



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΕ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

**ΜΑΡΙΑ ΜΕΛΙΔΟΥ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336969





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΕ
ΟΞΕΙΑΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

**ΜΑΡΙΑ ΜΕΛΙΔΟΥ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Μελίδου Μαρίας: 13-11-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 486^α/3-12-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ρηγανάκος Κυριάκος Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-12-2002

«Ο ρόλος της δέσμευσης των ιόντων σιδήρου στο μηχανισμό προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών σε κύτταρα που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 601^α/27-3-2007

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος	Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χήνου Ιωάννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών
Μπριασούλης Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ρηγανάκος Κυριάκος	Καθηγητής του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-5-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



*Στους γονείς μου Τζένη και Τάκη
Στα αδέρφια μου Λώρα, Γιάννα και Πάνο*

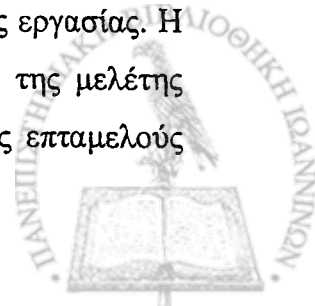


ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2001 με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων μελιών Ελληνικής προέλευσης, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις, που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες μελιού, καθώς και η απομόνωση των συστατικών του, τα οποία μελετήθηκαν για τη βιολογική τους δράση με την ευαίσθητη μέθοδο του “comet assay”. Στη συνέχεια η μελέτη επεκτάθηκε στη διερεύνηση του μηχανισμού της παρατηρούμενης προστασίας και για το λόγο αυτό εστιάστηκε στα πιο δραστικά συστατικά του μελιού, τα φλαβονοειδή. Τέλος, εκτός από την προστασία του κυτταρικού DNA, εξετάστηκε και ο μηχανισμός της προστασίας που προσφέρουν τα φλαβονοειδή ενάντια στην απόπτωση.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης, τον οποίο θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και για την υπομονή, την επιμονή και το αμείωτο ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για την πολύτιμη συμβολή του και για το ενδιαφέρον που έδειξε κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χημείας Τροφίμων κ Κυριάκο Ρηγανάκο, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, ο οποίος με καθοδήγησε στην προσεκτική επιλογή των φλαβονοειδών, τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Θα ήθελα επίσης να αναφέρω την πολύτιμη συμβολή της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακογνωσίας κ Ιωάννας Χήνου, που πέρα από μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, ήταν η Επιστημονική Υπεύθυνος του προγράμματος ΠΕΝΕΔ, το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, ήταν το έναυσμα για την εκκίνηση της παρούσας εργασίας. Η άψογη συνεργασία και το ενδιαφέρον της διευκόλυνε την περάτωση της μελέτης αυτής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς



εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Μ. Μαρσέλλο, τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Α. Ευαγγέλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Ογκολογίας κ. Ε. Μπριασούλη για τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Αμοργιανιώτη για την ηθική και τεχνική υποστήριξη, κυρίως όμως για την πολύτιμη φιλία του, καθώς και στη διδάκτορα Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη για τις χρήσιμες συμβουλές της και τη συμπαράσταση της. Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες αυτές τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες, κ. Λάμπρο Νούση, κα Μαργαρίτα Τενοπούλου, δρ. Άκη Δούλια, κα Ζωή Μητρογιάννη για τη συνεργασία που είχαμε και τη βοήθεια που μου προσέφεραν, καθώς και τα νέα μέλη της ομάδας κα Βασιλική Σκιαδά, κα Χαρά Βλάχου και κ Μιχάλη Μάντζαρη που συνεχίζουν, δείχνοντας έντονο ενδιαφέρον, τη διερεύνηση των ζητημάτων που με απασχόλησαν κατά την περάτωση της εργασίας αυτής. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κα Σταυρούλα Λιάσκα, η οποία στα πλαίσια της πτυχιακής της εργασίας, συνεργάστηκε άψογα μαζί μου και πραγματοποίησε τα πειράματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού της σιδηροδεσμευτικής ικανότητας των φλαβονοειδών, καθώς και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για τη βοήθειά τους στα διάφορα προβλήματα που παρουσιάστηκαν. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Αλέκα Γιαννάκη για την επιμέλεια της γλώσσας του κειμένου. Ευχαριστώ θερμά τον κ Νικόλαο Γεωργόπουλο για την κατανόηση και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε.

Τέλος, περισσότερο από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αδέρφια μου Λώρα, Γιάννα και Πάνο, και τους γονείς μου, Τζένη και Τάκη, για την συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη, χωρίς την οποία δεν θα κατάφερα να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

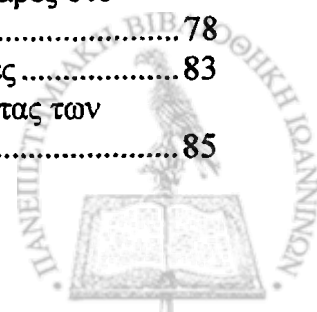


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ	i
ΠΙΝΑΚΕΣ	v
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	vi
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Διατροφή -Μέλι.....	3
1.1.1 Διατροφή και υγεία	3
1.1.2 Μεσογειακή διαίτα.....	4
1.1.2.1 Η παραδοσιακή Ελληνική διαίτα	4
1.1.2.2 Συστατικά της Μεσογειακής διαίτας	5
1.1.3 Η βιολογική σημασία του μελιού	6
1.1.4 Συστατικά του μελιού	7
1.2 Φλαβονοειδή.....	8
1.2.1 Γενικά.....	8
1.2.2 Περιεκτικότητα των τροφίμων φυτικής προέλευσης σε φλαβονοειδή	9
1.2.3 Φλαβονοειδή και υγεία	10
1.2.4 Απορρόφηση και μεταβολισμός των φλαβονοειδών.....	10
1.2.5 Βιολογική δράση των φλαβονοειδών	12
1.2.5.1 Φλαβονοειδή και βλάβη στο DNA	12
1.2.5.2 Φλαβονοειδή και απόπτωση	13
1.2.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών.....	14
1.2.7 Ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν μέταλλα.....	15
1.3 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες.....	17
1.3.1 Ιστορική αναδρομή.....	17
1.3.2 Ελεύθερες ρίζες.....	17
1.3.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.).....	19
1.3.4 Οξειδωτικό στρες.....	21
1.3.5 Βλαπτικές συνέπειες των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μακρομόρια	22
1.3.5.1 Υπεροξείδωση των λιπιδίων	23
1.3.5.2 Οξείδωση πρωτεϊνών	24
1.3.5.3 Βλάβες στο DNA	25
1.3.6 Υπεροξείδιο του υδρογόνου	26
1.3.6.1 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου.....	27
1.3.6.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου και μεταγωγή σήματος.....	29
1.3.6.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου και απόπτωση.....	31
1.4 Απόπτωση.....	33
1.4.1 Γενικά.....	33
1.4.2 Φυσιολογική σημασία της απόπτωσης	34



1.4.3 Η οικογένεια των κασπασών	34
1.4.3.1 Μηχανισμός ενεργοποίησης των κασπασών	35
1.4.3.2 Υποστρώματα εκτελεστικών κασπασών	38
1.4.3.3 Ρυθμιστικοί παράγοντες των κασπασών.....	39
1.4.4 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2	40
1.4.4.1 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2.....	42
1.4.4.2 Bax-like πρωτεΐνες.....	42
1.4.4.3 BH3- only πρωτεΐνες	43
1.5 Σκοπός της μελέτης.....	45
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	47
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
2.1 Υλικά	49
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων.....	52
2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	52
2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	52
2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων	53
2.2.4 Επώαση των κυττάρων	53
2.3 Μέθοδοι.....	55
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay)	55
2.3.2 Καθορισμός της ικανότητας εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών	58
2.3.3 Φασματοφωτομετρική ανάλυση της δέσμευσης σιδήρου από τα φλαβονοειδή	59
2.3.4 Μέτρηση δέσμευσης του ενδοκυττάρου σιδήρου	60
2.3.5 Βαφή πυρήνων με Hoechst	61
2.3.6 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA.....	62
2.3.7 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	64
2.3.8 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3	65
2.3.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	66
2.3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western.....	67
2.3.11 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων.....	69
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
3.1 Βιολογική δράση εκχυλισμάτων μελιού.....	71
3.1.1. Προστατευτική ικανότητα εκχυλισμάτων μελιών ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το H ₂ O ₂ στο πυρηνικό DNA	71
3.1.2. Προστατευτική ικανότητα απομονωμένων συστατικών του μελιού.....	75
3.2 Προστασία του πυρηνικού DNA από επιλεγμένα φλαβονοειδή.....	78
3.2.1. Προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες στο κυτταρικό DNA	78
3.2.2 Ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες	83
3.2.3 Φασματοφωτομετρική μελέτη της σιδηροδεσμευτικής ικανότητας των φλαβονοειδών	85



3.2.4. Δέσμευση σιδήρου και προστατευτική δράση	87
3.2.5 Ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν σίδηρο ενδοκυττάρια	89
3.2.6. Επίδραση της γλυκοσλίωσης των φλαβονοειδών στην προστατευτική τους ικανότητα	92
3.2.7 Τοξική δράση των φλαβονοειδών.....	94
3.3 Φλαβονοειδή και απόπτωση	97
3.3.1. Επίδραση των φλαβονοειδών στην απόπτωση που προκαλείται από το H ₂ O ₂	97
3.3.2 Επίδραση της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων από το H ₂ O ₂	102
3.3.3 Επίδραση της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3	104
3.3.4 Η λουτεολίνη προστατεύει από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C ...	106
3.3.5 Επίδραση της λουτεολίνης στην ρύθμιση της οικογένειας των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2.....	107
3.3.6 Προστατευτική δράση της λουτεολίνης έναντι στην αποσταθεροποίηση της λυσosomalικής μεμβράνης που προκαλείται από το H ₂ O ₂	111
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	114
4.1 Σύστημα μελέτης.....	114
4.2 Προστατευτική δράση του μελιού.....	115
4.3 Φλαβονοειδή και προστασία ενάντια στις βλάβες στο DNA.....	116
4.3.1.Συσχέτιση προστατευτικής δράσης και δομής των φλαβονοειδών	116
4.3.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών.....	118
4.3.3 Σιδηροδέσμευτική δράση των φλαβονοειδών	119
4.3.4 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης.....	121
4.3.5 Τοξική δράση των φλαβονοειδών.....	122
4.4 Φλαβονοειδή και απόπτωση	123
4.4.1 Γενικά.....	123
4.4.2 Προστατευτική δράση της λουτεολίνης ενάντια στην απόπτωση.....	123
4.4.3 Λυσοσωμάτια και απόπτωση.....	125
4.4.4 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης.....	126
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	129
6. SUMMARY	131
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133



ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1.** Βασική δομή ορισμένων υποομάδων των φλαβονοειδών.
- Σχήμα 2.** Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.
- Σχήμα 3.** Απεικόνιση των επιδράσεων του σταδιακά αυξανόμενου οξειδωτικού στρες σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες
- Σχήμα 4.** Αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στην υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων
- Σχήμα 5.** Οξειδωτικές τροποποιήσεις κατάλοιπων τυροσίνης από διαφορετικούς οξειδωτικούς παράγοντες.
- Σχήμα 6.** Οξειδωτική τροποποίηση της θυμίνης
- Σχήμα 7.** Διαγραμματική απεικόνιση της μιτοχονδριακής πορείας του αποπτωτικού θανάτου και τα υποστρώματα των κασπασών
- Σχήμα 8.** Αντιαποπτωτικά και προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας ογκοπρωτεϊνών Bcl-2. Σημειώνονται οι ομόλογες περιοχές (BH1-4), καθώς και το υδροφοβικό καρβοξυτελικό άκρο (TM)
- Σχήμα 9.** Τεταρτοταγής δομή της Bcl-X_L και του Bax
- Σχήμα 10.** Καταγραφή των διάφορων σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής του “comet assay” (A) και μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις (B)



Σχήμα 11. Χαρακτηριστικοί σχηματισμοί πυρήνων μετά από βαφή με Hoechst

Σχήμα 12. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων μελιών ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA.

Σχήμα 13. Χημικές δομές των απομονωμένων συστατικών του μελιού που μελετήθηκαν

Σχήμα 14. Δράση των απομονωμένων συστατικών από μέλι ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA.

Σχήμα 15. Χημική δομή των φλαβονοειδών που μελετήθηκαν

Σχήμα 16. Προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στη βλάβη του DNA

Σχήμα 17. Σύγκριση δομής και προστατευτικής λειτουργίας των φλαβονοειδών.

Σχήμα 18. Απουσία συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές TEAC (ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες) και τις τιμές IC_{50} (προστατευτική δράση ενάντια στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2) που αναγράφονται στον Πίνακα 3.

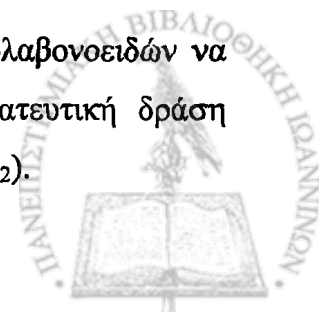
Σχήμα 19. Φασματοφωτομετρική μελέτη των φλαβονοειδών

Σχήμα 20. Δράση των συμπλόκων φλαβονοειδών: Fe^{2+} στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2

Σχήμα 21. Ενδοκυττάρια δέσμευση του σιδήρου από τα φλαβονοειδή

Σχήμα 22. Υπολογισμός τιμών EC_{50} των φλαβονοειδών.

Σχήμα 23. Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές EC_{50} (ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν το σίδηρο ενδοκυττάρια) και IC_{50} (προστατευτική δράση ενάντια στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2).



Σχήμα 24. Δομή και τιμές IC_{50} των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών που μελετήθηκαν

Σχήμα 25. Προστατευτική δράση των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών έναντι της βλάβης στο DNA σε σχέση με το χρόνο.

Σχήμα 26. Προστατευτική δράση των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών έναντι της βλάβης στο DNA σε σχέση με τη θερμοκρασία επώασης.

Σχήμα 27. Τοξική δράση των φλαβονοειδών

Σχήμα 28. Μοριακές δομές, τιμές IC_{50} και τιμές EC_{50} της λουτεολίνης και της απιγενίνης

Σχήμα 29. Συνέπειες της λουτεολίνης στη συμπύκνωση και τη θραυσματοποίηση των πυρήνων που προκαλεί το H_2O_2

Σχήμα 30. Συνέπειες της απιγενίνης στη συμπύκνωση και τη θραυσματοποίηση των πυρήνων που προκαλεί το H_2O_2

Σχήμα 31. Συνέπειες της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων του DNA που προκαλούνται από H_2O_2

Σχήμα 32. Συνέπειες της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από το H_2O_2

Σχήμα 33. Επιπτώσεις της λουτεολίνης στη σχάση της PARP, όταν προκαλείται από το H_2O_2

Σχήμα 34. Αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια από τη λουτεολίνη

Σχήμα 35. Συνέπειες της λουτεολίνης στη ρύθμιση της έκφρασης της Bcl-2 και της Bcl-XL από το H_2O_2



Σχήμα 36. Συνέπειες της λουτεολίνης στη μετατόπιση του Βαχ από το H_2O_2

Σχήμα 37. Επιπτώσεις της λουτεολίνης στη σχάση του Bid

Σχήμα 38. Αναστολή της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης από τη λουτεολίνη

Σχήμα 39. Προτεινόμενος μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης ενάντια στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικές Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Πίνακας 2. Φυτική προέλευση, γεωγραφική προέλευση, είδος διαλύτη και προστατευτική δράση εκχυλισμάτων μελιού

Πίνακας 3. Δομικά χαρακτηριστικά και τιμές IC_{50} , TEAC, EC_{50} και $LogP$ των φλαβονοειδών που μελετήθηκαν



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- Ac-DEVD-AMC:** Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin
- ALPS:** Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
- AO:** Acridine orange
- Apaf-1:** apoptotic-protease activating factor
- APS:** ammonium persulfate, υπερ-θειικό αμμώνιο
- ASK 1:** Apoptosis Signal-regulating kinase 1
- BIR:** baculovirus IAP repeat
- BSA:** Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός
- CARD:** caspase recruitment domain
- CAT:** Catalase, καταλάση
- CHAPS:** (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate
- ΔΜΟ:** Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
- DED:** Death Effector Domain
- DMSO:** Dimethyl Sulfoxide
- DFO:** Desferrioxamine mesilate, δεσφεριοξαμίνη
- DTT:** Διθειοθρεϊτόλη
- EDTA:** Ethylenetriamineteteraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ
- EGF:** Epidermal Growth Factor
- ERK:** Extracellular signal-regulated kinases
- FADD:** Fas associated death domain
- FACS:** Fluorescence Activated Cell Scanner
- FCS:** Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου
- GO:** Glucose oxidase, οξειδάση της γλυκόζης
- GP:** Περοξειδάση της γλουταθειόνης
- IAPs:** Inhibitors of Apoptotic Proteases
- ICAD:** Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease
- JNK:** c-Jun N-terminal kinases
- MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase
- MPTP:** mitochondrion permeability transition pore
- PARP:** poly (ADP-ribose) polymerase
- PBS:** Phosphate buffer saline



- PDGF:** Platelet Derived Growth Factor
- PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase
- PKC:** πρωτεϊνική κινάση C
- PMSF:** phenylmethyl sulfonyl fluoride
- Prx:** Περοξειρεδοξίνη
- RING:** really interesting new gene
- RIP:** receptor-interacting protein
- RPMI-1640:** Roswell Park Memorial Institute Media RPMI 1640
- SAPK:** Stress Activated Protein Kinases
- SDS:** Sodium dodecacyl sulphate, δωδεκύλοθειικό νάτριο
- SIH:** Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone
- SOD:** Superoxide Dismutase, δισμουτάση του σουπεροξειδίου
- STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription
- TEMED:** N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-
τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
- TNF- α :** Tumor Necrosis Factor- α
- TRADD:** TNF receptor associated death domain
- Tris:** Τρις-υδροξυμεθυλένο-διαμίνη
- Trolox:** 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Διατροφή -Μέλι

1.1.1 Διατροφή και υγεία

Η υγεία των ανθρώπων είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στη γενετική τους προδιάθεση και ενός αριθμού περιβαλλοντικών παραγόντων. Το ανθρώπινο γενετικό προφίλ δεν έχει διαφοροποιηθεί αισθητά τα τελευταία 10.000 χρόνια, ενώ αντιθέτως οι διατροφικές συνήθειες και η φυσική δραστηριότητα των ανθρώπων έχουν αλλάξει δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες. Οι σύγχρονες βιομηχανικές κοινωνίες χαρακτηρίζονται από την αύξηση της προσλαμβανόμενης ενέργειας από την τροφή, τη μείωση της φυσικής άσκησης, την αύξηση της πρόσληψης κεκορεσμένων λιπαρών οξέων, καθώς και τη μείωση κατανάλωσης υδατανθράκων, φυτικών ινών, ασβεστίου, φρούτων και λαχανικών (Eaton and Konner, 1985, Simopoulos, 1991, Simopoulos, 2001). Για τους παραπάνω λόγους, η συσχέτιση ανάμεσα στις διατροφικές συνήθειες και στην εμφάνιση πολλών ασθενειών προσέλκυσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και μελετήθηκε εντατικά.

Μία από τις πρώτες επιστημονικά εμπειριστατωμένες προσπάθειες, που έγιναν προς αυτή την κατεύθυνση, ήταν μία μελέτη, που ονομάστηκε μελέτη των «επτά χωρών» (Seven Country Study), και τα αποτελέσματα της οποίας δημοσιεύτηκαν το 1970. Η μελέτη αυτή αποσκοπούσε στη διερεύνηση της σχέσης της διατροφής με την ανάπτυξη διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων, των Ιταλών και των Ιαπώνων μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιακών νόσων (Keys, 1970). Έκτοτε μεγάλος αριθμός μελετών έχουν συσχετίσει τη διατροφή τόσο με την ανθρώπινη βιωσιμότητα, όσο και με συγκεκριμένες ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, οι χρόνιες παθήσεις, ο διαβήτης κ.α. (De Groot et al., 1996, Trichopoulou et al., 1995, Riboli et al., 2002, Willett et al., 1993, Jacques et al., 2001).



