρανσφερρίνης-2 ως «αισθητήρας» για το σίδηρο (iron sensor), δηλαδή να αντιλαμβάνεται τις μεταβολές στον κορεσμό της τρανσφερρίνης και στα επίπεδα σιδήρου στο αίμα όταν αυτά είναι επικίνδυνα αυξημένα. Σε περιπτώσεις περίσσειας σιδήρου στην κυκλοφορία, ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης-2, στο ήπαρ, αναγνωρίζει και προσδένει δισιδηρική τρανσφερρίνη, δίνοντας σήμα να εκκριθεί ηπατιδίνη από τα ηπατοκύτταρα, μπλοκάροντας έτσι την έξοδο σιδήρου από τα κύτταρα στην κυκλοφορία. Συγκεκριμένα αυξάνει τα επίπεδα της ηπατιδίνης (2 φορές περισσότερο), μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της πρωτεΐνης BMP (bone morphogenetic protein) (Worthen and Enns, 2014). An ω λεια της λειτουργικότητας του υποδοχέα της τρανσφερρίνης-2, έχει ως αποτέλεσμα το ήπαρ να παράγει 2 φορές λιγότερη ηπατιδίνη, η οποία ρυθμίζει αρνητικά την πρόσληψη του σιδήρου από τη διατροφή, με αποτέλεσμα την αργή συσσώρευση του σιδήρου στο ήπαρ, στην καρδιά, στις αρθρώσεις, στο πάγκρεας. Έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις του υποδοχέα τη τρανσφερρίνης-2 προκαλούν την υπερφόρτωση σιδήρου στον οργανισμό και την ενφάνιση ασθενειών όπως, η κληρονομική αιμοχρωμάτωση (HH, hereditary hemochromatosis) (Worthen and Enns, 2014).

Επίσης, ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης-2 εκφράζεται εκτός από τα ηπατοκύτταρα και στα αιμοποιητικά κύτταρα διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ερυθροποίησης. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι αλληλεπιδρά και σταθεροποιεί τον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EPOR, erythropoietin receptor), της ορμόνης που εκκρίνεται από τους νεφρούς και δίνει σήμα στο μυελό των οστών να δημιουργήσει ερυθρά αιμοσφαίρια, στην κυτταρική μεμβράνη (Silvestri et al., 2014). Σε καταστάσεις ενδείας σιδήρου ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης-2 δεν ενεργοποιεί την ηπατιδίνη, αλλά αυξάνει την ευαισθησία της ερυθροποιητίνης στα ερυθροκύτταρα, σταθεροποιώντας τον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (Nai et al., 2015; Pantopoulos, 2015).

Ρύθμιση επιπέδων μέσου του άζονα IRP-IRE

Κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας ομοιοστασίας του σιδήρου κατέγουν οι «πρωτεΐνες ρύθμισης σιδήρου» (Iron Regulating Protein 1 and 2, IRP1 και IRP2). Οι εν λόγω πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να "αισθάνονται" μικρές αλλαγές στα επίπεδα διαθέσιμου σιδήρου στο κυτταρόπλασμα και, βάσει αυτών, να ρυθμίζουν ανάλογα την είσοδο και την αποθήκευσή του στα κύτταρα (Wilkinson and Pantopoulos, 2014). Οι IRPs (IRP1 και IRP2) έχουν την ικανότητα να "ανιχνεύουν" ενδοκυττάριες αλλαγές των επιπέδων του διαθέσιμου σιδήρου τις στο κυτταρόπλασμα και να τροποποιούν τη δομή τους, ούτως ώστε να δεσμεύονται ή να μη δεσμεύονται σε ειδικές αλληλουχίες στα μη μεταφραζόμενα άκρα των mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεϊνες που έχουν σχέση με την πρόσληψη και την αποθήκευση του σιδήρου, όπως στοιχεία του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερρίνης-1 (TfR1), της φερριτίνης, της φερροπορτίνης και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου (Hentze et al., 2004; Fillebeen et al., 2005; Papanikolaou and Pantopoulos, 2005). Οι αλληλουχίες αυτές στα mRNAs καλούνται "ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στο σίδηρο" (IREs, ironresponsive elements) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Διαγραμματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού ανίχνευσης και ρύθμισης των επιπέδων άμεσα διαθέσιμου σιδήρου στο κυτταρόπλασμα, μέσω του συστήματος IRP/IRE. Σε συνθήκες επάρκειας ενδοκυττάριου σιδήρου, οι IRPs (iron regulatory proteins) έχουν προσδεδεμένο σίδηρο στο μόριό τους και δεν μπορούν να προσδεθούν στα αντίστοιχα IREs (iron responsive elements). Όταν υπάρχει έλλειψη σιδήρου, Η σύνδεση των IRPs στα IREs έχει διαφορετικά αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, ανάλογα με το εάν το IRE βρίσκεται στο 5' ή στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του συγκεκριμένου mRNA. Τα μειωμένα επίπεδα σιδήρου έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της IRP1 και τη σύνδεσή της στο 3' άκρο του mRNA του γονιδίου του υποδοχέα της τρανσφερρίνης 1, με τελικό αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του mRNA και την αύξηση της σύνθεσης του υποδοχέα. Ταυτόχρονα, η IRP1 συνδέεται στα 5' άκρα των mRNAs των γονιδίων της φερριτίνης και της φερροπορτίνης, αναστέλλοντας τη σύνθεσή τους (Muckenthaler et al., 2008; Recalcatti et al., 2010) (Εικόνα 16). Ο συνδυασμός αυτών των γεγονότων συνεπάγεται τη γρήγορη αύξηση των επιπέδων του άμεσα διαθέσιμου σιδήρου εντός των κυττάρων. Αντίθετα, όταν υπάρχει επάρκεια σιδήρου, οι IPRs αδρανοποιούνται και δεν δεσμεύονται στα αντίστοιχα IREs, προκαλώντας τα αντίστροφα αποτελέσματα (Walden et al., 2006; Muckenthaler et al., 2008).

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ο μηχανισμός ρύθμισης των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου επηρεάζεται κατά τέτοιον τρόπο, ώστε να υπάρχει περίσσεια φερριτίνης και μείωση των υποδοχέων τρανσφερρίνης, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο διαθέσιμος καταλυτικά ενεργός σίδηρος και ο κίνδυνος για τη δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών. Θα μπορούσε να υποστηρίζει κανείς ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου αντικατοπτρίζουν σε γενικές γραμμές τα ολικά επίπεδα σιδήρου στο κύτταρο. Συνεπώς, η ανίχνευση των επιπέδων του από τις IRPs δίνει το έναυσμα για την αντίδραση των κυττάρων σε συνθήκες υπερφόρτωσης ή έλλειψης.

1.4.3 Καταλυτικά ενεργός σίδηρος (LIP) και παθολογικές καταστάσεις

Αρκετές ερευνητικές μελέτες υποστηρίζουν πως τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες εμπλέκονται σε μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Korantzopoulos et al., 2003; Kruszewski, 2004; Eleuteri et al., 2009), η επανοξυγόνωση μετά από

φερριτίνης (Γαλάρης, Πρόγραμμα Κάλλιπος, 2015).

ισχαιμία (Galaris et al., 2006; Chevion M., 2008), οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (Weiss and Goodnough, 2005), οι νόσοι Parkinson's και Alzheimer's (Zhou et al., 2001; Gregory and Hayflick, 2005; Hayflick, 2006; Youdim, 2008) κ.ά. Ακόμη, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε συνεργασία με το σίδηρο εμπλέκονται σε διαδικασίες μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα (redox signaling) ως δεύτεροι διαμεσολαβητές και ως εκ τούτου κατέχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση (Richardson et al., 2009; Galaris et al., 2008), καθώς και στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Yu et al., 2003; Tenopoulou et al., 2005; Barbouti et al., 2007; Michalis et al., 2016).

1.4.3.1 Χορήγηση σιδήρου σε αιμοκαθαιρόμενους νεφροπαθείς

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και ιδιαίτερα στους ασθενείς τελικού σταδίου ή αυτούς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (Foley et al., 1998; Baigent et al., 2000). Πέρα όμως από τη συμμετοχή του στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου, το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι διαδραματίζει βασικό ρόλο και στην εξέλιξη της ίδιας της νεφρικής νόσου (Haugen and Nath,1999; Alfrey, 1994). Έτσι οξειδωτικοί παράγοντες φαίνεται ότι εμπλέκονται σε διαταραχές της νεφρικής αιματικής ροής, αλλά και σε διαταραχές που αφορούν την ενεργοποίηση μεσολαβητών της φλεγμονής και μορίων προσκόλλησης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, αλλά και ότι η ίδια η νεφρική νόσος επιδεινώνει τα ήδη αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Τα δύο βασικά αίτια της νεφρικής ανεπάρκειας είναι ο σακχαρώδης διαβήτης και η αρτηριακή υπέρταση, που αντιπροσωπεύουν περίπου τα 2/3 των αιτιών. Ακολουθούν οι σπειραματονεφρίτιδες, οι χρόνιες διάμεσες νεφρίτιδες, οι πολυκυστικοί νεφροί, τα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η αποφρακτική νεφροπάθεια. Στα τελικά στάδια της, όταν πλέον οι νεφροί έχουν χάσει το 85-90% της νεφρικής του λειτουργίας, ο ασθενής θα πρέπει να ενταχθεί σε κάποια από τις μεθόδους υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, την αιμοκάθαρση (AMK) ή την περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ). Η αιμοκάθαρση πραγματοποιείται σε εξειδικευμένες μονάδες στις οποίες πρέπει να προσέρχεται ο

45

ασθενής 3 φορές την εβδομάδα για 4-5 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες του. Η όλη διαδικασία επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία του αίματος σε μηχανήματα τεχνητού νεφρού. Με την αιμοκάθαρση επιτυγχάνεται μερική αναπλήρωση των φυσιολογικών λειτουργιών του νεφρού που έχουν να κάνουν με την αποβολή άχρηστων τοξικών ουσιών, τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ηλεκτρολυτών και την αποβολή της περίσσειας αλάτων και νερού με σκοπό την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Η δυνατότητα όμως του φυσιολογικού νεφρού να παράγει ερυθροποιητίνη δεν μπορεί να αναπληρωθεί.

Η αναιμία είναι συχνή επιπλοκή στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και η συχνότητά της εξαρτάται από το βαθμό νεφρικής ανεπάρκειας, αλλά σχεδόν υπάρχει πάντα στο τελικό στάδιο της νόσου, με τελική επιδείνωση (Hsu et al., 2002). Είναι συνήθως πολυπαραγοντική, ωστόσο ο βασικός παράγοντας είναι η ανεπάρκεια των νεφρών να παράγουν ερυθροποιητίνη για ικανοποιητική ερυθροποίηση. Η ερυθροποιητίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από τους νεφρούς και προάγει την ερυθροποίηση. Συγκεκριμένα δίνει σήμα στο μυελό των οστών να δημιουργήσει ερυθρά αιμοσφαίρια. Είναι, λοιπόν, λογικό σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια κυρίως τελικού σταδίου, που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, λόγω της δυσλειτουργίας των νεφρών τους, τα επίπεδά της στο πλάσμα να είναι πολύ χαμηλά. Για το λόγο αυτό, ως θεραπευτική αγωγή συνίσταται συνήθως η χορήγηση σκευασμάτων διέγερσης ερυθροποίησης, ανασυνδυασμένη ανθρώπινη της ερυθροποιητίνη (ESA, Erythropoiesis-Stimulating-Agents). Εντούτοις, έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στην ερυθροποιητίνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνίσταται η επιπρόσθετη ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου.

Όλοι σχεδόν οι ασθενείς που λαμβάνουν ερυθροποιητίνη απαιτούν συμπληρωματική θεραπεία με σκευάσματα σιδήρου λόγω των αυξημένων απαιτήσεων σε σίδηρο, οι οποίες υπερβαίνουν τις δυνατότητες απορρόφησής του από το γαστρεντερικό σύστημα (Annuk et al., 2001). Η πλειονότητα των ασθενών αυτών χρειάζονται αναπλήρωση των παραγόντων ερυθροποίησης και σιδήρου για τη διατήρηση επιπέδου της αιμοσφαιρίνης 10-11,5 g/dl με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες. Γι' αυτό, οι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια κυρίως τελικού σταδίου, καθώς και οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς, εμφανίζουν σημαντική ανεπάρκεια σιδήρου, τόσο απόλυτη, όσο και λειτουργική. Βασικά αίτια αυτής της ανεπάρκειας είναι η

μειωμένη πρόσληψη με την τροφή, η απώλεια αίματος κατά τη διάρκεια της εξωνεφρικής κάθαρσης ή λόγω αιμορραγιών από το γαστρεντερικό σωλήνα, η ανεπαρκής απορρόφηση του σιδήρου, αλλά και η αναστολή της απελευθέρωσής του από τα μακροφάγα, οι πολύ συχνές αιμοληψίες για διαγνωστικές εξετάσεις, αλλά και οι αυξημένες απαιτήσεις σε σίδηρο των ασθενών που λαμβάνουν παράγοντες ενεργοποίησης της ερυθροποίησης (ερυθροποιητίνη). Στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς η απώλεια σιδήρου υπολογίζεται στα 1000-3000 mg/χρόνο λόγω απώλεια αίματος κατά την παρακέντηση. Έτσι η χορήγηση του σιδήρου σε αυτούς τους ασθενείς θεωρείται επιτακτική (Morgan et al., 2007).

Η από του στόματος χορήγηση σιδήρου κατά βάση είναι ανεπιτυχής, κυρίως λόγω ανεπαρκούς απορρόφησης και για αυτό το λόγο ο σίδηρος χορηγείται κυρίως παρεντερικά (συνδεδεμένος με διάφορα πολυμερή όπως δεξτράνη, σουκρόζη ή ως γλυκονικός σίδηρος). Όλα τα ενδοφλέβια χορηγούμενα σκευάσματα σιδήρου περιέχουν ένα πυρήνα υδροξειδίου του σιδήρου με ένα στρώμα υδατανθράκων. Υπάρχουν διαφορετικά σκευάσματα σιδήρου για ενδοφλέβια χορήγηση (όπως το σύπλεγμα σιδήρου με δεξτράνη, σουκρόζη και γλυκονικό Na⁺). Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος του μορίου, τη βιοδιαθεσιμότητα, την κινητική της αποδόμησης και τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Όσο πιο μικρό είναι το μόριο του συμπλέγματος, τόσο πιο γρήγορα απελευθερώνεται ο σίδηρος και ενώνεται με την τρανσφερρίνη για να φτάσει στο μυελό των οστών. Ο σουκροζικός σίδηρος χρησιμοποιείται ευρέως με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα (Charytan et al., 2001). Πρόκειται για σύμπλοκο πολυπηρυνικού σιδήρου με υδροξείδιο της σουκρόζης. Μετά την έγχυση σιδήρου, ο σουκροζικός σίδηρος απελευθερώνεται στο πλάσμα και συνδέεται άμεσα στην τρανσφερρίνη (Hoigne et al., 1998).

Ο σίδηρος στο πλάσμα κυκλοφορεί συνδεδεμένος με την τρανσφερρίνη, της οποίας όμως οι θέσεις δέσμευσης είναι περιορισμένες. Έτσι σε περίπτωση υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό ελεύθερου σιδήρου, το οποίο μπορεί να προκαλέσει διάφορες τοξικές βλάβες, κυρίως λόγω της ικανότητας του να συμμετέχει σε αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών (OH·) (αντιδράσεις τύπου Fenton), όπως έχει ήδη αναφερθεί. Έτσι διάφορες μελέτες σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, έδειξαν μια σημαντική αύξηση διάφορων οξειδωτικών παραγόντων μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου (Zager et al., 2006; Lim et al., 1999; Drueke et al., 2002; Mimic-Oka et al., 2005; Tovbin et al., 2002; Anraku et al., 2004). Χρειάζεται επομένως ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρεντερική χορήγηση σιδήρου στους ασθενείς αυτούς.

Στην κλινική πράξη τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό εκτιμώνται με βάση το συνδυασμό μιας πληθώρας εργαστηριακών εξετάσεων. Αυτές περιλαμβάνουν τη μέτρηση του αιματοκρίτη, της αιμοσφαιρίνης, του υποδοχέα της τρανσφερρίνης, του σιδήρου στον ορό του αίματος, της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας πλάσματος (TIBC), του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat %) και της φερριτίνης. Επίσης, οι μέθοδοι υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, εδώ και αρκετά χρόνια, είναι γνωστό ότι αποτελούν καταστάσεις που προάγουν τη φλεγμονή (Jofre et al., 2006; Shlipak et al., 2003). Έμμεσος δείκτης αυτού του φαινομένου αποτελεί η αύξηση βιοχημικών δεικτών φλεγμονής στον ορό των ασθενών αυτών, όπως για παράδειγμα η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) (Morena et al., 2005; Arici et al., 2001). Σημαντική είναι και η μέτρηση του ποσοστού των δικτυοερυθροκυττάρων (REC %) ώστε να επιτυγχάνεται μια έγκαιρη εκτίμηση των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό, καθώς τα δικτυοερυθροκύτταρα αποτελούν πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων.

Αν και οι συγκεκριμένοι δείκτες παρέχουν μια εικόνα για τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό, εντούτοις δεν αντιπροσωπεύουν τον καταλυτικό ενεργό σίδηρο που είναι υπέυθυνος για τη δημιουργία των δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου. Για το λόγο αυτό, θα ήταν ωφέλιμο να μπορούν να εκτιμηθούν άμεσα τα επίπεδα του LIP.

ΣΚΟΠΟΣ

Κεντρικό σημείο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, καθώς και ο ρόλος που διαδραματίζουν σε σχέση με τη διατροφή και την ανθρώπινη υγεία. Οι βασικές κατευθύνσεις της μελέτης ήταν:

- Η διερεύνηση της ικανότητας βιοδραστικών φυσικών ενώσεων να προστατεύουν τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες από την πρόκληση ανεξέλεγκτων οξειδώσεων των βασικών συστατικών τους.
- Η μελέτη των βιοχημικών μονοπατιών τα οποία σηματοδοτούν τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και η διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο φαινολικές ενώσεις της διατροφής αναστέλλουν αυτή τη διαδικασία.
- Η διερεύνηση του ρόλου της ομοιόστασης του σιδήρου σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και λαμβάνουν σίδηρο ενδοφλεβίως ανά τακτά διαστήματα.
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονται από τις παρακάτω εταιρείες:

Abcam (Cambridge, MA, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φερριτίνης (ab75973) και του κυτόχρωματος-c (ab133504)

Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δις-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθεϊικό αμμώνιο (APS), αντιδραστήριο Bio-Rad για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)

BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA

Ανεξίνη-V συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη

Cell Signaling Technology, Inc. R&D System, Danvers, MA, USA

Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι της κασπάσης-3(#9664), της p38 (#9213) και των φωσφορυλιωμένων μορφών των κινασών JNK(#9251S), p38 (#9211) και ERK (#9101)

<u>Extra-Synthese (Genay Cedex, France)</u> Υδροξυτυροσόλη

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός από έμβρυο βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, Hepes, πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη, αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως

Jackson Immunoresearch (Baltimore Pike, West Grove, USA)

Μονοκλωνικά αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (115-035-062) και έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (111-035-144) συνδεδεμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP)

Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides)

Merck Company, Darmstadt, Germany

Κυανό του τροπανίου (trypan blue) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Ιωδιούχο Προπίδιο(PI), Ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM)

Roche (Mannheim, Germany)

Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της PARP-1 (sc-8035), της a-Tubulin (TU-02)(sc-7150)

<u>Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany</u> Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)

<u>Serva GmbH, Heidelberg, Germany</u> Αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως

Sigma Company, St. Louis, MO, USA

Καλλιεργητικό υλικά (DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, RPMI), DMSO dimethyl Sulfoxide),οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) (Aspergillus niger, 18000 units/g), λευκωματίνη ορού βοός (BSA), δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS), Triton X-100, διθειοθρεϊτόλη (DTT), τυροσόλη (79058), χρωστική Hoechst 33342, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της β-ισομορφής της ακτίνης (A5441) και κιναμικό οξύ (C80857), π-κουμαρικό οξύ (C9008), καφεϊκό οξύ (C0625), και φερουλικό οξύ

(F3500), ανθρώπινη αποτρανσφερρίνη (T1147), τρισθενής σίδηρος κιτρικού αμμωνίου (F5879), βορικό οξύ (B7901), ριβανόλη (D16606), γλυκερόλη (G5516) και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (E5134)

Η ένωση SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή Prem Ponka (McGill University, Montreal, Canada).

Οι εστέρες του καφεϊκού οξέος (μεθυλοεστέρας, προπυλοεστέρας, φαινεθυλοεστέρας και αμίδιο του φαινεθυλοεστέρα) συντέθηκαν από τον Επίκουρο Καθηγητή Δημοσθένη Φωκά (Τμήμα Μηχανικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων). Συντέθηκαν από το καφεϊκό οξύ με εστεροποίηση κατά Fischer (Fiuza et al., 2004). Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο 250 MHz Bruker AC χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d6) ως διαλύτη. Για την παρασκευή διαλυμάτων, όλα τα χημικά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

2.2.1. Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η κυτταρική σειρά Jurkat, η οποία προέρχεται από Τ-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία και η κυτταρική σειρά HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line), η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα ασθενούς με καρκίνο του ήπατος. Η μακρογρόνια διατήρηση της κάθε κυτταρικής σειράς έγινε σε δογεία που περιέγουν υγρό άζωτο (-196°C). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: στην κυτταρική σειρά Jurkat, τα κύτταρα στην εκθετική τους φάση ανάπτυξης, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 250 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 10 λεπτά, ενώ στην κυτταρική σειρά HepG2 συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση. Ακολούθησε επαναιώρηση σε διάλυμα 5ml PBS και φυγοκέντρηση, όπως προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται στο μίγμα κατάψυξης, το αποτελείται 90% 10% οποίο από εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) και διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και ένα ml του μίγματος αυτού (5-7,5 x 10⁶ κύτταρα) μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotube(s)) που ψύχονται σταδιακά.

Αρχικά τοποθετούνται στους 4°C για 10 λεπτά, έπειτα σε καταψύκτη στους -80°C για 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνται στο υγρό άζωτο όπου και διατηρούνται μέχρι τη χρήση τους.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν γρήγορα από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία 37°C. Το περιεχόμενο των ειδικών σωληναρίων κατάψυξης μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 250 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και εν συνεχεία τοποθετήθηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας όπου και καλλιεργήθηκε 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετούνται στο υγρό άζωτο όπου και διατηρούνται.

2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Τα κύτταρα Jurkat αναπτύσσονται ως εναιώρημα σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS (Fetal Bovine serum, FBS), απενεργοποιημένο με θέρμανση, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη για εξασφάλιση στείρων συνθηκών.

Αντίθετα, τα κύτταρα HepG2 έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα και αναπτύσσονται μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπήτου σχηματίζοντας αποφυάδες, σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle Medium), με L-γλουταμίνη το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.

Ο χειρισμός των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα για αποφυγή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific), που παρείχε σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για να διατηρείται σταθερό το pH στο καλλιεργητικό υλικό. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από μία φορές αποστειρώθηκαν στους 120 °C για μία ώρα. Για την κυτταρική σειρά HepG2, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραίωση 1 προς 6.

2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανούν του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα, η οποία δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. 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 αιματοκυτταρόμετρο 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 Επώαση των κυττάρων

Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (250 x g, 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου), επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 1,5 x 10⁶ κύτταρα ανά ml και αφέθηκαν για 1,5 ώρα σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα προεπωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαινολικών οξέων και αλκοολών διαλυμένα σε DMSO για τα ενδεικνυόμενα σε κάθε περίπτωση χρονικά διαστήματα. Η μέγιστη συγκέντρωση του διαλύτη δεν ξεπερνούσε το 3% στο τελικό μίγμα προεπώασης. Για τη μελέτη της βλάβης στο DNA ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη του θρεπτικού υλικού (5mM) και O₂ και παράγει γλυκονικό οξύ και H₂O₂ σύμφωνα με την αντίδραση 3.

Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.6 μg/ml, η οποία παράγει 10 μΜ H₂O₂ το λεπτό και ο χρόνος έκθεσης ήταν 10 λεπτά. Για τη μελέτη της απόπτωσης τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 250 μΜ H₂O₂, το οποίο προστέθηκε άμεσα στην κυτταρική καλλιέργεια για 7 ώρες.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis ή Comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το Η2O2 πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της «ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης», η οποία είναι γνωστή και ως «comet assay». Πρόκειται για μια απλή, εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μια από τις δυο αλυσίδες του κυτταρικού DNA και διαθέτει το πλεονέκτημα μελέτης της βλάβης του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η πρώτη περιγραφή της τεχνικής πραγματοποιήθηκε 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 ο Singh και οι συνεργάτες του (Singh et al., 1988) τροποποίησαν την αρχική μορφή της μεθόδου των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξή της. Από τη στιγμή που εμφανίστηκε η μέθοδος, μέχρι σήμερα, έχει υποστεί διάφορες αλλαγές με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητα της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η «comet assay» έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή τις διπλές αλυσίδες του DNA, αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά την επώασή τους με κατάλληλα ένζυμα, που τις αναγνωρίζουν, απομακρύνονται και με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σχάσεις στο DNA που ανιχνεύονται με τη τεχνική αυτή.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Για το σκοπό αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH>13) με αποτέλεσμα τη μετουσίωσή του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει τη 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. 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, επανασχηματίζονται. Έτσι οι σχηματισμοί, που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA, είναι στην πράξη «θηλιές» του DNA, που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικωμένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10^{5} / ml) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων και αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 1h. Ομοίως κύτταρα HepG2 (80.000/φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 24h. Μετά την προεπώαση των κυττάρων με τα φαινολικά οξέα και τις αλκοόλες ακολούθησε έκθεση των κυττάρων για 10 λεπτά παρουσία ή απουσία 0.6 μg/ml οξειδάση της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μΜ H₂O₂ ανά λεπτό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 400 x g (centrifuge 5415D, Eppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl 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 καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 μM Tris σε pH 10 και 1% Triton-X 100 κατά όγκο) στους 4 °C. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά, όπως οι μεμβράνες και οι πρωτεΐνες και παραμένει μόνο το πυρηνικό DNA εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης, υπερελικωμένο και συσκευασμένο σε μία πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Εν συνεχεία, 01 αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μια οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ψυγρό διάλυμα αποδιάταξης (Unwinding, 0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) για 40 λεπτά, έτσι ώστε να ξεδιπλωθούν οι αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30 V, 300 mA) για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS, τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε μια (Panagiotidis et al., 1999). Τέλος το DNA υποβλήθηκε σε χρώση με 50 μΙ διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (25 μg/ml σε PBS) και παραμονή στο σκοτάδι για 10 λεπτά.

Οπτική παρατήρηση και αξιολόγηση των σχάσεων

Μετά τη χρώση του DNA, οι πλάκες είναι έτοιμες για οπτική παρατήρηση και καταμέτρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400 x. Η βλάβη δεν είναι ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα, βασίζεται στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Οι σχηματισμοί του πυρηνικού DNA που έχουν υποστεί βλάβη παρουσιάζουν χαρακτηριστική μορφολογία η οποία μοιάζει με την κεφαλή και την ουρά ενός κομήτη. Κάθε σχηματισμός κατατάχθηκε σε μια από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (Εικόνα 17).

Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε αθροιστικά, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών με τον αριθμό της αντίστοιχης τάξης και έκφραση της βλάβης σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA μπορεί να λάβει τιμές από 0 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 0) έως 400 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 0) έως 400 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 1999). Η οπτική καταμέτρηση συσχετίζεται σχεδόν γραμμικά με άλλες παραμέτρους, όπως το επί τοις εκατό ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην "ουρά", το οποίο καθορίζεται με ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση εξειδικευμένου προγράμματος (Jornot et al., 1998; Ross et al., 1995).



Εικόνα 17: (Α) Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής «comet assay» και (Β) οπτική απεικόνιση των πέντε τάξεων, βλάβης του DNA.

