

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000199854



429





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΕΝΖΥΜΩΝ**

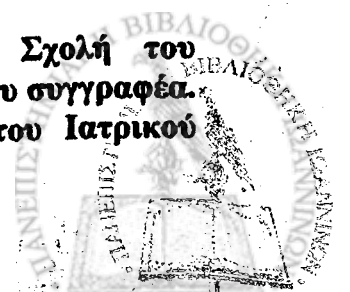
ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ Γ. ΚΟΝΤΑΡΓΥΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



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



Ημερομηνία αιτήσεως: 2-2-2001

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 5-4-2001

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. **Βασιλική Καλφακάκου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπουσα.
2. **Άγγελος Ευαγγέλου**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.
3. **Αθηνά Βαδαλούκα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-4-2001

Ανασύσταση τριμελούς επιτροπής.

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. **Βασιλική Καλφακάκου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπουσα.
2. **Ευάγγελος Κωλέττας**, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος.
3. **Αθηνά Βαδαλούκα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 23-6-2005

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων: Τσιάνος Επαμεινώνδας,
Καθηγητής Παθολογίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

1. **Ευαγγέλου Άγγελος**, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Καναβάρος Παναγιώτης**, Καθηγητής Ανατομίας, Ιστολογίας, Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. **Παπαδόπουλος Γεώργιος**, Καθηγητής Αναισθησιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. **Μάλαμας Μιχάλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Καλφακάκου Βασιλική**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
6. **Κωλέττας Ευάγγελος**, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
7. **Βαδαλούκα Αθηνά**, Επίκουρη Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών

Βαθμός αποδοχής της διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι γνωστό ότι τοπικά αναισθητικά όπως η ροπιβακαΐνη εκτός από τις αναλγητικές τους επιδράσεις επάγουν και απόπτωση σε κύτταρα. Επίσης το απαραίτητο ιχνοστοιχείο ψευδάργυρος (Zn) έχει βρεθεί ότι προστατεύει διάφορα είδη κυττάρων από την αποπτωτική δράση στρεσογόνων παραγόντων, και επίσης αποτελεί δομικό στοιχείο του ενεργού κέντρου μεταλλοπεπτιδασών όπως η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP). Η NEP, εκτός από τον σημαντικό ρόλο της στη φυσιολογία και βιοχημεία του πόνου που ασκείται με τη διάσπαση των ενδογενών οπιοειδών, επάγει επίσης και μείωση του πολλαπλασιασμού και επαγωγή απόπτωσης ειδικά σε καρκινικά κύτταρα. Ο συνδυασμός επομένως ροπιβακαΐνης, NEP και Zn πιθανόν να συνεργεί στη διαχείριση του άλγους καρκινικής και μη αιτιολογίας.

Η παρούσα διατριβή άρχισε τον Απρίλιο του 2001, ολοκληρώθηκε το έτος 2005 και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη των επιδράσεων ειδικών παραγόντων της φυσιολογίας του πόνου όπως το τοπικό αναισθητικό ροπιβακαΐνη, το μέταλλο ψευδάργυρος (Zn) σημαντικό στη νευροδιαβίβαση και η μεταλλοπεπτιδάση NEP που διασπά τα ενδογενή οπιοειδή, σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα ανθρώπου HaCaT. Μελετήθηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί επαγωγής της απόπτωσης ιδιαίτερα σε σχέση με τα αντι-αποπτωτικά γονίδια κλαστρίνη/ΑpoJ και Bcl-2.

Διαπιστώθηκε ότι η δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaT, πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού μέρος του οποίου είναι η μειορρύθμιση της κλαστρίνης/ΑpoJ. Βρέθηκε επίσης ότι ο Zn σε συγκέντρωση 15 μM ως $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ προστατεύει τα κύτταρα HaCaT από τις δράσεις της ροπιβακαΐνης, αφού ανέστειλε την μείωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας τους και μερικώς, την απόπτωση που προκαλεί η ροπιβακαΐνη. Επίσης φαίνεται ότι η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την NEP στα κύτταρα HaCaT, γεγονός που πιθανόν επιτρέπει στα ενδογενή οπιοειδή να ασκήσουν την αναλγητική τους δράση. Προέκυψε ακόμα ότι η υπερέκφραση της NEP στα κύτταρα HaCaT ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητά τους επάγοντας απόπτωση κατόπιν επώασης 48 ωρών. Τέλος παρατηρήθηκε ότι η προστατευτική δράση του Zn προς τα κύτταρα HaCaT που επερεκφράζουν την NEP, απέναντι στην αποπτωτική επίδραση της ροπιβακαΐνης, εμφανίζεται μειωμένη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Άγγελο Ευαγγέλου καθώς και όλα ανεξαιρέτως τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συμπεριφορά τους απέναντί μου γεγονός που με βοήθησε σημαντικά για την εκπόνηση της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κα. Βασιλική Καλφακάκου για την επίβλεψη, την εμπιστοσύνη και τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Ευάγγελο Κωλέττα του οποίου η συμβολή στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές Μοριακή Βιολογίας καθώς και σε άλλους τομείς εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, ήταν καθοριστική.

Επίσης ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας κα. Αθηνά Βαδαλούκα για τη σημαντική της συμβολή στην επιτυχή έκβαση της διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμα τις κυρίες Ευτυχία Γούλα και Χριστίνα Τζήμα καθώς και τους κυρίους Νίκο Γκάλκο και Παναγιώτη Γρίβα για την βοήθεια και φιλική συμπεριφορά τους.



Ακόμα ευχαριστώ τον διδάκτορα Χριστόφορο Θωμά και τους συναδέλφους Χρήστο Τσιρώνη, Χρήστο Μούλια και από το Εργαστήριο Φυσιολογίας για την βοήθεια και τη συμπαράστασή τους.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιολογίας, Χαράλαμπο Αγγελίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας και Θεώδορο Τζαβάρα Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας καθώς και τον διδάκτορα Πέτρο Μποζίδη, επίσης τους διδάκτορες από το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη, Άκη Ντούλια και τους συναδέλφους Μαργαρίτα Τενοπούλου και Λάμπρο Νούση και τέλος το μέλος ΔΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Περικλή Παππά, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

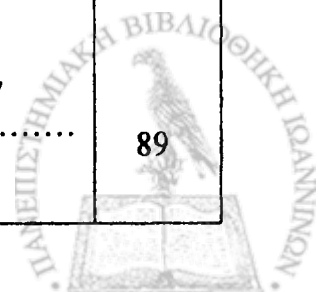
	Σελ.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i-iv
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	v
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1: ΤΟΠΙΚΑ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	1
1.1 Ανατομικολειτουργικά στοιχεία του πόνου και σύστημα αναλγησίας.....	1
1.2 Ιστορία, βασικές ομάδες και κατηγορίες τοπικών αναισθητικών.....	4
1.3 Δράσεις και μέθοδοι χορήγησης των τοπικών αναισθητικών.....	7
1.4 Απόπτωση.....	9
1.5 Βιοχημικές οδοί της απόπτωσης.....	10
1.6 Κασπάσες, ενεργοποιητές της απόπτωσης.....	12
1.7 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης.....	14
1.8 Απόπτωση και αντι-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-2.....	16
1.9 Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ): Ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο.....	19
1.10 Τοπικά αναισθητικά και απόπτωση.....	27
2: ΡΟΠΙΒΑΚΑΪΝΗ	29
2.1 Γενικά.....	29
2.2 Φαρμακοδυναμική, δράσεις και χορήγηση της ροπιβακαΐνης.....	31
2.3 Αντιφλεγμονώδης δράση της ροπιβακαΐνης.....	32
2.4 Ροπιβακαΐνη, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση.....	33
3: ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (Zn)	34
3.1 Γενικά.....	34
3.2 Zn και απόπτωση.....	35
3.3 Zn και μεταλλοπρωτεάσες.....	37
4: ΟΥΔΕΤΕΡΗ ΕΝΔΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗ (NEP)	39
4.1 Γενικά.....	39
4.2 Δράσεις της NEP.....	39
4.3 NEP και πόνος.....	42
4.4 Οποειδή και απόπτωση.....	43
4.5 Εντοπισμός και ρόλος της NEP και των εγκεφαλινών στα κύτταρα του δέρματος.....	43
4.6 NEP, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση.....	44



II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
ΥΛΙΚΑ.....	49
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
1: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	50
1.1 Χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς HaCaT.....	50
1.2 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	51
1.3 Διατήρηση και επαναφορά κυττάρων.....	52
1.4 Καταμέτρηση κυττάρων.....	53
1.5 Επώαση κυττάρων HaCaT με ροπιβακαΐνη και νιτρικό ψευδάργυρο, Zn(NO ₃) ₂ και κυτταρικός πολλαπλασιασμός (cell proliferation).....	53
1.6 Τεχνική αποκλεισμού με trypan blue (trypan blue exclusion assay).....	54
2: ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	55
2.1 Παρασκευή L-Broth και τρυβλίων με L-άγαρ.....	55
2.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό.....	55
2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA.....	56
2.4 Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων.....	56
2.5 Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων σε γλυκερόλη.....	57
2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρού όγκου (mini prep).....	57
2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλου όγκου (maxi prep).....	57
2.8 Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα.....	58
3: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	59
3.1 Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA.....	59
3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	60
4: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	61
4.1 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών.....	61
4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	61
4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	62
4.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)...	63
5: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ.....	64
5.1 Φορείς έκφρασης (expression vectors).....	64
5.2 Διαμόλυνση κερατινοκυττάρων HaCaT.....	65



III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
1: Οι επιδράσεις της ροπιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2.....	69
1.1 Η ροπιβακαΐνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT επάγοντας απόπτωση.....	69
1.2 Η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη κυτταρική επιβίωση κυττάρων θηλαστικών που εκτίθενται σε στρεσογόνους παράγοντες.....	72
1.3 Παραγωγή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη κλαστρίνη/ApoJ.....	72
1.4 Η κλαστρίνη/ApoJ και η Bcl-2 μειώνουν την ευαισθησία των κυττάρων HaCaT στη ροπιβακαΐνη.....	75
2: Μερική αναστολή της επαγόμενης από τη ροπιβακαΐνη απόπτωσης από τον νιτρικό ψευδάργυρο, Zn(NO₃)₂, στα κερατινοκύτταρα HaCaT.....	78
2.1 Αναστολή από τον νιτρικό ψευδάργυρο, Zn(NO ₃) ₂ , της επαγόμενης από τη ροπιβακαΐνη, μείωσης του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT.....	78
2.2 Ο νιτρικός ψευδάργυρος, Zn(NO ₃) ₂ , αναστέλλει μερικώς, την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη απόπτωση στα κύτταρα HaCaT.....	78
3: Ο ρόλος της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP, ψευδαργυροπεπτιδάση) και του νιτρικού ψευδαργύρου, Zn(NO₃)₂, στην επαγωγή απόπτωσης κερατινοκυττάρων HaCaT από τη ροπιβακαΐνη.....	81
3.1 Η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την πρωτεϊνική έκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) παρουσία και απουσία νιτρικού ψευδαργύρου, Zn(NO ₃) ₂	81
3.2 Κατασκευή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT που υπερεκφράζουν την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP).....	81
3.3 Η υπερέκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) στα κύτταρα HaCaT ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητά τους επάγοντας απόπτωση.....	81
3.4 Η επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη, σε κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζουν την NEP, δεν αναστέλλεται από τον νιτρικό ψευδάργυρο, Zn(NO ₃) ₂	82
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	89
1. Επιδράσεις της ροπιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κυττάρων θηλαστικών: ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2.....	89



2. Η επίδραση του ψευδαργύρου (Zn) στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου από στρεσογόνους παράγοντες στα κύτταρα θηλαστικών.....	93
3. Ο ρόλος της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP ψευδαργύροπεπτιδάση) και του νιτρικού ψευδαργύρου $Zn(NO_3)_2$, στην επαγωγή απόπτωσης κερατινοκυττάρων HaCaT από τη ροπιβακαΐνη.....	95
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	99
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	101
ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	101
ΑΓΓΛΙΚΗ.....	105
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ANP: Atrial natriuretic peptide/κολπικό νατριουρικό πεπτίδιο

Apaf-1: apoptotic protease activating factor-1/παράγοντας-1 που δραστηριοποιεί τις αποπτωτικές πρωτεάσες

APN: aminopeptidase N/αμινοπεπτιδάση N

β-FGF: beta-fibroblast growth factor /β-αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

Bak, Bax: προαποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της υπερικογένειας του Bcl-2

Bcl-2: B-cell lymphoma-2/ανθρώπινο λέμφωμα-2 των B-λεμφοκυττάρων

Bcl-x_L: B-cell lymphoma-XL/ ανθρώπινο λέμφωμα-XL των B-λεμφοκυττάρων

Bid, Bik: προαποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της υπερικογένειας του Bcl-2

C₂: Ceramide/κεραμίδιο

Ca⁺⁺: Calcium ion/ιόν ασβεστίου

CAD: caspase-activated deoxyribonuclease/δεσοξυριβοζονουκλεάση (DNAση), που ενεργοποιείται από κασπάσες

CALLA: common acute lymphoblastic leukemia antigen/κοινό αντιγόνο οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

Cd: cadmium/κάδμιο

CD95: death receptor CD95/υποδοχέας θανάτου CD95

CD95L: CD95 ligand/συνδεδεμένο μόριο του CD95

cDNA: complementary DNA/συμπληρωματικό DNA

c-FLIP: Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme inhibitory protein/κυτταρική ανασταλτική πρωτεΐνη του μετατρεπόμενου ενζύμου από την ιντερλευκίνη-1- συνδεδεμένο με τον Fas μέσω της περιοχής DD,

CLI: complement cytolysis inhibitor/αναστολέας της κυττόλυσης από τον μηχανισμό συμπληρώματος

Clusterin/ApoJ: Clusterin/Apolipoprotein J/Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J

Cu: copper/χαλκός

Cyto c: cytochrome c/κυτόχρωμα c



- DED:** death effector domain/δραστική περιοχή θανάτου
- DD:** death domain/περιοχή θανάτου
- DISC:** death-inducing signaling complex/σύμπλεγμα σήματος επαγωγής θανάτου
- DMSO:** dimethyl-sulphoxide/ διμεθυλο-σουλφοξείδιο
- DNA:** deoxyribonucleic acid/δεσοξυριβοζονουκλείκό οξύ
- DNase I:** deoxyribonuclease I/δεσοξυριβοζονουκλεάση I
- EGF:** epidermal growth factor/επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- EMLA:** eutectic mixture of local anaesthetics/εύτηκτο μείγμα τοπικών αναισθητικών
- ET-1:** endothelin-1/ενδοθελίνη-1
- FADD:** Fas-associated death domain/περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με τον Fas,
- Fas:** CD95 death receptor/υποδοχέας θανάτου ίδιος με τον CD95
- FasL:** Fas-Ligand/συνδεόμενο μόριο για τον Fas,
- FCS:** foetal calf serum/ορός εμβρύου βοός
- Fe:** iron/σίδηρος
- Hg:** mercury/υδράργυρος
- HSF-1:** heat shock transcription factor-1/παράγοντας μεταγραφής θερμικού σοκ-1
- IAPs:** inhibitors of apoptotic proteins/αναστολείς αποπτωτικών πρωτεϊνών
- ICAD:** ICAD inhibitor/αναστολέας της CAD
- IL-1, IL-2:** interleucine-1,-2/ιντερλευκίνη-1, -2
- JNK:** cJun NH₃-terminal kinase/ cJun NH₃ τελική κινάση
- ΚΝΣ:** κεντρικό νευρικό σύστημα
- LPA:** lisophosphatidic acid/λισοφωσφατιδικό οξύ
- LPS:** lipopolysaccharide/λιποπολυσακχαρίτης
- Mn:** manganese/μαγγάνιο
- mRNA:** messenger RNA/αγγελιοφόρο RNA



MT2A: metallothionein 2A/μεταλλοθειονίνη 2A

Na⁺: sodium ion/ión νατρίου

NAD: nicotamide adenine dinucleotide/νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο

NEP: neutral endopeptidase/ουδέτερη ενδοπεπτιδάση

NF-κB: nuclear factor-κB/πυρηνικός παράγοντας-κB

NGF: nerve growth factor/νευρικός αυξητικός παράγοντας

NKC: natural killer cells/φυσικά φονικά κύτταρα

PARP: poly ADP-ribose polymerase/πολύ ADP-ριβουσυλ-πολυμεράση

PBS: phosphate buffered saline/αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος

PDGF: platelet derived growth factor/αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

PDT: photodynamic therapy/φωτοδυναμική θεραπεία

PKCδ: protein kinase Cδ/πρωτεϊνική κινάση Cδ

r-NEP: recombinant NEP/ανασυνδιασμένη NEP

RNA: ribonucleic acid/ριβοζονουκλεϊκό οξύ

Smac/Diablo: Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct inhibitor of apoptotic protein binding protein with low isotonic point/δεύτερος ενεργοποιητής κασπασών που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια/άμεσος αναστολέας της πρωτεΐνης χαμηλού ισοτονικού σημείου, που συνδέεται με την αποπτωτική πρωτεΐνη

SP: substance P/ουσία P

SP-40,40: secreted protein 40,40/εκκρινόμενη πρωτεΐνη 40,40

TGFβ: transforming growth factor-beta/παράγοντας -β μεταβολής της ανάπτυξης

TNF: tumor necrosis factor/παράγοντας νέκρωσης των όγκων

TNF-α: tumor necrosis factor-α/ παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α

TNFR1, TNFR2: TNF receptors/υποδοχείς θανάτου του TNF

TRADD: TNF receptor-1-associated death domain protein/περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με τον υποδοχέα-1 του TNF



TRAF: TNF receptor-associated factor/συνδεδεμένος παράγοντας με τον υποδοχέα του TNF

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling

UV-A: ultraviolet radiation-A/υπεριώδης ακτινοβολία A

v-FLIP: viral FLIP/ FLIP ιών

Zn: zinc/ψευδάργυρος

Zn(NO₃)₂: zinc nitrate/νιτρικός ψευδάργυρος



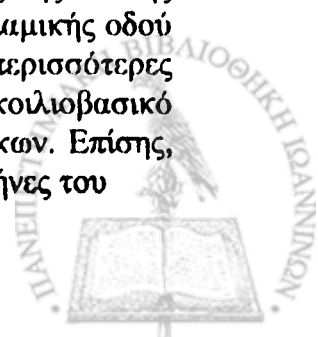
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1: ΤΟΠΙΚΑ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

1.1 Ανατομικολειτουργικά στοιχεία του πόνου και σύστημα αναλγησίας

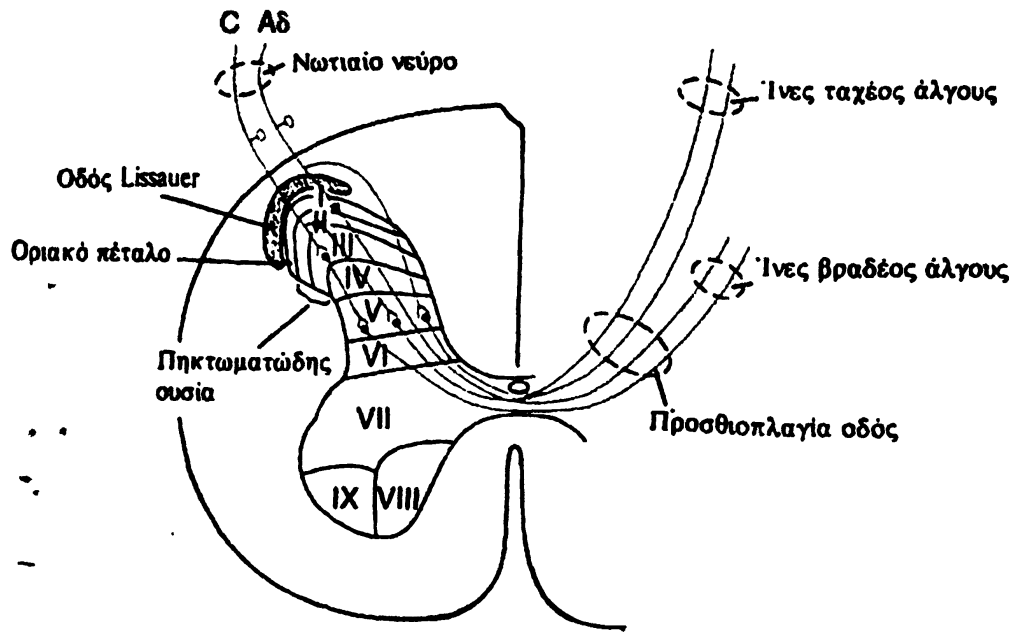
Ο πόνος αποτελεί ένα προστατευτικό μηχανισμό του σώματος, εμφανίζεται όταν προκαλείται βλάβη στους ιστούς και αναγκάζει το άτομο να αντιδράσει ώστε να αντιμετωπίσει το αλγογόνο ερέθισμα. Ο πόνος με βάση τη ταχύτητα αγωγής του διακρίνεται σε ταχύ και βραδύ πόνος. Ο ταχύς (ή οξύς ή νυγμώδης ή ηλεκτρικός) πόνος εμφανίζεται εντός 0,1 του δευτερολέπτου μετά την εφαρμογή αλγογόνου ερεθίσματος, δεν γίνεται αισθητός από τους περισσότερους εν τω βάθη ιστούς του σώματος και άγεται με νευρικές ίνες του άλγους τύπου Αδ. Ο βραδύς (ή καυστικός ή βύθιος ή σφύζων ή χρόνιος) πόνος αρχίζει να γίνεται αισθητός μετά από ένα δευτερόλεπτο ή και περισσότερο, με αυξανόμενη ένταση αργά για πολλά δευτερόλεπτα ή και για αρκετά λεπτά, μακρόχρονα καθίσταται βασανιστικός οδηγώντας σε ανυπόφορη αγωνία, προέρχεται από το δέρμα και από βαθύτερους ιστούς και όργανα και η αίσθησή του προκαλείται από τη διέγερση νευρικών ινών τύπου C. Οι υποδοχείς πόνου στο δέρμα και τους άλλους ιστούς είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις οι οποίες εμφανίζουν εκτεταμένη κατανομή στις επιφανειακές στιβάδες του δέρματος καθώς και σε ορισμένους εσωτερικούς ιστούς (περιόστεο, τοιχώματα των αρτηριών, αρθρικές επιφάνειες, δρέπανο και σκηνίδιο κρανιακού θόλου), διεγείρονται από τρεις διαφορετικούς τύπους ερεθισμάτων, μηχανικά, θερμικά και χημικά ερεθίσματα και ταξινομούνται αντίστοιχα ως μηχανικοί, θερμικοί και χημικοί υποδοχείς πόνου. Κατά γενικό κανόνα, ο ταχύς πόνος εκλύεται από μηχανικούς και θερμικούς υποδοχείς, ενώ ο βραδύς πόνος μπορεί να εκλύεται και από τους τρεις τύπους των υποδοχέων πόνου (Guyton and Hall, 1991).

Παρά το γεγονός ότι όλες οι νευρικές ίνες πόνου είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις, χρησιμοποιούνται δύο ξεχωριστές νευρικές οδοί για την αγωγή αυτών των ώσεων προς το κεντρικό νευρικό σύστημα, οι οποίες και αντιστοιχούν προς τους δύο τύπους του άλγους, δηλαδή μια οδός για το ταχύ και άλλη οδός για το βραδύ άλγος. Μετά την είσοδό τους στο νωτιαίο μυελό με τις οπίσθιες ρίζες των νωτιαίων νεύρων, οι νευρικές ίνες του πόνου ανέρχονται ή και κατέρχονται για ένα έως και τρία νευροτόμια μέσα στην οδό του Lissauer, η οποία βρίσκεται αμέσως πίσω από το οπίσθιο κέρατο της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού και στη συνέχεια πραγματοποιούν συνάψεις με νευράδες των οπισθίων κεράτων. Σε αυτό το σημείο τα σήματα για τον πόνο ακολουθούν δύο διαφορετικές οδούς προς τον εγκέφαλο, την νεονωτιαιοθλαμική οδό και την παλιονωτιαιοθλαμική οδό. Στην νεονωτιαιοθλαμική οδό οι νευρικές ίνες Αδ απολήγουν κυρίως στο πέταλο I (οριακό πέταλο) στα οπίσθια κέρατα και στο σημείο αυτό προκαλούν τη διέγερση της δεύτερης αισθητικής νευράδας της νεονωτιαιοθλαμικής οδού. Από τις νευράδες αυτές ξεκινούν μακρές νευρικές ίνες, οι οποίες χιάζονται αμέσως προς το αντίθετο ημιμόριο του νωτιαίου μυελού, μέσα από τον πρόσθιο σύνδεσμο, και στη συνέχεια φέρονται προς τα άνω στο εγκέφαλο μέσα στις προσθιοπλάγιες δέσμες της λευκής ουσίας (σχήμα I.1). Ένας μικρός αριθμός από τις ίνες της νεονωτιαιοθλαμικής οδού καταλήγουν στις δικτυωτές περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους, οι περισσότερες όμως ίνες φτάνουν ως τον οπτικό θάλαμο και καταλήγουν μέσα στο κοιλιοβασικό σύμπλεγμα, μαζί με τη νευρική οδό των οπισθίων δεσμών-έσω λημνίσκων. Επίσης, ένας μικρός αριθμός από αυτές τις ίνες καταλήγουν στους οπίσθιους πυρήνες του

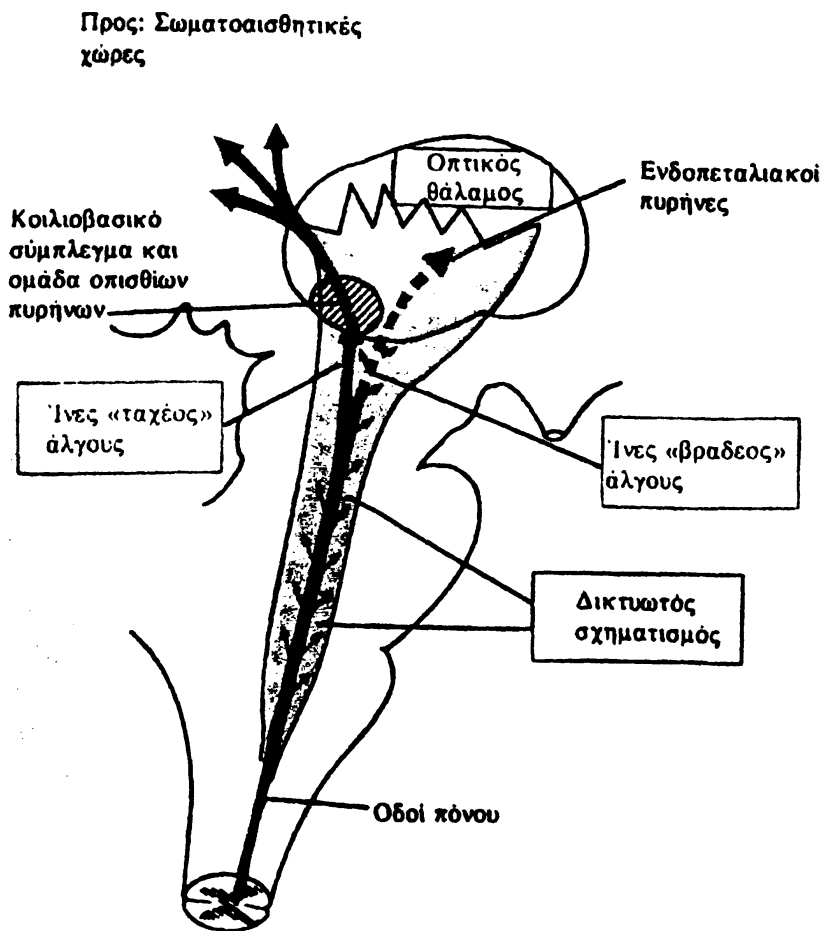


οπτικού θαλάμου. Από τις περιοχές αυτές οι νευρικές ώσεις μεταδίδονται σε άλλες περιοχές στη βάση του εγκεφάλου, καθώς και στη σωματοαισθητική χώρα του εγκεφαλικού φλοιού (σχήμα 1.2). Η παλαιονωτιαιοθαλαμική οδός αποτελεί πολύ παλαιότερο σύστημα και μεταφέρει κατά κύριο λόγο την αίσθηση του πόνου που άγεται με τις ίνες C των περιφερικών νεύρων, αλλά και ορισμένα σήματα που άγονται με τις ίνες Αδ. Αυτής της οδού, οι περιφερικές ίνες καταλήγουν σχεδόν αποκλειστικά στα πέταλα II και III των οπισθίων κέρατων, που και τα δύο μαζί αποτελούν την πηκτωματώδη ουσία. Στη συνέχεια τα περισσότερα από αυτά τα σήματα διέρχονται μέσα από μια ή και περισσότερες επιπρόσθετες νευράδες που βρίσκονται μέσα στα οπίσθια κέρατα, πριν να εισέλθουν, κατά κύριο λόγο μέσα στο πέταλο V, που βρίσκεται επίσης στο οπίσθιο κέρατο. Σε αυτή τη θέση, η τελευταία νευράδα σε αυτή τη σειρά αποδίδει μακρύ νευράξονα, που κατά το πλείστο φέρεται μαζί με τις νευρικές ίνες της ταχείας οδού, μέσα από τον πρόσθιο σύνδεσμο, προς το αντίθετο ημιμόριο του νωτιαίου μυελού και στη συνέχεια φέρεται προς τα άνω, μέσα στην ίδια την προσθιοπλάγια οδό. Η οδός για τον βραδύ πόνο απολήγει σε ευρεία έκταση μέσα στο εγκεφαλικό στέλεχος. Μόνο το ένα δέκατο ως το ένα τέταρτο από αυτές τις νευρικές ίνες φτάνουν ως τον οπτικό θάλαμο. Οι υπόλοιπες καταλήγουν σε μια από τις ακόλουθες τρεις περιοχές: (1) τους δικτυωτούς πυρήνες του προμήκου μυελού, στη γέφυρα και τον μεσεγκέφαλο, (2) στην οροφιαία περιοχή, βαθιά κάτω από τα πρόσθια και οπίσθια διδύμια και (3) στη φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό του Silivius (σχήματα 1.1, 1.2) (Guyton and Hall, 1991).

Η ικανότητα του ίδιου του εγκεφάλου να ελέγχει το βαθμό της εισόδου των σημάτων πόνου προς το νευρικό σύστημα, πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση ενός συστήματος ελέγχου του πόνου, το οποίο ονομάζεται «σύστημα αναλγησίας» και αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: (1) Τη φαιά ουσία που βρίσκεται γύρω από τον υδραγωγό του Sylvius στο μεσεγκέφαλο και την άνω γέφυρα. Νευράδες από την περιοχή αυτή αποστέλλουν νευρικές ώσεις προς (2) το μεγάλο πυρήνα της ραφής, ένα λεπτό πυρήνα που βρίσκεται στη μέση γραμμή, στο ύψος του κάτω μέρους της γέφυρας και του άνω μέρους του προμήκου. Από αυτό το σημείο οι νευρικές ώσεις μεταδίδονται προς τα κάτω με τις πλαγιοπίσθιες δέσμες του νωτιαίου μυελού προς (3) ένα σύμπλεγμα αναστολής του πόνου που βρίσκεται στα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού σημείο, στο οποίο, τα σήματα της αναλγησίας αποκλείουν τον πόνο πριν από τη διοχέτευσή του προς τον εγκέφαλο. Με τον ηλεκτρικό ερεθισμό της φαιάς ουσίας γύρω από τον υδραγωγό, είτε του μεγάλου πυρήνα της ραφής, μπορεί να καταστέλλονται σχεδόν πλήρως πολλά πολύ ισχυρά σήματα πόνου, τα οποία εισέρχονται στο νευρικό σύστημα με τις οπίσθιες ρίζες του νωτιαίου μυελού. Επίσης, με τον ερεθισμό περιοχών που βρίσκονται σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα του εγκεφάλου, τα οποία με τη σειρά τους διεγείρουν τη φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό, και ιδιαίτερα των περικολιακών πυρήνων του υποθαλάμου, που βρίσκονται δίπλα από την τρίτη κοιλία, και σε μικρότερο βαθμό της έσω προσεγκεφαλικής δεσμίδας, που βρίσκεται επίσης στον υποθάλαμο, μπορεί να καταστέλλεται ο πόνος, αν και πιθανώς σε μικρότερο βαθμό. Διάφορες διαβιβαστικές ουσίες συμμετέχουν σ' αυτό το σύστημα αναλγησίας και ιδιαίτερα η εγκεφαλίνη και η σεροτονίνη. Πολλές από τις νευρικές ίνες που προέρχονται, τόσο από τον περικολιακούς πυρήνες όσο και από τη φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό εκκρίνουν εγκεφαλίνη από τις απολήξεις τους. Οι απολήξεις πολλών από τις νευρικές ίνες μέσα στον μεγάλο πυρήνα της ραφής εκκρίνουν επίσης εγκεφαλίνη. Οι νευρικές ίνες που αρχίζουν από αυτό τον πυρήνα και καταλήγουν στα οπίσθια κέρατα τη φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού εκκρίνουν στις απολήξεις τους σεροτονίνη. Σε συνέχεια η σεροτονίνη με τη σειρά της επιδρά σε μια άλλη ομάδα από τοπικές



Σχήμα I.1 Η μετάδοση των νευρικών σημάτων για τον «ταχύ-οξύ» και τον «βραδύ-χρόνιο» πόνο προς τον νωτιαίο μυελό και από εκεί προς το εγκεφαλικό στέλεχος (Guyton and Hall, 1991).



Σχήμα I.2 Η μετάδοση των σημάτων πόνου στον οπίσθιο εγκέφαλο, τον οπτικό θάλαμο και τον φλοιό με την οδό για το «ταχύ, νυγμάδες άλγους» και με την οδό για το «βραδύ, καυστικό άλγους». Η περιοχή με το ροζ χρώμα απεικονίζει το εγκεφαλικό στέλεχος (Guyton and Hall, 1991).



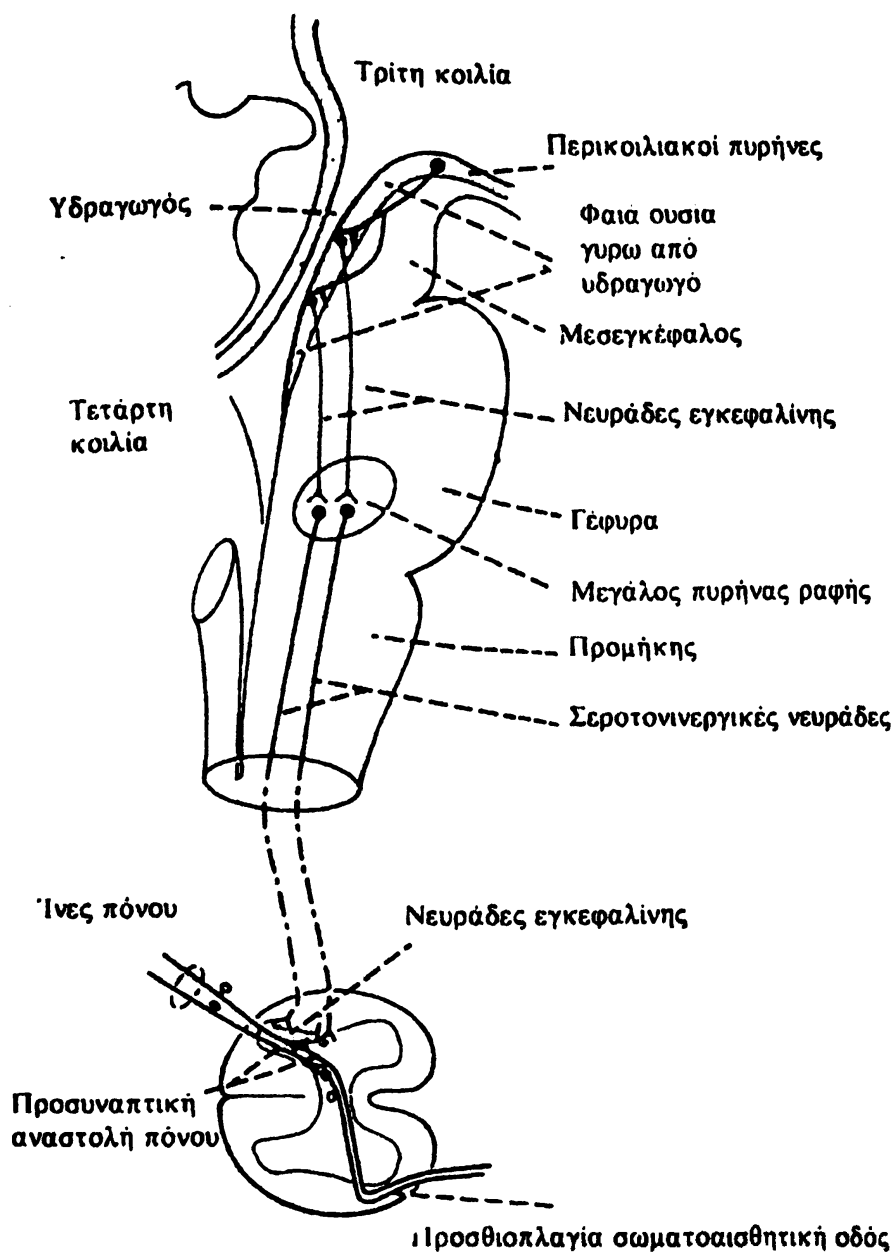
νευράδες του νωτιαίου μυελού, οι οποίες πιστεύεται ότι εκκρίνουν εγκεφαλίνη (σχήμα 1.3). Η εγκεφαλίνη πιστεύεται ότι προκαλεί προσυναπτική αναστολή, τόσο στις προσαγωγές νευρικές ίνες πόνου του τύπου C, όσο και στις ίνες τύπου Ad, κατά τα σημεία σύναψής τους μέσα στα οπίσθια κέρατα. Πιθανώς αυτό γίνεται με τον αποκλεισμό διαύλων ασβεστίου στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών απολήξεων. Επειδή τα ιόντα ασβεστίου είναι εκείνα που προκαλούν την απελευθέρωση διαβιβαστικής ουσίας στη σύναψη, ο αποκλεισμός των διαύλων ασβεστίου είναι προφανές ότι οδηγεί σε προσυναπτική αναστολή. Επιπρόσθετα ο αποκλεισμός αυτός φαίνεται ότι διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, γιατί μετά την ενεργοποίηση του συστήματος αναλγησίας, η αναλγησία συνήθως διατηρείται για πολλά λεπτά, είτε ακόμα και για ολόκληρες ώρες. Η εγκεφαλίνη όπως και άλλα ενδογενή πεπτίδια, που συμμετέχουν στο σύστημα αναλγησίας, ανήκουν στα ενδογενή οπιοειδή τα οποία απαντούν στα διάφορα σημεία του νευρικού συστήματος και αποτελούν προϊόντα διάσπασης τριών μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων: της προοπιομελανοκορτίνης, της προεγκεφαλίνης και της προδυνορφίνης. Επιπρόσθετα, σε πολλά σημεία του εγκεφάλου αποδείχθηκε η παρουσία υποδοχέων για τα οπιοειδή και ιδιαίτερα στις περιοχές που περιλαμβάνονται στο σύστημα αναλγησίας. Οι σημαντικότερες από τις ενδογενείς οπιοειδείς ουσίες είναι η β-ενδορφίνη, η μετ-εγκεφαλίνη, η λευκίνη-εγκεφαλίνη και η δυνορφίνη (Guyton, 1991, Rang and Dale, 1991).

1.2 Ιστορία, βασικές ομάδες και κατηγορίες τοπικών αναισθητικών

Τα τοπικά αναισθητικά εφαρμόζονται για την πρόκληση παροδικής και αναστρέψιμης κατάργησης των αισθήσεων σε μια περιορισμένη περιοχή του σώματος, πράγμα που επιτυγχάνεται με παρεμπόδιση της νευρικής αγωγιμότητας. Παρόλο που η καταναλώση φύλλων κόκας από του ινδιάνους της Νότιας Αμερικής για χιλιάδες χρόνια και η αίσθηση μουδιάσματος στη γλώσσα και στο στόμα λόγω της μάζησης τους ήταν γνωστή για πολύ καιρό, μόλις το 1884 προτάθηκε η κοκαΐνη ως ένα τοπικό αναισθητικό για χειρουργικές επεμβάσεις. Η κοκαΐνη απομονώθηκε από τα φύλλα κόκας το 1860 και βρέθηκε ότι σταματάει την επίδραση αισθητικής διέγερσης στους βατράχους. Ο Anper το 1880 δημοσίευσε ότι η ένεση κοκαΐνης κάτω από το δέρμα προκαλεί μια αναστρέψιμη απώλεια αίσθησης και πρότεινε ότι το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να είναι κλινικά χρήσιμο, ιδέα η οποία τότε δεν έγινε αποδεκτή. Ο Sigmund Freud επιδίωξε να χρησιμοποιήσει την ισχυρή ιδιότητα «ψυχικής ενέργειας» του τοπικού αυτού αναισθητικού, που ήταν γνωστή από τους χρήστες των φύλλων κόκας στις Άνδεις, για ψυχιατρικούς σκοπούς. Αυτό δεν είχε επιτυχία, αλλά ο φίλος και συνάδελφός του οφθαλμολόγος Carl Köller στη Βιέννη, προμηθεύτηκε λίγη κοκαΐνη από τον Freud και έδειξε το 1884 ότι, αναστρέψιμη αναισθησία του κερατοειδούς χιτώνα θα μπορούσε να προκληθεί στάζοντας κοκαΐνη μέσα στο μάτι. Εκείνη την περίοδο, η ιδέα έγινε ταχέως αποδεκτή, και μέσα σε λίγα χρόνια η αναισθησία από την κοκαΐνη εισήχθη στην οδοντιατρική και στη γενική χειρουργική. Το 1904, με την εισαγωγή της προκαΐνης από τον Einhorn, αρχίζει μια νέα εποχή για την τοπική αναισθησία. Η προκαΐνη ήταν το πρώτο ακίνδυνο ενέσιμο τοπικό αναισθητικό που παρέμεινε σε χρήση για πολλά χρόνια μέχρι να εκτοπιστεί από τη λιδοκαΐνη. Άλλα σημαντικά τοπικά αναισθητικά είναι η τετρακαΐνη, η μεπιβακαΐνη, η πριλοκαΐνη και η βουπιβακαΐνη (Goth, 1981, Rang and Dale, 1991).

Τα μόρια των τοπικών αναισθητικών, αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο μέσω ενός εστερικού ή αμιδικού δεσμού με μια βασική πλευρική αλυσίδα. Η μόνη εξαίρεση είναι η βενζοκαΐνη, ένα μάλλον ασυνήθιστο τοπικό αναισθητικό το οποίο δεν έχει βασική μονάδα (σχήμα 1.4). Όλα τα τοπικά

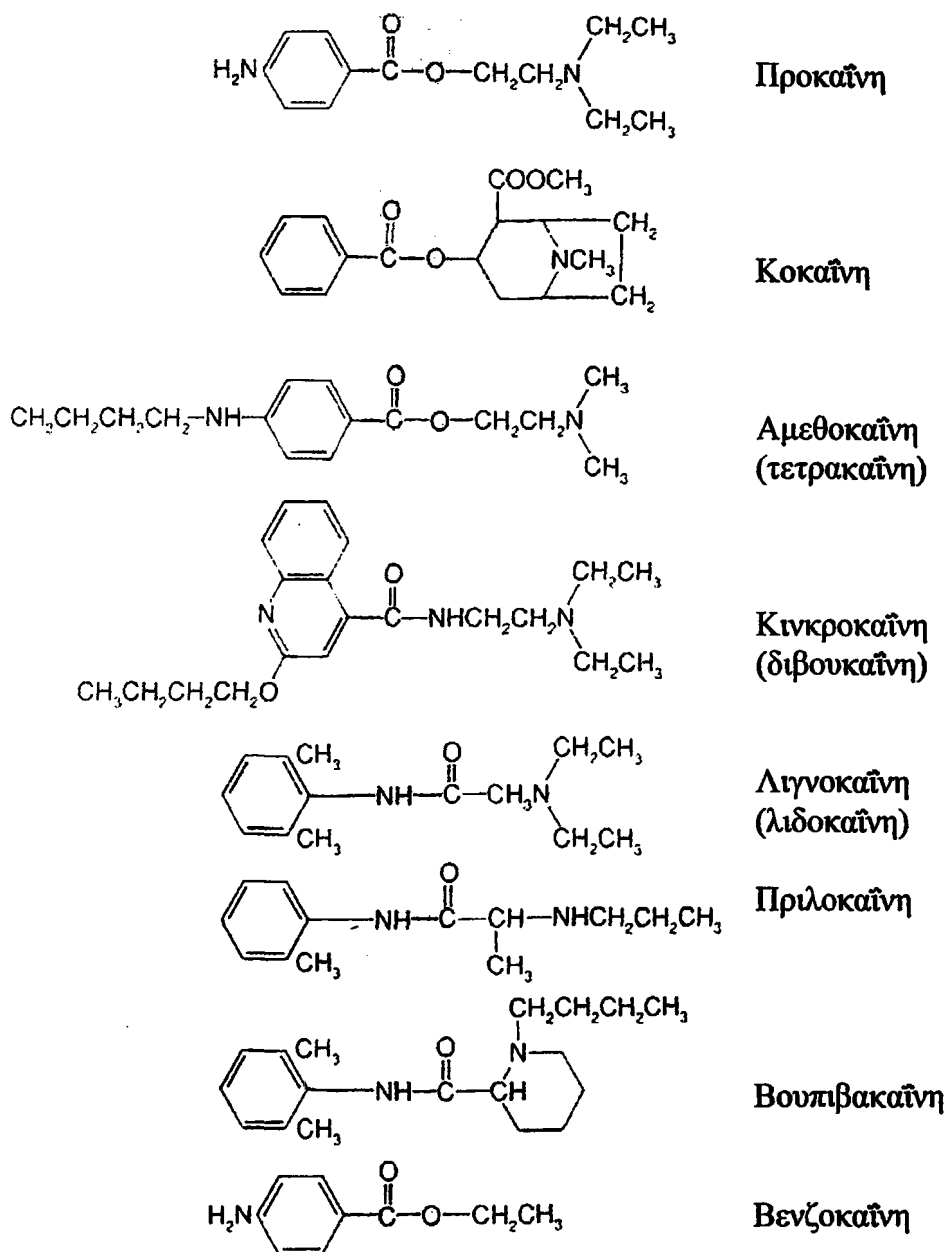




Σχήμα I.3 Το σύστημα αναλγησίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, όπου φαίνεται η αναστολή των εισερχομένων σημάτων πόνου στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού (Guyton and Hall, 1991).

ΤΟΠΙΚΑ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΑ

Αρωματικός Εστερικός Βασική
Δακτύλιος ή αμιδιακός πλευρική
 Δεσμός αλυσίδα



Σχήμα 1.4 ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ ΤΟΠΙΚΩΝ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ. Η γενική δομή των μορίων των τοπικών αναισθητικών αποτελούνται από αρωματική ομάδα (αριστερά), εστέρα ή αμιδιακή ομάδα (ροζ πλαίσιο) και αμινομάδα (δεξιά) (Rang and Dale, 1991).



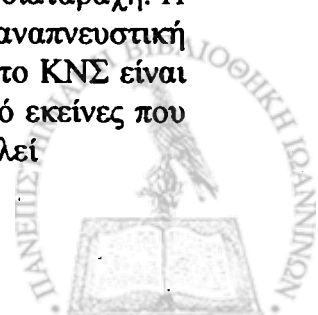
αναισθητικά είναι ασθενείς βάσεις με τιμές pK_a κυρίως μεταξύ 8-9 έτσι ώστε να είναι κυρίως, αλλά όχι εντελώς ιονισμένα σε φυσιολογικό pH, γεγονός σημαντικό σε σχέση με την ικανότητά τους να διεισδύουν στο έλυτρο των νευρώνων και στη μεμβράνη του νευράξονα. Γι αυτό και τα πλήρως ιονισμένα παράγωγα των ουσιών αυτών, ανεξάρτητα από το pH, δεν είναι αποτελεσματικά ως τοπικά αναισθητικά. Επειδή τα μόρια των τοπικών αναισθητικών αποτελούνται από μια υδρόφοβη αρωματική ομάδα συνδεδεμένη με μια υδρόφιλη βασική ομάδα, εμφανίζουν χαμηλή δραστηριότητα επιφανειακής τάσης. Προτάθηκε ότι αυτό το γεγονός, είναι σημαντικό για τη βιολογική δράση τους από τον Skou το 1961 και ότι αυτές οι ουσίες, δρουν παρόμοια με τα πτητικά γενικά αναισθητικά επεκτείνοντας τον όγκο της κυτταρικής μεμβράνης και επεμβαίνοντας μη-ειδικά στη λειτουργία των διαύλων ιόντων. Τέλος, η ύπαρξη του εστερικού ή αμιδικού δεσμού στα μόρια των τοπικών αναισθητικών είναι σημαντική λόγω της ευαισθησίας του στη μεταβολική υδρόλυση. Τα εστερικά τοπικά αναισθητικά όπως η βενζοκαΐνη, η κοκαΐνη, η προκαΐνη και η τετρακαΐνη, απενεργοποιούνται με υδρόλυση στο αίμα και στους ιστούς, κυρίως στο συκώτι. Τα αμιδικά τοπικά αναισθητικά όπως η βουπιβακαΐνη, η ροπιβακαΐνη, η λιδοκαΐνη, η μεπιβακαΐνη, η διβουκαΐνη και η πριλοκαΐνη, είναι πολύ πιο σταθερά έχοντας μακροχρόνια ημιζωή στο πλάσμα και μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ (Rang and Dale, 1991, Θεοχαρίδης, 1997).

1.3 Δράσεις και μέθοδοι χορήγησης των τοπικών αναισθητικών

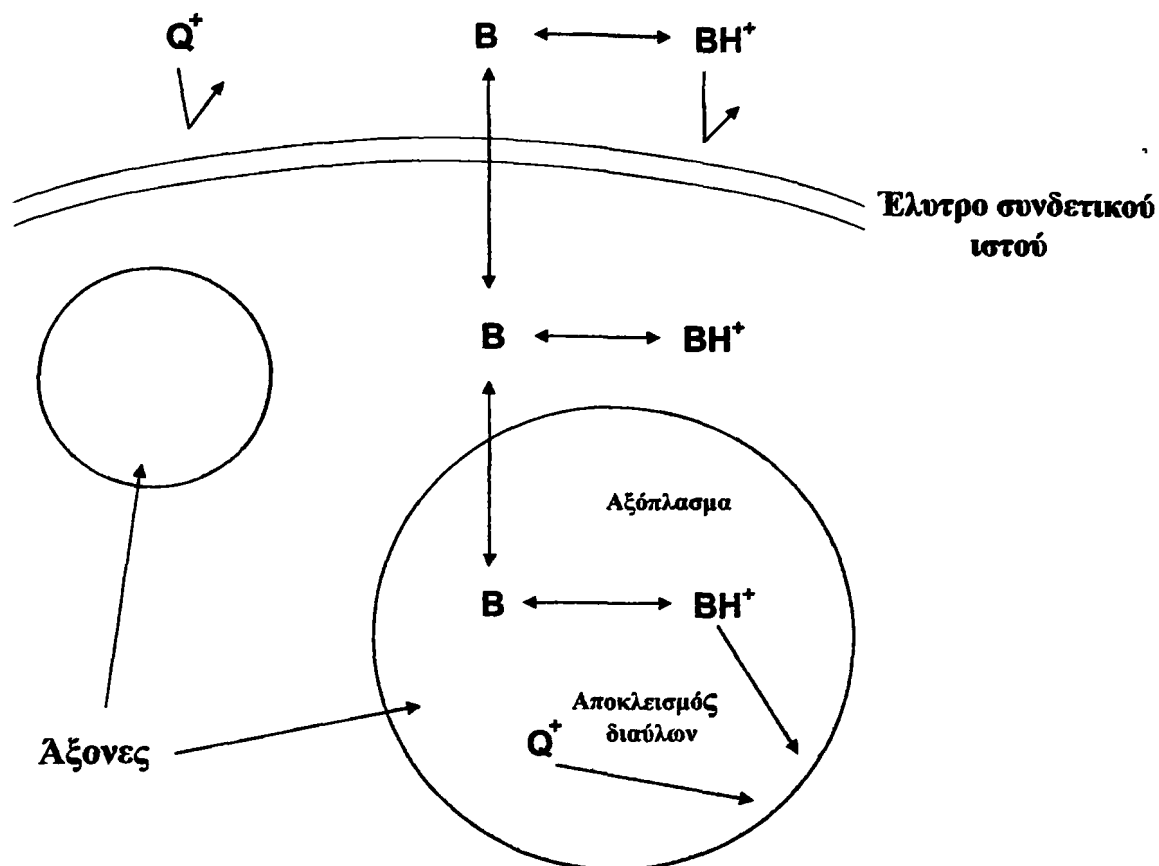
Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης τους, τα τοπικά αναισθητικά, χωρίς να επηρεάζουν το δυναμικό ηρεμίας ή τον ουδό ερεθισμού των νευρώνων, ασκούν αποκλεισμό σταματώντας την έναρξη και τη διάδοση των δυναμικών ενέργειας, παρεμποδίζοντας την αύξηση της αγωγιμότητας των ιόντων νατρίου (Na^+). Η δράση αυτή φαίνεται ότι ασκείται κυρίως με αποκλεισμό των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Na^+ . Τα συνηθισμένα τοπικά αναισθητικά που είναι τριτογενείς ή δευτερογενείς αμίνες, διεισδύουν στο έλυτρο μυελίνης και στη μεμβράνη του νευράξονα στη μη φορτισμένη μορφή, αλλά δρουν από την εσωτερική επιφάνεια της αξονικής μεμβράνης στην κατιονική μορφή (σχήμα 1.5) (Rang and Dale, 1991).

Γενικά τα τοπικά αναισθητικά ασκούν αποκλεισμό στην αγωγιμότητα των νευρικών ινών μικρής διαμέτρου πιο εύκολα, από ότι στις μεγάλες νευρικές ίνες. Ωστόσο, οι μικρότερες ίνες στα περιφερικά νεύρα είναι οι αμύελες C-ίνες (C-fibers) με διάμετρο μικρότερη του 1 μ που άγουν τα ερεθίσματα με ταχύτητα 1m/sec. Αυτές είναι λιγότερο ευαίσθητες από τις μικρότερες εμύελες ίνες Αδ, με διάμετρο 1-20 μ και με ταχύτητα αγωγής μέχρι 100 m/sec. Επειδή οι ώσεις ερεθισμάτων πόνου φέρονται από τις ίνες Αδ- και C-, η αίσθηση του πόνου υφίσταται αποκλεισμό πιο εύκολα από άλλες αισθητικές λειτουργίες, όπως η αφή και τα ιδιοδεκτικά ερεθίσματα. Οι άξονες των κινητικών νευρώνων, επειδή είναι μεγάλοι σε διάμετρο, είναι επίσης σχετικά ανθεκτικοί (Goth, 1981, Rang and Dale, 1991, Θεοχαρίδης, 1997).

Εκτός από τα περιφερικά νεύρα, τα τοπικά αναισθητικά επιδρούν κυρίως στο ΚΝΣ και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Η κύρια επίδραση όλων των τοπικών αναισθητικών στο ΚΝΣ είναι παραδόξως η πρόκληση διέγερσης, λόγω της άρσης της ανασταλτικής λειτουργίας συνάψεων του φλοιού η οποία παράγει ανησυχία και ρίγος, με υποκειμενικές επιδράσεις που ποικίλουν από σύγχυση, έως και οξεία διαταραχή. Η κύρια απειλή για τη ζωή σε αυτή τη φάση προέρχεται από την αναπνευστική καταστολή. Το μόνο τοπικό αναισθητικό με διαφορετικές επιδράσεις στο ΚΝΣ είναι η κοκαΐνη, η οποία προκαλεί φανερό ευφορία σε δόσεις πολύ κάτω από εκείνες που προκαλούν σπασμούς. Η προκαΐνη είναι κυρίως υπεύθυνη στο να προκαλεί



ΔΡΑΣΗ ΤΟΠΙΚΩΝ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ



Σχήμα 1.5 ΙΣΤΙΚΗ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΟΠΙΚΩΝ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ. Ένα τυπικό τοπικό αναισθητικό είναι μια ασθενής βάση, της οποίας το μη φορτισμένο είδος (B) διεισδύει στο νευρικό έλυτρο και στην αξονική μεμβράνη για να φτάσει τους διαύλους Na⁺, οι οποίοι υφίστανται αποκλεισμό από τα φορτισμένα είδη (BH⁺). Αφού το BH⁺ ως έχει δεν μπορεί να περάσει αυτά τα εμπόδια, η αύξηση της οξύτητας του εξωτερικού διαλύματος, που ευνοεί τον ιονισμό, ελαττώνει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Τεταρτογενή παράγωγα τοπικών αναισθητικών (Q⁺), που μπορούν να υπάρξουν μόνο σαν κατιόντα, δεν λειτουργούν όταν εφαρμόζονται εξωτερικά από τη νευρική ίνα, αλλά μπορούν να ασκήσουν αποκλεισμό στους διαύλους αν, σε πειραματικές συνθήκες, εισαχθούν κατευθείαν στο αξόπλασμα (Rang and Dale, 1991).

ανεπιθύμητες κεντρικές επιδράσεις, γιαυτό και αντικαταστάθηκε στην κλινική χρήση από ουσίες όπως η λιδοκαΐνη και η πριλοκαΐνη. Οι καρδιοαγγειακές επιδράσεις των τοπικών αναισθητικών οφείλονται κυρίως στην μυοκαρδιακή κατέρρευση και στην αγγειοδιαστολή. Η μείωση της μυοκαρδιακής συσταλτικότητας, πιθανόν οφείλεται έμμεσα στη μερική αναστολή του ρεύματος ιόντων Na^+ προς τον καρδιακό μύ, η οποία οδηγεί στην ελάττωση της συγκέντρωσής του, που με τη σειρά της μειώνει την ενδοκυττάρια αποθήκευση ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) γεγονός που μειώνει την ισχύ της συστολής. Η αγγειοδιαστολή έχει σαν αιτία μερικώς την άμεση επίδραση στον καρδιαγγειακό μύ και μερικώς την αναστολή του συμπαθητικού νευρικού συστήματός τόσο σε κεντρικό όσο σε γαγγλιακό επίπεδο, επιδρώντας κυρίως στα αρτηριόλια. Η συνδυασμένη επίδραση μυοκαρδιακής ύφεσης και αγγειοδιαστολής προκαλεί πτώση στην πίεση του αίματος, η οποία μπορεί να είναι ξαφνική και απειλητική για τη ζωή. (Goth, 1981, Rang and Dale, 1991).