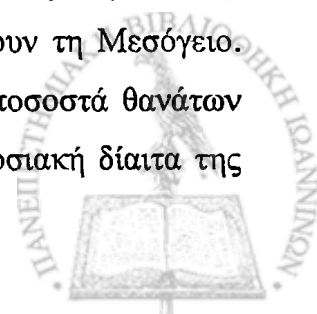
1.1.2 Μεσογειακή διαίτα

Παρά τα υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος και το λιγότερο αποτελεσματικό σύστημα υγείας των Μεσογειακών χωρών, σε σχέση με αυτό των πιο αναπτυγμένων χωρών της Δυτικής Ευρώπης και των ΗΠΑ, τα ποσοστά θανάτου των πληθυσμών της Μεσογείου από καρδιαγγειακές παθήσεις είναι πολύ χαμηλότερα. Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών των καρδιαγγειακών παθήσεων, υποδεικνύουν πως τα ποσοστά θνητότητας που οφείλονται σε αυτές, για το χρονικό διάστημα 1970-1995, ήταν 1,8-2,7% στο Ηνωμένο Βασίλειο, ενώ στην Ελλάδα και στην Ιταλία μόλις 0,5-1%. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε κατά κύριο λόγο στην παραδοσιακή διαίτα των λαών της Μεσογείου.

Ως Μεσογειακή διαίτα ορίζονται οι διατροφικές συνήθειες των πληθυσμών των χωρών, που περιβάλλουν τη Μεσόγειο. Τα διατροφικά χαρακτηριστικά της είναι η υψηλή κατανάλωση ελαιόλαδου, χορταρικών, δημητριακών, φρούτων και λαχανικών, η μέτρια με υψηλή κατανάλωση ψαριών, η μέτρια κατανάλωση κρασιού και γαλακτοκομικών και η χαμηλή -κατανάλωση κρεάτων. Πολλές μελέτες διαπίστωσαν τις ευεργετικές επιδράσεις της Μεσογειακής διαίτας τόσο στη επιβίωση (Trichopoulou et al., 2005) και τη γήρανση (Battino and Ferreiro, 2004), όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ανάπτυξη και η εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου (Panagiotakos et al., 2004), οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Ferria and Grassib, 2003, Lorgeril and Salen, 2000), ο καρκίνος (Martinez-Gonzalez and Estruch, 2004), ο διαβήτης (Biesalski, 2004), η αθηροσκλήρωση (Kok and Kromhout, 2004) και η νόσος Αλτσχάιμερ (Steele et al., 2006).

1.1.2.1 Η παραδοσιακή Ελληνική διαίτα

Πρόσφατες έρευνες των μοντέλων διατροφής και της κατάστασης της υγείας των πληθυσμών των χωρών, που περιβάλλουν τη Μεσόγειο, υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς των διαφόρων χωρών. Για το λόγο αυτό ο όρος «Μεσογειακή διαίτα» δεν είναι απόλυτα ακριβής. Στην ουσία δεν υπάρχει απλώς μία Μεσογειακή διαίτα, αλλά διαφορετικά είδη Μεσογειακής διαίτας, τα οποία ποικίλλουν ανάλογα με τις θρησκευτικές και πολιτιστικές παραδόσεις, καθώς και την οικονομική κατάσταση των χωρών, που περιβάλλουν τη Μεσόγειο. Από όλες τις περιοχές της Μεσογείου καμία δεν είχε μικρότερα ποσοστά θανάτων από την Κρήτη. Η διαίτα της Κρήτης αντιπροσωπεύει την παραδοσιακή διαίτα της



Ελλάδας πριν από το 1960 και χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες, αντιοξειδωτικά και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Simopoulos, 2001). Αντιθέτως οι δίαιτες των Δυτικών χωρών, καθώς και η σύγχρονη Ελληνική διαίτα, απομακρύνονται από τα πρότυπα αυτά και συσχετίζονται ολοένα και περισσότερο με αύξηση στις καρδιαγγειακές παθήσεις, στην παχυσαρκία και στον καρκίνο.

1.1.2.2 Συστατικά της Μεσογειακής διαίτας

Τα ευεργετικά αποτελέσματα της Μεσογειακής διαίτας αποδόθηκαν κατά κύριο λόγο στην αυξημένη κατανάλωση ορισμένων τροφίμων, τα οποία υπήρχαν σε χαμηλές ποσότητες ή ακόμη και απουσίαζαν από τις διατροφικές συνήθειες άλλων περιοχών. Το κύριο συστατικό της Μεσογειακής διαίτας είναι το ελαιόλαδο, το οποίο αποτελεί το βασικό και σε ορισμένες περιπτώσεις το αποκλειστικό μαγειρικό λίπος (Serra-Majema et al., 2004). Η ευεργετική δράση του αποδίδεται συχνότερα στην υψηλή του περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ειδικότερα σε ολεϊκό οξύ, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη μείωση της χοληστερίνης (Hegsted et al., 1993, Mensink et al., 2003). Επιπλέον τόσο το ελαιόλαδο όσο και οι ελιές είναι πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν εξεταστεί εκτενώς για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Visioli and Galli, 1994, Visioli and Galli, 2003, Nouis et al., 2006).

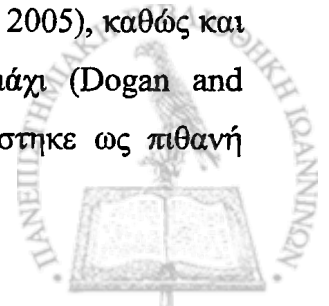
Η καθημερινή κατανάλωση κόκκινου κρασιού, τομάτας, άγριων χορταρικών και βοτάνων αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διαίτας (Visioli et al., 2005, Trichopoulou et al., 2000). Η ανάλυση των συστατικών των τροφίμων αυτών, και η αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων καταδεικνύουν την πιθανότητα, οι ευεργετικές επιδράσεις τους να οφείλονται στον μεγάλο αριθμό φαινολικών ή άλλων συστατικών (π.χ. φλαβονοειδή, καροτενοειδή, κ.α.), που αυτά περιέχουν (Stahl and Sies, 1996, Johnson, 2002, Rao and Rao 2004). Ίσως ένα από τα πιο υποτιμημένα συστατικά της Μεσογειακής διαίτας είναι το μέλι, το οποίο αποτελεί τη βασική γλυκαντική ουσία και καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες από τους λαούς της Μεσογείου. Ιδιαίτερα στην Ελλάδα πριν από το 1960 το μέλι, πέρα από στοιχείο του πρωινού γεύματος, αποτελούσε συστατικό ιδιαίτερα εύγευστων φαγητών και γλυκισμάτων.



1.1.3 Η βιολογική σημασία του μελιού

Τα προϊόντα της μέλισσας και ιδιαίτερα το μέλι, είχαν μια συνεχή παρουσία σ' όλες της περιόδους της ανθρώπινης ιστορίας. Αρχαίοι λαοί, όπως οι Αιγύπτιοι, οι Ασσύριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Σουμέριοι, και οι Χετταίοι, είχαν εντάξει το προϊόν στη διατροφή τους ως θεραπευτικό και φαρμακευτικό μέσο. Στις ανασκαφές της Φαιστού βρέθηκαν πήλινες κυψέλες της Μινωικής εποχής (3.400 π.Χ.), ενώ η πρώτη γραπτή μαρτυρία, που αποδεικνύει τη χρήση του μελιού, αλλά και τις θεϊκές ιδιότητες που του απέδιδαν, προέρχεται από την Πινακίδα της Κνωσού και χρονολογείται τον 14^ο αιώνα π.Χ. Στους μετέπειτα χρόνους η συχνή χρήση του μελιού θεωρείται απαραίτητη για την «ευζωία» και τη «μακροζωία» του ανθρώπου. Ο Ιπποκράτης αναφέρει ότι το μέλι κάνει πιο ζωηρό το χρώμα του ανθρώπου, ενώ ο Πυθαγόρας διαπιστώνει ότι το μέλι εξαφανίζει την κόπωση. Ο Δημόκριτος, ο οποίος έζησε περισσότερα από 110 χρόνια, απέδωσε τη μακροβιότητά του στο μέλι, λέγοντας ότι το προϊόν αυτό βοηθά το μεσήλικα να διατηρεί νεανικό σφρίγος. Σήμερα το μέλι έχει καθιερωθεί μαζί με μια σειρά άλλων προϊόντων στη Μεσογειακή διαίτα, η οποία αναγνωρίζεται σε διεθνές επίπεδο ως παράγοντας υγείας και μακροζωίας. Η Ελλάδα, μαζί με την Ισπανία και τη Γαλλία, είναι οι χώρες με τον μεγαλύτερο αριθμό μελισσιών στην Ευρώπη και οι μοναδικές αυτάρκειες χώρες της Κοινότητας σε μέλι. Μάλιστα η Ελλάδα έχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα μελισσιών ανά μονάδα εδάφους σε όλη την Ευρώπη.

Μεγάλος αριθμός σύγχρονων ερευνητικών εργασιών πραγματεύεται την αξιολόγηση των βιολογικών ιδιοτήτων του μελιού. Έχει μελετηθεί η *in vitro* αντιμικροβιακή δράση μελιών σε σειρά παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων (El-Arab et al., 2006) και διαπιστώθηκε ότι το καθιστά ισχυρό επουλωτικό μέσο ενάντια στις πληγές και στα εγκαύματα (Bergman et al., 1983, Subrahmanyam, 1993, Subrahmanyam, 1996, Meda et al., 2004). Παράλληλα με τη χρήση του για τις επουλωτικές του ιδιότητες, το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική θεραπεία σε διαφορές κλινικές καταστάσεις, οι οποίες ποικίλλουν από γαστροεντερικές ως και οφθαλμολογικές παθήσεις. Έχουν μελετηθεί πειραματικά οι θεραπευτικές ικανότητες του μελιού ενάντια στην κολίτιδα (Bilsel et al., 2002), στην ανάπτυξη του βακτηρίου της *Salmonella* σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Alnaqdy et al., 2005), καθώς και στη βλάβη που μπορεί να προκαλέσει η αιθανόλη στο στομάχι (Dogan and Kolankaya, 2005). Επιπλέον τα τελευταία χρόνια το μέλι εξετάστηκε ως πιθανή



θεραπεία σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν καρδιακές παθήσεις και εποχιακές αλλεργίες.

1.1.4 Συστατικά του μελιού

Οι ευεργετικές επιδράσεις του μελιού αποδίδονται στα συστατικά που αυτό περιέχει. Το μέλι είναι ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο φυσικό προϊόν και έχει αναφερθεί ότι περιέχει περίπου 180 διαφορετικές ουσίες, στις οποίες περιλαμβάνονται αμινοξέα, βιταμίνες, φαινολικές ενώσεις, μέταλλα, καθώς και διάφορα ένζυμα. Η χημική σύσταση του μελιού διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυτική του προέλευση, ενώ στη διαφοροποίηση αυτή παίζουν ρόλο και εποχιακοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και η διαδικασία παραγωγής του. Κατά μέσο όρο αποτελείται από 38,8 % φρουκτόζη, 30,31 % γλυκόζη, 1,3 % σουκρόζη, 17,2 % νερό και 0,169 % μέταλλα. Από τα μέταλλα τα κυριότερα είναι ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγνήσιο και ο σίδηρος (White, 1979).