2.3.2 Μέτρηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP)

Για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε ανέπαφα κύτταρα πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων χηλικών παραγόντων με δυνατότητα φθορισμού (Epsztejn et al., 1997; Kakhlon and Cabantchik, 2002). Οι παράγοντες αυτοί έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να λειτουργούν ως «ανιχνευτές» των επιπέδων του LIP χωρίς να επηρεάζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται εκτενώς την τελευταία δεκαετία για τον προσδιορισμό των επιπέδων του LIP, κυρίως σε κύτταρα σε καλλιέργειες, αποτελεί η καλσεΐνη (Cabantchik, 2014; Glickstein et al., 2005) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Δομή της καλσεΐνης

Η καλσεΐνη, λόγω των αρνητικών φορτίων που φέρουν οι καρβοξυλομάδες της σε φυσιολογικό pH, δεν έχει τη δυνατότητα εισόδου μέσα στα κύτταρα. Το εμπόδιο αυτό μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση της εστεροποιημένης της μορφής (καλσεΐνη-AM, ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης). Η καλσεΐνη-AM αποτελείται από ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδεδεμένο με μόριο EDTA. Η παρουσία των ακετομεθόξυ-εστερικών ομάδων στο μόριο της καλσεΐνης-AM επιτρέπει τη διάχυσή της μέσω της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Στο εσωτερικό του κυττάρου οι εστερικές ομάδες υδρολύονται από μη-εξειδικευμένες εστεράσες. Επομένως, η καλσεΐνη αποκτά αρνητικό φορτίο και με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η ικανότητα της καλσεΐνης να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευσή της. Επίσης, με την απομάκρυνση των εστερικών ομάδων επαναδιατάσσονται οι διπλοί δεσμοί που υπάρχουν στο μόριό της, γεγονός που την καθιστά ικανή να φθορίζει. Ένα μέρος της καλσεΐνης δεσμεύει ενδοκυττάρια ιόντα μετάλλων (π.χ. ασβεστίου, σιδήρου), κυρίως δισθενή, γεγονός που έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Συγκεκριμένα, έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει τόσο δισθενή όσο και τρισθενή ιόντα σιδήρου, με σταθερές συγγένειας 10^{14} και 10^{24} M⁻¹, αντίστοιχα, που βρίσκονται χαλαρά συνδεδεμένα σε διάφορα μόρια στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε ένα δεύτερο στάδιο, η προσθήκη, σε περίσσεια, ισχυρότερων εξειδικευμένων δεσμευτών σιδήρου με ικανότητα διάχυσης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, όπως του παράγοντα SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) (Kakhlon and Cabantchik, 2002), που παρουσιάζει σταθερά συγγένειας για το Fe³⁺ 10^{31} M⁻¹, οδηγεί στην απομάκρυνση του σιδήρου από την καλσεΐνη και κατά συνέπεια στην αύξηση του φθορισμού της σε ποσοστό ανάλογο με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Εκτίμηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (LIP) στο εσωτερικό ανέπαφων κυττάρων φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της καλσεΐνης. (A) Διαγραμματική αναπαράσταση της μέτρησης της δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου. (B) Μεταβολή της έντασηςτου φθορισμού της καλσεΐνης μετά την προσθήκη SIH.

Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός των «οξειδοαναγωγικά ενεργών» ιόντων σιδήρου, που ονομάζεται και LIP (Labile Iron Pool) στην κυτταρική σειρά Jurkat πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνης. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁵ / ml) συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 250 x g. Το ίζημα που συλλέχθηκε με τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε σε ένα ml ρυθμιστικού διαλύματος, που περιείχε PBS, 1 mg/ml ορού βοός αλβουμίνης και 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος HEPES με pH=7.3. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάστηκαν με 0.15 μM καλσεΐνης-AM για 10

λεπτά στους 37°C και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 250 x g. Στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2.2 ml του προηγούμενου ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενη κυβέτα (37°C), υπό ανάδευση, όπου φθορισμός της καλσεΐνης (μήκος κύματος διέγερσης: 488nm και μήκος κύματος εκπομπής: 517nm) καταγράφηκε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi). Τέλος, προστέθηκε για 5 λεπτά ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH (4 μM) που έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και να αποσπά σίδηρο που είναι δεσμευμένος με την καλσεΐνης προκαλώντας την αύξηση του φθορισμού της. Η διαφορά του φθορισμού της καλσεΐνης πριν και μετά την προσθήκη του SIH εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες αντιπροσωπεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο που δεσμεύει η καλσεΐνη.

Τα φαινολικά οξέα και οι αλκοόλες προστέθηκαν σε κύτταρα φορτωμένα με καλσεΐνη, πριν την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH και παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης (ΔF), επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

2.3.3. Ανάλυση δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων μοναδιαίων κυττάρων που ρέουν μέσα σε μια συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων (Shapiro, 2003; Longobardi, 2001). Παρουσιάζει μοναδικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές τεχνικές, όπως υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα μεγάλη ποικιλία υλικών που μπορούν να αναλυθούν και δυνατότητα ταυτοποίησης σπάνιων πληθυσμών.

2.3.3.1 Σήμανση με Ανεξίνη και Ιωδιούχο προπίδιο

Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidyloserine, PS) στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αντί της εσωτερικής που βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Η

ανεξίνη η οποία είναι μια εξαρτώμενη από ιόντα –Ca⁺² πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 35-36 kDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην φωσφατυδιλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση μόνο όταν η φωσφατιδιλοσερίνη εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 20). Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca⁺².



Εικόνα 20: Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Η σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκείνη (Annexin-FITC) (πράσινο χρώμα) αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων, ενώ η σήμανση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (PI) (κόκκινο χρώμα) δείχνει ότι η ακεραιότητα της μεμβράνης έχει χαθεί (Givan, 2000).

Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκείνη (Annexin-FITC) αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου. Λόγω του γεγονότος ότι η φωσφατυδιλοσερίνη γίνεται προσβάσιμη στην περίπτωση της νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε και ένας δεύτερος δείκτης, το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), το οποίο δένεται πάνω σε νουκλεϊκά οξεά μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες, ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Διαχωρισμός των κυττάρων με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Ο διαχωρισμός των κυττάρων γίνεται σε 4 κατηγορίες: ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα.

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 /ml) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και μετά τις αντίστοιχες επώασεις συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν. Σε κάθε δείγμα 1 x 10^5 κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (0.1 M HEPES / NaOH pH=7.4, 140 mM NaCl, 25 mM CaCl₂) και επωάστηκαν με 1.0 μg/ml Annexin-V-FITC και 4.0 μg/ml ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 15 min, στους 4 °C, στο σκοτάδι (Vermes et al., 1995). Ακολούθησε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής (CyFlow ML, Partec).

2.3.4. Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κύτταρα Jurkat 3 x 10^6 (1,5 × 10^6 /ml), μετά την έκθεσή τους επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 x αναστολείς πρωτεασών και αναστολείς φωσφατασών (2 mM sodium orthovanadate, 20 mM β-φωσφορική γλυκερόλη and 10 mM NaF). Μετά από επώαση στον πάγο για 30 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 14000 x g στους 4 °C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο, που αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Απομόνωση κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων

Για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών κλασμάτων κύτταρα Jurkat (80 x 10⁶ /δείγμα) ξεπλύθηκαν σε κρύο PBS και επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης (20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 1.5 mM MgCl₂ και 1 x αναστολείς πρωτεασών). Στη συνέχεια για τη λύση των κυττάρων διαβιβάστηκαν 20 φορές μέσα από θραυσματοποιητή κυττάρων (HGM, Heidelberg, Germany). Μετά τη λύση των κυττάρων το ίζημα (cell debris, nuclei and

mitochondria) φυγοκεντρήθηκε στα 14000 x g στους 4 °C για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 100.000 x g για 1 ώρα στους 4 °C (OptimaTM Ultracentrifuge, Beckman) και το υπερκείμενο που προέκυψε (S-100 κλάσμα), το οποίο αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, αποθηκεύτηκε στους -80 °C και χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο "protein microassay" της Bio-Rad, που βασίζεται στη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 μl υδατικού διαλύματος από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

2.3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες, που απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής τους. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί προϊόν συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του Ν, Ν-μεθυλένο-δις-ακρυλαμιδίου, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ηλεκτρικά ουδέτερων, τρισδιάστατων πλεγμάτων, που το μέγεθος των πόρων τους εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών από το υπερθειϊκό αμμώνιο ((NH₄)₂S₂O₈, APS) με καταλύτη την Ν, Ν, Ν', Ν'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη

64

(TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), γι' αυτό και η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή δωδεκυλοθειϊκού νατρίου - πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Πειραματική διαδικασία

Το σύστημα της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel). Στην πηκτή επιστοίβαξης γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος, πριν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, και περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0.125 M Tris pH=6.8 και 0.1 % (w/v) SDS και APS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού, που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμού, που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 8, 10 ή 15% ακρυλαμίδιο (w/v), 0.375 M Tris pH=8.8, 0.1% (w/v) SDS και APS. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση της φερριτίνης, της κασπάσης-3 και του κυτοχρώματος c, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πηκτή 15 %, ενώ για την ανίχνευση της p38 και των φωσφορυλιωμένων μορφών των κινασών JNK, p38 και ERK σε πηκτή 10% SDS-ακρυλαμιδίου και της PARP σε πηκτή 8% SDS-ακρυλαμιδίου.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών 30-50 μg μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής, αφού πρώτα μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 5 λεπτά στους 100 °C με το διάλυμα Laemmli Buffer μαζί με DTT. Ο βρασμός διευκόλυνε την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών: το DTT ανήγαγε τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 0.025 M Tris, 0.198 M γλυκίνη και 0.1 % SDS, στα 150 Volts (συσκευή MINI – PROTEAN II , BIO-RAD). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία περίπου 1.4 g SDS ανά gr πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εμφανίζουν περίπου το ίδιο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Έτσι η ταχύτητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στην πηκτή κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται μόνο από το μοριακό της βάρος. Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, οι οποίες έφεραν συνδεδεμένη χρωστική, εξυπηρετώντας

65

τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ανάμεσα στο μοριακό βάρος και την απόσταση, που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στην πηκτή ηλεκτροφόρησης.

2.3.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western

Μετά τον ηλεκροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακριλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Scheicher & Schuell), σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Για τον έλεγγο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0.1 % σε οξικό οξύ) για ένα λεπτό και ακολούθησε πλύση με νερό. Η μεμβράνη επωάστηκε με το διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα φωσφορικών pH=7.4 και 0.1 % Tween 20 (PBS-T 0.1%) σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες με ήπια ανακίνηση προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες, μη ειδικές θέσεις επάνω στη νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανατάραξη με αντισώματα έναντι της κάθε πρωτεΐνης, σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4 °C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0.1%. Τέλος, η μεμβράνη επωάστηκε με αντίσωμα συζευγμένο με ραφινική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP, Jackson Immunoresearch) για μία ώρα σε 5 % άπαχο γάλα σε PBS-T 0.1% με ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0.1% και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL).

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 H₂O₂ σε αλκαλικό περιβάλλον, οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση 4 :

υπεροξειδάση

 $Λουμινόλη + H_2O_2 \longrightarrow παράγωγο λουμινόλης + N_2 + φως$ (4)

Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της κατάσταση, εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωσή της σε φιλμ. Η μέγιστη ακτινοβολία, η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση, έχει μήκος κύματος 428 nm και ανιχνεύεται μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα, επωάστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (0.125 ml υποστρώματος/cm² μεμβράνης) για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR) για διάφορους χρόνους από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτησή του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) για 2 λεπτά, ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης τουλάχιστον για 1 λεπτό (Kodak AL 4, X-ray fixer).

2.3.7 Δείγματα ατόμων

Διαδικασία αιμοκάθαρσης και δειγματοληψίες του ορού του αίματος

Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο συμπεριλήφθησαν ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση τελικού νεφρικού σταδίου που προσήλθαν στο Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Χατζηκώστα καθώς και υγιείς δότες, για τη συνήθη διαδικασία της αιμοληψίας. Τα άτομα, ενημερώθηκαν και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για να συμπεριληφθούν στη μελέτη.

Οι ασθενείς υπόκεινται σε αιμοκάθαρση 3 φορές την εβδομάδα για 4 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες τους. Η όλη διαδικασία επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία του αίματος στο μηχάνημα του τεχνητού νεφρού, το οποίο αποτελείται από το φίλτρο αιμοκάθαρσης, το μηχάνημα αιμοκάθαρσης και το σύστημα παρασκευής και τροφοδοσίας του υγρού αιμοκάθαρσης. Τα φίλτρα αιμοκάθαρσης που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν υψηλής νηματικής ροής (NIKKISO-Medical GmbH, Hamburg, Germany) ή χαμηλής νηματικής ροής (Xenium-LF, Baxter Hellas, Athens, Greece) πολυαιθεροσουλφόνης, αποστειρωμένα με γ-ακτινοβολία και με χαμηλό μοριακό βάρους ηπαρίνης 5.000 IU/ 0.2 ml (Fragmin, Pfizer Hellas, Athens, Greece) ως αντιπηκτικό. Λειτουργούν ως ημιδιαπερατές μεμβράνες και επιτρέπουν εκλεκτικά την ανταλλαγή ουσιών από το αίμα προς το διάλυμα και αντίστροφα.

Οι ασθενείς έλαβαν ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου σουκρόζης (Venofer, Vifor France SA, France) κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 λεπτών της διαδικασίας της αιμοκάθαρσης. Τα δείγματα ορού περιφερικού αίματος συλλέχθηκαν από ασθενείς υπό αιμοκάθαρση, 15 λεπτά πριν την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρουσουκρόζης (100 mg/ 5ml, Venofer) και 15 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρουσιδήρου, καθώς και σε χρονικά διαστήματα 1, 2, 3, 5, 7, και 9 ώρες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου.

Σε κάθε δείγμα του ορού ολικού αίματος που συλλέχθηκε 15 λεπτά πριν την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου, πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση αίματος και βιοχημικός έλεγχος στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Αρχικά φυγοκεντρήθηκαν στα 2.000 x g για 5 λεπτά για την απομάκρυνση των έμμορφων συστατικών του πλάσματος (τα ερυθροκύτταρα ωθούνται στο κάτω μέρος του φυγοκεντικού σωλήνα και το πλάσμα στο πάνω μερος) και ακολούθησαν αυτοματοποιημένους εργαστηριακούς μεθόδους για τον υπολογισμό του σιδήρου στον ορό (Fe⁺³), της φερριτίνης του ορού, της ακόρεστης σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (UIBC) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, CRP. Η συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (TIBC) υπολογίστηκε αθροίζοντας το σίδηρο του ορού με την UIBC. Επίσης, σε κάθε δείγμα του ορού μετρήθηκε η αιμοσφαιρίνη (Hgb), ο αιματοκρίτης (Hct) και τα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα (RECs). Το υπόλοιπο μέρος του δείγματος καταψύχθηκε στους -20 °C, καθώς και τα δείγματα του ορού αίματος που συλλέχθηκαν μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του κορεσμού της τρανσφερρίνης που αναλύθηκε με τη τεχνική της ηλεκτροφόρησης ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE) στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ τα επίπεδα της ηπατιδίνης εκτιμήθηκαν με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική ELISA στο Ινστιτούτο Παστέρ των Αθηνών από την κ. Μαμαλάκη (βλέπε ενότητα 2.3.9).

68

2.3.8 Ανάλυση των διαφόρων μορφών της τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-UPAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης της τρανσφερρίνης επί πήγματος ουρίαςπολυακρυλαμιδίου αποτελεί μια μέθοδο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με αποδιατακτικό παράγοντα την ουρία. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί προϊόν συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του Ν, Ν-μεθυλένο-δις-ακρυλαμιδίου αποτέλεσμα του οποίου είναι ο σχηματισμός τρισδιάστατων πλεγμάτων ηλεκτρικά ουδέτερων. Το μέγεθος των πόρων των πλεγμάτων εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο συνπολυμερισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου (APS), μέσω του οποίου απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες, και του καταλύτη Ν, Ν, Ν', Ν'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι η ουρία και για το λόγο αυτό η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-UPAGE).

Σύμφωνα με τους Makey και Seal (Makey and Seal, 1976), η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν, υπό τις συγκεκριμένες αποδιατακτικές συνθήκες, οι μορφές της τρανσφερρίνης μετά τη δέσμευση σιδήρου. Η αποτρανσφερρίνη, που δεν έχει δεσμεύσει σίδηρο, αποδιατάσσεται σχετικά εύκολα και μετακινείται ελάχιστα στην πηκτή, ενώ η μονοσιδηρική τρανσφερρίνη, που έχει δεσμεύσει ένα μόνο ιόν τρισθενούς σιδήρου στο C-λοβό είναι πιο σταθερή και μετακινείται περισσότερο, αλλά διανύει μικρότερη απόσταση σε σχέση με τη μονοσιδηρική τρανσφερρίνη που έχει δεσμεύσει ένα μόνο ιόν τρισθενούς σιδήρου ιόν σιδήρου στο N-λοβό. Τέλος, η δισιδηρική τρανσφερρίνη, που έχει δεσμεύσει δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου, είναι ακόμη πιο σταθερή και διανύει μεγαλύτερο διάστημα στην πηκτή πριν αποδιαταχθεί από την ουρία.

Πειραματική διαδικασία

Το σύστημα της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel). Η πηκτή επιστοίβαξης, που επιτρέπει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος σε αυτή προτού εισέλθει στην πηκτή διαχωρισμού, περιέχει 4 % ακρυλαμίδιο (w/v), 10 x TBE (890 mM Tris – 890 mM Boρικό οξύ - 20 mM EDTA) με pH=8.2, 10 % (w/v) APS, 5 μl TEMED και 6 M ουρία. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια εισέρχεται στην πηκτή διαχωρισμού, η οποία περιέχει 6 % ακρυλαμίδιο (w/v), διάλυμα TBE με pH=8.2, 10 % (w/v) APS, 2 μl TEMED και 6 M ουρία.

Η προετοιμασία των δειγμάτων ορού περιφερικού αίματος (25 μl) απαιτούσε την επεξεργασία αυτών με την ουσία rivanol lactate (2,5-diamino-7 ethoxyacridine) πριν τη μεταφορά τους στο σύστημα της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου. Η προσθήκη της ουσίας (200 μl) και η ακόλουθη φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 10000 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου οδήγησε στην κατακρήμνιση της αλβουμίνης και του μεγαλύτερου μέρους των β-σφαιρινών. Παράλληλα, διατήρησε στο υπερκείμενο ανέπαφες τις γ-σφαιρίνες και κάποιες από τις β-σφαιρίνες συμπεριλαμβανομένης της τρανσφερρίνης. Το υπερκείμενο αυτό συλλέχθηκε για την περαιτέρω χρησιμοποίηση του κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα (20 μl από το υπερκείμενο του επεξεργασμένου ορού ανά δείγμα) μεταφέρηκαν στο σύστημα της πηκτής αφού προηγουμένως αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 (% v/v) με το διάλυμα δείγματος (sample buffer ~ 2 x) που περιέγει 2 mM TBE, 12 % w/v ficoll, 0.5 % διάλυμα χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης και κυανόλης του ξυλενίου καθώς και 6 Μ ουρία. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 1 x TBE με pH=8.2 στα 125 Volts για περίπου τρισίμιση ώρες για την περίπτωση των πειραμάτων με την τρανσφερρίνη ορού (συσκευή MINI-PROTEAN II, BIO-RAD).

Οπτικοποίηση και επεξεργασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

Coomassie brilliant blue R-250 staining

Η οπτικοποίηση των ηλεκτροφορητικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω επώασης της πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα της χρωστικής ένωσης Coomassie brilliant blue R-250 (0.25 % (w/v) Coomassie Briliant Blue, 9.2 % (v/v) οξικό οξύ, 45.5 % μεθανόλη) για 45 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα μόρια της χρωστικής συμπλέκονται με τα αμινοξέα τρυπτοφάνη (Trp), τυροσίνη (Tyr), φαινυλανίνη (Phe), ιστιδίνη (His) και λυσίνη (Lys) των πρωτεϊνών μέσω ιοντικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της αντίδρασης χρώσης, ακολούθησε επώαση της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining) (40 % (v/v) μεθανόλη, 10 % (v/v) οξικό οξύ) για 1 ώρα, κατά την οποία τα μόρια χρωστικής απομακρύνονται από μη πρωτεϊνικές περιοχές της πηκτής ενώ οι περιοχές πρωτεΐνης εμφανίζονται ως ζώνες βαθυκύανου χρώματος. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η αποτύπωση στην πηκτή όλων των μορφών της τρανσφερρίνης, όπως αυτές διαχωρίζονται μετά τη δέσμευση σιδήρου σε αυτή.

Quantity One

Η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του προγράμματος Quantity One (BIO-RAD Laboratories, CA, USA). Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (%) έχει υπολογιστεί με την εξής φόρμουλα:

Tf-Sat(%) = [(monoferric + 2 x diferric)-band densities] x 100 / 2 x [(apo + monoferric + diferric)-band densities].

2.3.9 Μέτρηση της ηπατιδίνης (Hepc) στον ορό του αίματος

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνουαντισώματος και την χρήση κατάλληλου ενζύμου και του υποστρώματος αυτού, η αντίδραση των οποίων θα οδηγήσει σε αλλαγές στην απορρόφηση των μετρούμενων δειγμάτων. Η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται με την χρήση ειδικού φασματοφωτόμετρου τύπου «ELISA» και οι μετρούμενες απορροφήσεις μεταφράζονται σε συγκεντρώσεις της μετρούμενης ουσίας.

Πειραματική διαδικασία

Τα επίπεδα της ηπατιδίνης στον ορό του αίματος των ασθενών εκτιμήθηκαν με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική ELISA (Koliaraki et al., 2009) στο Ινστιτούτο Παστέρ των Αθηνών από την κ. Μαμαλάκη.

Οι πλάκες ELISA είναι ειδικά επεξεργασμένες και φέρουν προσδεμένη ανασυνδυασμένη Hepcidin25-His (0.5 µg/ml) σε καθένα από τα φρεάτια. Οι οροί του αίματος των ασθενών ύστερα από αραίωση (1/8), επωάστηκαν με το πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό αντίσωμα ηπατιδίνης, στους 4 °C για 16 ώρες. Τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν, προστέθηκαν στα επικαλυμμένα φρεάτια και επωάστηκαν για 1 ώρα

στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP) και το μίγμα επωάστηκε στους 37 °C για 1 ώρα πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) και η απορρόφηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικού φασμαφωτομέτρου τύπου ELISA. Οι οπτικές πυκνότητες μετρήθηκαν σε κάθε φρεάτιο της πλάκας μικροτιτλοδότησης στα 450 nm.

2.3.10 Στατιστική ανάλυση

Η καταγραφή όλων των δεδομένων της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός πακέτου φύλλων εργασίας ενώ η στατιστική τους ανάλυση με τη χρήση στατιστικών πακέτων. Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Microsoft Office Excel 2010, GraphPad Prism 6.0 και SPSS (version 13.0, Inc. Chicago, Illinois), τόσο για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όσο και για τις γραφικές απεικονίσεις των διαγραμμάτων. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (mean ± SD), εκτός από τις μη παραμετρικές μεταβλητές οι οποίες παρουσιάστηκαν ως διάμεση τιμή (εύρος, mean ± SEM). Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αναλύθηκαν με ANOVA (one way analysis of variance) και επακόλουθα με Tukey's post hoc test για τη σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων. Η σύγκριση μεταξύ μεταβλητών που ακολουθούν κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε μέσω του Student's t-test, ενώ μεταξύ αυτών που έχουν μηκανονική κατανομή με το Mann-Whitney U test, για τις διάφορες τιμές πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Η συσγέτιση των διαφορετικών παραμέτρων έγινε με το συντελεστή του Pearson's και του Spearman's (κανονική, μη-κανονική κατανομή, αντίστοιχα). Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με τιμή $P \le 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ENOTHTA A

Προστασία του DNA των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες από φαινολικές ενώσεις της διατροφής

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας είχε διερευνηθεί διεξοδικά ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο τα φλαβονοειδή και άλλες φυτικής προέλευσης φαινολικές ενώσεις προστάτευαν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό τη μορφή H₂O₂ (Melidou et al., 2005; Nousis et al., 2005). Στην παρούσα εργασία η μελέτη επεκτάθηκε και σε άλλες φαινολικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα και ορισμένα συνθετικά παράγωγά τους, καθώς και σε ορισμένες φαινολικές αλκοόλες.

3.1Φαινολικά Οξέα

3.1.1 Διερεύνηση της προστατευτικής δράσης των φαινολικών οξέων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης διερευνήθηκε η ικανότητα φαινολικών οξεών της διατροφής, που προέρχονται από το μεταβολισμό του κιναμικού οξέος (Εικόνα 22), να προστατεύουν το πυρηνικό DNA των κυττάρων από το H₂O₂. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Jurkat, (μια ανθρώπινη Τ-λεμφοκυτταρική σειρά) και HepG2 (ανθρώπινη ηπατοκυτταρική σειρά). Τα κύτταρα προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με διαφορετικές συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων ενώσεων (0.5, 1, 2 και 3mM) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (G.O.), το οποίο, σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H₂O₂ (χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 0.6 μg/ml, ικανή να παράγει περίπου 10 μM H₂O₂ το λεπτό). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA, χρησιμοποιώντας την ευαίσθητη τεχνική της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης ή «comet assay»,



Εικόνα 22: Χημικές δομές φαινολικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Απεικονίζεται ο μεταβολισμός του trans-κιναμικού οξέος σε π-κουμαρικό, φλαβονοειδή, καφεϊκό και φερουλικό οξύ.

όπως περιγράφεται διεξοδικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η προστατευτική δράση των φαινολικών ενώσεων αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της επί της εκατό μείωσης της βλάβης που προκαλείται από την προεπώαση των κυττάρων με το κάθε φαινολικό οξύ.

Ως 100% ορίστηκε η βλάβη, που προκαλείται στο DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά σε H₂O₂, απουσία φαινολικού οξέος. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα μάρτυρες παρουσίασαν σχάσεις στο DNA, πριν ακόμα εκτεθούν σε εξωγενές H₂O₂ (105±1.49 αυθαίρετες μονάδες). Οι σχάσεις στο DNA αυξήθηκαν στις 302.88±3.68 αυθαίρετες μονάδες, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά στην προαναφερθείσα ποσότητα του ενζύμου G.O. (Εικόνα 23).

Προεπώαση των κυττάρων με κιναμικό και κουμαρικό για 20 λεπτά και έκθεσή τους σε H₂O₂ δεν έδειξε καμία προστασία στο κυτταρικό DNA στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 23A και 23B). Προεπώαση με υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών των φαινολικών οξέων (2 και 3 mM) είχε ως αποτέλεσμα την τοξική τους δράση, η οποία προκάλεσε αύξηση της βλάβης στις μονές αλυσίδες του DNA απουσία της οξειδάσης της γλυκόζης. Αντιθέτως, το καφεϊκό οξύ προσέφερε σημαντική προστασία αλλά σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες του 1 mM, χωρίς να παρουσιάζει το ίδιο τοξικότητα (Εικόνα 23Γ). Όταν η μία υδροξυλική ομάδα του καφεϊκού οξέος αντικαταστάθηκε με μια μεθόξυ-ομάδα στη θέση 4 του φαινολικού δακτυλίου (φερουλικό οξύ), η προστασία μειώθηκε σε σχέση με το καφεϊκό οξύ στη συγκέντρωση 1 mM, ενώ εμφανίστηκε κάποια τοξικότητα, η οποία πανία χάντως ήταν μικρότερη από αυτή του κιναμικού και κουμαρικού οξέος (Εικόνα 23Δ).



Εικόνα 23: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης παραγώγων trans-κιναμικού οξέος ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶/ ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0.5–3 mM) του trans-κιναμικού (A), π-κουμαρικού (B), καφεϊκού (Γ) και φερουλικού οξέος (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Τα "#" και "*" υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν ή έχουν επωαστεί με H₂O₂, αντίστοιχα (p<0.05).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν εξετάστηκαν τα συγκεκριμένα φαινολικά οξέα στην ανθρώπινη ηπατοκυτταρική σειρά HepG2 (80.000 κύτταρα ανά φρεάτιο) (Εικόνα 24), υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για ένα κοινό μηχανισμό στα διάφορα είδη κυττάρων. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, όλα τα υπόλοιπα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά Jurkat.



Εικόνα 24: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης παραγώγων trans-κιναμικού οξέος ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα HepG2 (80.000 κύτταρα ανά φρεάτιο) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0.5–3 mM) του trans-κιναμικού (A), π-κουμαρικού (B), καφεϊκού (Γ) και φερουλικού οξέος (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Τα "#" και "*" υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν ή έχουν επωαστεί με H₂O₂, αντίστοιχα (p<0.05).

Από τη σύγκριση των διαφορετικών δομών των υπό μελέτη φαινολικών οξέων, μόνο το καφεϊκό οξύ, που φέρει δύο υδροξύλια σε όρθο-θέση, προστάτευσε το πυρηνικό DNA στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Το κιναμικό οξύ, το οποίο δεν έχει κανένα υδροξύλιο στο φαινολικό του δακτύλιο και το π-κουμαρικό οξύ με ένα υδροξύλιο δεν έχουν καμία προστατευτική ικανότητα. Τέλος, το φερουλικό οξύ με όμοια δομή με αυτή του καφεϊκού οξέος, με μόνη διαφορά τη μεθυλίωση του ενός εκ των δύο υδροξυλίων, είχε προστατευτική ικανότητα αλλά αυτή ήταν μειωμένη σε σχέση με το καφεϊκό. Είναι φανερό, ότι η προστασία του καφεϊκού οξέος οφείλεται στην παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας του, η οποία απουσιάζει από τις άλλες ενώσεις. Σε προηγούμενα πειράματα της ερευνητικής μας ομάδας στα φλαβονοειδή, είχε δειχτεί ότι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά που ευνοεί την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών είναι η παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας σε ένα από τους φαινολικούς δακτυλίους. Επίσης, είχε παρατηρηθεί μία συσχέτιση της ικανότητας μείωσης του ενδοκυττάριου καταλυτικά ενεργού σιδήρου και της προστασίας (Melidou et al., 2005). Τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ορθοδιϋδρόξυ ομάδα δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου και με τον τρόπο αυτό προστατεύει το πυρηνικό DNA από το H₂O₂. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το καφεϊκό οξύ, που προστάτευσε, δεν ήταν καθόλου τοξικό ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Αντιθέτως το κιναμικό και το κουμαρικό ήταν τοξικά, ενώ το φερουλικό οξύ, με μειωμένη προστατευτική δράση σε σχέση με το καφεϊκό, εμφάνισε λιγότερη τοξικότητα. Δηλαδή, τα φαινολικά οξέα που δεν προστάτευσαν, λόγω απουσίας της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας, εμφάνισαν τοξικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά, δεν είναι αρκετά για να βγάλουμε συμπεράσματα για το μηγανισμό της τοξικότητας των ενώσεων αυτών. Κατά συνέπεια, επιπλέον πειράματα είναι αναγκαία για τη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού της τοξικότητας αυτών των ενώσεων.