Οι μέθοδοι χορήγησης των τοπικών αναισθητικών στους ασθενείς διακρίνονται, στην επιφανειακή αναισθησία, στην αναισθησία κατόπιν διήθησης, στην αναισθησία νευρικού αποκλεισμού και στη νωτιαία και επισκληρίδιο αναισθησία. Με την επιφανειακή αναισθησία, το διάλυμα του τοπικού αναισθητικού εφαρμόζεται κατευθείαν στη επιφάνεια του βλεννογόνου σε περιοχές όπως η μύτη, το στόμα, το βρογχικό δέντρο, ο οισοφάγος ή η ουρογενετική οδός και πρέπει να μπορεί να διεισδύει στους ιστούς γρήγορα. Καταλληλότερα τοπικά αναισθητικά για αυτή τη χορήγηση είναι η κοκαΐνη και η λιγνοκαΐνη. Η επιφανειακή αναισθησία δεν είναι γενικά αποτελεσματική στο δέρμα, παρόλο που πρόσφατα βρέθηκε ότι ένα μείγμα λιγνοκαΐνης και πριλοκαΐνης μπορεί να σχηματίσει ένα μη κρυσταλλικό μείγμα (EMLA) το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν στο δέρμα παράγοντας πλήρη αναισθησία σε περίπου μία ώρα. Τα διηθούμενα τοπικά αναισθητικά εισάγονται με ένεση κατευθείαν μέσα στους ιστούς για να φτάσουν σε λεπτούς νευρικούς κλάδους και αισθητικούς νευρικούς αποδέκτες. Στην αναισθησία νευρικού αποκλεισμού, το αναισθητικό εισάγεται με ένεση κοντά στα κατάλληλα νευρικά στελέχη, όπως το βραχιόνιο πλέγμα ή τα μεσοπλευρία νεύρα, για να προκαλέσει απώλεια αίσθησης περιφερικά. Τέλος, η αναισθησία κατά την οποία, τα διαλύματα των τοπικών αναισθητικών εισάγονται με ένεση στο υπαραχνοειδές διάστημα που περιέχει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, είναι γνωστή ως νωτιαία αναισθησία. Τα διαλύματα των αναισθητικών μπορούν επίσης να εισαχθούν με ένεση έξω από τη σκληρή μήνιγγα, μέσα σε ένα στενό διάστημα μεταξύ της σκληρής μήνιγγας και του οστέινου νωτιαίου καναλιού που περιλαμβάνει λίπος και συνδετικό ιστό. Αυτή είναι γνωστή ως επισκληρίδιος αναισθησία. Και στις δύο περιπτώσεις το αναισθητικό δρα κυρίως στις νωτιαίες ρίζες καθώς εξέρχονται από τον μυελό. Το πλεονέκτημα αυτής της μορφής τοπικής αναισθησίας είναι, ότι χρειάζονται μικρές δόσεις μειώνοντας τον κίνδυνο της συστηματικής τοξικότητας. Και οι δύο αυτές τεχνικές χρησιμοποιούνται συνήθως για εγχείρηση στη κοιλιά, στην πύελο και στα κάτω άκρα σε ασθενείς ακατάλληλους για γενική αναισθησία. Η επισκληρίδιος αναισθησία χρησιμοποιείται συχνά για ανώδυνο τοκετό (Rang and Dale, 1991).

1.4 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια συνεχής φυσιολογική διαδικασία μη-φλεγμονώδους προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με χαρακτηριστικά μιας αυτοκατευθυνόμενης κυτταρικής «αυτοκτονίας». Δύο τουλάχιστο βιοχημικές οδοί έχουν αναγνωριστεί που μπορούν, μετά από επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων, να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση πρωτεασών κυστεΐνης, τις δραστικές κασπάσες

(effector caspases), που με τη σειρά τους διασπούν μια ποικιλία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, προκαλώντας τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. Η μία οδός περιλαμβάνει βιοχημικό σήμα προερχόμενο από υποδοχείς θανάτου (death receptors) κυρίως της οικογένειας του TNF και η άλλη παράλληλη οδός είναι εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια και επηρεάζεται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας της Bcl-2. Ο θάνατος από τις τελικές οδούς της απόπτωσης διακρίνεται από τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, στο ότι η απόπτωση είναι μια στενά ρυθμισμένη διαδικασία που επάγεται από ένα συγκεκριμένο ερέθισμα και συμβαίνει χωρίς την απελευθέρωση διαμεσολαβητών φλεγμονής ή γενικότερα λόγω της αποτυχίας ελέγχου της κυτταρικής ομοιόστασης μετά από βλάβη (Hockenbery, 1995, Reed, 1999, Schultz and Harrington Jr., 2003). Οι βιοχημικές οδοί της απόπτωσης είναι αναπόσπαστο μέρος πολλών βιολογικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν την μορφογένεση, την ανακύκλωση των κυττάρων και την απομάκρυνση των βλαπτικών κυττάρων, με συνέπεια η ισορροπημένη απόπτωση να αποτελεί κρίσιμο σημείο της καλής υγείας. Μελέτες γενετικών και επαγόμενων από μικροοργανισμούς ανωμαλιών σε ζώα και ανθρώπους δείχνουν τον ισχυρό ρόλο των αποπτωτικών μηχανισμών στις αυτοάνοσες ασθένειες, στον καρκίνο και το νευρικό σύστημα και σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος του Αλτσχάϊμερ και η νόσος του Πάρκινσον (Schultz and Harrington Jr., 2003).

Ο θάνατος από απόπτωση, έχει βρεθεί ότι είναι το αποτέλεσμα έκθεσης σε φυσικούς παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία και η υπερθερμία, καθώς και τοξικών όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Ακόμα απόπτωση επάγεται, από τις κυτταρικές επιδράσεις κυττοκινών όπως ο TNF και ο παράγων-β μεταβολής ανάπτυξης-β (transforming growth factor-β), καθώς και οι ανοσολογικά σχετιζόμενοι μηχανισμοί όπως ο διαμεσολαβούμενος από T-κύτταρα κυτταροτοξικός θάνατος. Τέλος, επιπλέον ερεθίσματα που προκαλούν αυτού του είδους τον κυτταρικό θάνατο, είναι η στέρηση αυξητικών παραγόντων, η αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}), η μόλυνση από ιούς, η αποκόλληση κυττάρων, η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax, το κεραμίδιο, η επίδραση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Hockenbery 1995, Green and Reed, 1998, Reed, 1999).

1.5 Βιοχημικές οδοί της απόπτωσης.

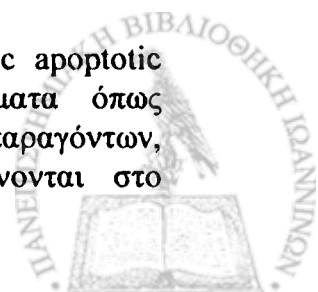
Ορισμένα κύτταρα έχουν μοναδικούς αισθητήρες, που ορίζονται ως «υποδοχείς θανάτου» (death receptors) στην επιφάνειά τους, οι οποίοι ανιχνεύουν την παρουσία εξωκυττάρων σημάτων θανάτου και σε απάντηση, ενεργοποιούν ταχέως τον ενδογενή μηχανισμό απόπτωσης του κυττάρου. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπεροικογένεια των γονιδίων του «υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων» (TNFR1), η οποία ορίζεται από παρόμοιες εξωκυττάριας περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και περιλαμβάνουν επιπλέον μια ομόλογη κυτταροπλασματική αλληλουχία που ορίζεται ως η «περιοχή θανάτου» (death domain). Οι πιο χαρακτηριστικοί υποδοχείς θανάτου, είναι ο CD95 ή Fas και ο TNFR1 ή p55. Τα συνδεδεμένα μόρια (ligands), που ενεργοποιούν αυτούς τους υποδοχείς είναι δομικά συγγενικά μόρια που ανήκουν στην υπεροικογένεια γονιδίων του TNF. Το μόριο CD95L συνδέεται με τον υποδοχέα CD95, ο TNF και η λεμφοτοξίνη α συνδέονται με τον υποδοχέα TNFR1 (Ashkenazi and Dixit, 1998 Schultz and Harrington Jr., 2003).

Ο υποδοχέας CD95 (Fas) και το μόριο CD95L (FasL), παίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως σε τρεις τύπους φυσιολογικής απόπτωσης. Ο πρώτος είναι η περιφερειακή εξάλειψη ενεργοποιημένων ώριμων T κυττάρων στο τέλος μιας ανοσολογικής αντίδρασης. Ο δεύτερος, η θανάτωση κυττάρων-στόχων όπως κύτταρα μολυσμένα

από ιό ή καρκινικά κύτταρα από κυτταροτοξικά T κύτταρα και από φυσικά φονικά κύτταρα (NKC), γεγονός που συμβαίνει γιατί τόσο τα T κύτταρα όσο και τα NKC εκφράζουν το μόριο FasL (CD95L). Ο τρίτος τύπος απόπτωσης που σχετίζεται με τον υποδοχέα CD95 και το μόριο CD95L είναι η θανάτωση φλεγμονωδών κυττάρων σε «περιοχές με ανοσολογική ασυλία» (immune privileged sites) όπως το μάτι και οι όρχεις. Τα κύτταρα από αυτούς τους ιστούς προστατεύονται από τα κυτταροτοξικά T κύτταρα με έκφραση του μορίου FasL, το οποίο όπως συμβαίνει μερικώς και σε καρκινικά κύτταρα, συνδέεται με το αντιγόνο-υποδοχέα Fas στα λεμφοκύτταρα επάγοντας σε αυτά απόπτωση. (Ashkenazi and Dixit, 1998). Ο TNF παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και T κύτταρα σαν απάντηση στη προσβολή. Μόλις έλθει σε επαφή με τον υποδοχέα TNFR1, ο TNF ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής όπως τον NF-κB, οδηγώντας στην επαγωγή προφλεγμονωδών και ανοσορυθμιστικών γονιδίων. Σε ορισμένα είδη κυττάρων ο TNF επίσης επάγει απόπτωση μέσω του TNFR1. Σε αντίθεση με το μόριο CD95L (FasL), ωστόσο, ο TNF σπάνια προκαλεί απόπτωση, γεγονός που δείχνει ότι προϋπάρχουν κυτταρικοί παράγοντες που μπορούν να αναστείλουν το αποπτωτικό ερέθισμα που ενεργοποιείται από τον TNF. Η έκφραση αυτών των ανασταλτικών πρωτεϊνών πιθανόν ελέγχεται μέσω των NF-κB (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Κατά την λεγόμενη «εξωγενή αποπτωτική οδό» (extrinsic apoptotic pathway) οι υποδοχείς θανάτου, και ειδικά ο Fas/CD95, μετά από τη σύνδεση με το συνδεδεμένο μόριο (FasL), περιλαμβάνουν μια διατηρημένη κυτταροπλασματική περιοχή, γνωστή ως «περιοχή θανάτου» (DD), που είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση πρωτεϊνών-προσαρμοστών (adapter proteins), όπως η λεγόμενη «περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με την Fas» (FADD) στο σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η πρωτεΐνη FADD περιλαμβάνει μια περιοχή θανάτου (DD) και μια επιπλέον πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης που ονομάζεται «δραστική περιοχή θανάτου» (DED). Η πρωτεΐνη DED της FADD, συνδέεται με συγκεκριμένες κασπάσες που περιλαμβάνουν ομόλογες πρωτεΐνες DED, μέσα στις περιοχές τους, τις κασπάσες-8 και -10. Το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών αυτών (DD, FADD και DED), αναφέρεται ως το «σύμπλεγμα σήματος επαγωγής θανάτου» (DISC). Το γενικό αποτέλεσμα μετά από τη στρατολόγηση στο DISC είναι η καταλυτική διαδικασία, με αυτοδιάσπαση, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 η οποία απελευθερώνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπου μπορεί να διασπάσει και να ενεργοποιήσει άλλες προκασπάσες που δρουν μεταγενέστερα (downstream caspases). Ένας αναστολέας αυτής της οδού, ορίζεται ως «η κυτταρική ανασταλτική πρωτεΐνη του μετατρεπόμενου ενζύμου από την ιντερλευκίνη-1-συνδεδεμένο με τον Fas μέσω της περιοχής DD» (c-FLIP) και είναι ένα ενζυμικά ανενεργό ομόλογο της κασπάσης-8. Υπάρχει επίσης και FLIP ιών (v-FLIP), πρωτεΐνη που έχει ομολογία με την c-FLIP των θηλαστικών, και είναι επίσης ικανή να ρυθμίσει τις αποπτωτικές βιοχημικές οδούς που ξεκινούν από τους υποδοχείς θανάτου που περιλαμβάνουν την κασπάση-8. Ο υποδοχέας Fas/CD95, εκτός από το σημαντικό του ρόλο για το βιοχημικό σήμα της απόπτωσης, είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα μεταγραφής NF-κB, ο οποίος προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση προωθώντας την έκφραση παραγόντων επιβίωσης, όπως μέλη των «αναστολέων αποπτωτικών πρωτεϊνών» (IAP) (σχήμα 1.6) (Ashkenazi and Dixit, 1998, Bratton et al., 2000, Andrikoula and Tsatsoulis, 2001, Schultz and Harrington Jr., 2003).

Σύμφωνα με την λεγόμενη «ενδογενή αποπτωτική οδό» (intrinsic apoptotic pathway) μετά την έκθεση σε ποικίλα προαποπτωτικά ερεθίσματα όπως χημειοθεραπευτικά φάρμακα, ακτινοβολία και απομάκρυνση αυξητικών παραγόντων, διάφορες πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις κασπάσες απελευθερώνονται στο

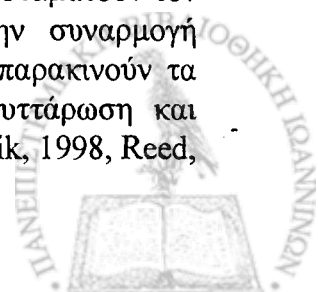


κυτταρόπλασμα από τα μιτοχόνδρια, όπως το κυτόχρωμα c (cyto c), που φυσιολογικά είναι απομονωμένο ανάμεσα στην εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη των οργανιδίων αυτών. Το κυτταροπλασματικό cyto c σχηματίζει ένα απαραίτητο μέρος από το λεγόμενο «αποπτώσωμα» (apoptosome), το οποίο εκτός από το cyto c, αποτελείται από την πρωτεΐνη που ονομάζεται «παράγοντας-1 που ενεργοποιεί τις αποπτωτικές πρωτεάσες» (Araf-1) και την προκασπάση-9. Το αποτέλεσμα του σχηματισμού του «αποπτωσώματος» είναι η δραστηριοποίηση της κασπάσης-9, με αλλαγή στη διάρθρωση του μορίου της, η οποία μετά επεξεργάζεται και δραστηριοποιεί άλλες κασπάσες, όπως την κασπάση-3 μέσα στο σύμπλεγμα του «αποπτωσώματος» για να ενεργοποιήσει τη βιοχημική εκτέλεση των κυττάρων (σχήμα I.6). Επίσης, η απελευθέρωση του cyto c μπορεί μερικές φορές να συνεισφέρει στην απόπτωση δια μέσου του Fas ενισχύοντας τις επιδράσεις της κασπάσης-8 στην ενεργοποίηση των μεταγενέστερων κασπασών (Green and Reed, 1998, Reed, 1999, Bratton et al., 2000). Άλλος ένας παράγοντας, που αναγνωριστικέ πρόσφατα, ο οποίος απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, είναι ο «δεύτερος ενεργοποιητής κασπασών που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια» (Smac/DIABLO), μια πρωτεΐνη που εξαφανίζει την ανασταλτική επίδραση των IAPs και εμπλέκεται με την προστατευτική επίδραση των αναστολέων αυτών, ενάντια στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την υπερϊώδη ακτινοβολία (σχήμα I.6) (Schultz and Harrington Jr., 2003).

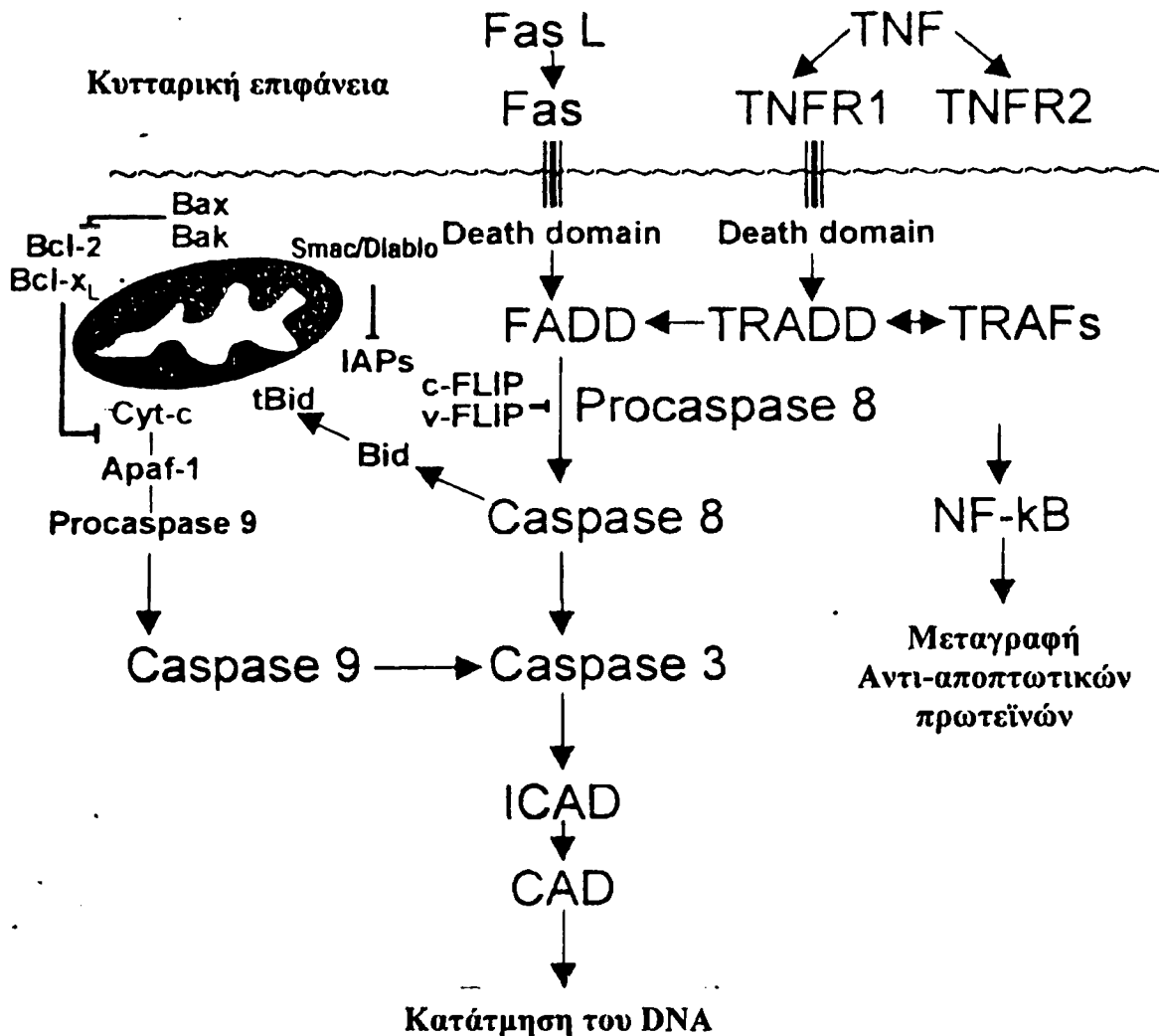
1.6 Κασπάσες, ενεργοποιητές της απόπτωσης

Το κεντρικό μέρος του ειδικού μηχανισμού που χρειάζεται στην απόπτωση, είναι ένα πρωτεολυτικό σύστημα που περιλαμβάνει μια οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης που ονομάζονται κασπάσες (caspases). Αυτά τα ένζυμα παίρνουν μέρος σε ένα βιοχημικό καταρράκτη ο οποίος ενεργοποιείται σε απάντηση προαποπτωτικών σημάτων και κορυφώνεται στη διάσπαση μιας ομάδας πρωτεϊνών, που έχει σαν αποτέλεσμα τη καταστροφή του κυττάρου. Οι κασπάσες που δρουν στην καταστροφή του κυττάρου ονομάζονται «δραστικές» (effector caspases), όπως η κασπάση-3 και αυτές που δρουν στην έναρξη αυτής της καταστροφής προς απάντηση σε αποπτωτικά σήματα, ονομάζονται «πρόδρομες» (initiator caspases), όπως οι κασπάσες-8 και-9. (Nunēz et al., 1998, Thornberry and Lazebnik, 1998, Shi, 2002).

Αυτές οι πρωτεΐνες υπάρχουν ως ανενεργά προένζυμα ή ζυμογόνα, και η ενεργοποίησή τους γίνεται είτε με έκθεση του ανενεργού ενζύμου (προκασπάση) στο μόριο μιας άλλης κασπάσης ενεργοποιημένης από πριν (κασπάση-3), είτε με στρατολόγηση και συνάθροιση προκασπασών, μετά από σύνδεση μορίου (FasL) στους «υποδοχείς θανάτου» όπως ο Fas (προκασπάση-8), είτε με τον σχηματισμό του «αποπτωσώματος» (προκασπάση-9) (Hengartner, 2000, Shi, 2002). Η μη αναστρέψιμη διάσπαση συγκεκριμένων πρωτεϊνών υποστρωμάτων σε κύτταρα από μεταγενέστερες, δραστικές κασπάσες, είναι ό,τι άμεσα ή έμμεσα εξηγεί τις βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που αναγνωρίζονται ως απόπτωση. Οι κασπάσες παίρνουν μέρος στην απόπτωση με ένα τρόπο που θυμίζει μια καλοσχεδιασμένη και εκτελεσμένη στρατιωτική επιχείρηση. Διακόπτουν τις επαφές με τα περιβάλλοντα κύτταρα, αποδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό, σταματούν τον αναδιπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA, διακόπτουν την συναρμογή (splicing), καταστρέφουν το DNA, διασπών τη δομή του πυρήνα, παρακινούν τα κύτταρα να επιδεικνύουν σήματα που το ξεχωρίζουν για φαγοκυττάρωση και διασπών το κύτταρο σε αποπτωτικά σωμάτια (Thornberry and Lazebnik, 1998, Reed, 1999).



ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ



Σχήμα 1.6 ΟΙ ΔΥΟ ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΟΔΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.

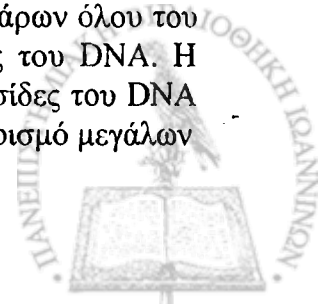
Η **ΕΞΩΓΕΝΗΣ** (με τους υποδοχείς Fas και άλλα μέλη της υπεροικογένειας του TNFR και των συνδεδεμένων μορίων) και η **ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ** (σχετιζόμενη με τα μιτοχόνδρια) βιοχημική οδός. Και οι δύο οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, προκαλώντας τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Μόνο λίγα παραδείγματα πρωτεϊνών που επηρεάζουν άμεσα τον κυτταρικό θάνατο και συνεπώς την τμηματοποίηση του DNA φαίνονται σε αυτό το απλοποιημένο διάγραμμα (FasL: Fas-Ligand-συνδεδεμένο μόριο για τον Fas, TNF: Tumor Necrosis Factor-παράγοντας νέκρωσης των όγκων, Fas: CD95 death receptor-υποδοχέας θανάτου, ίδιος με τον CD95, TNFR1, TNFR2: TNF receptors υποδοχείς θανάτου του TNF, Death domain: περιοχή θανάτου σημαντική για το σήμα της απόπτωσης, FADD: Fas-associated death domain-περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με την Fas, TRADD: TNF receptor-1-associated death domain protein- περιοχή θανάτου συνδεδεμένη με τον υποδοχέα-1 του TNF, TRAF: TNF receptor-associated factor-συνδεδεμένος παράγοντας με τον υποδοχέα του TNF, c-FLIP: Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme inhibitory protein- κυτταρική ανασταλτική πρωτεΐνη του μετατρεπτικού ενζύμου της ιντερλευκίνης-1-συνδεδεμένη με τον Fas μέσω της περιοχής DD, v-FLIP: viral FLIP- FLIP ών, Bcl-2, Bcl-x_L: αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της υπεροικογένειας του Bcl-2, Bax, Bak, Bid: προαποπτωτικές πρωτεΐνες, μέλη της υπεροικογένειας του Bcl-2, Cyt-c: cytochrome-c-κυττόχρωμα c, Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1-παράγοντας-1 που δραστηριοποιεί τις αποπτωτικές πρωτεάσες, Procaspase: προκασπάση Caspase: κασπάση, Smac/Diablo: Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct inhibitor of apoptotic protein binding protein with low isotonic point-δεύτερος ενεργοποιητής κασπασών που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια/άμεσος αναστολέας της πρωτεΐνης χαμηλού ισοτονικού σημείου, που συνδέεται με την αποπτωτική πρωτεΐνη IAPs: inhibitors of apoptotic proteins-αναστολείς αποπτωτικών πρωτεϊνών, NF-κB: Nuclear factor-κB-πυρηνικός παράγοντας-κB, CAD: Caspase-activated deoxyribonuclease-δεσοξυριβονουκλεάση που ενεργοποιείται από κασπάσες, ICAD: ICAD inhibitor-αναστολέας της CAD (Schultz and Harrington Jr., 2003).

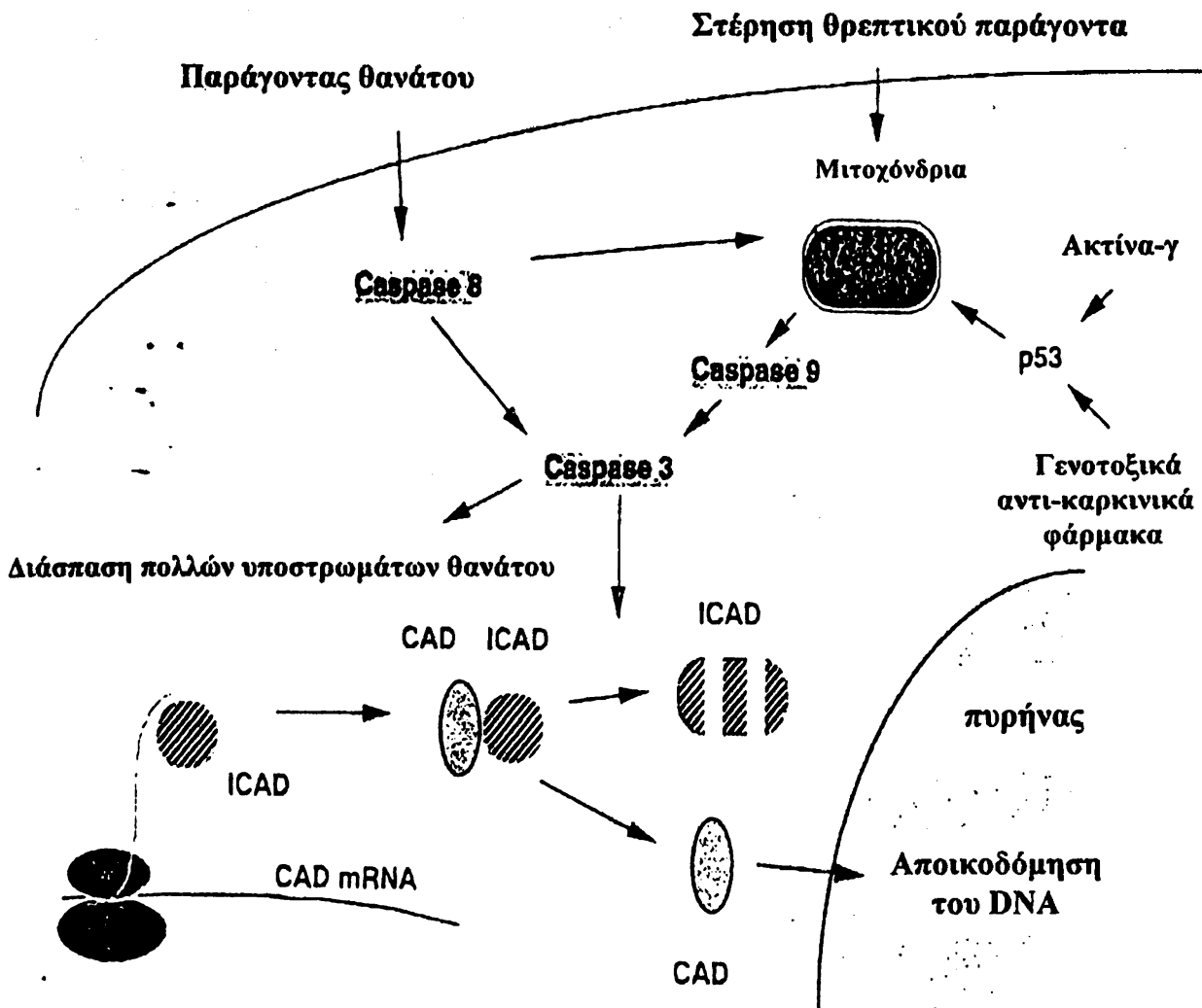
1.7 Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης

Η διάσπαση συγκεκριμένων υποστρωμάτων μέσω των κασπασών εξηγεί διάφορα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της απόπτωσης. Έτσι, η διάσπαση των λαμίνων του πυρηνικού ελάσματος χρειάζεται για την πυρηνική συρρίκνωση και επίσης η απώλεια του ολικού σχήματος του κυττάρου προκαλείται πιθανόν από τη διάσπαση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών όπως η ακτίνη, καθώς και ενός αριθμού πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από την ακτίνη, που περιλαμβάνει την α-φοδρίνη, αII και βII-σπεκτρίνη και την γελσολίνη (gelsolin) (Hockenbery, 1995, Nuñez et al., 1998, Hengartner, 2000). Επίσης η κατάτμηση του κυττάρου σε αποπτωτικά σώματα (apoptotic bodies), πιθανόν οφείλεται στη διευθέτηση του πλέγματος των μικροϊνιδίων και λόγω της διάσπασης των μικροσωληνίσκων του κυττάρου. Επιπλέον κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο αποκολλάται από τα γειτονικά κύτταρα και η μεμβράνη χάνει ειδικά δομικά χαρακτηριστικά όπως οι μικρολάχνες. Τα αποπτωτικά κύτταρα επιδεικνύουν δείκτες (markers) στην κυτταρική επιφάνεια, που εξασφαλίζουν την άμεση αναγνώριση και απομάκρυνση από φαγοκύτταρα, γεγονός το οποίο οδηγεί στην αποφυγή της διαρροής κυτταρικών συστατικών τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν φλεγμονή και κυτταρική βλάβη. Φαγοκυτταρικοί υποδοχείς μπορεί επίσης να αναγνωρίζουν αποπτωτικά κύτταρα από μια αλλαγή στη σύσταση των λιπιδίων της εξωτερικής πλασματικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα η ανιονική φωσφατιδιλοσερίνη μετατοπίζεται από την εσωτερική στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και εκτίθεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Hale et al., 1996, Schultz and Harrington Jr., 2003).

Ο σχηματισμός ευδιάκριτων τμημάτων DNA, είναι ένα βιοχημικό γνώρισμα της απόπτωσης σε πολλά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το DNA διασπάται μεταξύ των νουκλεοσωμάτων έχοντας σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό τμημάτων, παράγωγων 180-200 ζευγών βάσεων (base pairs), με μορφή «κλίμακας» (ladder). Θεωρείται ευρέως ότι η διάσπαση του DNA, ως χαρακτηριστικού της απόπτωσης, είναι το αποτέλεσμα μιας ενδογενούς ουδέτερης δραστηριότητας ενδονουκλεασών όπως η ενδονουκλεάση DNAση I (DNase I) η οποία βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη περιπυρηνική περιοχή του συστήματος Golgi και εισάγεται στον πυρήνα, μετά η διαλυτοποίηση (solubilisation) του πυρηνικού ελάσματος που οδηγεί στη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου (Wyllie et al., 1984, Hale et al., 1996). Μια άλλη ενδονουκλεάση η «δεσοξυριβοζονουκλεάση (DNAση), που ενεργοποιείται από κασπάσες» (CAD), είναι μια DNAση, 343 αμινοξέων, με πολύ συγκεκριμένη δραστηριότητα, ανάλογη ή και πιο έντονη από αυτή της DNAσης I. Η CAD περιλαμβάνει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear-localization signal) στο καρβοξυτελικό άκρο και υπάρχει στα ζωντανά κύτταρα σαν ένα ανενεργό σύμπλεγμα με τον λεγόμενο «αναστολέα της CAD» (ICAD). Οι κασπάσες που ενεργοποιούνται από αποπτωτικά σήματα και ειδικά η κασπάση-3, διασπούν τον ICAD στη θέση 117 ασπαραγινικού οξέως (Asp 117) για να απελευθερώσει την CAD η οποία εισέρχεται στον πυρήνα για την ενδονουκλεοσωμική διάσπαση του DNA (σχήμα 1.7) (Enari et al., 1998, Sakahira, Enari and Nagata, 1998, Nagata, 2000).

Ενδοκυττάρια πρωτεΐνες είναι πιθανόν να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη έναρξη της απόπτωσης. Μία από αυτές είναι η πολύ ADP-ριβουσυλ-πολυμεράση (PARP), ένα ένζυμο που βρίσκεται σε αφθονία στον πυρήνα των κυττάρων όλου του σώματος, και συμβάλλει σε διαδικασίες ρύθμισης και επιδιόρθωσης του DNA. Η PARP σε μη αποπτωτικά κύτταρα ενεργοποιείται επιλεκτικά από αλυσίδες του DNA που έχουν υποστεί θραύση και καταλύει την μεταφορά και τον πολυμερισμό μεγάλων





Σχήμα 1.7 ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕΣΩ ΤΗΣ CAD. Όταν η CAD συντίθεται, ο ICAD βοηθάει στην σωστή και παραγωγική της πτύχωση (folding). Έτσι η CAD υπάρχει σαν ένα ανενεργές ένζυμο μαζί με τον ICAD στα αναπτυσσόμενα κύτταρα. Διάφορα αποπτωτικά σήματα όπως οι παράγοντες θανάτου η στέρση θρεπτικών παραγόντων, ή διάφοροι γενοτοξικοί παράγοντες δραστηριοποιούν τον βιοχημικό καταρράκτη των κασπασών. Η κασπάση-3 στα μεταγενέστερα στάδια του καταρράκτη διασπά τον ICAD σε δύο θέσεις, απενεργοποιεί την ανασταλτική του δραστηριότητα στην CAD και έτσι αυτή απελευθερωμένη από τον ICAD διασπά το χρωμοσωμικό DNA (Nagata, 2000).

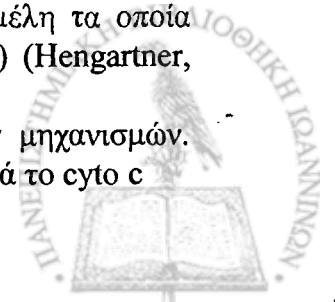
διακλαδιζόμενων αλυσίδων πολύ-ADP-ριβόζης από το υπόστρωμα της, το νικοτινάμινο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NAD), σε μια ποικιλία πυρηνικών πρωτεϊνών όπως είναι οι ιστόνες, οι DNA τοποϊσομεράσες I και II και η ίδια η PARP. Τα πολυμερή της ADP-ριβόζης συνδέονται με τις πυρηνικές πρωτεΐνες οδηγώντας στην αναστολή των πρωτεϊνών αυτών αποσυνδέοντας τες από το DNA. Η πολύ-ADP-ριβοζυλίωση των ιστόνων, για παράδειγμα, αποσυνθερώνει τη δομή της χρωματίνης, ενώ η μεταγενέστερη αποικοδόμηση του πολυμερούς αυτού, επαναφέρει τη χρωματίνη στην συσπειρωμένη της μορφή. Η χαλάρωση της χρωματίνης μπορεί να διευκολύνει τους ρυθμιστικούς και επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA σε σημεία βλάβης και επίσης στις αρχές των σημείων έναρξης του αναδιπλασιασμού και της μεταγραφής. Ακόμα εκτιμάται ότι η PARP βοηθάει στο να διατηρηθεί η ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων προστατεύοντας το DNA που έχει υποστεί θραύση, από ακατάλληλο ομόλογο ανασυνδυασμό. Η σύνδεση της PARP στα άκρα του DNA μπορεί να εμποδίζει την σύνδεσή τους με τον μηχανισμό του γενετικού ανασυνδυασμού, και η αρνητικά φορτισμένη πολύ-ADP-ριβόζη μπορεί να απωθεί ηλεκτροστατικά άλλα μόρια του DNA. Η αυτό-πολύ-ADP-ριβοζυλίωση απενεργοποιεί την PARP μέσω ηλεκτροστατικής απόθησης μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ADP-ριβόζο-πολυμερών που συνδέονται με τα ένζυμα, και το DNA. Έτσι, η απελευθέρωση της PARP από το DNA επιτρέπει την πρόσβαση των ενζύμων που επιδιορθώνουν το DNA στην βλάβη (σχήμα 1.8) (Patel, Gores and Kaufmann, 1996, Pieper et al., 1999).

Η διάσπαση της PARP, από τη κασπάση-3, από την άθικτη μορφή των 116 kDa στα τμήματα κατάτμησης των 85 kDa και 25 kDa, είναι ένα χαρακτηριστικό που προσδιορίζει την απόπτωση και μπορεί να εξηγηθεί με δύο υποθέσεις. Πρώτον επειδή η θραύση των αλυσίδων του DNA γίνεται αισθητή από την PARP, η πρώτη διάσπαση της ίδιας της PARP μπορεί να χρειάζεται για να αποτραπούν οι προσπάθειες για την επιδιόρθωση σε ένα κύτταρο που προορίζεται για εξάλειψη και δεύτερον, με δεδομένη την παρατήρηση ότι συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες αναστέλλονται από την ADP-ριβόζυλοποίηση, είναι πιθανόν ότι η διάσπαση της PARP είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτραπεί η απορυβοζυλίωση και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Patel, Gores and Kaufmann, 1996 and Pieper et al., 1999).

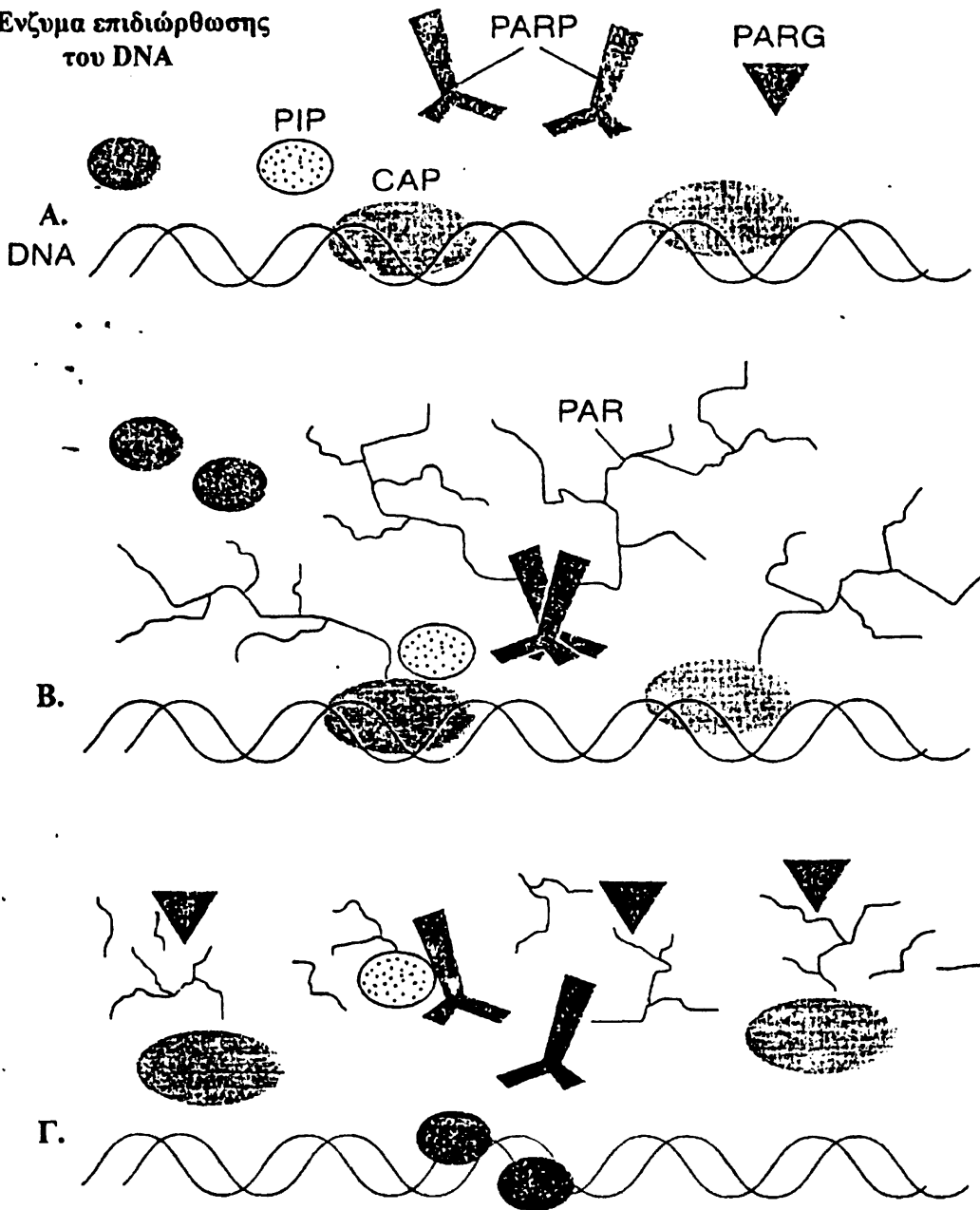
1.8 Απόπτωση και αντιαποπτωτικό γονίδιο Bcl-2

Η πρωτεΐνη Bcl-2 και οι σχετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι οι βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης. Εκείνες οι πρωτεΐνες που είναι παρόμοιες με την Bcl-2 προάγουν την επιβίωση του κυττάρου (Bcl-2, Bcl-x_L) ενώ οι πιο μακρινοί συγγενείς της πρωτεΐνης αυτής αντίθετα προάγουν την απόπτωση (Bax, Bak, Bik, Bid). Οπότε, για πολλά, αλλά όχι για όλα τα αποπτωτικά σήματα, η ισορροπία μεταξύ αυτών των συναγωνιζόμενων δραστηριοτήτων καθορίζει τη μοίρα των κυττάρων (πίνακας 1.1) (Adams and Cory, 1998, Schultz and Harrington Jr., 2003). Το γονίδιο bcl-2 εντοπίστηκε για πρώτη φορά θεωρούμενο ως ένα ογκογονίδιο που βρίσκεται κοντά στο σημείο θραύσεως των μετατοπίσεων t(14:18) (q32;q21) και εμπλέκεται στο ανθρώπινο λέμφωμα των B-λεμφοκυττάρων (B-cell lymphoma; bcl). (Hale et al., 1996). Η υπεροικογένεια του Bcl-2 αποτελείται από πάνω από 12 μέλη τα οποία ταξινομούνται σε τρεις λειτουργικές ομάδες I, II και III (σχήμα 1.9) (Hengartner, 2000).

Τα μέλη της υπεροικογένειας Bcl-2 δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ένας από αυτούς είναι ο σχηματισμός πόρων μέσω των οποίων διαπερνά το cyto c

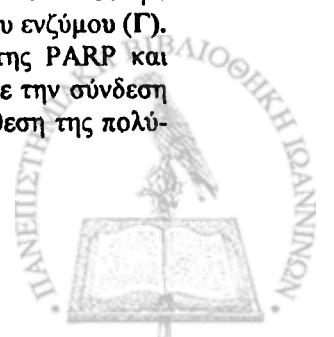


Ενζυμα επιδιόρθωσης
του DNA



Σχήμα 1.8 Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥ-ADP-ΡΙΒΟΖΗΣ ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΤΑ ΣΗΜΕΙΑ ΣΧΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΟΥ.

Η PARP (με τη μορφή δομής βλαστού στο διάγραμμα) συνδέεται με τις διακοπές της αλυσίδας του DNA με πολύ υψηλή χημική συγγένεια μέσω της πρωτεϊνικής περιοχής σύνδεσης στο DNA (Α). Αφού συνδεθεί, η καταλυτική πρωτεϊνική περιοχή παράγει μακριές, διακλαδιζόμενες αλυσίδες πολύ-ADP-ριβόζης (PAR) στη περιοχή αυτομεταβολής και σε άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τη χρωματίνη (CAP, γκρι οβάλ σχήματα) (Β). Η απελευθέρωση της αυτόμεταβαλλόμενης PARP και των άλλων πολύ ADP-ριβόζυλιωμένων πρωτεϊνών από το DNA διευκολύνει την σύνδεση και τη δράση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης (μαύροι κύκλοι). Οι αλυσίδες πολύ-ADP-ριβόζης διασπώνται ταχέως από την πολύ-ADP-ριβόζο-γλυκουδρολάση (PARG, μαύρα τρίγωνα), τη φωσφωδιεστεράση, και την ADP-ριβοζυλική πρωτεΐνη λύαση. Διάφορες πρωτεΐνες (PIP) που αλληλεπιδρούν με την PARP οι οποίες παίρνουν μέρος στην επιδιόρθωση του DNA μπορούν φυσιολογικά να συνδεθούν με την PARP, πράγμα που μπορεί να εκπροσωπεί άλλη μια ρυθμιστική δραστηριότητα του ενζύμου (Γ). Ο ρόλος της πολύ-ADP-ριβοζυλίωσης στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της PARP και άλλων πρωτεϊνών παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι αναστολείς της PARP δεν σταματάνε την σύνδεση της PARP με το κομμένο DNA ή με τις άλλες πρωτεΐνες αλλά αποτρέπουν την σύνθεση της πολύ-ADP-ριβόζης (Pieper et al., 1999).



Πίνακας I.1: Η οικογένεια της Bcl-2 των θηλαστικών ως αναστολείς ή Προωθητές της απόπτωσης (Schultz and Harrington Jr, 2003)

Πρωτεΐνη	Δράση στην Απόπτωση	Περιοχές ομολογίας (BH) της Bcl-2	Διαμεμβρανική προσκόλληση
Bcl-2 Bcl-XL Mcl-1	Αναστολή	BH1, BH2, BH3, BH4	(+)
A1 Bcl-w	Αναστολή	BH1, BH2, BH3, BH4 Αδύναμη ομολογία με το Bcl-2 στην περιοχή BH4	(+)
Bax Bak Bok	Προώθηση	BH1, BH2, BH3, BH4(?)	(+)
Bcl-XS	Προώθηση	BH3, BH4	(+)
BiK Hrk Bim Blk Bad Bid	Προώθηση	BH3 BH3	(+) (-) Επιδεικνύουν διαχυτική κυτταροπλασματική διανομή

Συντμήσεις: **Bad**, συνδεδεμένη πρωτεΐνη α με το θυλακοειδές λέμφωμα-2 των Β-κυττάρων (B-cell follicular lymphoma-2-associated protein α), **Bax**, συνδεδεμένη πρωτεΐνη X με το θυλακοειδές λέμφωμα-2 των Β-κυττάρων (B-cell follicular lymphoma-2-associated protein X), **Bcl**, θυλακοειδές λέμφωμα των Β-κυττάρων (B-cell follicular lymphoma), **BH**, ομολογία θυλακοειδούς λεμφώματος των Β-κυττάρων (B-cell follicular lymphoma homology).



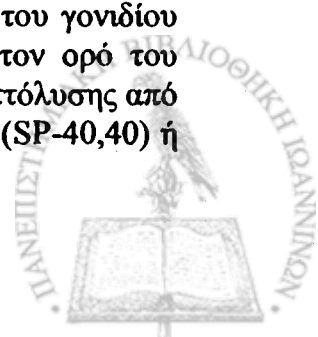
και άλλες πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου. Επίσης σχηματίζουν ετεροδιμερή μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μελών, γεγονός που επιτυγχάνεται όταν μια BH3 περιοχή ενός μορίου προσδένεται σε μία υδρόφοβη θέση (rocket) που σχηματίζεται από τις περιοχές BH1, BH2 και BH4 ενός άλλου μέλους. Ακόμα ασκούν άμεση ρύθμιση των κασπασών μέσω ενός προσαρμοστικού μορίου (adapter). Επίσης αλληλεπιδρούν με άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, είτε για το σχηματισμό ενός πόρου για την έξοδο του cyto c ή για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και τέλος με τον ολιγομερισμό τους σχηματίζουν ένα ασθενώς επλεκτικό δίκτυο ιόντων (σχήμα I.9). (Hengartner, 2000).

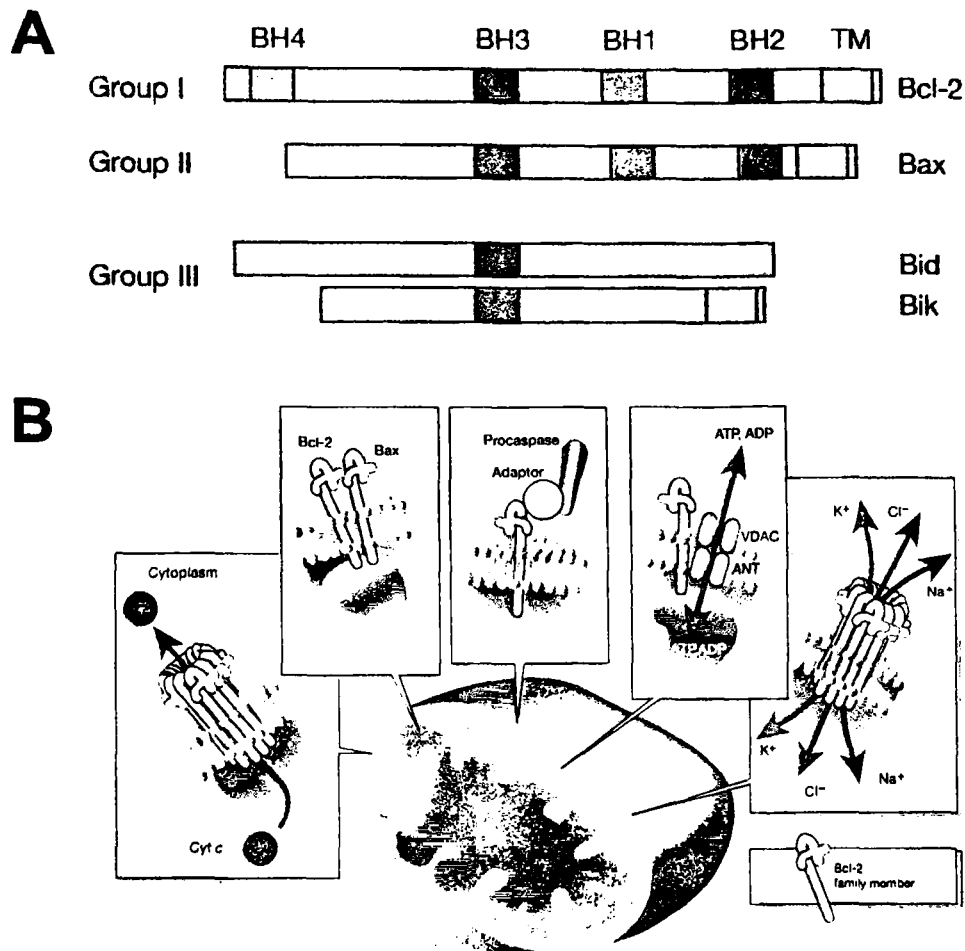
Τα μέλη αυτής της οικογένειας, όπως προαναφέρθηκε, είτε αναστέλλουν είτε προωθούν τον κυτταρικό θάνατο. Έχει βρεθεί ότι η Bcl-2 σταματάει το φαινόμενο της απόπτωσης αναστέλλοντας βασικά της γνωρίσματα όπως την ενδονουκλεολυτική διάσπαση του DNA ελέγχοντας την μετάβαση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και η υπερέκφρασή της σταματάει την απελευθέρωση του cyto-c, δραστηριότητα η οποία σταματάει την μιτοχονδριακή αποπτωτική οδό (σχήμα I.6). Η ισορροπία ανάμεσα στα προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας της Bcl-2 που εκφράζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πιθανόν καθορίζει αν ο προγραμματισμένος κυτταρικός ξεκινάει ή αν το κύτταρο θα επιβιώσει. Η Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από διάφορες κυτταροτοξικές προσβολές (πίνακας I.2) (Schultz and Harrington Jr., 2003, Reed, 1994, Adams and Cory, 1998). Σε μερικά είδη κυττάρων, ωστόσο η απόπτωση από τους υποδοχείς θανάτου, δεν σταματάει από την υπερέκφραση της Bcl-2 (Reed, 1999).

Δύο μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργούμενα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT (βλ. μεθόδους), εξετάζουν τη σχέση της απόπτωσης με την πρωτεΐνη Bcl-2. Στη πρώτη φάνηκε ότι η επαγωγή απόπτωσης λόγω του αποκλεισμού του «νευρικού αυξητικού παράγοντα» (NGF), από τον αλκαλοειδή παράγοντα K252 και το αντι-NGF αντίσωμα, συνδέεται με τη μειорύθμιση της Bcl-2 και ότι τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το γονίδιο bcl-2 ήταν ανθεκτικά στην απόπτωση, πράγμα που δείχνει ότι η επαγωγή απόπτωσης από την αναστολή της δραστηριότητας του NGF, είναι εξαρτημένη από την Bcl-2 (Pincelli et al., 1997). Η δεύτερη, πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η απόπτωση που επάγεται από το ενδοκυτταρικό κεραμίδιο C₂ του TNF και της 1 άλφα, 25-διυδροξυβιταμίνης D(3), συμβαίνει σε ένα κυτταρικό κλώνο διαμολυσμένο με το βέκτορα, αλλά όχι σε κλώνο των κυττάρων που διαμολύνθηκε με το bcl-2, έτσι ώστε να εκφράζει σταθερά την Bcl-2 (Muller-Wieprecht et al., 2000).

1.9 Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ): Ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο

Η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (clusterin/ApoJ), αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο υγρό των όρχεων του κριαριού το 1983 σαν μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ενίσχυε την συνάθροιση των κυττάρων *in vitro*, γεγονός λόγω του οποίου ονομάστηκε και κλαστρίνη (clustering=συνάθροιση). Από τότε, πολλά ομόλογα είδη καθαρίστηκαν και τα αντίστοιχα γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο, ένα καινούριο όνομα δίνονταν για αυτή την πρωτεΐνη ή το γονίδιο βασισμένο στην πηγή του γενετικού καθαρισμού ή της κλωνοποίησης του γονιδίου (πίνακας I.3). Στους ανθρώπους, καθαρίστηκε για πρώτη φορά από τον ορό του αίματος και το κλωνοποιημένο γονίδιο ονομάστηκε «αναστολέας της κυττόλυσης από τον μηχανισμό συμπληρώματος» (CLI), «εκκρινόμενη πρωτεΐνη 40,40» (SP-40,40) ή «απολιποπρωτεΐνη J» (ApoJ) λόγω των ομοιοτήτων με άλλες γνωστές





Σχήμα 1.9 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ Bcl-2 (A) Οι τρεις λειτουργικές ομάδες I, II και III των μελών της οικογένειας της Bcl-2. Τα μέλη της ομάδας I έχουν αντι-αποπτωτικές ιδιότητες και χαρακτηρίζονται από 4 μικρές διατηρημένες Bcl-2 ομόλογες (BH) περιοχές (BH1–BH4) και ένα υδρόφοβο C-τελικό άκρο (TM). Σε αντίθεση, η ομάδα II περιλαμβάνει μέλη της υπερικογένειας Bcl-2 με προ-αποπτωτικές ιδιότητες που έχουν σχεδόν ίδια δομή με τα μέλη της ομάδας I εκτός από την αμινο-τελική BH4 περιοχή. Η ομάδα III αποτελείται από μία μεγάλη συλλογή διαφορετικών προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία της BH3. Μέλη της ομάδας αυτής είναι οι Bid και Bik. **(B)** Οι μηχανισμοί δράσης των μελών της υπερικογένειας Bcl-2 στη εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Από αριστερά προ τα δεξιά διακρίνονται ο σχηματισμός πόρων μέσω των οποίων διαπερνά το κυτόχρωμα c (Cyt c) και άλλες πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου, ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μελών (Bax και Bcl-2 αντίστοιχα), η άμεση ρύθμιση των κασπασών μέσω ενός προσαρμοστικού μορίου (adaptor), η αλληλεπίδραση με άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως η VDAC και ο μεταφορέας των νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (ANT), είτε για το σχηματισμό ενός πόρου για την έξοδο του Cyt c ή για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και τέλος ο ολιγομερισμός τους με τον οποίο σχηματίζουν ένα ασθενώς επιλεκτικό διάλυο ιόντων (Na^+ , K^+ και Cl^-). (Hengartner, 2000).