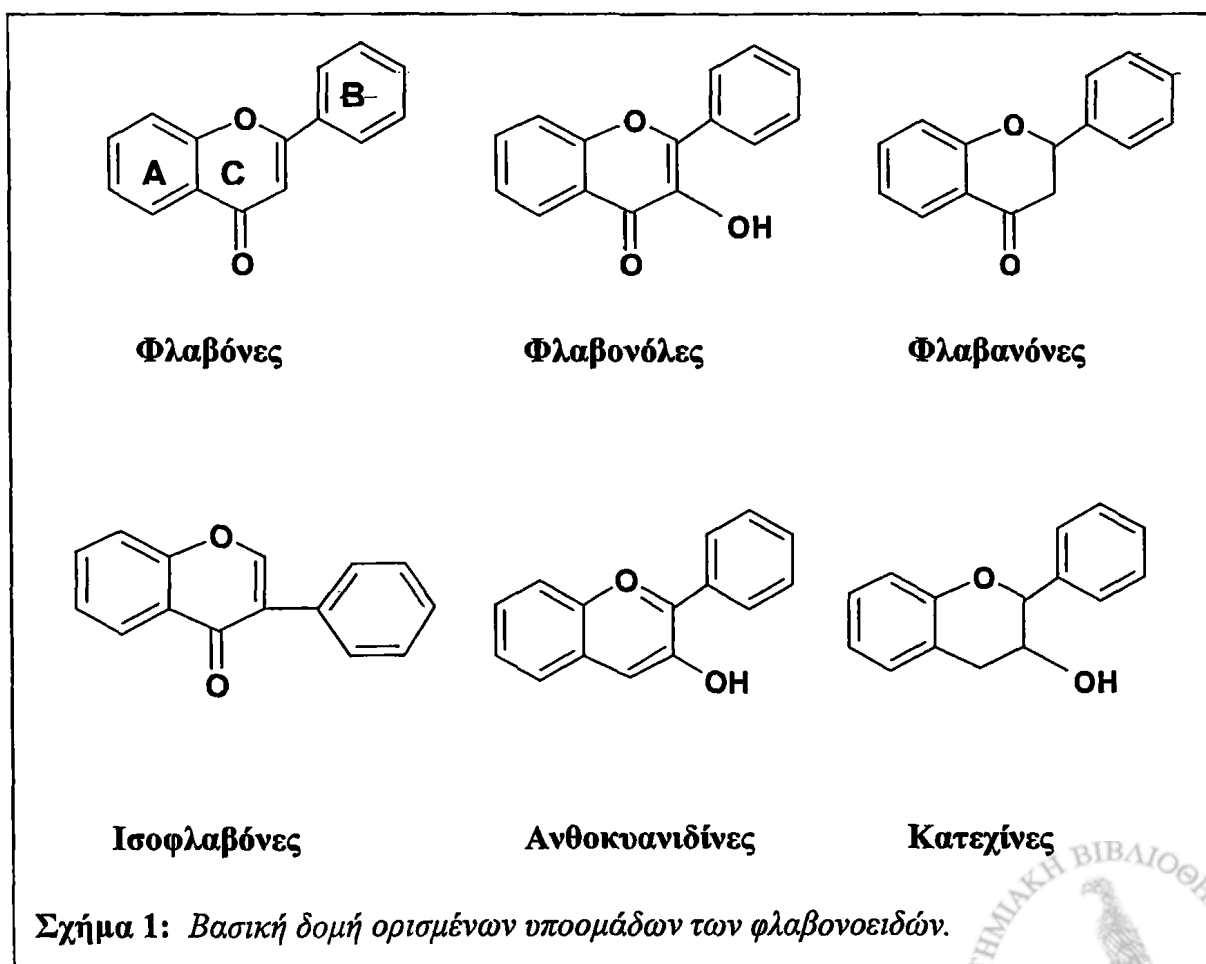
Στην προσπάθεια αναζήτησης αντικειμενικών μεθόδων που να χαρακτηρίζουν τη φυτική, αλλά και τη γεωγραφική προέλευση του κάθε μελιού, διαπιστώθηκε πως η παρουσία πολυφαινολικών ουσιών και ειδικότερα φλαβονοειδών, εξυπηρετεί στον ποιοτικό τους χαρακτηρισμό. Ως συνέπεια των παραπάνω, πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στην ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση των φλαβονοειδών που εμπεριέχονται σε μέλια διαφορετικής φυτικής αλλά και γεωγραφικής προέλευσης. Διαπιστώθηκε πως φλαβονοειδή όπως η μυρικετίνη, η λουτεολίνη, η πινοκεμπρίνη και η χρυσίνη, υπήρχαν σε σημαντικά ποσοστά στο μέλι (Martos et al., 2000a, Martos et al., 2000b, Yao et al., 2004). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις αναφορές για τις ευεργετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών, οδήγησε στην υπόθεση πως αποτελούν τα κύρια βιοδραστικά συστατικά του μελιού (Gheldof et al., 2002, Schramm et al., 2004). Η πληθώρα των ενδείξεων για τον κεντρικό ρόλο των φλαβονοειδών στις επιπτώσεις της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία, μας ώθησε σε μια εις βάθος μελέτη των μοριακών μηχανισμών, μέσω των οποίων δρουν οι ενώσεις αυτές, σε ανέπαφα κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες.



1.2 Φλαβονοειδή

1.2.1 Γενικά

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικά παράγωγα, που εκτός από το μέλι, απαντώνται με μεγάλη συχνότητα σε όλες τις τροφές φυτικής προέλευσης. Πρόκειται για μια από τις πιο πολυάριθμες και διαδεδομένες ομάδες φυσικών συστατικών, ενώ έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 2% του ολικού άνθρακα, που φωτοσυντίθεται στα φυτά, μετατρέπεται σε φλαβονοειδή ή παρόμοια συστατικά. Η βασική τους δομή αποτελείται από ένα βενζολικό δακτύλιο (A), ο οποίος είναι συμπυκνωμένος με έναν διυδροπυρανονικό δακτύλιο (C), που στη θέση 2 έχει έναν φαινολικό δακτύλιο (B) ως υποκαταστάτη (Σχήμα 1). Παραλλαγές στον ετεροκυκλικό αυτό σκελετό τα διαχωρίζει σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, κατεχίνες, ανθοκυανιδίνες, καθώς και ποικίλες άλλες ομάδες. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 8.500 διαφορετικά φλαβονοειδή, ενώ θεωρητικά ο αριθμός τους ξεπερνά τις 8 εκατομμύρια ενώσεις.



1.2.2 Περιεκτικότητα των τροφίμων φυτικής προέλευσης σε φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή υπάρχουν σε όλα τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης κυρίως με τη μορφή γλυκοσιλωμένων μορίων. Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα διαφόρων τροφίμων σε φλαβονοειδή, αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες ποιοτικού και ποσοτικού χαρακτηρισμού τους, οι οποίες ως επί των πλείστων βασίζονται στην τεχνική HPLC (Merken and Beecher, 2000). Οι αναλύσεις, που πραγματοποιήθηκαν σε φρούτα και λαχανικά, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι περιέχουν μεγάλη ποικιλία γλυκοσιλωμένων φλαβονοειδών, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνουν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. το κρεμμύδι περιέχει 284-486 mg κερκετίνης ανά kg, ενώ το λάχανο 211 mg κεμπερόλης ανά kg) (Hertog et al., 1992). Στο τσάι εντοπίζονται κυρίως κατεχίνες και φλαβονόλες (Wang et al., 2000), ενώ το κόκκινο κρασί περιέχει φλαβονοειδή, που ανήκουν στις υποομάδες των φλαβονολών, των προκυανιδίων και των ανθοκυανιδίων (Dreosti, 2000). Οι καρποί του κακαόδεντρου είναι πλούσιοι σε πολυφαινόλες, εκ των οποίων το 60% είναι φλαβονοειδή (Waterhouse et al., 1996). Όσον αφορά στο μέλι, η περιεκτικότητά του σε φλαβονοειδή κυμαίνεται από ποικιλία σε ποικιλία μελιού και μπορεί να φτάσει ως και τα 10 mg ανά kg προϊόντος (Gheldof et al., 2002).

Μεγάλος αριθμός παρόμοιων μελετών σε διάφορες κατηγορίες φρούτων και λαχανικών οδήγησε στη δημιουργία τραπεζών πληροφοριών, που περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών σε πάρα πολλά προϊόντα φυτικής προέλευσης (Hempel and Böhm, 1996, Häkkinen et al., 1999). Σκοπός της προσπάθειας αυτής ήταν να υπολογιστεί η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών από τον άνθρωπο. Μια τέτοια απόπειρα πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του Hertog, η οποία κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέση πρόσληψή τους από τον άνθρωπο ήταν 23 mg ημερησίως (Hertog et al., 1993). Η έρευνα αυτή αφορούσε τους κατοίκους της Δανίας, στην περίπτωση της Μεσογείου όμως, η υψηλή κατανάλωση και η μεγαλύτερη ποικιλία φρούτων και λαχανικών, η συχνή κατανάλωση κόκκινου κρασιού και μελιού, καθώς και η χρήση άγριων χορταρικών, των οποίων η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή δεν έχει καθοριστεί ακόμη, σίγουρα πολλαπλασιάζει την ημερήσια προσλαμβανόμενη ποσότητα. Είναι φανερό ότι ο προσδιορισμός της ακριβούς πρόσληψης των φλαβονοειδών από τον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελεί ιδιαίτερα πολύπλοκο θέμα, αφού διαφοροποιείται ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες του κάθε ατόμου.