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του χρόνου επώασης των κυττάρων με το καφεϊκό οξύ (1 και 2 mM σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 10, 20, 30, 60 και 120 λεπτά). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν με συγκέντρωση καφεϊκού οξέος 1 mM παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA από το H₂O₂ στα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (Εικόνα 25A). Στη συγκέντρωση των 2 mM, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της προστασίας έως τα 30 λεπτά (Εικόνα 25B), ενώ σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρατηρήθηκε μείωση της προστασίας και σταδιακή αύξηση της τοξικότητας (Εικόνα 25B). Η

προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση αλλά και από το χρόνο επώασης της ένωσης.



Εικόνα 25: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του καφεϊκού οξέος ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA ανάλογα με το χρόνο επώασης. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶ / ml) προεπωάστηκαν για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα με 1 mM (A) και 2 mM (B) καφεϊκού οξέος. Στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay» όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Τα "#" και "*" υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν ή έχουν επωαστεί με H_2O_2 , αντίστοιχα (p<0.05).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι απαραίτητη προϋπόθεση για να προστατεύσει μια ένωση είναι η ύπαρξη της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας. Η ορθο-διϋδρόξυ ομάδα, έχει δειχτεί ότι μπορεί και δεσμεύει σίδηρο, οπότε ένας πιθανός μηχανισμός προστασίας των ενώσεων είναι να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας τους, με αποτέλεσμα την προστασία των αρχικών θέσεων δέσμευσης από οξειδώσεις.

3.1.2 Συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου με την προστασία

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η συσχέτιση της κυτταροπροστατευτικής με τη σιδηροδεσμευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος. Για το σκοπό αυτό υπολογίστηκε, η ικανότητα δέσμευσης του ενδοκυττάριου σιδήρου από το καφεϊκό οξύ, φθορισμομετρικά με την τεχνική της καλσεΐνης, όπως αναλύεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, στις οποίες εξετάστηκε και η προστασία. Αρχικά μετρήθηκε ο φθορισμός της καλσεΐνης, ένα μόριο που έχει την ικανότητα να δεσμεύει δισθενή μέταλλα. Στη συνέχεια το καφεϊκό οξύ προστέθηκε σε κύτταρα φορτωμένα με καλσεΐνη, πριν την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH και παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης (ΔF), επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

Η σιδηροδεσμευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος υπολογίστηκε καταγράφοντας τις μεταβολές στα επίπεδα του φθορισμού για τις διάφορες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, θεωρώντας ως 100% την αύξηση του φθορισμού, που προκαλείται με την προσθήκη του SIH. Το EC_{50} το οποίο υποδηλώνει τη συγκέντρωση της ένωσης, η οποία μπορεί να αποσπάσει 50% του συνολικού σιδήρου, που δεσμεύει η καλσεΐνη υπολογίστηκε για το καφεϊκό οξύ (EC50=2.10mM). Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του καφεϊκού οξέος, μειώνονται οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA (IC50=2.15mM) (Εικόνα 26A) και μειώνονται τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου εντός των κυττάρων (Εικόνα 26B). Η συσχέτιση της προστατευτικής ικανότητας και της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου, ήταν στατιστικά σημαντική (συντελεστής του Spearman ρ=0.978, p <0.001) (Εικόνα 26Γ).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν, ότι η προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος οφείλεται στην ικανότητά του να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας που διαθέτει.



Εικόνα 26: Συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής ικανότητας του καφεϊκού οξέος. (A) Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶/ ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0.5-3 mM) καφεϊκού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση της βλάβης του DNA παρουσία του καφεϊκού οξέος. (B) Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 /ml) προεπωάστηκαν με καλσεΐνη-ΑΜ για 15 λεπτά στους 37 °C. Το ποσό του ενδοκυττάριου σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη, αποκαλύφθηκε από την προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή, που διαπερνά τη μεμβράνη του SIH (4 μM). Το καφεϊκό οξύ προστέθηκε απευθείας στην κυψελίδα για 20 λεπτά και η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε. Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύεται στην καλσεΐνη παρουσία του καφεϊκού οξέος (Labile Iron %). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε δύο διαφορετικά πειράματα. (Γ) Στατιστικά σημαντική συσχέτιση της προστασίας του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (p <0.001).

80

3.1.3 Διερεύνηση της προστατευτικής δράσης παραγώγων του καφεϊκού οξέος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το καφεϊκό οξύ, παρότι είχε την ικανότητα να προστατεύσει το DNA των κυττάρων, χρειάζεται υψηλές συγκεντρώσεις για να δράσει. Υποθέσαμε ότι αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η ένωση αυτή δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία ώστε να εισέλθει και να δράσει στο εσωτερικό των κυττάρων, αφού στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού, η καρβοξυλομάδα της είναι αρνητικά φορτισμένη. Για το λόγο αυτό, έγινε σύνθεση χημικών παραγώγων του καφεϊκού οξέος, από τον Επίκουρο Καθηγητή Δημοσθένη Φωκά (Τμήματος Μηχανικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), στα οποία το αρνητικό φορτίο είχε εξουδετερωθεί από το σχηματισμό εστερικών δεσμών με μεθυλο-, προπυλο- και φαιναίθυλο-ομάδες (Εικόνα 27). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η προστατευτική ικανότητα των παραγώγων αυτών σε κύτταρα που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

в



Μεθυλο-εστέρας καφεϊκού οξέος



Προπυλο-εστέρας καφεϊκού οξέος



Φαιναίθυλο-εστέρας καφεϊκού οξέος

Εικόνα 27: Συνθετικά παράγωγα καφεϊκού οξέος: (Α) μεθυλο-εστέρας, (Β) προπυλοεστέρας και (Γ) φαιναίθυλο-εστέρας.

Τα κύτταρα προεπωάστηκαν με τα παραπάνω συνθετικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος για 20 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε Η₂O₂. Όλοι οι εστέρες του καφεϊκού οξέος έδειξαν μεγαλύτερη κυτταροπροστατευτική ικανότητα σε σύγκριση με το καφεϊκό οξύ (Εικόνα 28), με την ικανότητα προστασίας να αυξάνεται σταδιακά από τον μεθυλο-εστέρα (IC50=0.91mM) στον προπυλο-εστέρα (IC50=0.22mM), ενώ ο φαιναίθυλο εστέρας έδειξε τη μεγαλύτερη προστατευτική ικανότητα (IC50=0.05mM). Φαίνεται δηλαδή ότι η προστατευτική ικανότητα αυξάνεται παράλληλα με τη λιποφιλικότητα των εστέρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι, οι εστέρες του καφεϊκού οξέος οι οποίοι δε φέρουν αρνητικό φορτίο προστάτευσαν καλύτερα το πυρηνικό DNA από το καφεϊκό οξύ. Αντίθετα η προστατευτική δράση του καφεϊκού οξέος ήταν μειωμένη σε σχέση με τους εστέρες του, αφού η καρβοξυλομάδα του είναι αρνητικά φορτισμένη στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού και επομένως δεν μπορεί να διαπεράσει με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι η αυξημένη ικανότητα προστασίας συνοδεύτηκε και με αυξημένη τοξικότητα αυτών των παραγόντων. Όλοι οι εστέρες ήταν τοξικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με τη μητρική τους ένωση, το καφεϊκό οξύ (Εικόνα 28). Η προεπώαση των κυττάρων με υψηλές συγκεντρώσεις μεθυλο-εστέρα (2mM και 3mM), απουσία H₂O₂, είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση σχάσεων στο DNA (Εικόνα 28B). Στις ίδιες συγκεντρώσεις και ο προπυλο-εστέρας εμφάνισε τοξικότητα (Εικόνα 28Γ). Τέλος, ο φαιναίθυλο-εστέρας ήταν πολύ πιο τοξικός και εμφάνισε τοξικότητα ήδη από τη συγκέντρωση των 0.5mM (Εικόνα 28Δ). Φαίνεται δηλαδή ότι ενώσεις που έχουν υψηλότερη λιποφιλικότητα εμφανίζουν παράλληλα και αυξημένη τοξικότητα.

Μια πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων είναι ότι οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται στο εσωτερικό των κυττάρων από μη ειδικές εστεράσες. Το καφεϊκό οξύ που σχηματίζεται μετά την υδρόλυση είναι αρνητικά φορτισμένο στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος και επομένως, δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων, δηλαδή να συσσωρεύεται. Τα αποτελέσματα αυτά, όμως δεν είναι αρκετά για να βγάλουμε συμπεράσματα για το μηχανισμό με τον οποίο οι ενώσεις αυτές προκαλούν σχάσεις στις μονές αλυσίδες του πυρηνικού DNA για να διευκρινιστεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός της τοξικότητας.



Εικόνα 28: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης παραγώγων καφεϊκού οξέος ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶/ ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του καφεϊκού οξέος (A), του μεθυλο-εστέρα (B) του προπυλο-εστέρα (Γ) και του φαιναίθυλο-εστέρα του καφεϊκού οξέος (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/μl οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Τα "#" και "*" υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν ή έχουν επωαστεί με H_2O_2 , αντίστοιχα (p<0.05).

3.1.3.1 Σύγκριση της προστατευτικής δράσης του φαιναίθυλο-εστέρα με του αμιδίου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Όπως προαναφέρθηκε, οι εστέρες μόλις εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες και τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι φορτισμένα αρνητικά στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα να αδυνατούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και ως εκ

83

τούτου συσσωρεύονται εντός των κυττάρων. Για το λόγο αυτό θεωρήσαμε ότι μια ένωση όπως ένα αμίδιο που δε θα υδρολύεται από μη ειδικές εστεράσες, θα μπορεί να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, αφού απουσιάζει το αρνητικό του φορτίο και δε θα συσσωρεύεται εντός των κυττάρων. Γι' αυτό, κατασκευάστηκε ένα άλλο παράγωγο του καφεϊκού οξέος το φαιναίθυλο-αμίδιο (Εικόνα 29Α), όμοιο στη δομή με το φαιναίθυλο-εστέρα, με μόνη διαφορά την αντικατάσταση του οξυγόνου, στην κετόξυ-ομάδα με άζωτο (Εικόνα 29Α) και ελέγχθηκε η κυτταροπροστατευτική του δράση σε κύτταρα που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η προεπώαση των κυττάρων με φαιναίθυλο-αμίδιο προστάτευσε σημαντικά το πυρηνικό DNA (IC50=0.14mM) από το H₂O₂, ενώ δεν εμφάνισε τοξικότητα απουσία H₂O₂ (έως τη συγκέντρωση 1 mM) (Εικόνα 29B). Η κυτταροπροστατευτική δράση του καφεϊκού οξέος ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τη δράση του εστέρα και του αμιδίου στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 30Α). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η καρβοξυλομάδα του καφεϊκού οξέος είναι αρνητικά φορτισμένη, στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία, όπως ο εστέρας και το αμίδιο. Από τη σύγκριση της δράσης του εστέρα με του αμιδίου, η κυτταροπροστατευτική ικανότητα του εστέρα ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το αμίδιο στις μικρότερες συγκεντρώσεις, με το αμίδιο, όμως, να διατηρεί την προστατευτική του δράση του σε σταθερά επίπεδα σε συγκέντρωση άνω των 0.2 mM (Εικόνα 30A). Όμως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.2 mM ο εστέρας ήταν τοξικός, ενώ το αμίδιο δεν εμφάνισε το ίδιο κάποια τοξική δράση έως τη συγκέντρωση 1 mM (Εικόνα 30A και 30B). Είναι φανερό ότι το είδος της τροποποίησης επηρεάζει σημαντικά τη δράση των παραπάνω ενώσεων. Όπως φαίνεται, στο εσωτερικό των κυττάρων, η δράση των εστερικών και των αμιδικών παραγώγων διαφέρει. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι οι εστέρες υδρολύονται εύκολα από μη ειδικές εστεράσες και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων, λόγω του αρνητικού φορτίου που δημιουργείται στο προϊόν της υδρόλυσης. Αντιθέτως, τα αμίδια είτε δεν υδρολύονται καθόλου είτε υδρολύονται με μικρή ταχύτητα σε σχέση με τους εστέρες με αποτέλεσμα να μην συσσωρεύονται ενδοκυττάρια.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι απαραίτητη προϋπόθεση για να προστατεύσει μια ένωση θα πρέπει να έχει την ικανότητα να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες και να εισέρχεται εντός των κυττάρων. Επίσης, στο εσωτερικό των κυττάρων ενώσεις που υδρολύονται και αποκτούν αρνητικό φορτίο, δε μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, και εγκλωβίζονται ενδοκυττάρια.



Εικόνα 29: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του φαιναίθυλο-αμιδίου ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶/ ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του φαιναίθυλο-αμιδίου και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Το "*" υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί με H_2O_2 (p<0.05).



Εικόνα 30: Σύγκριση της ικανότητάς του, του φαιναίθυλο-εστέρα με του -αμιδίου ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x $10^6/$ ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του καφεϊκού οξέος, του φαιναίθυλο-εστέρα και του -αμιδίου και στη συνέχεια εκτέθηκαν (A) ή όχι (B) σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.1.4 Συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου με την προστατευτική δράση παραγώγων του καφεϊκού οξέος

Για να αποδειχτεί η συσχέτιση της κυτταροπροστατευτικής με τη σιδηροδεσμευτική ικανότητα των παραγώγων του καφεϊκού οξέος, αξιολογήθηκε η ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου από τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, φθορισμομετρικά, με την τεχνική της καλσεΐνης, όπως αναλύεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Αρχικά μετρήθηκε ο φθορισμός της καλσεΐνης, ένα μόριο που έχει την ικανότητα να δεσμεύει δισθενή μέταλλα. Στη συνέχεια το καφεϊκό οξύ και οι εστέρες του προστέθηκαν σε κύτταρα φορτωμένα με καλσεΐνη, πριν την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH και παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης (ΔF), επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

Όλοι οι εστέρες έδειξαν μεγαλύτερη σιδηροδεσμευτική ικανότητα σε σύγκριση με τη μητρική τους ένωση, το καφεϊκό οξύ (Εικόνα 31Α). Παρατηρήθηκε ότι η ικανότητα δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου αυξανόταν σταδιακά από το μεθυλο-εστέρα, στον προπυλο-εστέρα, ενώ ο φαιναίθυλο-εστέρας και το φαιναίθυλο-αμίδιο έδειξαν μεγαλύτερη σιδηροδεσμευτική ικανότητα (Εικόνα 31Α). Φαίνεται δηλαδή ότι η σιδηροδεσμευτική ικανότητα αυξάνεται παράλληλα με τη λιποφιλικότητα των ενώσεων. Επίσης, στα μικρότερα χρονικά διαστήματα (5 και 10 μεγαλύτερη λεπτά) που μελετήθηκαν, 0 φαιναίθυλο-εστέρας εμφάνισε σιδηροδεσμευτική ικανότητα από το αντίστοιχο αμίδιο (Εικόνα 31Α). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν με τη διαφορετική δράση των εστερικών και των αμιδικών παραγώγων. Συγκεκριμένα, οι εστέρες υδρολύονται εύκολα από μη ειδικές εστεράσες και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων, λόγω του αρνητικού φορτίου που δημιουργείται. Αντιθέτως, τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων.

Παράλληλα, με τη σταδιακή αύξηση της σιδηροδεσμευτικής ικανότητας παρατηρήθηκε και σταδιακή αύξηση της κυτταροπροστατευτικής ικανότητας των παραπάνω ενώσεων (Εικόνα 31Α και 31Β). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η κυτταροπροστατευτική ικανότητα των ενώσεων αυτών οφείλεται στη σιδηροδεσμευτική τους ικανότητα. Η άποψη αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την στατιστικά σημαντική συχέτιση που εμφανίζεται ανάμεσα στις τιμές της προστασίας
και στις τιμές δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (συντελεστής του Spearman ρ =0.985, p < 0.001) (Εικόνα 31Γ).



Εικόνα 31: Συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής δράσης παραγώγων καφεϊκού οξέος. (A) Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10°/ml) προεπωάστηκαν με καλσεΐνη-AM για 15 λεπτά στους 37 °C. Το ποσό του ενδοκυττάριου σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη, αποκαλύφθηκε από την προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή, που διαπερνά τη μεμβράνη του SIH (4 μM). Τα παράγωγα του καφεϊκού προστέθηκαν απευθείας στην κυψελίδα για 20 λεπτά και η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε. Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύεται στην καλσεΐνη παρουσία των ενώσεων αυτών (Labile Iron %). (B) Kúttapa Jurkat (1,5 x 10^6 / ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του. Στη συνέχεια, εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μΜ Η₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση της βλάβης του DNA παρουσία της κάθε ένωσης. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε δύο διαφορετικά πειράματα. (Γ) Η συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές της προστασίας του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και στις τιμές της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου των παραπάνω ενώσεων ήταν στατιστικά σημαντική (p <0.001).

Τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν, ότι η προστατευτική ικανότητα των ενώσεων αυτών οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο διαθέσιμο σίδηρο μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας τους. Για να επιτευχθεί αυτό, όμως, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ένωση να έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων.

3.1.5 Ικανότητα των φαινολικών οξέων να εισέρχονται στον ενδοκυττάριο χώρο

Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, η κυτταροπροστατευτική και η σιδηροδεσμευτική ικανότητα των εστέρων είναι διαφορετική σε σύγκριση με το καφεϊκό οξύ. Η διαφορετική δράση των ενώσεων αυτών, υποδηλώνει ένα διαφορετικό μηχανισμό μεταφοράς τους μέσα στο κύτταρο. Είναι γνωστό πως οι ενζυμικές λειτουργίες, καθώς και οι μηχανισμοί ενεργητικής μεταφοράς των κυττάρων, αναστέλλονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Με σκοπό λοιπόν να διερευνηθεί, αν στο μηχανισμό εισόδου εμπλέκεται κάποια ενζυμική διαδικασία, μελετήθηκε η προστατευτική τους ικανότητα σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 0 °C.

Αρχικά, τα κύτταρα προεπωάστηκαν για 30 λεπτά με καφεϊκό οξύ, ή τον προπυλο-εστέρα και τον φαιναίθυλο-εστέρα του σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 0 °C και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂. Το καφεϊκό οξύ προστάτευσε μόνο στους 37 °C, ενώ στους 0 °C έχασε την προστατευτική του ικανότητα (Εικόνα 32). Αντιθέτως, ο προπυλο-εστέρας και ο φαιναίθυλο-εστέρας προστάτευσαν και στους 37 °C και στους 0 °C. Επομένως, φαίνεται ότι το καφεϊκό οξύ εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο με ένα μηχανισμό που απαιτεί ενζυμική δραστικότητα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι, η προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού εξαρτάται από τη θερμοκρασία και κατ' επέκταση η είσοδός του στα κύτταρα χρειάζεται οπωσδήποτε κάποιον ενζυμικό μηχανισμό. Αντιθέτως, η προστατευτική ικανότητα των εστέρων του δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα των εστέρων του καφεϊκού οξέος να διαχέονται παθητικά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 32: Επιπτώσεις της θερμοκρασίας στο μηχανισμό δράσης του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του στα κύτταρα. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 /ml) προεπωάστηκαν με καφεϊκό (2 mM), προπυλο-εστέρα (0.25 mM) και του φαιναίθυλο-εστέρα του καφεϊκού (0.1 mM) για 30 λεπτά στους 37° C ή στους 0° C. Στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) για 10 λεπτά, συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο DNA με την τεχνική comet assay. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Το "*" υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν επωαστεί με την ένωση (p<0.05).

3.1.6 Φαινολικά οξέα και απόπτωση

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας υπήρχαν σοβαρές ενδείξεις ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταγωγής του σήματος και ειδικότερα στην πρόκληση αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Barbouti et al., 2007; Tenopoulou et al., 2005). Για το σκοπό αυτό, διερευνήθηκε η δράση του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του, οι οποίες δεσμεύουν καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, στη διαδικασία της απόπτωσης.

Ένα χαρακτηριστικό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι οι μεταβολές που υφίσταται η κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της διεργασίας αυτής. Η σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη, η οποία συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη όταν αυτή βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αποτελεί ένα δείκτη πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Αντιθέτως, η σήμανση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (P.I.), το οποίο συνδέεται πάνω στο DNA μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί, αποτελεί ένα δείκτη νέκρωσης των κυττάρων.

Τα κύτταρα μάρτυρες, που βρίσκονται στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο (Q3, ζωντανά κύτταρα) με ποσοστό 90.82%, είναι αρνητικά σε ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο (Εικόνα 33Α). Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 250 μΜ H₂O₂ για 7 ώρες, ένα ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων 37.54%, οδηγήθηκε στη φάση της πρώιμης απόπτωσης, όπως φαίνεται στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο (Q4, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα). Η συνολική απόπτωση (δηλαδή το άθροισμα των πληθυσμών στο Q4 και στο Q2) ανήλθε στο 51.25±3.71% των κυττάρων (Εικόνα 33A). Η προεπώαση των κυττάρων με καφεϊκό οξύ ή μεθυλο-εστέρα για 20 λεπτά και έκθεση αυτών σε H₂O₂, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων 37.86% και 26.61% αντίστοιχα, σε σχέση με το συνολικό αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων (51.25 %), που επωάστηκαν παρουσία H2O2 και απουσία των παραπάνω ενώσεων. Ο μεθυλο-εστέρας έδειξε μεγαλύτερη μείωση του συνολικού αριθμού αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με το καφεϊκό οξύ, ενώ στη συγκέντρωση αυτή που μελετήθηκαν δεν εμφάνισαν καθόλου τοξικότητα (Εικόνα 33). Στην ίδια συγκέντρωση ο προπυλο-εστέρας και ο φαιναίθυλο-εστέρας προκάλεσαν αύξηση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων, απουσία H2O2 (Εικόνα 33A).

Το καφεϊκό οξύ και ο μεθυλο-εστέρας ανέστειλαν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και δεν ήταν τοξικά στη συγκέντρωση που εξετάστηκαν. Αντιθέτως, ο προπυλο-εστέρας και ο φαιναίθυλο-εστέρας, εμφάνισαν τοξικότητα απουσία H2O2. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ενώσεις που έχουν υψηλότερη λιποφιλικότητα εμφανίζουν παράλληλα και αυξημένη τοξικότητα. Αυτό θα πρέπει να οφείλεται στο γεγονός ότι οι εστέρες, όταν βρεθούν εντός των κυττάρων, υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες. Οι ενώσεις οι οποίες προκύπτουν μετά την υδρόλυση, είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του ουδέτερο pН του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και, κατά συνέπεια συσσωρεύονται εντός των κυττάρων. Αντιθέτως, τα αμίδια, όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, δεν υδρολύονται με την ίδια ευκολία και, επομένως, δεν εγκλωβίζονται εντός των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε στη συνέχεια η δράση του φαιναίθυλο-αμιδίου στη διαδικασία της απόπτωσης και συγκρίθηκε με τη δράση του αντίστοιχου εστέρα.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανεξίνη V-FITC



Εικόνα 33: Εκτίμηση της δράσης του καφεϊκού οξέος και των συνθετικά παραγώγων του στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 . (A) Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶ ανά ml) προεπωάστηκαν με 100 μΜ καφεϊκού οξέος και παραγώγων του και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό τη μορφή H_2O_2 (250μM) για 7 ώρες. Μετά τις αντίστοιχες επωάσεις, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν με ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (B) Ποσοτικοποίηση των συνολικών αποπτωτικών κυττάρων (εκφραζόμενη επί τις % του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού), πραγματοποιήθηκε αθροίζοντας τους πληθυσμούς στο Q4 (πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα) και Q2 («κύρια» αποπτωτικά κύτταρα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM δύο διαφορετικών πειραμάτων. Τα "#" και "*" υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που δεν έχουν ή έχουν επωαστεί με H_2O_2 , αντίστοιχα (p<0.05).

Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με φαιναίθυλο-εστέρα και –αμίδιο και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 , παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στις συγκεντρώσεις 5 και 10 μM (Εικόνα 34A, 34B και 34Γ). Επομένως, στις συγκεντρώσεις αυτές, ο φαιναίθυλο-εστέρας και το αντίστοιχο αμίδιο ανέστειλαν την κυτταρική απόπτωση. Όμως, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (50 και 100μM) ο φαιναίθυλο-εστέρας ήταν τοξικός, προκαλώντας αύξηση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων, απουσία H_2O_2 (Εικόνα 34B και 34Δ). Αντιθέτως, το αμίδιο, στις ίδιες συγκεντρώσεις, εμφάνισε κάποια τοξικότητα, η οποία όμως ήταν σημαντικά μειωμένη από εκείνη του φαιναίθυλο-εστέρα (Εικόνα 34B και 34Δ). Η διαφορετική αυτή δράση των εστερικών και αμιδικών παραγώγων οφείλεται στις τροποποιήσεις που υπόκειται η κάθε ένωση εντός των κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε, οι εστέρες υδρολύονται εύκολα από μη ειδικές εστεράσες και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων, λόγω του αρνητικού φορτίου που εμφανίζεται στο προϊόν. Αντιθέτως, τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι μια ένωση για να μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, θα πρέπει αφ'ενός μεν να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων και αφ' ετέρου να έχει την ικανότητα να δεσμεύει καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, στο εσωτερικό των κυττάρων. Περαιτέρω πειράματα είναι αναγκαία για τη διαλεύκανση του ακριβούς σημείου δράσης των ενώσεων αυτών στη διαδικασία της απόπτωσης.



Εικόνα 34: Σύγκριση της προστατευτικής δράσης του φαιναίθυλο-εστέρα και του – αμίδιοτου καφεϊκού οξέος από την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶ avá ml) προεπωάστηκαν με 10 μM φαιναίθυλο-εστέρα και –αμίδιο και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό τη μορφή H_2O_2 (250μM) για 7 ώρες. Η εκτίνηση της απόπτωσης έγινε με ανεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (Α). Ποσοτικοποίηση των συνολικών αποπτωτικών κυττάρων ύστερα από προεπωάση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0, 5, 10, 50 και 100 μM) φαιναίθυλο-εστέρα (B) και –αμίδιο (Γ) ή απουσία H_2O_2 (Δ). Ο συνολικός αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων (εκφραζόμενος επί τις % του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού), υπολογίστηκε αθροίζοντας τους πληθυσμούς στο Q4 (πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα) και Q2 («κύρια» αποπτωτικά κύτταρα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM δύο διαφορετικών πειραμάτων.

3.2 Φαινολικές Αλκοόλες

3.2.1 Διερεύνηση της προστατευτικής δράσης φαινολικών αλκοολών που περιέχονται στο ελαιόλαδο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Το καφεϊκό οξύ, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, λόγω της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας του στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού, δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία, ώστε να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων και να δράσει. Το εμπόδιο αυτό αντιμετωπίστηκε με τη σύνθεση των εστέρων του καφεϊκού οξέος, οι οποίοι εξουδετέρωσαν το αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη.

Παρόμοια δράση με αυτή των συνθετικών παραγώγων του καφεϊκού οξέος έχουν οι φαινολικές ενώσεις, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη που υπάρχουν σε αφθονία στο ελαιόλαδο (Εικόνα 35). Οι ενώσεις αυτές, σε αντίθεση με το καφεϊκό οξύ, δεν είναι αρνητικά φορτισμένες, διότι το υδροξύλιο της αλκοολικής ομάδας δεν αποπρωτονιώνεται στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού. Λόγω της χαρακτηριστικής αυτής ομάδα τους, οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να διαπερνούν απ' ευθείας την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχονται εντός των κυττάρων, όπως και οι εστέρες του καφεϊκού οξέος.



Εικόνα 35: Χημικές δομές της υδροξυτυροσόλης, ΗΤΥ (Α) και της τυροσόλης, ΤΥ (Β) που αποτελούν τα κύρια συστατικά των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου. Η μόνη διαφορά τους είναι η ύπαρξη μιας υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3 του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης.

Αρχικά διερευνήθηκε η ικανότητα των ενώσεων αυτών του ελαιολάδου να προστατεύουν το πυρηνικό DNA των κυττάρων από το H_2O_2 . Για το σκοπό αυτό, κύτταρα Jurkat προεπωάστηκαν για 30 λεπτά με διαφορετικές συγκεντρώσεις καφεϊκού οξέος, υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης πριν την έκθεσή τους για 10 λεπτά στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (G.O.), το οποίο παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H_2O_2 (10 μM το λεπτό), και αξιολογήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA με την τεχνική «comet assay».

Η προεπώαση των κυττάρων με καφεϊκό οξύ και υδροξυτυροσόλη για 30 λεπτά και στη συνέχεια η έκθεσή τους στο H2O2, προστάτευσε το πυρηνικό DNA, από τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες που προκαλεί το H2O2, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 36Α και 36Β). Αξίζει να σημειωθεί ότι η προστατευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης ήταν υψηλότερη (IC50=0.47mM) από εκείνη του καφεϊκού οξέος (IC50=2.15mM), το οποίο προστάτευσε μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (Εικόνα 36A και 36B). Αυτό οφείλεται στην παρουσία του αρνητικού φορτίου του καφεϊκού οξέος στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού. Η αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα του το εμποδίζει να εισέλθει απ' ευθείας στο εσωτερικό του κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, η υδροξυτυροσόλη φέρει μια υδροξυλική ομάδα στην αντίστοιχη θέση της καρβοξυλομάδας του καφεϊκού οξέος. Η ομάδα αυτή τη διευκολύνει να διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη, να εισέρχεται εντός των κυττάρων και να προστατεύει. Αντιθέτως, η τυροσόλη, δεν έδειξε καμία προστασία στις ίδιες συγκεντρώσεις με την υδροξυτυροσόλη (Εικόνα 36Γ). Καμία από τις ενώσεις αυτές δεν ήταν τοξική, στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, αφού απουσία H2O2. δεν προκάλεσαν αύξηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA.