Πίνακας I.2: Η Bcl-2 και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ζωής-θανάτου (Reed, 1994)

Αίτια κυτταρικού θανάτου που έχει αναφερθεί ότι αναστέλλονται από την Bcl-2

Χημειοθεραπευτικά φάρμακα	Το γλουταμινικό άλας
Η γ- και η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία	Το ασβέστιο
Το θερμικό σοκ	Η στέρηση γλυκόζης
Μερικοί ιοί (βάκιλος, sindbiis)	Η στέρηση αυξητικού παράγοντα
Ελεύθερες ρίζες	Η απόσυρση νευροτροφικού παράγοντα
Η υπεροξειδίωση των λιπιδίων	Ο Παράγοντας Μεταβολής Ανάπτυξης-β (TGF-β)
Το p53	Το αζίδιο
Το c-Myc	
Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF)	
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	

Αίτια κυτταρικού θανάτου που έχει αναφερθεί ότι δεν αναστέλλονται από την Bcl-2

Η λύση μέσω του συμπληρώματος
 Μερικά κυτταρολυτικά T-κύτταρα
 Το αμυλοειδές πεπτίδιο β
 Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF)
 Η απόσυρση κάποιων λεμφοκινών
 Η αντι-Ig και ο Υποδοχέας των T-Κυτταρων (TCR) (θετική και αρνητική θυμική επιλογή)
 Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)
 Μερικά είδη νευροτροφικών νευρώνων που εξαρτώνται από παράγοντες

Σημ. Κάποιοι απαγωγείς κυτταρικού θανάτου εμφανίζονται και στις δύο λίστες, δείχνοντας τις αντιθέσεις στην βιβλιογραφία. Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από το συμπλήρωμα, τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα, το αμυλοειδές πεπτίδιο β, τον TNF, και το H₂O₂ συχνά περιλαμβάνουν νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο



Πίνακας 1.3: Ονόματα της ApoJ με βάση την πηγή καθαρισμού και κλωνοποίησης (Trougakos and Gonos, 2002)

Όνομα	Πηγή απομόνωσης	Είδος
T64	Νευροαμφιβληστροειδής	Ορτύκι
SGP-2 (θευκή γλυκοπρωτεΐνη 2)	Όρχεις	Αρουραίος
TRPM-2 (μήνυμα του προστάτη 2 που καταστέλλεται από την τεστοστερόνη)	Προστάτης	Αρουραίος
gp80	Νεφρός	Σκύλος
Κλαστρίνη	Όρχεις	Πρόβατο
Gr-III (γλυκοπρωτεΐνη III)	Μυελός επινεφριδίων	Βόδι
Απολιποπρωτεΐνη J	Ορός, σπερματικό πλάσμα	Άνθρωπος
SP-40, 40 (εκκρινόμενη πρωτεΐνη 40,40)	Ορός, σπερματικό πλάσμα	Άνθρωπος
CLI (αναστολέας λύσης του συμπληρώματος)	Ορός	Άνθρωπος
pADHC-9	Εγκέφαλος	Άνθρωπος
pTB16	Εγκέφαλος	Άνθρωπος
HISL-19 (σεκρετογρανίνη IV)	Εγκέφαλος	Άνθρωπος



απολιποπρωτεΐνες. Μια σύγκριση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης ApoJ μεταξύ των ειδών των θηλαστικών αποκαλύπτει μια διατήρηση υψηλού βαθμού, ~70-85%. Επίσης παρατηρήσεις έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εξελίχθηκε στα θηλαστικά για να φέρει σε πέρας μια λειτουργική αποστολή θεμελιώδους βιολογικής σημασίας η οποία παρέμεινε ακαθόριστη, λόγω διαφορετικών και συνήθως αντιτιθέμενων λειτουργιών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και ιστούς (Tougakovs and Gonos, 2002).

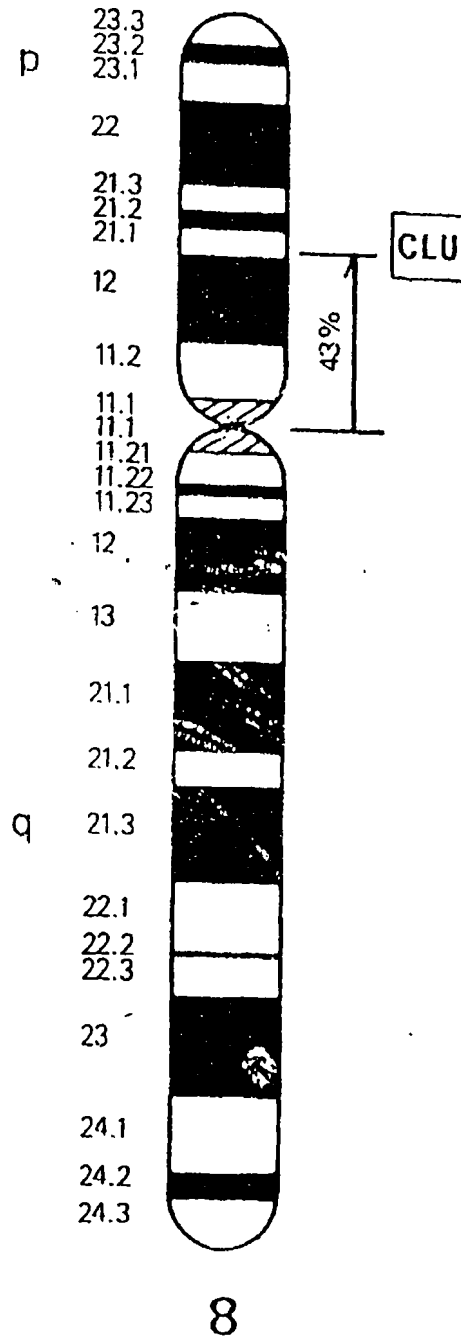
Η πρωτεΐνη ApoJ στους ανθρώπους κωδικοποιείται από ένα mRNA το οποίο μεταγράφεται από ένα αντίγραφο γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 (8p21-p12). Η θέση της κλαστρίνης υπολογίζεται ότι βρίσκεται σε απόσταση 43% από το κεντρομερίδιο στο τελομερίδιο (σχήμα I.10) (Wong et al., 1994). Το πρωτογενές προϊόν της μετάφρασης της ApoJ, είναι ένα πολυπεπίδιο 449 αμινοξέων όπου τα πρώτα 22 αμινοξέα αντιπροσωπεύουν την κλασική αλληλουχία του υδρόφοβου εκκριτικού σήματος. Η ωρίμανση του πρωτογενούς μορίου μετάφρασης περιλαμβάνει πρωτεολυτική διάσπαση σε διαμερίσματα του συστήματος Golgi που έχουν σαν αποτέλεσμα την ώριμη ετεροδιμερή πρωτεΐνη ApoJ που είναι περίπου 70-80 kDa. Η πρωτεολυτική διάσπαση απομακρύνει το πολυπεπίδιο εκκριτικού σήματος των 22 αμινοξέων και διασπά το υπόλοιπο στις α- και β- αλυσίδες. Αυτές συνδέονται αντιπαράλληλα με 5 δισουλφιδικούς δεσμούς κοντά στα κέντρα τους σχηματίζοντας ένα μόριο στο οποίο τρεις αμφολυτικές α-αλυσίδες και δύο α-αλυσίδες περιελιγμένες σε σπείραμα, βρίσκονται αμφίπλευρα από το κέντρο του (σχήμα I.11). Εκτός από την εκκρινόμενη διασπασμένη ώριμη πρωτεΐνη ApoJ, διάφορες άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεϊνικές μορφές έχουν αναφερθεί, και η πρωτεΐνη είναι ουσιαστικά κατανεμημένη σε όλα τα υποκυττάρια διαμερίσματα. Μια μορφή ~60 kDa υψηλή σε μαννόζη που δεν είναι εσωτερικά διασπασμένη έχει αναγνωριστεί στο κυτταρόπλασμα διαφόρων καρκινικών και φυσιολογικά διαιρούμενων ή γερασμένων κυττάρων (Tougakovs and Gonos, 2002, Jones and Jomary, 2002).

Η αυξορύθμιση του mRNA της κλαστρίνης και η αντίστοιχη πρωτεΐνη είναι ευρέως διαδεδομένα φαινόμενα σε καταστάσεις ανάπτυξης και παθοφυσιολογίας, δείχνοντας ότι ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης είναι σημαντικός. Το γονίδιο της ApoJ φαίνεται να ανταποκρίνεται σε μια ποικιλία κυττοκινών, αυξητικών παραγόντων και παραγόντων στρες ή παραγόντων που επάγουν απόπτωση όπως: οι κυττοκίνες, ιντερλευκίνη-1, -2 και -6, οι αυξητικοί παράγοντες, «παράγοντας -β μεταβολής της ανάπτυξης» (TGFβ), «αυξητικός παράγοντας των νεύρων» (NGF), «παράγοντας μεταγραφής θερμικού σοκ-1» (HSF-1), «επιδερμικός αυξητικός παράγοντας» (EGF), «αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων» (PDGF) και ο «β-αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών» (β-FGF). Τέλος οι εξωτερικοί στρεσογόνοι παράγοντες που μπορούν να επιφέρουν αυξορύθμιση του γονιδίου αυτού, περιλαμβάνουν το θερμικό σοκ, την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία A (UV-A), το οξειδωτικό στρες, την ιονίζουσα ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Tougakovs and Gonos, 2002).

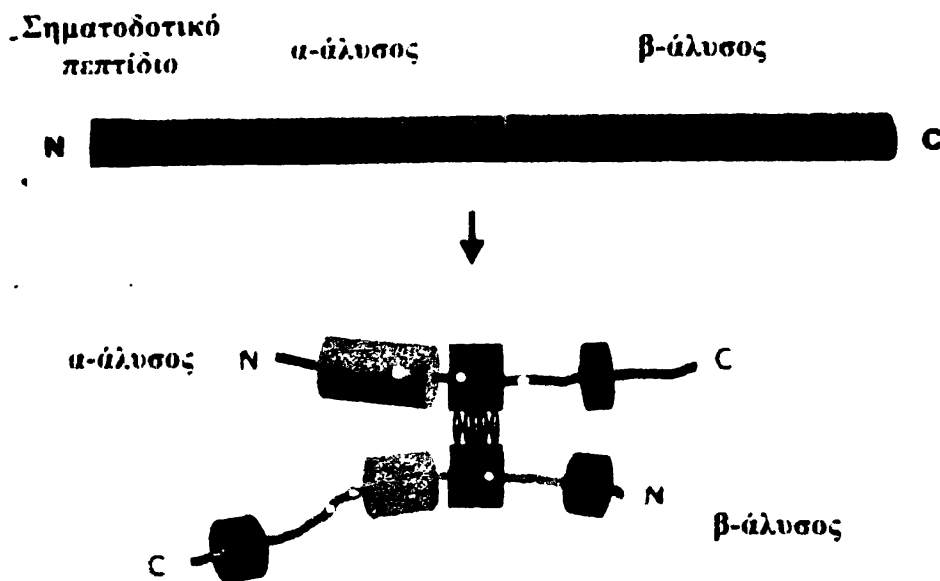
Η πρωτεΐνη ApoJ, έχει εμπλακεί σε πολλές και ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν την μετακίνηση των λιπιδίων, την ωρίμανση του σπέρματος και την αναστολή του συμπληρώματος, την κλασική εκκριτική οδό, την επαναδόμηση των ιστών, την επανακύκλωση των μεμβρανών και τον καθαρισμό κυτταρικών υπολειμμάτων. Έχει ακόμα εμπλακεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και υποστρώματος σαν ένα ισχυρό μόριο κυτταρικής συνάθροισης και πρόσδεσης (Tougakovs and Gonos, 2002).

Η ApoJ εμπλέκεται στην απόπτωση σαν ένα προ- ή αντί- αποπτωτικό μόριο, λόγω αντικρουόμενων δημοσιεύσεων οι περισσότερες από τις οποίες υποστηρίζουν την αντιαποπτωτική της ιδιότητα η οποία φαίνεται είτε από αύξηση της έκφρασης της





Σχήμα Ι.10 ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΛΑΣΤΡΙΝΗΣ Ιδεόγραμμα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 8 που δείχνει την σχετική απόσταση της θέσης (locus) της κλαστρίνης (CLU) μεταξύ του κεντρομεριδίου και του τελομεριδίου του μικρού σκέλους (short arm-p) του χρωμοσώματος 8 (Wong, et al., 1994).



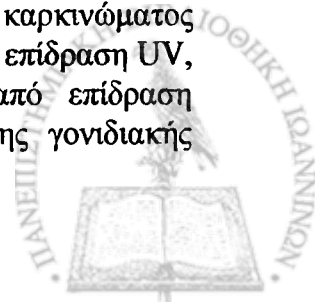
Σχήμα Ι.11.

Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΛΑΣΤΡΙΝΗΣ/ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ J

Το πρόδρομο μόριο (επάνω) διασπάται πρωτεολυτικά για να αφαιρεθεί το 22-μερές εκκρινόμενο σηματοδοτικό πεπτίδιο (δαμασκηνί) και ακόλουθα μεταξύ των κατάλοιπων 227/228 για να δημιουργηθούν οι α-(πορτοκαλί) και β- (ανοιχτό μπλε) αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες συγκροτούνται αντι-παράλληλα για να σχηματίσουν ένα ετεροδιμερές μόριο (κάτω) στο οποίο τα κέντρα κατάλοιπων κυστεΐνης (κόκκινοι κύλινδροι) συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (σκούρες κόκκινες ελλειψοειδείς δομές) και συνορεύουν με δύο εσπειραμένες α-έλικες (πράσινο) και τρεις αμφολυτικές α-έλικες (σκούρο μπλε). Οι θέσεις της N-γλυκοζυλίωσης απεικονίζονται με κίτρινες μικρές κηλίδες (Jones and Jomary, 2002)

στα κύτταρα, είτε από ελάττωση αυτής. Κάποιες μελέτες σε διάφορα είδη κυττάρων αναφέρουν την αύξηση της κλαστρίνης/ApoJ και σε πρωτεϊνικό και σε γονιδιακό επίπεδο, η οποία συμπίπτει με τη επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα αυτά. Αρχικά σε μια μελέτη που έγινε στα κυψελωτά παγκρεατικά κύτταρα AR4-2J, φάνηκε ότι το mRNA της κλαστρίνης επάγεται σε απάντηση προς διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα (κεραμίδιο, σταυροσπορίνη, κυκλοεξιμίδιο, οξειδωτικό στρες). Συνεπώς προκύπτει ότι πιθανόν η πρωτεΐνη αυτή παίζει ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης των κυψελωτών κυττάρων (Calvo et al., 1998). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης, η γονιδιακή έκφραση της κλαστρίνης αυξορρυθμίζεται σε ανταπόκριση προς στο θερμικού σοκ και το οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινα επιδερμικά καρκινικά κύτταρα A431, και επιτυγχάνει με τη μεσολάβησή της, ανθεκτικότητα στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τους παράγοντες αυτούς, παρέχοντας κυτταρική προστασία (Viard et al., 1999). Από τα αποτελέσματα μιας ακόμα έρευνας, φαίνεται για πρώτη φορά ότι η κλαστρίνη εμπλέκεται στην βιοχημική ανταπόκριση όγκου στη φωτοδυναμική δράση κατά τη διάρκεια *in vitro*, και *in vivo* φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT). Συγκεκριμένα, και πάλι στα κύτταρα A431, και σε χημικά επαγόμενα δερματικά θηλώματα σε ποντίκια SENCAR, παρατηρείται αυξορύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της κλαστρίνης η οποία συμβαίνει ταυτόχρονα με την επαγωγή απόπτωσης κατά τη διάρκεια βλάβης από φωτισμό διαμέσου του «φθαλοκυανίου 4» (phthalocyanine 4), που εντοπίζεται μια ώρα μετά τη PDT. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ικανότητα της φωτοδυναμικής δράσης βασίζεται κυρίως στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω έντονων φωτοοξειδωτικών αντιδράσεων, η επαγωγή της κλαστρίνης κατά τη διάρκεια της PDT μπορεί να αποδίδεται τουλάχιστο εν μέρει στο οξειδωτικό στρες που επάγεται στα κύτταρα του όγκου από φωτοευαισθητοποίηση (Kalka et al., 2000). Επίσης μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η επαγόμενη απόπτωση στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων αρουραίων σε καλλιέργεια λόγω στέρησης της τροφής, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση και των επιπέδων πρωτεΐνης και του mRNA της κλαστρίνης (Zwain and Amato, 2000). Σε μια άλλη έρευνα στην οποία έγινε διαμόλυνση με τα ογκογονίδια Ha-ras και c-myc σε αυθορμήτως αθανатоποιημένα κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών αρουραίου (Rat1), μελετήθηκε η έκφραση της κλαστρίνης μετά την επαγωγή απόπτωσης, λόγω απομάκρυνσης αυξητικού παράγοντα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η γονιδιακή έκφραση της κλαστρίνης αυξάνεται στα ζωτικά κύτταρα, όχι λόγω της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων, αλλά από μόρια σήματος που δημιουργούνται από τα αποπτωτικά κύτταρα (Klock et al., 1998). Τέλος, μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, άνθρωποι διπλοειδείς ινοβλάστες εμφανίζουν μια αύξηση στην ApoJ, μετά την έκθεσή τους σε ημιτοξικό στρες από H₂O₂, τερτ-βουτυλικο-υδροπεροξειδίο και αιθανόλη (Dumont et al., 2002).

Αντίθετα υπάρχουν και μελέτες που αναφέρουν ότι η επαγωγή απόπτωσης σε διάφορα κύτταρα, είτε δεν προκαλεί αύξηση, είτε προκαλεί μειορύθμιση της κλαστρίνης/ApoJ. Συγκεκριμένα, σε μια έρευνα στα κύτταρα του θύμου αρουραίου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* φάνηκε ότι η απόπτωση που επάγεται από το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθασόνη στα θυμοκύτταρα, δεν προκαλεί αυξορύθμιση στην έκφραση του mRNA της κλαστρίνης στα κύτταρα αυτά (Park et al., 2003). Σε μια ακόμα μελέτη τονίζεται ότι, τα αποπτωτικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων κυττάρων όπως, κυττάρων ιστιοκυτταρικού λεμφώματος U937, καρκινώματος τραχήλου μήτρας HeLa και επιδερμικού καρκινώματος A431, μετά από επίδραση UV, και κυττάρων ανθρώπινου λεμφοβλαστώματος CEM-C7, μετά από επίδραση δεξαμεθασόνης, σχετίζονται με σαφή ελάττωση ή και απουσία της γονιδιακής



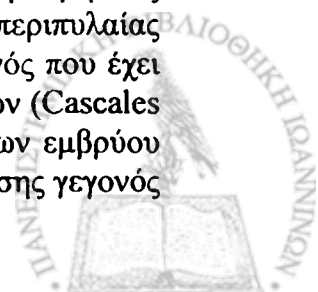
έκφρασης της κλαστρίνης η οποία είναι πιο πιθανό να σχετίζεται με τη διαδικασία της κυτταρικής επιβίωσης από ότι του κυτταρικού θανάτου (French et al., 1994). Σε μια άλλη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα μαστού ποντικού Shionogi, φαίνεται ότι η κυτταροτοξική ουσία paclitaxel που ως γνωστό επάγει απόπτωση, προκαλεί μια μειορύθμιση του mRNA της κλαστρίνης (TRPM-2), με χρόνο- και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο (Miyake et al., 2000). Τέλος, τα αποτελέσματα μιας επιπλέον έρευνας έδειξαν ότι οι κυτταρικές σειρές PC-3 και TSU-Prl ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του προστάτη και καρκινώματος της κύστης αντίστοιχα, μετά από θερμικό σοκ, υφίστανται μια παροδική αυξορύθμιση της έκφρασης της κλαστρίνης ακολουθούμενη από μειορύθμιση η οποία οδηγεί στην απόπτωση (Wu et al., 2002).

Ανάστολή της απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων επιτυγχάνεται με την υπερέκφραση της κλαστρίνης μέσω της διαμόλυνσης με cDNA της πρωτεΐνης αυτής στα κύτταρα, όπως φαίνεται από διάφορες μελέτες. Αρχικά σε μια έρευνα, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της κλαστρίνης (TRPM-2) στα ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη που εξαρτάται από τα ανδρογόνα LNCaP με σταθερή διαμόλυνση, τα κατέστησε πολύ ανθεκτικά στη θεραπεία με την κυτταροτοξική ουσία paclitaxel, μέσω της αναστολής αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Miyake et al., 2000). Τα αποτελέσματα μίας ακόμα έρευνας, στην οποία γίνεται διαμόλυνση με cDNA κλαστρίνης σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος του νεφρού ACHN, έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής μπορεί να συνεισφέρει σε ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση δια μέσου του Fas (Miyake et al., 2001). Οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες της κλαστρίνης/ApoJ, φαίνονται και σε μελέτες κατά τις οποίες σταματάει η μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης αυτής με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligodeoxynucleotides) (Kang et al., 2000 Miyake et al., 2000 Miyake et al., 2001 Zellweger et al., 2001).

Όπως προαναφέρθηκε δεν είναι όλες οι μορφές της ApoJ που επιδεικνύουν αυτές τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες. Πρόσφατα, μια πυρηνική μορφή 55 kDa της ApoJ, επαγόμενη από ακτινοβολία *in vitro* έχει ανευρεθεί να στοχεύει στον πυρήνα, όπου φαίνεται να δρα ως σήμα θανάτου (Yang et al., 2000). Υπερέκφραση της πυρηνικής μορφής της ApoJ σε αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστών MCF -7 επάγει την απόπτωσή τους (Yang et al., 1999). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι έρευνες σε επίμυες, όπου το γονίδιο της ApoJ εκμηδενίστηκε (Knockout) (Clu1) έχουν καταδείξει τις δύο όψεις των δράσεων της κλαστρίνης. Συγκεκριμένα, από την μια πλευρά η απουσία της μειώνει το ποσοστό νεκρών κυττάρων σε εγκεφαλική βλάβη που επάγεται από υποξεία ισχαιμία, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μόριο λειτουργεί φυσιολογικά για να επιτείνει τη βλάβη νευρώνων υπό τέτοιες συνθήκες (Han et al., 2001) και από την άλλη, στα ίδια πειραματόζωα με εκμηδενισμένο το γονίδιο, η αυτοάνοση βλάβη στο μυοκάρδιο αυξάνεται, υποδηλώνοντας ένα φυσιολογικά προστατευτικό ρόλο (McLaughlin et al., 2000).

1.10. Τοπικά αναισθητικά και απόπτωση

Έχει βρεθεί ότι τα τοπικά αναισθητικά, εκτός από τις δραστηριότητές τους στο νευρικό σύστημα και σε άλλους ιστούς, επάγουν κυτταροτοξικές επιδράσεις και απόπτωση. Συγκεκριμένα, η κοκαΐνη χορηγούμενη σε ποντίκια προκαλεί βλάβη στις κυψελίδες του ήπατος επιδρώντας στα κύτταρα της περιφερικής και της περιπυλαίας περιοχής, ειδικά όταν έχει προηγηθεί χορήγηση φαινοβαρβιτάλης, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση των ηπατοκυττάρων (Cascales et al., 1994). Ακόμα βρέθηκε ότι η απώλεια νευρικών φλοιικών κυττάρων εμβρύου ποντικού, καλλιεργούμενων με κοκαΐνη, οφείλεται στην επαγωγή απόπτωσης γεγονός



που φαίνεται από τη χαρακτηριστική μορφολογία αποπτωτικών πυρήνων με το οπτικό μικροσκόπιο, από το συνολικό κυτταρικό ίζημα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, καθώς και από το φαινόμενο της κατάτμησης του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και με την μέθοδο χρώσης TUNEL (Nassogne et al., 1997). Επίσης από παρόμοιες μεθόδους, φαίνεται η επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα των όρχεων των αρουραίων, μετά από έκθεση σε κοκαΐνη, μέσω της μιτοχονδριακής βιοχημικής οδού που συνοδεύεται από απελευθέρωση του cyto-c και ενεργοποίηση των κασπασών -9 και -3. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παίζει ρόλο στη διαταραχή της σπερματογένεσης λόγω του θανάτου των γαμετών, μετά από χρόνια χορήγηση κοκαΐνης στους αρουραίους (Li et al., 1999, Li et al., 2003). Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα της στεφανιαίας αρτηρίας του βοδιού από την κοκαΐνη, παίζει επίσης η απελευθέρωση του cyto c από τα μιτοχόνδρια (πιθανόν λόγω της ελάττωσης της πρωτεΐνης Bcl-2), η μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια, γεγονότα τα οποία ακολουθούνται από ενεργοποίηση κασπασών (He et al., 2000, He, Xiao and Zhang, 2001). Τέλος, με αύξηση της αναλογίας Bax/Bcl-2 και της ενεργοποίησης των κασπασών από την κοκαΐνη, επάγεται απόπτωση στην εμβρυϊκή καρδιά αρουραίου *in vivo*, φαινόμενο που πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στις δυσμενείς επιδράσεις του αναισθητικού αυτού στην καρδιακή ανάπτυξη (Xiao et al., 2001).

Ένα άλλο τοπικό αναισθητικό, η λιδοκαΐνη, βρέθηκε ότι ενισχύει τη βλάβη του DNA και την κυτταροτοξικότητα από το γλυκοπεπτίδιο βλεομυκίνη A₂, στα καλλιεργούμενα λευχαιμικά κύτταρα ποντικού L1210 και στα ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος κεφαλής και λαιμού A-253. Ο μηχανισμός οφείλεται στην ικανότητα του τοπικού αναισθητικού να αναστέλλει την μεταβολική απενεργοποίηση της βλεομυκίνης και την επισκευή του DNA από βλάβη, λόγω της βλεομυκίνης (Lazo et al., 1985). Επίσης στα καλλιεργούμενα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, διαφοροποιημένα από το ρετινοϊκό οξύ SH-SY5Y, η λιδοκαΐνη επάγει νέκρωση και απόπτωση με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιδράσεις που φάνηκαν με τεχνικές χρώσης με "trypan blue", κυτταρομετρίας ροής και ανοσοκυτταροχημείας (Friederich and Schmitz, 2002).

Έχει βρεθεί από τους Yau και Kim (1980), ότι μεταξύ των τοπικών αναισθητικών διβουκαΐνη, λιδοκαΐνη, τετρακαΐνη και προκαΐνη, η διβουκαΐνη, είναι το πιο αποτελεσματικό και η προκαΐνη το λιγότερο αποτελεσματικό στην ενίσχυση κυτταρικού θανάτου από υπερθερμία στα καλλιεργούμενα κύτταρα λεμφώματος ποντικού, L5178Y (Yau and Kim, 1980). Παρομοίως, η πριλοκαΐνη, η λιδοκαΐνη και η βουπιβακαΐνη ενισχύουν την προκαλούμενη από υπερθερμία απόπτωση στα ανθρώπινα κύτταρα ιστιοκυτταρικού λεμφώματος U937, μέσω βιοχημικών οδών εξαρτημένων από τα Ca⁺⁺ και τα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, προκαλείται αύξηση των κυτταροπλασματικών Ca⁺⁺ τα οποία δρουν απευθείας στα μιτοχόνδρια προκαλώντας ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και την απελευθέρωση πρωτεϊνών ενεργοποίησης των κασπασών. Ακόμα, αναφέρεται ότι τα τοπικά αναισθητικά με τη μεγαλύτερη λιποφιλία, όπως η βουπιβακαΐνη, είναι πιο αποτελεσματικά σε αυτό το φαινόμενο, επειδή μπορούν πιο εύκολα να ενσωματωθούν στις κυτταρικές μεμβράνες αυξάνοντας τη ρευστότητά τους (Arai et al., 2002). Η πριλοκαΐνη βρέθηκε ότι επάγει απόπτωση στα οστεοβλαστικά κύτταρα ανθρώπου Saos-2 και MG63 και ποντικού MC3T3-E1, με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο επιδεικνύοντας όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, αυτού του είδους του κυτταρικού θανάτου. (Nakamura et al., 1999). Επίσης, τα τοπικά αναισθητικά λιδοκαΐνη, βουπιβακαΐνη, και τετρακαΐνη, επάγουν δοσοεξαρτώμενη απόπτωση στα ανθρώπινα κύτταρα από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο HK-2 και ακόμα ενισχύουν την

επαγωγή απόπτωσης από τον TNF- α στα κύτταρα αυτά. Η επαγωγή απόπτωσης βρέθηκε ότι έγινε με ενεργοποίηση κασπασών και με αναστολή οδών σημάτων επιβίωσης, με την εφαρμογή τεχνικών όπως χρώση TUNEL, ανοσοαποτυπώματος κατά western καθώς και με μελέτη κατάτμησης DNA και της κυτταρικής μορφολογίας (Lee et al., 2003). Το τοπικό αναισθητικό βουπιβακαΐνη παρατηρήθηκε ότι προκαλεί το σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων, κατάτμηση του DNA με χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο καθώς και την ενεργοποίηση των κασπασών -3, -8 και -9, γεγονότα που χαρακτηρίζουν τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση, στα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 (Unami et al., 2003). Κυτταρικό θάνατο από απόπτωση σε καλλιεργούμενα κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος ποντικού PC12 προκαλεί η τετρακαΐνη, όπως έδειξε μια άλλη έρευνα, με τεχνικές μελέτης παρόμοιες με τις ανωτέρω (Tan et al., 2002).

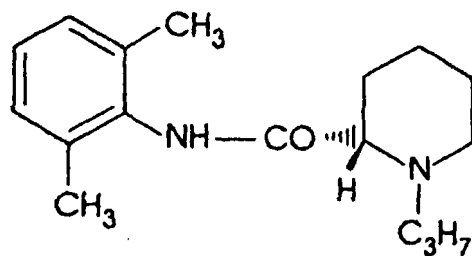
Τέλος δύο ερευνητικές δημοσιεύσεις αποκαλύπτουν την επαγωγή κυτταρικού θανάτου από απόπτωση σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, από τη διβουκαΐνη. Σύμφωνα με την πρώτη, η διβουκαΐνη επάγει απόπτωση με δοσοεξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-MC, που επιδεικνύεται τόσο με μορφολογικά, όπως η συρρίκνωση της χρωματίνης, όσο και με βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως η κατάτμηση του DNA (Kim et al., 1997). Στη δεύτερη δημοσίευση, φαίνεται η επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, από τη διβουκαΐνη, με κατάτμηση του DNA καθώς και ενεργοποίηση κασπασών που φαίνεται ότι συνδέεται με την απελευθέρωση του cyto c από τα μιτοχόνδρια (Arita et al., 2000).

2: ΡΟΠΙΒΑΚΑΪΝΗ

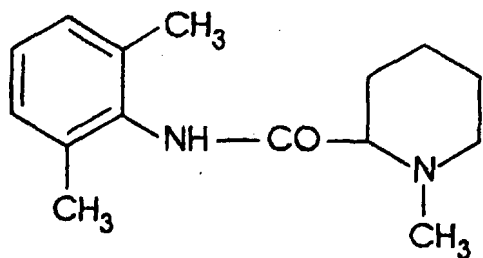
2.1 Γενικά

Η ροπιβακαΐνη (ropivacaine hydrochloride NaropinTM), είναι ένα από τα προσφάτως εισαχθέντα στην αγορά τοπικά αναισθητικά αμιδικού τύπου, που επινοήθηκε και αναπτύχθηκε σε ένα πρωτότυπο ερευνητικό πρόγραμμα της "Astra Pain Control AB", στην Σουηδία. Είναι ένα εναντιομερές του υδροχλωρικού άλατος της S-(-)-1-προπυλ - 2',6' -πιπεκολοξυλιδίδης και η δομή του είναι ενδιάμεση μεταξύ της βουπιβακαΐνης και της μεπιβακαΐνης. Τα τοπικά αναισθητικά της ομάδας των πιπεκολοξυλιδίων είναι ουσίες με οπτική ισομέρεια (chiral), γιατί το μόριό τους έχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα και επομένως μπορεί να έχει αριστερόστροφη ή δεξιόστροφη μορφή. Ενώ η μεπιβακαΐνη και η βουπιβακαΐνη παράγονται για κλινική χρήση σαν ρακεμικά μείγματα των εναντιομερών περιλαμβάνοντας ίσες αναλογίες "S" και "R" μορφών, η ροπιβακαΐνη παρασκευάζεται σαν ένα γνήσιο S-εναντιομερές. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται από την αλκυλοποίηση του S εναντιομερούς του διβενζοϊλικού-L-ταρταρικού οξέος και έχει 99,5% εναντιομερική γνησιότητα (σχήμα 1.12). Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ροπιβακαΐνης έχει βρεθεί ότι η λιπιδιακή διαλυτότητα του αναισθητικού αυτού είναι σχετικά χαμηλή και ανάμεσα σε αυτή της λιδοκαΐνης και της βουπιβακαΐνης και η σταθερά διάστασης (pK_a) είναι 8,1, ίδια με αυτή της βουπιβακαΐνης και λίγο υψηλότερη από αυτή της λιδοκαΐνης (McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000, O'Keefe and Healy, 1999, Owen and Dean, 2000).

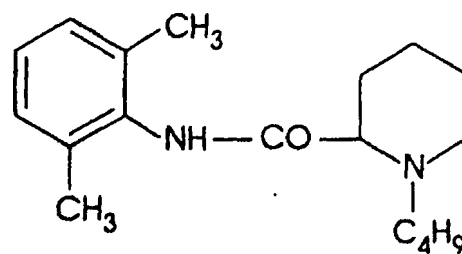




S-(-)-ροπιβακαΐνη



R,S-(±)-μεπιβακαΐνη



R,S-(±)-βουπιβακαΐνη

Σχήμα 1.12. ΟΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΡΟΠΒΑΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΜΕΠΒΑΚΑΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΟΥΠΒΑΚΑΪΝΗΣ (McClure, 1996)

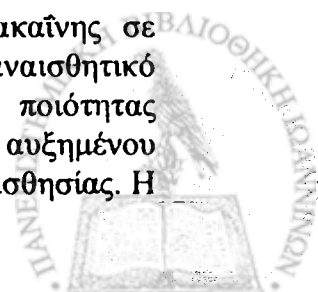
2.2 Φαρμακοδυναμική, δράσεις και χορήγηση της ροπιβακαΐνης

Η φαρμακοδυναμική της ροπιβακαΐνης έχει μελετηθεί σε σύγκριση με αυτή της βουπιβακαΐνης και προέκυψε ότι σε χαμηλή συγκέντρωση, και συγκεκριμένα 25-50 $\mu\text{mol litre}^{-1}$, προκαλεί ένα βαθύ και ταχύ αποκλεισμό και των μικρών και εμύελων νευρικών ιών Αδ, και των ακόμα μικρότερων και αμύελων νευρικών ιών C που είναι υπεύθυνες για τη μετάδοση του πόνου, με μεγαλύτερη δραστηριότητα από αυτή της βουπιβακαΐνης. Παρόλο που δρα στον αποκλεισμό αισθητικών νευρικών ιών Αδ και C, η ροπιβακαΐνη είναι λιγότερο δραστήρια στον αποκλεισμό κινητικών νευρικών ιών όπως οι Αβ. Σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις η ροπιβακαΐνη και η βουπιβακαΐνη έχουν παρόμοια δράση αποκλεισμού νευρικών ιών (McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000, O'Keeffe and Healy, 1999, Owen and Dean, 2000).

Όσον αφορά τις καρδιοτοξικές επιδράσεις των τοπικών αυτών αναισθητικών, βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη είναι λιγότερο αρρυθμογόνος από τη βουπιβακαΐνη. Αυτή η ελαττωμένη καρδιοτοξικότητα της ροπιβακαΐνης επιβεβαιώθηκε, σε σύγκριση και με τη λιδοκαΐνη, και βρέθηκε ότι η είναι πιο καρδιοτοξική από τη λιδοκαΐνη, όπως προέκυψε από *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Ακόμα, η κατασταλτική επίδραση της ροπιβακαΐνης στο καρδιακό δυναμικό ενέργειας (V_{max}), είναι ανάμεσα στη βουπιβακαΐνη (υψηλότερη) και τη λιδοκαΐνη (χαμηλότερη). (Marsh and Hardy, 1991, McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000). Η καρδιοτοξική επίδραση της ροπιβακαΐνης και της βουπιβακαΐνης πιθανόν οφείλεται, στην αναστολή της οξειδωσης των λιπιδιακών υποστρωμάτων όπως το πυροσταφυλικό άλας και η παλμιτοϊλική καρνιτίνη, που επάγεται από αυτά τα αναισθητικά και συμβαίνει στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του μυοκαρδίου (Zhang, Yao and Li, 2003).

Η ικανότητα της ροπιβακαΐνης στον αισθητικό και κινητικό αποκλεισμό έχει προσδιοριστεί στην κλινική χρήση από ένα μεγάλο αριθμό μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε εθελοντές και ασθενείς όπου απλά διαλύματα ροπιβακαΐνης παράγουν σημαντικά μεγαλύτερης διάρκειας, δερματική αναλγησία από ότι διαλύματα βουπιβακαΐνης. Ακόμα η διήθηση ροπιβακαΐνης σε τραύματα χολοκυστεκτομής, ελαττώνει σε σημαντικό βαθμό τον πόνο της πληγής και αυξάνει το χρόνο που απαιτείται για την εφαρμογή μετεγχειρητικής αναλγησίας σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ορό (McClure, 1996). Ειδικά για τη λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή, έγινε σύγκριση της αναλγητικής ικανότητας της ροπιβακαΐνης και της λεβοβουπιβακαΐνης για τοπική ιστική διείσδυση πριν την τομή με σκοπό τη βελτίωση του μετεγχειρητικού ελέγχου του πόνου μετά τη χειρουργική αυτή επέμβαση, σε μια πρόσφατη μελέτη και φάνηκε ότι η τοπική ιστική διείσδυση με τη λεβοβουπιβακαΐνη είναι πιο αποτελεσματική από ότι με τη ροπιβακαΐνη στην ελάττωση του μετεγχειρητικού πόνου της (Paragianopoulou et al., 2003). Επίσης, μελέτες περιφερικού νευρικού αποκλεισμού έδειξαν ότι η ροπιβακαΐνη έχει σχεδόν ίδια αποτελέσματα με την βουπιβακαΐνη στο ξεκίνημα, στην ποιότητα και στη διάρκεια του αισθητικού αποκλεισμού, αλλά παράγει λιγότερο κινητικό αποκλεισμό. Τέλος, βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη έχει σημαντικά υψηλότερη ουδό για την τοξικότητα στο ΚΝΣ, από ότι η ρακεμική βουπιβακαΐνη σε υγιείς εθελοντές (McClure, 1996, O'Keeffe and Healy, 1999, Owen and Dean, 2000, McClellan and Faulds, 2000).

Ανοιχτές μελέτες οσφυϊκής επισκληριδίου χορήγησης της ροπιβακαΐνης σε συγκεντρώσεις 0,5%, 0,75% και 1% έδειξαν ότι είναι ένα τοπικό αναισθητικό μακράς διάρκειας το οποίο παρέχει χειρουργική αναισθησία καλής ποιότητας αυξάνοντας τον χρόνο έναρξης της μειωμένης συγκέντρωσης και του αυξημένου κινητικού αποκλεισμού, όπως συμβαίνει και με άλλες ουσίες τοπικής αναισθησίας. Η



κορυφαία συγκέντρωση πλάσματος (C_{pmax}) της ροπιβακαΐνης ήταν κάτω από τη συγκέντρωση που σχετίζεται με τη συστηματική τοξικότητα στα ζώα. Σε διάφορες μελέτες έχουν προκύψει ποικίλα αποτελέσματα σχετικά με την έναρξη, την έκταση ή τη διάρκεια του κινητικού και του αισθητικού αποκλεισμού από τη ροπιβακαΐνη σε σύγκριση με τη βουπιβακαΐνη (McClure, 1996). Επίσης από εκτεταμένα κλινικά αποτελέσματα, φάνηκε ότι η επισκληρίδιος ροπιβακαΐνη σε ποσοστό 0,2%, είναι αποτελεσματική για την έναρξη και τη διατήρηση αναισθησίας τοκετού και παρέχει ανακούφιση από τον πόνο μετά από κοιλιακή και ορθοπεδική χειρουργική επέμβαση ειδικά όταν χορηγείται σε συνδυασμό με οπιοειδή. Το φάρμακο έχει γενικά παρόμοια δραστηριότητα με αυτή της ίδιας δόσης βουπιβακαΐνης σε ότι αφορά την ανακούφιση από πόνο και προκαλεί λιγότερο κινητικό αποκλεισμό σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όσον αφορά την οσφυϊκή επισκληρίδιο αναισθησία για χειρουργικές επεμβάσεις κάτω άκρων ή ουρογενετικού συστήματος, συγκρινόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης ποσοστών 0,75 ή 1 %, μπορεί να χρειάζονται για να παρέχουν τον ίδιο αισθητικό και κινητικό αποκλεισμό όπως η βουπιβακαΐνη σε ποσοστό 0,5 και 0,75 % (McClellan and Faulds, 2000). Τέλος, τα αποτελέσματα μιας επίσης πρόσφατης έρευνας έδειξαν ότι 0,12 % επισκληριδίου ροπιβακαΐνης μπορεί να παρέχει μια ικανοποιητική μετεγχειρητική αναλγησία σε ασθενείς από την Ταϊβάν, με λίγες παρενέργειες. Η έρευνα έγινε για να βρεθεί μια κατάλληλη δόση ροπιβακαΐνης στους ασθενείς της συγκεκριμένης εθνικότητας, των οποίων η φυσική κατάσταση δεν είναι εντελώς συμβατή με την προτεινόμενη φαρμακευτική δοσολογία για τους δυτικούς λαούς (Lee, et al, 2003). Παρόλο που έχει αναφερθεί ότι η ροπιβακαΐνη δεν διατίθεται για χρήση στη ραχιαία αναισθησία (McClure, 1996), βρέθηκε πρόσφατα ότι το τοπικό αυτό αναισθητικό παρέχει αποτελεσματική ραχιαία αναισθησία για ολική αρθροπλαστική του ισχίου (McNamee et al., 2002).

Όσον αφορά τις παρενέργειες της ροπιβακαΐνης, τα δημοσιευμένα περιστατικά που προέκυψαν από μελέτες, έδειξαν ότι είναι λιγότερες κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης τοκετού και καισαρικής τομής από ότι αυτές της βουπιβακαΐνης. Σε ελάχιστα περιστατικά ακούσιας ενδοφλέβιας ένεσης ροπιβακαΐνης 75-200 mg, κανένας ασθενής δεν έδειξε σημάδια καρδιοτοξικότητας. Τέλος αναφέρεται ένα περιστατικό ασθενούς που δέχτηκε 200 mg ροπιβακαΐνης ενδοαγγειακά κατά τη διάρκεια διαδικασίας αποκλεισμού μασχαλαίου βραχιόνιου πλέγματος, που εμφάνισε σπασμούς. Με τη διενέργεια άμεσης και κατάλληλης θεραπείας έγινε πλήρης ανάρρωση μέσα σε 2 λεπτά (McClure et al., 1996).

2.3 Αντιφλεγμονώδης δράση της ροπιβακαΐνης

Η αντιφλεγμονώδης επίδραση της ροπιβακαΐνης έχει δείξει σε ερευνητικές εργασίες τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που έγινε στη μικροαγγείωση του ζυγωματικού εγκολπώματος ποντικών hamster βρέθηκε πρώτον ότι η ροπιβακαΐνη αναστέλλει την φλεγμονώδη μετακίνηση και τη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων καθώς και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και δεύτερον ότι αναστέλλει την επαγόμενη έκφραση των μορίων CD11b/CD18, στα λευκοκύτταρα ανθρώπου *in vitro*, τα οποία είναι μέλη της οικογένειας των ιντεγκρινών και φαίνεται ότι είναι σημαντικά για τη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων (Martinsson et al., 1997). Επίσης, βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη μειώνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την προσκόλληση λευκοκυττάρων που επάγεται από τον TNF- α , αλλά δεν επιδρά καθόλου στη μετακίνηση των λευκοκυττάρων που συμβαίνει από τον TNF- α , όπως προκύπτει από

έρευνα στην μικροκυκλοφορία του κρεμαστήρα μυός ποντικού. Έτσι προτείνεται ότι η τοπική χορήγηση ροπιβακαΐνης μπορεί να είναι μια αποτελεσματική φαρμακολογική επέμβαση στις φλεγμονώδεις ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την ενεργοποίηση του TNF- α και τη διήθηση των λευκοκυττάρων (Zhang and Thorlacius, 2000). Από αποτελέσματα ερευνών που έγιναν σε ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα με ανοσολογικές μεθόδους, προέκυψε ότι η ροπιβακαΐνη αναστέλλει την απελευθέρωση εικοσανοϊδών, που είναι προϊόντα της 5-λιποξυγενάσης, από τα κύτταρα αυτά γεγονός που μπορεί να εξηγήσει κάποιες από τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της ροπιβακαΐνης (Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1997). Τέλος, οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της ροπιβακαΐνης φαίνονται και σε μια έρευνα στην οποία η ροπιβακαΐνη, η λιδοκαΐνη και η τετρακαΐνη σε κλινικά σχετικές συγκεντρώσεις εξασθενούν τις χημειοτακτικές και μεταβολικές ανταποκρίσεις που προέρχονται από το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), στα ουδετερόφιλα του ανθρώπου. Το LPA είναι ένας ενδοκυττάριος φωσφολιπιδικός μεσολαβητής με ποικιλία δράσης και πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στη διέγερση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Fischer et al., 2001).

2.4 Ροπιβακαΐνη, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση

Η ροπιβακαΐνη βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό καλλιεργούμενων κυττάρων. Συγκεκριμένα, προκαλεί αναστολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καλλιεργούμενα ανθρώπινα κύτταρα όπως ινοβλάστες, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα. Σημαντική αναστολή στους ινοβλάστες γίνεται σε συγκεντρώσεις 50 μ M και 500 μ M ροπιβακαΐνης σε 1 % και 10% «ορού νεογέννητου μόσχου» (foetal bovine serum) αντίστοιχα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε 1 mM και 500 mM αναισθητικού σε 5 % και 40 % ορού αντίστοιχα και τέλος 100 mM ροπιβακαΐνης προκάλεσαν σημαντική αναστολή πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων (Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1993). Παρομοίως, η ροπιβακαΐνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών αδενοκαρκινώματος από παχύ έντερο HT-29 και Caco-2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. (Martinsson T., 1999). Επίσης βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη και η βουπιβακαΐνη σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 500 μ M, έχουν ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό καλλιεργούμενων ινοβλαστών από τα πόδια νεογέννητου αρσενικού αρουραίου Wistar και καρκινικών κυττάρων νεφρού πθήκου (Vero), με τη ροπιβακαΐνη να έχει τη πιο ισχυρή ανασταλτική επίδραση. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης, η ελάττωση των γονιδίων κυττοκινών και μορίων προσκόλλησης, τα οποία εκφράζονται από ενεργοποιημένα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα είναι υψηλότερη για τη βουπιβακαΐνη από ότι για τη ροπιβακαΐνη, γεγονός που δείχνει τη διαφορετική τάση αντιφλεγμονώδους επίδρασης των δύο τοπικών αναισθητικών (De Iuliis et al., 2001). Ακόμα, η ροπιβακαΐνη καθώς και τα τοπικά αναισθητικά λιδοκαΐνη, βουπιβακαΐνη και μεπιβακαΐνη προκαλούν νευροτοξικότητα σε καλλιεργούμενους αναπτυσσόμενους νευρώνες, απομονωμένους από το γάγγλιο της νωτιαίας ρίζας εμβρύου κοτόπουλου, έχοντας σαν συνέπεια τις μορφολογικές αλλαγές στους νευρώνες αυτούς καθώς και την μείωση του πολλαπλασιασμού τους (Radwan, Saito and Goto, 2002). Τέλος, οι μυοτοξικές επιδράσεις της ροπιβακαΐνης σε σύγκριση με αυτές της βουπιβακαΐνης, στο σκελετικό μυϊκό ιστό, συγκρίθηκαν μετά από συνεχείς περιφερικούς αποκλεισμούς, σε μια πρόσφατη μελέτη όπου έγινε έγχυση 20 ml βουπιβακαΐνης (5 mg/ml) ή ροπιβακαΐνης (7,5 mg/ml), για 6 ώρες, μέσω μηριαίων νευρικών καθετήρων σε

αναισθησιοποιημένα γουρούνια minipigs. Τα αποτελέσματα έδειξαν πρώτον, ότι και τα δύο φάρμακα επάγουν μυϊκή βλάβη με παρόμοιες ιστολογικές μορφές και δεύτερον ότι σε σύγκριση με τη βουπιβακαΐνη, η οποία επάγει και νέκρωση και απόπτωση, η ιστική βλάβη που προκαλείται από τη ροπιβακαΐνη είναι σημαντικά λιγότερο σοβαρή (Zink et al., 2003).

3: ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (Zn)

3.1 Γενικά

Ο ψευδάργυρος (Zn), είναι στοιχείο της ομάδας ΙΙβ του περιοδικού συστήματος. Σχετικά με τη φυσιολογία του ανθρώπου, δύο χαρακτηριστικά του Zn πρέπει να τονιστούν. Πρώτο, αντίθετα από άλλα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων της ομάδας ΙΙβ, ο Zn είναι σχεδόν μη τοξικός. Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την είσοδό του μέσα στα κύτταρα, την κατανομή του και την έκκριση του από αυτά και από τους ιστούς είναι τόσο ικανοί, που δεν υπάρχουν γνωστές ανωμαλίες που να συνδέονται με την υπερβολική συσσώρευση, σε αντίθεση με τον σίδηρο (Fe), τον χαλκό (Cu), τον υδράργυρο (Hg) και άλλα μέταλλα. Δεύτερο, οι φυσικές και χημικές ιδιότητές του, καθιστούν τον Zn κατάλληλο για συμμετοχή δομική ή λειτουργική σε ένα ιδιαίτερα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών και ενζύμων που πραγματοποιούν πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Αυτές και άλλες ακόμα χημικές ιδιότητες αποτελούν τη βάση για την εκτεταμένη συμμετοχή του Zn στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων, των υδατανθράκων και των λιπιδίων, όπως και στον έλεγχο της γονιδιακής μεταγραφής. Συμμετέχει επίσης και σε άλλες βιολογικές διαδικασίες όπως για παράδειγμα στην διαίρεση, στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Τέλος η αναστολή της σύνδεσης πεπτιδίων και άλλων συνδεδεμένων μορίων σε διάφορους υποδοχείς οπιοειδών (μ, δ, ε και κ) είναι μια από τις λειτουργίες του Zn στο νευρικό σύστημα (Vallee and Falchuk, 1993).

Το κλάσμα του ελεύθερου Zn είναι πολύ μικρό στα βιολογικά συστήματα όπου συνήθως πραγματοποιεί τις βιοχημικές του λειτουργίες σαν δισθενές κατιόν συνδεδεμένο με ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες. Περίπου 30-40% του ολικού κυτταρικού Zn είναι στον πυρήνα, ~50% είναι στο κυτταρόπλασμα και στα οργανίδια του και το υπόλοιπο είναι στην κυτταρική μεμβράνη. Οι ιδιότητές του είναι ειδικά ευνοϊκές για μια πληθώρα λειτουργικά σημαντικών αλληλεπιδράσεων αφού κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν πραγματοποιεί αναγωγή και οξείδωση. Αυτή η απουσία οξειδοαναγωγικής αλλαγής, τον καθιστά σταθερό σε ένα βιολογικό θρεπτικό υλικό του οποίου το οξειδοαναγωγικό δυναμικό είναι εκτεθειμένο στη συνεχή ροή. Άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες που του παρέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα στα βιολογικά συστήματα, αφορούν τον επαμφοτερίζοντα ιοντικό του χαρακτήρα με δυνατότητα να υπάρχει σαν υδρομεταλλικό και υδροξομεταλλικό σύμπλεγμα σε τιμές pH κοντά στην ουδέτερη τιμή (Vallee and Falchuk, 1993).

Διαθέτει μια περιοχή μεταβλητού συντονισμού (variable coordination) και τη στερεοχημική προσαρμοστικότητα ώστε να παίρνει γεωμετρικές διατάξεις πολλαπλού συντονισμού που ποικίλουν από δύο έως οχτώ, χαρακτηριστικά τα οποία συνεισφέρουν στην βιοχημική του πολλαπλή χρησιμότητα. Ωστόσο, τέσσερα, πέντε και έξι συμπλέγματα συντονισμού είναι αυτά που συναντώνται πιο συχνά σε ενζυματικές και άλλες βιολογικές λειτουργίες του Zn με γεωμετρικές διατάξεις που ποικίλουν από συνηθισμένα ή παραμορφωμένα τετράεδρα, σε τρίγωνα αμφιπυραμιδικά, τετράγωνα πυραμιδικά και οχταεδρικά. Αυτή η πληθώρα των αριθμών συντονισμού και των γεωμετρικών διατάξεων αντανakλά την ικανότητα του

Zn να συνεργάζεται με τις απαιτήσεις των συνδεδεμένων μορίων του, επιτρέποντας τους να μεταβάλουν την εσωτερική αντιδραστικότητα του μετάλλου αυτού. Είναι σημαντικό λοιπόν ότι, η πρωτεϊνική δομή επηρεάζει τη χημεία του συνδεδεμένου Zn, τόσο όσο, ο Zn με τη σειρά του, επηρεάζει τη διαμόρφωση και την προσαρμωσιμότητα αυτών των μακρομορίων (Vallee and Falchuk, 1993).

3.2 Zn και απόπτωση

Όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση σε διάφορα είδη κυττάρων, έχει βρεθεί σε μελέτες ότι ο Zn σε διάφορες συγκεντρώσεις, είτε επάγει τον θάνατο αυτό, είτε τον αναστέλλει όταν αυτός επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη αποκαλύπτεται ότι η έκθεση σε Zn επάγει απόπτωση σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη, PC-3, και σε κύτταρα καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη, BPH, τα οποία συγκεντρώνουν υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα του μετάλλου με άμεση επίδραση στα μιτοχόνδρια, που έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του cyto-c (Feng et al., 2002). Ο ρόλος του ενδοκυτταρικού επιπέδου του Zn στην επαγωγή απόπτωσης στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα HL-60, μελετάται σε άλλη έρευνα, στην οποία φάνηκε ότι η χορήγηση 25-200 μM Zn με το ιονοφόρο πυριθιονίνη (pyrithione) για 6 ώρες, επάγει κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα αυτά με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, με νέκρωση και απόπτωση. Επιπλέον φαίνεται ότι απαιτείται η ενεργοποίηση κασπασών, για τον αποπτωτικό θάνατο (Kondoh et al., 2002). Σε μια ακόμα μελέτη αποκαλύπτεται ότι 25-100 μM Zn, προκαλούν θάνατο με χαρακτηριστικά απόπτωσης στα αθανατοποιημένα νευρικά κύτταρα του υποθαλάμου GT1-7, με δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Kawahara, Kato-Negishi and Kuroda, 2002). Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PARP, χαρακτηριστικό της απόπτωσης, παρατηρείται σε καλλιεργούμενα φλοιικά αστροκύτταρα ποντικού μετά από τοξική οξεία έκθεση στον Zn (350 μM για 15 λεπτά), σε άλλη μια έρευνα (Sheline et al., 2003). Ο μηχανισμός με τον οποίο μέταλλα μεταξύ των οποίων και ο Zn επάγουν απόπτωση στα ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα του αίματος, εξετάζεται από τους Jimenez Del Rio και Velez-Pardo. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα μέταλλα αυτά επάγουν απόπτωση με την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), με αποτέλεσμα την εκπόλωση των μιτοχονδρίων, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, και την πυρηνική κατάπτωση ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών NF- κB και p53 (Jimenez Del Rio and Velez-Pardo, 2004).