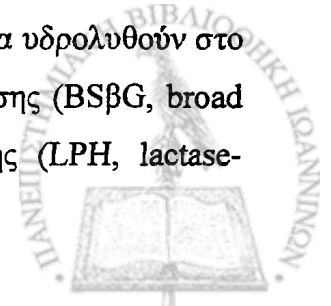


1.2.3 Φλαβονοειδή και υγεία

Το τεράστιο ενδιαφέρον, που αναπτύχθηκε γύρω από αυτή την ομάδα ενώσεων, οφείλεται σε μία σειρά από επιδημιολογικές μελέτες που συσχέτισαν την υψηλή κατανάλωση φλαβονοειδών με τη μείωση εμφάνισης διάφορων ασθενειών (Birt et al., 2001). Μια πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 878 άτομα, τα οποία παρακολούθηθηκαν για 25 χρόνια. Η μελέτη αυτή προσπάθησε να συσχετίσει την πρόσληψη 5 διαφορετικών φλαβονοειδών με την πιθανότητα εμφάνισης διάφορων ειδών καρκίνου (Hertog et al., 1994). Παρά το γεγονός ότι δεν εμφανίστηκε συσχέτιση ανάμεσα στον καρκίνο και την πρόσληψη φλαβονοειδών, διαπιστώθηκε μείωση της θνητότητας από στεφανιαία νόσο κατά 25 % στα άτομα με υψηλή πρόσληψη σε φλαβονοειδή (Hertog et al., 1995). Μια πιο πρόσφατη και μεγαλύτερης κλίμακας μελέτη στη Φινλανδία, η οποία παρακολούθησε άτομα από το 1967 έως και το 1991, απέδειξε την αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και την πιθανότητα καρκίνου του πνεύμονα, του στομάχου και του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν πιο εμφανή στους μη καπνιστές κάτω των 50 ετών, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της μείωσης του καρκίνου με άλλα φυσικά συστατικά όπως οι βιταμίνες E και C, καθώς και το β-καροτένιο (Knekt et al., 1997).

1.2.4 Απορρόφηση και μεταβολισμός των φλαβονοειδών

Η βιολογική πορεία των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών αποτέλεσε αντικείμενο εντατικής επιστημονικής έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ο ακριβής μηχανισμός απορρόφησής τους από τον ανθρώπινο οργανισμό υπήρξε θέμα αντιπαράθεσης, με ορισμένους ερευνητές να υποστηρίζουν ότι τα γλυκοσιλιωμένα φλαβονοειδή μπορούν να απορροφηθούν άμεσα από το λεπτό έντερο (Hollman et al., 1995). Η ανίχνευση των φλαβονοειδών ως γλυκοσίδια στο ανθρώπινο πλάσμα (Paranga and Rice-Evans, 1997) ενισχύει την υπόθεση αυτή. Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε πως η αποτελεσματικότητα μιας τέτοιας απορρόφησης μειώνεται σημαντικά από την «επιστροφή» των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών πίσω στο λεπτό έντερο μέσω πρωτεϊνών-μεταφορέων (Walgren et al., 2000). Παράλληλα αποδείχτηκε ότι ορισμένα γλυκοσιλιωμένα φλαβονοειδή μπορούν να υδρολυθούν στο λεπτό έντερο από ένζυμα, όπως η β-γλυκοσιδάση γενικής ειδικότητας (BSβG, broad specific β-glucosidase) και η υδρολάση-λακτάση της φλοριζίνης (LPH, lactase-



phlorizin hydrolase) (Day et al., 1998, Day et al., 2000, Walle, 2004). Πρόσφατα πειράματα σε αρχικό στάδιο υποστηρίζουν, ότι τα γλυκοσιλωμένα φλαβονοειδή μπορούν να υδρολυθούν ακόμη και στην στοματική κοιλότητα. Από τα παραπάνω προκύπτει, πως το πλέον πιθανό είναι ότι τα φλαβονοειδή απορροφούνται στην άγλυκη μορφή τους κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα.

Μία από τις πρώτες μελέτες για την βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών αφορούσε στην άγλυκη μορφή της κερκετίνης και υπολογίστηκε, ότι ο χρόνος ημιζωής της στους ανθρώπους είναι 2,4 ώρες (Gugler et al., 1975). Χρησιμοποιώντας πιο εξειδικευμένες μεθόδους ανάλυσης, όπως η HPLC, διαπιστώθηκαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις της κερκετίνης στο πλάσμα, με τη μορφή κυρίως γλουκουρονιωμένων, σουλφωλιωμένων και, σε μικρότερο βαθμό, άγλυκων μορίων της (Erlund et al., 2000, Walle et al., 2001). Η ανίχνευση αυτών των παραγώγων των φλαβονοειδών οδήγησε στη μελέτη του μεταβολισμού τους. Αρχικά υπήρχε η θεωρία, πως ο μεταβολισμός των φλαβονοειδών στον οργανισμό, σε αναλογία με τα διάφορα φάρμακα και τις ξενοβιοτικές ενώσεις, πραγματοποιούταν από τα ισοένζυμα της μεταβολικής φάσης I, CYP (cytochrome P450). Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε από τους Otake et al., οι οποίοι μελέτησαν το μεταβολισμό των φλαβονοειδών σε ανθρώπινα ηπατικά μικροσωμάτια (Otake et al., 2001). Πέρα όμως από τον οξειδωτικό μεταβολισμό τους, τα φλαβονοειδή υπόκεινται και σε σύζευξη με διάφορα υδατοδιαλυτά μόρια, ακολουθώντας την μεταβολική φάση II (Pong Ng et al., 2005). Διαπιστώθηκε πως κάποια ισοφλαβονοειδή ανιχνεύτηκαν με τη μορφή μονογλουκουριωμένων και σουλφωριωμένων μορίων στα ανθρώπινα ούρα (Adlercreutz et al., 1995), ενώ η κερκετίνη ανιχνεύτηκε με τη γλουκουριωμένη της μορφή στο πλάσμα ποντικών (Moon et al., 2001). Ένα διαφορετικό είδος μεταβολισμού των φλαβονοειδών είναι η μεθυλίωσή τους από ένα υδατοδιαλυτό ένζυμο την κατεχολική-*O*-μεθυλοτρανσφεράση (Ichihyanagi et al., 2004). Τέλος αναφέρθηκε ότι η έκθεση δερματικών ινοβλαστών σε κερκετίνη οδήγησε στο σχηματισμό δύο νέων ενδοκυττάρων μεταβολιτών, της 2'-γλουταθειονυλοκερκετίνης και ενός προϊόντος παρόμοιας δομής (Spencer et al., 2003).



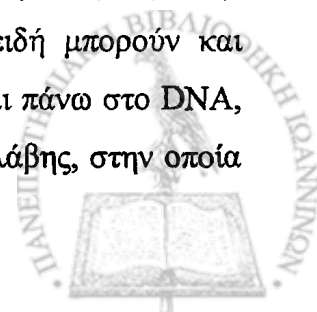
1.2.5 Βιολογική δράση των φλαβονοειδών

Οι επιδημιολογικές μελέτες είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ενδιαφέροντος για τα φλαβονοειδή και τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα. Αυτό είχε σαν συνέπεια τη δημοσίευση μιας πληθώρας εργασιών, που μελετούν τη δράση των ενώσεων αυτών ενάντια σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, οι αλλεργίες, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι ιϊκές λοιμώξεις, οι φλεγμονές κ.α. (Birt et al., 2001, Agarwal et al., 2000, Middleton et al., 1992, Fotsis et al., 1997, Davis et al., 2001).

Οι μελέτες αυτές συνοδεύτηκαν από μεγάλο αριθμό προτάσεων σχετικά με το μηχανισμό δράσης των φλαβονοειδών, ο οποίος όμως παρόλα αυτά παραμένει εν πολλοίς άγνωστος. Έτσι έχει προταθεί ότι η δράση τους οφείλεται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Rice-Evans et al., 1996, Ishige et al., 2001, Lemanska et al., 2001), στην ικανότητά τους να δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης (Borsari et al., 2001, Kostyuk et al., 2001, Mira et al., 2002, Fernandez et al., 2002), στην ικανότητά τους να αναστέλλουν ένζυμα (Laughton et al., 1991, Sies et al., 1995), στο ρόλο τους στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος (Peet et al., 1999, Agarwal et al., 2000, Schroeter et al., 2002, Spencer et al., 2003, O'Prey et al., 2003, Williams et al., 2004), καθώς και σε ποικίλες άλλες δράσεις.

1.2.5.1 Φλαβονοειδή και βλάβη στο DNA

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις, ότι οι βλάβες στο DNA συμβάλλουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Αρκετοί ερευνητές μελέτησαν την επίδραση των φλαβονοειδών στην πρόκληση βλαβών στο DNA από διάφορους παράγοντες. Το 1998 η ερευνητική ομάδα του Noroozi έδειξε, πως ορισμένα φλαβονοειδή μπορούσαν να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από τις βλάβες που προκαλούσε η προσθήκη του H₂O₂, και απέδωσαν την προστασία αυτή στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες (Noroozi et al., 1998). Η παρατήρηση αυτή πυροδότησε μια σειρά από νέες μελέτες, για την αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών έναντι στη βλάβη του DNA, με ποικίλες μεθόδους (Yoshikawa et al., 2004, Horvathova et al., 2004). Οι Anderson et al. υποστήριξαν πως παράλληλα με την ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, τα φλαβονοειδή μπορούν και προσφέρουν άτομα H⁺ στις θέσεις ελεύθερων ριζών που βρίσκονται πάνω στο DNA, με αποτέλεσμα την ταχεία χημική επιδιόρθωση της οξειδωτικής βλάβης, στην οποία

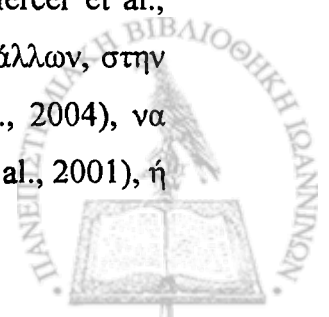


αυτό υπόκειται (Anderson et al., 2000). Μια άλλη προσέγγιση του θέματος αυτού έγινε από την ερευνητική ομάδα του Sestili, η οποία υποστήριξε πως η προστατευτική δράση της κερκετίνης ενάντια στη βλάβη του DNA οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο (Sestili et al., 1998). Τέλος υπήρξαν κάποιες επιστημονικές ομάδες, που αμφισβήτησαν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στη βλάβη του DNA (Adherme and O'Brien, 2000), ενώ αρκετοί ήταν εκείνοι, οι οποίοι έδωσαν βάρος στην ικανότητα των φλαβονοειδών να προκαλούν βλάβη στο DNA απουσία κάποιου άλλου οξειδωτικού παράγοντα (Da Silva et al., 2002, Suzuki et al., 2004).