Από τη σύγκριση των διαφορετικών δομών των παραπάνω ενώσεων η υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ, που φέρουν δύο υδροξύλια σε όρθο θέση, προστάτευσαν το πυρηνικό DNA στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, η τυροσόλη με όμοια δομή με αυτή της υδροξυτυροσόλης, με μόνη διαφορά την απουσία μιας υδροξυλομάδας στη θέση 3 του φαινολικού της δακτυλίου δεν είχε καμία προστατευτική ικανότητα (Εικόνα 36). Από τα παραπάνω, είναι φανερό ότι η ορθο-διϋδρόξυ ομάδα της υδροξυτυροσόλης και του καφεϊκού οξέος όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι απαραίτητη για να προστατεύσει το DNA των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 36: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶/ ml) προεπωάστηκαν για 30 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0-3 mM) καφεϊκού οξέος (A), (0-1mM) υδροξυτυροσόλης (B) και τυροσόλης (Γ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάση της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Με κόκκινα τετράγωνα και μπλε κύκλους σημειώνονται οι χημικές δομές που επηρεάζουν τη βιολογική δράση των συγκεκριμένων ενώσεων. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Το "*" υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί με H_2O_2 (p<0.05).

96

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του χρόνου επώασης των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης (0.01, 0.05, 0.1 και 0.5 mM για χρονικά διαστήματα 0, 10, 20, 30, 60 και 120 λεπτά). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν με 0.01 mM υδροξυτυροσόλη δεν σημειώθηκε σημαντική μείωση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA από το H₂O₂ (Εικόνα 37). Αντιθέτως, σταδιακή μείωση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA από το H₂O₂, δηλαδή σταδιακή αύξηση της προστασίας, παρατηρήθηκε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης (Εικόνα 37). Φαίνεται δηλαδή ότι η προστατευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση αλλά και από το χρόνο



Εικόνα 37: Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης της υδροζυτυροσόλης ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Κύτταρα Jurkat (1,5 × 10⁶/mL) προεπωάστηκαν με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης, στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, εκτέθηκαν σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.2.1.1 Ικανότητας της υδροξυτυροσόλης να εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο

Σε ένα επόμενο βήμα ελέγχθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο η υδροξυτυροσόλη εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο για να δράσει. Είναι γνωστό πως οι ενζυμικές λειτουργίες, διακόπτονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Με σκοπό λοιπόν να διερευνηθεί, αν στο μηχανισμό εισόδου εμπλέκεται κάποια ενζυμική διαδικασία, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα του καφεϊκού και της υδροξυτυροσόλης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 0 °C.

Αρχικά, τα κύτταρα προεπωάστηκαν με τις παραπάνω ενώσεις για 30 λεπτά, και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 0 °C (Εικόνα 38). Το καφεϊκό οξύ προστάτευσε στους 37 °C, αλλά όχι στους 0 °C. Αντιθέτως, η υδροξυτυροσόλη έδειξε την ίδια προστατευτική ικανότητα και στις δύο θερμοκρασίες (Εικόνα 38). Από το πείραμα αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι το καφεϊκό οξύ χρειάζεται τη δράση κάποιου ή κάποιων ενζυμικών μηχανισμών για να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων και να δράσει, ενώ η υδροζυτυροσόλη διαπερνά παθητικά την κυτταρική μεμβράνη. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι, η προστατευτική ικανότητα των ενώσεων αυτών σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και κατ' επέκταση από την ικανότητα της κάθε ένωσης να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων.



Εικόνα 38: Επιπτώσεις της θερμοκρασίας στο μηχανισμό δράσης του καφεϊκού οξέος και της υδροξυτυροσόλης στα κύτταρα. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 /ml) προεπωάστηκαν με καφεϊκό (2 mM) και υδροξυτυροσόλη (0.5 mM) για 30 λεπτά στους 37 °C ή στους 0 °C. Στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) για 10 λεπτά, συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι βλάβες στο πυρηνικό τους DNA με την τεχνική comet assay. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. Το "*" υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί με H₂O₂ (p<0.05).

3.2.2 Συσχέτιση της κυτταροπροστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης με την ικανότητά της να δεσμεύει ενδοκυττάριο «οξειδοαναγωγικά ενεργό» σίδηρο

Σε ένα επόμενο στάδιο ελέγχθηκε η συσχέτιση της κυτταροπροστατευτικής με τη σιδηροδεσμευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά με την τεχνική της καλσεΐνης η ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου από την υδροξυτυροσόλη.

Η σιδηροδεσμευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης υπολογίστηκε καταγράφοντας τις μεταβολές στα επίπεδα του φθορισμού για τις διάφορες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, θεωρώντας ως 100% την αύξηση του φθορισμού, που προκαλείται με την προσθήκη του SIH. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης παρατηρήθηκε μείωση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA, καθώς και μείωση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (Εικόνα 39). Αντιθέτως, η τυροσόλη στην οποία απουσιάζει η υδροξυλική ομάδα στη θέση 3 του φαινολικού της δακτυλίου, δεν είχε καμία επίπτωση στα επίπεδα του ενδοκυττάριου οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου. Φαίνεται δηλαδή ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, έχει την ικανότητα να δεσμεύει καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδα της.

Το EC50 το οποίο υποδηλώνει τη συγκέντρωση της ένωσης, η οποία μπορεί να μειώσει κατά 50% τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, που δεσμεύει η καλσεΐνη υπολογίστηκε για την υδροξυτυροσόλη (EC50=0.455mM). Αξίζει να σημειωθεί ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης, μειώνονται τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου εντός των κυττάρων και ταυτόχρονα μειώνονται οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA (IC50=0.469mM) (Εικόνα 39A και 39B). Στην Εικόνα 39Γ φαίνεται η ισχυρή στατιστική συσχέτιση της προστατευτικής ικανότητας της υδροξυτυροσόλης, με συντελεστή του Spearman ρ ίσο με 0.959 (p < 0.001).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν, ότι η προστατευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης, ενάντια στις βλάβες του πυρηνικού DNA, που προκαλούνται από το H₂O₂, οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο καταλυτικά ενεργό σίδηρο, μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας που διαθέτει.



Εικόνα 39: Συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης. (A) Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 / ml) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Στη συνέχεια, εκτέθηκαν ή όχι σε 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μΜ H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο «comet assay». Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση της βλάβης του DNA παρουσία της κάθε ένωσης. (B) Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 /ml) προεπωάστηκαν με καλσεΐνη-AM για 15 λεπτά στους 37 °C. Το ποσό του ενδοκυττάριου σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη, αποκαλύφθηκε από την προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή, που διαπερνά τη μεμβράνη του SIH (4 μM). Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη προστέθηκαν απευθείας στην κυψελίδα για 20 λεπτά και η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε. Οι τιμές εκφράζονται επί τις εκατό μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύεται στην καλσεΐνη παρουσία των ενώσεων αυτών (Labile Iron %). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. (Γ) Συσγέτιση της προστασίας του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (p <0.001).

3.2.2.1 Αναστολή της αύξησης των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου από το H₂O₂ εντός των κυττάρων από την υδροξυτυροσόλη

Στη συνέχεια καταγράφηκαν οι αλλαγές που προκαλεί η έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ και οι επιπτώσεις της προεπώασης με υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη. Αρχικά τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H₂O₂ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (15 λεπτά, 1, 3, 4 και 7 ώρες) και εκτιμήθηκαν τα επίπεδα του καταλυτικά ενεργού σιδήρου φθορισμομετρικά με την τεχνική της καλσεΐνης.

Όπως ήταν ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες, το H₂O₂ προκάλεσε ταχεία αύξηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου στα πρώτα λεπτά, που κορυφώθηκε στη 1 ώρα. Τα επίπεδα αυτά παρέμειναν αυξημένα για αρκετό διάστημα (Εικόνα 40) (Tenopoulou et al., 2005; Qenaei et al., 2014; Mantzaris et al., 2016). Σημαντική μείωση των επίπεδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με υδροξυτυροσόλη και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂ (Εικόνα 40Α). Αντιθέτως, η τυροσόλη, δεν είχε καμία επίπτωση στα επίπεδα των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου εντός των κυττάρων (Εικόνα 40Β). Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την αύξηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 40: Η υδροζυτυροσόλη αναστέλλει την αύξηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶/ml) προεπωάστηκαν για 30 λεπτά παρουσία ή απουσία 50 μM υδροζυτυροσόλης (HTy) (A) ή τυροσόλης (Ty) (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα. Η ποσότητα του ενδοκυττάριου σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη, αποκαλύφθηκε από την προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή, που διαπερνά τη μεμβράνη, του SIH (4 μM). Η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε φθορισμομετρικά, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD δύο διαφορετικών πειραμάτων.

Ένας άλλος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των επιπέδων των «καταλυτικά ενεργών» ιόντων σιδήρου ήταν η πρωτεΐνη φερριτίνη, η οποία αποτελεί την κύρια αποθήκη σιδήρου στα κύτταρα. Η έκφραση της φερριτίνης ανταποκρίνεται στις μεταβολές των «καταλυτικά ενεργών» ιόντων σιδήρου. Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της έκφρασης της πρωτεΐνης φερριτίνης με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές (0, 15 λεπτά, 1, 4 και 7 ώρες) προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της φερριτίνης από τα 15 πρώτα λεπτά (Εικόνα 41Α και 41Β). Σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η ταχεία αύξηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου από το H₂O₂ (Εικόνα 40), συνοδεύτηκε από μια γρήγορη και ισχυρή επαγωγή της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης (Εικόνα 41).

Μια πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων βασίζεται στο μοριακό μηχανισμό ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο μέσω συστημάτων αλληλεπίδρασης IRP/IRE σε συνθήκες ενδείας και περίσσειας σιδήρου (Εικόνα 16), όπως περιγγράφτηκε στην Εισαγωγή. Σε συνθήκες περίσσειας σιδήρου, πραγματοποιείται κανονικά η μετάφραση του mRNA της φερριτίνης. Η απόκριση αυτή οδηγεί από τη μια πλευρά σε αναστολή της περαιτέρω πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα μέσω της τρανσφερρίνης και από την άλλη προάγει την αποθήκευση του ενδοκυττάριου σιδήρου στην αυξημένη φερριτίνη, ώστε να αποφευχθούν οι τοξικές του επιδράσεις.

Όταν όμως τα κύτταρα προεπωάστηκαν παρουσία υδροξυτυροσόλης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂, παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης φερριτίνης. Αντιθέτως, η τυροσόλη δεν είχε καμία επίπτωση (Εικόνα 41).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την αύξηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου εντός των κυττάρων, μετά από έκθεση των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της ορθοδιϋδρόξυ ομάδα της, με αποτέλεσμα να μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα της φερριτίνης.



103

Εικόνα 41: Η υδροζυτυροσόλη αναστέλλει την αύξηση της ενδοκυττάριας φερριτίνης. Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶/ml) προεπωάστηκαν για 30 λεπτά απουσία ή παρουσία 50 μM υδροζυτυροσόλης (HTy) (A) ή τυροσόλης (Ty) (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Η έκφραση της φερριτίνης ελέγχθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τη χρήση ενός αντισώματος που ανιχνεύει τη βαριά αλυσίδα της φερριτίνης. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της φερριτίνης παρουσιάζονται στα γραφήματα στο κάτω μέρος. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM τριών διαφορετικών πειραμάτων.

3.2.3 Επίδραση της υδροξυτυροσόλης στην απόπτωση που προκαλείται από το H₂O₂

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν δείξει ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 (Mantzaris et al., 2016; Barbouti et al., 2007; Tenopoulou et al., 2005; Doulias et al., 2003). Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί και ο τρόπος δράσης της υδροξυτυροσόλης, στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο στα Υλικά και Μέθοδοι.

Η έκθεση των κυττάρων σε 250 μM H_2O_2 για 7 ώρες είχε ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων 38.06±1.33%, να οδηγηθεί στη φάση της πρώιμης απόπτωσης. σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (7.52±1.73%) (Εικόνα 42). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν με υδροξυτυροσόλη (50 μM) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων (Εικόνα 42A). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (100μM) η υδροξυτυροσόλη, προκάλεσε αύξηση του συνολικού αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων, απουσία H_2O_2 , εμφανίζοντας τοξικότητα (Εικόνα 42A). Αντιθέτως, η τυροσόλη δεν μετέβαλλε το συνολικό αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων και δεν ήταν τοξική απουσία H_2O_2 (Εικόνα 42B).

Είναι φανερό, ότι η αντιαποπτωτική δράση της υδροξυτυροσόλης οφείλεται στην παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας της, η οποία απουσιάζει από την τυροσόλη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η υδροξυτυροσόλη που προστάτευσε τα κύτταρα από την απόπτωση, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαίνεται να είναι από μόνη της τοξική και να επάγει τον κυτταρικό θάνατο. Προς το παρόν, δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για το μηχανισμό της τοξικότητας της υδροξυτυροσόλης. Επιπλέον πειράματα είναι αναγκαία για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αυτού.



Ανεξίνη V-FITC

Εικόνα 42: Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης που προκαλείται από το H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁶ ανά ml) προεπωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (50 και 100 μΜ) υδροξυτυροσόλης (A) και τυροσόλης (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό τη μορφή H2O2 (250μΜ) για 7 ώρες. Στη συνέγεια, τα κύτταρα συλλέγθηκαν και σημάνθηκαν με ανεξίνη και Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ιωδιούχο προπίδιο. ροής. Ποσοτικοποίηση των συνολικών αποπτωτικών κυττάρων (εκφραζόμενη επί τις % του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού), παρουσία υδροξυτυροσόλη (πάνω δεξιά) και τυροσόλης (κάτω δεξιά) πραγματοποιήθηκε αθροίζοντας τους πληθυσμούς στο Q4 (πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα) και Q2 (αποπτωτικά κύτταρα). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε τρία διαφορετικά πειράματα. Τα * και [#] υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί ή όχι με H_2O_2 , αντίστοιχα (p<0.01).

3.2.4 Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών

Η υδροξυτυροσόλη, όπως προαναφέρθηκε, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για το λόγο αυτό, ελέγξαμε πιο συγκεκριμένα διάφορα βήματα στο αποπτωτικό μονοπάτι για να δούμε σε ποιο σημείο στο μονοπάτι της απόπτωσης δρα η υδροξυτυροσόλη. Είναι γνωστό ότι, για τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA των κυττάρων σε τμήματα πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων, το οποίο αποτελεί το τελικό στάδιο της απόπτωσης, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών (Arnoult et al., 2003). Γι' αυτό, ελέγχθηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Ένα από τα πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας των κασπασών είναι η εκτελεστική κασπάση-3, και ένα εκ των φυσιολογικών υποστρωμάτων της κασπάσης-3 είναι το ένζυμο poly (ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP). Γι' αυτό, στη συνέχεια, εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης-3 καθώς και η σχάση του υποστρώματός της με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 για 7 ώρες οδήγησε σε σχάση της ίδιας της κασπάσης-3 αλλά και του υποστρώματός της, PARP-1, όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση θραυσμάτων με μοριακά βάρη 17-19 kDa και 81 kDa αντίστοιχα (Εικόνα 43). Φαίνεται δηλαδή, ότι η δράση του H_2O_2 ενεργοποιεί την κασπάση-3 σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Barbouti et al., 2002, Borutaite et al., 2001, Chandra et al., 2000, Hampton and Orrenius, 1997, Stridh et al., 1998). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν παρουσία υδροξυτυροσόλης, και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 , παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των σχασμένων τμημάτων της κασπάσης-3 και του υποστρώματός της (Εικόνα 43Α). Σε υψηλότερες συγκέντρωσεις (100μΜ) η υδροξυτυροσόλη ήταν τοξική από μόνη της προκαλώντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, όπως φαίνεται από την αύξηση των σχασμένων τμημάτων της κασπάσης-3 και του υποστρώματός της. Αντιθέτως, η τυροσόλη, παρουσία ή απουσία H_2O_2 , δεν είχε καμία επίπτωση (Εικόνα 43Β).

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, αναστέλλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Όμως σε υψηλότερη συγκέντρωση φαίνεται να προκαλεί από μόνη της στα κύτταρα απόπτωση.



Εικόνα 43: Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 ανά ml) προ-επωάστηκαν με 50 και 100 μM υδροξυτυροσόλης (HTy) (A) και τυροσόλης (Ty) (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μM H₂O₂ για 7 ώρες. Στα ολικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης-3 και η σχάση της πρωτεΐνης PARP με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ποσοτικοποίηση της σχάσης της πρωτεΐνης PARP με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ποσοτικοποίηση της σχάσης της πρωτεΐνης PARP με ανοσοαποτύπωση κατά Upoσόλης στη δεξιά. Τα βέλη στα δεξιά δείχνουν τα μοριακά βάρη για την PARP 113 kDa και τα σχασμένα τμήματα της PARP, 81 kDa και της κασπάσης-3, 17-19kDa. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε δύο διαφορετικά πειράματα. Τα * και [#] υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί ή όχι με H₂O₂, αντίστοιχα (p<0.01).

107

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του χρόνου επώασης των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη (50 μΜ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 1, 3, 4 και 7 ώρες) στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Σχάσεις στην κασπάσης-3 και στην PARP-1 παρατηρήθηκαν με την εμφάνιση μικρότερων τμημάτων τους μετά από 3-4 ώρες έκθεσης σε H₂O₂ (Εικόνα 44).

Σημαντική μείωση των σχασμένων τμημάτων της κασπάσης-3 και του κύτταρα σημειώθηκε υποστρώματος της όταν τα προεπωάστηκαν uε υδροξυτυροσόλη, στις 3-4 ώρες μετά την έκθεση σε Η2O2 και με αποκορύφωμα στις 7 ώρες (Εικόνα 44Α). Όμως, η εμφάνιση σχασμένων τμημάτων του υποστρώματος της κασπάσης-3, απουσία H₂O₂, δείχνει την τοξική δράση της υδροξυτυροσόλης και την ικανότητά της να προκαλεί από μόνη της την απόπτωση των κυττάρων (Εικόνα 44A). Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι αρκετά ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για το μηχανισμό τοξικότητας της υδροξυτυροσόλης. Περαιτέρω πειράματα είναι αναγκαία για να διευκρινιστεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης της. Αντιθέτως, η τυροσόλη δεν είχε καμία επίπτωση (Εικόνα 44B). Φαίνεται δηλαδή ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση του κατταράκτη των κασπασών όχι μόνο δόσο- αλλά και χρόνο- εξαρτώμενα.

Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, αναστέλλει σε κάποιο βήμα την αποπτωτική διαδικασία το οποίο προηγείται της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών. Για να ερευνήσουμε το ακριβές σημείο στο οποίο δρα η υδροξυτυροσόλη στο μονοπάτι της απόπτωσης, ελέγχθηκε στη συνέχεια η δράση της υδροξυτυροσόλης στα στάδια που προηγούνται της ενεργοποίησης των εκτελεστικών κασπασών.



109

Εικόνα 44: Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶ ανά ml) προ-επωάστηκαν με 50 μΜ υδροξυτυροσόλης (HTy) (A) και τυροσόλης (Ty) (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μΜ H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης-3 και η σχάση της πρωτεΐνης PARP με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ποσοτικοποίηση της σχάσης της πρωτεΐνης PARP και της κασπάσης-3 παρουσία υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης παρουσιάζεται στα γραφήματα κάτω από τις αντίστοιχες εικόνες. Τα βέλη στα δεξιά δείχνουν τα μοριακά βάρη για την PARP 113 kDa και τα σχασμένα τμήματα της PARP, 81 kDa και της κασπάσης-3, 17-19kDa. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε τρία διαφορετικά πειράματα.

3.2.5 Η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c (Cyt-c) από τα μιτοχόνδρια και της μεταφοράς τους στο κυτταρόπλασμα, όπου μαζί με τον παράγοντα Apaf-1 και την προκασπάση-9, σχηματίζουν το λεγόμενο αποπτώσωμα (Adrain and Martin, 2001). Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, που προκαλείται από το H₂O₂.

Η έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ για 7 ώρες οδήγησε σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση θραυσμάτων μοριακού βάρους 12-13 kDa στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 45). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν παρουσία υδροξυτυροσόλης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 45Α).

Όμως, σε υψηλότερες συγκέντρωσεις (100 μM) υδροξυτυροσόλης, απουσία του H₂O₂, ήταν τοξική από μόνη της προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Φαίνεται δηλαδή ότι η υδροξυτυροσόλη έχει την ικανότητα να επάγει την απόπτωση στη συγκεκριμένη συγκέντρωση που εξετάστηκε. Αντιθέτως, η τυροσόλη, παρουσία ή απουσία H₂O₂, δεν είχε καμία επίπτωση (Εικόνα 45B).

Είναι φανερό ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 45: Αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από την υδροξυτυροσόλη. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 ανά ml) προ-επωάστηκαν με ή χωρίς με 50 και 100 μM υδροξυτυροσόλης (HTy) (A) και τυροσόλης (Ty) (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για 7 ώρες. Στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν εξετάστηκε η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα βέλη στα δεξιά δείχνουν τα μοριακά βάρη του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές με τα ίδια αποτελέσματα. Τα * και [#] υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες που έχουν επωαστεί ή όχι με H₂O₂, αντίστοιχα (p<0.01).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του χρόνου επώασης των κυττάρων με υδροξυτυροσόλη (50 μΜ σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 1, 4 και 7 ώρες) στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παρατηρήθηκε μεταξύ 1 και 4 ώρες μετά την έκθεση σε H_2O_2 , με αποκορύφωμα στις 7 ώρες (Εικόνα 46). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν με υδροξυτυροσόλη και εκτέθηκαν σε H_2O_2 , παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ποσότητα του κυτοχρώματος c που ανιχνεύτηκε στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 46Α). Αντιθέτως, παρουσία τυροσόλης, δε σημειώθηκε καμία αλλαγή στην ποσότητα του κυτοχρώματος c που απελευθερώθηκε στο κυτταρόπλασμα μετά την έκθεση στο H_2O_2 (Εικόνα 46Β).



Εικόνα 46: Αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από την υδροξυτυροσόλη. Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10^6 ανά ml) προ-επωάστηκαν με ή χωρίς 50 μM υδροξυτυροσόλης (HTy) (A) ή τυροσόλης (Ty) (B) για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν εξετάστηκε η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα βέλη στα δεξιά δείχνουν τα μοριακά βάρη του κυτοχρώματος c. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM σε τρία διαφορετικά πειράματα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Φαίνεται ότι το σημείο της δόσο- και χρόνοεξαρτώμενης δράσης της βρίσκεται σε κάποιο βήμα, που προηγείται της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια ελέγχθηκε η δράση της υδροξυτυροσόλης στα βήματα που προηγούνται της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c.

3.2.6 Αναστολή της ενεργοποίησης των ΜΑΡ κινασών που προκαλείται από το H₂O₂ από την υδροξυτυροσόλη

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης στραφήκαμε σε ανοδικά βήματα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c για να μελετήσουμε τη δράση της υδροξυτυροσόλης στο μονοπάτι της απόπτωσης. Είναι γνωστό ότι οι προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας ογκοπρωτεϊνών Bcl-2, καθορίζουν τη διάνοιξη πόρων διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Cory and Adams, 2002; Willis et al., 2003). Επίσης, είναι γνωστό ότι προαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το Bim, το Bad, το jBid και Bax μπορούν να ενεργοποιηθούν από την JNK, μια κινάση που έχει ως υποστρώματά της τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Aoki et al., 2002; Chauhan et al., 2003; Kharbanda et al., 2000; Schroeter et al., 2003). Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια εξετάσαμε το ρόλο της υδροξυτυροσόλης στην ενεργοποίηση των MAP κινασών JNK, p38 και ERK. Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής κινητική ανάλυση και των τριών ΜΑΡΚ μελετώντας τη φωσφορυλίωση της JNK, της p38 και της ERK σε συνάρτηση με το χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε H2O2. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και η φωσφορυλίωση των JNK, p38 και ERK κινασών ανιχνεύτηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η έκθεση των κυττάρων με H_2O_2 για τα χρονικά διαστήματα από 0 έως 7 ώρες, οδήγησε στη φωσφορυλίωση και των τριών κινασών. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση της JNK που κορυφώθηκε στις 3-4 ώρες έκθεσης σε H2O2, ενώ μειώθηκε στις 7 ώρες (Εικόνα 47). Φαίνεται δηλαδή, ότι το H2O2 προκάλεσε παρατεταμένη ενεργοποίηση της JNK που είναι απαραίτητη για την πρόκληση της (Εικόνα 47). απόπτωσης Σημαντική μείωση σημειώθηκε στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της JNK, όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με υδροξυτυροσόλη, και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε Η2Ο2 (Εικόνα 47Α). Αντιθέτως, η τυροσόλη, δε μετέβαλλε καθόλου τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της JNK (Εικόνα 47B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την ικανότητα της υδροξυτυροσόλης, σε αντίθεση με την τυροσόλη, να αναστέλλει την παρατεταμένη ενεργοποίηση της JNK.



Εικόνα 47: Η υδροζυτυροσόλη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της JNK και της p38, αλλά όχι της ERK. Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10^6 /ml) προεπωάστηκαν για 30 λεπτά παρουσία ή απουσία 50 μM υδροζυτυροσόλης (HTy) (A) ή τυροσόλης (Ty) (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂ για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν εξετάστηκε η φωσφορυλίωση της JNK, p38 και ERK με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπως αναλύεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Η ποσοτικοποίηση της έντασης στις αντίστοιχες μπάντες παρουσιάζεται στα γραφήματα κάτω από τις αντίστοιχες εικόνες. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SEM τριών διαφορετικών πειραμάτων.

Με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκε και η φωσφορυλίωση της ERK, μιας κινάσης υπεύθυνης για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα επίπεδα της φωσφορυλίωση της ERK από το H₂O₂ αυξήθηκαν στα 15-30 πρώτα λεπτά, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταδιακή μείωσή τους. Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν παρουσία υδροξυτυροσόλης ή τυροσόλης, και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H₂O₂, δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK (Εικόνα 47A και 47B). Από τα αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι σε αντίθεση με την JNK η υδροξυτυροσόλη δεν επηρεάζει το μηχανισμό φωσφορυλίωσης της ERK από το H₂O₂ (Εικόνα 47A και 47B).

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε και η φωσφορυλίωση της p38 παρουσία H₂O₂ στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Παρατηρήθηκαν δύο φάσεις φωσφορυλίωσης της p38. Μια πρώτη μικρή και παροδική φωσφορυλίωση της p38 στα 5-10 πρώτα λεπτά μετά την έκθεση σε H₂O₂ και μια δεύτερη μεγαλύτερη και παρατεταμένη φωσφορυλίωση από τις 1 μέχρι τις 7 ώρες που κορυφώθηκε στις 3 ώρες (Εικόνα 47). Όταν τα κύτταρα προεπωάστηκαν παρουσία υδροζυτυροσόλης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης της p38 μόνο όμως στη δεύτερη, παρατεταμένη φάση φωσφορυλίωσης, ενώ η πρώτη φάση δεν επηρεάστηκε καθόλου (Εικόνα 47Α). Είναι πιθανόν ότι η δεύτερη φάση φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την επαγωγή του αποπτωτικού σήματος, ενώ η πρώτη φάση πιθανόν να συνδέεται με σήματα επιβίωσης σε αντιστοιχία με την ERK, αφού σε αυτές τις περιπτώσεις δε μεταβλήθηκαν καθόλου τα επίπεδα φωσφορυλίωσης. Η τυροσόλη, δεν είχε καμία επίπτωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης είτε της πρώτης είτε της δεύτερης φάσης της p38 (Εικόνα 47Β).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η υδροξυτυροσόλη αναστέλλει εξειδικευμένα την παρατεταμένη φωσφορυλίωση των JNK και p38 MAP κινασών, ενώ δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της ERK και της πρώτης φάσης της p38. Το γεγονός ότι η τυροσόλη είναι ανενεργή υποδηλώνει ότι η δέσμευση ιόντων σιδήρου στην ορθο-διϋδρόξυ θέση της υδροξυτυροσόλης είναι υπεύθυνη για αυτές τις επιπτώσεις.

Είναι φανερό ότι το H₂O₂ προκαλεί τη φωσφορυλίωση των JNK και p38 μέσω ενεργοποίησης κινασών που δρουν ανοδικά στην αλληλουχία της φωσφορυλίωσης των MAP κινασών, πιθανότατα την ASK1. Η υδροξυτυροσόλη θα μπορούσε να αναστείλει αυτές τις κινάσες, αλλά αυτή η υπόθεση χρειάζεται στήριξη από πειραματικά δεδομένα.