Σε άλλες δημοσιεύσεις φαίνεται ότι ο Zn ενισχύει την επαγωγή απόπτωσης από άλλους παράγοντες, σε διάφορα είδη κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη εξετάζεται η επίδραση των φυσιολογικών επιπέδων Zn στα μη εξαρτημένα από ανδρογόνα καρκινικά κύτταρα προστάτη, PC-3 και DU-145 όπου ο Zn αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF- κB , μειώνει την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης c-IAP2, ενεργοποιεί την c-Jun NH₂ τελική κινάση (JNK) και ευαισθητοποιεί τα κακοήθη κύτταρα στην απόπτωση που επάγεται από κυτταροτοξικές ουσίες όπως ο TNF- α και ο αντικαρκινικός παράγοντας paclitaxel (Uzzo et al., 2002). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλης έρευνας, η επαγωγή της απόπτωσης από τον ιό του δάγγειου πυρετού τύπου 2 (dengue virus type 2) στα νεφρικά κύτταρα πράσινου πιθήκου της Αφρικής, επιταχύνεται από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης (1.0 mM) εξωκυτταρικού Zn (Shaffee and AbuBakar, 2002). Η προστατευτική ιδιότητα του Zn φαίνεται πρώτον από μια μελέτη, στην οποία αξιολογείται ο βαθμός διαμόρφωσης της απόπτωσης σε λεμφοκύτταρα του θύμου αδένου του αρουραίου, με δείγματα ιζημάτων από τον βυθό του ποταμού Έλβα, που περιείχαν μέταλλα σε διαφορετικές

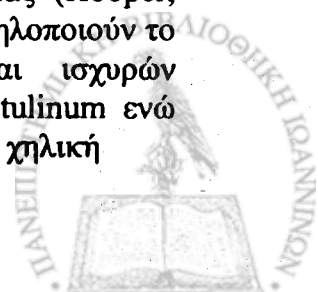
συγκεντρώσεις, καθώς και με γνήσια άλατα μετάλλων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστολή της απόπτωσης στα κύτταρα αυτά από τα διάφορα μέταλλα (Fe, Mn, Zn, Cd και άλλων), συνδέεται με την περίσσια του Zn και πιθανόν του Cd (Chukhlovi et al., 2001). Μια άλλη μελέτη, δείχνει ότι ο Zn σε δόσεις, από 10 έως 50 μM , αναστέλλει την επαγωγή απόπτωσης από το Mn, η οποία συνοδεύεται από ενεργοποίηση της κασπάσης-3, στα ανθρώπινα κύτταρα Β λεμφώματος, Ramos (Schrantz et al., 2001). Τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης, έδειξαν ότι ο εξωγενώς προστιθέμενος Zn στα ανθρώπινα κύτταρα μυελοειδούς λευχαιμίας U937, παίζει ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης σε διάφορα βήματα αναστέλλοντας την κατάτμηση του DNA από την τοξίνη των φυτών ρικίνη (ricin), γεγονός που μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην αναστολή από τον Zn μιας ενδονουκλεάσης, στη δράση του σε συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς παράγοντες που παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση των κασπασών-6 και -9, ή στη διαδικασία ενεργοποίησής τους αυτής καθαυτής. Επίσης εκτιμάται ότι, η απελευθέρωση του Zn από μακρομόρια όπως οι μεταλλοπρωτεΐνες ή ορισμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, μπορεί να γίνεται κατά τη διάρκεια της επαγόμενης απόπτωσης από τη ρικίνη και επομένως η πρόσθεση εξωγενούς Zn, μπορεί να αποτρέπει την απελευθέρωσή του από την ενδονουκλεάση, από άλλα ένζυμα εξαρτώμενα από τον Zn και από μακρομόρια και έτσι να αναστέλλει την επαγωγή της απόπτωσης (Tamura et al., 2002). Σε μια άλλη μελέτη εξετάζεται η αναστολή της απόπτωσης από τον Zn σε διάφορα στάδια, τόσο της αποπτωτικής χημικής οδού με την ανισομυκίνη, όσο και αυτής μέσω των υποδοχέων θανάτου από τον Fas ή τον TNF. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο Zn σε συγκέντρωση 0,3 mM, αναστέλλει επιλεκτικά την ενεργοποίηση μόνο των BH3 πρωτεϊνών Bax και Bak, που χρειάζονται στην χημική οδό, αλλά αναστέλλει και την ενεργοποίηση μεταγενέστερων κασπασών, όπως της κασπάσης-3, στην οδό των υποδοχέων θανάτου, σε συγκέντρωση 3 mM (Ganju and Eastman, 2003). Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από μια άλλη έρευνα στην οποία 10 μM Zn αναστέλλουν την απόπτωση σε καλλιεργούμενα κύτταρα νεφρικών σωληναρίων, η οποία επάγεται από τη μείωση του ATP. Η αναστολή γίνεται με αποτροπή της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bax, των κασπασών και της απελευθέρωσης του cyto-c από τα μιτοχόνδρια (Wei et al., 2004). Σε μια άλλη μελέτη φαίνεται ότι η προχωρήγηση 25 έως και 500 μM Zn, 30 λεπτά πριν από την επίδραση ανοξίας σε καλλιεργούμενους νευρώνες υπόκαμψου αρουραίου, έχει σαν αποτέλεσμα τη δόσοεξαρτώμενη ικανότητα προστασίας από προχωρημένες αποπτωτικές αλλαγές προερχόμενες από την ανοξία (Naganska and Matyja, 2002). Επίσης τα αποτελέσματα από μια επιπλέον έρευνα σε καλλιεργούμενους νευρώνες ανθρώπου NT2-N, έδειξαν ότι 700 μM Zn προστατεύουν τα κύτταρα αυτά από την απόπτωση που επάγεται από 100 μM Cu ρυθμίζοντας την αφθονία του mRNA της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και αποτρέποντας την μετατόπιση της p53 στον πυρήνα των κυττάρων (VanLandingham, Fitch and Levenson, 2002). Επιπλέον, μια ακόμα μελέτη απέδειξε ότι η προεπαγωγή της σύνθεσης της συνδεδεμένης με τον Zn πρωτεΐνης, μεταλλοθειονίνης, από τον ίδιο τον Zn και το Cd, προστατεύει τα καλλιεργούμενα πρωτογενή κύτταρα του ΚΝΣ και τα αστροκύτταρα από την απόπτωση η οποία επάγεται από την γ -ακτινοβολία πιθανόν μέσω της αντιοξειδωτικής ιδιότητας της μεταλλοθειονίνης (Cai et al., 2004). Αποδείχτηκε επίσης και από τους Perez και Cederbaum, ότι ο Zn προστατεύει τα κύτταρα E47, κατά 50%, από τις τοξικές συνέπειες του αραχιδονικού οξέος (τμηματοποίηση του DNA, νέκρωση, απώλεια μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού) μέσω της υπερέκφρασης της μεταλλοθειονίνης 2A (MT2A) (Perez and Cederbaum, 2003). Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, ο Zn αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από την

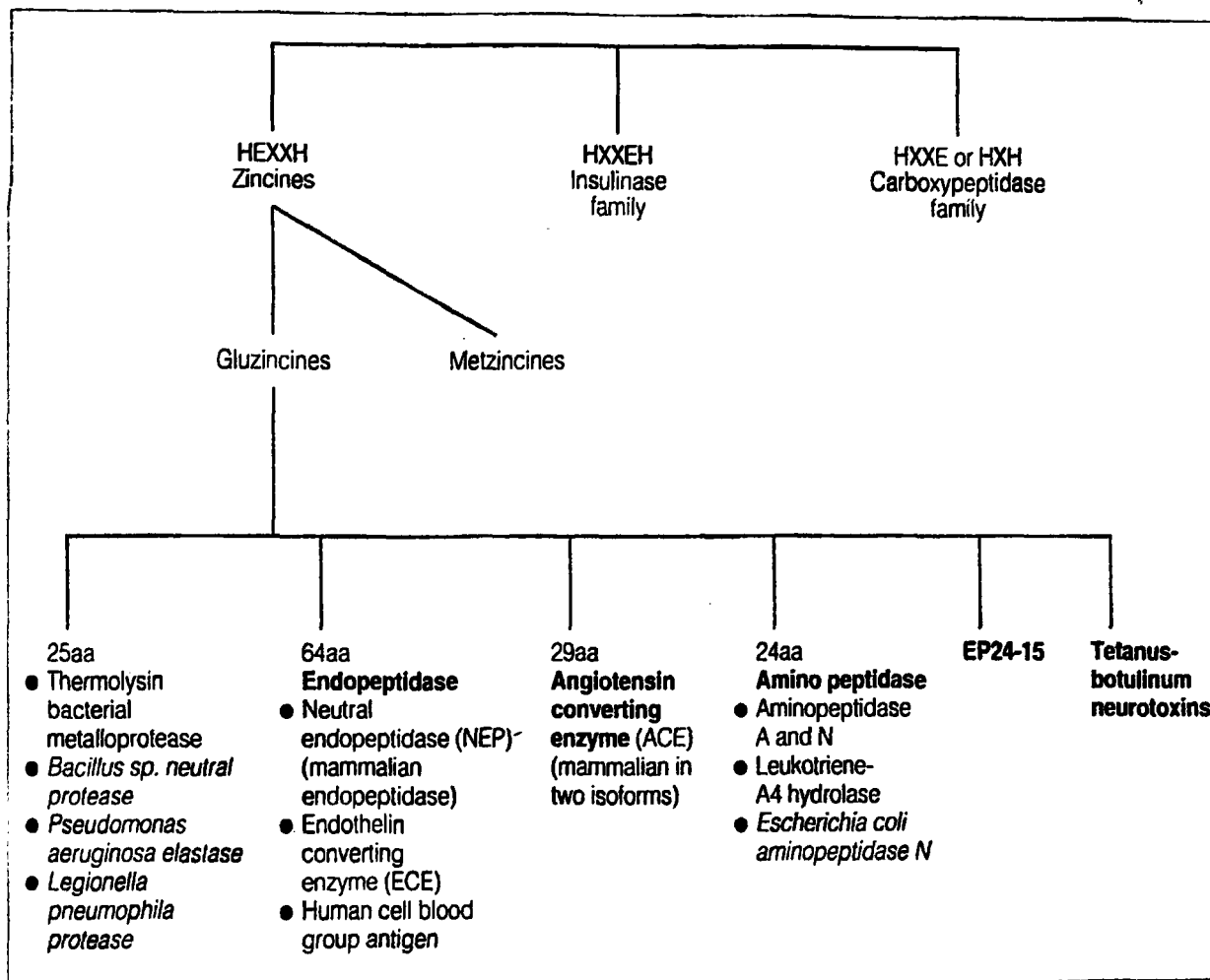
αιθανόλη στα κύτταρα του ήπατος ποντικών, όπου αποδεικνύεται ότι η επίδραση του Zn, γίνεται μέσω της παρέμβασής του στη βιοχημική οδό του υποδοχέα Fas και της καταστολής της κασπάσης-3 (Lambert, Zhou and Kang, 2003). Τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας σε «αρουραίους της όχθης» (bank vole) δείχνουν ότι, διαίτα εμπλουτισμένη με Zn προστατεύει το επιθήλιο των σπερματοφόρων σωληναρίων από την τοξικότητα του φθορίου που επάγει ιστοπαθολογικές αλλαγές όπως νέκρωση και απόπτωση (Krasowska, Wlostowski and Bonda, 2004).

Η ευεργετική επίδραση ειδικά του ενδοκυτταρικού Zn στα κύτταρα, αποδεικνύεται από το γεγονός ότι επάγεται απόπτωση, όταν η συγκέντρωσή του ελαττώνεται. Μια πρώτη έρευνα αποκαλύπτει ότι χαμηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού Zn στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα HL-60 παρατηρούνται πριν από πρώιμα στάδια απόπτωσης (Duffy et al., 2001). Σε μια άλλη μελέτη, φαίνεται πρώτον ότι ο Zn, σε μέτριες συγκεντρώσεις, από 10 έως και 50 μM , προστατεύει από την απόπτωση που επάγεται από το κάδμιο, τα κύτταρα γλοιώματος αρουραίου C6 και δεύτερον ότι η στέρηση του Zn από χηλικό παράγοντα, προκαλεί κυτταρικό θάνατο με χαρακτηριστικά απόπτωσης (Watjen et al., 2002). Μια άλλη έρευνα δείχνει ότι η επώαση μιας μέρας καλλιεργούμενων χονδροκυττάρων με γνωστούς παράγοντες που επάγουν απόπτωση, έχει σαν συνέπεια την σημαντική ελάττωση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού Zn από ενδοκυτταρικές θέσεις σύνδεσης, το οποίο και μεταβαίνει στην εξωκυττάρια ουσία μέσω κυστιδίων (Sauer et al., 2003). Τέλος παρόμοιες παρατηρήσεις σε ότι αφορά τον ρόλο του ενδοκυτταρικού Zn στη επαγωγή της απόπτωσης, γίνονται στα ανθρώπινα κύτταρα μυελοειδούς λευχαιμίας U937 (Tamura et al., 2002) και στο επιθήλιο των σπερματοφόρων σωληναρίων των «αρουραίων της όχθης» (Krasowska, Wlostowski and Bonda 2004).

3.3 Zn και μεταλλοπρωτεάσες

Οι περισσότερες μεταλοενδοπεπτιδάσες περιέχουν Zn σαν απαραίτητο μέταλλο της καταλυτικής τους δράσης. Η ομολογία HEXXH χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των θέσεων σύνδεσης του Zn στις μεταλοπεπτιδάσες όταν νέα αμινοξέα υπεισέρχονται στις αλληλουχίες. Η παραπάνω ομολογία διατηρείται στις περισσότερες ομάδες μεταλλοπρωτεασών. Οι θέσεις H είναι εκείνες με τις οποίες συνδέονται τα άτομα του Zn και το X αντιπροσωπεύει μια ποικιλία αμινοξέων. Το E παριστά το γλουταμικό οξύ που δρα σαν καταλυτική βάση. Οι οικογένειες των μεταλοπεπτιδασών γενικά διακρίνονται με βάση την θέση σύνδεσης των ατόμων Zn που μπορεί να είναι 2,3 ή και 4 (Jiang and Bond, 1992). Οι οικογένειες των μεταλλοπρωτεασών φαίνονται στο σχήμα I.12. Η μεγαλύτερη οικογένεια των Ζινκινών (HEXXH) περιλαμβάνει τις γκλουζινκίνες και τις μετζινκίνες. Η οικογένεια των ενδοπεπτιδασών 24-11, είναι αυτή στην οποία ανήκει η νεπριλίσίνη (E. C. 3. 4. 24.11). Στην οικογένεια αυτή το γλουταμινικό οξύ είναι το τρίτο αμινοξύ που συνδέεται με Zn και βρίσκεται 64 αμινοξέα μετά το N-τελικό άκρο της ομολογίας των γκλουκοζινκινών (HEXXH...E). Στην ίδια οικογένεια ανήκουν το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης, η ομάδα αντιγόνων των ερυθρών αιμοσφαιρίων κ. α. Στην ευρύτερη οικογένεια των γκλουζινκινών ενδεικτικά ανήκουν επίσης το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE), οι νευροτοξίνες του τετάνου και της αλλαντίασης και βακτηριακές θερμολυσίνες της ψευδομονάδας και της λεγκιονέλας (Hooper, 1994). Η δέσμευση του Zn^{2+} , σε in vitro διεργασίες π.χ. με θειώλες που χηλοποιούν το ιόν προκαλεί μείωση της πρωτεολυτικής δράσης ακόμη και ισχυρών μεταλλοπρωτεασών όπως π.χ. της νευροτοξίνης B του *Clostridium botulinum* ενώ αντίθετα η προσθήκη Zn^{2+} σε συγκεντρώσεις 10-20 μM αντάρροπησε την χηλική





Σχήμα Ι.12. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ (Zn) (Hooper, 1994)



δράση των θειολών και αύξησε τον ρυθμό πρωτεόλυσης από 2-10 φορές ανάλογα με την συнχορηγούμενη θειόλα (χηλικό παράγοντα) (Shone and Roberts, 1994). Οι ψευδαργυροπεπτιδάσες και ο Zn αποτελούν ένα ρυθμιστικό ζεύγος πιθανά της δράσης των αλγογόνων/αναλγητικών ουσιών του ανθρώπινου οργανισμού καθώς τροποποιούν και ελέγχουν μεσολαβητές των οδών του πόνου (Vadalouca and Kalfakakou, 1999, Papaioannou et al., 2004).

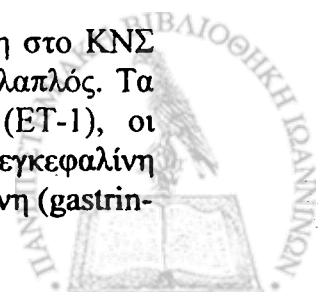
4: ΟΥΔΕΤΕΡΗ ΕΝΔΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗ (NEP)

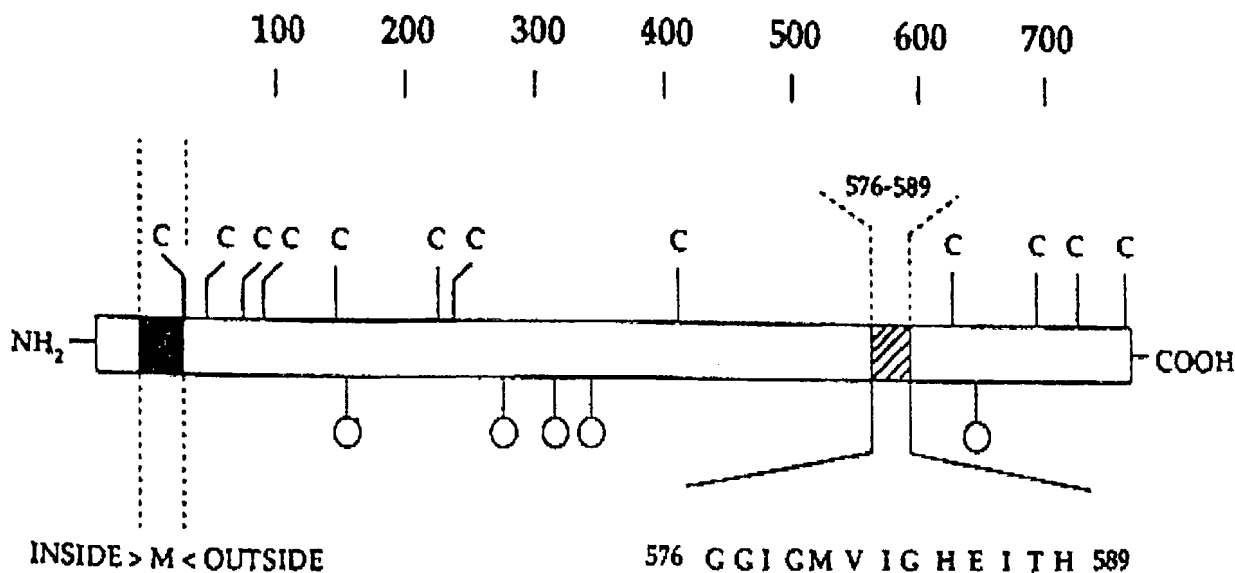
4.1 Γενικά

Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP/CALLA/CD10/Neprilysin E.C. 3.4.24.11.), είναι ένα ένζυμο, που ανακαλύφθηκε στο νεφρό του κουνελιού και του γουρουνιού από το οποίο απομονώθηκε και καθαρίστηκε. Είναι μια γλυκοζυλιωμένη μεταλλοπεπτιδάση με ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο της που διασπά υποστρώματα στο αμινοτελικό άκρο των υδρόφοβων αμινοξέων τους (Roques, et al 1993, Erdös and Skidgel, 1989). Έχει αποδειχτεί ότι το λεγόμενο «κοινό αντιγόνο οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας» CALLA, είναι μια λειτουργική μορφή της NEP (Shipp, et al., 1989). Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) της NEP κωδικοποιεί μια ενδομεμβρανική πρωτεΐνη με 749 αμινοξέα με έξι N-γλυκοζυλιωμένες θέσεις, για την ανθρώπινη NEP, η οποία περιλαμβάνει 12 κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία πιθανόν να εμπλέκονται στον σχηματισμό εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών. Όσον αφορά τη διάταξη των αμινοξέων της, η NEP έχει μια μικρή αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή με 27 αμινοξέα, η οποία ακολουθείται από μια υδρόφοβη ενδομεμβρανική περιοχή με 23 αμινοξέα και τέλος, καταλήγει σε μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή που περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο (σχήμα 1.13). Το μοριακό βάρος της είναι 95-110 kDa (Roques, et al 1993, Erdös and Skidgel 1989). Σχετικά με το ενεργό κέντρο της NEP, δυο κατάλοιπα αργινίνης φαίνεται ότι εντοπίζονται εκεί και συμμετέχουν στη δέσμευση με τα αντιδρώντα: η αργινίνη 747 (Arg⁷⁴⁷) και 102 (Arg¹⁰²), η οποία και μπορεί να δεσμευτεί στην ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα του υπολείμματος P₂' των αντιδρώντων (Beaumont, et al., 1991). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι, το αμινοξύ Asp⁵⁴² σχηματίζει ένα μοναδικό δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα (NH group) του υπολείμματος P₂' των αντιδρώντων. Αυτή η αλληλεπίδραση, μαζί με αυτή την καρβοξυλική ομάδα της Arg¹⁰², σταθεροποιεί το καρβοξυτελικό άκρο μικρών αμινοξέων και έτσι μπορεί να συμβάλλει στην δραστηριότητα της NEP ως πεπτιδυλικής διπεπτιδάσης (Dion, et al., 1995). Η NEP που απομονώθηκε από το νεφρό και τον εγκέφαλο του αρουραίου και τον πλακούντα του ανθρώπου εμφανίζει μεγαλύτερη από 90% ομολογία με το αντίστοιχο ένζυμο του κουνελιού, με τη μόνη σημαντική διαφορά να είναι ο αριθμός των πιθανών θέσεων γλυκοζυλίωσης οι οποίες είναι 5 στην NEP του κουνελιού και 6 στον άνθρωπο και στον αρουραίο (Roques et al., 1993, Erdös and Skidgel, 1989).

4.2 Δράσεις της NEP

Η NEP υδρολύει ρυθμιστικά πεπτίδια καθώς είναι ευρέως κατανεμημένη στο ΚΝΣ και σε περιφερικούς ιστούς, και ο φυσιολογικός της ρόλος φαίνεται πολλαπλός. Τα ρυθμιστικά αυτά πεπτίδια είναι η ουσία P (SP), η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), οι εγκεφαλίνες μετεγκεφαλίνη ([Met]enkephalin) και λευκοεγκεφαλίνη ([Leu]enkephalin), η βομβεσίνη, το πεπτίδιο που εκκρίνεται από τη γαστρίνη (gastrin-





Σχήμα I.13 ΣΧΗΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΝΕΡ. Η ενδοκυττάρια περιοχή (αμινοξέα 1 έως 27) ακολουθείται από μια περιοχή που καλύπτει την μεμβράνη (M, αμινοξέα 28 με 50) και το υπόλοιπο του ενζύμου είναι στο εξωκυτταρικό διάστημα. Όπου C, 12 υπολείμματα κυστεΐνης, όπου «κύκλοι», οι θεωρούμενες θέσεις γλυκοσυλίωσης, όπου «ανοιγμένη» περιοχή, συναινετική αλληλουχία με αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της θερμολυσίνης (Roques et al., 1993).

releasing peptide), οι ταχυκινίνες και άλλα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την κατανομή της, είναι πολύ άφθονη σε μεμβράνες επιθηλιακών κυττάρων των λάχνων του εντέρου και του νεφρού, των λεμφαδένων και του πλακούντα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να βρεθεί στον πνεύμονα, στους όρχεις, στον προστάτη, στους ινοβλάστες, στα ουδετερόφιλα, στα χονδροκύτταρα στον αρθρικό χόνδρο, στους εξωκρινείς αδένες και σε διάφορα επιθηλιακά και ενδοκρινικά κύτταρα (Roques et al., 1993).

Σε ότι αφορά το φυσιολογικό της ρόλο πρώτον έχει βρεθεί ότι ινοβλάστες δέρματος ηλικιωμένων ατόμων εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα NEP από τους αντίστοιχους νεότερων δοτών. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε *in vitro* γερασμένους ινοβλάστες πνεύμονα. Η επινεφριδιοτρόφος ορμόνη ACTH, που διασπάται από την NEP, προκάλεσε αύξηση της ενζυμικής της δραστικότητας σε εμβρυικούς ή νεαρούς ινοβλάστες και μείωσή της σε ινοβλάστες από ενήλικες (Kletsas et al., 1998). Οι παραπάνω παρατηρήσεις επισημαίνουν τον ρόλο της NEP στις διάφορες ηλικίες. Ο κύριος ρόλος της NEP ωστόσο φαίνεται να είναι ρυθμιστικός του πόνου και της φλεγμονής όπως και αρκετών από τις άλλες Zn-μεταλλοπρωτεάσες. Σημαντική μείωση του πόνου καρκινοπαθών και μείωση της δόσης των χορηγούμενων αναλγητικών οπιοειδών παρατηρήθηκε με τη χορήγηση Vit C, που αυξάνει τις συγκεντρώσεις ACTH, κορτιζόλης και ενδορφινών (Evangeliou et al., 2000). Η NEP εκτός από τη ρύθμιση που ασκεί σε όλες τις παραπάνω αναλγητικές ουσίες διασπά επίσης και την SP, αλγογόνο ουσία που συμμετέχει στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Matucci-Cerinic et al., 1993). Ακόμα, η δυναμική σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων και της ενζυματικής δράσης της NEP στην κυτταρική επιφάνεια, έδειξε ότι το ένζυμο αυτό παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανταπόκρισης των ουδετεροφίλων σε διάφορα φλεγμονώδη πεπτιδία (Shipp et al., 1991). Η NEP επιπλέον, μπορεί να παίζει κεντρικό ρόλο σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ακεραιότητα των αεραγωγών και τη ρύθμιση της νευρογενούς φλεγμονής τους, στο άσθμα και σε άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές (Di Maria, Bellofiore and Gerpetti, 1998). Σε ότι αφορά ειδικά το δέρμα βρέθηκε πρόσφατα ότι, η NEP λόγω της πρωτεολυτικής διάσπασης πεπτιδικών μεσολαβητών και αυξητικών παραγόντων που ασκεί, αποτελεί σημαντικό παράγοντα ελέγχου για την φλεγμονώδη αντίδραση σε παθήσεις του δέρματος όπως η ψωρίαση ή η αλλεργική φλεγμονή, και μπορεί επίσης να επηρεάσει την χρώση του δέρματος, την κυτταρική επιβίωση, την επούλωση τραύματος και την ιστική αναγέννηση (Scholzen and Luger, 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ότι, τα επίπεδα του mRNA της ET-1 και της NEP ποικίλουν σε διάφορα ιστικά διαμερίσματα της ανθρώπινης μήτρας. Συγκεκριμένα, στο μυομήτριο και στο λειομύωμα, το mRNA της ET-1 εκφράζεται ενώ υπάρχει απουσία mRNA της NEP. Ακόμα, η NEP, είναι σε υψηλά επίπεδα στο ενδομήτριο στη φάση προ-εμφύτευσης, πράγμα που πιθανόν ελαττώνει την αγγειοσυσταλτική επίδραση της ET-1, και έτσι επιτρέπει την καλύτερη αιμάτωση στο σημείο της εμφύτευσης (Pekonen, Nyman and Rutanen, 1994). Ακόμα, το γεγονός ότι η NEP απενεργοποιεί την ισχυρά νατριουρητική και αγγειοχαλαρωτική ορμόνη «κολπικό νατριουρητικό πεπτιδίο» (ANP), αποδεικνύει ότι είναι πιθανή η χρήση αναστολέων του ενζύμου αυτού σαν διουρητικών και αντι-υπερτασικών παραγόντων (Roques and Beaumont, 1990). Επιπλέον η NEP, αναγνωρίζεται ιστοχημικά στην κορυφή της πλασματικής μεμβράνης ανθρώπινων εκκριτικών κυττάρων του προστάτη σε αντίθεση, με τους ιστούς και τα κύτταρα καρκινώματος του προστάτη όπου εντοπίζεται κατά προτίμηση στο κυτταρόπλασμα, ίσως λόγω αλλαγών στη γλυκοζυλίωση του μορίου. Έτσι τονίζεται ότι οι αλλαγές στην έκφραση και στον εντοπισμό της NEP δείχνουν τον σημαντικό ρόλο του ενζύμου αυτού στην αποικοδόμηση νευροπεπτιδίων του

προστάτη, που προκαλούν την διέγερση της ανάπτυξης του καρκίνου (Renneberg et al., 2001). Σε άλλη μια έρευνα, φαίνεται ότι η NEP σταματάει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, πιθανόν με απενεργοποίηση των νευροπεπτιδίων βομβεσίνη και ET-1, γεγονός που αποδεικνύει ότι η NEP μπορεί να ρυθμίζει την εισβολή και τη μετάσταση του καρκίνου (Sumitomo et al., 2000). Η έκφραση της NEP χαρακτηρίζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές και πρωτογενή δείγματα όγκου από «μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα» (non-small cell lung carcinomas), όπου φαίνεται ότι παρόλο που οι κυτταρικές σειρές των βρογχοκυψελιδικών καρκινωμάτων και αυτών των μεγάλων κυττάρων έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης και ενζυματικής δράσης της NEP, οι κυτταρικές σειρές από πλακώδη και αδενοπλακώδη, έχουν υψηλότερα και πιο ποικίλα επίπεδα του ένζυμου στην κυτταρική επιφάνεια (Ganju et al., 1994). Επίσης όσον αφορά τον πνεύμονα, η NEP εντοπίζεται στο επιθήλιο των κυψελίδων και των αεροφόρων οδών καθώς και στους ινοβλάστες, ενώ αντίθετα δεν εντοπίζεται στον «μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα» (small cell lung cancer), στο αδενοκαρκίνωμα, στο πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα και στους καρκινικούς όγκους του οργάνου αυτού (Cohen et al., 1996). Στο κανονικό περιφερικό αίμα, τα ώριμα κοκκιοκύτταρα είναι τα μοναδικά κύτταρα που εκφράζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα του mRNA της CALLA/NEP, το αντιγόνο της CALLA και συγκεκριμένη δράση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (Tran-Paterson et al., 1990). Μία *in vitro* μελέτη στη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος Neuro2A, έδειξε ότι, η ανασυνδυασμένη NEP εντοπίζεται κατά προτίμηση στους νευρίτες των κυττάρων αυτών. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την θεωρία στην οποία τονίζεται ότι, εφόσον ο ρόλος της NEP είναι να σταματάει την φυσιολογική δράση βιοενεργών πεπτιδίων, θα πρέπει να βρίσκεται κοντά στα σημεία από όπου τα πεπτίδια αυτά απελευθερώνονται ή στους υποδοχείς τους (Lemay et al., 1990).

Όσον αφορά το ΚΝΣ, η NEP που είναι γνωστή και ως «εγκεφαλίναση», είναι κατανοημένη στον εγκέφαλο του αρουραίου με την υψηλότερη συγκέντρωση στο χοριοειδές πλέγμα, στον κερκοφόρο πυρήνα, στην ωχρά σφαίρα και στη πηκτωματώδη ουσία του νωτιαίου μυελού. Στο χοριοειδές πλέγμα, η NEP μπορεί να παίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση των συγκεντρώσεων των νευροπεπτιδίων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η τοποθεσία της NEP στην πηκτωματώδη ουσία επιβεβαιώνει τον πιθανό ρόλο της, στην απενεργοποίηση της SP και των εγκεφαλίνων σε αυτή τη περιοχή (Roques et al., 1993).

4.3 NEP και πόνος

Ο ρόλος της NEP στον πόνο φαίνεται πρώτον, από το γεγονός ότι οι περιοχές ανίχνευσης της πρωτεΐνης αυτής ταιριάζουν με τις περιοχές ανίχνευσης των υποδοχέων οπιοειδών μ- και δ- και δεύτερον, οι παράγοντες που αναστέλλουν την NEP έχει βρεθεί ότι παρατείνουν τις αναλγητικές επιδράσεις των εγκεφαλίνων μιας και όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο αυτό εμπλέκεται στην απενεργοποίηση των οπιοειδών πεπτιδίων, εγκεφαλίνων, στο ΚΝΣ (Erdös and Skidgel, 1989). Πράγματι μια μελέτη δείχνει ότι η ουσία RB120, η οποία επάγει σημαντικές δοσοεξαρτούμενες αναλγητικές αντιδράσεις σε ποντίκια και αρουραίους με χορήγηση από το στόμα, φαίνεται ότι ενισχύεται με αναστολείς της NEP και της αμινοπεπτιδάσης N (APN) (Noble et al., 1997). Ακόμα σε άλλη έρευνα φαίνεται ότι σκευάσματα που περιέχουν αμινοφωσφονική ομάδα γενικού μοριακού τύπου $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{R}_1)\text{P}(\text{O})\text{-(OH)CH}_2\text{-CH}(\text{R}_2)\text{CONH-CH}(\text{R}_3)\text{COOH}$, στα οποία οι πλευρικές αλυσίδες έχουν επιλεγεί για την καλύτερη αναγνώριση της NEP και της APN, είναι οι πρώτοι ανταγωνιστικοί αναστολείς με χημικές συγγένειες σε panopolar και για τα δύο ένζυμα. Επίσης είναι

ισχυροί αναστολείς για οξύ και για χρόνιο πόνο σε μοντέλα ζώων (Chen et al., 1998). Επίσης, μελέτες σε αρουραίους Wistar δείχνουν ότι, η σιαλορφίνη (sialorphin), ένας εξωκρινής και ενδοκρινής μεσολαβητής σήματος που παράγεται από τους υπογνάθιους αδένες και τον προστάτη αρουραίων σε απάντηση προς τα στεροειδή ανδρογόνα και απελευθερώνεται τοπικά και συστηματικά σε απάντηση προς το στρες, είναι ένας φυσικός αναστολέας της NEP στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα, η σιαλορφίνη αναστέλλει τον οξύ τον δυνατό πόνο που προκαλείται από μηχανικούς και χημικούς παράγοντες και επιπλέον φαίνεται ότι παράγει τουλάχιστο μέρος των αναλγητικών επιδράσεών της, ενισχύοντας τις ενδογενείς χημικές οδούς που εξαρτώνται από τους μ - και δ - υποδοχείς οπιοειδών, με συμμετοχή των ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων, των εγκεφαλίνων (Rougeot et al., 2003). Αντίθετα, σε μια άλλη έρευνα φαίνεται ότι διαγονιδιακά ποντίκια που στερούνται της NEP, δεν ανταποκρίνονται με μειωμένη αντίληψη πόνου μιας και η γενετική εξάλειψη της NEP, σε αντίθεση με τη φαρμακολογική αναστολή, οδηγεί στην υπεραλγησία που επάγεται από τη βραδυκινίνη αντί της αναλγησίας μέσω της εγκεφαλίνης (Fischer et al., 2002).

4.4 Οπιοειδή και απόπτωση

Σε ορισμένες μελέτες φαίνεται ότι τα οπιοειδή πεπτίδια προκαλούν αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επαγωγή απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων. Συγκεκριμένα μια πρώτη μελέτη δείχνει ότι το ενδογενές οπιοειδές μετεγκεφαλίνη ($[Met^5]$ -enkephalin) ή «οπιοειδής αυξητικός παράγοντας» (opioid growth factor), εντοπίζεται με τον υποδοχέα του (ζ), στο εκτόδερμα, στο μεσόδερμα και στο ενδόδερμα εμβρύων αρουραίου και ανθρώπου, επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την οργάνωση των ιστών σαν ένα ενεργά ανασταλτικό αυξητικό μόριο. Συγκεκριμένα, η οξεία έκθεση ενός θηλυκού που κυοφορεί, στο οπιοειδές αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της σύνθεσης του DNA στα κύτταρα και στα όργανα που αντιπροσωπεύουν και τις τρεις βλαστικές στιβάδες, γεγονός που γίνεται μέσω του υποδοχέα (Zagon, Wu and McLaughlin, 1999). Επίσης, όπως φαίνεται σε άλλη έρευνα, τα οπιοειδή μορφίνη και $[D-Ala^2, N-Me-Phe^4, Gly^5-Ol]$ enkephalin ή DAGO επάγουν απόπτωση στα T κύτταρα πιθανόν μέσω της βιοχημικής οδού της κινάσης c-Jun NH₂ (JNK) και της ενεργοποίησης των κασπασών-8 και -3 (Singhal et al., 2001). Μια επιπλέον μελέτη δείχνει την ανασταλτική δράση οπιοειδών πεπτιδίων, μεταξύ των οποίων και της μετεγκεφαλίνης, στον πολλαπλασιασμό κυττάρων μήτρας αρουραίου κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, σε δύο διαφορετικές φάσεις με ένα χρονικό διάστημα μη ευαισθησίας ανάμεσα στις φάσεις αυτές (Kompyei et al., 2003). Τέλος, μια άλλη έρευνα σε ουδετερόφιλα περιφερικού αίματος *in vitro*, δείχνει ότι η μετεγκεφαλίνη και η β -ενδορφίνη ενισχύουν την απόπτωσή τους με δόσοεξαρτώμενο τρόπο η οποία επάγεται και μέσω του TNF- α και χωρίς αυτόν (Sulowska et al., 2003).

4.5 Εντοπισμός και ρόλος της NEP και των εγκεφαλινών στα κύτταρα του δέρματος

Σε ότι αφορά το ανθρώπινο δέρμα, βρέθηκε ότι η NEP εκφράζεται στην επιδερμίδα από τα κερατινοκύτταρα. Αυτό αποδεικνύεται πρώτον, από τον εντοπισμό της στο κανονικό και στο τραυματισμένο ανθρώπινο δέρμα, δεύτερον από τον εντοπισμό του mRNA της πρωτεΐνης αυτής σε καλλιεργούμενα κερατινοκύτταρα και από μελέτη της δραστηριότητας της NEP επίσης σε καλλιεργούμενα κερατινοκύτταρα (Olegrud et al., 1999). Αντίθετα, μια πιο πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η ενζυμική δραστηριότητα της

NEP από την κυτταρική μεμβράνη καλλιεργούμενων ανθρώπινων κερατινοκυττάρων υγιούς δέρματος, δεν παρατηρείται (Gabrilovac et al., 2004).

Τα οπιοειδή πεπτιδία εγκεφαλίνες έχουν εντοπιστεί κοντά στην επιδερμίδα και εκτός από την κεντρική και περιφερική αναλγητική τους ιδιότητα, μπορούν να ρυθμίζουν την ανοσοποιητική δραστηριότητα και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε μια πρώτη έρευνα που μπορεί να αναφερθεί, φαίνεται ότι αφενός η μετεγκεφαλίνη ($[Met^5]$ -enkephalin) και ο υποδοχέας οπιοειδών ζ συνδέονται με τα επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου δέρματος με τρόπο παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται σε ποντίκια και αφετέρου, το οπιοειδές αυτό πεπτίδιο μπορεί να παίζει το ρόλο μίας τονοτικής ανασταλτικής ουσίας στον ομοιοστατικό έλεγχο της σύνθεσης του DNA στο δέρμα ποντικού αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Zagon, Wu and McLaughlin, 1996). Μια μελέτη σε καλλιεργούμενα κανονικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα από ασθενείς που υπέστησαν πλαστική εγχείρηση, δείχνει πρώτον ότι αυτά παράγουν εγκεφαλίνες ενδογενώς, δεύτερον ότι οι εγκεφαλίνες μπορεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση της διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών και τρίτον ότι η ανασταλτική δράση της μεθιονίνης-εγκεφαλίνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, είναι μέτρια (10-15%) και δεν έχει βιολογική σημασία (Nissen and Kragballe, 1997). Κατατοπιστικά συμπεράσματα προκύπτουν και από μια άλλη μελέτη, σχετικά με το ρόλο των οπιοειδών πεπτιδίων, που πραγματοποιείται στο δέρμα της ουράς ποντικού. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι, πρώτον η τοπική μετεγκεφαλίνη και ο υποδοχέας της εκφράζονται στα κύτταρα της επιδερμίδας του τραυματισμένου και μη δέρματος της ουράς ποντικού, δεύτερον η απομάκρυνση της στοιβάδας κερατίνης (stratum corneum) δεν επηρεάζει την λειτουργία του ενδογενούς συστήματος πολλαπλασιασμού από οπιοειδή, τρίτον η ανταπόκριση κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον τραυματισμό της ουράς αναστέλλεται δυναμικά από τη δράση, μέσω υποδοχέα, ενός ενδογενούς οπιοειδούς πεπτιδίου και τέλος η σύνθεση του DNA από τα βασικά κύτταρα μπορεί να αυξηθεί αναστέλλοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του οπιοειδούς πεπτιδίου και του υποδοχέα (Wilson et al., 2000).

4.6 NEP, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση

Ο ρόλος της NEP στην ελάττωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στον θάνατο κυττάρων από απόπτωση, έχει αναφερθεί σε διάφορες δημοσιεύσεις. Μια πρώτη μελέτη αναφέρει ότι, η NEP έχει την ικανότητα να απενεργοποιεί τη δραστηριότητα πολλαπλασιασμού των θυμοκυττάρων από την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), με απευθείας απενεργοποίησή της πριν από την επαφή της με τα κύτταρα (Pierart et al., 1988). Σε μια άλλη έρευνα τονίζεται ότι NEP υδρολύει τα παρόμοια με τη βομβεσίνη πεπτιδία ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κακοηθών πνευμονικών νευροενδοκρινικών κυττάρων τα οποία παράγουν και ανταποκρίνονται στα πεπτιδία αυτά και λειτουργώντας ως ένας αναστολέας όγκων η απώλεια του οποίου μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (Shipp et al., 1991). Όσον αφορά επίσης κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, έχει αποδειχτεί σε άλλη μελέτη, ότι η ανασυνδυσμένη NEP (r-NEP) αναστέλλει την ανάπτυξη κανονικών και καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα *in vitro* και *in vivo* σε αθυμικά ποντίκια με δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο, δείχνοντας ότι η NEP μπορεί να παίζει ρόλο στην απορρύθμιση του αυτοκρινούς/παρακρινούς συστήματος των νευροπεπτιδικών ορμονών (Bunn et al., 1998). Επιπλέον το ένζυμο αυτό, όπως αναφέρεται σε άλλη έρευνα, ρυθμίζει την ανάπτυξη και την ωρίμανση του κανονικού εμβρυϊκού πνεύμονα μέσω των ενδογενών πεπτιδίων παρόμοιων της βομβεσίνης

(King et al., 1993). Μια άλλη μελέτη εξετάζει την υπερπλασία των κανονικών νευροενδοκρινικών κυττάρων του πνεύμονα σε ποντίκια Hamster, από το «πεπτίδιο απελευθέρωσης της γαστρίνης» (gastrin releasing peptide), σε σχέση με την αναστολή της NEP και αποκαλύπτει ότι, η πρόωμη και ταχεία υπερπλασία των κυττάρων αυτών από το πεπτίδιο αυτό προάγεται από την αναστολή της NEP και δεύτερον ότι οι σημαντικοί κυτταρικοί μηχανισμοί για την υπερπλασία αυτή είναι η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μείωση της απόπτωσης (Willett et al., 1999). Σε άλλη έρευνα παρατηρείται ότι η υπερέκφραση και η ενζυματική δραστηριότητα της NEP χρειάζεται για την παύση της ανάπτυξης των T κύτταρων Jurkat που προκαλείται από τον φορβοδιεστέρα που ονομάζεται «ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C» και επομένως ενισχύεται ο ρόλος της NEP ως σημαντικού ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού των αιμοποιητικών κυττάρων (Mari et al., 1997). Τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας δείχνουν ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που επάγεται από ιασπαμίδιο (jaspamide), ένα φυσικό πεπτίδιο απομονωμένο από θαλασσινούς σπόγγους με ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη κυττάρων, στα ανθρώπινα προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα HL-60, συνοδεύεται από την έκφραση της NEP/CD10 στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρόλο που τα κύτταρα HL-60 δεν εκφράζουν κανονικά ανιχνεύσιμη ποσότητα NEP στην επιφάνεια ή ενδοκυτταροπλασματικά, με τη χορήγηση του ιασπαμιδίου η σύνθεση της NEP γίνεται εκ νέου (Cioca and Kitano, 2002). Σύμφωνα με αποτελέσματα μιας μελέτης που έγινε σε ινοβλάστες ασθενών με διάχυτη συστημική σκλήρυνση ή σκληρόδερμα (diffuse systemic sclerosis), παρατηρείται η αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων τους και ακόμα το γεγονός ότι η έκφραση της CD10 στην κυτταρική μεμβράνη τους είναι χαμηλή ενώ η ενδοκυττάρια NEP, είναι υψηλή πιθανόν λόγω μετατόπισης από την μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, φαινόμενο που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική υπερδραστηριότητα και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους (Matucci-Cerinic et al., 1999). Σε μια άλλη μελέτη, τονίζεται ότι η εξωγενώς ανασυνδυασμένη NEP ή η εισαγωγή cDNA της NEP σε μη εξαρτώμενα από ανδρογόνα κύτταρα καρκίνου του προστάτη, αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών (Papandreou et al., 1998). Επίσης σε καρκινικά κύτταρα προστάτη φαίνεται ότι, ένας μηχανισμός με τον οποίο η NEP προωθεί την επαγωγή απόπτωσης από τον φορβολεστέρα «12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate» (TPA), είναι η σταθεροποίηση της έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης Cδ (PKCδ), μέσω της οποίας επάγεται η απόπτωση από τον TPA (Sumitomo et al., 2000). Επιπλέον τονίζεται ότι η επαγόμενη από τα ανδρογόνα καταστολή της ανάπτυξης των κυττάρων του μη εξαρτημένου από τα ανδρογόνα καρκίνου του προστάτη, PC3 και LNCaP-OM1, πραγματοποιείται εν μέρει από την επαγόμενη από τα ανδρογόνα έκφραση της NEP σε αυτά τα κύτταρα (Shen et al., 2000). Ο δυναμικός ρόλος της NEP στη ρύθμιση των επιδράσεων των νευροπεπτιδίων ενδοθηλίνης-1 και βομβεσίνης στα πλαίσια της κυτταρικής επιβίωσης εξετάζεται και σε μια άλλη μελέτη όπου φαίνεται ότι η NEP αναστέλλει την ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού επιβίωσης Akt, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα που προσομοιάζει με την ινσουλίνη (insulin-like growth factor receptor) γεγονός που αποδεικνύει ότι η απώλεια της έκφρασής της από τα κύτταρα καρκίνου του προστάτη, έχει σαν αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στην απόπτωση (Sumitomo et al., 2001). Οι αντιογκογόνες επιδράσεις της NEP και η μεγάλη χρησιμότητά της στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη που δεν εξαρτάται από τα ανδρογόνα, φαίνεται σε μια άλλη έρευνα, όπου η υπερέκφραση της NEP στα κύτταρα αυτά έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξής τους, την επαγωγή

απόπτωσης, την παύση του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της δημιουργίας όγκου (Dai et al., 2001). Πιο πρόσφατα, βρέθηκε ότι η ενζυμική δράση της NEP συντελεί στην απόπτωση κυττάρων καρκίνου του προστάτη, που επάγεται από αντικαρκινικά φάρμακα γεγονός που εξαρτάται από μιτοχονδριακές διαδικασίες μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C-δ. Το σημαντικό αποτέλεσμα της έρευνας αυτής, είναι ότι ο συνδυασμός της NEP με αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδος, γιατί η ανασυνδυασμένη NEP (rNEP) είναι ικανή να αυξήσει την χημειοευαισθησία στον ανεξάρτητο από ανδρογόνα καρκίνο του προστάτη με ελάχιστη τοξικότητα στους κανονικούς ιστούς (Sumitomo et al., 2004).

Η μειорύθμιση, η απώλεια ή και η αναστολή της δραστηριότητας της NEP σε καρκινικά κύτταρα έχει σαν συνέπεια τη προώθηση του όγκου, λόγω της ανασταλτικής της ιδιότητας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως φαίνεται σε διάφορες μελέτες. Σε μια πρώτη έρευνα αποδεικνύεται ότι στο ανθρώπινο καρκίνωμα του ενδομήτριου το mRNA της ενδοθηλίνης-1 (ET1) εκφράζεται, ενώ τα σχετικά επίπεδα των mRNA που κωδικοποιούν τους υποδοχείς της ενδοθηλίνης (ETRs) ή της NEP, είναι χαμηλά ή μη εντοπισμένα (Pekonen et al., 1995). Επίσης, φαίνεται από τους Suzuki et al, (2001) ότι η NEP μειορυθμίζεται ενώ η ET1 αυξορυθμίζεται με αυξανόμενο βαθμό καρκίνου, στα κύτταρα του στρώματος του αδενοκαρκινώματος του ενδομήτριου και προκύπτει το συμπέρασμα ότι η δυσαναλογία μεταξύ της έκφρασης της NEP και της ET1 σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να παίζει ένα ρόλο στη εξέλιξη του όγκου και τη διαφοροποίησή του σε αυτή την ασθένεια, μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους (Suzuki et al., 2001). Τα αποτελέσματα μελέτης σε «καρκινώματα μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα» (non-small cell lung carcinomas) με χαμηλά επίπεδα της NEP δείχνουν, ότι αυτά μπορεί να έχουν υπεροχή στον πολλαπλασιασμό (Ganju et al., 1994). Επίσης, η έκφραση και η δραστηριότητα της NEP, είναι πολύ χαμηλή ή μη-ανιχνεύσιμη σε ιστούς και σε κυτταρικές σειρές, τόσο «μικροκυτταρικού» (small cell lung cancer), όσο και «μη μικροκυτταρικού» (non-small cell lung cancer) καρκίνου του πνεύμονα, ενώ μια δραστήρια μορφή του ένζυμου εκφράζεται στους παρακείμενους ιστούς του. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι, αφενός η NEP παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα και αφετέρου, ότι μπορεί το γονίδιο της NEP να δράσει και ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Cohen et al., 1996). Όπως επίσης προκύπτει από μια μελέτη σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη, όταν η έκφραση της NEP μειώνεται, τα νευροπεπτίδια μπορούν να αυξήσουν τον πολλαπλασιασμό τους, οδηγώντας στην ανάπτυξη κυτταρικού πληθυσμού από καρκινικά κύτταρα που είναι ανεξάρτητα από τα ανδρογόνα και διεγείρονται από τα νευροπεπτίδια (Papandreou et al., 1998). Μια άλλη έρευνα δείχνει για πρώτη φορά ότι η απώλεια της έκφρασης της NEP σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, μπορεί να γίνει με υπερμεθυλίωση του προαγωγέα της, γεγονός που μπορεί να συντελεί στη ανάπτυξη του πληθυσμού των κυττάρων αυτών από νευροπεπτίδια (Usmani et al., 2000). Ακόμα, τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης δείχνουν ότι η πρωτεϊνική έκφραση της NEP μειορυθμίζεται στον καρκίνο των κυττάρων του νεφρού, όταν αυτή συγκρίνεται με το νεφρικό παρέγχυμα (Gohring et al., 1998). Σε μια άλλη μελέτη όπου γίνεται μορφολογικός υπολογισμός της έκφρασης της NEP (CD10) σε διάφορους βαθμούς θυλακικού λεμφώματος και των μεσοθηλιακών διηθημάτων του φάνηκε ότι η έκφρασή της είναι συχνά αδύναμη ή και αρνητική στον βαθμό III του λεμφώματος καθώς και στα μεσοθηλιακά διηθήματα (Eshoa et al., 2001). Τέλος σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, φαίνεται ότι η αναστολή της δραστηριότητας της NEP αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καλλιιεργούμενων κυττάρων νευροβλαστώματος από το «εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο»

(vasoactive intestinal peptide) γεγονός που δείχνει ότι η αύξηση της δραστηριότητας της NEP, μπορεί να χρησιμεύσει για τη θεραπεία του καρκίνου (Wollman et al., 2002). Αντίθετα αποτελέσματα άλλων δημοσιεύσεων δείχνουν ότι η NEP εκφράζεται περισσότερο σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων ιστών όπως σε κύτταρα στρώματος του καρκίνου του μαστού, στα κύτταρα στρώματος που περιβάλλουν νεοπλάσματα του ορθού του παχέως εντέρου (colorectal tumor) καθώς και στο μελάνωμα του ανθρώπινου δέρματος, από ότι σε κανονικά, παίζοντας ρόλο στη καρκινογένεση διευκολύνοντας την διήθηση και τη μετάσταση του καρκίνου (Iwaya et al., 2002, Ogawa et al., 2002, Kanitakis, Narvaez and Claudy, 2002).

Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη των επιδράσεων ειδικών παραγόντων της φυσιολογίας του πόνου όπως το τοπικό αναισθητικό ροπιβακαΐνη, το απαραίτητο για τον οργανισμό ιχνοστοιχείο ψευδάργυρος (Zn), σημαντικό στη νευροδιαβίβαση και η μεταλλοπεπτιδάση ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP) που διασπά τα ενδογενή οπιοειδή, σε αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα ανθρώπου HaCaT. Επίσης μελετήθηκαν οι πιθανοί μηχανισμοί επαγωγής της απόπτωσης ειδικά από τη ροπιβακαΐνη, σε σχέση με τα αντι-αποπτωτικά γονίδια κλαστρίνη/ApoJ και Bcl-2.



II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Κατάλογος με τα σημαντικότερα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Υλικό	Εταιρεία
DMEM	Biochrom KG, Germany
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Biochrom KG, Germany (Seromed)
Πεκικυλλίνη/Στρεπτομυκίνη 10000 IU/ml / 10000 µg/ml	Biochrom KG, Germany
L-γλουταμίνη (200 mM)	Biochrom KG, Germany
Θρυψίνη - EDTA	Biochrom KG, Germany
PBS	Sigma Chemical Co.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Lab M, U.K
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Lab M, U.K
Άγαρ	Lab M, U.K
Ροπιβακαΐνη (Naropeine-ropivacaine Hydrochloride)	AstraZeneca
Zn(NO ₃) ₂	BDH Chemicals Ltd Polle England
Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO)	Sigma Chemical Co.
Πολυβρίνη (Polybrene)	Aldrich Chemical Co.
1 kb DNA ladder	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-Hind III digest	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-BstEII Digest	Life Technologies Inc.
Ένζυμα περιορισμού DNA	New England Biolabs
Αγαρόζη	Life Technologies Inc.
Πρότυποι μάρτυρες πρωτεϊνών (Kaleidoscope Prestained Standards)	BIORad Laboratories, USA
Qiagen αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Qiagen, Germany
Nucleobond kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Nucleobond
Αντιδραστήριο Bradford: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrare	Bio-Rad
Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Πρωτεΐνες)	Schleicher and Schnell Optitran BA - S - 85
ECL kit	Amersham International
Αντισώματα	SantaCruz Biotech, USA BD Transduction Laboratories, USA
Διάφορα στερεά χημικά (MOPS, SDS, EDTA, NaCl, NaOH, Tris, βορικό οξύ, βρωμοφαινόλη, κρυσταλλικό ώδες, οξικό νάτριο, γλυκίνη, βρωμιούχο αιθίδιο, ακρυλαμίδιο, δις-ακρυλαμίδιο)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co.
Πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας	CellTek



(Τρυβλία, σιφώνια)	
Πλαστικοί σωλήνες (15 ml, 50 ml)	Falcon
Μικροσωλήνες	Eppendorff
φασματοφωτόμετρο	SHIMADZU UV-1601

ΜΕΘΟΔΟΙ

1: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1.1 Χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς HaCaT

Οι κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν τα αυθόρμητα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα δέρματος HaCaT. Τα κύτταρα αυτά αρχικά απομονώθηκαν από ένα δείγμα ιστολογικά κανονικού δέρματος ανθρώπου άρρενος, από την απομακρυσμένη περιφέρεια ενός μελανώματος. Στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε ασβέστιο και η κυτταρική σειρά που χαρακτηρίστηκε ως HaCaT προέκυψε επιδεικνύοντας την προέλευσή τους (ανθρώπινα κερατινοκύτταρα δέρματος) και το γεγονός ότι πολλαπλασιάζονται κάτω από συνθήκες χαμηλών ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) και ανεβασμένης θερμοκρασίας ($38,5^{\circ}\text{C}$). Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα HaCaT, επέδειξαν ένα ενδιάμεσο φαινότυπο πολυγωνικών κυττάρων διάσπαρτων με γιγαντιαία συχνά πολυπυρηνικά κύτταρα και μονούς κερατινοποιημένους φακέλους. Μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια τα κύτταρα HaCaT βαθμιαία ξέφυγαν από τον περιβαλλοντικά καθορισμένο έλεγχο ανάπτυξης *in vitro* και τελικά έγιναν αυτόνομα, δηλαδή ικανά για ανάπτυξη κλώνων κάτω από διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού για περισσότερες από 140 ανακαλλιέργειες (όπου έγιναν τουλάχιστον 600 διπλασιασμοί πληθυσμού) καμία προφανής κρίση δεν παρατηρήθηκε. Όταν πρωτοδοκιμάστηκαν (στην ανακαλλιέργεια 5) τα κύτταρα HaCaT είχαν ήδη επιδείξει αλλαγμένες ιδιότητες στην ανάπτυξη σε σύγκριση με κανονικά κερατινοκύτταρα και μπορούσαν να αναπτυχθούν σε πυκνότητες κλώνων (10^3 κύτταρα ανά τρυβλίο των 60mm). Γύρω στην δέκατη ανακαλλιέργεια τα κύτταρα ανέπτυξαν πλήρη ανεξαρτησία και για την συγκέντρωση των Ca^{+2} και για τη θερμοκρασία. Όσον αφορά την χρωμοσωμική σύσταση των κυττάρων HaCaT, σε πρώιμο στάδιο ανακαλλιέργειας ήταν προφανείς οι αλλαγές στον αριθμό και τη δομή του καρυότυπου. Συγκεκριμένα η πλειοψηφία των κυττάρων ήταν υποδιπλοειδική με ένα μέσο όρο 44 χρωμοσωμάτων που προέκυψε από πλήρεις ή μερικές μονοσωμίες χρωμοσωμάτων οι οποίες είχαν σαν αποτέλεσμα στην δημιουργία τριών χρωμοσωμάτων δεικτών (marker chromosomes). Αρχίζοντας από την ανακαλλιέργεια 5 μια υποτετραπλοειδική βλαστική σειρά αναπτύχθηκε με μια διακύμανση 72-88 χρωμοσωμάτων (συμπεριλαμβανομένου και του διπλασιασμού των πρώιμων δεικτών) και ένα τέταρτο χρωμόσωμα δείκτης εμφανίστηκε. Όπως προέκυψε με ανάλυση «δακτυλικού αποτυπώματος DNA» (DNA fingerprinting), το δείγμα του DNA των κυττάρων HaCaT ήταν ταυτόσημο με αυτό από τον ιστό του δότη. Επιπλέον, παρ' όλες τις τεκμηριωμένες δραστικές κυττογενετικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης καλλιέργειας της

κυτταρικής σειράς HaCaT, το πολύ χαρακτηριστικό υπόδειγμα του «δακτυλικού αποτυπώματος DNA» παρέμεινε χωρίς αλλαγή από τις ανακαλλιέργειες 6-79. Ακόμα, μετά από ανάλυση in vivo που περιλάμβανε εμφύτευση των κυττάρων HaCaT σε ποντίκια, προέκυψε μεταξύ άλλων ότι τα κύτταρα αυτά επανασυνθέτουν μια σχεδόν τέλεια επιδερμίδα παρόμοια με αυτή που σχηματίζεται από κανονικά κερατινοκύτταρα σε ενηλικίωση. Τέλος, τα υποδείγματα της κερατίνης των εμφυτευμάτων των κυττάρων HaCaT προέκυψε, από ανάλυση πρωτεϊνών, ότι είναι ίδια με αυτά των κανονικών κυττάρων από ακροπροσθία (foreskin) (Boukamp et al., 1988).

Συνοψίζοντας λοιπόν προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα όσον αφορά τα κύτταρα HaCaT: πρώτον, η πρώτη εμφάνιση και η σταθερότητα των διακριτών κυτταρογενετικών μεταβολών στα κύτταρα αυτά είναι πολύ σημαντική για τον έλεγχο της ανάπτυξης που έχει σαν αποτέλεσμα την παρατεταμένη ή και απεριόριστη διάρκεια ζωής τους, δεύτερον ο πολυπλοικισμός των κυττάρων αυτών που συντελεί περαιτέρω στην γενομική ανισορροπία και την μεταβαλλόμενη γονιδιακή έκφραση, είναι πολύ σημαντικός για την απόκτηση αυτόνομης ανάπτυξης σε καλλιέργεια αλλά σίγουρα δεν είναι ικανός για νεοπλασματική μεταβολή, τρίτον παρόλο τον μεταβαλλόμενο φαινότυπο των κυττάρων αυτών και των διαφορετικών δομικών χρωμοσωμικών αλλαγών το δακτυλικό αποτύπωμα του DNA παραμένει ταυτόσημο και στις ανακαλλιέργειες και με αυτό από τον δότη και τέταρτον η κυτταρική αυτή σειρά είναι πολύ παρόμοια με τα κανονικά κερατινοκύτταρα και επομένως είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη ρυθμιστικών μηχανισμών στη διαδικασία της διαφοροποίησης των ανθρώπινων επιδερμικών κυττάρων (Boukamp et al., 1988).

1.2 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων

Κύτταρα HaCaT, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum) (Seromed), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης και 2 mM L-γλουταμίνης στους 37°C και σε 5% CO₂. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Biochrom KG, Germany.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε πλήρες ταπήτιο διεξαγόταν μετά από την έκπλυσή τους δύο φορές με PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma Chemical Co.) και επεξεργασία με 1.0-1.5 ml θρυψίνης-EDTA (Biochrom KG, Germany) σε αναλογία 1:4, 1:8 ή 1:16. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων διεξάγονταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (Tissue culture lamina flow hood).