1.2.5.2 Φλαβονοειδή και απόπτωση

Η απόπτωση ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, όπως περιγράφεται εκτενώς παρακάτω (ενότητα 1.4), εμπλέκεται σε ποικίλες καταστάσεις, που έχουν σχέση με την ομοιοστασία των κυττάρων. Υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών, που διερευνούν την πρόκληση της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων από τα φλαβονοειδή, και προσπαθούν να εμβαθύνουν στον μηχανισμό δράσης τους (Shen et al., 2003, Chen et al., 2003, Hsu et al., 2004, Kuo et al., 2004, Ye et al., 2005, Matsui et al., 2005, Elsisi et al., 2005, Way et al., 2005). Ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης της απόπτωσης από τα φλαβονοειδή αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης, αφού είναι πιθανό η προαποπτωτική τους ικανότητα να αποτελεί τη βάση της αντικαρκινικής τους δράσης. Προτάθηκε, πως η προαποπτωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητά τους να δρουν ως αναστολείς κινασών (Yin et al., 1999, Lee et al., 2002), να ανάγουν τον Fe^{+3} σε Fe^{+2} , προάγοντας έτσι την παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου (Nakagawa et al., 2002), καθώς και να μεταβάλλουν την έκφραση μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (Lee et al., 2002). Άλλη μελέτη υποστηρίζει πως η υδροξυλίωση στις θέσεις 4' ή 6 της βασικής δομής των φλαβονοειδών είναι απαραίτητη για την προαποπτωτική δράση των φλαβονοειδών και προτείνει ως μηχανισμό δράσης τους την παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου, μέσω ενεργοποίησης της οξειδάσης της ξανθίνης (Ko et al., 2004).

Εξίσου σημαντική είναι η ικανότητα των φλαβονοειδών να προστατεύουν από την απόπτωση, αλλά παρόλα αυτά η βιβλιογραφία, όσον αφορά στο θέμα αυτό, είναι σαφώς πιο περιορισμένη (Bastianetto et al., 2000, Choi et al., 2004, Mercer et al., 2005). Η αντιαποπτωτική δράση των φλαβονοειδών αποδόθηκε, μεταξύ άλλων, στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες (Samhan-Arias et al., 2004), να ρυθμίζουν κάποιες από τις MAP κινάσες, όπως είναι η JNK (Schroeter et al., 2001), ή



η ERK (Lee et al., 2005), καθώς και να επηρεάζουν την έκφραση ορισμένων αντιοξειδωτικών ένζυμων (Kanno et al., 2003). Οι Lee et al. απέδειξαν ότι η βαϊκαλεΐνη προστατεύει από την απόπτωση, που προκαλεί η ciplastin και υπέδειξαν ως πιθανό μηχανισμό προστασίας την αναστολή της έκφρασης του Bax, ενώ υποστήριξαν πως είναι πιθανό να ανταγωνίζεται τις θέσεις πρόσδεσης του ATP, σε πρωτεΐνες όπως είναι η διαμεμβρανική ATPάση και η πρωτεϊνική κινάση A (Lee et al., 2005).

1.2.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών

Η χημική δομή των φλαβονοειδών είναι τέτοια ώστε να ευνοεί την ικανότητά τους να δρουν ως εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών, μιας και τα δυναμικά αναγωγής των ελεύθερων ριζών των φλαβονοειδών είναι χαμηλά (0,23-0,75 V) επιτρέποντας θερμοδυναμικά την αναγωγή των ελεύθερων ριζών αλκοξειδίου, υδροξυλίου, καθώς και του ανιόντος του σουπεροξειδίου, που έχουν υψηλότερα δυναμικά αναγωγής (1,00-2,13 V) (Pietta, 2000). Κατά συνέπεια οι περισσότεροι ερευνητές αποδίδουν τις σημαντικές ευεργετικές δράσεις των φλαβονοειδών στην ικανότητά τους να δρουν ως εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών, την οποία όμως αναφέρουν απλώς ως αντιοξειδωτική ικανότητα (Rice-Evans et al., 1996, Ishige et al., 2001, Lemanska et al., 2001).

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες αξιολογήθηκε *in vitro* με ποικίλες μεθόδους, που βασίζονται στην παραγωγή μιας σχετικά σταθερής ελεύθερης ρίζας σε υδατικό περιβάλλον και την ανίχνευση της συγκέντρωσής της φωτομετρικά. Ο μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών οδήγησε στην αναζήτηση της συσχέτισης της δομής τους με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. (van Acker et al., 1996, Rice-Evans et al., 1996, Cotelle et al., 1996, Lien et al., 1999, Silva et al., 2002). Οι έρευνες αυτές κατέληξαν σε ορισμένα κριτήρια, που πρέπει να πληρεί ένα φλαβονοειδές, προκειμένου να είναι αποτελεσματικός εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών. Τα κριτήρια αυτά είναι: α) η παρουσία της όρθο-διυδροξυ δομής στο δακτύλιο B, η οποία σταθεροποιεί τη φαινολική ελεύθερη ρίζα, β) η παρουσία του 2,3-διπλού δεσμού σε συνδυασμό με την 4-όξο δομή στο δακτύλιο C, ο οποίος συμβάλλει στην κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας βελτιώνοντας έτσι το αντιοξειδωτικό δυναμικό της ουσίας, και γ) η παρουσία του 3- ή του 5- υδροξυλικού υποκαταστάτη σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση η οποία θεωρείται απαραίτητη για να

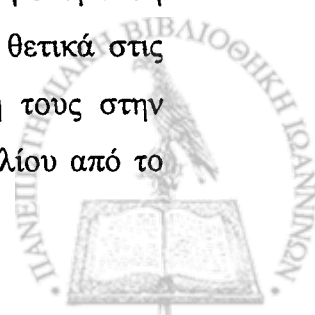


προσδίδεται η μέγιστη αποτελεσματικότητα στην εκκαθάριση ελεύθερων ριζών (Rice-Evans et al., 1996).

1.2.7 Ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν μέταλλα

Ένας διαφορετικός μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών, ο οποίος παρά τη μεγάλη του σημασία, συνήθως δε λαμβάνεται υπ' όψιν στην εξήγηση των βιολογικών τους δράσεων, είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, ιδιαιτέρως σιδήρου και χαλκού. Με τη χρήση φασματοσκοπικών (Borsari et al., 2001, Kostyuk et al., 2001, Mira et al., 2002, Fernadez et al., 2002, Moridani et al., 2003, Nest et al., 2004, de Souza and de Giovani, 2004, O'Coinceanainn et al., 2004), βολταμετρικών (Vestergaard et al., 2005) και άλλων μεθόδων, αποδείχθηκε ότι τα φλαβονοειδή δεσμεύουν μέταλλα, όπως Cu, Fe, Mg, Mn, Zn. Ορισμένες ερευνητικές ομάδες υποστήριξαν ότι οι πιθανότερες θέσεις δέσμευσης μετάλλων στα φλαβονοειδή είναι η 3-υδροξυλομάδα σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση, η 5-υδροξυλομάδα σε συνδυασμό με την 4-όξο ομάδα και η όρθο-διυδροξύ-δομή στον Β-δακτύλιο (Fernadez et al., 2002, Moridani et al., 2003). Από την άλλη πλευρά οι Khokhar και Arenten υποστήριξαν ότι η σιδηροδεσμευτική δράση σχετίζεται με την παρουσία υψηλού αριθμού υδροξυλικών υποκαταστατών (Khokhar and Arenten, 2003).

Οι μεταλλοδεσμευτικές δράσεις των φλαβονοειδών υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που μπορεί να έχουν στις ασθένειες, που σχετίζονται με την υπερπλήρωση σε μέταλλα (Fraga et al., 2002, Jagetia et al., 2004), καθώς και σε όλες τις καταστάσεις οξειδωτικού στρες στις οποίες εμπλέκονται ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Οι αναφορές που υπάρχουν όμως στη συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης μετάλλων και την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες είναι αντικρουόμενες. Ενώ ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η δέσμευση μετάλλων είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Afanas'ev et al., 1989, Miller et al., 1996, Bodini et al., 2001, Kostyuk et al., 2001, Moridani et al., 2003, de Souza and de Giovani, 2004), άλλοι πιστεύουν, πως αυτό συμβαίνει μόνο για εκείνα τα φλαβονοειδή, που έχουν χαμηλή ικανότητα εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών (van Acker et al., 1996, van Acker et al., 1998). Πάντως πιθανολογείται, ότι η δέσμευση μετάλλων μετάπτωσης και ιδιαίτερα του σιδήρου μπορεί να επιδράσει θετικά στις ευεργετικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στην αντίδραση Fenton και συνεπώς την παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου από το



H₂O₂. Επιπλέον είναι δυνατό, να πραγματοποιείται το φαινόμενο του «site-specific scavenging». Σύμφωνα με τη θεωρία του φαινομένου αυτού, ακόμη και αν ο σίδηρος παραμένει οξειδοαναγωγικά ενεργός μετά τη δέσμευσή του από τα φλαβονοειδή, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τον καταλυτικά ενεργό Fe²⁺ μπορούν να εκκαθαριστούν απευθείας από τα παρακείμενα μόρια του φλαβονοειδούς.

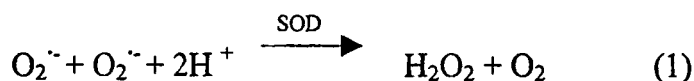
Η ισχύς με την οποία τα φλαβονοειδή μπορούν να δεσμεύσουν σίδηρο αποτέλεσε επίσης αντικείμενο μελέτης από κάποιους ερευνητές. Η σχετική ικανότητα δέσμευσης σιδήρου ορισμένων φλαβονοειδών υπολογίστηκε από τους van Acker et al., 1996 και τα αποτελέσματα των εργασιών τους έδειξαν ότι η απιγενίνη, η ναριγενίνη και η φισετίνη είναι ισχυροί δεσμευτές μετάλλων, η λουτεολίνη και η κερκετίνη μέτριοι, καθώς και ότι η γαλανγίνη δεσμεύει το σίδηρο πολύ ήπια (van Acker et al., 1996). Η ερευνητική ομάδα του Engelmann πραγματοποίησε μια τέτοια προσπάθεια, περιορίστηκε όμως στον προσδιορισμό των σταθερών πρόσδεσης για φλαβονοειδή, που περιείχαν μόνο μια θέση δέσμευσης για το σίδηρο, αφού η παρουσία περισσότερων θέσεων δέσμευσης καθιστά το θέμα αυτό ιδιαίτερα πολύπλοκο (Engelmann et al., 2005). Παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα σε αυτό το πεδίο, η σημασία της δέσμευσης σιδήρου σε ζωντανά ανέπαφα κύτταρα δεν είχε μέχρι σήμερα διευκρινιστεί.