ENOTHTA B

3.3 Ομοιοστασία σιδήρου σε συστημικό επίπεδο

Ο διαθέσιμος «οξειδοαναγωγικά» ενεργός σίδηρος, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί τον κύριο καταλύτη για τη δημιουργία των δραστικών ελευθέρων ριζών που οξειδώνουν τα βασικά συστατικά των κυττάρων. Τα επίπεδα των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου θα πρέπει να διατηρούνται σταθερά, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστημικό επίπεδο, καθώς οποιαδήποτε διαταραχή τους, μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, οδηγώντας στην εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων. Για τον λόγο αυτόν, η φύση, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, μερίμνησε για την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών που έχουν ως στόχο την ακριβή ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου τόσο σε κυτταρικό όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι επιπτώσεις χορήγησης μεγάλων ποσοτήτων σιδήρου σε νεφροπαθείς τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Αξιολογήθηκαν οι άμεσες επιπτώσεις της χορήγησης του σιδήρου στον κορεσμό της τρανσφερρίνης (πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου στους ιστούς) και της ηπατιδίνης, της ορμόνης που ρυθμίζει την παροχή σιδήρου από τα κύτταρα προς τον ορό του αίματος.

3.3.1 Ανίχνευση του κορεσμού της τρανσφερρίνης με τη τεχνική της U-PAGE

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης του σιδήρου σε συστημικό επίπεδο σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Οι ασθενείς αυτοί αναπτύσσουν αναιμία, διότι δεν παράγουν αρκετή ερυθροποιητίνη (EPO). Επίσης, η ανεπάρκεια του διαθέσιμου λειτουργικού σιδήρου στους ασθενείς αυτούς αποτελεί την κύρια αιτία για την μειωμένη απόκριση στην ερυθροποιητίνη (EPO). Κατά συνέπεια, ως θεραπευτική αγωγή συνίσταται μαζί με τη χορήγηση σκεαυσμάτων διέγερσης της ερυθροποίησης και η ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου.

Ένας ευαίσθητος δείκτης για την αξιολόγηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου για την ερυθροποίηση είναι ο κορεσμός της τρανσφερρίνης ορού (Tf-Sat). Για τον υπολογισμό της τρανσφερρίνης σε δείγματα ορού αίματος, αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία με την οποία μπορούμε να ανιχνεύουμε τις διάφορες μορφές της τρανσφερρίνης με ακρίβεια και να υπολογίζουμε τον κορεσμό της στον ορό του αίματος μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου, ακόμη και παρουσίας στον ορό σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI). Η ικανότητα αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης της τρανσφερρίνης σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, U-PAGE), όπως αυτή αναπτύχθηκε από τους Makey και Seal το 1976 και περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, έχοντας υποστεί κάποιες τροποποιήσεις, η οποία επιτρέπει την ανάλυση των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης παρουσία ΝΤΒΙ.

Συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανίχνευση και των τεσσάρων μορφών της τρανσφερρίνης, δηλαδή την αποτρανσφερρίνη (Apo-Tf), τη μονοσιδηρική καρβοξυτελική (C-Tf-Fe), τη μονοσιδηρική αμινοτελική τρανσφερρίνη (N-Tf-Fe) και τη δισιδηρική τρανσφερρίνη (Tf-Fe₂). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που παρουσιάζουν οι μορφές αυτές της τρανσφερρίνης, κατά την ηλεκτροφόρηση, υπό τις συγκεκριμένες αποδιατακτικές συνθήκες (6M ουρία).

Σε προκαταρτικά πειράματα διάλυμα καθαρής αποτρανσφερρίνης (25 μM) επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος τρισθενούς σιδήρου (FAC, Ferric Ammonium Citrate) και αναλύθηκαν οι διάφορες μορφές τρανσφερρίνης με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης της U-PAGE, όπως περιγράφτηκε παραπάνω (Εικόνα 48Α). Απουσία σιδήρου, η τρανσφερρίνη δεν έχει δεσμευμένο σίδηρο σε κανέναν από τους δύο λοβούς της (αποτρανσφερρίνη), αποδιατάσσεται σχετικά εύκολα από την ουρία κατά την ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να μετακινείται ελάχιστα στην πηκτή (Εικόνα 48Α). Αντίθετα, η τρανσφερρίνη που έχει δεσμευμένο ένα μόνο ιόν τρισθενούς σιδήρου στο C-λοβό (μονοσιδηρική), είναι πιο σταθερή και μετακινείται περισσότερο, εμφανίζοντας μεγαλύτερη κινητικότητα από την αποτρανσφερρίνη, αλλά διανύει μικρότερη απόσταση σε σχέση με τη μονοσιδηρική τρανσφερρίνη στο Ν-λοβό (μονοσιδηρική) η οποία είναι πιο συμπαγής. Τέλος, η τρανσφερρίνη που δεσμεύει δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου (δισιδηρική) είναι σταθερότερη και διανύει μεγαλύτερη απόσταση στην πηκτή από τις άλλες μορφές τρανσφερρίνης, πριν αποδιαταχθεί από την ουρία (Εικόνα 48Α). Ποσοτικοποιώντας τις διάφορες μορφές μπορούμε να υπολογίζουμε τον κορεσμό της τρανσφερρίνης. Παρατηρήθηκε ότι ο κορεσμός της τρανσφερρίνης αυξάνεται με την προσθήκη διαλύματος αυξανόμενων συγκεντρώσεων τρισθενούς σιδήρου (Εικόνα 48B). Φαίνεται δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του σιδήρου, τόσο περισσότερα μόρια τρανσφερρίνης δεσμεύουν σίδηρο στους δύο λοβούς της, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κορεσμός της τρανσφερρίνης. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ανάλογα με τη συγκέντρωση τρισθενούς σιδήρου στο διάλυμα, ο κορεσμός της τρανσφερρίνης μεταβάλλεται.



Εικόνα 48: Διαχωρισμός των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης με ηλεκτροφόρηση πηκτής ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE). (A) Καθαρή αποτρανσφερρίνη (25 μM) επωάστηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος τρισθενούς σιδήρου FAC (0, 15, 25, 50, 100 μM) για 45 λεπτά και αναλύθηκαν οι διάφορες μορφές της τρανσφερρίνης με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης U-PAGE. (B) Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης παρουσιάζεται στο γράφημα δεξιά από την αντίστοιχη εικόνα και υπολογίστηκε με την εξής φόρμουλα: Tf-Sat(%) = [(monoferric + 2 x diferric)-band densities] x 100 / 2 x [(apo + monoferric + diferric)-band densities]. Apo-Tf (αποτρανσφερρίνη), C-Tf (μονοσιδηρική στο C-λοβό), N-Tf (μονοσιδηρική στο N-λοβό) και Tf-Fe₂ (δισιδηρική).

3.3.2 Ανίχνευση των διάφορων ισομορφών της τρανσφερρίνης στον ορό περιφερικού αίματος

Στη συνέχεια, η τεχνική της U-PAGE χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat) στον ορό περιφερικού αίματος ανθρώπων. Ο ορός είναι το πλάσμα από το οποίο το ινωδογόνο και άλλες πρωτεϊνες που εμπλέκονται στην πήξη έχουν αφαιρεθεί. Στην περίπτωση του ορού, η ανίχνευση των διαφορετικών μορφών τρανσφερρίνης προϋποθέτει την απομάκρυνση των έμμορφων συστατικών του πλάσματος με φυγοκέντρηση του δείγματος αίματος. Στη συνέχεια συλλέγεται ο ορός και επωάζονται τα δείγματα με την ουσία rivanol lactate (2,5-diamino-7 ethoxyacridine), ούτως ώστε να κατακρημνιστούν η αλβουμίνη και το μεγαλύτερο μέρος των β-σφαιρινών του ορού. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η

τρανσφερρίνη του ορού εμφανίζει διαφορετική κινητικότητα από τις γ-σφαιρίνες με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευσή της (Εικόνα 49Α).

Η ακρίβεια της τεχνικής αυτής, συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα της κλασικής εργαστηριακής μεθόδου υπολογισμού του κορεσμού της τρανσφερρίνης σε δείγματα ορού υγιών ατόμων (Εικόνα 49). Ο υπολογισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας το σίδηρο του ορού και την UIBC (Unsaturated Iron Binding Capacity, μη κορεσμένη σιδηροδεσμευτική ικανότητα), цε πυκνομετρική ανάλυση σε αυτοματοποιημένους εργαστηριακούς αναλυτές. Συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό του κορεσμού της τρανσφερρίνης αρχικά αθροίζονται οι τιμές του ολικού σιδήρου με τις τιμές της UIBC, για την εκτίμηση της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας του ορού (TIBC). Στη συνέχεια, το κλάσμα της ΤΙΒC με την τιμή του ολικού σιδήρου μας δίνει το ποσοστό κορεσμού της τρανσφερρίνης.



Εικόνα 49: Υπολογισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης ορού περιφερικού αίματος υγιών ατόμων με τη μέθοδο U-PAGE. (Α) Αντιπροσωπευτική ανάλυση διπλών δειγμάτων ορού περιφερικού αίματος τεσσάρων υγιών ατόμων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκε ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (Tf-Sat %) με την τεχνική U-PAGE, όπως αναλύεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Καθαρή αποτρανσφερρίνη (25 μM) επωάστηκε με διάλυμα τρισθενούς σιδήρου FAC (50 μM) για 45 λεπτά στους 37 °C και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ανίχνευσης των διάφορων μορφών τρανσφερρίνης (C). (B) Η συσχέτιση του κορεσμού της τρανσφερρίνης με την τεχνική της U-PAGE και με την κλασική εργαστηριακή τεχνική ήταν στατιστικά σημαντική (r=0.982, p<0.0001, n=20). Αρο-Tf (αποτρανσφερρίνη), C-Tf (μονοσιδηρική στο C-λοβό), N-Tf (μονοσιδηρική στο N-λοβό) και Tf-Fe₂ (δισιδηρική).

Από τη σύγκριση των τιμών κορεσμού της τρανσφερρίνης που υπολογίστηκε εργαστηριακά, σε δείγματα ορού περιφερικού αίματος τυχαίων υγιών ατόμων, με τιμές κορεσμού της τρανσφερρίνης που υπολογίστηκαν με την τεχνική της U-PAGE παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική (r=0.982, p<0.0001, n=20) (Εικόνα 49B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η τεχνική της U-PAGE αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμηση και τον υπολογισμό του κορεσμού της τρανσφερρίνης σε δείγματα ορού

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται πως η μέθοδος της U-PAGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αξιόπιστη τεχνική για τον υπολογισμό του κορεσμού της τρανσφερρίνης σε δείγματα ορού περιφερικού αίματος. Η τεχνική αυτή όμως πλεονεκτεί έναντι των κλασικών βιοχημικών μεθόδων κορεσμού της τρανσφερρίνης αφού εκτός από τον υπολογισμό του κορεσμού της τρανσφερρίνης παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης των διάφορων μορφών της τρανσφερρίνης με ακρίβεια ακόμα και παρουσίας σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI), μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου που λαμβάνουν οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

3.3.3 Μεταβολές στον κορεσμό της τρανσφερρίνης σε αιμοκαθαιρόμενους πριν και μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου

Ο υπολογισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat) δεν είναι δυνατόν να γίνει με τις κλασικές μεθοδολογίες σε παθολογικές καταστάσεις που οι ασθενείς λαμβάνουν σίδηρο ενδοφλεβίως. Αυτό συμβαίνει διότι οι παραδοσιακές εργαστηριακές τεχνικές βασίζονται στη μέτρηση των επιπέδων του σιδήρου στον ορό και προϋποθέτουν ότι όλος ο σίδηρος στον ορό είναι προσδεδεμένος στην τρανσφερρίνη. Ως εκ τούτου, σε περιπτώσεις που λαμβάνονται δείγματα ορού μετά την ενδοφλέβια χορήγηση παρασκευασμάτων που περιέχουν σίδηρο, οι μετρήσεις με τις παραδοσιακές τεχνικές «αδυνατούν» να παρέχουν ακριβείς μετρήσεις για τον κορεσμό της τρανσφερρίνης επειδή οδηγούν σε υπερκορεσμό της τρανσφερρίνης, όσο αυτά τα παρασκευάσματα του σιδήρου βρίσκονται ακόμα στην κυκλοφορία του αίματος. Οι εσφαλμένες αυτές τιμές λόγω υπερκορεσμού της τρανσφερρίνης σε αυτές τις περιπτώσεις σχετίζονται με την παρουσία στον ορό σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI) (Seligman and Schleicher, 1999; Sunder-Plassmann and Horl, 1996). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα έρευνα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ηλεκτροφόρησης ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE), η οποία επιτρέπει την ανάλυση των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης παρουσία σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI). Με την τεχνική αυτή, διερευνήθηκαν οι άμεσες αλλαγές του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat) δειγμάτων ορού αίματος ασθενών τελικού νεφρικού σταδίου, που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου.

Αρχικά, συλλέχθηκαν δείγματα ορού περιφερικού αίματος ασθενών που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση, 15 λεπτά πριν και 15 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου σουκρόζης (Venofer), στα τελευταία 30 λεπτά της αιμοκάθαρσης. Στους ασθενείς που χορηγήθηκε ενδοφλέβια 100 mg σιδήρου σημειώθηκε σημαντική αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Εικόνα 50B και 50Γ). Αντιθέτως, στους ασθενείς στους οποίους δεν χορηγήθηκε καθόλου σίδηρος, στα ίδια χρονικά διαστήματα, ο κορεσμός της τρανσφερρίνης παρέμεινε ο ίδιος (Εικόνα 50Α και 50Γ). Μετά τη χορήγηση σιδήρου η ένταση της μονοσιδηρικής καθώς και της δισιδηρικής τρανσφερρρίνης αυξήθηκαν σημαντικά (Εικόνα 50B). Η ταχεία αυτή αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα άμεσης μεταφοράς του σιδήρου στην ίδια την τρανσφερρίνη. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική ποσοστιαία διαφορά του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat), των δειγμάτων πριν τη χορήγηση σιδήρου έναντι των δειγμάτων μετά τη χορήγηση 100 mg σιδήρου 11.4±2.25% (21.15±5% vs 32.56±7.25%, p<0.0001, n=25 αντίστοιχα) (Εικόνα 50Γ). Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ταχεία αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου.





Εικόνα 50: Αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Αντιπροσωπευτικά δείγματα ανάλυσης διπλών δειγμάτων ορού από ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση, στους οποίους δεν χορηγήθηκε (A) ή χορηγήθηκε (B) ενδοφλεβίως 100 mg σιδήρου υπό τη μορφή σιδήρου-σουκρόζης. Τα δείγματα ελήφθησαν 15 λεπτά πριν (S_B, before) και 15 λεπτά μετά (S_{A1}, after) τη χορήγηση. Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης υπολογίστηκε με την τεχνική U-PAGE. (Γ) Ποσοτικοποίηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat %) των δειγμάτων αυτών χωρίς χορήγηση σιδήρου (αριστερά, n=10), ή μετά τη χορήγηση 100 mg σιδήρου (δεξιά, n=25, p<0.0001) παρουσιάζεται στο γράφημα. Αρο-Tf (αποτρανσφερρίνη), C-Tf (μονοσιδηρική στο C-λοβό), N-Tf (μονοσιδηρική στο N-λοβό) και Tf-Fe₂ (δισιδηρική).
3.3.4 Αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και των επιπέδων της ηπατιδίνης του ορού μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου

Σε ένα επόμενο στάδιο μελετήθηκαν οι μεταβολές του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat %) του ορού, σε ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Παράλληλα με τον κορεσμό της τρανσφερρίνης εξετάστηκαν και τα επίπεδα της ηπατιδίνης, της κύριας ορμόνης που ρυθμίζει την ομοιοστασία του σιδήρου στον οργανισμό στα ίδια δείγματα, προκειμένου να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα για το ρόλο του σιδήρου σε συστημικό επίπεδο στη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση.

Δείγματα ορού συλλέχθηκαν από έξι αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς 15 λεπτά πριν (χρονικό σημείο 0) και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου (1, 2, 3, 5, 7, και 9 ώρες) (Εικόνα 51). Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης αναλύθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης ουρίαςπολυακρυλαμιδίου (U-PAGE) και τα επίπεδα της ηπατιδίνης εκτιμήθηκαν με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική ELISA από την κ. Μαμαλάκη του Ινστιτούτο Παστέρ των Αθηνών, όπως αναλύεται στα Υλικά και Μέθοδοι.



Εικόνα 51: Δειγματοληψίες του ορού του αίματος πριν και μετά τη χορήγηση ενδοφλέβιου σιδήρου σε αιμοκαθαιρόμενους. Δείγματα ορού αίματος συλλέχθηκαν από 6 ασθενείς σε αιμοκάθαρση 15 λεπτά πριν (χρονικό σημείο 0, S_B) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου σουκρόζης (1, 2, 3, 5, 7, και 9 ώρες, S_{Ai}).

Ασθενείς	Ηλικία (χρόνια)	Χρόνια Αιμοκάθαρσης	Hgb (g/dl)	Hct (%)	REC (%)	Fer (ng/ml)	CRP (mg/dl)	Κατάσταση Νοσηρότητας
1	48	1	12.0	36.2	1.81	-	-	Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα
2	62	17	10.8	32.8	1.80	-	-	Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα
3	59	7	10.6	31.5	2.80	356.6	1.13	Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα
4	57	6	11.5	34.9	4.92	-	-	Διαβητική νεφροπάθεια
5	82	2	13.3	42.2	1.5	64.1	0.77	Υπερτασική νεφροσκλήρυνση
6	80	5	11.5	35.6	1.9	132.2	0.35	Διαβητική νεφροπάθεια

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά των έξι αιμοκαθαιρόμενων ασθενών που εξετάστηκαν στην Εικόνα 52. Hgb: αιμοσφαιρίνη, Hct: αιματοκρίτης, REC: δικτυοερυθροκύτταρα, Fer: φερριτίνη ορού, CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.

Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της δισιδηρικής (TF-Fe₂) τρανσφερρίνης (Εικόνα 52 κέντροδεξια). Παράλληλα σημειώθηκε και σημαντική αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat %) σε όλα τα δείγματα των ατόμων που υποβλήθηκαν σε αιμοκάθαρση, μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Συγκεκριμένα, στους περισσότερους ασθενείς (4 από τους 6), ο κορεσμός της τρανσφερρίνης έφτασε σε μία μέγιστη τιμή στις 3 με 5 ώρες μετά τη χορήγηση σιδήρου, όμως μετά ξεκίνησε να μειώνεται. Ενώ στους υπόλοιπους 2, ο κορεσμός της τρανσφερρίνης καθώς και η δισιδηρική της μορφή συνέχιζε να αυξάνεται έως τις 9 ώρες που διήρκησαν οι δειγματοληψίες (Εικόνα 52 κέντροαριστερα και κέντροδεξια αντίστοιχα). Η μέση διακύμανση του κορεσμού της τρανσφερρίνης, Δ Tf-Sat (%) και της δισιδηρικής τρανσφερρίνης, Δ TF-Fe₂ (%) μεταξύ αρχικών και μέγιστων τιμών ήταν 28.68±12.7% και 20.64±9.9% αντίστοιχα (ρ<0.0001, n=6).

Ταυτόχρονα, υπολογίστηκε η έκφραση της ηπατιδίνης στον ορό στα ίδια δείγματα που εξετάστηκε ο κορεσμός της τρανσφερρίνης. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής συνοδεύτηκε από μία παράλληλη αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης στον ορό των ασθενών (Εικόνα 52 δεξιά). Στους περισσότερους ασθενείς τα επίπεδα ηπατιδίνης μετά την αρχική αύξηση παρέμειναν υψηλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Εικόνα 52). Η αύξηση αυτή κυμαινόταν μεταξύ 25% και 200% των αρχικών τιμών μεταξύ των διαφόρων ασθενών.



Εικόνα 52: Αλλαγές του κορεσμού της τρανσφερρίνης, της δισιδηρικής της μορφής και των επιπέδων της ηπατιδίνης του ορού μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Δείγματα ορού αίματος συλλέχθηκαν από 6 ασθενείς σε αιμοκάθαρση 15 λεπτά πριν (χρονικό σημείο 0) και σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου σουκρόζης (1, 2, 3, 5, 7, και 9 ώρες). Η ανάλυση των διαφορετικών μορφών της τρανσφερρίνης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική U-PAGE (αριστερά) και τα επίπεδα

κορεσμού της τρανσφερρίνης (κέντροαριστερα) και δισιδηρικής τρανσφερρίνης (κέντροδεξια) ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την ένταση της αποτύπωσης των αντίστοιχων μορφών τρανσφερρίνης. Η συγκέντρωση της ηπατιδίνης στον ορό (δεξιά) υπολογίστηκε με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική ELISA. Οι σκιαγραφημένες περιοχές υποδηλώνουν τη χρονική περίοδο χορήγησης σιδήρου (30 λεπτά). Apo-Tf (αποτρανσφερρίνη), C-Tf (μονοσιδηρική στο C-λοβό), N-Tf (μονοσιδηρική στο N-λοβό), Tf-Fe₂ (δισιδηρική) και ηπατιδίνη (Hepc).

Υψηλή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής με τα επίπεδα της ηπατιδίνης του ορού (r = 0.622, p<0.001 και r = 0.418, p<0.001 αντίστοιχα) (Εικόνα 53).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια χρόνο-εξαρτώμενη αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης καθώς και των επιπέδων της δισιδηρικής τρανσφερρίνης αμέσως μετά τη χορήγηση σιδήρου σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Η παράλληλη αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση σιδήρου στον ορό, η οποία αυξάνει τα επίπεδα της δισιδηρικής τρανσφερρίνης, οδηγώντας έτσι σε έκκριση της ηπατιδίνης από τα ηπατοκύτταρα στην κυκλοφορία.



Εικόνα 53: Συσχέτιση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής με τα επίπεδα της ηπατιδίνης στον ορό. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat%) (A) και της δισιδηρικής της μορφής (Tf-Fe₂%) (B) με την ηπατιδίνη του ορού (Hepc), όλων των δειγμάτων των έξι ασθενών του σχήματος 52.

3.3.5 Μεταβολές των επιπέδων του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της ηπατιδίνης στον ορό μετά από χορήγηση διαφορετικών ποσοτήτων σιδήρου

Σε ένα επόμενο στάδιο επιχειρήσαμε να ελέγχξουμε τη χρονική εξέλιξη του φαινομένου αυτού μελετώντας τα επιπέδα του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της ηπατιδίνης στον ορό μετά από χορήγηση διαφορετικών ποσοτήτων σιδήρου. Συγκεκριμένα, δείγματα ορού περιφερικού αίματος, συλλέχθηκαν 15 λεπτά πριν (χρονικό σημείο 0) και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 2, 3, 4 και 6 ώρες) μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 25, 50 και 100 mg σιδήρου σουκρόζης σε διαφορετικές συνεδρίες αιμοκάθαρσης (Εικόνα 54).

Αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής σημειώθηκε μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου (Εικόνα 54A και 54B). Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης έφτασε σε μία μέγιστη τιμή στις 4 ώρες μετά τη χορήγηση σιδήρου (ΔTf-Sat>20%) και στη συνέχεια ξεκίνησε να μειώνεται (Εικόνα 54Α). Όμως η αύξηση αυτή δεν ήταν η ίδια όταν η ποσότητα του ενδοφλέβιου σιδήρου που χορηγήθηκε μειώθηκε στη μισή (50 mg). Συγκεκριμένα μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 50 mg σιδήρου ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (Δ Tf-Sat>10%), ο οποίος συνέχιζε να αυξάνεται ως τις 6 ώρες που διήρκησαν οι δειγματοληψίες και η δισιδηρική της μορφής ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τον κορεσμό της τρανσφερρίνης και τη δισιδηρική της μορφή, μετά την ενδοφλέβια χορήγηση 100 mg σιδήρου (Εικόνα 54Α και 54Β). Όταν χορηγήθηκε ακόμα χαμηλότερη ποσότητα σιδήρου (25 mg) τα επίπεδα του κορεσμού της τρανσφερρίνης καθώς και η ένταση δισιδηρικής της μορφής δε μεταβλήθηκαν σημαντικά σε όλα τα χρονικά διαστήματα που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες (Εικόνα 54Α και 54Β). Φαίνεται δηλαδή ότι ο κορεσμός της τρανσφερρίνης και τα επίπεδα της δισιδηρικής της μορφής αυξάνονται ανάλογα με την ποσότητα του σιδήρου που χορηγείται.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της ηπατιδίνης στον ορό. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής συνοδεύτηκε από μία παράλληλη αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης στον ορό, η οποία ήταν ανάλογη με τις ενδοφλέβιες ποσότητες σιδήρου που χορηγήθηκαν στους ασθενείς. Δηλαδή, τα επίπεδα της ηπατιδίνης δεν μεταβλήθηκαν όταν χορηγήθηκαν 25 mg σιδήρου, ενώ από τα πρώτα χρονικά διαστήματα που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης στα 50 mg σιδήρου και ακόμα υψηλότερη στα 100 mg σιδήρου (Εικόνα 54Γ).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι χαμηλότερες δόσεις σιδήρου οδηγούν σε ηπιότερες μεταβολές του κορεσμού της τρανσφερρίνης και των επιπέδων της ηπατιδίνης στον ορό του αίματος.



Εικόνα 54: Αύξηση των επιπέδων του κορεσμού της τρανσφερρίνης, της δισιδηρικής τρανσφερρίνης και της ηπατιδίνης μετά από χορήγηση διαφορετικών ποσοτήτων σιδήρου. Δείγματα ορού περιφερικού αίματος αιμοκαθαιρόμενων συλλέχθηκαν 15 λεπτά πριν (χρονικό σημείο 0) και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1, 2, 3, 4 και 6 ώρες) μετά τη χορήγηση 25, 50 και 100 mg σιδήρου σουκρόζης. Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (ΔTf-Sat %) (A) και της δισιδηρικής της μορφή (ΔTF-Fe₂ %) (B) αναλύθηκαν με την τεχνική της U-PAGE, ενώ τα επίπεδα της ηπατιδίνης (ΔHepc) (Γ) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική ELISA.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Καταλυτικά ενεργός σίδηρος (Labile Iron)

Ο σίδηρος αποτελεί ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τη ζωή γιατί συμμετέχει σε πολλαπλές και σημαντικές βιολογικές διαδικασίες όπως στη μεταφορά του οξυγόνου, στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, αλλά και ως προσθετική ομάδα σε διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της αίμης και των συμπλόκων σιδήρου-θείου. Ωστόσο, σε περιπτώσεις στις οποίες τα επίπεδά του στον οργανισμό είναι υψηλότερα ή χαμηλότερα του κανονικού, προκαλούνται σοβαρές παρενέργειες. Από την άλλη πλευρά, όμως, όταν ο σίδηρος είναι διαθέσιμος στην οξειδοαναγωγικά ενεργή του μορφή, μπορεί να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, καταλύοντας τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (αντίδραση Fenton), ικανές να επιτίθενται και να οξειδώνουν όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά (Weinberg, 2010; Kurz et al., 2010; Galaris and Pantopoulos, 2008; Sullivan, 2007; Cadenas, 1989), προκαλώντας την εμφάνιση και εξέλιξη σοβαρών παθολογικών καταστάσεων. Για τον λόγο αυτό, η φύση, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, μερίμνησε για την ανάπτυξη πολύπλοκων μοριακών μηχανισμών που έχουν ως στόχο την αυστηρή ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο οργανισμού (Hentze et al., 2010; Andrews, 2008).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο καταλυτικά ενεργός αυτός σίδηρος βρίσκεται στα κύτταρα σε ποσοστό λιγότερο του 5% του συνολικού σιδήρου και καλείται «καταλυτικά ενεργός ή οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος» (Labile Iron, LI) (Kakhlon and Cabantchik, 2002). Ο σίδηρος αυτός κατανέμεται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Tenopoulou et al., 2007; Petrat et al., 2002), αλλά η ακριβής φύση του παραμένει άγνωστη μέχρι σήμερα. Βέβαια, δεν αντιπροσωπεύει τον «ελεύθερο» σίδηρο με την αυστηρή έννοια του όρου, αλλά θεωρείται ότι συνδέεται χαλαρά με διάφορα συστατικά των κυττάρων, δηλαδή σε μια «ασταθή» (οξειδοαναγωγικά δραστική) μορφή. Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως είναι οι περιπτώσεις ενός τραύματος, μιας μόλυνσης ή μιας φλεγμονής, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς για να μειώνουν τη διαθεσιμότητα του σιδήρου, ώστε να προστατεύονται από την τοξική του δράση (Ganz, 2006). Έτσι, είναι εύλογο να φανταστεί κανείς ότι οποιαδήποτε ένωση η οποία μπορεί να επηρεάζει το ενδοκυτταρικό επίπεδο ή τη φύση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου, επηρεάζει επίσης και τη δράση του και, κατά συνέπεια, μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.

4.2 Σχέσεις διατροφής και καταλυτικά ενεργού σιδήρου

Μακροχρόνιες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση Μεσογειακού τύπου διατροφής είναι εξαιρετικά ωφέλιμη για τη διατήρηση της υγείας των ανθρώπων. Κατά συνέπεια, είναι φυσικό να υποθέσει κανείς ότι ορισμένα συστατικά αυτής της δίαιτας προστατεύουν από την εμφάνιση και την ανάπτυξη σοβαρών παθολογικών καταστάσεων.

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός παραγόντων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι συσσωρευμένος σε φυτικής προέλευσης συστατικά και έχει προταθεί ότι αυτοί οι παράγοντες προστατεύουν από τις οξειδώσεις που προκαλούνται από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες. Οι ενώσεις αυτές έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και έχει προταθεί ότι είναι υπεύθυνοι για τις ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία. Δυστυχώς, όμως, παρά τις μακροχρόνιες μελέτες χορήγησης αντιοξειδωτικών ενώσεων σε ανθρώπους, η υπόθεση αυτή ότι δηλαδή δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών αποδείχθηκε λανθασμένη (Warnholtz and Munzel, 2000).