Η ανάπτυξη οποιασδήποτε κυτταρικής καλλιέργειας έχει συνήθως απαίτηση εμπλουτισμού του βασικού καλλιεργητικού υλικού με ορό. Μη ταυτοποιημένα ακόμη συστατικά του ορού, κυρίως αυξητικοί παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαίοι για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο μόσχου (FCS), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε.

Πλήρες θρεπτικό υλικό κυττάρων DMEM: Σε 440 ml Dulbecco's MEM (DMEM) που περιείχε 3.7 g/l NaHCO₃ και 1,0 g/l D-γλυκόζης προστέθηκαν 50 ml ορού από έμβρυο μόσχου (FCS), 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000 µg/ml στρεπτομυκίνης και 5 ml 200 mM L- γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που



προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβρυο μόσχου, 100 µg/ml στρεπτομυκίνης, 100 IU/ml πενικιλίνης και 2 mM L- γλουταμίνης.

Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS): Ένα δίσκιο PBS (Sigma chemical Co.) διαλύθηκε με ανάδευση σε 200 ml δις-απεσταγμένου νερού και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0.01 M ρυθμιστικού φωσφορικού άλατος, 0.0027 M χλωριούχου καλίου και χλωριούχου νατρίου σε pH 7.4. Το διάλυμα PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

Η ανακαλλιέργεια κυττάρων έγινε: 1) Για να διατηρηθούν τα καλλιεργούμενα κύτταρα ζωντανά, και 2) Για να προετοιμαστούν τα καλλιεργούμενα κύτταρα για έκθεση σε παράγοντες, κατά τη διάρκεια των διαφόρων πειραμάτων. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων διεξάγονταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής.

Αρχικά επιλέχθηκαν τρυβλία των 90 mm, με κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) και το θρεπτικό υλικό DMEM αναρροφήθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένων πιπετών Pasteur. Στη συνέχεια τα τρυβλία εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Biochrom KG, Germany) σε αυτά. Το διάλυμα περιείχε 0.05% θρυψίνη / 0.02% EDTA (w/v) σε PBS χωρίς ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO₂ για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος PBS στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές διαιρέσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:2, 1:4, 1:8 ή 1:16. Τέλος αφού προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος εναιωρήματος κυττάρων στα νέα τρυβλία, ανάλογα με τη διαίρεση, προστέθηκαν και 10 ml πλήρους DMEM και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

1.3 Διατήρηση και επαναφορά των κυττάρων

Η μακροχρόνια συντήρηση των κυτταρικών σειρών είναι δυνατή με την τοποθέτησή τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο (-192°C) σε υλικό που αποτελείται από 90% FCS και 10% διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) (Tissue culture grade, Sigma Chemical Co).

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη-EDTA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 'ανακαλλιέργεια κυττάρων' (παρ. 1.2). Στη συνέχεια προστέθηκαν 9 ml PBS στα τρυβλία με τα αποκολλημένα κύτταρα και τη θρυψίνη-EDTA και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml. Έγινε φυγοκέντρηση στον ψυχρό θάλαμο για 5-10 λεπτά στις 1500-2000 rpm, και αφού οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά ώστε να μην υποστεί ζημιά το κυτταρικό ίζημα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα Falcon προστέθηκαν 2 ml ορού (FCS) που περιείχε διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) (Sigma Chemical Co.) και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας. Να σημειωθεί ότι το διμεθυλο-σουλφοξείδιο κάνει τις μεμβράνες ημιδιαπερατές, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον μεταβολισμό των κυττάρων. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε 2 ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml, για κάθε Falcon (1 ml εναιωρήματος ανά Falcon). Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ειδικό

ισοθερμικό δοχείο ('Mister Frosty', Nalgene) που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -70°C για όλη τη νύχτα ώστε να παγώσουν σταδιακά ($1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$). Την επομένη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

Μέσο διατήρησης κυττάρων: 1,8 ml FCS και 0,2 ml DMSO (FCS –10% DMSO)

Για την επαναφορά των κυττάρων οι αμπούλες από το υγρό άζωτο τοποθετήθηκαν για περίπου 1-2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα και το περιεχόμενο μεταβιβάστηκε σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25 cm^2 , όπου προστέθηκαν αργά 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 .

Την επόμενη ημέρα, αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στο δάπεδο των φλασκών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 6 ml φρέσκου πλήρους DMEM και οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, ώσπου τα κύτταρα να σχηματίσουν πλήρες ταπήτιο. Όταν αναπτύχθηκαν σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 1.2).

1.4 Καταμέτρηση κυττάρων

Μετά τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και την αποκόλληση τους από τα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, 10 ml εναιωρήματος κυττάρων σε PBS τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber) όπου και έγινε η μέτρηση των κυττάρων σε δύο διαγώνια τετράγωνα από το σταυρό (τα οποία είναι διαιρεμένα σε 16 επιμέρους τετραγωνάκια, δηλαδή 2×16). Η μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των κυττάρων των μετρήσεων, διαιρέθηκε δια 100 και πολλαπλασιάστηκε $\times 10^6$ παρέχοντας έτσι το συνολικό αριθμό των κυττάρων $\times 10^6$ ανά ml του αρχικού εναιωρήματος κυττάρων.

1.5 Επώαση κυττάρων HaCaT με ροπιβακαΐνη και νιτρικό ψευδάργυρο, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, και κυτταρικός πολλαπλασιασμός (cell proliferation)

Κύτταρα HaCaT και HaCaT που εκφράζανε διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTAp0J/2, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTNEP) σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 1×10^5 κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτρυβλίο 24 θέσεων και τα κύτταρα επώαστηκαν για 36 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM στους 37°C , 5% CO_2 . Μετά από 36 ώρες, προστέθηκε 1 ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό και χορηγήθηκαν 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 και 5 mM ροπιβακαΐνης, στα HaCaT, HaCaTneo, HaCaTAp0J/2 και HaCaTBcl-2/2 και 0, 0.5, 1, 2, και 5 mM ροπιβακαΐνης, συν 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ταυτόχρονα και με 30 λεπτά προχορήγησης του $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, πριν τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης, στα HaCaT, HaCaTneo και HaCaTNEP ανά κάθε δύο πηγαδάκια (in duplicates) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ή 48 ώρες. Μετά την πάροδο των συγκεκριμένων χρόνων, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Ο αριθμός των κυττάρων με ροπιβακαΐνη και ο αριθμός κυττάρων με ροπιβακαΐνη συν $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, υπολογίστηκε επί τις % του αριθμού των κυττάρων χωρίς ροπιβακαΐνη και $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$



1.6 Τεχνική αποκλεισμού με trypan blue (trypan blue exclusion assay)

Ένα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου είναι η απώλεια της ακεραιότητας των μεμβρανών, επακόλουθο της οποίας είναι η ανικανότητα των κυττάρων να αποκλείουν ζωτικές χρωστικές ουσίες, όπως η trypan blue (Gorman et al., 1996). Αυτή η μέθοδος του αποκλεισμού της trypan blue είναι χρήσιμη ως μια προκαταρκτική μέθοδος υπολογισμού του κυτταρικού θανάτου από διάφορους παράγοντες. Όμως, ο τρόπος του κυτταρικού θανάτου δεν μπορεί να μελετηθεί με αυτή τη μέθοδο αφού νεκρωτικά και αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να προσλάβουν τη χρωστική. Επίσης υπάρχει η πιθανότητα της υποτίμησης του βαθμού του κυτταρικού θανάτου, καθώς αποπτωτικά κύτταρα σε πρώιμα στάδια διατηρούν την ακεραιότητα των μεμβρανών τους για αρκετές ώρες. Επομένως, αυτά τα αποπτωτικά κύτταρα θα αποκλείουν την είσοδο της χρωστικής και θα συμπεριλαμβάνονται στον υπολογισμό ως ζωντανά. Είναι λοιπόν φανερό ότι ο προσδιορισμός του αποκλεισμού της trypan blue θα πρέπει να χρησιμοποιείται μαζί με άλλες βιοχημικές τεχνικές, όπως η κατάτμηση (τμηματοποίηση) του DNA.

Κύτταρα επεξεργασμένα με ροπιβακαΐνη και $Zn(NO_3)_2$, (παρ.1.5) εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS και θρυψινοποιήθηκαν σε 0.5 ml θρυψίνης. Αφού τα κύτταρα αποκολλήθηκαν προστέθηκαν 250 μl PBS σε κάθε θέση του πολυτριβλύου, κάνοντας τον συνολικό όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος 750 μl. Στη συνέχεια, σε κάθε θέση του πολυτριβλύου προστέθηκαν στο κυτταρικό εναιώρημα, PBS και διάλυμα trypan blue, έτσι ώστε η χρωστική ουσία να αποτελεί το 1/3 του όγκου του κυτταρικού εναιωρήματος. Δηλαδή προστέθηκαν άλλα 750 μl PBS συν 750 μl διαλύματος trypan blue και αφήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-8 λεπτά (όχι περισσότερο από 10 λεπτά καθώς η trypan blue είναι τοξική στα κύτταρα), επαρκή χρόνο για τη πρόσληψη της χρωστικής ουσίας. Μετά από μια σύντομη ενναιώρηση, 10 μl του εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε ένα αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer chamber) και τα κύτταρα εξετάστηκαν και μετρήθηκαν κάτω από ένα οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x40). Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε, ενώ τα ζωντανά κύτταρα είναι συνήθως άχρωμα ή επιδεικνύουν χρυσή-καφέ χρώση με ομαλές αέριες δομές. Στο αιμοκυτταρόμετρο καταμετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα και ο αριθμός τους υπολογίστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (παρ. 1.5) σαν ποσοστό:

$$\% \text{ Ζωντανά κύτταρα} = \frac{\text{Αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

0.4% Διάλυμα Trypan Blue (Sigma Chemical Co., Cat. No: T8154)



2: ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)

Η παρασκευή των τρυβλίων αυτών έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος L-Broth. 10g θρυπτόνης (Bacto-tryptone), 5g εκχυλίσματος ζύμης (Bacto-yeast extract) και 10g χλωριούχου νατρίου (Riedel, Germany), διαλύθηκαν με ανάδευση και αύξηση της θερμοκρασίας σε 1000 ml δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μεταβιβάστηκε σε 2 φιάλες των 500 ml. Στη μια φιάλη προστέθηκαν 7.5g άγαρ και αφού έγινε αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η L-άγαρ αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να μειωθεί η θερμοκρασία στους 55°C και στη συνέχεια προστέθηκε στη φιάλη αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Τέλος τοποθετήθηκαν 25 ml L-άγαρ σε καθένα από 20 τρυβλία, και η L-άγαρ αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου και να αφυδατωθεί σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Όταν ετοιμάστηκαν τα τρυβλία με τη πολυμερισμένη L-άγαρ περιτυλίχθηκαν με φιλμ παραφίνης (parafilm) και τοποθετήθηκαν στον ψυχρό θάλαμο. Τα τρυβλία L-άγαρ με την αμπικιλίνη διατηρούνται για περίπου ένα μήνα στους 4°C.

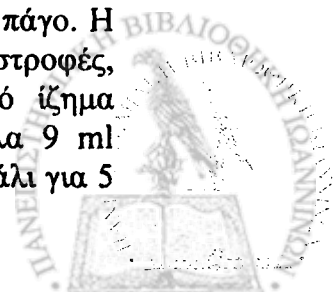
25 mg/ml Αμπικιλίνης: Διάλυμα του άλατος νατρίου της αμπικιλίνης (Sigma chemical Co.) σε συγκέντρωση 25 mg/ml σε αποστειρωμένο ddH₂O φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 µm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

2.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

Για να δημιουργηθούν επιδεκτικά προς μετασχηματισμό βακτήρια, απαιτείται η κατεργασία τους με παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό οπών/καναλιών στο κυτταρικό τους τοίχωμα, που θα επιτρέψουν την εισαγωγή με παθητική διάχυση, εξωγενώς προστιθέμενου DNA. Η κατεργασία αυτή πρέπει να γίνεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων.

Τα συνηθισμένα βακτηριακά στελέχη για την παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό με πλασμίδια είναι τα στελέχη *E. Coli* HB101, DH5α, JM109 και MC1061. Αυτά τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν αφού υπέστησαν επεξεργασία ώστε να γίνουν 'επιδεκτικά κύτταρα' (competent cells), δηλαδή κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν (να δεχτούν πλασμίδια).

Αρχικά, μη ικανά (επιδεκτικά) βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 5 ml L- Broth και επώαστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Την επομένη ημέρα, 0.5 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη και τα βακτήρια επώαστηκαν για 2 περίπου ώρες σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για να αναπτυχθούν μέχρις ότου η OD₆₀₀ ήταν 0.3. Κατά τη διάρκεια της επώασης των βακτηρίων παρασκευάστηκαν τα διαλύματα Α και Β, τα οποία τοποθετήθηκαν στον πάγο. Η υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές, στους 4°C και αφού αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, το βακτηριακό ίζημα εναωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος Α. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος Α και μετά την ανάμιξη τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν και πάλι για 5



λεπτά, στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με 1 ml διαλύματος B. Αφού προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος B, το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος B που περιείχε 10% γλυκερόλη (Riedel, Germany) και δείγματα των 50-100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorff και αποθηκεύτηκαν στους -70°C για μελλοντική χρήση.

Τα 'επιδεκτικά κύτταρα' διατηρήθηκαν σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) και χλωριούχο ρουβίδιο (RbCl₂) διότι τα ιόντα Ca²⁺ δημιουργούν σύμπλοκα με το φωσφόρο του DNA και κατ' αυτόν τον τρόπο καθιζάνουν ως ίζημα. Μέσω του βακτηριακού μετασχηματισμού αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και τα κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν έναν παράγοντα που ονομάζεται 'παράγοντας μετασχηματισμού' (competent factor).

Διάλυμα A: 10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM RbCl₂

Διάλυμα B: 10 mM MOPS pH 6.5, 10 mM RbCl₂, και 50 mM CaCl₂.

Διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων: 10 mM MOPS pH 6.5, 10 mM RbCl₂,
50mM CaCl₂ και 10% γλυκερόλη

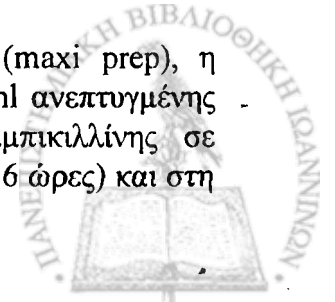
2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

50-100 μl ικανών βακτηριακών στελεχών *E. Coli* αναμίχθηκαν με περίπου 20 μl πλασμιδιακού DNA (100-500 ng DNA) σε σωλήνες erpendorff και αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 42°C για δύο λεπτά έτσι ώστε να υποστούν θερμικό στρες (heat shock) και να γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Προστέθηκε 1 ml L-Broth στους σωλήνες erpendorff και επώαστηκαν στους 37°C για μία ώρα. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 6500 στροφές και στους 4°C, αφαιρέθηκε το περισσότερο υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 300 μl υπερκείμενου. Τέλος με την υγρή αυτή καλλιέργεια εμβολιάσθηκαν τρυβλία με L-άγαρ παρουσία 100 μg/ml αμπικιλίνης με τη βοήθεια μιας ράβδου τα οποία και διατηρήθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφηθεί το εμβολίασμα. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για όλη τη νύχτα ώστε να σχηματιστούν αποικίες βακτηρίων. Να σημειωθεί ότι μετά την ολονύχτια επώαση αναπτύσσονται με τη μορφή αποικιών μόνον τα βακτήρια στα οποία έχει εισέλθει ο πλασμιδιακός φορέας, ο οποίος φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλίνη).

2.4 Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων. 5 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης εμβολιάσθηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επώαστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep), η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων γινόταν με ανάμιξη 0,5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 5 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) και στη



συνέχεια με τον εμβολιασμό 100 ml L-Broth και 100 µg/ml αμπικιλίνης με 5 ml της ολονύχτιας αναπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.

2.5 Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων σε γλυκερόλη

Τα αποθέματα γλυκερόλης παρασκευάζονται αναμιγνύοντας 1.2 ml αναπτυγμένης υγρής καλλιέργειας βακτηρίων και 300 µl γλυκερόλης (10% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης) (Riedel, Germany). Τα αποθέματα διατηρούνταν στους -70°C για περαιτέρω χρήση.

2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρού όγκου (mini prep)

1.5 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες (παρ. 2.4), τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με δίνη (vortexing) σε 200 µl διαλύματος λύσης βακτηρίων (Bacterial lysis buffer). Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 400 µl αλκαλικού διαλύματος και το μίγμα αφέθηκε στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 µl διαλύματος οξικού νατρίου pH 5.2, έγινε ελαφριά ανάμειξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά (η χρήση οξικού νατρίου pH 5.2 υποβοηθάει στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χρωματοσωμικού DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και προστέθηκαν 0.6 όγκοι ισοπροπανόλης (Riedel, Germany). Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 στροφές στους 4°C. Το ίζημα DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και ξηράθηκε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 50 µl 1xTE pH 8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ο έλεγχος του παρασκευάσματος γίνεται μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (παρ. 2.8) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (παρ. 3.2).

Διάλυμα λύσης βακτηρίων (Bacterial lysis buffer): 50 mM Γλυκόζη,
25 mM Tris pH 8.0,
10 mM ml EDTA pH 8.0
και 4 mg/ml λυσοζύμη

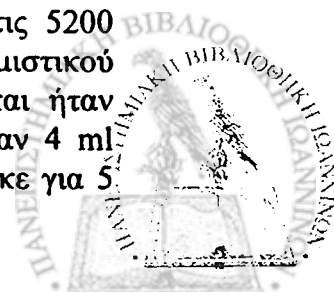
Αλκαλικό διάλυμα: 0.2 NaOH, 1% SDS

1xTE pH 8.0: 10 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0

2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλου όγκου (maxi prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε είτε με τη χρήση αντιδραστηρίου Qiagen ή με τη χρήση αντιδραστηρίου Nucleobond.

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε όγκο 50-100 ml L-Broth με 100 µg/ml αμπικιλίνης φυγοκεντρήθηκαν για 25 λεπτά, στις 5200 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος εναιώρησης (resuspension buffer) που περιείχε RNAση και ήταν διατηρημένο στους 4°C, με δίνη (vortexing). Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml αλκαλικού διαλύματος, έγινε ελαφριά ανάμειξη και το εναιώρημα αφέθηκε για 5



λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστέθηκαν 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης' (neutralization buffer), έγινε ελαφριά ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο. Μετά από 20 λεπτά έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές, για 30 λεπτά και στους 4°C. Στο μεταξύ οι ειδικές στήλες 'QIAGEN tip-100 ή Nucleobond tip-100 εκπλύθηκαν με 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης' (equilibration buffer). Στη συνέχεια το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση μεταβιβάστηκε στις στήλες και αφέθηκε να περάσει διαμέσου των στηλών, στις οποίες κατακρατήθηκε το πλασμιδιακό DNA. Μετά οι στήλες εκπλύθηκαν 2 φορές με 10 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης' (wash buffer) και το πλασμιδιακό DNA εκχειλίστηκε από τις στήλες με 5 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης' (elution buffer). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3.5 ml ισοπροπανόλης (Riedel, Germany), έγινε ανάμιξη (vortexing) και το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C για τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA. Ακολούθησε έκπλυση με 70% αιθανόλη και ξήρανση σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 100-200 μl 1xTE pH 8.0, μεταφέρθηκε σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: Οπτική πυκνότητα (O.D) =1 αντιστοιχεί σε 50 μg DNA. Ελέγχουμε το DNA μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού (παρ. 2.8) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παρ. 2.18).

2.8. Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα

Κοπή πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδοκουκλεάσες γίνεται αφενός σε μικρούς όγκους, για να γίνει έλεγχος εάν απομονωμένα πλασμίδια περιλαμβάνουν συγκεκριμένα γονίδια με ηλεκτροφόρηση DNA, αφετέρου σε μεγάλους όγκους, για να απομονωθούν συγκεκριμένα γονίδια από πλασμίδια με ηλεκτροφόρηση DNA και με ηλεκτροδιήθηση DNA.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν HindIII, BamHI, XhoI και XbaI ήταν από την New England Biolabs ή την Gibco BRL Life Technologies, Inc. Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του προς ενσωμάτωση τμήματος του DNA διεξάγεται με τις ίδιες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η πέψη πραγματοποιείται σε όγκο 20 μl, στους 37°C, για 1.5-2 ώρες, στο προτεινόμενο (ανάλογα με το ένζυμο) ρυθμιστικό διάλυμα. Η πέψη του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρότυπες μεθόδους (Sambrook, 1989).



3: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

(Α) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.1 Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA

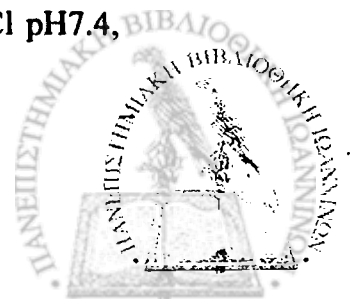
Χαμηλού μοριακού βάρους, γενομικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα HaCaT και HaCaT που έφεραν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2, HaCaTAp0J/6, και HaCaTNEP) και που έφεραν διαφορετικά γονίδια. Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να μελετηθεί εάν και κατά πόσο επάγεται απόπτωση από τη ροπιβακαΐνη και κατά πόσο η επαγόμενη απόπτωση αναστέλλεται από τον νιτρικό ψευδάργυρο $Zn(NO_3)_2$.

Τα κύτταρα που προορίζονταν για την απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA καλλιεργήθηκαν για 36 ώρες σε χαμηλή πυκνότητα ($1.5 \cdot 10^6$ κύτταρα ανά 100 mm τρυβλίο) πριν τη χορήγηση ροπιβακαΐνης και $Zn(NO_3)_2$. Μετά την πάροδο των 36 ωρών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 5 ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό με ή χωρίς ροπιβακαΐνη και $Zn(NO_3)_2$. (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 και 5 mM ροπιβακαΐνης και 15 μM $Zn(NO_3)_2$) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες στους $37^\circ C$, 5% CO_2 .

Χαμηλού μοριακού βάρους γενομικό DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα (Sugiki et al., 2000). Περιληπτικά, αιωρούμενα κύτταρα στο θρεπτικό υλικό συλλέχθηκαν σε 15 ml σωλήνα Falcon και διατηρήθηκαν σε πάγο. Τα επικολλημένα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS-1mM EDTA pH8.0 και τα εκπλύματα προστέθηκαν στον σωλήνα Falcon. Τα επικολλημένα κύτταρα, συλλέχθηκαν σε 1,5 ml PBS-1mM EDTA pH8.0 με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) στον σωλήνα Falcon μαζί με τα αιωρούμενα κύτταρα και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm στους $4^\circ C$. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS-1mM EDTA pH 8.0, μεταφέρθηκε σε σωλήνες erpendorff και επαναφυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 6500 rpm στους $4^\circ C$. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer), αφέθηκε για 5-10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 13000 rpm στους $4^\circ C$. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και επώαστηκε διαδοχικά με 2 mg/ml RNάση A για 2 ώρες στους $37^\circ C$ και με 250 $\mu g/ml$ πρωτεΐνάσης K για 2 ώρες στους $37^\circ C$. Μετά τις επώσεις, προστέθηκαν 20 μl 5 M NaCl και 120 μl ισοπροπανόλης και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους $-20^\circ C$ όλη τη νύχτα για την κατακρήμιση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους $4^\circ C$ για 20 λεπτά, το DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και το ίζημα του DNA αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά για να στεγνώσει. Στη συνέχεια εναιωρήθηκε σε 20 μl ρυθμιστικό διάλυμα 1XTE pH7.4.

Τα δείγματα του DNA αναλύθηκαν σε 1.6% πηκτή αγαρόζης που περιείχε 0.5 $\mu g/ml$ βρωμιούχο αιθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA 0.5XTBE σε τάση 70V για 3 ώρες. Το DNA ανιχνεύθηκε κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, UV και φωτογραφήθηκε (παρ. 3.2).

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer): 10 mM Tris-Cl pH7.4, 10 mM EDTA pH8.0, 0.5% Triton X-100



B) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

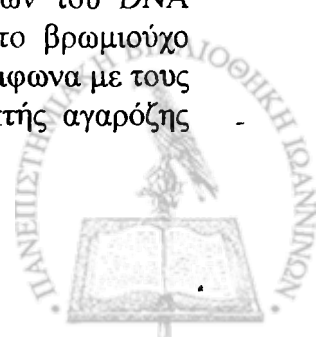
3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης έγινε για να γίνει έλεγχος των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης (παρ. 2.8) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι οι ορθές κατασκευές και ότι περιλαμβάνουν τα επιθυμητά γονίδια μετά την απομόνωση τους από βακτηριακές καλλιέργειες. Η ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA πραγματοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο βαθμός της απόπτωσης των κυττάρων μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες (ροπιβακαΐνη και $Zn(NO_3)_2$) σε συγκεκριμένες ποσότητες (0-5 mM ροπιβακαΐνης, και 15 μM $Zn(NO_3)_2$) και για ορισμένα χρονικά διαστήματα (48 ώρες).

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πηκτή αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5XTBE (0.0445 M Tris, 0.0445 M βορικό οξύ, 0.001 M EDTA). Το μοριακό βάρος των τμημάτων του DNA προσδιορίζεται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο παρουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας επιτρέπει τον εντοπισμό των τμημάτων του DNA στην πηκτή αγαρόζης. Η κινητικότητα μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τις εξής παραμέτρους: α) από το μέγεθός τους β) τη μορφή τους (ευθύγραμμο, κυκλικά υπερελικωμένα, κυκλικά με εγκοπές) και γ) από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες πηκτές αγαρόζης 1% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA και πηκτές αγαρόζης 1.6% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5xTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία 50–56°C πριν την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu g/ml$. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισήχθη στο διάλυμα ένα κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές ('πηγαδάκια'). Μετά το πολυμερισμό της αγαρόζης και το σχηματισμό της πηκτής (gel), προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί η πηκτή αγαρόζης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές ('πηγαδάκια') της πηκτής αφού αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:10 με διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (sample loading buffer) για την κατακρήμνιση του DNA και την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (ολικός όγκος δειγμάτων 25 μl). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μάρτυρες DNA με γνωστά, κλιμακούμενα μοριακά βάρη όπως 1 kb DNA ladder, Lambda DNA-Hind III digest και Lambda DNA-BstEII Digest (Gibco BRL Life Technologies Inc.). Μπορούν έτσι να υπολογιστούν προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των προς έλεγχο τμημάτων του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και σύνδεσης της συσκευής με τροφοδοτικό σταθερής τάσης 70–120 volt (τροφοδοτικό Consort) για 2-3 ώρες. Η πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε σε συσκευή υπερϊόδους ακτινοβολίας για την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης και τον υπολογισμό του μεγέθους των τμημάτων του DNA καθώς επίσης και για φωτογράφιση. Να σημειωθεί ότι επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί μεταλλαξογόνο παράγοντα η χρήση του γίνεται σύμφωνα με τους θεσμοθετημένους κανόνες ασφαλείας. Έτσι, ο χειρισμός της πηκτής αγαρόζης που περιέχει τον παράγοντα αυτό, πρέπει να γίνεται με γάντια.



10xTBE (Tris -Borate/EDTA buffer): 890 mM Tris, 890 mM Βορικό οξύ, 20 mM EDTA

10xΔιάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Sample loading buffer): 50% γλυκερόλη, (αποστειρωμένη σε δις-απεσταγμένο νερό), 1 mM EDTA pH 8.0, 0.4% κυανού της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue), 0.4% xylene cyanol FF 10 mg/ml Βρωμιούχο αιθίδιο σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

4: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.1 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Κύτταρα HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2, HaCaTAp0J/2, και HaCaTNEP στα οποία χρωρήθηκε ροπιβακαΐνη και $Zn(NO_3)_2$ όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 1.6) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Sambrook, 1989).

Περιληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0, στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 100–150 μl διαλύματος RIPA το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών, ομογενοποιήθηκαν με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate της BioRad, για τον ποσοτικό προσδιορισμό με τη μέθοδο Bradford (παρ. 4.2). Τα δείγματα χωρίστηκαν σε μικρότερα (aliquots) των 25 μl και προστέθηκε ¼ του όγκου 4xδιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer) και τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -40°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 1% SDS, 1 mM EDTA pH8.0 και 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (Na Deoxycholate) το οποίο περιείχε 1mM Dithiothreitol (DTT) και αναστολείς πρωτεασών -1 μg/ml πεψιστατίνη (pepstatin), 1 μg/ml λευπεψίνη (leupeptin), 1 mM PMSF και 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου.

4xΔιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer): 250 mM Tris-Cl pH 6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 2.8 M β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.2% κυανού της βρωμοφαινόλης

4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Με την αλλαγή του χρώματος μετατοπίζεται το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595nm. Η απορρόφηση του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παρακολουθείται σε φωτόμετρο στα 595nm.



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών όγκος πρωτεϊνικού δείγματος 5 μl μεταφέρθηκε μαζί με 795 μl απεσταγμένου νερού σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Στον ίδιο σωλήνα προστέθηκαν 200 μl αντιδραστηρίου Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) και αφού το περιεχόμενο αναδεύτηκε καλά, επώαστηκε για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση του μείγματος πρωτεΐνης-χρωστικής μετρήθηκε στα 595nm σε φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU UV-1601). Η αναγωγή της απορρόφησης σε ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα έγινε με τη χρησιμοποίηση πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάστηκε με διαλύματα γνωστών ποσοτήτων BSA (Sigma).

4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών μετά από προσθήκη υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED και δημιουργεί τριδιάστατο δίκτυο. Ο σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου για τη δημιουργία του δικτύου είναι το N, N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο. Η προσθήκη του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκακυλικό θειικό νάτριο) έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση SDS-πρωτεϊνών και προσδίδει στα μόρια καθαρό αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μάζα τους. Έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών πάνω στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη μέθοδο του Laemmli (1970) σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών (Sambrook, 1989). Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοιβάξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού: πηκτή επιστοιβάξης είναι ~5:1.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες πηκτές SDS-PAGE: 10% για την ανάλυση της κλαστρίνης/ApoJ, 15% για το Bcl-2 και 8% για την πολυμεράση της πολυ-ADP ριβόζης (Poly-ADP ribose polymerase; PARP) και της NEP, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Sambrook, 1989).

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε σε μικρή διπλή συσκευή (Mini-Protean gel electrophoresis tank; Bio-Rad Laboratories, USA)

Όγκοι πηκτής επιστοιβάξης (για δύο πηκτές: 10 ml)

Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	6.84	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% δισ-ακρυλαμίδιο)	1.7	5% w/v
1.0 M Tris pH6.8	1.25	0.125 M
10% SDS	0.1	0.1%
10% υπερθεϊκό αμμώνιο	0.1	0.1%
TEMED	0.01	
Τελικός όγκος (ml)	10	



Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για δύο πηκτές: 20 ml)			
Πηκτή	Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
8%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	9.3	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8 δις-ακρυλαμίδιο)	5.3	8% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειικό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.012	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
10%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	7.9	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8 δις-ακρυλαμίδιο)	6.7	10% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειικό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
15%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	4.6	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8 δις-ακρυλαμίδιο)	10	10% w/v
	1.0 M Tris pH 6.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειικό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	

Το μίγμα αφέθηκε να πολυμερισθεί με την προσθήκη TEMED σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά δείγματα (~100 μg πρωτεΐνης) θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 100V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~2 ώρες. Ως δείκτες των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο έγχρωμο μίγμα πρωτεϊνών (Kaleidoscope prestained standards; Bio-Rad Laboratories, USA) που περιείχε: μυοσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 67 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστολέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (1X Tris-γλυκίνη/SDS):

25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0.1% SDS

4.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)

Η προσπάθεια διαχωρισμού και ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων (ανοσο-αποτύπωμα κατά western).



Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 35V σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους (Sambrook et al., 1989).

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 3 ώρες σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS το οποίο, άλλοτε περιείχε 0.05% Tween-20, άλλοτε όχι (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε 5% blocking solution. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Για την ApoJ, goat anti-human ApoJ, 1:1500 (SantaCruz, sc-6419; Κλώνος C-18), για την Bcl-2, mouse anti-human Bcl-2, 1:500 (BD Transduction Laboratories, 610538) ή mouse monoclonal anti-human Bcl-2 (SantaCruz, sc-509), για την PARP, mouse anti-human PARP, 1:1000 (BD Pharmingen, 556362), και η επώαση έγινε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη NEP/CD10, το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το, rabbit polyclonal anti-human NEP, 1:500 (Santa Cruz, sc-9149), και η επώαση έγινε για όλη τη νύχτα σε περίπου 4°C. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 (το διάλυμα PBS για τη NEP δεν περιείχε 0.05% Tween-20). Στη συνέχεια εκτέθηκαν στα δεύτερα αντισώματα: donkey anti-goat IgG-Horse Radish Peroxidase (HRP) για την ApoJ σε αναλογία 1:2000, goat-anti mouse IgG-HRP για την Bcl-2 και την PARP σε αναλογία 1:1000 και goat anti-Rabbit IgG-HRP για την NEP επίσης σε αναλογία 1:1000 και σε 5% blocking solution για 1.5–2 ώρες. Τέλος οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 (το διάλυμα PBS για τη NEP δεν περιείχε 0.05% Tween-20) και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο χρησιμοποιώντας το Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescence kit (Pierce, USA) ή το ECL (Amersham Int.), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, και εκτέθηκαν σε φιλμ Kodak-XOMAT AR.

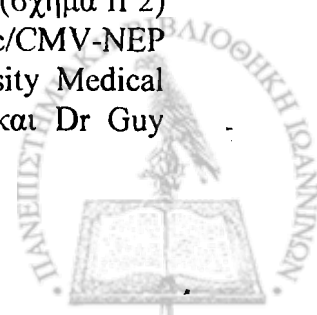
1xΡυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer blotting buffer):

0.0025 M Tris, 0.192 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη

5: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

5.1 Φορείς έκφρασης (expression vectors)

Οι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT ήταν: ο pcDNA3.1B (Invitrogen), ο pcDNABcl-2, ο pcDNAApoJ και ο pRc/CMV-NEP τα οποία φέρουν το γονίδιο της φωσφομεταφοράς της νεομυκίνης (neo), που επιφέρει ανθεκτικότητα στα διαμολυσμένα κύτταρα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418. Το pcDNABcl-2 φέρει επιπλέον το 0.8 kb ανθρώπινο αντι-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-2 στη θέση XhoI του pcDNA3.1 (Odajima et al., 2000), το pcDNAApoJ φέρει επιπλέον το 1.65 kb ανθρώπινο γονίδιο της κλαστρίνης/απολιπρωτεΐνης J (ApoJ) στη θέση BamHI του pcDNA3.1B (Petropoulou et al., 2001) (σχήμα II 1) και το pRc/CMV-NEP φέρει επιπλέον το 2.2 kb γονίδιο της NEP του κουνελιού στη θέση EcoRV (σχήμα II 2) (Lanctot C. et al 1995) Το pcDNABcl-2, το pcDNAApoJ και το pRc/CMV-NEP ήταν ευγενείς προσφορές των Dr. Itaru Matsumura, Osaka University Medical School, Japan, Δρ. Ευσταθίου Γκόνου, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και Dr Guy Boileau, University of Montreal, Canada, αντίστοιχα.

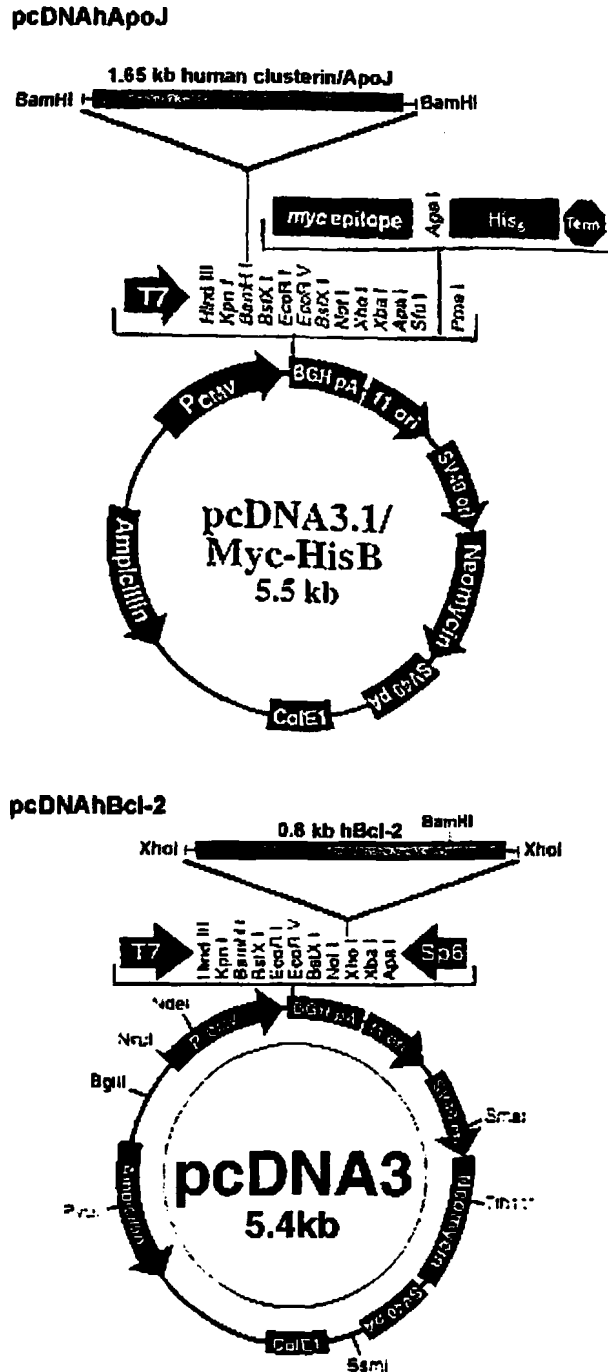


5.2 Διαμόλυνση κερατινοκυττάρων HaCaT

Η διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της πολυβρίνης-διμεθυλοσουλφοξειδίου (polybrene-DMSO), όπως περιγράφηκε λεπτομερώς προηγουμένως (Gonos and Spandidos, 1993). Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι οι κυτταρικές επιφάνειες και το πλασμιδιακό DNA είναι αρνητικά φορτισμένα και η προσθήκη του πολυκατιόντος της πολυβρίνης διευκολύνει την προσρόφηση του DNA στις κυτταρικές επιφάνειες. Στη συνέχεια η προσθήκη του DMSO διευκολύνει το άνοιγμα των μεμβρανικών πόρων με αποτέλεσμα το DNA να εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και να ενσωματώνεται στο γενομικό DNA, μετά την προσθήκη αντιβιοτικού (Πίεση επιλογής; Selection pressure).

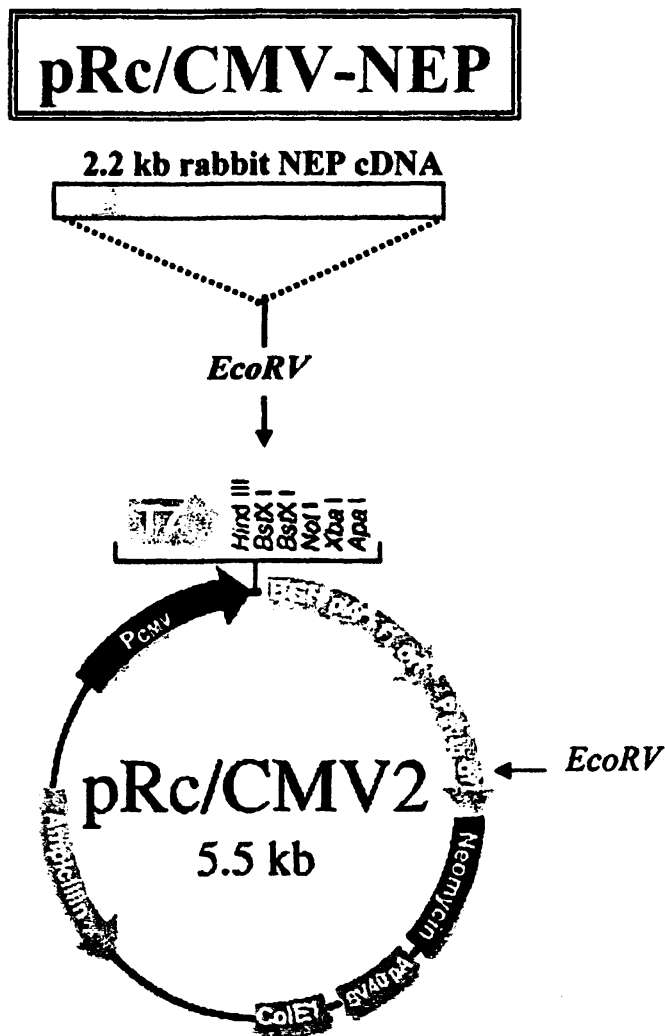
Περίληπτικά, κύτταρα HaCaT σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα ($1-2 \times 10^6$) ανά 10 cm τρυβλία καλλιέργειας σε εμπλουτισμένο DMEM θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 2.5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχαν 8 $\mu\text{g/ml}$ πολυβρίνη (polybrene) (Sigma Chemical Co.) και 15 $\mu\text{g/ml}$ πλασμιδιακού DNA (pcDNA3.1B, pcDNA/Bcl-2, pcDNA/ApoJ και pRc/CMV-NEP) (Μέσο διαμόλυνσης; Transfection medium) και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO₂ για 6 ώρες. Κάθε τριάντα λεπτά γινόταν ελαφρά ανακίνηση των τρυβλίων (3-4 φορές) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης των κυττάρων με το DNA, ούτως ώστε το DNA να κατανεμηθεί ομοιόμορφα πάνω από όλα τα κύτταρα. Μετά την πάροδο των 6 ωρών το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν με 5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχαν 30% διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, tissue culture grade; Sigma Chemical Co.) (Μέσο καταπληξίας ή σοκ; Shock medium) για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό που περιείχε DMSO αναρροφήθηκε και τα κύτταρα εκκλύθηκαν δύο φορές με 10 ml DMEM που περιείχε αντιβιοτικά και γλουταμίνη, χωρίς ορό. Μετά την έκλυση των κυττάρων, προστέθηκαν 10 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO₂ για 48 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 10ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 (Μέσο επιλογής; Selection Medium) ώστε να επιλεγούν σταθεροί κλώνοι επιτυχώς διαμολυσμένοι με τους φορείς έκφρασης. Η επιλογή των κυττάρων έγινε για τρεις εβδομάδες. Η αλλαγή του μέσου επιλογής των διαμολυσμένων κυττάρων επαναλαμβανόταν κάθε 3-4 μέρες καθόλη τη διάρκεια επιλογής των κυττάρων παρουσία 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 ώστε να διασφαλιστεί η επιλογή των κυτταρικών κλώνων που υπερεκφράζουν τα εισαχθέντα γονίδια (Gonos and Spandidos, 1993). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας επιλογής, επιλέχθηκαν σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι και χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (παρ. 4.1 και 4.2) και ανοσο-αποτύπωμα κατά western (παρ. 4.3) για την έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων. Αποθέματα των σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT παρασκευάστηκαν και αποθηκεύτηκαν στο υγρό άζωτο (παρ. 1.3).





Σχήμα Π 1. Φορείς έκφρασης της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (clusterin/ApoJ) και του Bcl-2. Οι φορείς έκφρασης pcDNA3.1B (Invitrogen), pcDNABcl-2 και pcDNAApoJ που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT και την κατασκευή σταθερών κυτταρικών κλώνων HaCaTneo, HaCaTBcl-2 και HaCaTApoJ, αντίστοιχα. Το pcDNA3.1B φέρει το γονίδιο neo ως μάρτυρα επιλογής το οποίο επιφέρει ανθεκτικότητα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418. Το pcDNAApoJ φέρει το γονίδιο neo και το πλήρες ανθρώπινο 1.65 kb ApoJ cDNA στη θέση BamHI του pcDNA3.1B (Petropoulou et al., 2001). Το pcDNABcl-2 φέρει το neo και το ανθρώπινο 0.8 kb Bcl-2 cDNA στην θέση XhoI του pcDNA3 (Invitrogen) (Odajima et al., 2000).



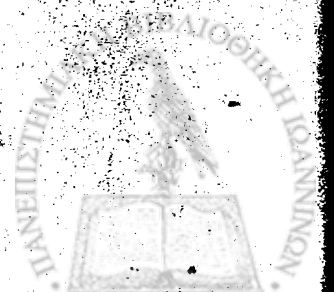


Σχήμα Π 2. Φορέας έκφρασης της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP). Ο φορέας έκφρασης pRc/CMV-NEP χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT. Το pRc/CMV-NEP φέρει το γονίδιο neo και το 2.2 kb γονίδιο της NEP κουνελιού στη θέση *EcoRV* του pRc/CMV2 (Lanctot C. et al., 1995)

UNIVERSITY OF JOHANNESBURG



UNIVERSITY OF JOHANNESBURG
SCHOOL OF DISTANCE EDUCATION
DEPARTMENT OF EDUCATION
PO BOX 17003, JOHANNESBURG 2010
TEL: 011 551 2000 FAX: 011 551 2001
WWW.UJ.ac.za



III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Οι επιδράσεις της ροπιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2

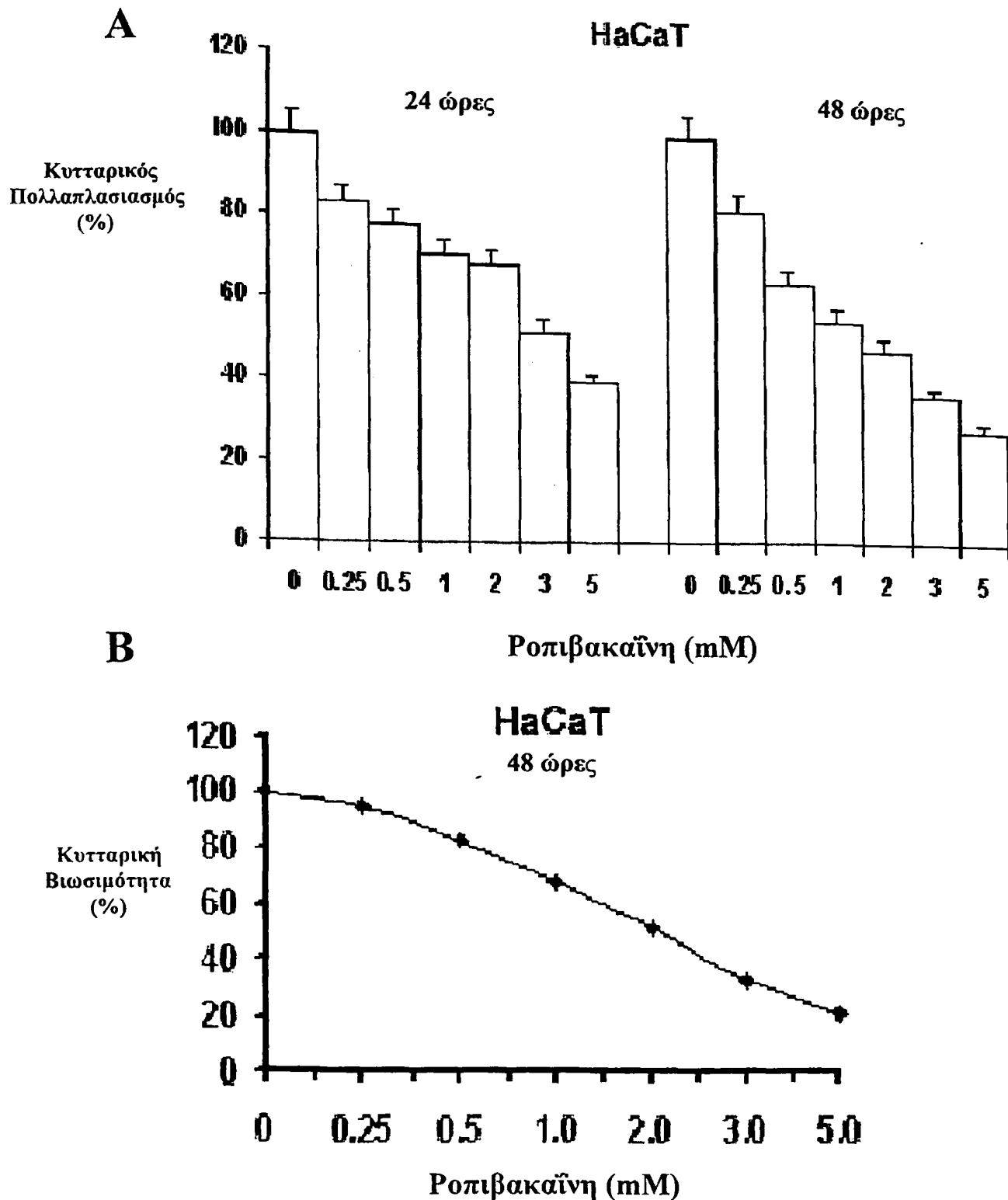
1.1. Η ροπιβακαΐνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT επάγοντας απόπτωση

Στά κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 24 και 48 ώρες προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όπως φαίνεται στο Σχήμα III 1A, η ροπιβακαΐνη προκάλεσε δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη αναστολή της αύξησης των κυττάρων HaCaT. Η ανασταλτική επίδραση της ροπιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT ήταν φανερή στις 24 ώρες και έγινε πιο έντονη μετά από 48 ώρες επώασης, προκαλώντας 50% μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση 2 mM (Σχήμα III 1A).

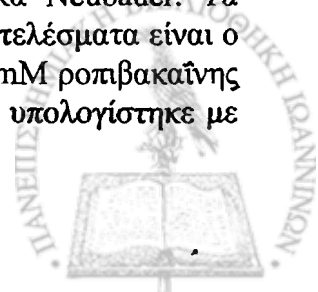
Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη ροπιβακαΐνη οδήγησε στη μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας που ήταν πιθανόν να επηρεάζεται επίσης από τη ροπιβακαΐνη. Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και εκτέθηκαν στην τεχνική αποκλεισμού με trypan blue. Η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε επίσης από τη ροπιβακαΐνη με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η έκθεση των κυττάρων HaCaT σε 2 mM ροπιβακαΐνης προκάλεσε ελάττωση της κυτταρικής βιωσιμότητας περίπου κατά 50% (Σχήμα III 1B). Στα κύτταρα HaCaT στα οποία χορηγήθηκε ροπιβακαΐνη κυρίως σε αυξημένες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές αποπτωτικού φαινοτύπου.

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται βιοχημικά από διάσπαση του DNA σε πολλαπλάσια νουκλεοσωματικών τμημάτων των 180 ζευγών βάσεων. Για να μελετηθεί περαιτέρω η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου από τη ροπιβακαΐνη και συγκεκριμένα τότε η ροπιβακαΐνη προκαλεί θραυσματοποίηση του DNA, απομονώθηκε DNA από προσκολλημένα και αιωρούμενα κύτταρα HaCaT, με και χωρίς ροπιβακαΐνη σε συγκέντρωση 0-5 mM για 48 ώρες, χωρίς ορό. Η χορήγηση ροπιβακαΐνης στα κύτταρα HaCaT είχε σαν αποτέλεσμα τη δόσοεξαρτώμενη επαγωγή της νουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης του DNA, παράγοντας μια κλίμακα DNA (DNA ladder), που είναι χαρακτηριστική των κυττάρων τα οποία υφίστανται απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaT ήταν εμφανής σε συγκεντρώσεις του 1 mM και έγινε πιο έντονη σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 2 mM ροπιβακαΐνης (Σχήμα III 2A).

Γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστηριοποίηση των κασπασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης είναι μια στενά ρυθμιζόμενη διαδικασία, που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία διασπά έναν αριθμό κυτταρικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης και της πολύ-ADP-ριβοσυλο-πολυμεράσης (PARP) (Hengartner, 2000). Η ροπιβακαΐνη, σε συγκεντρώσεις πάνω από 1 mM, προκάλεσε τη διάσπαση της PARP, γνωστού υποστρώματος της κασπάσης-3, από πολυπεπίδιο των 115 kD σε τμήμα των 89 kD (Σχήμα III 2B). Συγκεκριμένα ενώ στα μη-επεξεργασμένα κύτταρα HaCaT μόνο η 118 kDa μη-διασπασμένη μορφή της PARP ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωμα, σε κύτταρα επεξεργασμένα με ροπιβακαΐνη πάνω από 1 mM ανιχνεύθηκαν η 118 kDa μη-



Σχήμα III 1. Οι επιδράσεις της ροσιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και στη βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT. (A) Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν 0-5 mM ροσιβακαΐνης για 24 και 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και μετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές με μετρήσεις εις διπλούν. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm SD ($p < 0,05$). (B) Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν 0-5.0 mM ροσιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε με την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue.

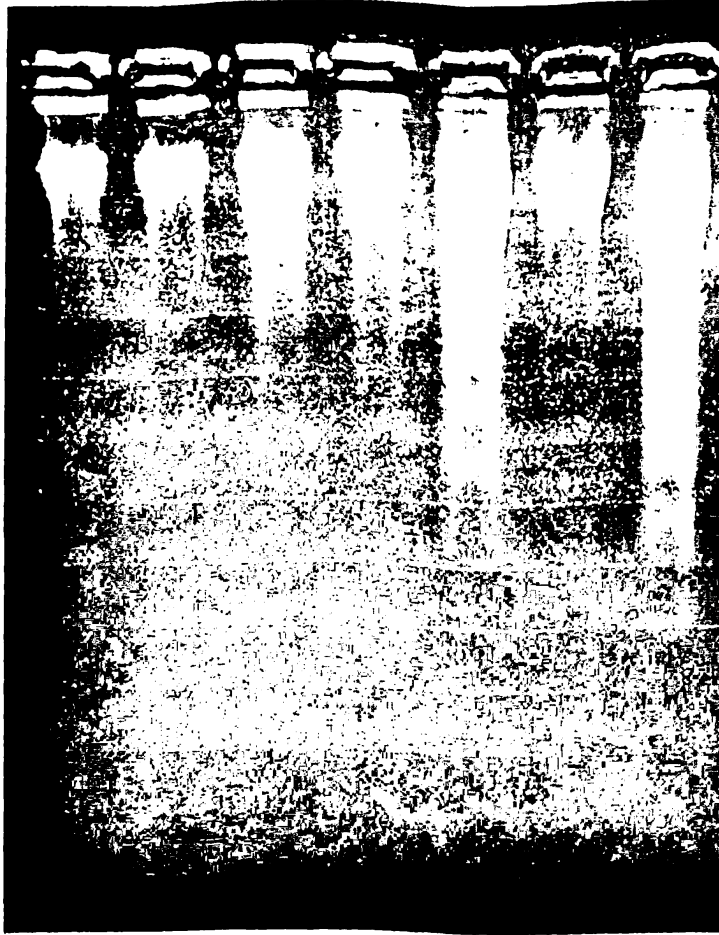


Ροπιβακαΐνη
mM:

HaCaT

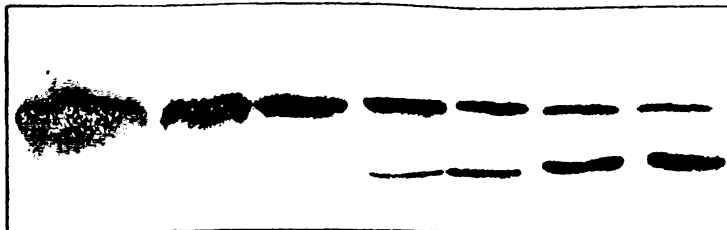
0 0.25 0.5 1 2 3 5

A



B

PARP



Σχήμα III 2. Δοσοεξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων ροπιβακαΐνη. Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. (A) Το DNA απομονώθηκε από αι προσκολλημένα κύτταρα, και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,6% π (B) Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία έ ροπιβακαΐνης αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για τη PARP. Απεικονίζεται η μη-διχοτομημένη μορφή (115 kDa) και η διχοτομημένη μορφή (89 kDa) της PARP.



διασπασμένη μορφή και η 89 kDa πρωτεολυμένη μορφή της PARP σε συγκέντρωση πάνω από 1mM ροπιβακαΐνης (Σχήμα III 2B). Επομένως η τεχνική ανάλυσης με Trypan blue, η θραυσματοποίηση του DNA και η διάσπαση της PARP, έδειξαν ότι η ροπιβακαΐνη επάγει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT.

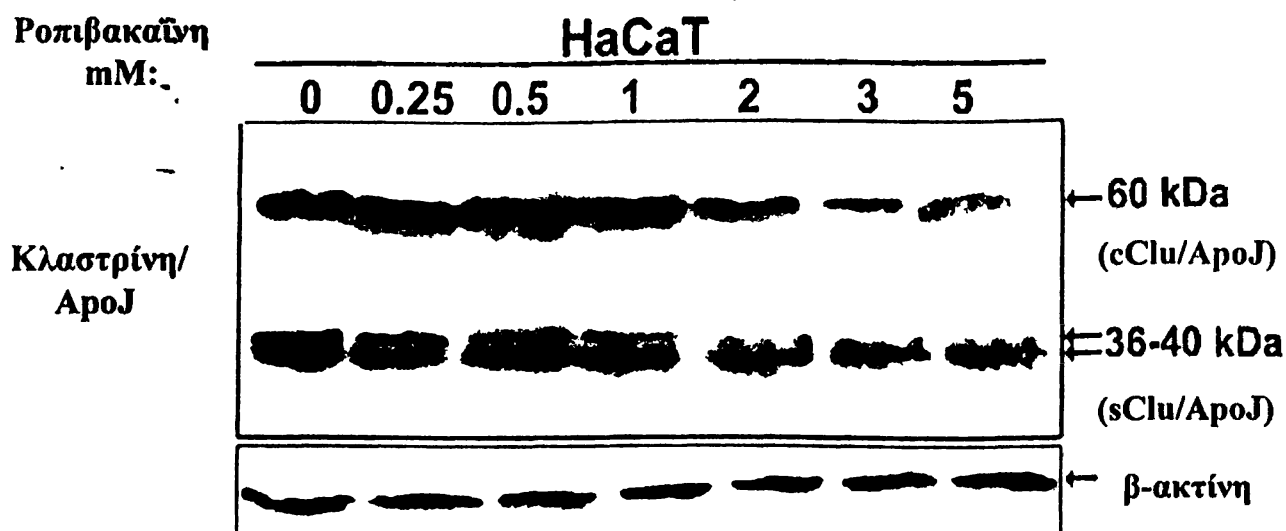
1.2. Η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J , μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη κυτταρική επιβίωση κυττάρων θηλαστικών που εκτίθενται σε στρεσογόνους παράγοντες.