1.3 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Η χημεία των ελεύθερων ριζών (free radicals) χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε τομείς, όπως η οργανική χημεία, η συντήρηση τροφίμων, οι επιδράσεις ακτινοβολιών, οι βιομηχανίες χρωμάτων και πλαστικών κ.α. Στις Βιολογικές και τις Ιατρικές επιστήμες η σημασία των ελεύθερων ριζών, και ειδικότερα αυτών που σχετίζονται με το οξυγόνο, εκτιμήθηκε μετά την ανακάλυψη της συμμετοχής τους σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων σε ανθρώπους, ζώα και φυτά. Μεγάλη ώθηση στην έρευνα γύρω από το ρόλο των ελεύθερων ριζών στην Βιολογία και την Ιατρική έδωσε η ανακάλυψη της οικογένειας των ενζύμων «δισμουτάσες του σουπεροξειδίου» (Superoxide Dismutase, SOD) σε κύτταρα αερόβιων οργανισμών από τους McCord και Fridovich, το 1969 (McCord and Fridovich, 1969a, McCord and Fridovich, 1969b). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και O_2 (αντίδραση 1), γεγονός που υποδηλώνει, ότι ελεύθερες ρίζες παράγονται *in vivo* και θα πρέπει να εξουδετερωθούν.



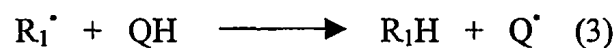
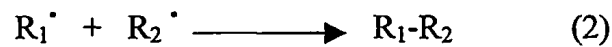
Σημαντική επίσης συμβολή στην κατανόηση του ρόλου των ελεύθερων ριζών στις βιολογικές επιστήμες είχε και η ανάπτυξη ειδικών οργάνων (ηλεκτρονικοί παραμαγνητικοί συντονιστές, EPR ή ESR), με τα οποία έγινε δυνατή η άμεση ανίχνευσή τους. Σήμερα η μελέτη και η αξιολόγηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις κερδίζει συνεχώς έδαφος και προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

1.3.2 Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται άτομα ή μόρια με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή



(spin). Οι ενώσεις αυτές μπορεί να προέλθουν είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, είτε από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού μετά από κατανάλωση ενέργειας. Η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους προσδίδει συνήθως μεγάλη δραστηριότητα, οδηγώντας στην τάση να αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια, προκειμένου να συμπληρώσουν τη δική τους εξωτερική στοιβάδα, έτσι ώστε να μετατραπούν σε πιο σταθερές ενώσεις. Η απόσπαση όμως ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ελεύθερη ρίζα, τη μετατρέπει σε ελεύθερη ρίζα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια και να σχηματίσει νέες ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό ανεξέλεγκτη παραγωγή ελεύθερων ριζών μέσα σε ένα κύτταρο μπορεί τελικά να καταλήξει σε καταστροφή ολόκληρου του βιολογικού υλικού. Ο τερματισμός των αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών μπορεί να επιτευχθεί με μία από τις παρακάτω αντιδράσεις.



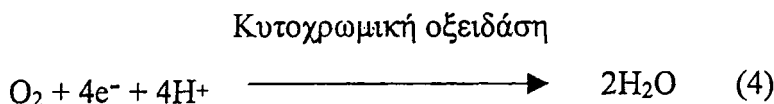
Στην πρώτη περίπτωση (αντίδραση 2), δύο ελεύθερες ρίζες $R_1 \cdot$ και $R_2 \cdot$ αντιδρούν μεταξύ τους και, συνεισφέροντας ένα ηλεκτρόνιο η καθεμιά, σχηματίζουν έναν ομοιοπολικό δεσμό. Οι αντιδράσεις αυτές είναι σπάνιες, διότι εξαιτίας της δραστηριότητάς τους, οι συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών είναι πολύ χαμηλές και κατά συνέπεια είναι σχεδόν απίθανο να συναντηθούν και να αντιδράσουν μεταξύ τους. Πιο πιθανό είναι να πραγματοποιηθεί η δεύτερη περίπτωση (αντίδραση 3). Η ελεύθερη ρίζα $R_1 \cdot$ αντιδρά με ένα άλλο μόριο QH και αποσπώντας ένα άτομο $H \cdot$ (ένα πρωτόνιο H^+ και ένα ηλεκτρόνιο e^- ταυτόχρονα), συμπληρώνει την εξωτερική της στοιβάδα (R_1H), σχηματίζοντας μια νέα ελεύθερη ρίζα ($Q \cdot$). Λόγω της ειδικής χημικής δομής της, η ρίζα αυτή δεν είναι δραστική, διακόπτοντας έτσι την αλληλουχία των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις της δεύτερης περίπτωσης είναι οι κατ'εξοχήν υπεύθυνες για την αντιμετώπιση ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται σε βιολογικά συστήματα. Ενώσεις με τέτοιες ιδιότητες είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) αλλά και τα φλαβονοειδή, όπως προαναφέρθηκε παραπάνω. Οι ενώσεις που μπορούν με τον τρόπο αυτό να διακόψουν την αλυσίδα αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών ονομάζονται εκκαθαριστές ελεύθερων ριζών, ή χαρακτηρίζονται γενικότερα ως αντιοξειδωτικά.



1.3.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.)

Το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων από τις οξειδωτικές διαδικασίες του καταβολισμού, επιτρέποντας την αποδέσμευση της μέγιστης δυνατής ενέργειας από τις τροφές. Με την εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα, υπήρξε σταδιακή μετατροπή των αναερόβιων συνθηκών σε αερόβιες, η οποία είχε ως συνέπεια την εξελικτική ανάπτυξη μηχανισμών προστασίας ενάντια στην τοξικότητα του O_2 . Η τοξικότητα του O_2 οφείλεται στην ικανότητά του, να ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Bruyninckx et al., 1978, Shigenaga et al., 1994).

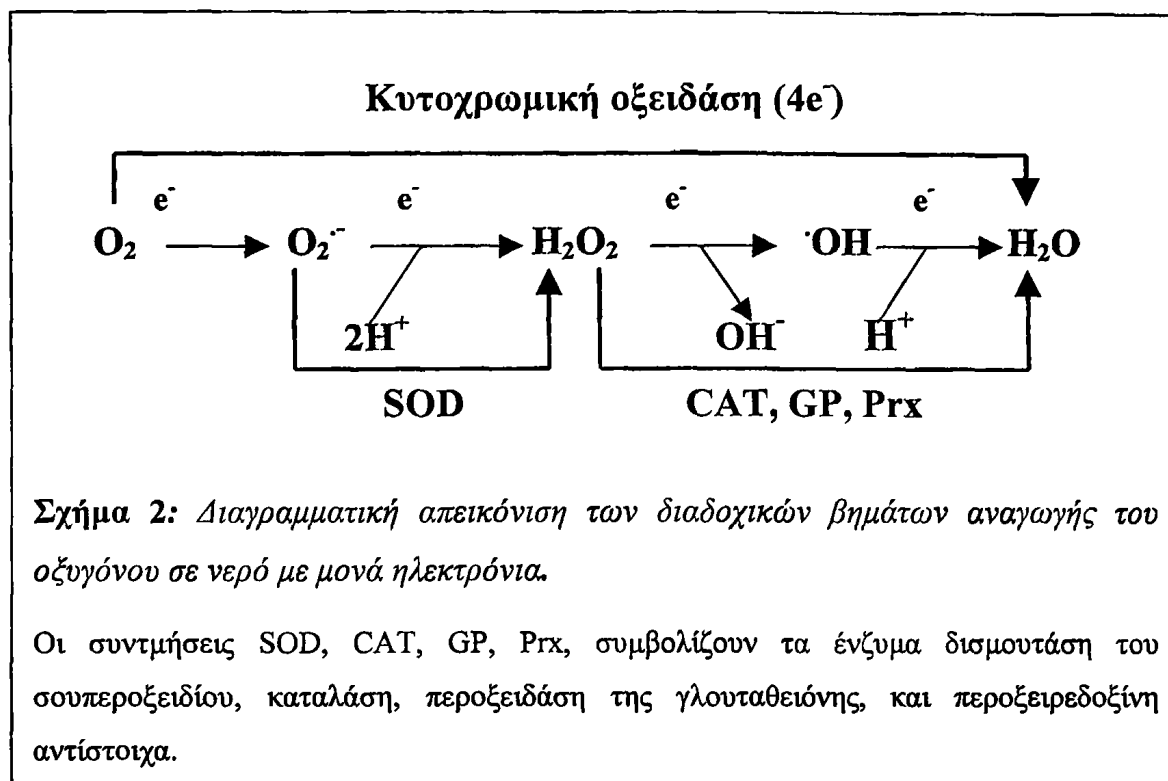
Το μοριακό οξυγόνο (O_2) προσλαμβάνοντας 4 ηλεκτρόνια ανάγεται σε δύο μόρια ύδατος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο «κυτοχρωμική οξειδάση», η οποία αποτελεί το τελευταίο σύμπλοκο στην ακολουθία των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (αντίδραση 4).



Το ενζυμικό σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει ειδική δομή (2 μόρια αίμης και 2 άτομα Cu στο ενεργό του κέντρο), η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων στο O_2 , πριν τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης (δύο μόρια H_2O) αφηθούν ελεύθερα. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας, πρωτόνια από το εσωτερικό της μιτοχονδριακής μήτρας μεταφέρονται στο διαμεμβρανικό χώρο, σχηματίζοντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό. Το δυναμικό αυτό χρησιμοποιείται από μια ειδική πρωτεΐνη, την ΑΤΡαση των μιτοχονδρίων, για τη φωσφορυλίωση του ADP και το σχηματισμό ATP. Με τον τρόπο αυτό καταναλώνεται περίπου το 85% με 90% του προσλαμβανόμενου από τον οργανισμό O_2 . Το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου που δε χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια (10-15%), συμμετέχει σε αντιδράσεις που καταλύονται από τις οξειδάσες (D-άμινο-οξειδάση, οξειδάση της ξανθίνης κ.α.), τις υδροξυλάσες (λυσίνης, προλίνης και τυροσίνης) καθώς και από διάφορες μονοξυγονάσες. Τέλος, ένα μικρό ποσοστό (περίπου 2%) ανάγεται κάτω από

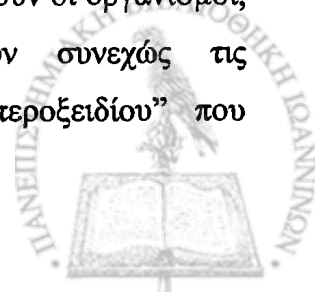


φυσιολογικές συνθήκες με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2).