Μια εναλλακτική υπόθεση εργασίας που έχει ελεγχθεί πειραματικά από την ερευνητική μας ομάδα είναι ότι η Μεσογειακή διατροφή έχει ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία, διότι περιέχει βιοδραστικές ενώσεις που έχουν την ικανότητα να διαχέονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και να δεσμεύουν τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου (labile iron) (Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Melidou et al., 2005, Nousis et al., 2005). Η ενδοκυττάρια δέσμευση σιδήρου είναι ικανή να προστατεύσει τα βασικά κυτταρικά συστατικά από τις ανεξέλεγκτες οξειδώσεις σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες. Η βασική διαφορά μεταξύ αυτής της πρότασης και της θεωρίας της εκκαθάρισης των δραστικών ελευθέρων ριζών έγκειται στο ότι δεσμεύοντας τα καταλυτικά ιόντα σιδήρου εμποδίζεται η δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών, ενώ δρώντας ως εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών αναστέλλεται η τοξική τους δράση αφού όμως πρώτα έχουν δημιουργηθεί. Επομένως, είναι φυσιολογικό να υποθέσει κανείς ότι διάφορες φαινολικές ενώσεις της διατροφής που εισέρχονται στα κύτταρα, ικανές να αποσπάσουν τα ιόντα σιδήρου από θέσεις χαμηλής συγγένειας δέσμευσης, καθιστούν τις θέσεις αυτές άτρωτες, σε περιπτώσεις απότομης έκθεσης των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

4.2.1 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης των φαινολικών οξέων

Οι άνθρωποι προσλαμβάνουν καθημερινά με τη διατροφή μεγάλες ποσότητες φαινολικών οξέων, κυρίως με τη μορφή εστέρων του καφεϊκού οξέος (Rechner et al., 2001; Moridani et al., 2001). Έχει προταθεί ότι η κατανάλωση των φαινολικών αυτών ενώσεων συμβάλλει στην διατήρηση της υγείας του ανθρώπου μέσω μιας ποικιλίας μοριακών μηχανισμών. Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από φυσικά προϊόντα έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιϊκές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Prasaud et al., 2011; Liao et al., 2003; Kudugunti et al., 2010; Wang et al., 2008; Chiang et al., 2005; Kikuzaki et al., 2002; Hwang et al., 2012). Η πραγματική βιοχημική βάση των μηχανισμών αυτών παραμένει ελάχιστα κατανοητή και τα πειραματικά δεδομένα είναι ιδιαίτερα αμφιλεγόμενα, συμπεριλαμβανομένων τόσο κυτταροπροστατευτικών όσο και κυτταροτοξικών αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε κατ' αρχήν στους μηχανισμούς κυτταρικής προστασίας που προσφέρουν διάφορα φαινολικά οξέα (βλέπε εικόνα 22). Οι παράγοντες αυτοί περιέχονται σε πλήθος συστατικών της διατροφής. Για το λόγο αυτό, η έρευνά μας κατευθύνθηκε στην αξιολόγηση της ικανότητας των συγκεκριμένων ενώσεων να προστατεύουν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες υπό τη μορφή H₂O₂. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε το συμπέρασμα ότι το καφεϊκό οξύ προστάτευσε το πυρηνικό DNA, αλλά σε πολύ υψηλές μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις (βλέπε εικόνα 23). Επίσης, η προστατευτική ικανότητά του, φαίνεται να μην εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση αλλά και την περίοδο επώασης των κυττάρων με την ένωση αυτή (βλέπε εικόνα 25). Επιπλέον, έγινε φανερό ότι η κυτταροπροστατευτική του ικανότητα οφείλεται στην παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας του, η οποία είναι γνωστό ότι μπορεί και δεσμεύει ιόντα σιδήρου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο εργαστήριό μας έχει αποδειχτεί ότι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά που ευνοεί την προστατευτική δράση ενώσεων φυτικής προέλευσης, όπως τα φλαβονοειδή, είναι η παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας σε ένα από τους φαινολικούς δακτυλίους (Melidou et al., 2005; Nousis et al, 2005).

Έχει προταθεί στο παρελθόν ότι η δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου λειτουργεί ως μηχανισμός προστασίας ενάντια στη βλάβη του DNA που προκαλείται από το H₂O₂ (Barbouti et al., 2001; Doulias et al., 2003; Melidou et al., 2005). Για το λόγο αυτό, η έρευνά μας κατευθύνθηκε στην αξιολόγηση της ικανότητας των υπό εξέταση ενώσεων να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο καταλυτικά ενεργό σίδηρο. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής ικανότητας του καφεϊκού οξέος (βλέπε εικόνα 26). Επομένως, η προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος οφείλεται στην ικανότητά του να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας που διαθέτει και με τον τρόπο αυτό προστατεύει το πυρηνικό DNA από το H₂O₂.

Ενώσεις, όπως το καφεϊκό οξύ, του οποίου η καρβοξυλομάδα είναι αρνητικά φορτισμένη στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού, δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία ώστε να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, και χρειάζονται περισσότερο χρόνο και υψηλότερες συγκεντρώσεις για να προστατεύσουν (βλέπε εικόνες 23 και 25). Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τον τρόπο εισόδου του καφεϊκού οξέος στα κύτταρα παρά με την ικανότητά του να δεσμεύει σίδηρο. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας, η δεσφεριοξαμίνη, ένας ισχυρός σιδηροδεσμευτής, εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης που απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα (Doulias et al., 2005; Tenopoulou et al., 2005). Η παρατήρηση αυτή δύναται να αποτελεί μια πιθανή εξήγηση και για την περίπτωση του καφεϊκού οξέος (βλέπε εικόνα 55). Η πρόταση αυτή στηρίζεται επίσης από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους 0 °C αντί για τους 37 °C, δείχνοντας ότι το καφεϊκό οξύ προστάτευσε μόνο στους 37 °C, ενώ στους 0 °C η προστατευτική του ικανότητα χάθηκε (βλέπε εικόνα 32). Επομένως, ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του καφεϊκού οξέος φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητά του να εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια. Η λιποφιλικότητα του καφεϊκού οξέος μπορεί να αυξηθεί με πρωτονίωση της καρβοξυλικής ομάδας στο όξινο pH των λυσοσωματίων, γεγονός που εξουδετερώνει το ηλεκτρικό φορτίο του καφεϊκού οξέος

και με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η διάχυσή του στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, στον ενδοκυττάριο χώρο δεσμεύει τον διαθέσιμο καταλυτικά ενεργό σίδηρο μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας του, προστατεύοντας το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα κύτταρα δεν είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες επειδή τα επίπεδα του διαθέσιμου σίδηρου για την παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών είναι μειωμένα.



Εικόνα 55: Μηχανισμός προστατευτικής δράσης του καφεϊκού οξέος και των συνθετικών παραγώγων του. Το καφεϊκό οξύ, δεν μπορεί να διαπεράσει με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας του στο ουδέτερο pH και εισέρχεται στα κύτταρα πιθανόν με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης στα ενδοσωμάτια και λυσοσσωμάτια. Εκεί λόγω του χαμηλού pH πρωτονιώνεται και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως, οι εστέρες του καφεϊκού οξέος, όπως ο προπυλεστέρας (CAPE) διαχέονται παθητικά. Οι ενώσεις αυτές μόλις βρεθούν στον ενδοκυττάριο χώρο δεσμεύουν τον διαθέσιμο καταλυτικά ενεργό σίδηρο μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας τους, προστατεύοντας το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Προκειμένου να εξουδετερώσουμε το αρνητικό φορτίο του καφεϊκού οξέος, το οποίο το εμποδίζει να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθει στον ενδοκυττάριο χώρο για να δράσει, συντέθηκαν χημικά παράγωγα του καφεϊκού οξέος, με το σχηματισμό εστερικών δεσμών με μεθυλο-, προπυλο- και φαιναίθυλο-ομάδες (βλέπε εικόνα 27). Υποθέσαμε ότι η αλλαγή αυτή θα αυξήσει την λιποφιλικότητα των συνθετικών παραγώγων του καφεϊκού οξέος και κατά συνέπεια, θα διευκολύνει τη διάχυση των παραγώγων αυτών μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι η κυτταροπροστατευτική δράση των εστέρων του καφεϊκού οξέος ήταν πολύ αυξημένη σε σχέση τη μητρική ένωση (βλέπε εικόνα 28).

Η προστατευτική δράση του καφεϊκού οξέος και των εστερικών παραγώγων του φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα των ενώσεων αυτών α) να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία και β) στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας τους εντός των κυττάρων, προστατεύοντας έτσι το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (βλέπε εικόνα 55). Αυτή η πρόταση υποστηρίζεται επίσης από τις παρατηρήσεις στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους 0 °C αντί για τους 37 °C. Ο προπυλο-εστέρας και ο φαιναίθυλο-εστέρας του καφεϊκού οξέος παρέμειναν το ίδιο αποτελεσματικοί, ενώ η προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος χάθηκε (βλέπε εικόνα 32). Είναι εύλογο να φανταστεί κανείς ότι στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος, η διαδικασία της ενδοκύττωσης αναστέλεται σε χαμηλή θερμοκρασία, ενώ ο προπυλεστέρας και ο φαιναίθυλο-εστέρας.

Εκτός από την κυτταροπροστατευτική ικανότητα των εστερικών παραγώγων του καφεϊκού οξεος ενδιαφέρον προκάλεσε η εμφάνιση τοξικότητας των ενώσεων αυτών σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις απουσία H₂O₂ (βλέπε εικόνα 28). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών στο εσωτερικό των κυττάρων από μη ειδικές εστεράσες. Οι ενώσεις που προκύπτουν μετά την υδρόλυση αυτή είναι αρνητικά φορτισμένες στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος και αδυνατούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα τη σταδιακή συσσώρευση τους εντός των κυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε τοξικές επιπτώσεις. Για το λόγο αυτό συντέθηκε ένα άλλο παράγωγο του καφεϊκού οξέος, το φαιναιθυλο-αμίδιο (βλέπε εικόνα 29Α), που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, αφού απουσιάζει το αρνητικό του φορτίο, αλλά δεν υδρολύεται εντός των κυττάρων, ούτως ώστε να συσσωρεύεται. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι ο φαιναίθυλο-εστέρας προσέφερε μεγαλύτερη προστασία και μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με το φαιναιθυλο-αμίδιο (βλέπε εικόνες 29B και 30). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν ελέγχθηκε η ικανότητα των ενώσεων αυτών να αναστέλλουν την απόπτωση. Και οι δυο αυτές ενώσεις ανέστειλαν την απόπτωση στις μικρότερες συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ο φαιναίθυλο-εστέρας ήταν περισσότερο τοξικός από το φαιναιθυλο-αμίδιο (βλέπε

εικόνα 34). Τα αποτελέσματα αυτά σχετίζονται με το είδος της τροποποίησης που έχει υποστεί η κάθε ένωση, με αποτέλεσμα η δράση των εστερικών και των αμιδικών παραγώγων να διαφέρει. Συγκεκριμένα, οι εστέρες υδρολύονται εύκολα από μη ειδικές εστεράσες και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων ως καφεϊκό, λόγω του αρνητικού του φορτίου στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος. Αντίθετα τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν εγκλωβίζεται εντός των κυττάρων.

Συμπερασματικά, η προστατευτική ικανότητα μιας ένωσης οφείλεται στις εξής ιδιότητες: 1) Στην ικανότητά της να διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η προστασία αυτή είναι πιο αποτελεσματική όταν η λιποφιλικότητα των παραγόντων αυτών αυξάνεται, επιτρέποντας τη διάχυσή τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. 2) Στην ικανότητα της να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της ορθο-διϋδρόξυ-ομάδας της.

4.2.2 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης των φαινολικών αλκοολών

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η προστατευτική ικανότητα δυο φαινολικών ενώσεων, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης. Επιλέξαμε τις δυο αυτές ενώσεις για τρεις κύριους λόγους: 1) αντιπροσωπεύουν τους κύριους φαινολικούς παράγοντες του ελαιόλαδου, 2) σε αντίθεση με τα φαινολικά οξέα, οι αλκοόλες δεν είναι αρνητικά φορτισμένες και, επομένως, έχουν την ικανότητα να διαχέονται ευκολότερα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, και 3) έχουν παρόμοια δομή με τη διαφορά ότι στη θέση 3 του αρωματικού δακτυλίου στην τυροσόλη το υδρογόνο έχει αντικατασταθεί με μια υδροξυλική ομάδα στην υδροξυτυροσόλη (βλέπε εικόνα 35). Αυτή η δομική ομοιότητα μεταξύ των δυο ενώσεων μας επιτρέπει να βγάλουμε συμπεράσματα για το ρόλο της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας, που βρίσκεται σε αφθονία και σε άλλους παράγοντες της διατροφής και ειδικότερα στη Μεσογειακή δίαιτα.

Πράγματι, στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η ορθο-διϋδρόξυ ομάδα του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης προστάτευσε το πυρηνικό DNA δόσοκαι χρόνο-εξαρτώμενα (βλέπε εικόνες 36B και 37). Αντιθέτως, η τυροσόλη στην οποία απουσιάζει η υδροξυλομάδα στη θέση 3 του φαινολικού δακτυλίου δεν έδειξε καμία προστασία (βλέπε εικόνα 36Γ). Κατά συνέπεια η παρουσία της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας είναι υπεύθυνη για την κυτταροπροστατευτική ικανότητα. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η δράση της υδροξυτυροσόλης είναι παρόμοια με των εστέρων του καφεϊκού οξέος. Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη προστάτευσε σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το καφεϊκό οξύ (βλέπε εικόνες 36A και 36B). Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η υδροξυτυροσόλη διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη, ενώ το καφεϊκό οξύ λόγω της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας του δε μπορεί να εισέλθει απ' ευθείας στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η πρόταση υποστηρίζεται επιπλέον με τις παρατηρήσεις από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους 0 °C αντί για τους 37 °C. Όπως και με τους εστέρες του καφεϊκού οξέος, η υδροξυτυροσόλη παρέμεινε το ίδιο αποτελεσματική και στους 0 °C και στους 37 °C, ενώ η προστατευτική ικανότητα του καφεϊκού οξέος χάθηκε στους 0 °C (βλέπε εικόνα 38). Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος, η διαδικασία της ενδοκύττωσης αναστέλλεται σε χαμηλή θερμοκρασία, ενώ η υδροξυτυροσόλη διαχέεται παθητικά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης.

Για να προστατεύσει μια ένωση όπως είδαμε και με το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του όταν εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου θα πρέπει να δεσμεύει το διαθέσιμο «καταλυτικά ενεργό» σίδηρο. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια ελέγξαμε άμεσα την ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου εντός των κυττάρων. Πράγματι, η υδροξυτυροσόλη, σε αντίθεση με την τυροσόλη, έχει την ικανότητα να μειώνει τα επίπεδα των «καταλυτικά ενεργών» ιόντων σιδήρου (βλέπε εικόνα 39) και να αναστέλλει την ταχεία αύξηση των επιπέδων του διαθέσιμου σιδήρου που προκαλεί το H₂O₂ (βλέπε εικόνα 40). Επομένως, προτείνεται ότι η προστατευτική ικανότητα της υδροξυτυροσόλης οφείλεται στην ικανότητά της να μειώνει τον ενδοκυττάριο σίδηρο μέσω της δέσμευσής του στην ορθο-διϋδρόζυ ομάδας της.

Ένας άλλος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των επιπέδων των «καταλυτικά ενεργών» ιόντων σιδήρου ήταν η πρωτεΐνη φερριτίνη, η κύρια αποθήκη σιδήρου στα κύτταρα. Η έκφρασής της φερριτίνης ανταποκρίνεται στις μεταβολές των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και η ταχεία αύξηση των επιπέδων της μετά την έκθεση σε H₂O₂, θεωρείται ως ένας προστατευτικός μηχανισμός (βλέπε εικόνα 41). Αντανακλά μια γρήγορη απόκριση των κυττάρων, ούτως ώστε να αντισταθμίσει τις πιθανές τοξικές επιπτώσεις που προκαλούνται από την ταυτόχρονη παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου των καταλυτικά ενεργών

φερριτίνης από την υδροξυτυροσόλη, αλλά όχι από την τυροσόλη (βλέπε εικόνα 41), υποδηλώνει την αποτελεσματική δράση της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας.

4.2.3 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης ενάντια στην απόπτωση

Εκτός από την πρόκληση οξειδωτικού στρες, έχει αναφερθεί ότι το H₂O₂ αποτελεί δεύτερο αγγελιοφόρο για τη μεταγωγή του σήματος, σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (redox signaling) (Marinho et al., 2014; Netto and Antunes, 2016). Πρόσφατα, η ερευνητική μας ομάδα παρουσίασε ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν την άποψη αυτή (Mantzaris et al., 2016; Barbouti et al., 2007). Το κύριο εμπόδιο στην εξήγηση του ρόλου του σιδήρου στη σηματοδότηση από το H2O2 είναι η δυσκολία της κατανόησης της βασικής χημείας που αποτελεί τη βάση αυτού του μηγανισμού. Έχει διαπιστωθεί ότι το H_2O_2 οξειδώνει ευαίσθητα κατάλοιπα κυστεΐνων για το σχηματισμό σουλφενικού οξέος, το οποίο αντιπροσωπεύει ένα βήμα οξείδωσης δύο ηλεκτρονίων (Roos and Messens, 2011), ενώ οι ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται μετά την αντίδραση του H2O2 με δισθενή ιόντα σιδήρου αποτελούν παράγοντες οξείδωσης ενός ηλεκτρονίου. Πρόσφατα προτείναμε ότι τα ενδιάμεσα προϊόντα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση Fenton (και όχι αυτή καθαυτή η ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου), θα μπορούσαν να αποτελούν τα κύρια οξειδωτικά μέσα στις οξειδώσεις των κυστεϊνικών καταλοίπων που προκαλούνται από το H2O2 και το σίδηρο (Mantzaris et al., 2016).

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι η δεσφεριοξαμίνη, μια ισχυρή σιδηροδεσμευτική ένωση, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την απόπτωση και συγκεκριμένα τη φωσφορυλίωση των MAPK, JNK και p38, που προκαλείται από το H₂O₂ (Mantzaris et al., 2016). Γι' αυτό, στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί και ο τρόπος δράσης της υδροξυτυροσόλης στην απόπτωση που προκαλείται από το H₂O₂.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το H₂O₂, στο εσωτερικό των κυττάρων, ανάγεται σε H₂O από αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως περοξειρεδοξίνες και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όμως, όταν οι συγκεντρώσεις H₂O₂ εντός των κυττάρων είναι υψηλές η απομάκρυνσή του διαρκεί περισσότερο, επιτρέποντάς του να αλληλεπιδρά και να οξειδώνει ευαίσθητους στόχους. Επίσης, η παρουσία του εντός των κυττάρων προκαλεί μια σημαντική αύξηση των διαθέσιμων καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (βλέπε εικόνα 40), η οποία σχετίζεται με ισχυρή και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και ρ38 MAPK και γρήγορη φωσφορυλίωση της ERK (βλέπε εικόνα 47 και 56). Εντούτοις, η υδροξυτυροσόλη, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας της, ανέστειλλε εξειδικευμένα την παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και p38 MAP κινάσης, χωρίς όμως να επηρεάσει τη γρήγορη φωσφορυλίωση της ERK και την πρώτη φάση φωσφορυλίωσης της p38 (βλέπε εικόνα 47Α και 56). Δεδομένου ότι το πραγματικό επίπεδο της φωσφορυλίωσης των ΜΑΡΚ καθορίζεται από τη συντονισμένη δράση των ανοδικά ΜΑΡ2Κ και ΜΑΡ3Κ ή των αντίστοιχων φωσφατασών, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι η απομάκρυνση του σιδήρου μέσω της δέσμευσής του στην ορθο-διϋδρόξυ ομάδα της υδροξυτυροσόλης, καθιστά τις θέσεις αυτές μη ευαίσθητες στην οξείδωση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αντιθέτως, στην περίπτωση που απουσιάζει η υδροξυτυροσόλη (ή παρουσία της τυροσόλης), τα αυξημένα επίπεδα των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου οξειδώνουν τις συγκεκριμένες θέσεις των πρωτεϊνών στις οποίες βρίσκονται, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε αντίθετα αποτελέσματα. Ωστόσο, για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του καταλυτικά ενεργού σιδήρου στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και της p38 MAP κινάσης, χρειάζεται να εντοπιστεί το ακριβές σημείο (ή τα σημεία) της δράσης του. Φαίνεται δηλαδή ότι το H₂O₂ προκαλεί τη φωσφορυλίωση των JNK και p38 μέσω ενεργοποίησης κινασών που δρουν ανοδικά στην αλληλουχία της φωσφορυλίωσης των MAP κινασών, πιθανότατα την ASK1. Η υδροξυτυροσόλη θα μπορούσε να αναστείλει αυτές τις κινάσες, αλλά αυτή η υπόθεση χρειάζεται στήριξη από πειραματικά δεδομένα. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραραίτητα έτσι ώστε να εξακριβωθεί το ακριβές σημείο δράσης της υδροξυτυροσόλης στην απόπτωση, όπως θα ήταν καλό να ελεγθεί η δράση κινασών που δρουν ανοδικά στην αλληλουχία της φωσφορυλίωσης των MAP κινασών και συγκεκριμένα η δράση της ASK1.

Η παρατεταμένη ενεργοποίηση της JNK και της p38 MAPK στη συνέχεια, μπορεί να μεταβάλλει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (βλέπε εικόνα 56). Μια άποψη είναι ότι η οικογένεια των MAP κινασών ενεργοποιεί τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα οι κινάσες JNK και p38, φωσφορυλιώνοντας ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr165) στην αμινοτελική περιοχή της Bax. Προκαλούν έτσι την ενεργοποίηση και την άμεση μετατόπιση της πρωτεΐνης αυτής από το κυτταρόπλασμα στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Kim et al., 2006) και με τον τρόπο αυτό ενισχύει στη διάνοιξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η αποσταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, την ενεργοποίηση των κασπασών, καταλήγοντας τελικά στην κυτταρική απόπτωση (βλέπε εικόνα 56).



Εικόνα 56: Προτεινόμενος μηχανισμός προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης ενάντια στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Σε φυσιολογικές συνθήκες το H_2O_2 διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο (1). Στο κυτταρόπλασμα, το H_2O_2 ανάγεται σε H_2O από αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και περοξυρεδοξίνες (Prx) (2). Το H_2O_2 εντός των κυττάρων προκαλεί αύξηση των διαθέσιμων καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (3). Ο διαθέσιμος καταλυτικά ενεργός σίδηρος οδηγεί στην παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και της p38 MAPK (4) και γρήγορη φωσφορυλίωση της ERK (5), ενεργοποιώντας τα παρακάτω βήματα της αποπτωτικής διαδικασίας (απελευθέρωση κυτοχρώματος c και σχάση της κασπάσης-3) (7). Στο εσωτερικό του κυττάρου η υδροξυτυροσόλη δεσμεύει τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο, μέσω της ορθο-διΰδρόξυ ομάδα της, αναστέλλοντας την παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και p38 αλλά όχι της ERK και αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση των κυττάρων (6).

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, προτείνεται ότι οποιαδήποτε ένωση που περιέχεται στην ανθρώπινη δίαιτα που

μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και, επιπλέον, είναι σε θέση να δεσμεύσει τον ενδοκυττάριο διαθέσιμο καταλυτικά ενεργό σίδηρο είναι πιθανό να αναστείλει την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 . Σε in νίνο συνθήκες όμως, λόγω των διαδικασιών βιο-κατανομής και μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης στη συγκεκριμένη μελέτη δεν μπορεί να συγκριθεί με πραγματικές φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Το πλήθος, όμως, των φαινολικών ενώσεων της διατροφής, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το σίδηρο, θα μπορούσαν να δρουν προσθετικά και να επηρεάζουν την ομοιόσταση του σιδήρου και με τον τρόπο αυτό να προστατεύουν τα κύτταρα σε συνθήκες αύξησης του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, καθώς το H_2O_2 αποτελεί δεύτερο αγγελιοφόρο για τη μεταγωγή του σήματος σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία για την κατανόηση του ρόλου του σιδήρου στη σηματοδότηση από το H_2O_2 , με αποτέλεσμα την πρόληψη ή τη θεραπεία σοβαρών ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες (Jones, 2006).

4.3 Μηχανισμός δράσης του διαθέσιμου καταλυτικά ενεργού σιδήρου σε συστημικό επίπεδο

Η ικανότητα του σιδήρου να καταλύει τη δημιουργία των δραστικών ελευθέρων ριζών, τον καθιστούν άκρως επικίνδυνο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για το λόγο αυτό, τα ενδοκυττάρια επίπεδα του σιδήρου θα πρέπει να ρυθμίζονται με την ίδια προσοχή και να διατηρούνται σταθερά, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστημικό επίπεδο. Δυσλειτουργίες στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του σιδήρου στον οργανισμό έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζονται με βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Kell, 2009).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι επιπτώσεις χορήγησης μεγάλων ποσοτήτων σιδήρου σε νεφροπαθείς τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και αξιολογήθηκαν οι άμεσες επιπτώσεις της χορήγησης του σιδήρου στον κορεσμό της τρανσφερρίνης (πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου στους ιστούς) και της ηπατιδίνης, της ορμόνης που ρυθμίζει την παροχή σιδήρου από τα κύτταρα προς τον ορό του αίματος.

4.3.1 Μεταβολές στον κορεσμό της τρανσφερρίνης και στα επίπεδα ηπατιδίνης στον ορό, αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου σε ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση.

Η πλειοψηφία των νεφροπαθών τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (HD) αναπτύσσουν αναιμία, διότι δεν παράγουν αρκετή ερυθροποιητίνη (EPO), μια ορμόνη που δρα στο μυελό των οστών με αποτέλεσμα τη δημιουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων. Έτσι επηρεάζεται αρνητικά η ποιότητα της ζωής τους και αυξάνεται ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά επεισόδια και θάνατο. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών στρατηγικών με στόχο τη διόρθωση της αναιμίας σε αυτούς τους ασθενείς είναι εξαιρετικά σημαντική (Horl, 2013). Η ανεπάρκεια του διαθέσιμου λειτουργικού σιδήρου σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση αποτελεί την κύρια αιτία για την μειωμένη απόκριση στην ερυθροποιητίνη (EPO). Η μη απόκριση των ασθενών αυτών στην ερυθροποιητίνη οφείλεται στην ανισορροπία που υπάρχει από τη μια πλευρά λόγω των απαιτήσεων σε σίδηρο των ερυθροποιητικών κυττάρων και τη διαθεσιμότητα του σιδήρου από την άλλη. Για το λόγο αυτό, ως θεραπευτική αγωγή συνίσταται μαζί με τη χορήγηση σκεαυσμάτων διέγερσης της ερυθροποίησης και η ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου που χρησιμοποιείται ευρέως προκειμένου να παρακαμφθεί η ανισορροπία αυτή. Ωστόσο, ερωτήματα δημιουργούνται σχετικά με την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια αυτής της διαδικασίας φόρτωσης, τα οποία παραμένουν αναπάντητα μέχρι σήμερα (Horl, 2013).

Η πρωτεΐνη τρανσφερρίνη του ορού αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό μεταφορέα σιδήρου στα κύτταρα του σώματος που χρειάζονται σίδηρο, κυρίως τους ερυθροβλάστες στον μυελό των οστών για τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Ο σίδηρος της τρανσφερρίνης προέρχεται από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (RES), που φαγοκυτταρώνουν τα γηρασμένα ερυθροκυττάρα απελευθερώνοντας το σίδηρο στην κυκλοφορία (Sebastiani and Pantopoulos, 2011). Η διαδικασία αυτή, καθώς και η απελευθέρωση του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου και από τα ηπατοκύτταρα, ελέγχεται από την πρωτεΐνη φερροπορτίνη, τη μόνη γνωστή πρωτεΐνη που επιτρέπει την έξοδο του σιδήρου από τα κύτταρα (Ganz, 2013). Η δράση της πρωτεΐνης αυτής, όμως, ρυθμίζεται αρνητικά από μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται στο ήπαρ, την ηπατιδίνη, η οποία

δεσμεύεται στην φερροπορτίνη και επάγει την εσωτερίκευση και αποικοδόμησή της, εμποδίζοντας έτσι την εξαγωγή του σιδήρου και τη χρησιμοποίηση του για ερυθροποίηση (Ganz, 2013). Η έκφραση της ηπατιδίνης ρυθμίζεται από έναν αριθμό διαφορετικών σημάτων, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων σιδήρου, τη φλεγμονή, το ρυθμό ερυθροποίησης και την υποξία (Camaschella, 2013). Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο τα επίπεδα σιδήρου στο αίμα ρυθμίζουν την έκφραση της ηπατιδίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις της δισιδηρικής μορφής τρανσφερρίνης (Tf-Fe₂) στον ορό μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση της ηπατιδίνης. Αυτό το γεγονός πιστεύεται ότι προκαλείται μέσω της δέσμευσης Tf-Fe₂ στον υποδοχέα τρανσφερρίνης 2 (TfR2) στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων (Daba et al., 2013).