Μια οδός μέσω της οποίας τα αποπτωτικά ερεθίσματα επάγουν τον κυτταρικό θάνατο είναι η μειορρύθμιση της έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων, μεταξύ των οποίων είναι μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2 και η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (Clu/ApoJ). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η έκφραση της Clu/ApoJ, μιας πρωτεΐνης με αντι-αποπτωτικές ιδιότητες που εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση. Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western έδειξε ότι η χορήγηση ροπιβακαΐνης στα κύτταρα HaCaT για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό είχε σαν αποτέλεσμα την εμφανή μείωση των επιπέδων της Clu/ApoJ, ειδικά σε δόσεις ροπιβακαΐνης μεγαλύτερες των 2 mM (Σχήμα III 3), καταδεικνύοντας ότι η μείωση της έκφρασής της, είναι δυνατόν να εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT, από τη ροπιβακαΐνη.

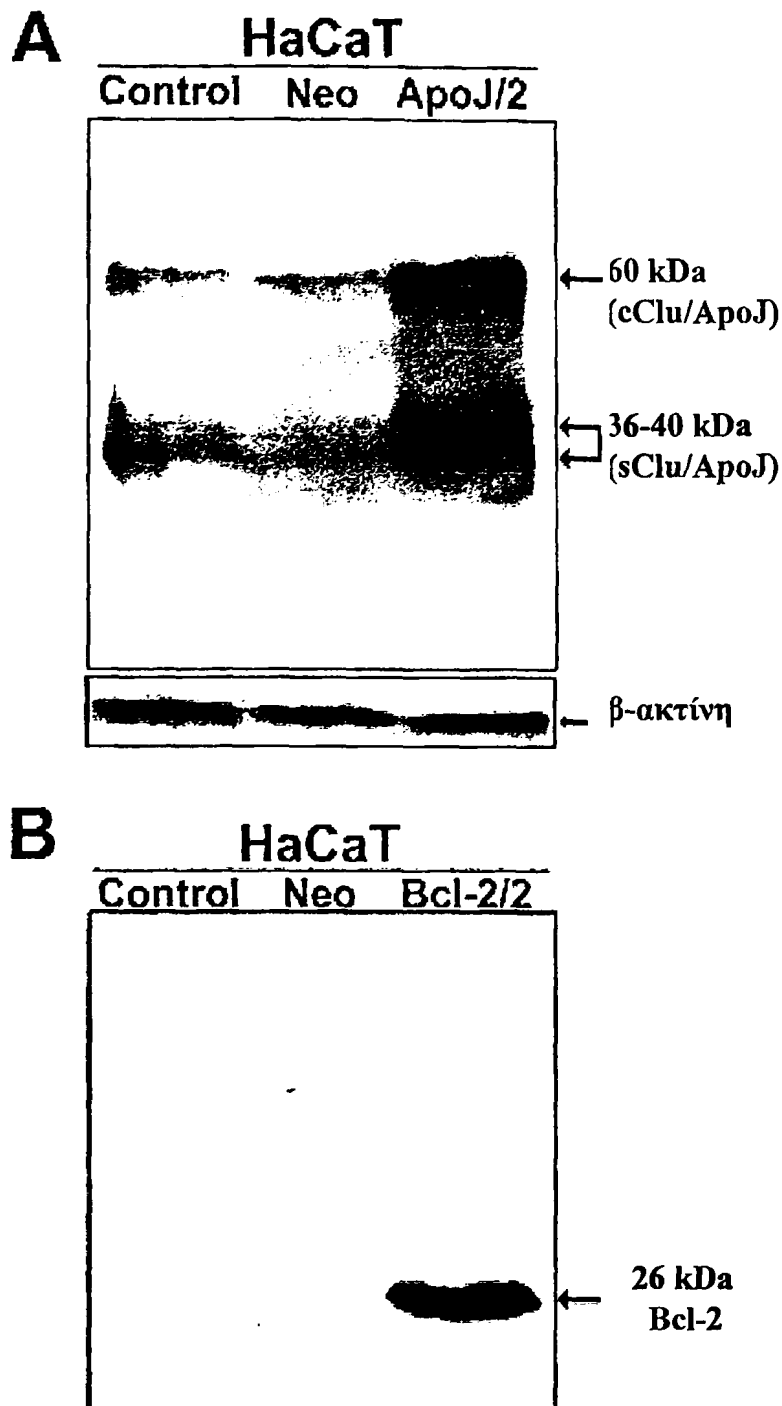
1.3 Παραγωγή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη κλαστρίνη/ApoJ

Για να αναλυθεί περαιτέρω ο ρόλος της Clu/ApoJ και να συγκριθεί με την καλά γνωστή αντι-αποπτωτική δράση της Bcl-2 στην απόπτωση από διάφορους παράγοντες στρες κατασκευάστηκαν με διαμόλυνση κυτταρικές σειρές HaCaT που υπερεκφράζουν τον πρότυπο φορέα Neo, τη Bcl-2 ή τη Clu/ApoJ. Διάφοροι κλώνοι κυττάρων ανθεκτικοί σε G418 απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για την έκφραση της Clu/ApoJ και της Bcl-2 με ανοσοαποτύπωμα κατά western (Σχήμα III 4). Το Σχήμα III 4A δείχνει την έκφραση της Clu/ApoJ στον κλώνο 2 (που στην συνέχεια αναφέρεται σαν HaCaTApoJ/2). Τα διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT εκφράζουν την Clu/ApoJ σε υψηλότερα επίπεδα από ότι τα αντίστοιχα μη-διαμολυσμένα και neo-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT (Σχήμα III 4A). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε σχέση με τις διάφορες μορφές της Clu/ApoJ ανιχνεύθηκαν, μια διαχυτική διπλή ζώνη ~36-40 kDa που αντιπροσωπεύει τις α- και β-αλύσους 75-80 kDa της εκκρινόμενης μορφής της Clu/ApoJ (sClu/ApoJ), λόγω της αναγωγής στα κατάλοιπα Asp²²⁷-Ser²²⁸ και μια ζώνη 60 kDa που αντιπροσωπεύει την ενδοκυττάρια μορφή της Clu/ApoJ (cClu/ApoJ) η οποία δεν εκκρίνεται αλλά γλυκοζυλιώνεται ενδοκυττάρια παράγοντας τελικά την τελική sClu/ApoJ (Trougakos and Gonos 2002, Petropoulou et al., 2001). Όπως φαίνεται στο Σχήμα III 4B, ενώ καμία έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 δεν εντοπίζεται στα κύτταρα HaCaT και HaCaTNeo, ο κλώνος 2 των κυττάρων HaCaT που είναι διαμολυσμένα με το Bcl-2 (που στη συνέχεια αναφέρεται σαν HaCaT Bcl-2/2) εκφράζει τη πρωτεΐνη Bcl-2 μοριακού βάρους 26 kDa σε πολύ υψηλά επίπεδα.





Σχήμα III 3. Η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την έκφραση της Clu/ApoJ στα κύτταρα HaCaT. Εκχυλίσματα όλων των πρωτεϊνών απομονώθηκαν από κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και αναλύθηκαν με αποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της Clu/ApoJ και της β-ακτίνης. Απεικονίζεται η ενδοκυτταρική (60 kDa) και η εκκρινόμενη μορφή (75-80 kD) της κλαστρίνης/ApoJ σαν μια διπλή μπάντα ~36-40 kD, που αντιπροσωπεύει τις α- και β- αλύσους της πρωτεΐνης, κάτω από συνθήκες αναγωγής.



Σχήμα III 4. Υπερέκφραση της ανθρώπινης Clu/ApoJ και Bcl-2 σε διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα HaCaT, διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA3.1B, pcDNA3.1/hApoJ και pcDNA3.1/hBcl-2, τα οποία φέρουν τα ανθρώπινα cDNA της Clu/ApoJ και της Bcl-2, αντίστοιχα, και επιλέχτηκαν σε G418 προκειμένου να παραχθούν σταθερά διαμολυσμένοι κυτταρικοί κλώνοι. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με αποτύπωμα κατά western για την έκφραση: (A) Clu/ApoJ και (B) Bcl-2. Ανοσοαποτυπώματα έδειξαν την έκφραση των πρωτεϊνών στους αντίστοιχους κλώνους.

- cClu/ApoJ, ενδοκυτταρική μορφή της κλαστρίνης/ApoJ,
- sClu/ApoJ, εκκρινόμενη μορφή της κλαστρίνης/ApoJ



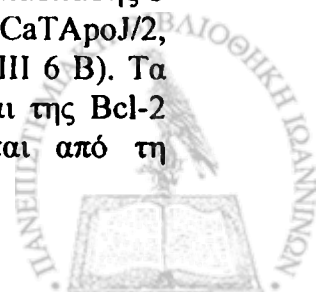
1.4. Η κλαστρίνη/ApoJ και η Bcl-2 μειώνουν την ευαισθησία των κυττάρων HaCaT στη ροπιβακαΐνη

Για να ερευνηθεί αν η Clu/ApoJ και η Bcl-2 μεταβάλλουν τη συμπεριφορά των κυττάρων HaCaT και αν αναστέλλουν την απόπτωση ως απόκριση στη ροπιβακαΐνη, στις κυτταρικές σειρές HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2 χορηγήθηκε ροπιβακαΐνη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0-5 mM) για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και αναλύθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός της. Η ανάπτυξη των κυττάρων HaCaTNeo ανεστάλη σημαντικά από τη ροπιβακαΐνη με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, σε ποσοστό ~50% στα 2 mM ροπιβακαΐνης (Σχήμα III 5 A). Όμως, αυτή η ανασταλτική επίδραση της ροπιβακαΐνης ήταν λιγότερο εμφανής στα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2.

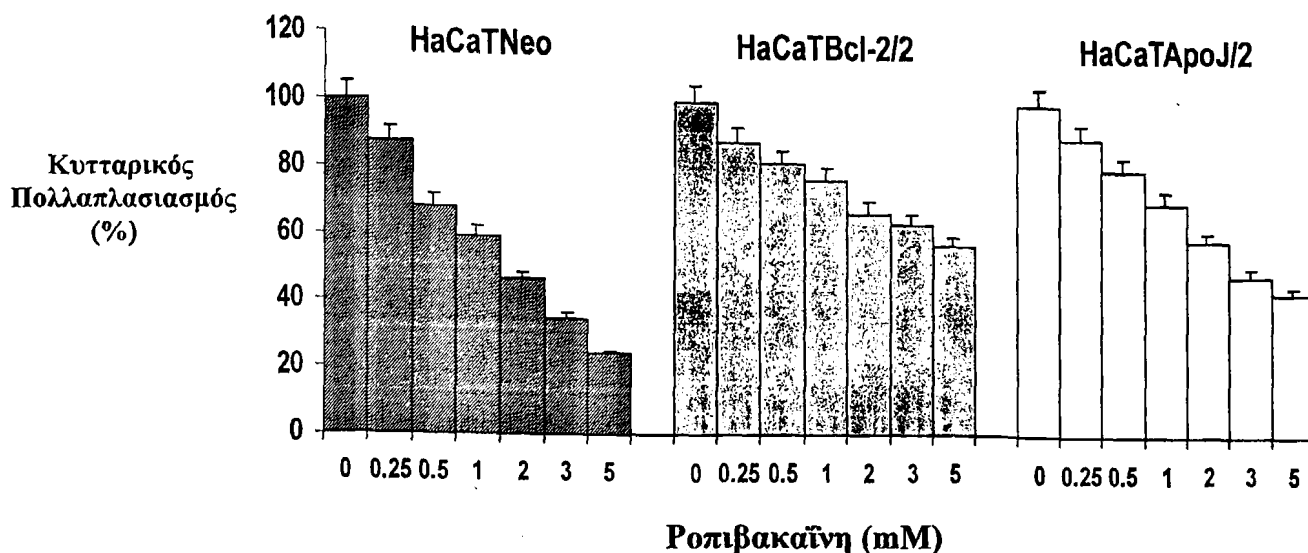
Η κυτταρική βιωσιμότητα των HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2 μετά από χορήγηση ροπιβακαΐνης για 48 ώρες υπολογίστηκε με την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue (Σχήμα III 5 B). Η βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaTNeo μειώθηκε από τη ροπιβακαΐνη με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ακολουθώντας ένα παρόμοιο προφίλ με αυτό των αντίστοιχων μη-διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT (Σχήμα III 1 B). Η έκθεση των κυττάρων HaCaTNeo σε 2 mM ροπιβακαΐνης προκάλεσε κυτταροτοξικότητα με μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας περίπου κατά 50%. Όμως, η κυτταρική βιωσιμότητα στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την Bcl-2 (HaCaTBcl-2/2) και την Clu/ApoJ (HaCaTApoJ/2), διατηρήθηκε παρόμοια όταν έγινε χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ροπιβακαΐνης (Σχήμα III 5 B). Επομένως, τα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2 επιδεικνύουν ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από τη ροπιβακαΐνη.

Για να διερευνήσουμε αν η Clu/ApoJ και η Bcl-2 προκαλούν μείωση της θραυσματοποίησης του DNA από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2, HaCaTApoJ/2 απομονώθηκε το DNA από αιωρούμενα και προσκολλημένα κύτταρα με και χωρίς τη χορήγηση ροπιβακαΐνης και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Σχήμα III 6). Ενώ τα κύτταρα HaCaTNeo υπέστησαν απόπτωση μετά τη χορήγηση ροπιβακαΐνης, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, με παρόμοιο τρόπο προς τα μη-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT, η υπερέκφραση της Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ ελάττωσε την ευαισθησία των κυττάρων HaCaT στη επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη θραυσματοποίηση του DNA (σχήμα III 6 A).

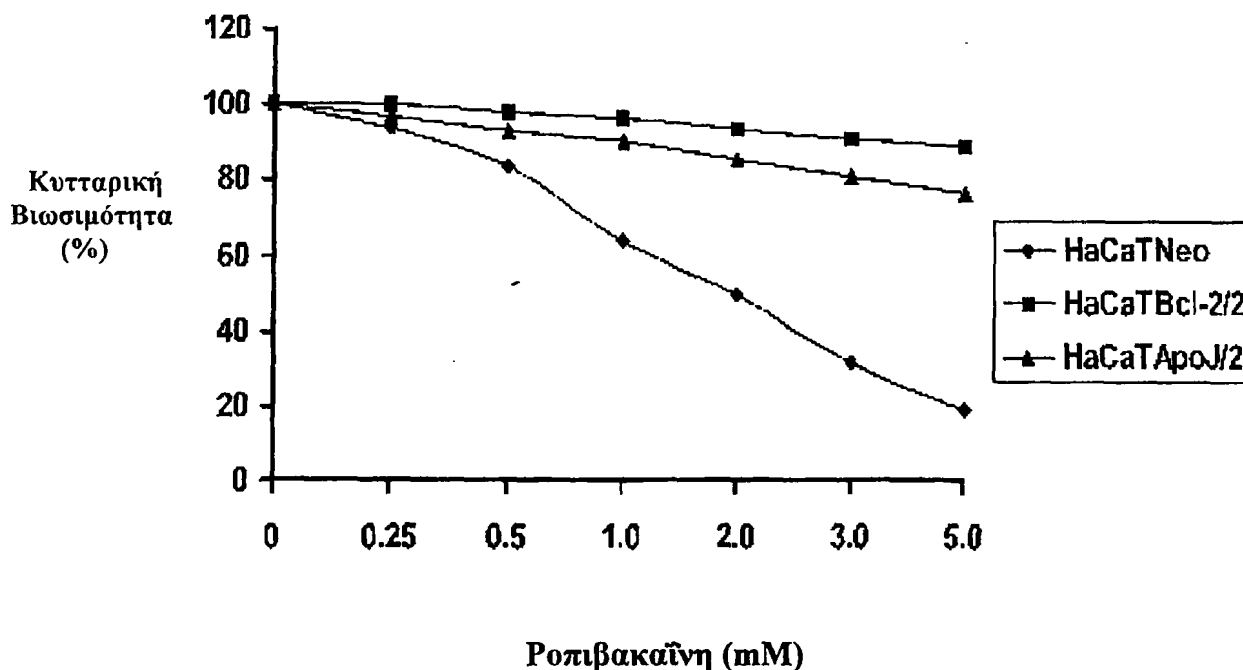
Με δεδομένο ότι η διάσπαση της πολύ-ADP-ριβουλο-πολυμεράσης (PARP), αποτελεί χαρακτηριστικό απόπτωσης, πρωτεΐνες οι οποίες απομονώθηκαν από αιωρούμενα στο θρεπτικό υλικό και προσκολλημένα κύτταρα HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2, παρουσία/απουσία ροπιβακαΐνης, υπεβλήθησαν σε ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP (Σχήμα III 6 B). Ενώ στα κύτταρα HaCaTNeo ανιχνεύτηκε η μη-διασπασμένη 115 kDa μορφή της PARP, και η διασπασμένη 89 kDa μορφή ως αποτέλεσμα της χορήγησης 1 mM ροπιβακαΐνης ή και υψηλότερων δόσεων, στα κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την Clu/ApoJ και τη Bcl-2 ανιχνεύθηκε η μη-διασπασμένη 115 kDa μορφή του ένζυμου (Σχήμα III 6B). Επειδή η PARP είναι ένα υπόστρωμα της κασπάσης-3, εξετάστηκε επίσης η έκφραση της προκασπάσης-3 στα ίδια δείγματα πρωτεϊνών. Η έκφραση της προκασπάσης-3 μειώθηκε στα κύτταρα HaCaTNeo αλλά όχι στα HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2, σε συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης ίσες ή μεγαλύτερες του 1 mM (σχήμα III 6 B). Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Clu/ApoJ και της Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα HaCaT από την απόπτωση που επάγεται από τη ροπιβακαΐνη.



A

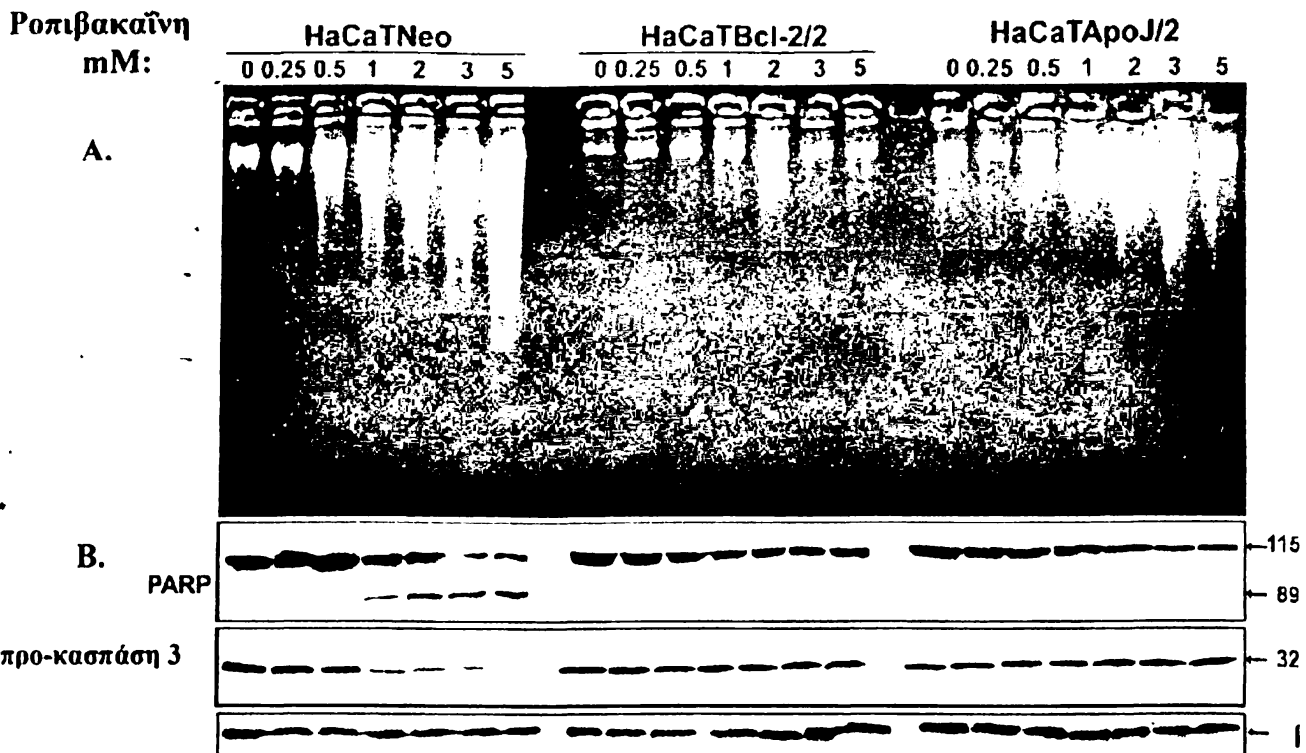


B



Σχήμα III 5. Οι επιδράσεις της ροσιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaTNeo, και HaCaT που υπερεκφράζουν την κλαστρίνη/ApoJ και την Bcl-2. (A) Στα κύτταρα χορηγήθηκαν 0-5 mM ροσιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος \pm SD έξι μετρήσεων ($P < 0.05$). (B) Στα κύτταρα χορηγήθηκαν 0-5.0 mM ροσιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε με την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue.





Σχήμα III 6. Η εκτοπική έκφραση της Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaT. (A) Το DNA απομονώθηκε από προσκολλημένα και αιωρούμενα κύτταρα HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2 στα οποία έγινε χορήγηση ροπιβακαΐνης και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,6% πηκτής αγαρόζης. (B) Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP και η μείωση της έκφρασης της προκασπάσης-3 από την υπερέκφραση της ανθρώπινης Bcl-2 και της ανθρώπινης κλαστρίνης/ApoJ. Στα κύτταρα HaCaTNeo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/2 χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και όλες οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τα κύτταρα με τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης και χωρίς αυτή, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP και της προκασπάσης-3. Απεικονίζεται η μη-διασπασμένη μορφή (115 kDa) και η πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή της PARP (89 kD).

2. Μερική αναστολή από τον νιτρικό ψευδάργυρο, $Zn(NO_3)_2$, της επαγόμενης από τη ροπιβακαΐνη απόπτωσης στα κερατινοκύτταρα HaCaT

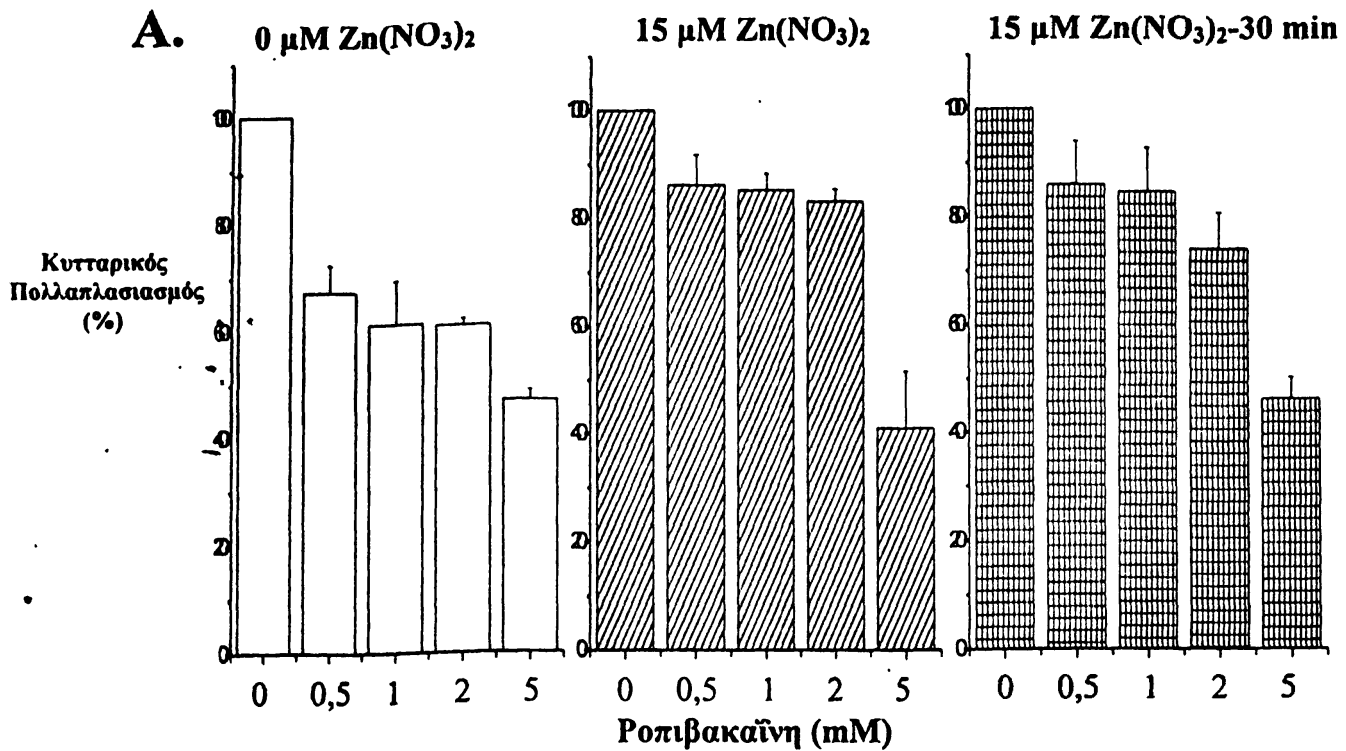
2.1. Αναστολή από τον νιτρικό ψευδάργυρο, $Zn(NO_3)_2$, της επαγόμενης από τη ροπιβακαΐνη, μείωσης του πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) και σταθερή συγκέντρωση 15 μM $Zn(NO_3)_2$ σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες, με 2 τρόπους: α) ταυτόχρονη χορήγηση $Zn(NO_3)_2$ και ροπιβακαΐνης και β) χορήγηση $Zn(NO_3)_2$ 30 λεπτά πριν τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης, προκειμένου να μελετηθεί η αναστολή της μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα III 7 A, 15 μM $Zn(NO_3)_2$ ανέστειλαν τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT που προκλήθηκε από 0,5, 1 και 2 mM αλλά όχι από 5 mM ροπιβακαΐνης, υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι η αναστολή αυτή ήταν μεγαλύτερη με ταυτόχρονη χορήγηση $Zn(NO_3)_2$ και ροπιβακαΐνης, από ότι με προχορήγηση $Zn(NO_3)_2$ 30 λεπτά πριν από τη χορήγηση ροπιβακαΐνης. Στο Σχήμα III 7 B, φαίνεται ότι η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT από τη ροπιβακαΐνη αναστάλη από 15 μM $Zn(NO_3)_2$ και επίσης ότι η αναστολή αυτή ήταν πιο εμφανής με ταυτόχρονη χορήγηση $Zn(NO_3)_2$ και ροπιβακαΐνης, σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε με την προχορήγηση $Zn(NO_3)_2$ 30 λεπτά πριν από τη ροπιβακαΐνη.

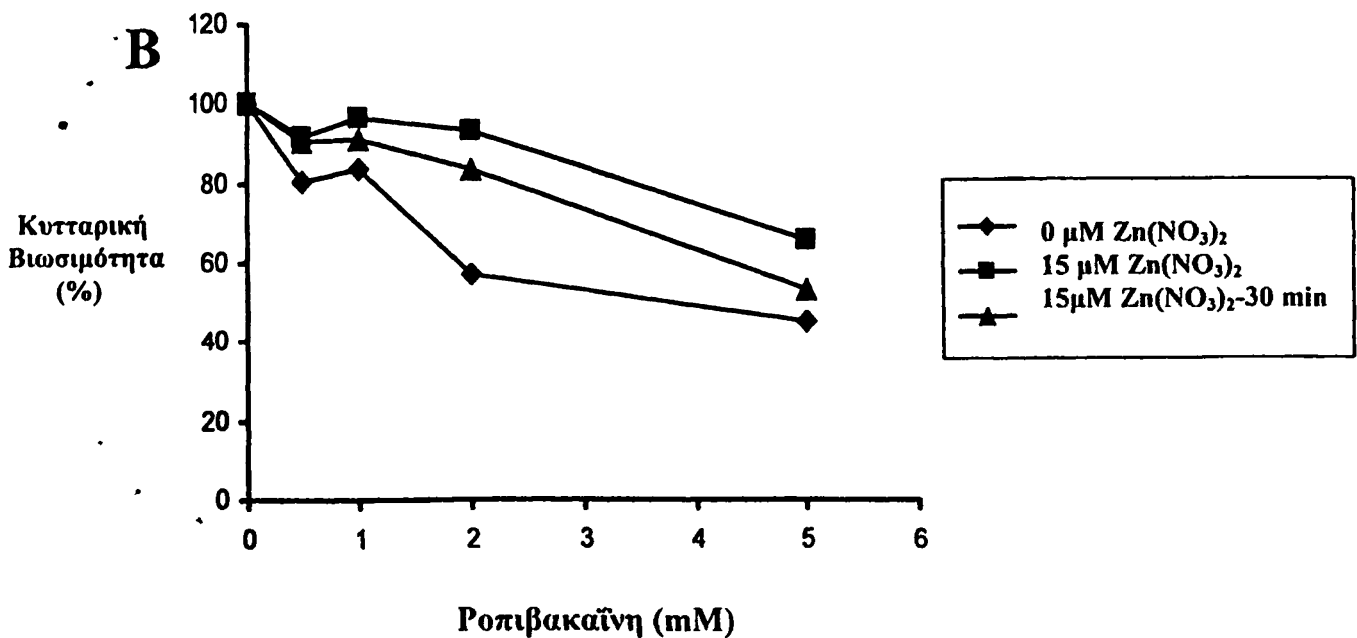
2.2. Ο νιτρικός ψευδάργυρος, $Zn(NO_3)_2$, αναστέλλει μερικώς, την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη απόπτωση στα κύτταρα HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) καθώς και σταθερή συγκέντρωση 15 μM $Zn(NO_3)_2$ και επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, με ταυτόχρονη χορήγηση $Zn(NO_3)_2$ και ροπιβακαΐνης και με προχώρηση $Zn(NO_3)_2$ 30 λεπτά πριν τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης. DNA απομονώθηκε από προσκολλημένα και αιωρούμενα κύτταρα HaCaT και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προκειμένου να μελετηθεί η θραυσματοποίησή του. Στο Σχήμα III 8 A, φαίνεται ότι η απόπτωση που επάγονταν από τα 0.5 και 1 mM ροπιβακαΐνης αναστάλη μερικώς από τα 15 μM $Zn(NO_3)_2$ σε αντίθεση με τη συγκέντρωση των 2 και 5 mM ροπιβακαΐνης, όπου δε υπήρξε αναστολή της απόπτωσης υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Η ροπιβακαΐνη, σε συγκεντρώσεις πάνω από 1 mM προκάλεσε, επίσης και τη διάσπαση του γνωστού υποστρώματος της κασπάσης-3, PARP (σχήμα III 2 B). Η μερική αναστολή της επαγωγής της απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη λόγω του $Zn(NO_3)_2$ φάνηκε και από το γεγονός ότι, μέχρι και το 1mM ροπιβακαΐνης, διατηρήθηκε η μη διασπασμένη μορφή της PARP των 115 kDa. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις 2 mM και 5 mM ροπιβακαΐνης διακρίνεται η πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή της PARP των 89 kDa (Σχήμα III 8 B). Επίσης, όπως φάνηκε κυρίως από τη θραυσματοποίηση του DNA, η έστω και μερική αναστολή της επαγωγής απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη λόγω του $Zn(NO_3)_2$ ήταν πιο εμφανής όταν ο $Zn(NO_3)_2$ χορηγήθηκε ταυτόχρονα με τη ροπιβακαΐνη σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται όταν ο $Zn(NO_3)_2$ χορηγήθηκε 30 λεπτά πριν από τη ροπιβακαΐνη. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι η

HaCaT



HaCaT

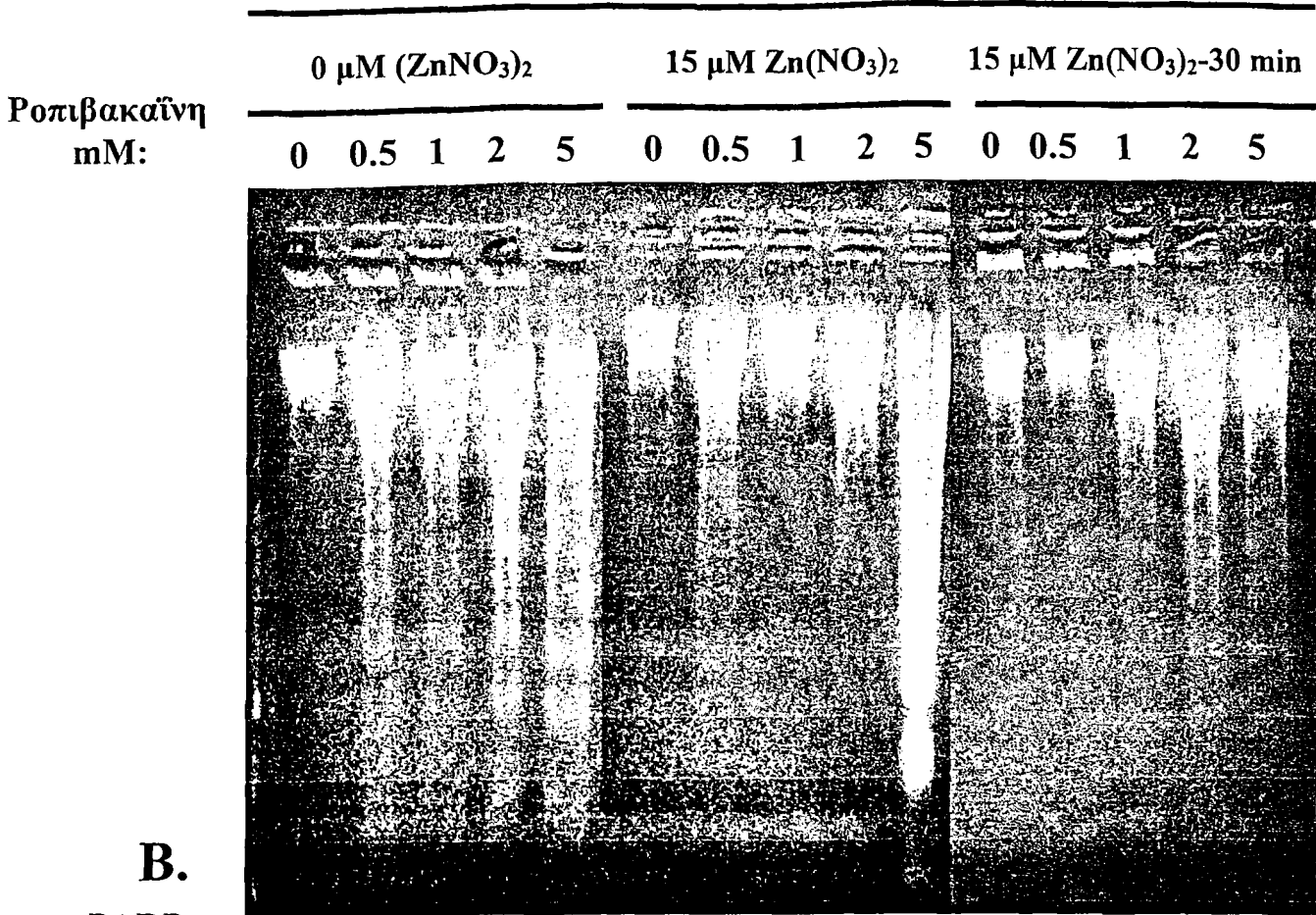


Σχήμα III 7. Αναστολή της μείωσης του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT λόγω της ροσιβακαΐνης, από τον νιτρικό ψευδάργυρο ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$). (A) Στα κύτταρα χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις ροσιβακαΐνης (0-5mM) και 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες. Τα πειράματα έγιναν δύο φορές με μετρήσεις εις διπλούν. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος με $\pm\text{SD}$ ($p < 0,05$). (B) Στα κύτταρα χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις ροσιβακαΐνης (0-5mM) και 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες και ο αριθμός σε ποσοστό των ζωντανών κυττάρων προσδιορίστηκε με την τεχνική αποκλεισμού με *trypan blue*.



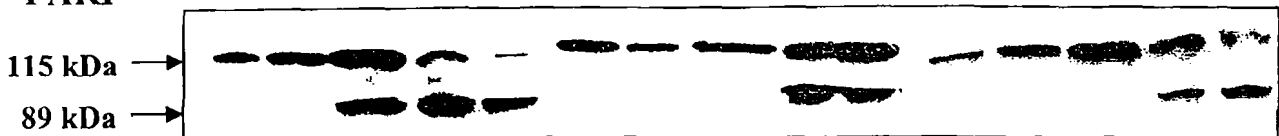
A.

HaCaT



B.

PARP



Σχήμα III 8. Μερική αναστολή της, επαγόμενης από τη ροπιβακαΐνη, απόπτωσης στα κύτταρα HaCaT, από τον νιτρικό ψευδάργυρο ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$). Στα κύτταρα χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης και 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, με ταυτόχρονη χορήγηση με τη ροπιβακαΐνη και με προχορήγηση $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, 30 λεπτά πριν τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης και επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. (A) Το DNA απομονώθηκε από αιωρούμενα και προσκολλημένα κύτταρα, και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,6% πηκτής αγαρόζης. (B) Όλες οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία έγινε χορήγηση ροπιβακαΐνης και $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, αναλύθηκαν με αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP. Δείχνονται η μη-διασπασμένη μορφή (115 kDa) και η πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή (89 kDa) της PARP.

προστατευτική επίδραση του $Zn(NO_3)_2$ στα κερατινοκύτταρα HaCaT, ενάντια στην απόπτωση που επάγεται από τη ροπιβακαΐνη, ασκείται κυρίως μέχρι τη συγκέντρωση του 1 mM ροπιβακαΐνης και κυρίως όταν ο $Zn(NO_3)_2$ χορηγείται ταυτόχρονα με τη ροπιβακαΐνη.

3. Ο ρόλος της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP, ψευδαργυροπεπτιδάση) και του νιτρικού ψευδαργύρου $Zn(NO_3)_2$ στην επαγωγή απόπτωσης κερατινοκυττάρων HaCaT

3.1. Η ροπιβακαΐνη μειορρυθμίζει την πρωτεϊνική έκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) παρουσία και απουσία νιτρικού ψευδαργύρου $Zn(NO_3)_2$

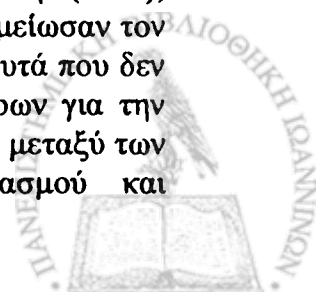
Στα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) ταυτόχρονα με σταθερή συγκέντρωση 15 μM $Zn(NO_3)_2$ και επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Ερευνήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της μεταλλοπεπτιδάσης ψευδαργύρου, ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP), η οποία παίζει ρόλο στον πόνο και στην απόπτωση των κυττάρων (Roques et al 1993, Erdős and Skidgel 1989 Papandreou et al., 1998, Dai et al., 2001, Mari et al., 1997, Sumitomo et al 2000, Sumitomo et al., 2004). Πρωτεΐνες από προσκολλημένα και αιωρούμενα κύτταρα HaCaT απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της NEP. Όπως φαίνεται στο σχήμα III 9 η ροπιβακαΐνη είχε σαν συνέπεια την μειορρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης της NEP με δοσοεξαρτώμενο τρόπο υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Η μειορρύθμιση αυτή έγινε με παρόμοιο τρόπο απουσία και παρουσία 15 μM $Zn(NO_3)_2$ πράγμα που σημαίνει ότι η χορήγηση του $Zn(NO_3)_2$ δεν επηρέασε την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη μειορρύθμιση της NEP.

3.2. Κατασκευή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT που υπερεκφράζουν την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP)

Για να αναλυθεί περαιτέρω ο ρόλος της NEP στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT κατασκευάστηκαν με διαμόλυνση σταθερές κυτταρικές σειρές HaCaTNeo, και HaCaTNEP. Κύτταρα ανθεκτικά σε G418 απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για την έκφραση της NEP με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Τα διαμολυσμένα με πλασμίδια κύτταρα HaCaT εξέφραζαν την NEP σε υψηλότερα επίπεδα από ότι τα αντίστοιχα neo-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT (Σχήμα III 10).

3.3. Η υπερέκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) στα κύτταρα HaCaT ελαττώνει τον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητά τους επάγοντας απόπτωση

Κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP), HaCaTNEP, μετά από επώαση σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες μείωσαν τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική βιωσιμότητά τους, σε σύγκριση με αυτά που δεν την υπερέκφραζαν (HaCaTNeo), όπως προέκυψε από μετρήσεις κυττάρων για την αύξησή τους και από την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue. Η διαφορά μεταξύ των μετρούμενων ποσοστιαίων μέσων όρων κυτταρικού πολλαπλασιασμού και



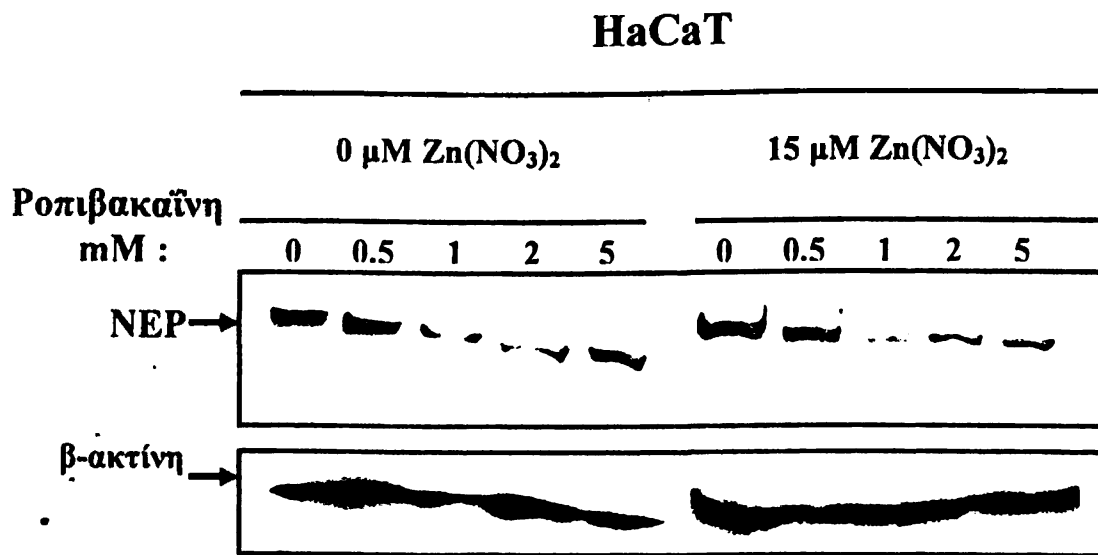
κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$, t-test) (Σχήματα III 11 A και III 11 B). Τα κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την NEP, HaCaTNEP, και τα κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με τον βέκτορα, HaCaTNeo, επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Από την θραυσματοποίηση του DNA φαίνεται ότι η υπερέκφραση της NEP στα κύτταρα HaCaT υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης, επήγγε την απόπτωσή τους (Σχήμα III 12 A). Η υπερέκφραση της NEP προκάλεσε τη διάσπαση του γνωστού υποστρώματος της κασπάσης-3, PARP, από το πολυπεπτιδίο των 115 kDa στο πρωτεολυτικά διασπασμένο θραύσμα των 89 kDa, υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης (Σχήμα III 12 B).

3.4. Η επαγωγή απόπτωσης από την ροπιβακαΐνη σε κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζουν την NEP, δεν αναστέλλεται από τον $Zn(NO_3)_2$

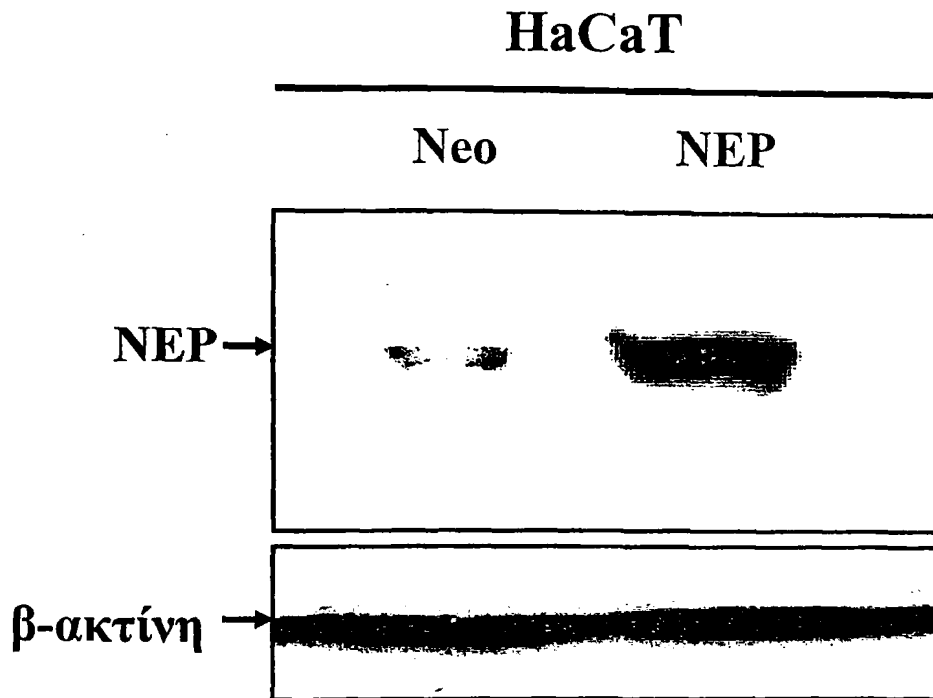
Κύτταρα HaCaT που δεν υπερέκφραζαν (HaCaTNeo), και κύτταρα που υπερέκφραζαν την NEP (HaCaTNEP) επώαστηκαν με 15 μM $Zn(NO_3)_2$ και σε αυξανόμενες δόσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα III 13 η βιωσιμότητα των κυττάρων που υπερέκφραζαν την NEP (HaCaTNEP) μειώθηκε με τον ίδιο τρόπο απουσία και παρουσία του $Zn(NO_3)_2$. Αντίθετα, στα κύτταρα HaCaTNeo όπως παρατηρήθηκε και στα HaCaT, η μείωση της κυτταρικής τους βιωσιμότητας ανεστάλη από τον $Zn(NO_3)_2$. Επίσης τα κύτταρα HaCaTNeo και HaCaTNEP επώαστηκαν με 15 μM $Zn(NO_3)_2$ και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες προκειμένου να μελετηθεί ο βαθμός επαγωγής της απόπτωσης, με ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους DNA, σε πηκτή αγαρόζης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα III 14 ο βαθμός επαγωγής της απόπτωσης στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την NEP (HaCaTNEP), ήταν το ίδιο έντονος είτε παρουσία ή απουσία ροπιβακαΐνης, είτε απουσία ή παρουσία $Zn(NO_3)_2$. Αντίθετα στα κύτταρα HaCaTNeo φαίνεται ότι ο $Zn(NO_3)_2$ ανέστειλε μερικά, την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη απόπτωση, ειδικά στις συγκεντρώσεις 0,5 και 1 mM, όπως παρατηρήθηκε και στα κύτταρα HaCaT.

Η ροπιβακαΐνη, σε συγκεντρώσεις από 1 mM και πάνω, προκάλεσε επίσης και τη διάσπαση της PARP, από τη μη διασπασμένη μορφή των 115 kDa στη πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή των 89 kDa, στα κύτταρα HaCaTNeo, όπως έχει ήδη αναφερθεί (σχήμα III 6 B). Η μερική αναστολή της επαγωγής της απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη, λόγω του $Zn(NO_3)_2$, όσον αφορά τη διάσπαση της PARP, φάνηκε επίσης στα HaCaTNeo, όπως παρατηρήθηκε και στα HaCaT (σχήμα III 8 B), και ασκείται κυρίως μέχρι και τη συγκέντρωση του 1 mM ροπιβακαΐνης. Αντίθετα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την NEP (HaCaTNEP), παρατηρείται η διάσπαση της PARP (115 kDa και 89 kDa), παρουσία και απουσία ροπιβακαΐνης και $Zn(NO_3)_2$ υποδηλώνοντας ότι ο βαθμός της απόπτωσης είναι ο ίδιος (σχήμα III 14). Προέκυψε επομένως το συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση της NEP στα κύτταρα HaCaT, υπό τις πειραματικές μας συνθήκες, περιορίζει την προστατευτική δράση του Zn έναντι της απόπτωσης.



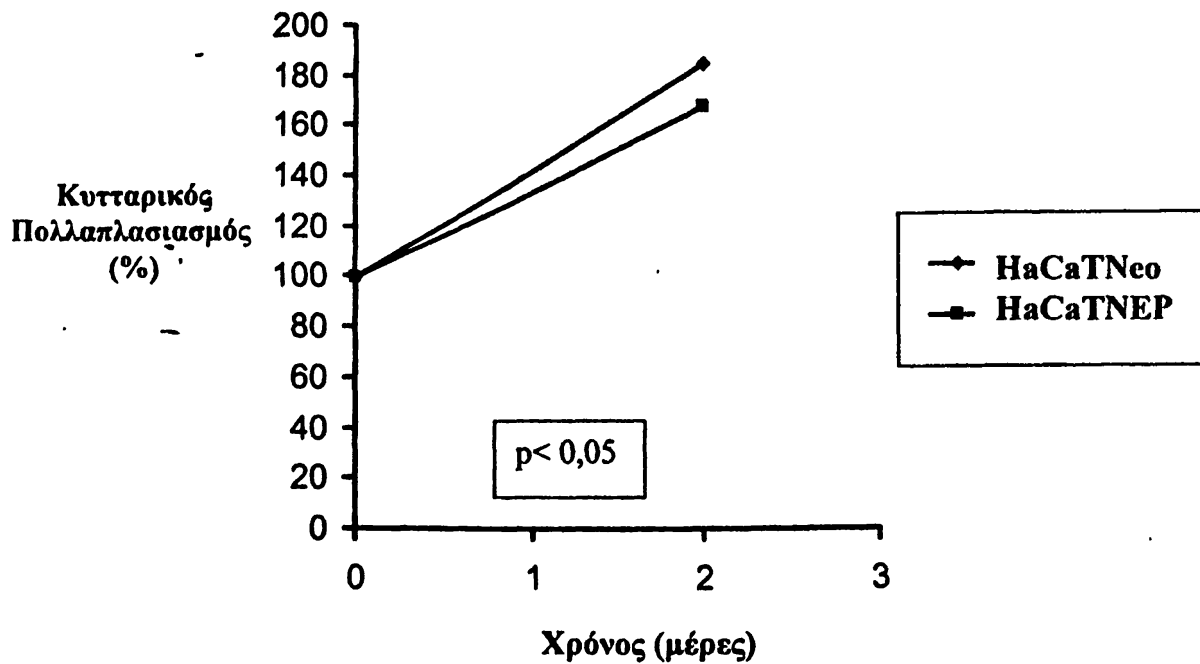


Σχήμα III 9. Η ροπιβακαΐνη μειορυθμίζει την έκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) απουσία και παρουσία νιτρικού ψευδαργύρου ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) στα κύτταρα HaCaT. Εκχυλίσματα όλων των πρωτεϊνών απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης ταυτόχρονα με 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της NEP και της β-ακτίνης.

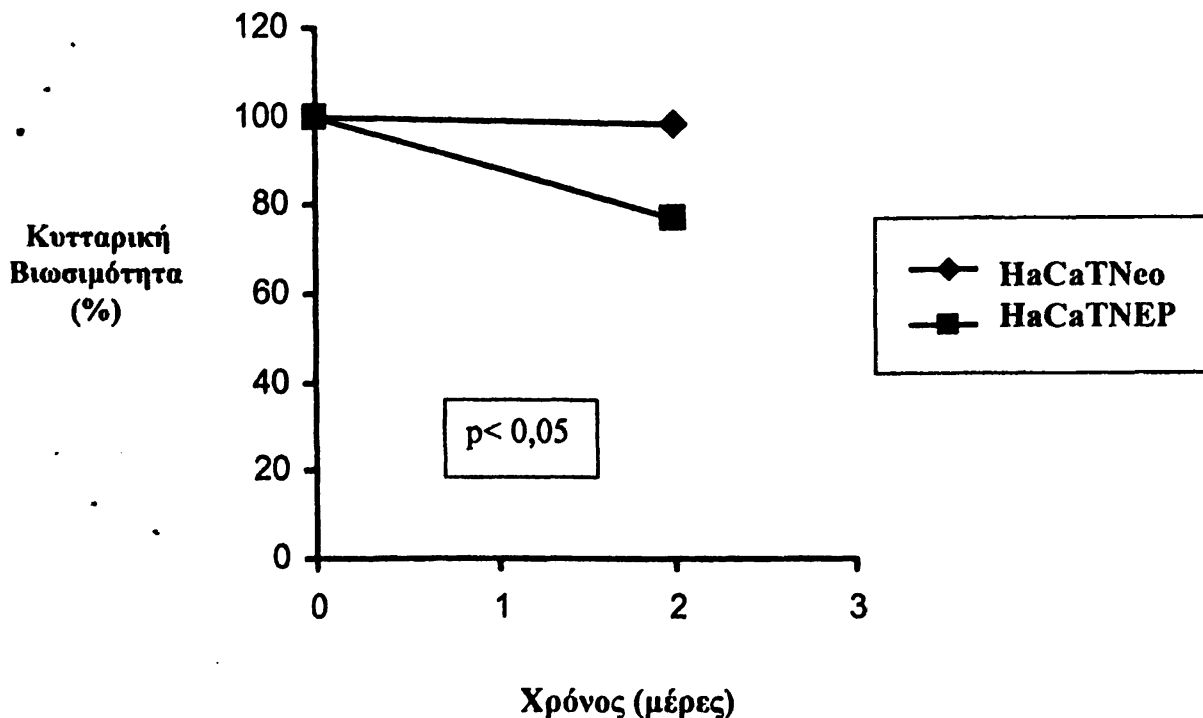


Σχήμα III 10. Έκφραση της NEP κουνελιού σε διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα HaCaT, διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pcDNA3.1 B, και pRc/CMV2 NEP, το οποίο φέρει το cDNA της NEP κουνελιού και επιλέχθηκαν σε G418 προκειμένου να δημιουργηθούν οι σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές, HaCaTNeo και HaCaTNEP. Πρωτεΐνες των κυτταρικών σειρών HaCaTNeo και HaCaTNEP μετά, απομονώθηκαν και υπέστησαν ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της NEP.

A.

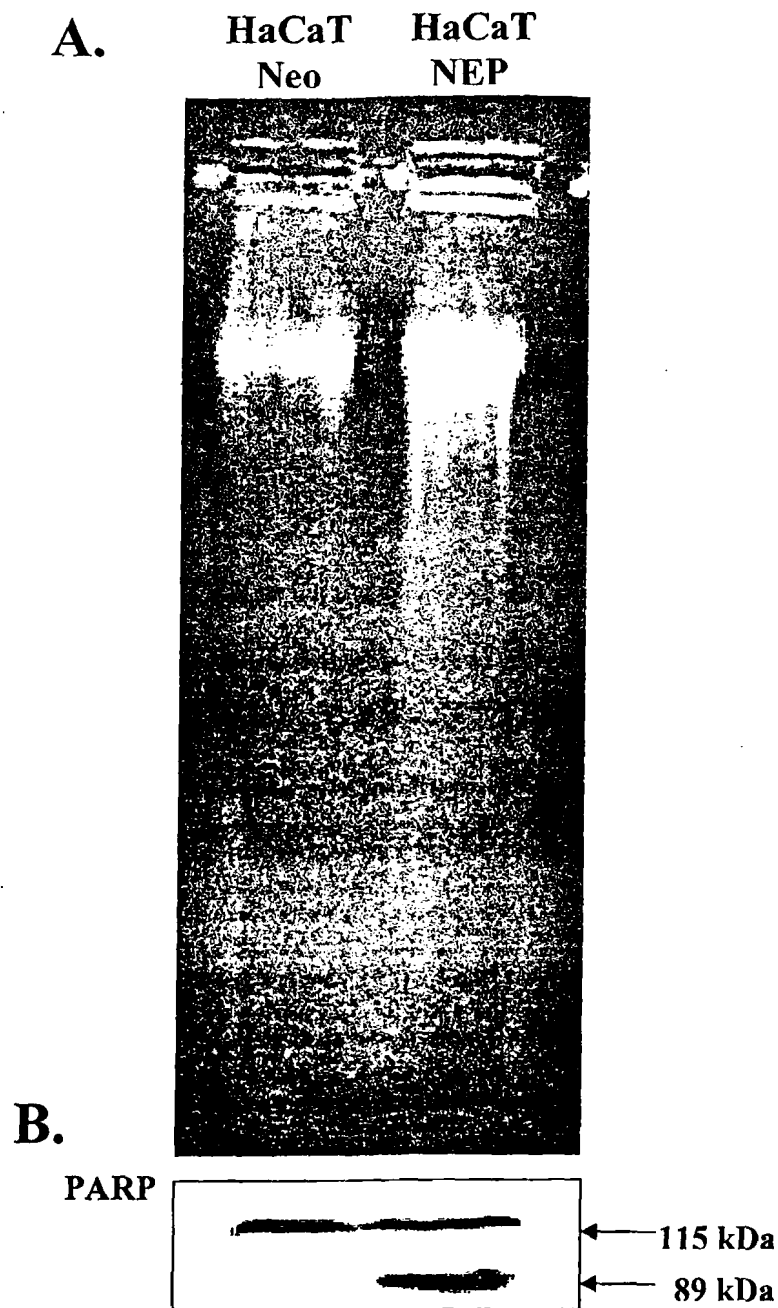


B.