Ένας ευαίσθητος δείκτης για την αξιολόγηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου για την ερυθροποίηση είναι ο κορεσμός της τρανσφερρίνης ορού (Tf-Sat). Οι παραδοσιακές εργαστηριακές τεχνικές για την εκτίμηση Tf-Sat με βάση τη μέτρηση των επιπέδων σιδήρου στον ορό, προϋποθέτουν ότι όλος ο σίδηρος του ορού είναι προσδεδεμένος στην τρανσφερρίνη. Ως εκ τούτου, μετά την ενδοφλέβια χορήγηση παρασκευασμάτων που περιέχουν σίδηρο, δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης διότι όσο αυτά τα παρασκευάσματα του σιδήρου είναι παρόντα στο πλάσμα, οδηγούν σε ακαθόριστη υπερεκτίμηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης. Για το λόγο αυτό, ο υπολογισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat) μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου δεν είναι δυνατόν να γίνει με τις κλασικές μεθοδολογίες λόγω της παρουσίας στον ορό σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI) (Seligman and Schleicher, 1999; Sunder-Plassmann and Horl, 1996).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ηλεκτροφόρησης ουρίας-πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE) η οποία επιτρέπει την ανάλυση των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης με ακρίβεια, παρουσία NTBI. Με την τεχνική αυτή διερευνήθηκαν οι άμεσες αλλαγές τόσο του κορεσμού της τρανσφερρίνης, (Tf-Sat) όσο και των επιπέδων της δισιδηρικής τρανσφερρίνης (Tf-Fe₂), αμέσως μετά τη χορήγηση του σιδήρου (βλέπε εικόνα 52). Στη συνέχεια ελέγχθηκε κατά πόσον η αύξηση των επιπέδων της TF-Fe₂ θα μπορούσαν να επηρεάσουν την έκφραση της ηπατιδίνης, μετά τη χορήγηση σιδήρου στους ασθενείς (βλέπε εικόνα 52). Η γνώση που αποκτάται από τη χρήση U-PAGE είναι εξαιρετικά πολύτιμη, επειδή επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των Tf-Fe₂, τη μόνη μορφή τρανσφερρίνης που δεσμεύεται αποτελεσματικά στον υποδοχέα-1 της τρανσφερρίνης (TfR1) για να προμηθεύσει τα κύτταρα με σίδηρο ή στον υποδοχέα-2 της τρανσφερρίνης (TfR2) με αποτέλεσμα την έκφραση της ηπατιδίνης. Τέτοιες πληροφορίες είναι σημαντικές για τον καθορισμό ασφαλών και αποτελεσματικών στρατηγικών για την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

Παρ' όλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός σχετικά με τη βιολογία του σιδήρου δεν έχει ακόμα πλήρως κατανοηθεί και παραμένει εν πολλοίς ατελής. Από ερευνητικές προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά μονοπάτια που ανταποκρίνονται στα αυξημένα επίπεδα του σιδήρου στα ηπατοκύτταρα ή στον ορό. Το πρώτο περιλαμβάνει την επαγωγή της BMP6, και το άλλο, την ανίχνευση των επιπέδων Tf-Fe2, ενδεχομένως μέσω TfR2 επί της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων (Lin et al., 2007; Ramos et al., 2011). Σε περιπτώσεις περίσσειας σιδήρου, η Tf-Fe2 αναγνωρίζεται και συνδέεται στους υποδοχείς TfR2 των ηπατοκυττάρων, δίνοντας σήμα στην ηπατιδίνη. Ο μηγανισμός αυτός για την έκφραση της ηπατιδίνης μέσω Tf-Fe2 φαίνεται να αντιπροσωπεύει μια προστατευτική απάντηση στον υπερκορεσμό της τρανσφερρίνης και την επακόλουθη εμφάνιση ΝΤΒΙ, η οποία είναι δυνητικά τοξική, διότι τα πλεονάζοντα ιόντα σιδήρου διαγέονται στον ορό του αίματος και δεσμεύονται σε άλλες θέσεις χαμηλότερης συγγένειας (π.χ. πρωτεϊνες, λιπίδια, υδατάνθρακες κ.α.). Ο σίδηρος αυτός είναι καταλυτικά ενεργός, δηλαδή μπορεί να αντιδράσει με υπεροξείδια και να προκαλέσει το σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες μπορούν να οξειδώσουν χωρίς διάκριση τα διάφορα συστατικά του αίματος, επιφέροντας βλαπτικές συνέπειες.

Η αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής συνοδεύτηκε από μια παράλληλη αύξηση των επιπέδων ηπατιδίνης στον ορό του αίματος που παρατηρήθηκε μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου (βλέπε εικόνες 52 και 53). Η γρήγορη αυτή αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης στον ορό μπορεί να μπλοκάρει την ανακύκλωση του σιδήρου, απαιτώντας ακόμη μεγαλύτερες ποσότητες για σίδηρο οδηγώντας σε ένα φαύλο κύκλο. Λόγω της δυσλειτουργίας των νεφρών αυτών των ασθενών, η απομάκρυνση της ηπατιδίνης στα ούρα είναι προβληματική, γεγονός που επιδεινώνει περαιτέρω την κατάσταση. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χορήγηση ίδιας ποσότητας σιδήρου σε μικρότερες δόσεις αλλά για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Πρόκειται για μια εύλογη εναλλακτική λύση που χρειάζεται να εξεταστεί σοβαρά από την ιατρική κοινότητα.

Προκαταρκτικά πειράματα έχουν δείξει ότι χαμηλότερες δόσεις ενδοφλέβιας χορήγησης σιδήρου οδηγούν σε ηπιότερες μεταβολές του κορεσμού της τρανσφερρίνης στον ορό και της συγκέντρωσης της ηπατιδίνης στον ορό του αίματος (βλέπε εικόνα 54), περαιτέρω πειράματα όμως είναι αναγκαία. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι η χορήγηση χαμηλών δόσεων σιδήρου ήταν επωφελής για τη σταθεροποίηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης (Hgb). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με ερυθροποιητίνη (EPO) στους αιμοκαθαιρόμενους (Singh, 2009). Επομένως, η χορήγηση της ίδιας ποσότητας σιδήρου σε μικρότερες δόσεις αλλά για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα θα μπορούσε να αποτρέψει τις επιπτώσεις αυτές. Γι' αυτό θα ήταν καλό να εξεταστούν στο μέλλον οι μεταβολές του κορεσμού της τρανσφερρίνης και τα επίπεδα της ηπατιδίνης στον ορό, σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χορηγώντας δηλαδή την ίδια ποσότητα σιδήρου, σε χαμηλότερες δόσεις (<100mg), αλλά και για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών δράσης των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου:

Ο ρόλος των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου σε σχέση με τη διατροφή και την υγεία

Ο σίδηρος, λόγω της ικανότητάς του να μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική του κατάσταση, φαίνεται ότι έχει επιλεγεί από τη φύση κατά τη διαδικασία της εξέλιξης για τη διεκπεραίωση μιας σειράς βασικών λειτουργιών που χαρακτηρίζουν τη ζωή. Όμως, η ικανότητα αυτή τον καθιστά επικίνδυνο παράγοντα καθώς του επιτρέπει να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών. Για το λόγο αυτό, οι οργανισμοί και ειδικότερα ο άνθρωπος διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστεμικό επίπεδο για τη δέσμευση του σιδήρου και την ασφαλή αποθήκευσή του. Ωστόσο, μια μικρή ποσότητα σιδήρου παραμένει «ελεύθερη» στο εσωτερικό των κυττάρων και είναι οξειδοαναγωγικά ενεργή (Labile Iron Pool (LIP) ή καταλυτικά Ενεργός Σίδηρος) καθώς έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Fenton με δυσάρεστες για το κύτταρο επιπτώσεις.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που υπάρχουν στη Μεσογειακή δίαιτα προστατεύουν τα κύτταρα από τις οξειδώσεις των δραστικών ελευθέρων ριζών. Αν και είναι γνωστό ότι η Μεσογειακή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας του ανθρώπου, οι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Στην παρούσα έρευνα, αξιολογήσαμε την ικανότητα αρκετών φαινολικών οξέων (trans-κιναμικό, ρ-κουμαρικό, καφεϊκό και φερουλικό οξύ), που υπάρχουν σε αφθονία στη Μεσογειακή δίαιτα, να προστατεύουν το πυρηνικό DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε H₂O₂. Παρατηρήθηκε ότι το καφεϊκό οξύ, που φέρει δυο υδροξύλια σε ορθο-θέση, προστάτευσε το πυρηνικό DNA. Η προστατευτική του ικανότητά οφείλεται στο γεγονός ότι έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της ορθο-διϋδρόξυ ομάδας που διαθέτει. Όμως, προστασία επιτυγχάνεται μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, διότι δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με ευκολία ώστε να εισέλθει και να δράσει εντός των κυττάρων, λόγω της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας, στο ουδέτερο pH του θρεπτικού υλικού. Για το λόγο αυτό, συνθέσαμε χημικά παράγωγα καφεϊκού (εστέρες), στα οποία το αρνητικό φορτίο είχε εξουδετερωθεί από το σχηματισμό των εστερικών δεσμών, τα οποία παρουσίαζαν αυξημένη λιποφιλικότητα. Η κυτταροπροστατευτική τους δράση ήταν πολύ αυξημένη σε σχέση με το καφεϊκό οξύ. Επομένως, η προστατευτική ικανότητα των ενώσεων αυτών βασίστηκε στην ικανότητα της κάθε ένωσης (1) να εισέρχεται στον ενδοκυτταρικό χώρο με ευκολία και (2) να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της ορθο-διϋδρόξυ-ομάδας της.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω ο ρόλος της ορθοδιϋδρόξυ ομάδας φυσικών φαινολικών ενώσεων στην προστασία του πυρηνικού DNA αλλά και στην απόπτωση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, εξετάστηκαν η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη, δύο κύριες φαινολικές αλκοόλες του ελαιολάδου, οι οποίες δεν είναι αρνητικά φορτισμένες και έχουν την ικανότητα να διαχέονται ευκολότερα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Παρατηρήθηκε μια ισχυρή συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής δράσης της υδροξυτυροσόλης από τις βλάβες του πυρηνικού DNA και της απόπτωσης από το H₂O₂. Από την άλλη πλευρά, η τυροσόλη, η οποία δεν διαθέτει ορθο-διϋδροξυ αναποτελεσματική. ομάδα, ήταν Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη (αλλά όχι η τυροσόλη), ήταν σε θέση να αναστείλει την ισχυρή και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της JNK και της ρ38 MAPK που προκαλεί το H₂O₂. Φαίνεται δηλαδή ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση βλαβών στο DNA των κυττάρων και στη διαδικασία της απόπτωσης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Μελέτες αναφέρουν ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες εμπλέκονται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε ο ρόλος ομοιόστασης του σιδήρου σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Η ανεπάρκεια διαθέσιμου λειτουργικού σιδήρου αποτελεί την κύρια αιτία για την μειωμένη απόκριση στην ερυθροποιητίνη (EPO) σε αυτούς τους ασθενείς. Κατά συνέπεια, η ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου αποτελεί βασικό συστατικό της θεραπευτικής αγωγής, αν και έχουν εκφραστεί κάποιες επιφυλάξεις όσον αφορά τις επιπτώσεις. Ο υπολογισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Tf-Sat) δεν είναι δυνατόν να γίνει με τις κλασικές μεθοδολογίες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου, λόγω της παρουσίας στον ορό σιδήρου μη προσδεδεμένου στην τρανσφερρίνη (NTBI). Για τον λόγο αυτό στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ηλεκτροφόρησης ουρίας πολυακρυλαμιδίου (U-PAGE) η οποία επιτρέπει την ανάλυση των διαφόρων μορφών τρανσφερρίνης παρουσία NTBI. Με την τεχνική αυτή διερευνήθηκαν οι άμεσες αλλαγές τόσο του κορεσμού της τρανσφερρίνης, όσο και των επιπέδων της δισιδηρικής τρανσφερρίνης (Tf-Fe₂), αμέσως μετά τη χορήγηση του σιδήρου. Επίσης, ελέγχθηκε κατά πόσον η αύξηση των επιπέδων της TF-Fe₂ θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση της ηπατιδίνης, της κύριας ορμόνης που ρυθμίζει την ομοιοστασία του σιδήρου, μετά τη χορήγηση σιδήρου στους ασθενείς αυτούς. Παρατηρήθηκε αύξηση του κορεσμού της τρανσφερρίνης και της δισιδηρικής της μορφής η οποία συνοδεύτηκε από μια παράλληλη αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης στον ορό λίγο μετά την ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Η γρήγορη αυτή απόκριση σήματος από την ηπατιδίνη παρεμποδίζει την έξοδο του σιδήρου από τα κύτταρα στην κυκλοφορία, επηρεάζοντας αρνητικά τη διαδικασία της ερυθροποίησης.

Συνοψίζοντας από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό προστασίας των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, αλλά και στη διαδικασία μεταγωγής του σήματος εντός των κυττάρων. Είναι φανερό ότι οι φυσικές φαινολικές ενώσεις, που υπάρχουν σε αφθονία στη Μεσογειακή δίαιτα, δεσμεύοντας το διαθέσιμο ενδοκυττάριο καταλυτικά ενεργό σίδηρο προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από τις ανεξέλεγκτες οξειδώσεις και από την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, συνεισφέροντας σημαντικά στη διατήρηση της υγείας των ανθρώπων.

6. SUMMARY

Investigation of the molecular mechanisms of action of reactive oxygen species: The role of labile iron in nutrition and human health

The ability of iron to easily change its oxidation state makes it an essential element in many fundamental cellular processes. Simultaneously, the ability that enables iron to readily switch between the ferrous and ferric states makes it extremely toxic. Thus, it is not surprising that nature handles iron with the highest care and iron homeostasis is carefully regulated at systemic and cellular level by sophisticated mechanisms in order to avoid such injurious interactions. Although iron is usually bound with high affinity to specialized proteins, which abrogate the deleterious effects of free iron during oxidative stress, a distinct minor fraction of total cellular iron is thought to be loosely bound to diverse intracellular ligands and serves as a crossroad of cell iron metabolism. This fraction of iron is called labile iron pool (LIP) or redoxactive iron and in the presence of H_2O_2 , it catalyzes the generation of the extremely reactive hydroxyl radical (HO⁻) via the Fenton Reaction.

Although it is known that Mediterranean diet plays an important role in maintaining human health, the underlying molecular mechanisms remain largely unknown. In the present investigation, we evaluated the capacity of several phenolic acids (trans-cinnamic, p-coumaric, caffeic and ferulic acids), which are present in the Mediterranean diet, to protect cells from oxidative stress-induced DNA damage. It was observed that caffeic acid, which has two hydroxyl groups in ortho-position, protected cells from H₂O₂-induced DNA damage. The protective capacity correlated with the ability of the caffeic acid to chelate "labile iron" by its ortho-dihydroxy group. Compounds, like caffeic acid, which are able to chelate iron but unable to diffuse through the plasma membrane due to the negative charge of their carboxylic moiety at neutral pH, required higher concentrations to be protective. Therefore, we decided to neutralize this charge by esterification. We synthesized chemically caffeic derivatives (esters). This change could increase the lipophilicity of the derivatives and consequently facilitated the diffusion of these derivatives through cell membrane. Their cytoprotective activity was greatly increased compared with caffeic acid. The

effective protection was based on the ability of each compound to (i) reach the intracellular space and (ii) chelate intracellular "labile" iron.

Then, in order to further clarify the role of the ortho-dihydroxy group of natural phenolic compounds in protecting the nuclear DNA but also in apoptosis induced by oxidative stress, we examined hydroxytyrosol and tyrosol, two major phenolic olive oil alcohols, which are uncharged and have the ability to diffuse easily through the cell membrane. Indeed, it was observed that the degree of protection offered by hydroxytyrosol against H_2O_2 -induced DNA damage correlated strongly with its ability to decrease the level of intracellular labile iron pool and to inhibit apoptosis. On the other hand, tyrosol, which lacks the ortho-dihydroxy group, was ineffective. Moreover, hydroxytyrosol (but not tyrosol), was able to diminish the late sustained phase of H_2O_2 -induced JNK and p38 phosphorylation. These results show that redox active iron plays an important role in oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis. The derangement of intracellular iron homeostasis, following exposure of cells to H_2O_2 , played pivotal role both in the induction of DNA damage and the initiation of apoptotic signaling.

We investigated also the role of iron homeostasis at the end-stage renal patients undergoing maintenance hemodialysis (HD). The inadequacy of available functional iron in these patients is the main cause of decreased response to erythropoietin (EPO). Therefore, intravenous iron administration is an essential component of treatment, although some reservations about the impact of this treatment have been raised. The estimation of transferrin saturation (Tf-Sat) is not possible with traditional methodologies after intravenous administration of iron preparations, due to the presence of non-transferrin bound iron (NTBI) in the serum. Therefore, in the present work we used a urea polyacrylamide electrophoresis technique (U-PAGE) which allows the analysis of various forms of transferrin in the presence of NTBI. With this technique, we observed direct elevation of both Tf-Sat and differic transferrin (Tf-Fe₂), immediately after administration of iron. Also, we tested whether the elevation of $TF-Fe_2$ levels could influence the expression of hepcidin, the principal hormone that regulates iron homeostasis, after administration of iron in these patients. The observation that serum hepcidin levels increased in parallel with Tf-Fe2 and transferring saturation shortly after iron administration

indicates a fast signaling response, which is expected to have a negative influence on iron efflux from cells to circulation.

In conclusion intracellular labile iron play pivotal role in cell protection mechanism under oxidative stress, and in the signal transduction process within cells. Thus, it was rational to imagine that numerous natural phenolic compounds, which are present abundantly in the Mediterranean diet, are able to modulate intracellular labile iron homeostasis and in this way to influence redox-mediated signal transduction, contributing to the maintenance of human health by preventing oxidative stressrelated diseases, like end-stage renal patients.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abboud, S. and Haile, D.J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **275**, 19906-19912.

Adam, A., Crepsy, V., Levrat-Verny, M.A., *et al.* (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr*, **132**, 1962-1968.

Adrain, C. and Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, **26**, 390-397.

Aisen, P., Enns, C. and Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 940-959.

Akyol, S., Ozturk, G., Ginis, Z., *et al.* (2013). In vivo and in vitro antineoplastic actions of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Therapeutic perspectives. *Nutr Cancer*, **65**, 515-26.

Akyol, S., Ugurcu, V., Altuntas, A., *et al.* (2014). Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against nephrotoxicity and/or oxidative kidney damage: A detailed systematic review. *Scientific World Journal*, **2014**, 561-971.

Alfrey, A.C. (1994). Role of iron and oxygen radicals in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, **23**, 183-187.

Alnemri, E.S. (1997). Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, **64**, 33-42.

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

Amodio, R., De Ruvo, C., Sacchetti, A., *et al.* (2003). Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *Int J Dev Neurosci*, **21**, 79-389.

Anderson, G.J. and Frazer, D.M. (2005). Recent advances in intestinal iron transport. *Curr Gastroenterol Rep*, **7**, 365–372.

Andjelkovic, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., *et al.* (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem*, **98**, 23-31.

Andrews, N. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, **112**, 219–230. Annuk, M., Zilmer, M., Lind, L., et al. (2001). Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 2747-2752.

Anraku, M., Kitamura, K., Shinohara, A., *et al.* (2004). Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **66**, 841-848.

Antunes, F. and Cadenas, E. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H(2)O(2): submicromolar levels of H(2)O(2) induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med*, **30**, 1008-1018.

Aoki, H., Kang, P.M., Hampe, J., *et al.* (2002). Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **277**, 10244-10250.

Aravanis, C., Corcondilas, A., Dontas, A.S., *et al.* (1970). Coronary heart disease in seven countries. IX. The Greek islands of Crete and Corfu. *Circulation*, **41**, 188-100.

Arici, M. and Walls, J. (2001) End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int*, **59**, 407-414

Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., *et al.* (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak mediated permeabilization. *EMBO J*, **22**, 4385–4399.

Arosio, P. and Levi, S. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 783-92.

Baigent, C., Burbury, K. and Wheeler, D. (2000). Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*, **356**,147-152.

Baker, H.M. and Lindley, P.F. (1992). New perspectives on the structure and function of transferrins. *J Inorg Biochem*, **47**, 147-160.

Balasubashini, M.S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., and Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, **18**, 310–314.

Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., *et al.* (2007). Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1377-1387.

Barbouti, A., Doulias, P.T., Nousis, L., *et al.* (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H_2O_2 . *Free Radic Biol Med*, **33**, 691-702.

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

Battino, M. and Ferreiro, M.S. (2004). Ageing and the Mediterranean diet: a review of the role of dietary fats. *Pub Heal Nutr*, **7**, 953–958.

Bernini, R., Crisante, F., Barontini, M., *et al.* (2012). Synthesis and structure/antioxidant activity relationship of novel catecholic antioxidant structural analogues to hydroxytyrosol and its lipophilic esters. *J Agric Food Chem*, **60**, 7408-16.

Besarab, A., Hörlm W.H. and Silverberg, D. (2009). Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome. *Oncologist*, **14**, Suppl 1, 22-33.

Biesalski, H.K. (2004). Diabetes preventive components in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr*, **43**, 26–30.

Bogoyevitch, M.A. and Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 1061-1095.

Borutaite, V. and Brown, G.C. (2001). Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, **500**,114-118.

Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H. and Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*, **49**, 179–184.

Breuer, W., Shvartsman, M. and Cabantchik, ZI. (2008). Intracellular labile iron. Int. J. Biochem Cell Biol. 40, 350-354.

Bruyninckx, W., Mason, H.S. and Morse, S.A. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*, **274**, 606-607.

Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., *et al.* (2011). Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chem*, **127**, 1609–1614.

Burattini, S., Salucci, S., Baldassarri, V., *et al.* (2013). Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. *Food Chem Toxicol*, **55**, 248-56.

Cabantchik, Z.I. (2014). Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol*, **5**, 45.

Cabrini, L., Barzanti, V., Cipollone, M., *et al.* (2001) Antioxidants and total peroxyl radical-trapping ability of olive and seed oils. *J Agric Food Chem*, **49**, 6026-6032.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Biochem, 58, 79-110.

Camaschella, C. (2013). Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2013**, 1-8.

Cano, A., Arnao, M.B., Williamson, G. and Garcia-Conesa, M.T. (2002). *Redox Rep*, 7, 739-783.

Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*, **20**, 117-122.

Canonne-Hergaux, F., Zhang, A.S., Ponka, P., *et al.* (2001). Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mK/mk mice. *Blood*, **98**, 3823-3830.

Carluccio, M.A., Ancora, M.A., Massaro, M., *et al.* (2007). Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kB and NAD(P)H oxidasa activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **293**, 2344–2354.

Carluccio, M.A., Siculella, L., Ancora, M.A., *et al.* (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiaatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 622-629.

Caruso, D., Visioli, F., Patelli, R., *et al.* (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*, **50**, 1426-1428.

Cazzola, M., Huebers, H.A., Sayers, M.H., *et al.* (1985). Transferrin saturation, plasma iron turnover, and transferrin uptake in normal humans. Blood, **66**, 935–939.

Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **29**, 323-333.

Chang, L. and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.

Chang, W.C., Hsieh, C.H., Hsiao, M.W., *et al.* (2010). Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through mitochondrial pathway. Taiwan J Obstet Gynecol, **49**, 419–424.

Charytan, C., Levin, N., Al-Saloum, M., et al. (2001). Efficacy and safety of iron sucrose for iron deficiency in patients with dialysis-associated anemia: North American clinical trial. *Am J Kidney Dis*, **37**, 300-307.

Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., *et al.* (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem*, **278**, 17593-17596.

Chen, Y.J., Shiao, M.S., Hsu, M.L., *et al.* (2001). Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J Agric Food Chem*, **49**, 5615–5619.

Chen, Y.J., Shiao, M.S. and Wang, S.Y. (2001). The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs*, **12**, 143-9.

Chen, Y.R. and Tan, T.H. (2000). The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol*, **16**, 651-662.

Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., *et al.* (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 31929-31936.

Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., et al. (2004). Structure of human transferrin receptor transferrin complex. Cell, **116**, 565-576.

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.

Chevion, M., Leibowitz, S., Aye, N.N., *et al.* (2008). Heart protection by ischemic preconditioning: a novel pathway initiated by iron and mediated by ferritin. *J Mol Cell Cardiol*, **45**, 839-845.

Chiang, Y.M., Lo, C. P., Chen, Y. P., *et al.* (2005). Ethyl caffeate suppresses NF-kB activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. *Br J Pharmacol*, **146**, 352–363.

Chung, M.C.M. (1984). Structure and function of transferring. *Biochem Educ*, **12**, 146–154.

Clark, R.J., Tan, C.C., Preza, G.C., *et al.* (2011). Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol*, **18**, 336-343.

Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **79**, 362–372.

Clifford, M.N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric*, **80**, 1033–1043.

Cory, S. and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nature Rev*, **2**, 647-656.

Covas, M.I., Miro-casas, E., Fito, M., *et al.* (2003). Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs Exp Clin Res*, **29**, 203-206.

Covas, M.I., Konstantinidou, V. and Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. J Cardiovasc Pharmacol, **54**, 477-482.

D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., *et al.* (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med*, **38**, 908–919.

D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., *et al.* (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos*, **29**, 1492-1498.

D'Archivio, M., Filesi, C., Benedetto, R.D., et al. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist super sAnItà, 43, 348-361.

Daba, A., Gkouvatsos, K., Sebastiani, G. and Pantopoulos K. (2013). Differences in activation of mouse hepcidin by dietary iron and parenterally administered iron dextran: compartmentalization is critical for iron sensing. *J Mol Med (Berl)*, **91**, 95-102.

Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H.F. (1983). PH and the recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci*, **80**, 2258-2262.

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

Day, A.J. and Williamson, G. (2001). Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr*, **86**, *Suppl 1*, S105-110.

De Domenico, I., Nemeth, E., Nelson, J.M., *et al.* (2008). The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab*, **8**, 146-156.

De Domenico, I., Ward, D.M., di Patti, M.C., *et al.* (2007). Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J*, **26**, 2823-2831.

De La Cruz, J.P., Ruiz-Moreno, M.I., Guerrero, A., *et al.* (2015). Role of the catecholic group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J Nutr Biochem*, **26**, 549-55.

De la Torre, R., Covas, M.I., Pujadas, M.A., *et al.* (2006). Is dopamine behind the health benefits of red wine? *Eur J Nutr*, **45**, 307-310.

De Weerdt, S. (2011). Food: The omnivore's labyrinth. Nature, 471, S22-24.

Deng, X., Xiao, L., Lang, W., et al. (2001). Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. J Biol Chem, 276, 23681-23688.

Détivaud, L., Island, M.L., Jouanolle, A.M., *et al.* (2013). Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mutat*, **34**, 1529-1536.

Dhanasekaran, D.N. and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. Oncogene, 27, 6245-6251.

Dilis, V. and Trichopoulou, A. (2010). Antioxidant intakes and food sources in Greek adults. *J Nutr*, **140**, 1274-1279.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., *et al.* (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776-781.

Donovan, N., Becker, E.B., Konishi, Y. and Bonni, A. (2002). JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*, **277**, 40944-40949.

Doulias, P.T., Christoforidis, S., Brunk, U.T. and 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.

Drueke, T., Witko-Sarsat, V., Massy, Z., *et al.* (2002). Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation*, **106**, 2212-2217.

Eaton, J.W. and Quian, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med.*, **32**, 833-40.

Eleuteri, E., Magno, F., Gnemmi, I., *et al.* (2009). Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci*, **14**, 2230-2237.

Elsayed, M.E., Sharif, M.U., and Stack, A.G. (2016). Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. *Adv Clin Chem*, **75**, 71-97.

Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., *et al.* (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem*, **248**, 31–40.

Erboga, M., Kanter, M., Aktas, C., *et al.* (2016). Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, **171**, 176-84.

Erdemli, H.K., Akyol, S., Armutcu, F. and Akyol, O. (2015). Antiviral properties of caffeic acid phenethyl ester and its potential application. *J Intercult Ethnopharmacol*, **4**, 344-7.

Erdemli, H.K., Akyol, S., Armutcu, F., *et al.* (2016). Melatonin and caffeic acid phenethyl ester in the regulation of mitochondrial function and apoptosis: The basis for future medical approaches. *Life Sci*, **148**, 305-12.

Evans, R.W., Kong, X. and Hider, R.C. (2012). Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 282-290.

Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., *et al.* (2006). Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differenciation. *J Nutr*, **136**, 614–619.

Fabiani, R., Fuccelli, R., Pieravanti, F., *et al.* (2009). Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol Nutr Food Res*, **53**, 887–896.

Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., *et al.* (2011). The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenol compounds induce apoptosis on HL60 cells. *Food Chem*, **125**, 1249–1255.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S. and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, **37**, 719-727.

Ferria, C. and Grassib, G. (2003). Mediterranean diet, cocoa and cardiovascular disease: a sweeter life, a longer life, or both? *J Hypertens*, **21**, 2231–2234.

Ferris, C.D., Jaffrey, S.R., Sawa, A., *et al.* (1999). Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol*, **1**, 152-157.

Fesen, M.R., Pommier, Y., Leteurtre, F., *et al.* (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol*, **48**, 595.

Fillebeen, C., Caltagirone, A., Martelli, A., *et al.* (2005). IRP1 Ser-711 is a phosphorylation site, critical for regulation of RNA-binding and aconitase activities. *Biochem J*, **388**, 143-150.

Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.

Fitzpatrick, L., Wang, J. and Le, T. (2001). Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **299**, 915.

Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., *et al.* (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties–a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg Med Chem*, **12**, 3581–3589.

Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., *et al.* (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 1148-1153.

Foley, R.N., Parfrey, P.S. and Sarnak, M.J. (1988). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*, **32**, S112-S119.

Forman, H.J., Davies, K.J. and Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*, **66**, 24-35.

Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., *et al.* (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 NY Acad Sci*, **893**, 13-18.