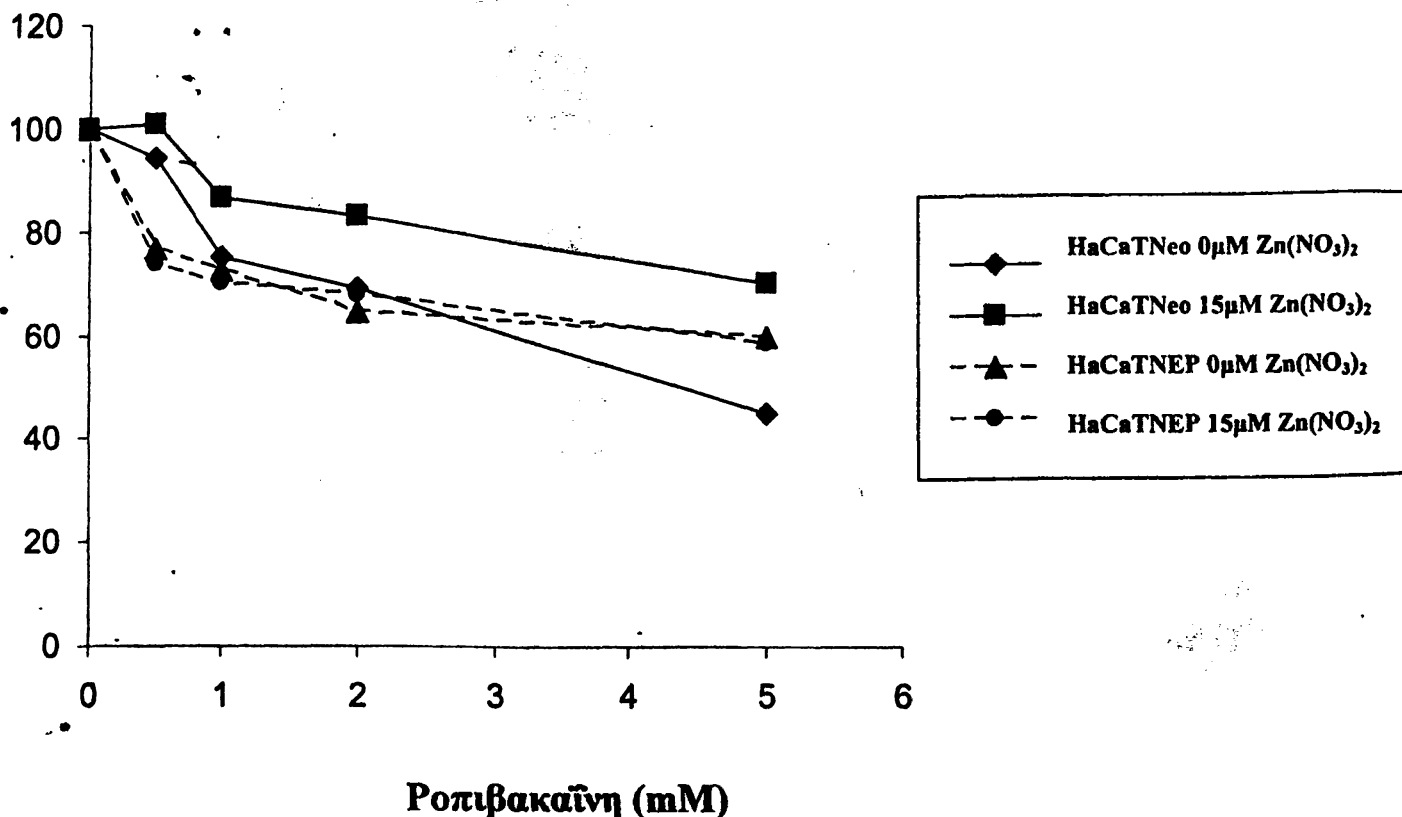
Σχήμα III 11. Η υπερέκφραση της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP) αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT. (A) Τα κύτταρα HaCaT που δεν υπερεκφράζουν την NEP (HaCaTNeo) και τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την NEP (HaCaTNEP) επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και μετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer. (B) Στα κύτταρα HaCaTNeo και HaCaTNEP, υπολογίστηκε η κυτταρική βιωσιμότητα με την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue μετά από επώαση 48 ωρών σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό.





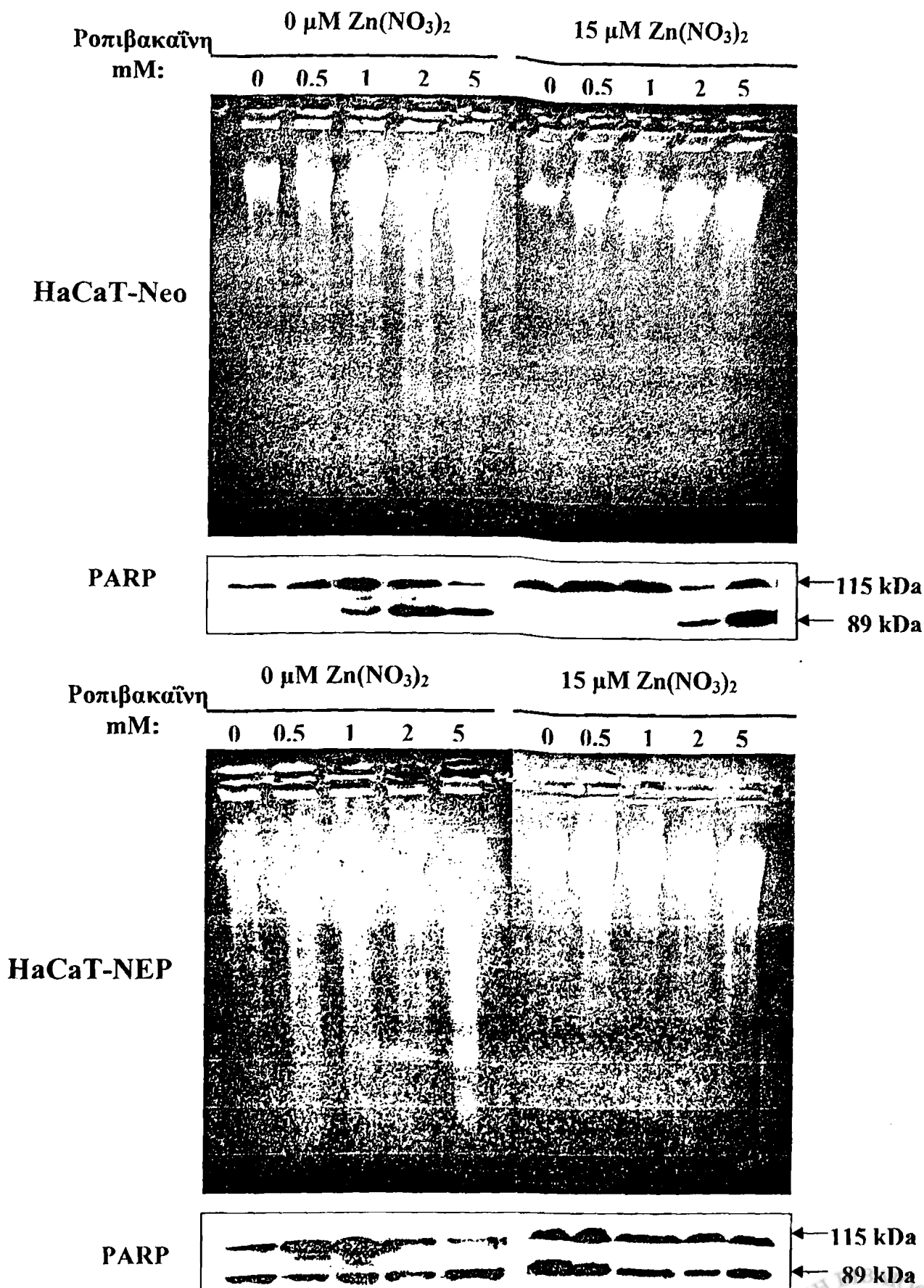
Σχήμα III 12. Η υπερέκφραση της NEP επάγει απόπτωση στα κύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα που δεν υπερέκφράζουν (HaCaTNeo) και τα κύτταρα που υπερέκφράζουν την NEP (HaCaTNEP) επωάστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (A) Το DNA απομονώθηκε από αιωρούμενα και προσκολλημένα κύτταρα, και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,6% πηκτής αγαρόζης. (B) Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τα κύτταρα, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της PARP. Απεικονίζεται η μη-διασπασμένη μορφή (115 kDa) και η πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή (89kDa) της PARP.

Κυτταρική
βιωσιμότητα
(%)



Σχήμα III 13. Ο νιτρικός ψευδάργυρος ($Zn(NO_3)_2$), δεν αναστέλλει την μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, κυττάρων HaCaT που υπερεκφράζουν την μεταλοπεπτιδάση (NEP), που προκαλεί η ροπιβακαΐνη. Στα κύτταρα χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις ροπιβακαΐνης (0-5 mM) και 15 μM $Zn(NO_3)_2$, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό για 48 ώρες και ο αριθμός σε ποσοστό των ζωντανών κυττάρων προσδιορίστηκε με την τεχνική αποκλεισμού με trypan blue.





Σχήμα III 14. Ο Zn αναστέλλει μερικά την απόπτωση που προκαλεί η ροπιβακαΐνη σε κύτταρα HaCaTNeo, αλλά δεν φαίνεται να έχει το ίδιο αποτέλεσμα σε κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζουν την NEP (HaCaTNEP). Στα κύτταρα χορηγήθηκαν 0-5 mM ροπιβακαΐνης και 15 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ με ταυτόχρονη χορήγηση και επώαστηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Το DNA απομονώθηκε από αιωρούμενα και προσκολλημένα κύτταρα, και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,6% πηκτής αγαρόζης. Όλες οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τα κύτταρα στα οποία έγινε χορήγηση ροπιβακαΐνης και $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP. Απεικονίζονται η μη-διασπασμένη μορφή (115 kDa) και η πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή (89 kDa) της PARP.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Επιδράσεις της ροπιβακαΐνης στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κυττάρων θηλαστικών: ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2

Η κλινική χρήση των τοπικών αναισθητικών, όπως και η ροπιβακαΐνη, στηρίζεται στην ιδιότητά τους να προκαλούν παροδική και αναστρέψιμη απώλεια των αισθήσεων, με παρεμπόδιση της νευρικής αγωγιμότητας κυρίως των νευρικών ινών Αδ και C, για τον πόνο αποκλείοντας στους διαύλους νατρίου (Na^+) (Rang and Dale, 1991). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια αυθόρμητα αθανатоποιημένη σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων δέρματος HaCaT (Boukamp et al., 1988). Εκτός από την σχετικά εύκολη χρήση τους σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (υλικά και μέθοδοι), η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιήθηκε επειδή το δέρμα και το νευρικό σύστημα έχουν την ίδια βλαστική προέλευση, προέρχονται από το εξώδερμα και γι' αυτό έχουν κοινούς λειτουργικούς χαρακτήρες (Sadler, 1990).

Στη παρούσα μελέτη, η χορήγηση 0-5 mM ροπιβακαΐνης στα κερατινοκύτταρα HaCaT για 24 και 48 ώρες ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό τους με δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε θρεπτικό υλικό, απουσία ορού. Η αναστολή αυτή ήταν προφανής, μετά από επώαση των κυττάρων στο αναισθητικό για 48 ώρες, προκαλώντας αναστολή στον πολλαπλασιασμό τους κατά 50% στη συγκέντρωση των 2 mM. Επίσης βρέθηκε ότι και η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT μειώθηκε μετά από επώαση 48 ωρών στη ροπιβακαΐνη, σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η ελάττωση στη βιωσιμότητά τους προκλήθηκε κατά περίπου 50% στη συγκέντρωση των 2 mM ροπιβακαΐνης (σχήμα III 1 A, B). Τα ευρήματα αυτά ήταν σε συμφωνία και με αποτελέσματα μελετών σε διάφορα κύτταρα από τη ροπιβακαΐνη. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι η ροπιβακαΐνη προκάλεσε την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καλλιεργούμενων ινοβλαστών ανθρώπου σε δόσεις 50 μM και 500 μM σε 1 % και 10% ορού αντίστοιχα, ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε δόσεις 1 mM και 500 mM σε 5 % και 40 % ορού αντίστοιχα και των κερατινοκυττάρων ανθρώπου σε δόσεις 100 mM (Martinsson, Hagerstrand and Dalsgaard, 1993). Παρομοίως, το τοπικό αυτό αναισθητικό ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών αδενοκαρκινώματος από το παχύ έντερο HT-29 και Caco-2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, πιθανόν λόγω της αποπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης (Martinsson, 1999). Επίσης, η ροπιβακαΐνη και η βουπιβακαΐνη σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 500 μM , ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό καλλιεργούμενων ινοβλαστών από τα πόδια νεογέννητου αρσενικού αρουραίου Wistar και καρκινικών κυττάρων νεφρού πιθήκου (Vero), με τη ροπιβακαΐνη να έχει τη πιο ισχυρή ανασταλτική επίδραση (De Iuliis et al., 2001). Ακόμα η ροπιβακαΐνη προκάλεσε νευροτοξικότητα σε καλλιεργούμενους αναπτυσσόμενους νευρώνες, απομονωμένους από το γάγγλιο της νωτιαίας ρίζας εμβρύου κοτόπουλου, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό τους (Radwan, Saito and Goto, 2002). Τέλος, η ροπιβακαΐνη προκάλεσε ιστική βλάβη στις ίνες του σκελετικού μυϊκού ιστού, με νέκρωση αλλά όχι με απόπτωση σε γουρούνια *mini pigs*, αν και λιγότερο σοβαρή σε σύγκριση με τη βουπιβακαΐνη (Zink et al., 2003).

Επίσης από την παρούσα έρευνα βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη επήγε την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT με δοσοεξαρτώμενο τρόπο μετά από 48 ώρες επώασης σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Η επαγωγή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου από τη ροπιβακαΐνη φάνηκε κυρίως από την ενδονουκλεωσωματική θραυσματοποίηση του DNA και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP. Η επαγωγή

της απόπτωσης ήταν προφανής στη συγκέντρωση του 1 mM, και έγινε πιο έντονη πάνω από τα 2 mM ροπιβακαΐνης (σχήμα III 2 A, B). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν επίσης σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα μελετών επαγωγής απόπτωσης κυττάρων, από άλλα τοπικά αναισθητικά. Όσον αφορά τη ροπιβακαΐνη, οι μελέτες που προαναφέρθηκαν επικεντρώθηκαν περισσότερο στην αναστολή του πολλαπλασιασμού διαφόρων τύπων κυττάρων και λιγότερο στην επαγωγή απόπτωσης από το αναισθητικό στα κύτταρα αυτά. Μόνο στις μελέτες από τους Martinsson (1999) και τους De Iulius et al (2001) στην οποία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική trypan blue για την καταμέτρηση των νεκρών κυττάρων, διαφάνηκε η πιθανότητα να οδηγούνται σε απόπτωση.

Έχει βρεθεί ότι τα τοπικά αναισθητικά, όπως προαναφέρθηκε, εκτός από τις δραστηριότητές τους στο νευρικό σύστημα και σε άλλους ιστούς, επάγουν κυτταροτοξικές επιδράσεις και απόπτωση σε διάφορα είδη κυττάρων. Πράγματι, η κοκαΐνη επήγε τον κυτταρικό θάνατο με απόπτωση ηπατοκυττάρων ποντικού (Cascales et al., 1994), νευρικών φλοιικών κυττάρων εμβρύου ποντικού, (Nassogne et al., 1997) και ορχικών κυττάρων αρουραίου (Li et al., 1999). Επίσης η λιδοκαΐνη επήγε την απόπτωση ανθρώπινων κυττάρων νευροβλαστώματος, SH-SY5Y διαφοροποιημένων από ρετινοϊκό οξύ (Friederich and Schmitz, 2002), η πριλοκαΐνη των οστεοβλαστικών κυττάρων ανθρώπου Saos-2 και MG63 και ποντικού MC3T3-E1 (Nakamura et al., 1999), η λιδοκαΐνη, η βουπιβακαΐνη, και η τετρακαΐνη, των ανθρώπινων κυττάρων εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου HK-2 (Lee et al., 2003), η τετρακαΐνη κυττάρων φαιοχρωμοκυττώματος ποντικού (Tan et al., 2002), η διβουκαΐνη κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-MC (Kim et al., 1997) και προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 (Arita et al., 2000) και τέλος η βουπιβακαΐνη επίσης κυττάρων προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 (Unami et al., 2003). Στις παραπάνω μελέτες ο κυτταρικός θάνατος από απόπτωση λόγω των επιδράσεων των διαφόρων τοπικών αναισθητικών, αποδείχτηκε και επιδείχτηκε με διάφορες εργαστηριακές τεχνικές μεταξύ των οποίων είναι και αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, όπως η τεχνική αποκλεισμού με "trypan blue", η τεχνική απομόνωσης και ηλεκτροφόρησης χαμηλού μοριακού βάρους DNA προκειμένου να μελετηθεί ο βαθμός θραυσματοποίησης του και η τεχνική ανοσοαποτυπώματος κατά western.

Ακόμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης κλαστρίνης/ApoJ στα κερατινοκύτταρα HaCaT μετά τη χορήγηση της ροπιβακαΐνης υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης, ελαττώθηκαν όπως φαίνεται από ανοσοαποτύπωμα κατά western (σχήμα III 3). Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μειорύθμιση αυτή μπορεί να είναι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η ροπιβακαΐνη επάγει απόπτωση στα κύτταρα HaCaT καθώς η κλαστρίνη/ApoJ είναι γονίδιο με κυρίως αντιαποπτωτικές ιδιότητες (Trougakos and Gonos, 2002). Η μειορρύθμιση της κλαστρίνης/ApoJ στα κερατινοκύτταρα HaCaT που υπέστησαν απόπτωση από τη ροπιβακαΐνη, είναι σύμφωνη με προηγούμενες δημοσιεύσεις.

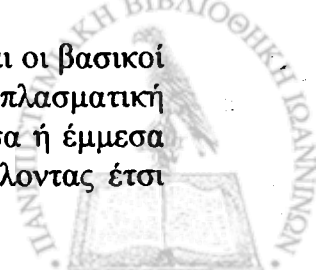
Πράγματι, τα αποπτωτικά χαρακτηριστικά κυττάρων ιστοκυτταρικού λεμφώματος U937, καρκινώματος τραχήλου μήτρας HeLa και επιδερμικού καρκινώματος A431, μετά από επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας (UV), και κυττάρων ανθρώπινου λεμφοβλαστώματος CEM-C7, μετά από επίδραση δεξαμεθαζόνης, σχετίστηκαν με ελάττωση ή και απουσία της γονιδιακής έκφρασης της κλαστρίνης (French et al., 1994). Επιπλέον, στις κυτταρικές σειρές PC-3 και TSU-Pr1 ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του προστάτη και καρκινώματος της κύστης, αντίστοιχα, μετά από θανατηφόρα δόση θερμικού σοκ, παρατηρήθηκε μια

παροδική αυξορρύθμιση της έκφρασης της κλαστρίνης ακολουθούμενη από μειορρύθμιση η οποία και οδήγησε στην απόπτωση (Wu et al., 2002). Τέλος, ο αποπτωτικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας paclitaxel μειορρύθμισε το mRNA της κλαστρίνης σε καρκινικά κύτταρα μαστού, Shionogi με χρόνο- και δόσο- εξαρτώμενο τρόπο (Miyake et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την κλαστρίνη/ApoJ και τη Bcl-2 με διαμόλυνση με τα αντίστοιχα cDNA. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών στα κύτταρα φάνηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western, όπου κλώνοι των διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών HaCaT/ApoJ/2 και HaCaTBcl-2/2 συγκρίθηκαν με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα, HaCaT και με αυτά που διαμολύνθηκαν μόνο με τον βέκτορα, HaCaTNeo (σχήμα III 4). Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της αντιαποπτωτικής δραστηριότητας των δύο αυτών πρωτεϊνών μετά από τη χορήγηση ροπιβακαΐνης, υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των πρωτεϊνών κλαστρίνη/ApoJ και Bcl-2, προστάτευσε τα κύτταρα HaCaT από την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη απόπτωση, όπως φάνηκε από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική βιωσιμότητα (σχήμα III 5 A, B), τον βαθμό θραυσματοποίησης του DNA, της πρωτεόλυσης της PARP και της ελάττωσης της έκφρασης της προ-κασπάσης-3 (σχήμα III 6 A, B). Το φαινόμενο της προστασίας των κυττάρων HaCaT από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, εξαιτίας της ροπιβακαΐνης, λόγω υπερέκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2, ήταν σύμφωνο και με άλλες μελέτες. Συνολικά επομένως, αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στις τοξικές επιδράσεις που επάγονται από τη ροπιβακαΐνη.

Η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ εμπλέκεται στην ογκογένεση (Trougakos and Gonos, 2002), μέσω των αντιαποπτωτικών της ιδιοτήτων. Οι αντιαποπτωτικές αυτές ιδιότητες της κλαστρίνης /ApoJ φάνηκαν καθαρά μετά από διαμόλυνση του cDNA της πρωτεΐνης αυτής σε διάφορους τύπους κυττάρων τα οποία εκτέθηκαν σε κυτταροτοξικούς παράγοντες. Όντως, η υπερέκφραση της κλαστρίνης σε ανθρώπινα κύτταρα ανδρογονοεξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη LNCaP, τα κατέστησε χημειοανθεκτικά στη κυτταροτοξική δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα paclitaxel και στην στέρηση ανδρογόνων, γεγονός που προκάλεσε την προώθηση του καρκίνου και μείωσε σημαντικά την απόπτωση από την ακτινοβολία με ακτίνες X (Miyake et al., 2000, Miyake et al., 2000, Zellweger et al., 2002, Zellweger et al., 2003). Επιπλέον, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος του νεφρού ACHN συνείσφερε σε ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση δια μέσου του Fas, καθώς και σε φαινότυπο χημειοανθεκτικότητας και παράτασης της κυτταρικής επιβίωσης έχοντας σαν αποτέλεσμα το ενισχυμένο μεταστατικό δυναμικό του κυτταρικού καρκινώματος του νεφρού (Miyake et al., 2001, Hara et al., 2001, Miyake et al., 2002). Η χρήση αντισηματικών ολιγονουκλεοτιδίων με σκοπό την αναστολή της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου της κλαστρίνης/ApoJ, παρείχε χημειοευαισθησία σε διάφορα καρκινικά κύτταρα in vitro και in vivo όπως σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη PC-3, της ουροδόχου κύστεως KoTCC-1, του νεφρού Caki-2 (Miyake, Chi et al., 2000, Trougakos et al., 2004, Miyake et al., 2001, Zellweger et al., 2001 and Gleave et al., 2002) καθώς και επαγωγή αποπτωτικού θανάτου στα κύτταρα Sertoli του αρουραίου in vitro (Kang et al., 2000).

Η πρωτεΐνη Bcl-2 και οι σχετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες είναι οι βασικοί ρυθμιστές της απόπτωσης. Η πρωτεΐνη Bcl-2 βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων εμποδίζοντας άμεσα ή έμμεσα την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, αναστέλλοντας έτσι



την επαγωγή απόπτωσης μέσω του «αποπτωσώματος» και της κασπάσης-9 (Hale et al., 1996, Adams and Cory, 1998, Green and Reed, 1998, Schultz and Harrington Jr., 2003). Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 προστάτευσε τα κύτταρα από ποικίλους παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως ακτινοβολίες UV, γ , κυτταροτοξικά φάρμακα, TNF α , υπεροξειδάσες, ανδρογόνα (Reed, 1998, Adams and Cory, 1998). Όπως επίσης φάνηκε σε μελέτες, τα κερατινοκύτταρα HaCaT που εξέφραζαν σταθερά την Bcl-2, λόγω διαμόλυνσης με το αντίστοιχο γονίδιο, ήταν ανθεκτικά στην επαγωγή απόπτωσης από τον αλκαλοειδή παράγοντα K252 (Pincelli et al., 1997), το C₂ κεραμίδιο, τον TNF α και την 1 α , 25-διυδροξυβιταμίνη D₃ (Muller-Wieprecht et al., 2000).

Η διβουκαΐνη όπως αναφέρθηκε, επήγε απόπτωση σε μια κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος (Kim et al., 1997) και στα κύτταρα HL-60 (Arita et al., 2000) μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων κασπασών σε συνδυασμό με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (cyto c) από τα μιτοχόνδρια που προκλήθηκε από ένα επεξεργασμένο προϊόν της πρωτεΐνης Bid και την αποπόλωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Arita et al., 2000). Επίσης είναι γνωστό ότι η Bid όπως και οι άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας της Bcl-2 (Bax και Bak) επήγαν την «διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων» (mitochondrial outer membrane permeabilization) (Finucane et al., 1999). Το προϊόν διάσπασης της Bid είχε σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση της Bid στα μιτοχόνδρια και την είσοδό της μέσα στην μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου ανέστειλε την αντιαποπτωτική δράση της Bcl-2 και έχοντας σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του cyto c με την επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών. Παρόλο που στην παρούσα μελέτη σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις η ροπιβακαΐνη επήγε απόπτωση στα κύτταρα HaCaT, δεν είναι γνωστό αν η επαγωγή αυτή έγινε λόγω της διάσπασης της Bid και της απελευθέρωσης του cyto c. Το γεγονός ότι η Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από τη ροπιβακαΐνη απόπτωση στα κύτταρα HaCaT, θα μπορούσε να υποδηλώνει ένα παρόμοιο μηχανισμό με αυτό της διβουκαΐνης στην απόπτωση, στην παρούσα μελέτη.

Η ροπιβακαΐνη επίσης έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις όπως έχει φανεί σε ερευνητικές εργασίες. Συγκεκριμένα ανέστειλε την φλεγμονώδη μετακίνηση και τη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων καθώς και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα στο ζυγωματικό εγκόλπωμα χάμστερ. Επίσης ανέστειλε την επαγόμενη έκφραση των μορίων CD11b/CD18, στα λευκοκύτταρα ανθρώπου *in vitro* (Martinsson et al., 1997). Ακόμα, μείωσε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την προσκόλληση λευκοκυττάρων που επάγεται από τον TNF- α , αλλά δεν επέδρασε καθόλου στη μετακίνηση των λευκοκυττάρων που συνέβη από τον TNF- α , στην μικροκυκλοφορία του κρεμαστήρα μυός ποντικού (Zhang and Thorlacius, 2000). Τέλος, η ροπιβακαΐνη, η λιδοκαΐνη και η τετρακαΐνη ανέστειλαν τις χημειοτακτικές και μεταβολικές αποκρίσεις που προκαλούνται από τον ενδοκυττάριο φωσφολιπιδικό μεσολαβητή «λυσοφωσφατιδικό οξύ» (LPA), στα ουδετερόφιλα του ανθρώπου. Το LPA πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στη διέγερση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Fischer et al., 2001).

Σε αυτό το σημείο πρέπει να ληφθούν υπόψη δύο δεδομένα. Πρώτον ότι η απόπτωση που επάγεται στα κύτταρα του θύμου του αρουραίου από τη δεξαμεθαζόνη, στα κύτταρα ανθρώπινου λεμφοβλαστώματος CEM-C7, σχετίζεται με ελάττωση ή και απουσία της γονιδιακής έκφρασης της κλαστρίνης (French et al., 1994). Το δεύτερο δεδομένο είναι ότι η δεξαμεθαζόνη έχει αντιφλεγμονώδεις και ανασοκατασταλτικές επιδράσεις (Rang and Dale, 1991). Έτσι, μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση ότι στην παρούσα μελέτη, η επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα HaCaT από

τη ροπιβακαΐνη υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης, μπορεί να έγινε με τρόπο παρόμοιο με αυτό της δεξαμεθαζόνης. Και αυτό γιατί αφενός η ροπιβακαΐνη έχει και αυτή αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις (Martinsson et al., 1997, Zhang and Thorlacius, 2000) και αφετέρου γιατί η επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη γίνεται με ταυτόχρονη μειорύθμιση της κλαστρίνης/ApoJ.

Ακόμα, η μειорύθμιση της κλαστρίνης/ ApoJ από τη ροπιβακαΐνη δείχνει ότι η χορήγησή της μαζί με ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα μπορεί εκτός από αναλγητικές επιδράσεις, να αυξήσει τη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην κυτταροτοξική χημειοθεραπεία λόγω προφανώς των αποπτωτικών της επιδράσεων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εν μέρει και για τη θεραπεία τοπικών όγκων.

2. Η επίδραση του ψευδαργύρου (Zn) στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου από στρεσογόνους παράγοντες στα κύτταρα θηλαστικών

Στη παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η ευεργετική επίδραση του εξωγενούς Zn, με τη μορφή του νιτρικού ψευδαργύρου, $Zn(NO_3)_2$, στα κερατινοκύτταρα HaCaT στα οποία επάγονταν δόσο-εξαρτώμενη απόπτωση από το τοπικό αναισθητικό ροπιβακαΐνη μετά από επώαση 48 ωρών σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Βρέθηκε, ότι ο $Zn(NO_3)_2$, σε συγκέντρωση 15 μM , ανέστειλε την ελάττωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας (σχήμα III 7 A, B) και μερικώς την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT (σχήμα III 8 A, B) από την τοξική επίδραση της ροπιβακαΐνης υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Επίσης παρατηρώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό την κυτταρική βιωσιμότητα (σχήμα III 7 A, B) αλλά και την θραυσματοποίηση του DNA (σχήμα III 8 A, B), φάνηκε ότι η συγχορήγηση του $Zn(NO_3)_2$ με τη ροπιβακαΐνη ήταν πιο αποτελεσματική από την προχορήγησή του, 30 λεπτά πριν από τη ροπιβακαΐνη, όσον αφορά την προστατευτική του δράση στα κύτταρα HaCaT απέναντι στη ροπιβακαΐνη. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν κατά μεγάλο βαθμό σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις.

Πράγματι, ο ψευδάργυρος (Zn), έχει βρεθεί ότι μπορεί να προστατέψει, σε διάφορες δόσεις, διάφορους τύπους κυττάρων από τον αποπτωτικό θάνατο ο οποίος προέρχεται από μια ποικιλία στρεσογόνων παραγόντων. Συγκεκριμένα, ο Zn σε δόσεις, από 10 έως 50 μM , ανέστειλε την επαγωγή απόπτωσης από το μαγγάνιο (Mn), στα ανθρώπινα κύτταρα Β λεμφώματος, Ramos (Schrantz et al., 2001), 10 μM Zn ανέστειλαν την απόπτωση σε καλλιεργούμενα κύτταρα νεφρικών σωληνάρων, η οποία προκλήθηκε από τη μείωση του ATP (Wei et al., 2004), η προχορήγηση 25 έως και 500 μM Zn, 30 λεπτά πριν από την επίδραση ανοξίας σε καλλιεργούμενους νευρώνες υπόκαμπου αρουραίου, είχε σαν αποτέλεσμα την προστασία από την απόπτωση λόγω της ανοξίας (Naganska and Matyja, 2002), 700 μM Zn προστάτευσαν τους καλλιεργούμενους νευρώνες ανθρώπου NT2-N από την απόπτωση που προκλήθηκε από 100 μM χαλκού (Cu) (VanLandingham, Fitch and Levenson, 2002) και τέλος, 10 έως και 50 μM Zn, προστάτευσαν τα κύτταρα γλοιώματος αρουραίου C6 από την απόπτωση που προκλήθηκε από το κάδμιο (Waijen et al., 2002). Ακόμα, ο εξωγενώς προστιθέμενος Zn στα ανθρώπινα κύτταρα μυελοειδούς λευχαιμίας U937, έπαιξε ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης, αναστέλλοντας την κατάτμηση του DNA από την τοξίνη των φυτών ρικίνη (ricin) (Tamura et al., 2002), προστάτευσε τα καλλιεργούμενα πρωτογενή κύτταρα του ΚΝΣ και τα αστροκύτταρα από την απόπτωση η οποία προκλήθηκε από την γ -ακτινοβολία (Cai et al., 2004), τα κύτταρα E47, κατά 50%, από τις αποπτωτικές τοξικές συνέπειες του αραχιδονικού οξέος (Perez and Cederbaum, 2003), ανέστειλε την απόπτωση που

προκλήθηκε από την αιθανόλη στα κύτταρα του ήπατος ποντικών (Lambert, Zhou and Kang, 2003) και επιπλέον, η απόπτωση που επάγεται από το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα S100A8/A9, και τον χηλικό παράγοντα των μεταλλοϊόντων DTPA, σε κύτταρα καρκινώματος από το παχύ έντερο, ανεστάλη από τον Zn και τον χαλκό (Cu) (Ghavami et al., 2004).

Ο Zn ανέστειλε τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση σε διάφορα κύτταρα μέσω: 1) αναστολής μιας ενδοουκλεάσης που παίζει βασικό ρόλο στην επαγωγή απόπτωσης (Tamura et al., 2002), 2) έμμεσης δράσης του σε συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς παράγοντες που παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση των κασπασών -6 και -9 (Tamura et al., 2002), 3) άμεσης δράσης του στη διαδικασία ενεργοποίησης των κασπασών -6, -9 και -3 (Tamura et al., 2002, Ganju and Eastman, 2003, Wei et al., 2004, Lambert, Zhou and Kang, 2003), 4) αποτροπής της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bax και της απελευθέρωσης του cyto-c από τα μιτοχόνδρια (Wei et al., 2004) και 5) ρύθμισης της αφθονίας του mRNA της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και αποτροπής της μετατόπισης της στον πυρήνα των κυττάρων (VanLandingham, Fitch and Levenson, 2002). Ακόμα από τους Tamura et al. (2002) εκτιμήθηκε ότι η απελευθέρωση του Zn από μακρομόρια ή ορισμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, μπορεί να έγινε κατά τη διάρκεια της επαγόμενης απόπτωσης από τη ρικίνη, και έτσι η πρόσθεση εξωγενούς Zn, μπορεί να απέτρεψε την απελευθέρωση του από την ενδοουκλεάση, και να ανέστειλε την επαγωγή της απόπτωσης (Tamura et al., 2002). Επίσης και από άλλες δημοσιεύσεις προέκυψε το συμπέρασμα ότι, όταν η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού Zn ελαττώθηκε σε διαφόρους τύπους κυττάρων, επάγονταν απόπτωση σε αυτά παρουσία και απουσία παραγόντων που την επάγουν. Το φαινόμενο συνέβη στα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα HL-60 (Duffy et al., 2001), στα κύτταρα γλοιώματος αρουραίου C6 (Watjen et al., 2002), σε καλλιεργούμενα χονδροκύτταρα με γνωστούς παράγοντες που επήγαν απόπτωση και συνοδεύτηκε από την ελάττωση της μεταλλοθειονίνης στο κυτταρόπλασμα (Sauer et al., 2003), καθώς και σε κύτταρα λεμφώματος EL-4 (Yui et al., 2002). Τέλος, σημαντικός ήταν και ο ρόλος της πρωτεΐνης μεταλλοθειονίνης στην ανασταλτική αυτή ιδιότητα του Zn, η οποία είναι γνωστό ότι συνδέεται με τον ενδοκυτταρικό Zn. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι, η προεπαγωγή της σύνθεσης της μεταλλοθειονίνης, από τον ίδιο τον Zn και το Cd, προστάτευσε τα καλλιεργούμενα πρωτογενή κύτταρα του ΚΝΣ και τα αστροκύτταρα από την απόπτωση λόγω της γ-ακτινοβολίας, πιθανόν μέσω της αντιοξειδωτικής ιδιότητας της επαγόμενης αυτής πρωτεΐνης (Cai et al., 2004), και ότι ο Zn προστάτευσε τα κύτταρα E47, κατά 50%, από τις τοξικές συνέπειες του αραχιδονικού οξέος, μέσω της υπερέκφρασης της μεταλλοθειονίνης 2A (MT2A) (Perez and Cederbaum, 2003).

Στην παρούσα μελέτη, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο $Zn(NO_3)_2$ ανέστειλε, έστω και μερικά, την επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα HaCaT από τη ροπιβακαΐνη δεν διερευνηθήκαν. Όμως επειδή η αναστολή της επαγωγής της απόπτωσης εκφράστηκε και από την αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP, η οποία είναι υπόστρωμα της κασπάσης-3, πιθανολογείται ότι η αναστολή αυτή της επαγωγής απόπτωσης έγινε λόγω της δράσης του Zn στη διαδικασία ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και ίσως και της -9, καθώς η κασπάση-3 είναι με τη σειρά της υπόστρωμα της-9 κατά τη διαδικασία επαγωγής της απόπτωσης.

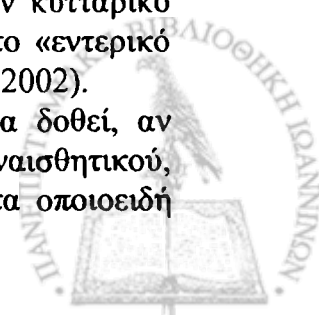


3. Ο ρόλος της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP ψευδαργυροπεπτιδάση) και του νιτρικού ψευδαργύρου $Zn(NO_3)_2$ στην επαγωγή απόπτωσης, κερατινοκυττάρων HaCaT από τη ροπιβακαΐνη

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι η επαγωγή απόπτωσης στα κερατινοκύτταρα HaCaT από τη ροπιβακαΐνη μετά από επώαση 48 ωρών σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό, είχε σαν συνέπεια τη μειορύθμιση της NEP. Η μειορύθμιση της NEP παρατηρήθηκε, απουσία και παρουσία $Zn(NO_3)_2$ (σχήμα III 9), από τη ροπιβακαΐνη ENΩ όπως αναφέρθηκε ήδη η επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα αυτά από τη ροπιβακαΐνη, μερικώς αναστάληκε από τον $Zn(NO_3)_2$. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα, έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγωγή απόπτωσης διαφόρων τύπων κυττάρων, είχε σαν συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης της ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης (NEP). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η μειορύθμιση της NEP, είχε σαν συνέπεια την ανθεκτικότητα στην απόπτωση και την ανάπτυξη κυρίως καρκινικών κυττάρων.

Πράγματι, η απώλεια ζωτικότητας στα ανθρώπινα προμυελοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα HL-60 από την απόπτωση που επάγονταν από ιασπαμίδιο (jaspramide), συνοδεύτηκε από την σύνθεση της NEP/CD10 εκ νέου στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων (Cioca and Kitano, 2002). Επίσης, η NEP ανέστειλε την ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού επιβίωσης Akt, μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα παρόμοιου της ινσουλίνης (insulin-like growth factor receptor), στα κύτταρα καρκίνου του προστάτη και συνεπώς η απώλεια της έκφρασής της είχε σαν αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στην απόπτωση των κυττάρων αυτών (Sumitomo et al., 2001). Τα σχετικά επίπεδα των mRNA που κωδικοποιούσαν τους υποδοχείς της ενδοθηλίνης (ETRs) ή της NEP, ήταν χαμηλά ή μη εντοπισμένα στον ανθρώπινο καρκίνωμα του ενδομητρίου σε αντίθεση με το mRNA της ενδοθηλίνης-1 (ET1) το οποίο εκφράστηκε (Pekonen et al., 1995). Η NEP μειορρυθμίστηκε ενώ η ET1 αυξορρυθμίστηκε με αυξανόμενο βαθμό καρκίνου, στα κύτταρα του στρώματος του αδενοκαρκινώματος του ενδομητρίου, γεγονός το οποίο μπορεί να έπαιξε ρόλο στη εξέλιξη και τη διαφοροποίηση του όγκου μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Suzuki et al., 2001). Τα χαμηλά επίπεδα της NEP στα κύτταρα «μη μικροκυταρικού καρκίνου του πνεύμονα» (non-small cell lung carcinomas), πιθανόν προσέφεραν υπεροχή στον πολλαπλασιασμό τους (Ganju et al., 1994), γενικά δε η έκφραση της NEP, ήταν πολύ χαμηλή ή μη-ανιχνεύσιμη σε ιστούς και σε κυτταρικές σειρές «μικροκυταρικού καρκίνου πνεύμονα» (small cell lung cancer) παίζοντας ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών αυτών κυττάρων (Cohen et al., 1996). Όταν η έκφραση της NEP μειώθηκε, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη τα νευροπεπτίδια μπορούσαν να αυξήσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών (Papandreou et al., 1998), η απώλεια δε της έκφρασης της NEP, με υπερμεθυλίωση του προαγωγέα της, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, μπορούσε να συντέλεσε στη ανάπτυξη του πληθυσμού των κυττάρων αυτών από νευροπεπτίδια (Usmani et al., 2000). Η πρωτεϊνική έκφραση της NEP μειορρυθμίστηκε στον καρκίνο των κυττάρων του νεφρού, όταν έγινε σύγκριση με αυτή από το νεφρικό παρέγχυμα (Gohring et al., 1998) και τέλος η αναστολή της δραστηριότητας της NEP αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καλλιεργούμενων κυττάρων νευροβλαστώματος από το «εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο» (vasoactive intestinal peptide) (Wollman et al., 2002).

Ερμηνεία στο φαινομενικά παράδοξο αυτό αποτέλεσμα μπορεί να δοθεί, αν ληφθεί υπόψη πρώτον η ιδιότητα της ροπιβακαΐνης ως τοπικού αναισθητικού, δεύτερον ο ρόλος της NEP στη διαδικασία του πόνου σε σχέση με τα οποιοειδή



εγκεφαλίνες, τρίτον η έκφραση εγκεφαλινών και NEP στα κερατινοκύτταρα και τέταρτο ο ρόλος των εγκεφαλινών σε σχέση με την απόπτωση. Σύμφωνα με μελέτες, παράγοντες που ανέστειλαν την NEP έχει βρεθεί ότι παρέτειναν τις αναλγητικές επιδράσεις των εγκεφαλινών αφού το ένζυμο αυτό εμπλέκεται στην απενεργοποίηση των οπιοειδών πεπτιδίων, εγκεφαλινών, στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Erdős and Skidgel, 1989). Πράγματι, το αναλγητικό RB120, το οποίο επήγε δραστικές δοσοεξαρτώμενες αναλγητικές αντιδράσεις σε δοκιμές σε ποντίκια και αρουραίους με χορήγηση από το στόμα, φάνηκε ότι υπέστη ενίσχυση με αναστολείς της NEP και της αμινοπεπτιδάσης N (APN) (Noble et al., 1997), σκευάσματα που περιείχαν αμινοφωσφινική ομάδα γενικού μοριακού τύπου $\text{NH}_2\text{-CH(R}_1\text{)P(O)-(OH)CH}_2\text{-CH(R}_2\text{)CONH-CH(R}_3\text{)COOH}$, ήταν ανταγωνιστικοί αναστολείς για τη NEP και τη APN, και συγχρόνως ισχυροί αναστολείς του οξέος και χρόνιου πόνου όπως φάνηκε σε ζώα (Chen et al., 1998). Η σιαλορφίνη (sialorphin) επίσης, ένας εξωκρινής και ενδοκρινής μεσολαβητής σήματος ο οποίος παράγεται από τους υπογνάθιους αδένες και τον προστάτη αρουραίων σε απάντηση προς τα στεροειδή ανδρογόνα και απελευθερώνεται τοπικά και συστηματικά σε απάντηση προς το στρες, είναι ένας φυσικός αναστολέας της NEP στα θηλαστικά και ανέστειλε τον οξύ και τον δυνατό πόνο που προκλήθηκε από μηχανικούς και χημικούς παράγοντες ενισχύοντας τις ενδογενείς χημικές οδούς που ήταν εξαρτημένοι από τους μ - και δ - υποδοχείς οπιοειδών, με προφανή συμμετοχή των εγκεφαλινών (Rougeot et al., 2003). Ακόμα επαληθεύτηκε ότι η NEP εκφράστηκε σε κερατινοκύτταρα, όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη (κερατινοκύτταρα HaCaT) αλλά και στην επιδερμίδα κανονικού και τραυματισμένου ανθρώπινου δέρματος το mRNA της πρωτεΐνης αυτής εντοπίστηκε σε καλλιεργούμενα κερατινοκύτταρα (Olejud et al., 1999). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι στα επιθηλιακά κύτταρα δέρματος εντοπίστηκαν τα οπιοειδή εγκεφαλίνες, οι οποίες παράγονταν ενδογενώς. Πράγματι, η μετεγκεφαλίνη ($[\text{Met}^5]$ -enkephalin) και ο υποδοχέας οπιοειδών ζ συνδέθηκαν με τα επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου δέρματος με τρόπο παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται σε ποντίκια (Zagon, Wu and McLaughlin, 1996). Εξάλλου καλλιεργούμενα κανονικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα από ασθενείς που υπέστησαν πλαστική εγχείρηση, επίσης παρήγαγαν εγκεφαλίνες ενδογενώς (Nissen and Kragballe, 1997), η έκθεση ανθρώπων στην υπεριώδη ακτινοβολία A (UVA), προκάλεσε την άμεση σύνθεση της μεθιονίνης-εγκεφαλίνης στο δέρμα (Nissen et al., 1998) και τέλος, η τοπική μετεγκεφαλίνη και ο υποδοχέας της εκφράστηκαν στα κύτταρα της επιδερμίδας του τραυματισμένου και μη δέρματος της ουράς ποντικίου (Wilson et al., 2000).

Με δεδομένο λοιπόν, οι εγκεφαλίνες παράγονται ενδογενώς από τα κερατινοκύτταρα, φαίνεται πιθανό η αναλγητική δράση της ροπιβακαΐνης στα κερατινοκύτταρα να επάγεται μέσω της πρωτεϊνικής μειορύθμισης της NEP που έχει σαν συνέπεια την απελευθέρωση της δράσης των εγκεφαλινών στα κύτταρα αυτά.

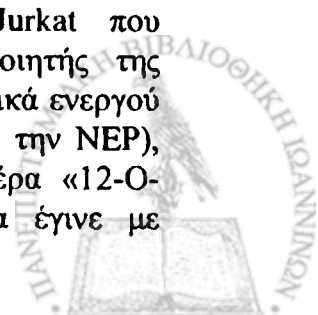
Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι τα οπιοειδή πεπτίδια εγκεφαλίνες προκαλούν αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επαγωγή απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων. Πράγματι, η μετεγκεφαλίνη ($[\text{Met}^5]$ -enkephalin) εντοπίστηκε με τον υποδοχέα της (ζ), στο εξώδερμα, στο μεσόδερμα και στο ενδόδερμα εμβρύων αρουραίου και ανθρώπου, επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την οργάνωση των ιστών σαν ένα ενεργά ανασταλτικό αυξητικό μόριο, ελαττώνοντας τη σύνθεση του DNA στα κύτταρα και στα όργανα που αντιπροσωπεύουν και τις τρεις βλαστικές στιβάδες, γεγονός που έγινε μέσω του υποδοχέα (Zagon, Wu and McLaughlin, 1999). Τα οπιοειδή μορφίνη και $[\text{D Ala}^2, \text{N-Me-Phe}^4, \text{Gly}^5 \text{ol}]$ enkephalin ή DAGO επήγαν απόπτωση στα T κύτταρα πιθανόν μέσω της βιοχημικής οδού της κινάσης c-Jun NH₂ (JNK) και της ενεργοποίησης των κασπασών

-8 και -3 (Singhal et al., 2001). Επίσης οπιοειδή πεπτίδια, μεταξύ των οποίων και η μετεγκεφαλίνη, είχαν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό κυττάρων μήτρας αρουραίου κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, σε δύο διαφορετικές φάσεις με ένα χρονικό διάστημα μη ευαισθησίας ανάμεσα στις φάσεις αυτές (Korhoyei et al., 2003), η μετεγκεφαλίνη και η β-ενδορφίνη ενίσχυσαν την απόπτωση των ουδετερόφιλων περιφερικού αίματος *in vitro*, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο η οποία επάγονταν και μέσω του παράγοντα TNF- α και χωρίς αυτόν (Sulowska et al., 2003).

Επειδή λοιπόν η επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaT υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης, είχε σαν συνέπεια την μειορρύθμιση της NEP (σχήμα III 9) και συνεπώς, την πιθανή αύξηση της επίδρασης του οπιοειδούς μετεγκεφαλίνη στα κύτταρα αυτά, είναι πιθανό ότι εκτός από την επίδραση της ροπιβακαΐνης αυτής καθεαυτής στην επαγωγή απόπτωσης, πιθανόν η απόπτωση να επάγονταν και από τις επιδράσεις της ενδογενούς μετεγκεφαλίνης στα κύτταρα αυτά, υπόθεση που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να επαληθευτεί.

Στην παρούσα μελέτη η NEP υπερεκφράστηκε στα κύτταρα HaCaT, με διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA που περιλαμβάνει το γονίδιο της πρωτεΐνης. Η υπερέκφραση φάνηκε από ανοσοαποτύπωμα κατά western όπου συγκρίθηκε η πρωτεϊνική έκφραση της NEP κυττάρων HaCaT που ήταν διαμολυσμένα μόνο με τον βέκτορα, HaCaTNeo, και αυτών που ήταν διαμολυσμένα με το cDNA της NEP HaCaTNEP (σχήμα III 10). Η υπερέκφραση της NEP είχε σαν συνέπεια την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής βιωσιμότητας (σχήμα III 11 A, B), καθώς και την επαγωγή απόπτωσης (σχήμα III 12) στα κύτταρα αυτά μετά από επώαση 48 ωρών και σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό. Τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με αυτά ορισμένων ερευνητικών εργασιών και πιθανόν οφείλονται στην τοξική επίδραση της NEP στα κύτταρα HaCaT. Πράγματι, η διαμόλυνση cDNA της NEP σε κύτταρα TSU-Pr1 καρκίνου του προστάτη ανεξάρτητου από τα ανδρογόνα, ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, πιθανόν λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της NEP (Papandreou et al., 1998) και προκάλεσε την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁, την επαγωγή απόπτωσης, την αύξηση των επιπέδων της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p21 και την μείωση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ρετινοβλαστώματος (pRb), μετά από 7 μέρες υπερέκφρασης της NEP στα κύτταρα (Dai et al., 2001).

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε επίσης η επίδραση της ροπιβακαΐνης στα κύτταρα HaCaT που δεν υπερέκφραζαν (HaCaTneo) και που υπερέκφραζαν (HaCaTNEP) την NEP παρουσία και απουσία Zn(NO₃)₂ όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα (σχήμα III 13) και την επαγωγή απόπτωσης (σχήμα III 14), μετά από επώαση 48 ωρών και σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό. Παρατηρήθηκε ότι, πρώτον η τοξική επίδραση της ροπιβακαΐνης πραγματοποιήθηκε σε συνέργεια με την υπερέκφραση της NEP και δεύτερο ότι ο Zn(NO₃)₂ δε άσκησε την ευεργετική του επίδραση απέναντι στην τοξικότητα της ροπιβακαΐνης όταν υπερεκφράστηκε η NEP, στα κύτταρα HaCaT, στις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης. Το πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων ήταν σύμφωνο με δημοσιεύσεις οι οποίες έδειξαν ότι η NEP ανέστειλε την ανάπτυξη, ή επήγε απόπτωση κυττάρων σε συνδυασμό με κυτταροτοξικές ουσίες. Πράγματι, η υπερέκφραση και η ενζυματική δραστηριότητα της NEP χρειάστηκε για την παύση της ανάπτυξης των T κυττάρων Jurkat που προκαλούνταν από τον φορμποδιεστέρα που ονομάζεται «ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C» ή PMA (Mari et al., 1997). Η έκφραση ενζυματικά ενεργού NEP, από τα κύτταρα καρκίνου του προστάτη LNCaP (που εκφράζανε την NEP), ήταν απαραίτητη για την επαγωγή απόπτωσης από τον φορμπολεστέρα «12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate» (TPA) στα κύτταρα αυτά, η οποία έγινε με



σταθεροποίηση της έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης Cδ (PKCδ), μέσω της οποίας επάγονταν η απόπτωση από τον TPA (Sumitomo et al., 2000), και τέλος η ενζυμική δράση της NEP συντέλεσε στην επαγωγή απόπτωσης κυττάρων καρκίνου του προστάτη PC-3, από τα αντικαρκινικά φάρμακα “etoposide” και “paclitaxel”, η οποία ήταν εξαρτημένη από μιτοχονδριακές διαδικασίες επίσης μέσω της έκφρασης της PKCδ (Sumitomo et al., 2004). Λαμβάνοντας επομένως υπόψη ειδικά τις μελέτες από τους Sumitomo et al. (2000) και τους Sumitomo et al. (2004), η επαγόμενη απόπτωση από τη ροπιβακαΐνη που παρατηρήθηκε στα κύτταρα HaCaTNEP τα οποία υπερέκφραζαν την NEP (και συνεπώς ενισχύθηκε και η δράση αυτής), η οποία ήταν μεγαλύτερου βαθμού από τα αντίστοιχα κύτταρα που δεν την υπερέκφραζαν (HaCaTneo), στις προαναφερόμενες συνθήκες επώασης, έγινε πιθανόν λόγω της σταθεροποίησης της έκφρασης της PKCδ. Η υπόθεση αυτή χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να επαληθευτεί στην οποία να εξετάζεται με κατάλληλες τεχνικές και η ενζυμική δράση της NEP, καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση της PKCδ.

Τέλος, σε αρκετές δημοσιεύσεις τονίστηκαν οι αντικαρκινικές επιδράσεις της NEP. Πράγματι, η έκφραση και η δραστηριότητα της NEP ήταν πολύ χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη σε ιστούς και σε κυτταρικές σειρές τόσο «μικροκυτταρικού» (small cell lung cancer), όσο και «μη μικροκυτταρικού» (non-small cell lung cancer) καρκίνου του πνεύμονα, σε αντίθεση με μια δραστήρια μορφή του ένζυμου που εκφράστηκε στους παρακείμενους ιστούς του οργάνου αυτού. Έτσι πιθανά το γονίδιο της NEP να έδρασε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Cohen et al., 1996). Επίσης, η υπερέκφραση της NEP στα κύτταρα καρκίνου του προστάτη που δεν εξαρτάται από τα ανδρογόνα είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξής τους, την επαγωγή απόπτωσης, την παύση του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς την αναστολή της δημιουργίας όγκου (Dai et al., 2001). Ακόμα, η ενζυμική δράση της NEP συντέλεσε στην απόπτωση κυττάρων καρκίνου του προστάτη, που επάγονταν από αντικαρκινικά φάρμακα, συνδυασμός ο οποίος μπορούσε να ήταν μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδος, καθώς ειδικά η ανασυνδυασμένη NEP (rNEP) ήταν ικανή να αυξήσει την χημειοευαισθησία στον ανεξάρτητο από ανδρογόνα καρκίνο του προστάτη με ελάχιστη τοξικότητα στους κανονικούς ιστούς (Sumitomo et al., 2004). Τέλος τονίστηκε ότι η αύξηση της δραστηριότητας της NEP μπορούσε να συντελέσει στην θεραπεία του καρκίνου στα κύτταρα νευροβλαστώματος (Wollman et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη η υπερέκφραση της NEP και με την απουσία και με την παρουσία κυτταροτοξικής επίδρασης από τη ροπιβακαΐνη, είχε σαν συνέπεια την επαγωγή απόπτωσης στα κερατινοκύτταρα HaCaT μετά από επώαση 48 ωρών και σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης των επιδράσεων της NEP σε αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT συμπεραίνεται ότι η υπερέκφραση της NEP είναι δυνατόν να συμβάλλει στην αντιμετώπιση του καρκίνου.



V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η ροπιβακαΐνη (2mM, 48 ώρες) προκαλεί 50% μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα ανθρώπου, HaCaT
2. Η ροπιβακαΐνη, επάγει απόπτωση στα HaCaT σε συγκέντρωση >1mM, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και διάσπασης της PARP
3. Η ροπιβακαΐνη ασκεί αποπτωτική δράση μέσω μειορρύθμισης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης κλαστρίνης/ApoJ
4. Ο Zn {15μM Zn(NO₃)₂} αναστέλλει την μείωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας και την απόπτωση που προκαλεί η ροπιβακαΐνη, σε κύτταρα HaCaT.
5. Η NEP μειορρυθμίζεται από την ροπιβακαΐνη, παρουσία και απουσία Zn, και πιθανά η μειορύθμιση αυτή ενισχύει την αναλγητική δράση της ροπιβακαΐνης λόγω απελευθέρωσης της δράσης ενδογενών οπιοειδών
6. Η υπερέκφραση της NEP προκαλεί στα κύτταρα HaCaT ελάττωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας επάγοντας απόπτωση
7. Ο Zn στις πειραματικές μας συνθήκες δεν αναστέλλει την αποπτωτική δράση της ροπιβακαΐνης σε κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζουν την NEP



VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

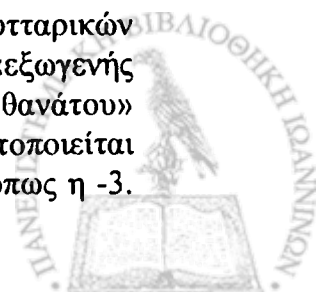
ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΕΝΖΥΜΩΝ

Είναι γνωστό ότι τοπικά αναισθητικά όπως η ροπιβακαΐνη εκτός από τις αναλγητικές τους επιδράσεις επάγουν και απόπτωση σε κύτταρα. Επίσης το απαραίτητο ιχνοστοιχείο ψευδάργυρος (Zn) έχει βρεθεί ότι προστατεύει διάφορα είδη κυττάρων από την αποπτωτική δράση στρεσογόνων παραγόντων, και επίσης αποτελεί δομικό στοιχείο του ενεργού κέντρου μεταλλοπεπτιδασών όπως η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP). Η NEP, εκτός από τον σημαντικό ρόλο της στη φυσιολογία και βιοχημεία του πόνου που ασκείται με τη διάσπαση των ενδογενών οπιοειδών, επάγει επίσης και μείωση του πολλαπλασιασμού και επαγωγή απόπτωσης ειδικά σε καρκινικά κύτταρα. Ο συνδυασμός επομένως ροπιβακαΐνης, NEP και Zn πιθανόν να συνεργεί στη διαχείριση του άλγους καρκινικής και μη αιτιολογίας.

Ο πόνος, οξύς και χρόνιος, είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός του ανθρώπινου σώματος απέναντι στις ιστικές βλάβες που προκαλούν διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες. Γίνεται αντιληπτός από νευρικούς υποδοχείς στο δέρμα και στους εσωτερικούς ιστούς κατόπιν μηχανικών, θερμικών και χημικών ερεθισμάτων. Άγεται από τις νευρικές ίνες τύπου Αδ και C και μέσω δύο ξεχωριστών νευρικών οδών του νωπαιού μυελού καταλήγει σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ που περιλαμβάνουν τον προμήκη μυελό, τον μεσεγκέφαλο και τον εγκεφαλικό φλοιό. Η ικανότητα του ΚΝΣ να ελέγχει τον βαθμό εισόδου των ερεθισμάτων πόνου στο νευρικό σύστημα, ασκείται με την ενεργοποίηση του «συστήματος αναλγησίας» (Guyton, 1991, Rang and Dale, 1991).