Gackowski, D., Kruszewsk, M., Banaszkiewicz, Z. *et al.* (2002). Lymphocyte labile iron pool, plasma iron, transferrin saturation and ferritin levels in colon cancer patients. *Acta Biochim Pol.* **49**, 269-72.

Galaris, D. and Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **45**, 1-23.

Galaris, D., Barbouti, A. and Korantzopoulos, P. (2006). Oxidative stress in hepatic ischemiareperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des*, **12**, 2875-2890.

Galaris, D., Mantzaris, M.D. and Amorgianiotis, C. (2008). Oxidative stress and ageing: the potential role of iron. *Hormones*, **7**, 114-122. Review.

Ganz, T. (2003). Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, **102**, 783-788.

Ganz, T. (2005). Hepcidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol*, **18**, 171-82.

Ganz, T. (2006). Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Center*, **46**, 554–557.

Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. Physiol Rev, 93, 1721-1741.

Ganz, T. and Nemeth, E. (2006). Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**, G199-203.

Ganz, T. and Nemeth, E. (2011). The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2011**, 538-542.

Ganz, T. and Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1434–1443.

Genaro-Mattos, T.C., Maurício, Â.Q., Rettori, D., *et al.* (2015). Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *PLoS ONE*, **10**, 1-12.

Gerber, M. (1994). Olive oil and cancer. In M. J. Hill, A. Giacosa and C. P. J. Caygill eds. Epidemiology Of Diet And Cancer. Chichester, Ellis Horwood. pp. 267-275.

Givan, A.L. (2000). In Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting. In R. Diamond and S. DeMaggio, eds. Springer, Berlin, pp 142-164.

Glickstein, H., El, R.B., Shvartsman, M. and Cabantchik, Z.I. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood*, **106**, 3242-3250.
González-Correa, J.A., Navas, M.D., Muñoz-Marín, J., *et al.* (2008). Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem*, **56**, 7872–7876.

Gotoh, Y. and Cooper, J.A. (1998). Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem*, **273**, 17477-17482.

Goya, L., Mateos, R. and Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tertbutylhydroperoxide. *Eur J Nutr*, **46**, 70-78.

Granados-Principal, S., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, C.L., *et al.* (2010). Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev*, **68**, 191-206.

Greenberg, G.R. and Wintrobe, M.M. (1946). A labile iron pool. J Biol Chem, 165, 397.

Gregory, A. and Hayflick, S.J. (2005). Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Folia Neuropathol*, **43**, 286-296.

Griendling, K.K. and Harrison, D.G. (1999). Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res*, **85**, 562-563.

Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., *et al.* (2014). Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res*, **58**, 1721-1738.

Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., *et al.* (2006). Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/treonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **9**, 1812-1827.

Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (1982). The role of the superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline complex. *Biochem Pharmacol*, **31**, 2801-2805.

Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* **899**, 136-47.

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

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

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, **186**, 1-85.

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

Harris, W.R. (2012). Anion binding properties of the transferrins. Implications for function, *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 348–361.

Hashimoto, T., Ibi, M., Matsuno, K., *et al.* (2004). An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med*, **36**, 555-564.

Hass, U. (2003). Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett*, *140-141*, 155-159.

Haugen, E. and Nath, K.A. (1999). The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif*, **17**, 58-65.

Hayflick, S.J. (2006). Neurodegeneration with brain iron accumulation: from genes to pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol*, **13**, 182-185.

Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., *et al.* (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺⁻ mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem*, **274**, 962-971.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. and Andrews, N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, **117**, 285-97.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B. and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. Cell, **142**, 24–38.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., *et al.* (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zupthen Elderly Study. Lancet, **342**, 1007-1011.

Hishikawa, K., Nakaki, T. and Fujita T. (2005). Oral Flavonoid Supplementation Attenuates Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 442-446.

Hoigne, R., Breymann, C., Kunzi, U.P. and Brunner, F. (1998) Parenteral iron therapy: Problems and possible solutions. *Schweiz Med Wochenschr*, **128**, 528-535.

Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 318-327.

Horl WH. (2013). Anaemia management and mortality risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, **9**, 291-301.

Hsu, C.Y., McCulloch, C.E. and Curhan, G.C. (2002). Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: Results from the third national health and nutrition examination survey. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 504-510.

Hur, W. and Gray, N.S. (2011). Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr Opin Chem Biol*, **15**, 162-173.

Hwang, J.W., Kim, E.K., Lee, S.J., et al. (2012). Antioxidant activity and protective effect of anthocyanin oligomers on H_2O_2 -triggered G2/M arrest in retinal cells. *J Agric Food Chem*, **60**, 4282–4288.

Ikeda, H., Kimura, Y., Masaki M. and Iwahashi, H. (2011). Caffeic acid inhibits the formation of 1hydroxyethyl radical in the reaction mixture of rat liver microsomes with ethanol partly through its metal chelating activity. *J Clin Biochem Nutr*, **48**, 187–193.

Incani, A., Deiana, M., Corona, G., *et al.* (2010). Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H2O2induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol. *Mol Nutr Food Res*, **54**, 788–796.

Iordanov, M.S. and Magun, B.E. (1999). Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors. *J Biol Chem*, **274**, 25801-25806.

Jacobs, A. (1977). Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood*, **50**, 433-439.

Jiang, X. and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, 275, 31199-31203.

Jofre, R., Rodriguez-Benitez, P., Lopez-Gomez, J.M., *et al.* (2006). Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, **17**, S274-S280.

Johnson, G.L. and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1341-1348.

Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal, 8, 1865-1879.

Jornot, L., Petersen, H. and Junod, A.F. (1998). Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J*, **335** (Pt 1), 85-94.

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

Kakhlon, O. and Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes (1). *Free Radic Biol Med*, **33**, 1037-1046.

Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, *et al.* (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*, **6**, R63-74.

Kawabata H, Yang R, Hirama T., et al. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor like family. *J Biol Chem.* 274: 20826-20832.

Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., *et al.* (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor like family. *J Biol Chem.* **274**, 20826-20832.

Kawabata, K., Yamamoto, T., Hara, A., et al. (2000). Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Cancer Letters, 157, 15–21.

Kell, D.B. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*, **2**, 2.

Kern, S. M., Bernnett, R.N., Needs, P.W., *et al.* (2003). Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, **51**, 7884-7891.

Kerr, J.F., Wyllie, X. and Currie, A. (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.

Khanduja, K.L., Avti, P.K., Kumar, S., *et al.* (2006). Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1760**, 283-289.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., *et al.* (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **275**, 322-327.

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

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., *et al.* (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem*, **50**, 2161–2168.

Kim, B.J., Ryu, S.W. and Song, B.J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*, **281**, 21256-21265.

Kim, H., Kim, W., Yum, S et al. (2013). Caffeic acid phenethyl ester activation of Nrf2 pathway is enhanced under oxidative state: structural analysis and potential as a pathologically targeted therapeutic agent in treatment of colonic inflammation. *Free Radic Biol Med*, **65**, 552-62.

Kim, J.K. and Jang, H.D. (2014). Nrf2-Mediated HO-1 Induction Coupled with the ERK Signaling Pathway Contributes to Indirect Antioxidant Capacity of Caffeic Acid Phenethyl Ester in HepG2 Cells. *Int J Mol Sci*, **15**, 12149-12165.

Klausner, R.D., Harford, J. and van Renswoude, J. (1983). Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci*, **81**, 3005-3009.

Knoops, K.T., De Groot, L.C., Kromhout, D., *et al.* (2004). Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*, **292**, 1433-1439.

Knutson, M. and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **38**, 61-88.

Kok, F.J. and Kromhout, D. (2004). Atherosclerosis. Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr*, **43**, 2–5.

Koliaraki, V., Marinou, M., Vassilakopoulos, T.P., *et al.* (2009). A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One*, **4**, e4581.

Konishi, Y. and Kobayashi, S. (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*, **52**, 2518-2526.

Konishi, Y. and Kobayashi, S. (2005). Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 583-591.

Konishi, Y. and Shimizu, M. (2003). Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 856-862.

Korantzopoulos, P., Galaris, D., Papaioannides, D. and Siogas, K. (2003). The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med Sci Monit*, **9**, RA140-145.

Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., *et al.* (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*, **480**, 147-150.

Kruszewski, M. (2004). The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biobhim Pol*, **52**, 471-480.

Kudugunti, S.K., Vad, N.M., Whiteside, A.J., *et al.* (2010). Biochemical mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. *Chem Biol Interact*, **188**, 1–14.

Kurz, T., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. (2010). Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, **13**, 511-523.

Lafay, S., Morand, C., Manach, C., *et al.* (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. Brit J Nutr, **96**, 39-46.

Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., et al. (2005). Vital functions for lethal caspases. Oncogene, 24, 5137-5148.

Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., *et al.* (2004). Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin. *In Chem Akta*, **357**, 2027-2037.

Lee, E.S., Park, S.H., Kim, M.S., *et al.* (2012). Caffeic acid disturbs monocyte adhesion onto cultured endothelial cells stimulated by adipokine resistin. *J Agric Food Chem*, **60**, 2730–2739.

Lee, Y.J., Kuo, H.C., Chu, C.Y., *et al.* (2003). Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol*, **66**, 2281-9.

Lei, K. and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 2432-2437.

Liang, H. and Fesik, S.W. (1997). Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol*, 274, 291-302.

Liao, H.F., Chen, Y.Y., Liu, J.J., *et al.* (2003). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invention, and metastasis. *J Agric Food Chem*, **51**, 7907–7912.

Lim, P.S., Wei, Y.H., Yu, Y.L. and Kho, B. (1999). Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. Nephrol Dial Transplant, **14**, 2680-2687.

Lin, L., Valore, E.V., Nemeth, E., *et al.* (2007). Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*, **110**, 2182-2189.

Linos, E., Holmes, M.D. and Willett, W.C. (2007). Diet and breast cancer. *Curr Oncol Rep*, **9**, 31-41.

Longobardi-Givan, A., (2001). Flow Cytometry: First Principles, second ed. John Wiley & Sons, New York.

López de las Hazas, M.C., Rubió, L., Kotronoulas, A., *et al.* (2015). Dose effect on the uptake and accumulation of hydroxytyrosol and its metabolites in target tissues in rats. *Mol Nutr Food Res*, **59**, 1395-1399.

Lorgeril, M. and Salen, P. (2000). Diet as preventive medicine in cardiology. *Curr Opin Cardiol*, **15**, 364–370.

Makey, D.G. and Seal, U.S. (1976). The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim Biophys Acta*, **453**, 250-6.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79**, 727–47.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, L. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Manna, C., Galleti, P., Maisto, G., et al. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. FEBS Lett, **470**, 341-344.

Manna, C., Migliardi, V., Sannino, F., *et al.* (2005). Protective effects of synthetic hydroxytyrosol acetyl derivatives against oxidative stress in human cells. *J Agric Food Chem*, **53**, 9602-9607.

Mantzaris, M.D., Bellou, S., Skiada, V., *et al.* (2016). Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. *Free Radic Biol Med*, **97**, 454-465.

Marinho, H.S., Real, C., Cyrne, L., *et al.* (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*, **2**, 535-562.

Martín, M.A., Ramos, S., Granado-Serrano, A.B., *et al.* (2010). Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*, **54**, 956-966.

Martin, S.J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon, A.J., *et al.* (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**, 1545-1549.

Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, **192**, 1-15.

Martinez-Gonzalez, M.A. and Estruch, R. (2004). Mediterranean diet, antioxidants and cancer: the need for randomized trials. *Eur J Cancer Prev*, **13**, 327–335.

Mateos, R., Goya, L. and Bravo, L. (2006). Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J Agric Food Chem*, **54**, 8724-8732.

Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2001). Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem*, **130**, 1-8.

Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2005). Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*, 7, 472-481.

Mauri, M.C., De Stefano, D., Di Meglio, P., *et al.* (2005). Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents machrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **371**, 475-465.

Maurya, D.K. and Devasagayam, T.P. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol*, **248**, 3369-3373.

McCord, J. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**, 529-531.

McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., *et al.* (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Moll Cell*, **5**, 299-309.

Melidou, M., Riganakos, K. and 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**, 1591-1600.

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

Mimic-Oka, J., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., *et al.* (2005). Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. *Ren Fail*, **27**, 345-351.

Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., *et al.* (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: Amechanism for their antioxidant activity. *Free Rad Res*, **36**, 1199-1208.

Miró-Casas, E., Farré Albaladejo, M., Covas, M.I., *et al.* (2001). Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem*, **294**, 63-72.

Miro-Casas, E., Covas, M.I., Farre, M., et al. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. Clin Chem, 49, 945-952.

Morena, M., Delbosc, S., Dupuy, A.M., *et al.* (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial Int*, **9**, 37-46.

Morgan, H.E., Holt, R.C., Jones, C.A. and Judd, B.A. (2007). Intravenous iron treatment in paediatric chronic kidney disease patients not on erythropoietin. *Pediatr Nephrol*, **22**, 1963-1965.

Moridani, M.J., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., *et al.* (2001). Caffeic acid, chlorogenic acid and dihydrocaffeic acid metabolism:glutathione conjugate formation. *Drug Metab Dispos*, **29**, 1432–1439.

Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4, 11.

Muckenthaler, M.U., Galy, B. and Hentze, M.W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*, **28**, 197-213.

Muñoz-Bravo, C., Gutiérrez-Bedmar, M., Gómez-Aracena, J., et al. (2013). Iron: protector or risk factor for cardiovascular disease? Still controversial. *Nutrients*, **5**, 2384-2404.

Murgia, I., Arosio, P., Tarantino, D. and Soave, C. (2012). Biofortification for combating 'hidden hunger' for iron. *Trends Plant Sci*, **17**, 47-55.

Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol*, **40**, 1-6.

Nai, A., Lidonnici, M.R., Rausa, M., *et al.* (2015). The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood*, **125**, 1170-9.

Nakayama, T., Yamada, M., Osavwa, T. and Kawakishi, S. (1996). Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H_2O_2 -induced cytotoxicity and DNA single strand breaks in Chinese hamster V79 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 316–318.

Natarajan, K., Singh, S., Burke, Jr J.R., *et al.* (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 9090–9095.

Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., *et al.* (2003). Structures of (-)-epicatechin glucuronide indentified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med*, **34**, 840-849.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., *et al.* (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. **306**, 2090-2093.

Netto, L.E. and Antunes, F. (2016). The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells*, **39**, 65-71.

Nguyen, T., Yang, C.S. and Pickett, C.B. (2004). The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med*, **37**, 433-441.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., *et al.* (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, **98**, 8780-8785.

Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., *et al.* (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, **99**, 4596-4601.

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

Nousis, L., Doulias, P.T., Aligiannis, N., *et al.* (2005). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res*, **39**, 787-795.

Nunez, M.T. (2010). Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption-uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis, *Biofactors*, **36**, 88–97.

Ohgami, R.S., Campagna, D.R, Greer, E.L., *et al.* (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, **37**, 1264-1269.

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A. and Fleming, M.D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, **108**, 1388-1394.

Ohta, T., Nakano, T., Egashira, Y. and Sanada, H. (1997). Antioxidant activity of ferulic acid beta-glucuronide in the LDL oxidation system. Biosci Biotech Biochem, **61**, 1942-1943.

Olthof, M.R., Hollman, P.CH. and Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*, **131**, 66–71.

Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 291-298.

Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Polychronopoulos, E., *et al.* (2004). Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit*, **10**, 193-198.

Panagiotidis, M., Tsolas, O. and Galaris, D. (1999). Glucose oxidase produced H_2O_2 induces Ca^{2+} -dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radical Biol Med*, **26**, 548–556.

Pantopoulos, K. (2015). TfR2 links iron metabolism and erythropoiesis. (Comment on Nai et al) *Blood*, **125**, 1170.

Papanikolaou, G. and Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **202**, 199-211.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J. and Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, **276**, 7806-7810.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., *et al.* (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22, 153-183.

Peng, S., Zhang, B., Yao, J., *et al.* (2015). Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food Funct*, **6**, 2091-100.

Pérez-Jiménez, F., Álvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., *et al.* (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest*, **35**, 421–424.

Perluigi, M., Joshi, G., Sultana, R., *et al.* (2006). In vivo protective effects of ferulic acid ethyl ester against amyloid-beta peptide 1–42-induced oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, **84**, 418–426.

Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., *et al.* (2009). Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*, **113**, 6225-6236.

Petrak, J. and Vyoral, D. (2005). Hephaestin—a ferroxidase of cellular iron export. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 1173–1178.

Petrat, F., De Groot, H., Sustmann, R. and Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Che.* **383**, 489-502.

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., *et al.* (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*, **276**, 7811-7819.

Plumb, G.W., Garcia-Conesa, M.T., Kroon, P.A., *et al.* (1999). Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric*, **79**, 390–392.

Ponka, P., Beaumont, C. and Richardson, D.R. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*, **35**, 35-54.

Prasaud, N.R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S. and Reddy, B.V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem*, **349**, 11–19.

Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., *et al.* (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353, 670-674.

Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., *et al.* (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, **38**, 899-914.

Qenaei,-Al., Yiakouvaki, A., Reelfs, O., *et al.* (2014). Role of intracellular labile iron, ferritin, and antioxidant defence in resistance of chronically adapted Jurkat T cells to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, **68**, 87-100.

Quiles, J.L., Farquharson, A.J., Simpson, D.K., *et al.* (2002). Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr*, **88**, 225–234.

Ragione, F.D., Cucciolla, V., Borriello, A. *et al.* (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 733-9.

Ramos, E., Kautz, L., Rodriguez, R., *et al.* (2011). Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*, **53**, 1333-1341.

Recalcatti. S., Minotti, G. and Cairo, G. (2010). Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid Redox Signal*, **13**, 1593-1616.

Rechner, A.R., Pannala, A.S. and Rice-Evans, C.A. (2001). Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Radical Res*, **35**, 195–202.

Rechner, A.R., Spencer, J.P., Kuhnle, G., *et al.* (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, **30**, 1213–1222.

Richardson, D.R., Kalinowski, D.S., Lau, S., *et al.* (2009). Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 702-717.

Rietjens, S.J., Bast, A. and Haenen, G.R. (2007). New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol, *J Agric Food Chem*, **55**, 7609-7614.

Rochette, L., Gudjoncik, A., Guenancia, C., *et al.* (2015). The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? *Pharmacol Ther*, **146**, 35-52.

Rodriguez-Morato, J., Xicota, L., Fito, M., *et al.* (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, **20**, 4655-4680.

Roetto, A., Daraio, F., Porporato, P., *et al.* (2004). Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood*, **103**, 2407-9.

Roetto, A., Papanikolaou, G., Politou, M., *et al.* (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, **33**, 21-22.

Romero, C. and Brenes, M. (2012). Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *J Agric Food Chem*, **60**, 9017-9022.

Roos, G. and Messens, J. (2011). Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med*, **51**, 314-326.

Ross, G.M., McMillan, T.J., Wilcox, P. and Collins, A.R. (1995). The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res*, **337**, 57-60.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., *et al.* (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J*, **17**, 2596-2606.

Salas-Salvadó, J., Martinez-González, M.Á., Bulló, M. and Ros, E. (2011). The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **21**, Suppl 2, B32-48.

Scapgnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., *et al.* (2002). Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of Heme Oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol*, **3**, 554–561.

Schaffer, S., Müller, W.E. and Eckert, G.P. (2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res*, **62**, 322-327.

Schroeter, H., Boyd, C.S., Ahmed, R., *et al.* (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J*, **372**, 359-369.

Scoditti, E., Calabriso, N., Massaro, M., *et al.* (2012). Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch Biochem Biophys*, **527**, 81-89.

Sebastiani, G. and Pantopoulos, K. (2011). Disorders associated with systemic or local iron overload: from pathophysiology to clinical practice. *Metallomics*, **3**, 971-986.

Seligman, P.A. and Schleicher, R.B. (1999). Comparison of methods used to measure serum iron in the presence of iron gluconate or iron dextran. *Clin Chem*, **45**, 898-901.

Sestili, P., Diamantini, G., Bedini, A., *et al.* (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.

Setchell, K.D., Faughnan, M.S., Avades, T., *et al.* (2003). Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of 13C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **77**, 411-419.

Shapiro, H.M. (2003). Practical flow cytometry. Wiley-Liss, New York.

Shaw, G.C., Cope, J.J., Li L., et al. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, **440**, 96-100.

Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S. et al. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. Cell, 122, 789-801.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E. and Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grapes seedsbiochemistry and functionality. *J Med Food*, 6, 291–299.

Shi, Y. (2002). Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb.)*, **10**, 285–288.

Shigenaga, M., Hagen, T. and Ames, B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 10771-10778.

Shin, K.M., Kim, I.T., Park, Y.M., *et al.* (2004). Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-a production. *Biochem Pharmacol*, **68**, 2327–2336.

Shlipak, M.G., Fried, L.F., Crump, C., *et al.* (2003). Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation*, **107**, 87-92.

Sies, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, **4**, 180-183.

Sies, H. and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **311**, 617-631.

Silvestri, L., Nai, A., Pagani, A. and Camaschella, C. (2014). The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis. *Front Pharmacol*, **5**, 93.

Simopoulos, A.P. (2005). What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *World Rev Nutr Diet*, **95**, 80-92.

Singh, A. (2009). Hemoglobin control, ESA resistance, and regular low-dose IV iron therapy: a review of the evidence. *Semin Dial*, **22**, 6469.

Singh, N., McCoy, M., Tice, R. and Schneider, E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res, **184**, 461–470.

Siriani, R., Chimento, A., De Luca, A., *et al.* (2010). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res*, **54**, 833–840.

Sirota, R., Gibson, D. and Kohen, R. (2015). The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biology*, **4**, 48-59.

Sluss, H.K., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R.J. (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol*, **14**, 8376-8384.

Sofi, F., Macchi, C., Abbate, R., et al. (2013). Mediterranean diet and health. Biofactors, 39, 335-342.

Son, S. and Lewis, B.A. (2002). Free radical scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. J *Agric Food Chem*, **50**, 468–47.

Song, Y., Wen, L., Sun, J., *et al.* (2016). Cytoprotective mechanism of ferulic acid against high glucoseinduced oxidative stress in cardiomyocytes and hepatocyte. *Food Nutr Res*, **60**, 30323.

Sposi, N. M., Cianetti, L., Tritarelli, E., et al. (2000). Mechanisms of differential transferring receptor expression in normal hematopoiesis. *Eur J Biochem*, **267**, 6762-6774.

Steele, M., Stuchbury, G. and Műnch, G. (2006). The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Exp Gerontol*, **42**, 28-36.

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

Stridh, H., Kimland, M., Jones, D.P., *et al.* (1998). Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributylin-induced apoptosis. *FEBS Lett*, **429**, 351-355.

Su, M.A., Trenor, C.C., Fleming, M.D. *et al.* (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter nramp2. *Blood*, **92**, 2157-2163.

Sullivan, J. L. (2007). Long-term risks of increased use of intravenous iron. *Lancet*, **370**, 481–482.

Sultana, R., Ravagna, A., Mohmmad-Abdul, H., *et al.* (2005). Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Relationship to antioxidant activity. *Journal of Neurochemistry*, **92**, 749–758.

Sunder-Plassmann, G. and Horl, W.H. (1996). Safety of intravenous injection of iron saccharate in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, **11**, 1797-1802.

Tan, J., Ma, Z., Han, L., *et al.* (2005). Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Phys*, **289**, H2265-H2271.

Tenopoulou, M., Doulias, P.T., Barbouti, A., *et al.* (2005). Role of compartmentalized redoxactive iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J*, **387**, 703-710.

Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.T., *et al.* (2007). Does the calcein-AM method assay the total cellular "labile iron pool" or only a fraction of it? Biochem. J. **403**, 261–266.

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. and Yamamoto, M. (2006). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem*, **387**, 1311-1320.

Tovbin, D., Mazor, D., Vorobiov, M., *et al.* (2002). Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis*, **40**, 1005-1012.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. and Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*, **348**, 2599-2608.

Trichopoulou, A., Orfanos, P., Norat, T., *et al.* (2005). Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ*, **330**, 991-997.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., et al. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, **252**, 38-53.

Uysal, E., Yilmaz, H.R., Ugan, Y., *et al.* (2015). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, **29**, 559-63.

Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., *et al.* (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 380, 75-79.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J Immun Meth*, **184**, 39-45.

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

Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., *et al.* (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res*, **34**, 301-305.

Visioli, F., Galli, C., Grande, S., *et al.* (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr*, **133**, 2612-2615.

Walden, W.E., Selezneva, A.I., Dupuy, J. *et al.* (2006). Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science*, **314**, 1903-1908.

Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., *et al.* (2014). Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother*, **41**, 213-221.

Wang, D., Xiang, D.B., He, Y.J., *et al.* (2005). Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*, **11**, 4008-4012.

Wang, T., Chen, L., Wu, W., *et al.* (2008). Potential cytoprotection: antioxidant defense by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can J Physiol Pharmacol*, **86**, 279–287.

Wang, X., Stavchansky, S., Kerwin, S.M. and Bowman, P.D. (2010). Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives. *Eur J Pharmacol*, **635**, 16–22.

Wang, Y., Shahidi, F. and Ho, C.T. (2013). Metabolism of dietary phenolic acids. In Ho, C.T., Mussinan. C., Shahidi, F., Contis E.T. Editors: eds. Nutrinional and Functional Properties of food. pp.178-204.

Warnholtz, A. and Munzel, T. (2000). Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, **1**, 38-40.

Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A., *et al.* (2004). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. J Biol Chem, **279**, 6017-6026.

Wei, X., Zhao, L., Ma, Z., *et al.* (2004). Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Brain*, **127**, 2629-2635.

Weinberg, E.D. (2010). The hazards of iron loading. Metallomics, 2, 732-740.

Weinbrenner, T., Fitó, M., Farré Albaladejo, M., *et al.* (2004). Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res*, **30**, 207-212.

Weiss, G. and Goodnough, L.T. (2005). Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*, **352**, 1011-1023.

Wilkinson, N. and Pantopoulos, K. (2014). The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol*, **5**, 176.

Willett, W.C. (2006). The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr*, **9**, 105-110.

Willis, S., Day, C.L., Hinds, M.G. and Huang, D.C.S. (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci*, **116**, 4053-4056.

Wilson, D.J., Fortner, K.A., Lynch, D.H., *et al.* (1996). JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*, **26**, 989-994.

Winter, W.E., Bazydlo, L.A. and Harris, N.S. (2014). The molecular biology of human iron metabolism. *Lab Med*, **45**, 92–102.

Worthen, C.A. and Enns, C.A. (2014). The role of hepatic transferrin receptor 2 in the regulation of iron homeostasis in the body. *Front Pharmacol*, **5**, 34.

Wu, W.M., Lu, L., Long, Y., *et al.* (2007). Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure–activity insight. *Food Chemistry*, **105**, 107-115.

Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*, **19**, 8469-8478.

Yang, J., Marriner, G.A., Wang, X., *et al.* (2010). Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinated derivatives: Comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl ether (CAPE). *Bioorg Med Chem*, **18**, 5032–5038.

Youdim, M.B. (2008). Brain iron deficiency and excess; cognitive impairment and neurodegeneration with involvement of striatum and hippocampus. *Neurotox Res*, **14**, 45-56.

Yu, Z., Persson, H.L., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. (2003). Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1243-1252.

Zager, R.A. (2006). Intravenous iron therapy in peritoneal dialysis patients: short-term efficacy and long-term issues. *Clin J Am Soc Nephrol*, **1**, 353-355.

Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., *et al.* (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol*, **6**, 606-613.

Zhang, Y., Hendrich, S. and Murphy, PA. (2003). Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*, **133**, 399-404.

Zhao, Z. and Moghadasian, M.H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem*, **109**, 691-702.

Zhong, R.Z., Zhou, D.W., Tan, C.Y., *et al.* (2011). Effect of tea catechins on regulation of antioxidant enzyme expression in H_2O_2 -induced skeletal muscle cells of goat in vitro. *J Agric Food Chem*, **59**, 11338–11343.

Zhou, G., Miura, Y. and Shoji, H. (2001). Platelet monoamine oxidase B and plasma betaphenylethylamine in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Phychiatry*, **70**, 229-231.

Zou, X., Feng, Z., Li, Y., *et al.* (2012). Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem*, **23**, 994-1006.

Zrelli, H., Matsuoka, M., Kitazaki, S., *et al.* (2011). Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J Agric Food Chem*, **59**, 4473-4482.

Γαλάρης, Δ. (2015). Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες. [ηλεκτρ. Βιβλ.], Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Εκδόσεις Κάλλιπος, Αθήνα. Διαθέσιμο στο: http://dhl.handle.net/11419/5113.

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Δημοσιεύσεις της παρούσας Διδιακτορικής Διατριβής

Kitsati, N., Mantzaris, M.D. and Galaris, D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biology*, **70**, 233-242.

Mantzaris, M.D., Bellou, S., Skiada, V., **Kitsati, N.**, Fotsis, T., Galaris, D. (2016). Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. *Free Radical Biology and Medicine*, **97**, 454–465.

Kitsati. N., Liakos, D., Ermeidi, E., Mantzaris, M.D., Vasakos, S., Kyratzopoulou, E., Eliadis, P., Andrikos, E., Kokkolou, E., Sferopoulos, G., Mamalaki, A., Siamopoulos, K., Galaris, D. (2015). Rapid elevation of transferrin saturation and serum hepcidin concentration in hemodialysis patients after intravenous iron infusion. *Haematologica*, **100**, 80-83.

Kitsati,N., Fokas, D., Ouzouni, M.D., Mantzaris, M.D., Barbouti, A., Galaris, D. (2012). Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H_2O_2 -induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *J Agric Food Chem*, **60**, 7873-7879.

Galaris, D., **Kitsati, N.**, Pelidou, S.E., Barbouti, A. (2012). Implication of oxidative stress and "labile iron" in ischemic stroke. In, "Metal ions in stroke" (Eds: Li Y and Zhang JH), Springer Series in Translational Stroke Research, XVII, 978-1-4419-9662-6.