Τα τοπικά αναισθητικά χρησιμοποιούνται για την προσωρινή και αναστρέψιμη κατάργηση των αισθήσεων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του ανθρώπινου σώματος αποτρέποντας την νευροδιαβίβαση ασκώντας αποκλεισμό των διαύλων νατρίου (Na^+) στην μεμβράνη των νευρώνων και ιδιαίτερα του τύπου Αδ και C. Το μόριό τους περιλαμβάνει ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο μέσω ενός εστερικού ή αμιδιακού δεσμού με μια βασική πλευρική αλυσίδα και το γεγονός ότι είναι ασθενείς βάσεις με τιμές pK_a μεταξύ 8-9, τα καθιστά ικανά να διεισδύουν στο έλυτρο της μυελίνης και στις μεμβράνες των νευραξόνων. Τα τοπικά αναισθητικά που περιλαμβάνουν εστερικό δεσμό είναι η βενζοκαΐνη, η κοκαΐνη, η προκαΐνη και η τετρακαΐνη και εκείνα που περιλαμβάνουν αμιδιακό δεσμό είναι η λιδοκαΐνη, η πριλοκαΐνη, η βουπιβακαΐνη και η ροπιβακαΐνη (Rang and Dale, 1991).

Η απόπτωση είναι μια συνεχής φυσιολογική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που παίρνει μέρος σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, που περιλαμβάνουν την μορφογένεση, την ανακύκλωση και την απομάκρυνση βλαπτικών κυττάρων και διακρίνεται από τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο στο ότι είναι μια στενά ρυθμισμένη διαδικασία που επάγεται από ένα συγκεκριμένο ερέθισμα και συμβαίνει χωρίς την απελευθέρωση διαμεσολαβητών φλεγμονής. Τουλάχιστο δύο βιοχημικές οδοί μετά από την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων, έχουν αναγνωριστεί ότι οδηγούν στην ενεργοποίηση πρωτεασών κυστεΐνης, των δραστικών κασπασών οι οποίες με τη σειρά τους διασπούν μια ποικιλία συγκεκριμένων κυτταρικών υποστρωμάτων και προκαλούν αποπτωτικό θάνατο. Η λεγόμενη «εξωγενής αποπτωτική οδός» περιλαμβάνει ένα βιοχημικό σήμα από τους «υποδοχείς θανάτου» (Fas) από τα κατάλληλα συνδεδεμένα μόρια (FasL) και η απόπτωση πραγματοποιείται τελικά με ενεργοποίηση πρόδρομων κασπασών όπως η -8 και δραστικών όπως η -3.



Στην «ενδογενή αποπτωτική οδό», ο ρόλος των μιτοχονδρίων και της υπεροικογένειας της πρωτεΐνης Bcl-2 είναι σημαντικός, και ο αποπτωτικός θάνατος συμβαίνει με ενεργοποίηση πρόδρομων κασπασών όπως η -9 και επίσης της -3. Επιπλέον ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος αναγνωρίζεται από διάφορα χαρακτηριστικά όπως κυτταρική συρρίκνωση, έντονη συσπείρωση χρωματίνης, ταχεία φαγοκύτωση και πέψη του DNA σε ενδονουκλεοσωματικές περιοχές (Hockenbery, 1995, Reed et al., 1999, Schultz and Harrington Jr., 2003).

Η υπεροικογένεια της Bcl-2 είναι μια από τις πιο σημαντικές ομάδες ρυθμιστικών πρωτεϊνών στην απόπτωση και περιλαμβάνει τα προ-αποπτωτικά μέλη Bax, Bad και Bak και τα αντι-αποπτωτικά Bcl-2 και Bcl-x_L και είναι τοποθετημένες κυρίως στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ειδικά η πρωτεΐνη Bcl-2 αποτρέπει την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, αναστέλλοντας την έναρξη της ενδογενούς αποπτωτικής οδού (Adams and Cory, 1998).

Η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J είναι ένα προϊόν γονιδίου που εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες και επίσης στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης, δρώντας κυρίως σαν αντι-αποπτωτικός παράγοντας. Η έκφραση της ApoJ επάγεται από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, το θερμικό σοκ, από κυττοκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως η TGFβ και ο TNFα και μετά από έκθεση στην UV και την ιονίζουσα ακτινοβολία και στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Miyake et al., 2000, Yang et al., 2000, Jones and Jomary, 2002, Trougatos and Gonos, 2002).

Μελέτες έδειξαν ότι τοπικά αναισθητικά, εκτός από τις δράσεις τους στο νευρικό σύστημα, επάγουν κυτταροτοξικές επιδράσεις και απόπτωση. Πράγματι, διάφορα τοπικά αναισθητικά όπως η κοκαΐνη (Cascales et al., 1994, Nassogne et al., 1997, Li et al., 1999, Li et al., 2003, He et al., 2000, He, Xiao and Zhang, 2001, Xiao et al., 2001), η λιδοκαΐνη (Friederich and Schmitz, 2002), η πριλοκαΐνη (Nakamura et al., 1999), η τετρακαΐνη, η βουπιβακαΐνη (Tan et al., 2002, Lee et al., 2003, Unami et al., 2003,) και η διβουκαΐνη (Kim et al., 1997, Arita et al., 2000), επάγουν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε διάφορα είδη κυττάρων.

Η ροπιβακαΐνη (Ropivacaine hydrochloride; NaropeineTM) είναι ένα νέο S-εναντιομερές τοπικό αναισθητικό αμιδιακού τύπου μακράς διάρκειας, το οποίο πρόσφατα εισήχθη στην αγορά για κλινική χρήση. Έχει υψηλή pK_a, 8,1, χαμηλή λιπιδική διαλυτότητα, ασκεί αποκλεισμό στους νευρώνες Aδ και C σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε αυτούς που ελέγχουν την κινητική επίδραση και είναι λιγότερο καρδιοτοξική από ίσες δόσεις ρακεμικής βουπιβακαΐνης (McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000). Εκτός από τις αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις της (Martinsson et al., 1997, Zhang and Thorlacius, 2000, Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1997 Fischer et al., 2001), η ροπιβακαΐνη βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό μη-μετασχηματισμένων καλλιεργούμενων ανθρώπινων ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, κερατινοκυττάρων (Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1993) και πρωτογενών ινοβλαστών αρουραίου, όπως και μετασχηματισμένων κυττάρων νεφρού πιθήκου, Vero (De Iuliis et al., 2001) και ανθρώπινων κυττάρων από το παχύ έντερο (Martinsson, 1999).

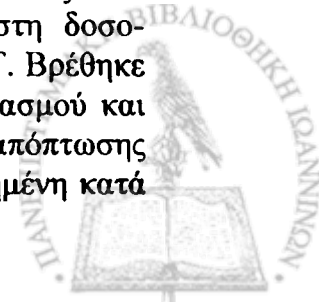
Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι ένα απαραίτητο μέταλλο της ομάδας IIB του περιοδικού συστήματος του οποίου οι φυσικές και χημικές ιδιότητες τον καθιστούν προσαρμόσιμο στις ανάγκες πρωτεϊνών και ένζυμων που πραγματοποιούν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Οι σταθεροποιητικές του ιδιότητες επίσης δημιουργούν τη βάση για την εκτεταμένη συμμετοχή του Zn στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων, των υδατανθράκων και των λιπιδίων όπως και στον έλεγχο της

γονιδιακής μεταγραφής και άλλων πολύ σημαντικών βιολογικών διεργασιών (Vallee and Falchuk, 1993). Όσον αφορά τον ρόλο του στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε διάφορα είδη κυττάρων βρέθηκε ότι ο Zn, είτε επάγει απόπτωση (Feng et al., 2002, Kondoh et al., 2002, Kawahara, Kato-Negishi and Kuroda, 2002, Sheline et al., 2003, Jimenez Del Rio and Velez-Pardo, 2004) είτε αναστέλλει την αποπτωτικές επιδράσεις από άλλους παράγοντες όπως το Mn (Schrantz et al., 2001), η φυτική τοξίνη ρικίνη (Tamura et al., 2002), η μείωση του ATP (Wei et al., 2004), η επίδραση της ανοξίας (Naganska and Matyja, 2002), ο Cu (VanLandingham, Fitch and Levenson, 2002), η ακτινοβολία-γ (Cai et al., 2004) και το αραχιδονικό οξύ (Perez and Cederbaum, 2003).

Η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση (NEP/CALLA/CD10/Nepilysin E.C. 3.4.24.11.) είναι μια διαμεμβρανική, N-γλυκοζυλιωμένη μεταλλοπεπτιδάση με Zn στο ενεργό της κέντρο και ανακαλύφθηκε απομονώθηκε και καθαρίστηκε από το νεφρό κουνελιού και γουρουνιού. Είναι ευρέως κατανοημένη στο ΚΝΣ και σε περιφερικούς ιστούς διασπώντας μια ποικιλία υποστρωμάτων, στην αμινοτελική πλευρά των υδρόφοβων αμινοξέων τους, όπως τα ενδογενή οπιοειδή. Οι θέσεις δραστηριοποίησης της NEP συμπίπτουν με τους υποδοχείς των οπιοειδών μ- και δ- σε πολλές περιοχές που περιλαμβάνουν και αυτές του ελέγχου του πόνου. Επίσης βρέθηκε ότι, παράγοντες που αναστέλλουν τη NEP ενισχύουν τις αναλγητικές επιδράσεις των εγκεφαλίνων (Roques et al., 1993, Erdös and Skidgel, 1989). Όσον αφορά τον ρόλο της στην απόπτωση, προέκυψε από μελέτες ότι, η ενζυματική δράση ή η υπερέκφραση της NEP, προκάλεσε αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επαγωγή απόπτωσης αυτή καθαυτή ή σε συνδυασμό με άλλους κυτταροτοξικούς παράγοντες, ειδικά σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (Mari et al., 1997, Papandreou et al., 1998, Dai et al., 2001, Sumitomo et al 2000, Sumitomo et al., 2004).

Στην παρούσα διατριβή πρώτα μελετήθηκε η απόπτωση σε αυθόρμητα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα ανθρώπου HaCaT, που προκάλεσε το τοπικό αναισθητικό ροπιβακαΐνη και ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνη/ApoJ και Bcl-2. Η ροπιβακαΐνη επήγε απόπτωση στα κύτταρα HaCaT με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως αποδείχτηκε από τεχνικές κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αποκλεισμού με trypan blue, ενδονουκλεοσωματικής θραυσματοποίησης του DNA και τη πρωτεολυτική διάσπαση της PARP (πολύ-ADP ριβοσυλ-πολυμεράση). Η ροπιβακαΐνη επίσης μειοϋθμισε την κλαστρίνη/ApoJ όπως φάνηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western, δείχνοντας ότι η μείωση της έκφρασης αυτής της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης από το φάρμακο στα κύτταρα HaCaT. Προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της κλαστρίνης/ApoJ στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT και να συγκριθεί με το καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό ρόλο της Bcl-2, κατασκευάστηκαν κυτταρικοί κλώνοι που υπερέκφραζαν την κλαστρίνη/ApoJ και την Bcl-2. Φάνηκε ότι η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 προστάτευσαν τα κύτταρα HaCaT από την απόπτωση που επήγε η ροπιβακαΐνη όπως αποδείχτηκε με τεχνικές όμοιες με τις ήδη αναφερθείσες. Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ μπορεί να έχει αντιαποπτωτικό ρόλο στις τοξικές επιδράσεις που επάγει η ροπιβακαΐνη.

Ακόμα στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε ο προστατευτικός ρόλος του εξωγενούς Zn με τη μορφή του νιτρικού ψευδαργύρου, $Zn(NO_3)_2$, στη δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη στα κύτταρα HaCaT. Βρέθηκε ότι 15 μM $Zn(NO_3)_2$ ανέστειλαν τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρική βιωσιμότητας και επίσης ανέστειλαν μερικώς την επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη. Η προστατευτική επίδραση του $Zn(NO_3)_2$ ήταν αυξημένη κατά



την ταυτόχρονη χορήγηση με τη ροπιβακαΐνη παρά με την προχορήγησή του 30 λεπτά πριν από τη ροπιβακαΐνη.

Επιπλέον ερευνήθηκε ο ρόλος της NEP στην επαγωγή απόπτωσης από τη ροπιβακαΐνη και στην αναστολή της από τον $Zn(NO_3)_2$ στα κύτταρα HaCaT. Βρέθηκε ότι η ροπιβακαΐνη μειορύθμισε την NEP παρουσία και απουσία $Zn(NO_3)_2$, όπως φάνηκε από ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western, διαπίστωση που πιθανόν υποσημαίνει ένα ακόμη μηχανισμό αναλγητικής δράσης της ροπιβακαΐνης, δηλαδή απελευθέρωσης της δράσης των ενδογενών οπιοειδών μέσω ελέγχου της δραστηριότητας της NEP. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της NEP, κατασκευάστηκαν κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την NEP και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπό τις συνθήκες επώασης (48 ώρες, DMEM χωρίς ορό), η υπερέκφραση της NEP προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής βιωσιμότητας, επάγοντας απόπτωση. Τελικά, βρέθηκε στα κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την NEP η μείωση της κυτταρική βιωσιμότητας και η απόπτωση που προκλήθηκε από τη ροπιβακαΐνη αντιμετωπίστηκαν περιορισμένα από τον Zn.



ABSTRACT

Title: The effects of analgesic compounds on the expression of metalloenzymes

Evangelos Kontargiris BSc Biomedical Sciences

Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina

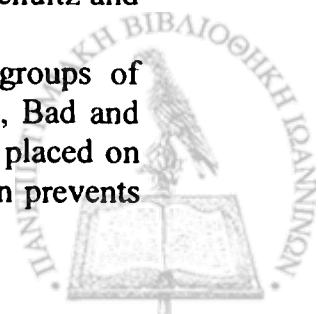
It is known that local anesthetics such as ropivacaine apart from their analgesic effects induce apoptosis in cells. Furthermore it was found that the essential metal zinc (Zn) protects several types of cells from the apoptotic action of stress factors and also is a structural element of the active site of metallopeptidases such as neutral endopeptidase (NEP). NEP, apart from its important role in the physiology and biochemistry of pain which is induced by the breakdown of endogenous opioids, also causes reduction of proliferation and induction of apoptosis especially in cancer cells.

Pain, acute and chronic, is a protective mechanism of the human body. It is noticeable by nerve sensors in the skin and internal tissues due to mechanical, thermal and chemical stimuli. It is transmitted by A δ and C nerve fibres and through two distinct pathways of the spinal cord the stimulus ends up at various areas of the brain including medulla oblongata, mesencephalon and cerebral cortex. The ability of the CNS to control the degree of pain stimuli entrance into the nervous system works by t activation of "the analgesia system" (Guyton, 1991, Rang and Dale, 1991).

Local anesthetics are used for the temporal and reversible abolition of senses in a distinctive area of the human body by preventing nerve transmission by blocking of sodium (Na⁺) channels on the membrane of the nerve cells, especially of A δ and C nerve fibres. Their molecule contains an aromatic ring linked by an ester or amide bond to a basic side-chain and also they are weak bases, (pK_a~8-9) characteristics that make them able to penetrate the myelin sheath and axon membrane. Local anesthetics that include ester bond are benzocaine, cocaine, procaine and tetracaine while those with an amide bond include lidocaine, prilocaine, bupivacaine and ropivacaine (Rang and Dale, 1991).

Apoptosis is a normal continuous process for programmed cell death which participates in many biologic events, including morphogenesis, cell turnover, and the removal of harmful cells and is distinguished from necrotic cell death in that it is a closely regulated process induced by a specific stimulus and occurs without the release of inflammatory mediators. At least two biochemical pathways after the effect of various stimuli, have been recognised to lead to the activation of cysteine proteases, the "effector caspases" which in turn breakdown a variety of certain protein substrates and cause apoptotic death. The so-called "extrinsic apoptotic pathway" includes a biochemical signal from "death receptors" (Fas) by the appropriate ligands (FasL) and apoptosis finally takes place by activation of initiator caspases such as caspase-8 and effector caspases such as caspase-3. In the so-called "intrinsic apoptotic pathway", the roles of mitochondria and the Bcl-2 protein superfamily are important, and apoptotic death happens by activation of initiator caspases such as caspase-9 and again caspase-3. Moreover, apoptotic cell death is identified by various characteristics including cell shrinkage, chromatin condensation, rapid phagocytosis and DNA digestion at internucleosomal sites (Hockenbery, 1995, Reed et al., 1999, Schultz and Harrington Jr., 2003).

The superfamily of Bcl-2 proteins is one of the most important groups of regulatory proteins in apoptosis, includes the pro-apoptotic members Bax, Bad and Bak and the antiapoptotic members Bcl-2 and Bcl-x_L and they are mainly placed on the outer side of the mitochondrial membrane. Especially the Bcl-2 protein prevents



the release of cytochrome c from mitochondria, inhibiting the initiation of the intrinsic apoptotic pathway (Adams and Cory, 1998).

Clusterin/ApoJ is a gene product which is involved in a number of physiological processes, but also in the regulation of cell proliferation and apoptosis acting mainly as an anti-apoptotic factor. The expression of ApoJ is induced by several stress factors, such as oxidative stress, heat shock, by cytokines and growth factors, such as TGF β and TNF α and by exposure to UV and ionizing radiation and chemotherapeutic agents (Miyake et al., 2000, Yang et al., 2000, Jones and Jomary, 2002, Trougakos and Gonos, 2002).

It was published that local anaesthetics, apart from their activities in the nervous system, they induce cytotoxic effects and apoptosis. Indeed, several local anaesthetics such as cocaine (Cascales et al., 1994, Nassogne et al., 1997, Li et al., 1999, Li et al., 2003, He et al., 2000, He, Xiao and Zhang, 2001, Xiao et al., 2001), lidocaine (Friederich and Schmitz, 2002), prilocaine (Nakamura et al., 1999), tetracaine, bupivacaine (Tan et al., 2002, Lee et al., 2003, Unami et al., 2003,) and dibucaine (Kim et al., 1997, Arita et al., 2000), induce apoptotic cell death in various types of cells.

Ropivacaine (Ropivacaine hydrochloride; NaropeineTM) is a long-lasting amide local anaesthetic pure enantiomer (S-enantiomer), which is recently introduced to the market available for clinical use. It has a high pKa 8,1, low lipid solubility, blocks A δ and C nerve fibres to a greater degree than those controlling motor function and is less cardiotoxic than equal concentrations of racemic bupivacaine (McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000). Apart from its anti-inflammatory effects (Martinsson et al., 1997, Zhang and Thorlacius, 2000, Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1997 Fischer et al., 2001) ropivacaine was found to inhibit the proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes (Martinsson, Haegerstrand and Dalsgaard, 1993) and primary rat fibroblast, as well as that of the transformed monkey kidney Vero cells (De Iuliis et al., 2001) and human colon cell lines (Martinsson T., 1999).

Zn is an essential metal of the IIB series whose physical and chemical properties, make it highly adaptable to meet the needs of proteins and enzymes that carry out diverse biological functions. Metal's stabilizing properties form the basis for the extensive participation of Zn in protein, nucleic acid, carbohydrate and lipid metabolism as well as in the control of gene transcription and other fundamental biological processes (Vallee and Falchuk, 1993). Concerning its role in apoptotic cell death in various types of cells, it was found that Zn either induces apoptosis (Feng et al., 2002, Kondoh et al., 2002, Kawahara, Kato-Negishi and Kuroda, 2002, Sheline et al., 2003, Jimenez Del Rio and Velez-Pardo, 2004) or inhibits the apoptotic effects by other factors such as Mn (Schrantz et al., 2001), the plant toxin ricin (Tamura et al., 2002), reduction of ATP (Wei et al., 2004), the effect of anoxia (Naganska and Matyja, 2002), Cu (VanLandingham, Fitch and Levenson, 2002), γ radiation (Cai et al., 2004) and arachidonic acid (Perez and Cederbaum, 2003).

Neutral endopeptidase (NEP/CALLA/CD10/Nepriylisin E.C. 3.4.24.11.) is a transmembrane, N-glycosylated metallopeptidase with Zn in its active centre and was first discovered, extracted and purified from the renal brush border of rabbit and pig. It is widely distributed in CNS and peripheral tissues cleaving a variety of substrates, at the amino side of hydrophobic amino acids, such as the endogenous opioid peptides (Roques et al., 1993, Erdős and Skidgel, 1989). The localisation of NEP matches that of μ - and/or δ -opioid receptors in many regions including those of pain control. Furthermore, it was found that, factors that inhibit NEP prolong the analgesic effects

of enkephalins (Erdös and Skidgel, 1989). Concerning its role in apoptosis it was published that, the enzymatic activity or the overexpression of NEP, caused inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis by itself or in combination with other cytotoxic agents, especially in cells of prostate cancer (Mari et al., 1997, Papandreou et al., 1998, Dai et al., 2001, Sumitomo et al 2000, Sumitomo et al., 2004).

In the present work, first of all, we studied the apoptosis of spontaneously immortalized human keratinocytes HaCaT, induced by the local anaesthetic ropivacaine and the role of anti-apoptotic gene products Clusterin/ApoJ and Bcl-2. Ropivacaine induced apoptosis of HaCaT cells in a dose-dependent manner, as evidenced by cell proliferation, trypan blue exclusion essays, endonucleosomal DNA fragmentation and proteolytic cleavage of PARP (Poly-ADP Ribose Polymerase). Ropivacaine also downregulated Clusterin/ApoJ as shown by western blot analysis, suggesting that a reduction in the expression of this anti-apoptotic protein, may be involved in the drug induced apoptosis of HaCaT cells. In order to investigate further the role of clusterin/ApoJ in the apoptosis of HaCaT cells and compare it to the well-studied anti-apoptotic role of Bcl-2, we generated stable cell clones that overexpressed ApoJ or Bcl-2. It was shown that overexpression of clusterin/ApoJ or Bcl-2 protected HaCaT cells from ropivacaine-induced apoptosis as demonstrated again by cell proliferation, trypan blue exclusion essays, DNA fragmentation, cleavage of PARP and the reduction in procaspase-3 expression. These results suggest that clusterin/ApoJ expression may play an antiapoptotic role towards the toxic effects induced by ropivacaine.

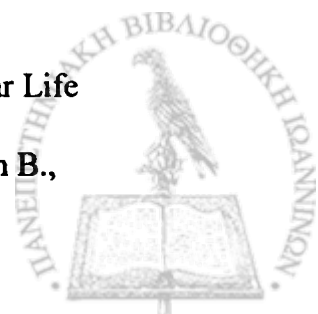
Furthermore in the present work, the protective role of exogenous Zn in the form of zinc nitrate, $Zn(NO_3)_2$, against the dose-dependent induction of apoptosis by ropivacaine was studied, in HaCaT cells. It was found that 15 μM of $Zn(NO_3)_2$, inhibited the reduction of cell growth and cell viability and also inhibited partially the induction of apoptosis by ropivacaine, as demonstrated by molecular tests as above. Protective effects of Zn were increased when it was administered simultaneously to ropivacaine rather than in the pre-treated 30 minutes before ropivacaine.

Moreover, we investigated the role of NEP in the induction of apoptosis by ropivacaine and its inhibition by Zn, in HaCaT cells. It was found that ropivacaine downregulated NEP present or not of $Zn(NO_3)_2$, as shown by western blot analysis, indicating possibly another Ropivacaine's action which is the enhancement of endogenous opioid actions through NEP's activity regulation. In order to further investigate the role of NEP, we generated HaCaT cells that overexpressed NEP and our results demonstrated that under certain incubation conditions (48 hours, serum free DMEM), overexpression of NEP caused inhibition of cell proliferation and viability and induced apoptosis. Finally, it was found that in HaCaT cells overexpressing NEP, the reduction of cell viability and apoptosis caused by ropivacaine.

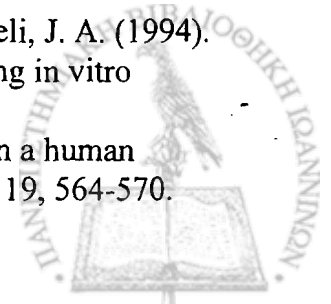


VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

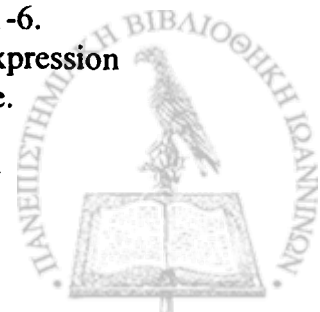
- Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Andrikoula M. and Tsatsoulis A. (2001). The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *European Journal of Endocrinology*. 144, 561-568.
- Arai Y., Kondo T., Tanabe K., Zhao Q-L., Li F-J., Ogawa R., Li M. and Kasuya M. (2002). Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 No 21, 18986-18993.
- Arita K., Utsami T., Kato A., Kanno T., Kobuchi H., Inoue B., Akiyama J. and Utsūmi K. (2000). Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol*. 60, 905-915.
- Ashkenazi, A. and Dixit, A.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Beamont A., Le Moual H., Boileau G., Crine P. and Roques B P. (1991). Evidence that both Arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC3.4.24.11). *The Journal of Biological Chemistry* 266 No1, 214-220.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinisation in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology* 106, 761-771.
- Bratton S. B., MacFarlane M., Cain K. and Cohen G. M. (2000). Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*. 256, 27-33.
- Bunn P. A. Jr., Helfrich B. A., Brenner D. G., Chan D. C., Dykes D. J., Cohen A. J. and Miller Y. E. (1998). Effects of recombinant neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11.) on the growth of lung cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Cancer Research*. 4, 2849-2858.
- Cai L., Iskander S., Cherian M. G. and Hammond R. R. (2004). Zinc-or cadmium-pre-induced metallothionein protects human central nervous system cells and astrocytes from radiation-induced apoptosis. *Toxicology Letters*. 146 (3), 217-226.
- Calvo, E. L., Mallo, G. V., Fiedler, F., Malka, D., Vaccaro, M. I., Keim, V., Morisset, J., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (1998). Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development. *European Journal of Biochemistry* 254, 282-289.
- Cascales, M., Alvarez, A., Gascó, P., Fernandez-Simon, L., Sanz, N. and Boscá L. (1994) Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* 20, (4), 992-1001.
- Chen H., Noble F., Coric P., Fournie-Zaluski M-C. and Bernard P. Roques (1998). Aminophosphinic inhibitors as transition state analogues of enkephalin-degrading enzymes: A class of central analgesics. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95, 12028-12033.
- Chukhlovi A. B., Tokalov S. V., Yagunov A. S., Westendorf J., Reincke H. and Karbe L. (2001). *In vitro* suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Sci. Total Environ*. 281 (1-3), 153-163.
- Cioca D. P. and Kitano K. (2002). Induction of apoptosis and CD10/neutral endopeptidase expression by jaspamide in HL-60 line cells. *Cell Molecular Life Science*. 59 (8),1377-1387.
- Cohen A. J., Bunn P. A., Franklin W., Magill-Sole C., Hartmann C., Helfrich B.,



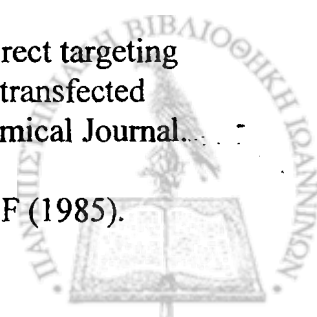
- Gilman L., Folkvord J., Helm K. and Miller Y. E. (1996). Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Reseach.* 56, 831-839.
- Dai J., Shen R., Sumitomo M., Goldberg J. S., Geng Y., Navarro D., Xu S., Koutcher J. A., Garzotto M., Powell T. and Nanus D. M. (2001). Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research.* 7, 1370-1377.
- De Iuliis A, Zanatta L, Vincenti E, and Galzigna L(2001). Differences of ropivacaine and bupivacaine relevant to anti-inflammatory activity, platelet aggregation and antioxidant activity in vitro. *Il Farmaco.* 56, 153-157.
- DiMaria G. U., Bellofiore S. and Geppetti P. (1998). Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Eur. Respir. J.* 12, 1454-1462.
- Dion N., LeMoual H., Fournie-Zaluski M.-C., Roques B. P., Crine P. and Boileau G. (1995). Evidence that Asn⁵⁴² of neprilysin (EC 3.4.24.11) is involved in binding of the P₂ residue of substrates and inhibitors. *Biochemical Journal* 311, 623-627.
- Duffy J. Y., Miller C. M., Rutschilling G. L., Ridder G. M., Clegg M. S., Keen C. L. Daston G. P. (2001). A decrease in intracellular zinc level precedes the detection of early indicators of apoptosis in HL-60 cells. *Apoptosis.* 6 (3), 161-72.
- Dumont, P., Chainianx, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002). Overexpresion of ApoJ in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senecence induced by ethanol and tert-butyl/hydroperoxide Cell stress Chaperones. 7, 23-35.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. and Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391,43-50.
- Erdös E. G. and Skidgel R. A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB.* 3, 145-151.
- Eshoa C., Perkins S., Kampalath B., Šhidham V., Juckett M. Cchang C.-C. (2001). Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology.* 115,862-867.
- Evangelou A., Kalfakakou V., Georgakas P., Koutras V., Vezyraki P., Iliopoulou L. and Vadalouka A. (2000). Ascorbic Acid (Vitamin C) Effects on Withdrawal Syndrome of Heroin Abusers. *In vivo* 14, 363-366.
- Feng P., Li T-L., Guan Z-X., Franklin R. B. and Costello L. C. (2002). Direct effect of zinc on mitochondrial apoptosis in prostate cells. *The prostate.* 52, 311-318.
- Finucane, D. M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N. J., Cotter T. G. and Green D. R. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 2225-2233.
- Fischer L. G., Bremer M., Coleman E. J., Conrad B., Krumm B., Gross A., Hollmann M. W., Mandell G. and Durieux M. E. (2001). Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth. Analg.* 92 (4) 1041-1047.
- Fischer H. S., Zernig G., Hauser K. F., Gerard C., Hersh L. B. and Saria A. (2002). Neutral endopeptidase knockout induces hyperalgesia in a model of visceral pain, an effect related to bradykinin and nitric oxide. *Journal of Molecular Neuroscience.* 18 (1-2), 129-134.
- French, L. E., Wohlwend, A., Sappino, A-P., Tschopp, J. and Schiffereli, J. A. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J. Clin. Invest.* 93, 877-884.
- Friederich P. and Schmitz T. P. (2002). Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *European Journal of Anaesthesiology.* 19, 564-570.



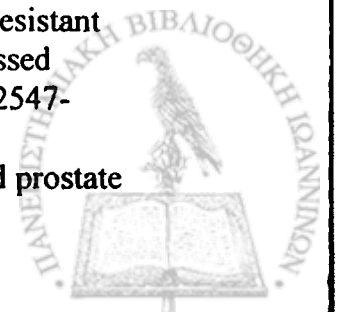
- Gabrilovac J., Cupic B., Breljak., Zekusic M. and Boranic M. (2004). Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/ neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes. *Immunol Letters* 91 (1), 39-47.
- Ganju R. K., Sunday M., Tsarwas D. G., Card A. and Shipp M. A. (1994). CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. *Journal of Clinical Investigation*. 94, 1784-1791.
- Ganju N. and Eastman A. (2003). Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c release induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell Death Differentiation*. 10 (6), 652-61.
- Gohring B., Holzhausen H. J., Meye A., Heynemann H., Rebmann U., Langer J. and Riemann D. (1998). Endopeptidase 24. 11/CD10 is down-regulated in renal cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 2 (4), 409-414.
- Gonos, E. S. and Spandidos, D. A., (1993). Oncogenes in cellular immortalization and differentiation. *Anticancer Res.* 13(4):1117-1122.
- Gorman L., Mercer, L. P. and Henning, B. (1996). Growth requirements of endothelial cells in culture: variation in serum and amino acids concentrations. *Nutrition* 12(4): 266-270.
- Goth A. (1981). *Medical pharmacology-principles and concepts*. Tenth Edition. The C. V. Mosby Company, 433-435.
- Green D. R. and Reed C. J. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281, 1309-1312.
- Guyton A. C. (1991). *Textbook of Medical Physiology*. Eight Edition. W. B. Saunders Company, 678-685.
- Θεοχαρίδης Θ. Κ. (1997) *Φαρμακολογία- Βασικές έννοιες στην κλινική πράξη*. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 355.
- Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L.C., Stoneman, V. E., Longshorne, V., Culhane, A. C. and Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *European Journal of Biochemistry* 236, 1-26.
- Han, B. H., DeMattos, R. B., Dugan, J. S., Kim-Han, R. P., Brendza, J. D., Fryer, M., Jalal F., Lemay G., Zollinger M., Berteloot A., Boileau G. and Crine P. (1991). Neutral endopeptidase, a major brush border protein of the kidney proximal nephron, is directly targeted to the apical domain when expressed in Madin-Darby canine cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 266, No. 29, 19826-19832.
- Hara I, Miyake H, Gleave ME, Kamidono S (2001). Introduction of clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy through inhibition of apoptosis both in vitro and in vivo. *Japanese Journal of Cancer Res.* 92, 1220-1224.
- He J., Xiao Y., Casiano C. A. and Zhang L. (2000). Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in coronary artery endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (3), 896-903.
- He J., Xiao Y. and Zhang L. (2001). Cocaine-mediated apoptosis in bovine coronary artery endothelial cells: role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (1), 180-187.
- Hengartner. M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770-776.
- Hockenbery D. (1995). Defining apoptosis. *American Journal of Pathology* 146 (No1) 16-19
- Hooper N. M.(1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* 354, 1-6.
- Iwaya K., Ogawa H., Izumi M., Kuroda M. and Mukai K. (2002). Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch.* 440, 589-593.
- Jiang W. and Bond J. S. (1992). Families of metalloendopeptidases and their



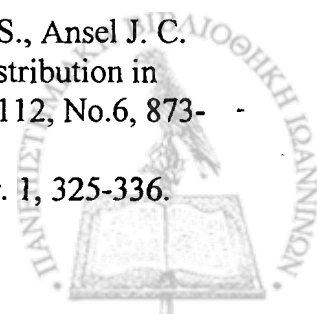
- Relationships. FEBS. 312, 110-114
- Jimenez Del Rio M. and Velez-Pardo C. (2004). Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Archives of Medical Research*. 35 (3), 185-193.
- Jones, S.E. and Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34, 427-431.
- Kalka K., Ahmad N., Criswell T., Boothman D. and Mukhtar Hasan. (2000). Up-Regulation of clusterin during Phthalosyanine 4 Photodynamic Therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouth skin tumors. *Cancer Research*. 60, 5984-5987.
- Kang S. W., Lim S. W., Choi S. H., Shin K. H., Chun B. G., Park I. S. and Min B. H. (2000). Antisense oligonucleotide of clusterin mRNA induces apoptotic cell death and prevents adhesion of rat ASC-17D Sertoli cells. *Mol. Cell*. 10, 193-198.
- Kanitakis J., Narvaez D. and Claudy A. (2002). Differential expression of the CD10 antigen (neutral endopeptidase) in primary versus metastatic malignant melanomas of the skin. *Melanoma Research*. 12 (3), 241-244.
- Kawahara M., Kato-Negishi M. and Kuroda Y. (2002). Pyruvate blocks zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons. *Cell Mol. Neurobiology*. 22 (1), 87-93.
- Kim M, Lee YS, Mathews HL, Wurster RD (1997). Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Experimental Cell Research* 231, 235-241.
- King A. K., Hua J., Torday, J. S., Drazen J. M., Graham S. Shipp M. and Sunday M. E. (1993). CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentiating endogenous bombesin-like peptides. *Journal of Clinical Investigation*. 91, 1969-1973.
- Kletsas D., Caselgrandi E., Barbieri D., Stathakos D., Franceschi C. and Ottaviani E. (1998). Neutral endopeptidase-24.11 (NEP) activity in human fibroblasts during development and ageing. *Mechanisms of aging and development*. 102, 15-23.
- Klock G., Storch S., Rickert J., Gutacker C. and Koch-brandt C. (1998). Differential regulation of the clusterin gene by Ha-ras and c-myc oncogenes and during apoptosis. *Journal of cellular physiology*. 177, 593-605.
- Kondoh M., Tasaki E., Araragi E., Takiguchi M., Higashimoto M., Watanabe Y. and Sato M. (2002). Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Biochem*. 269 (24), 6204-6211.
- Kornyei J. L., Vertes Z., Kovacs K. A., Gocze P. M. and Vertes M. (2003). Developmental changes in the inhibition of cultured rat uterine cell proliferation by opioid peptides. *Cell Proliferation*. 36 (3), 151-163.
- Krasowska A., Wlostowski T. and Bonda E. (2004). Zinc protection from fluoride-induced testicular injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Toxicology Letters* 147 (3), 229-235.
- Lambert J. C., Zhou Z. and Kang Y. J. (2003). Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis. *Experimental Biological Medicine*. 228 (4), 406-412.
- Lanctot C., Fournier H., Howell S., Boileau G. and Crine P. (1995). Direct targeting of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) to the apical cell surface of transfected LLC-PK₁ cells and unpolarized secretion of its soluble form. *Biochemical Journal*. 305, 165-171.
- Lazo JS., Braun D, Meandzija B, Kennedy KA, Pham ET, Smaldone LF (1985).



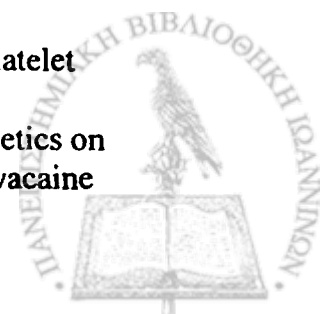
- Lidocaine potentiation of bleomycin A₂ cytotoxicity and DNA strand breakage in L1210 and human A-253 cells. *Cancer Res.* 45, 2103-2109.
- Lee H. T., Xu H., Siegel C. D and Krichevsky I. E. (2003). Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *American Journal of Nephrology.* 23, 129-139.
- Lee W. K., Li C. H., Lee L. S., Au C. F., Yu K. L. and Tang C. S. (2003) Epidural ropivacaine for postoperative analgesia in Taiwanese patients. *Acta Anaesthesiol. Sin* 41 (1), 21-25.
- Lemay G., Zollinger M., Waksman G., Roques B. P., Crine P. and Boileau G. (1990). Recombinant neutral endopeptidase-24.11 expressed in mouse neuroblastoma cells is associated with neurite membranes. *Biochemical Journal.* 267,447-452.
- Li H., Jiang Y., Rajpurkar A., Dunbar J. C. and Dhabuwala C. B. (1999). Cocaine induced apoptosis in rat testes. *The Journal of Urology.* 162, 213-216.
- Li H., Xu L., Dunbar J. C. and Dhabuwala C. B. (2003). Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes. *Urology.* 61 (3), 646-650.
- Mari B., Guerin S., Maulon L., Belhacenc N., Far D. F., Imbert V., Rossi B., Peyron J.-F. and Auberger P. (1997). Endopeptidase 24.11 (CD10/NEP) is required for phorbol ester-induced growth arrest in Jurkat T cells. *FASEB.* 11, 869-879.
- Marsh C. R. and Hardy P. A. J. (1991). Ropivacaine: a new local anaesthetic agent. *British Journal of Hospital Medicine.* 45, 94-95.
- Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard, C-J. (1993) Ropivacaine and lidocaine inhibits proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. *Agents Actions.* 40, 78-85.
- Martinsson T, Oda T, Fernvik E, Roempke K, Dalsgaard C-J., Svensjö E. (1997) Ropivacaine inhibits leukocyte rolling, adhesion and CD11b/CD18 expression. *J. Pharmacol Exp Ther.* 283, 59-65.
- Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard C-J (1997). Effects of ropivacaine on eicosanoid release from human granulocytes and endothelial cells in vitro. *Inflamm Res.* 46, 398-403.
- Martinsson T. (1999) Ropivacaine inhibits serum-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells in vitro. *J. Pharmacol Exp Ther.* 288, 660-664.
- Matucci-Cerinic M., Lombardi A., Leoncini G., Pignone A., Sacerdoti L., Spillantini M. G. and Rartsch G. (1993). Neutral endopeptidase (3.4.24.11) in plasma and synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis. A marker of disease activity or a regulator of pain and inflammation. *Rheumatol. Int.* 13, 1-4.
- Matucci-Cerinic M., Iannone F., Carossino A., Pignone A., Leoncini G., Generini s., Lapadula G. and Cagnoni M. (1999). Discrepant expression of neprilysin on fibroblasts in Diffuse Systemic Sclerosis. *The Journal of Rheumatology.* 26 (2), 347-351.
- McClure JH (1996). Ropivacaine. *Br J Anaesth.* 76, 300-307.
- McClellan K. J. and Faulds D. (2000) Ropivacaine: an update of its use in regional anaesthesia. *Drugs.* 60 (5), 1065-1093.
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W. D., Florio, C. J., Groen, P. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Witte, D. P., Harmony, J. A. and Aronow, B. J. (2000). Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *Journal of Clinical Investigation* 106, 1105-1113.
- Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. (2000) Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res.* 60, 2547-2554.
- Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. (2000) Testosterone-repressed prostate



- message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 170-176.
- Miyake H, Chi KN, Gleave, M. E. (2000) Antisense TRPM-2 oligonucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 6, 1655-1663.
- Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME. (2001) Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligonucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res.* 7, 4245-4252.
- Miyake H, Hara S, Zellweger T, Kamidono S, Gleave ME, Hara I. (2001) Acquisition of resistance to Fas-mediated apoptosis by overexpression of clusterin in human renal cell carcinoma cells. *Mol Urol.* 5, 105-111.
- Miyake H, Gleave ME, Arakawa S, Kamidono S, Hara, I. (2002) Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential. *Journal of Urology* 167, 2203-2208.
- Muller-Wieprecht V., Riebeling C., Stooss A., Orfanos C. E. and Geilen C. C. (2000) Bcl-2 transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumour necrosis factor alpha and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D (3). *Arch. Dermatol. Res.*, 292 (9), 455-462.
- Naganska E. and Matyja E. (2002). The protective effect of ZnCl₂ pretreatment on the development of postanoxic neuronal damage in organotypic rat hippocampal cultures. *Ultrastructural Pathology.* 26 (6), 383-391.
- Nagata S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research.* 256, 12-18.
- Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, Morimoto H, Kobayashi S, Morikawa M, Haneji T. (1999) Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth.* 46, 476-482.
- Nassogne M. C., Louahed J., Evrad P. and Courtoy P. J. (1997). Cocaine induces apoptosis in cortical neurons of fetal mice. *J. Neurochem.* 68 (6), 2442-2450.
- Nissen J. B. and Kragballe K. (1997). Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes *in vitro*. *Experimental Dermatology.* 6, 222-229.
- Noble F., Smadja C., Valverde O., Maldonado R., Coric P., Turcaud S., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P. (1997). Pain-suppressive effects on various nociceptive stimuli (thermal, chemical, electrical and inflammatory) of the first orally active enkephaline-metabolizing enzyme inhibitor RB 120. *Pain.* 73,(3), 383-391.
- Nunẽz G., Benedict M. A., Hu Y. and Inohara N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17, 3237-3245.
- Odajima, J., Matsumura, I. and Sonoyama J. (2000) Full oncogenic activities of v-src are mediated by multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 24096-24105.
- Ogawa H., Iwaya K., Izumi M., Kuroda M., Serizawa H., Koyanagi Y. and Mukai K. (2002). Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development. *Human Pathology* 33, 806-811.
- O'Keeffe NJ, Healy TE. (1999) The role of new anesthetic agents. *Pharmacol Ther.* 84, 233-248.
- Olerud J. E., Usui M. L., Seckin D., Chiu D. S., Haycox C. L., Song I-S., Ansel J. C. and Bunnett N. W. (1999). Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. *The Journal of Investigative Dermatology.* 112, No.6, 873-881.
- Owen MD, Dean LS. (2000). Ropivacaine. *Expert Opin Pharmacother.* 1, 325-336.

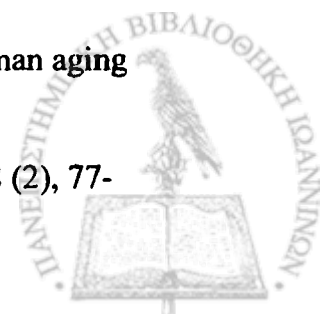


- Papagianopoulou P., Argiriadoy H., Georgiou M., Papaziogas B., Sfyra E. and Kanakoudis F. (2003). Preincisional local infiltration of levobupivacaine vs ropivacaine for pain control after laparoscopic cholecystectomy. *Surg. Endosc.* 17 (12), 1961-1964.
- Papaioannou A., Manos M., Karkabounas S., Liasko R., Evangelou A. M., Correia I, Kalfakakou V., Pessoa I. C. and Kabanos T. (2004). Solid state and solution studies of a vanadium (III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase. *J. Inorg Biochem.* 98, 959-68
- Papandreou C. N., Usmani B., Geng Y., Bogenrieder T., Freeman R., Wilk S., Finstad C. L., Reuter V. E., Powell C. T., Scheinberg D., Magill C. Scher H. I., Albino A. P. and Nanus D. M. (1998). Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Medicine.* 4 No.1, 50-57.
- Park J. H., Park J. S., Ju S. K., Lee K. B., Park Y. K., Kang M. H., Na S. Y. and You K. H. (2003). Clusterin mRNA expression in apoptotic and activated rat thymocytes. *Cell Research.* 13, 49-58.
- Patel T., Gores G. J. and Kaufmann S. H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB* 10, 587-597.
- Pekonen F., Nyman T. and E.-M. Rutanen. (1994). Differential expression of mRNAs for endothelin-related proteins in human endometrium, myometrium and leiomyoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 103, 165-170.
- Pekonen F., Nyman T., Ämmälä M. and Rutanen E-M (1995). Decreased expression of messenger RNAs encoding endothelin receptors and neutral endopeptidase 24.11 in endometrial cancer. *British Journal of Cancer.* 71, 59-63.
- Perez M. J. and Cederbaum A.I., (2003). Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radical Biological Medicine.* 34 (4), 443-455.
- Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O. and Gonos, E.S. (2001). Clustering/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS. Let.* 509, 287-297.
- Pieper A. A., Verma A., Zhang J. and Snyder S. H., (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *TIPS.* 20, 171-181.
- Pierart M. E., Najdovski T., Appelboom T. E. and Deschodt-Lanckman M. M. (1988). Effect of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1-induced thymocyte proliferation activity. *The Journal of Immunology.* 140 No 11, 3808-3811.
- Pincelli C., Haake A. R., Benassi L., Grassilli E., Magnoni C., Ottani D., Polakowska R., Franceschi C. and Giannetti A. (1997). Autocrine Nerve Growth Factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): a role for Bcl-2. *The Journal of Investigative Dermatology.* 109, 757-764.
- Porter J. M., McGinley J., O'Hare B. and Shorten G. D. (1999). The effects of ropivacaine hydrochloride on coagulation and fibrinolysis. *Anaesthesia* 54, 899-908.
- Porter J. M., Crowe B., Cahill M. and Shorten G. D. (2001). The effects of ropivacaine hydrochloride on platelet function: an assessment using the platelet function analyser (PFA-100). *Anaesthesia.* 56, 15-18.
- Radwan I. A., Saito S. and Goto F. (2002). The neurotoxicity of local anesthetics on growing neurons: a comprehensive study of lidocaine, bupivacaine, mepivacaine



- and ropivacaine. *Anesth. Analg.* 94 (2), 319-124.
- Rang H. P. and Dale M. M. (1991) "Pharmacology" Second Edition. Churchill Livingstone, 751-757..
- Reed J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 124, 1-6.
- Reed J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology* 17, 2941-2953.
- Renneberg H., Albrecht M., Kurek R., Krause E., Lottspeich F., Aumüller G. and Wilhelm B. (2001). Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostasomes-localization in prostatic tissue and cell lines. *The Prostate* 46, 173-183.
- Roques B. P. and Beaumont A. (1990). Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives. *TIPS.* 11, 245-249.
- Roques B. P., Noble F., Daugè V., Fourniè-Zaluski M.-C. and Beaumont A. (1993), Neutral endopeptidase 24.11: Structure, Inhibition, and Experimental and Clinical Pharmacology. *Pharmacological Reviews.* 45, No1, 87-146.
- Rougeot C., Messaoudi M., Hermitte V., Rigault A. G., Blisnick T., Dugave C., Desor D. and Rougeon F. (2003). Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *PNAS.* 100, No.14, 8549-8554.
- Sadler T. W. (1990). LANGMAN 'S MEDICAL EMBRYOLOGY Sixth Edition. Williams and Wilkins, 347-352.
- Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391, 96-99.
- Sambrook, J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342 (6247): 224-225.
- Sauer G. R., Smith D. M., Cahalane M., Wu L. N. and Wuthier R. E. (2003). Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes. *Journal of Cell Biochemistry* 88 (5), 954-969.
- Scholzen T. E. and Luger T. A. (2004). Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme-key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. *Exp. Dermatology.* 13,22-26
- Schultz D. R. and Harrington W. J. Jr., (2003). Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 32 (No 6). 345-369.
- Shaffee N. and AbuBakar S. (2002). Zinc accelerates dengue virus type 2-induced apoptosis in Vero cells. *FEBS Letters.* 524, 20-24.
- Sheline C. T., Wang H., Cai A. L., Dawson V. L. and Chio D. W. (2003). Involvement of poly ADP rivosyl polymerase-I in acute but not chronic zinc toxicity. *European Journal of Neuroscience.* 18 (6), 1402-1409.
- Shen R., Sumotomo M., Dai J., Harris A., Kaminetzky D., Gao M., Burnstein K. L. and Nanus D. M. (2000). Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells is mediated by increased levels of neutral endopeptidase. *Endocrinology.* 141, No.5, 1699-1704.
- Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell.* 9, 459-470.
- Shipp M. A., Stefano G. B., Switzer S. N., Griffin J. D. and Reinherz E. L. (1991). CD10(CALLA)/Neutral Endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood.* 78, No7, 1834-1841.
- Shipp M. A., Tarr G. E., Chen C-Y., Switzer S. N., Hersh L. B., Stein H., Suday M.

- E. and Reinherz E. L. (1991). CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10662-10666.
- Shipp M. A., Vijayaraghavan J., Schmidt E. V., Masteller E. L., D'Adamio L., Hersh L. B. and Reinherz E. (1989). Common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): Direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 297-301.
- Shone C. C. and Roberts A. K. (1994). Peptide substrate specificity and properties of the zinc-endopeptidase activity of botulinum type B neurotoxin. *European Journal of Biochemistry* 225, 263-270.
- Singhal P., Kapasi A., Reddy K. and Franki N. (2001). Opiates promote T cell apoptosis through JNK and caspase pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.* 493, 127-135.
- Sugiki, H., Hozumi, Y., Maeshima, H., Katagata, Y., Mitsuhashi, Y. and Kondo, S. (2000). C2-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line. *Br. J. Dermatol.* 143, 1154-1163.
- Sulowska Z., Majewska E., Tchorzewski H. and Klink M. (2003). Effects of exogenous opioid peptides on TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Archives Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 51 (4), 267-272.
- Sumitomo M., Shen R., Walburg M., Dai J., Geng Y., Navarro D., Boileau G., Papandreou C. N., Giancotti F. G., Knudsen B. and Nanus D. M. (2000). Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signalling. *The Journal of Clinical Investigation.* 106, No. 11, 1399-1407.
- Sumitomo M., Shen R., Goldberg J. S., Dai J., Navarro D., and Nanus D. M. (2000). Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C δ degradation. *Cancer Research.* 60, 6590-6596.
- Sumitomo M., Milowsky M. I., Shen R., Navarro D., Dai J., Asano T., Hayakawa M. and Nanus D. M. (2001). Neutral endopeptidase inhibits neuropeptide-mediated transactivation of the insulin-like growth factor receptor-Akt cell survival pathway. *Cancer Research.* 61, 3294-3298.
- Sumitomo M., Asano T., Asakuma J. Asano T., Nanus D. M. and Hayakawa M. (2004). Chemosensitization of androgen-independent prostate cancer with neutral endopeptidase. *Clinical Cancer Research.* 10, 260-266.
- Suzuki T., Kikkawa F., Ino k., Nagasaka T., Tamakoshi K. and Mizutani. (2001). Imbalance between neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-1 expression in human endometrial carcinoma. *Oncology.* 60, 258-267.
- Tamura T., Sadakata N., Oda T. and Muramatsu T. (2002). Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicology Letters.* 132, 141-151.
- Tan Z., Dohi S., Chen J., Banno Y. and Nozawa Y. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death. *Anesthesiology.* 96, 1191-1201.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tran-Paterson R., Boileau G., Giguère V. and Letarte M. (1990). Comparative levels of CALLA/Neutral Endopeptidase on normal granulocytes, leukemic cells, and transfected COS-1 cells. *Blood.* 76, No. 4, 775-782.
- Trougakos, I.P. and Gonos, E. S. (2002). Clueterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1430-1448.
- Unami A., Shinohara Y., Ichikawa T. and Baba Y. (2003). Biochemical and microarray analyses of bupivacaine-induced apoptosis. *J. Toxicol. Sci.* 28 (2), 77-



- 94.
- Usmani B. A., Shen R., Janaczko M. Papandreou C. N., Lee W-H., Nelson W. G., Nelson J. B. and Nanus D. M. (2000). Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers. *Clinical Cancer Research* 6, 1664-1670.
- Uzzo R. G., Leavis P., Hatch W., Gabai V. L., Dulin N., Zvartau N. and Kolenko V. M. (2002). Zinc inhibits Nuclear Factor- κ B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clinical Cancer Research*. 8, 3579-3583.
- Vadalouca A. and Kalfakakou V. (1999). Zinc and opioid catabolism: a promising new approach to analgesia. *The international monitor*. 11, No2, 3-8
- Vallee L. and Falchuk K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*. 78, No1, 79-118.
- VanLandingham JW, Fitch CA and Levenson CW, (2002). Zinc inhibits the nuclear translocation of the tumor suppressor protein p53 and protects cultured human neurons from copper- induced neurotoxicity. *Neuromolecular Medicine*. 1 (3), 171-182.
- Viard I, Wehrli P, Jornot L, Bullani R, Vechietti JL, Schifferli JA, Tschopp J, French LE. (1999) Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J Invest Dermatol*. 112, 290-296.
- Watjen W., Haase H., Biagioli M. and Beyersmann D. (2002). Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environment Health Perspectives*. 110, Suppl.5, 865-867.
- Wei Q., Wang J., Wang M. H., Yu F. and Dong Z. (2004). Inhibition of apoptosis by Zn²⁺ in renal tubular cells following ATP- depletion. *American Journal Physiological Renal Physiology*. 287 (3), F 492-500.
- Willett C. G., Shahsafi A., Graham S. A. and Sunday M. E. (1999). CD10/Neutral endopeptidase inhibition augments pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in hamsters treated with diethylnitrosamine and hypoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 21, 13-20.
- Wilson R. P., McLaughlin P. J., Lang C. M. and Zagon I. S. (2000). The opioid growth factor, [Met5]-enkephalin, inhibits DNA synthesis during recornification of mouse tail skin. *Cell Proliferation*. 33 (2), 63-73.
- Wollman Y., Blumberg S., Spungin A., Brenneman D. E., Fridkin M., Wollman J., Iaina A. and Gozes I. (2002). The increased proliferation of cultured neuroblastoma cells treated with vasoactive intestinal peptide is enhanced by simultaneous inhibition of neutral endopeptidase. *Regul Pept*. 108 (2-3), 175-177.
- Wong P., Taillefer D., Lakins J., Pineault J. Chader G. and Tenniswood M. (1994) Molecular characterization of human TRTM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*. 221, 917-925.
- Wu A.J., Park I.I., Zhaung L, Lee C. (2002) Response to a lethal dose of heat shock by a transient up-regulation of clusterin expression followed by down-regulation and apoptosis in prostate and bladder cancer cells. *Prostate*; 53: 277-285.
- Wyllie A. H., Morris R. G., Smith A. L. and Dunlop D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of pathology*. 142, 67-77.
- Xiao Y., Xiao D., He J. and Zhang L. (2001). Maternal cocaine administration during pregnancy induces apoptosis in fetal rat heart. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 37 (6), 639-648.
- Yang, C-R., Yeh, S., Leskov, K., Odegaard, E., Hsu, H-L., Chang, C., Kinsella, T. J., Chen, D. J. and Boothman D. (1999). Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs).

Nucleic Acids Res. 27, 2165-2174.

- Yang, C-R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J. and Boothman, D. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5907-5912.
- Yau T. M. and Kim S. C. (1980). Local anaesthetics as hypoxic radiosensitizers, oxic radioprotectors and potentiators of hyperthermic killing in mammalian cells. *British Journal of Radiology*. 53, 687-692.
- Zagon I. S., Wu Y. and McLaughlin P. J. (1996). The opioid growth factor, [Met⁵]-Enkephalin, and the ζ (Zeta) Opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit DNA synthesis in the epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 106, No. 3, 490-497.
- Zagon I. S., Wu Y. and McLaughlin P.J. (1999). Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos. *Brain Research*. 839 (2), 313-322.
- Zellweger T, Miyake H, July LV, Akbari M, Kiyama S, Gleave ME. (2001) Chemosensitization of human renal cell cancer using antisense oligonucleotides targeting the anti-apoptotic gene clusterin. *Neoplasia*. 3, 360-367.
- Zellweger T., Chi K., Miyake H., Adomat H., Kiyama S., Skov K. and Gleave M. E. (2002). Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the survival protein clusterin. *Clinical Cancer Research*. 8, 3276-3284.
- Zellweger T, Kiyama S, Chi K, Miyake H, Adolomat T, Skov K, Gleave ME. (2003). Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumor model. *BJU Int*. 92, 463-469.
- Zhang XW, Thorlacious H. (2000) Inhibitory actions of ropivacaine on tumor necrosis factor- α induced leukocyte adhesion and tissue accumulation in vivo. *Eur J Pharmacol*. 392, R1-3.
- Zhang S., Yao S. and Li Q. (2003) Effects of ropivacaine and bupivacaine on rabbit myocardial energetic metabolism and mitochondria oxidation. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci*. 23 (2), 178-179.
- Zink W., Seif C., Bohl J. R., Hacke N., Braun P. M., Sinner B., Martin E., Fink R. H. and Graf B. M. (2003). The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth. Analg*. 97(4), 1173-1179.
- Zwain I. and Amato P. (2000) Clusterin protects granulosa cells from apoptotic cell death during follicular atresia. *Experimental Cell Research*, 257, 101-110.