Το αναγωγικό περιβάλλον, το οποίο επικρατεί στα κύτταρα, προσφέρει αρκετές δυνατότητες στο O_2 για αναγωγή με ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζοντας το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Κατ' αυτό τον τρόπο, ενώσεις, όπως το $O_2^{\cdot-}$, η υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot}), το H_2O_2 και η εξαιρετικά δραστική ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot OH$), μπορούν να θεωρηθούν κανονικά προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Αυξημένη δημιουργία αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του οξυγόνου θεωρείται υπεύθυνη για μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς (Ames et al., 1993, Fridovich, 1975, Griending et al., 1999, McCord, 1974). Στον πίνακα 1 αναφέρονται μια σειρά από ενώσεις του O_2 , οι οποίες είναι δυνατόν να συμμετέχουν σε τοξικές για τα κύτταρα αντιδράσεις και οι οποίες ονομάζονται "Δραστικές Μορφές Οξυγόνου". Όπως παρατηρείται, μόνο μερικές από αυτές είναι ελεύθερες ρίζες.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η συνεχής συσσώρευση ΔΜΟ θα ήταν καταστρεπτική για τα κύτταρα. Για να μπορέσουν να επιβιώσουν οι οργανισμοί, χρειάζονται ενζυμικά συστήματα ικανά να απομακρύνουν συνεχώς τις σχηματιζόμενες ΔΜΟ. Οι διάφορες "δισμουτάσες του σουπεροξειδίου" που



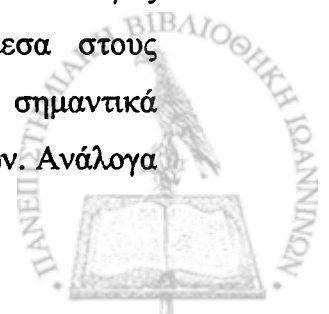
προαναφέρθηκαν, οι οποίες απαντώνται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, αποτελούν ακριβώς ένα σύστημα απομάκρυνσης του $O_2^{\cdot -}$ (McCord et al., 1969). Η απομάκρυνση όμως του $O_2^{\cdot -}$ συνεπάγεται τη δημιουργία H_2O_2 , το οποίο επίσης πρέπει να απομακρυνθεί. Αυτό επιτυγχάνεται με τρία είδη ενζύμων: α) την καταλάση, β) την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και γ) τις περόξυ-ρεδοξίνες. Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα, να ανάγουν το H_2O_2 με δύο ηλεκτρόνια σε H_2O , παρακάμπτοντας έτσι τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών του υδροξυλίου (Chance et al., 1979, Wood et al., 2003).

Μοριακός Τύπος	Όνομα
Ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\cdot -}$	ανιόν σουπεροξειδίου
HO_2^{\cdot}	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	ρίζα υδροξυλίου
RO^{\cdot}	ρίζα αλκοξειδίου
ROO^{\cdot}	ρίζα υπεροξειδίου
Μη-ελεύθερες ρίζες	
H_2O_2	υπεροξειδίο- του υδρογόνου
$ROOH$	οργανικά υδροπεροξειδία
1O_2	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
$HOCl$	υποχλωριώδες οξύ

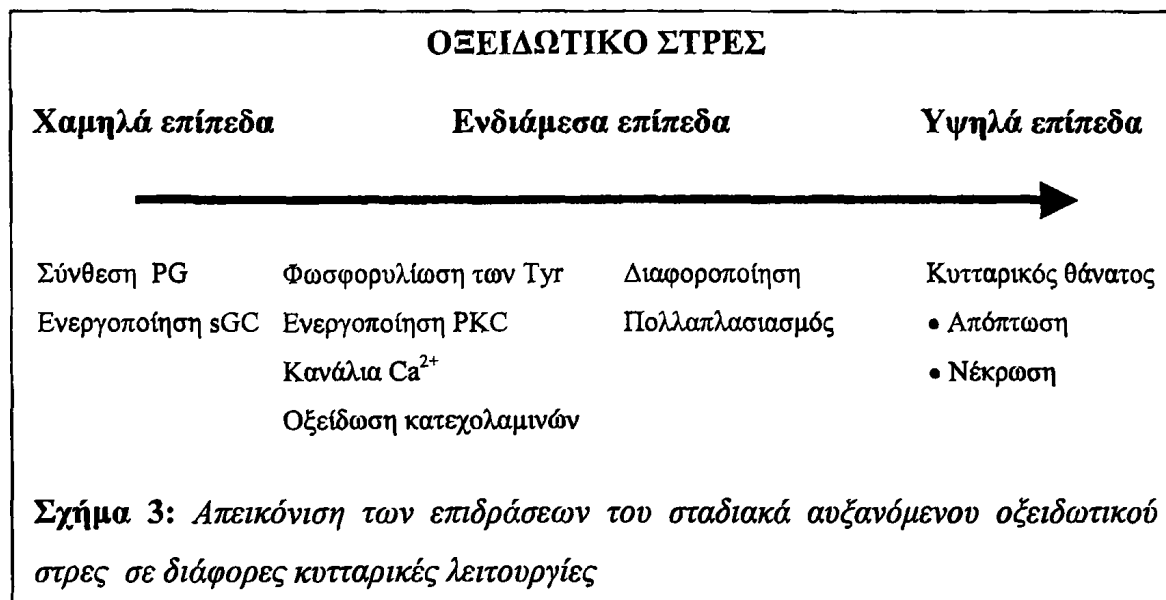
Πίνακας 1: Αντιπροσωπευτικές « Δραστικές Μορφές Οξυγόνου »

1.3.4 Οξειδωτικό στρες

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, εξισορροπείται κατά κανόνα στους αερόβιους οργανισμούς από τη δράση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών συστημάτων. Η ισορροπία αυτή είναι δυναμική με δυνατότητα αλλαγής προς την μία ή την άλλη πλευρά. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην κατάσταση, κατά την οποία η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και την αντιοξειδωτική άμυνα διαταράσσεται σημαντικά υπέρ των πρώτων, οδηγώντας έτσι στη βλάβη των κυτταρικών συστατικών. Ανάλογα



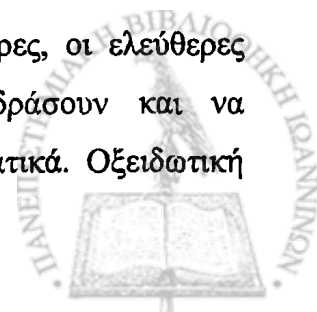
με την ένταση του οξειδωτικού στρες, οι επιδράσεις στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες ποικίλλουν, οδηγώντας ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο όταν τα επίπεδα της έντασης αυτής είναι υψηλά (Σχήμα 3).



Η βιβλιογραφία περιέχει πληθώρα ερευνητικών μελετών, που υποστηρίζουν πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες. Για παράδειγμα η δράση των ελεύθερων ριζών έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις, όπως η επανοξυγόνωση μετά από μια περίοδο ισχαιμίας (McCord and Turrens, 1994), η δημιουργία της αθηρωματώδους πλάκας (Parthasarathy et al., 1992, Steinberg, 1997), οι πνευμονικές παθήσεις οι οποίες προκαλούνται από το μολυσμένο περιβάλλον (Louie et al., 1997), οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (Cooke, 1997), οι ασθένειες Parkinson's και Alzheimer's (Coyle and Puttfarcken, 1993, Lyras et al., 1997) κ.ά. Τέλος υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, ότι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα (signal transduction) σαν δεύτεροι διαμεσολαβητές και ως εκ τούτου παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, στη γήρανση, στην καρκινογένεση (Gower, 1998, Kensler and Teffe, 1986), στο AIDS (Westendorp et al., 1995), καθώς και στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Chandra et al., 2000).

1.3.5 Βλαπτικές συνέπειες των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά μακρομόρια

Όταν στο κύτταρο επικρατούν συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται ενδοκυττάρια, μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά. Οξειδωτική

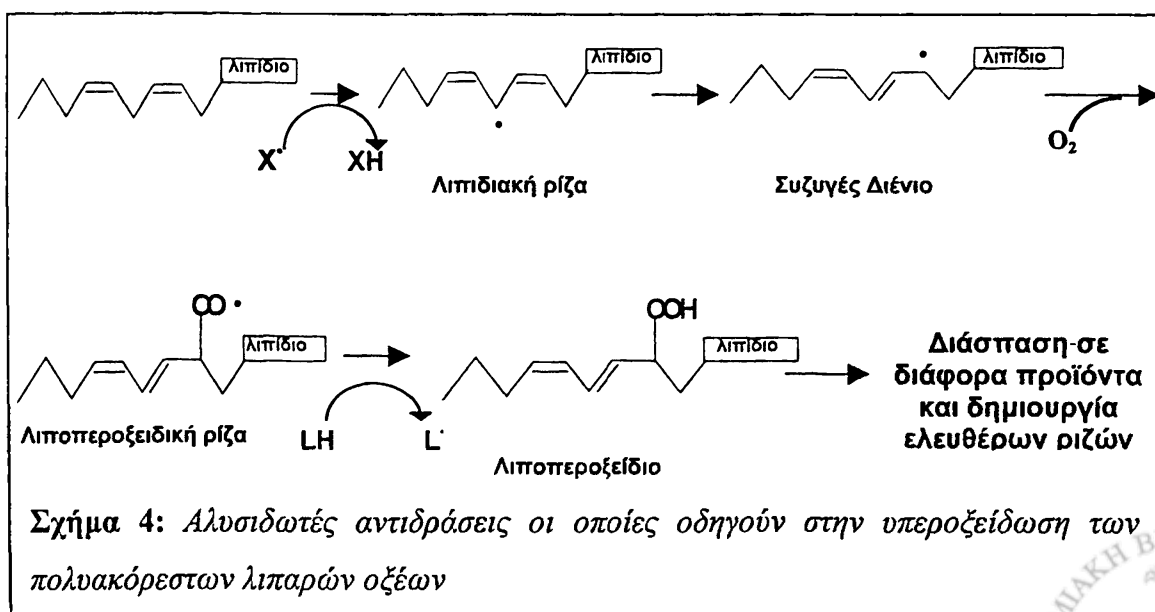


τροποποίηση των βασικών κυτταρικών συστατικών όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, τα μεμβρανικά λιπίδια κλπ, έχει σοβαρές επιπτώσεις, που είναι δυνατόν να επιφέρουν έως και τον κυτταρικό θάνατο.

1.3.5.1 Υπεροξείδωση των λιπιδίων

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των ελεύθερων ριζών στα κύτταρα είναι με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια και αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου και των λιποπρωτεϊνών του. Το φαινόμενο αυτό καλείται λιπιδιακή υπεροξείδωση και το έναυσμά της μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα, αρκεί να είναι τόσο δραστική, ώστε να μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από το λιπαρό οξύ, έχοντας ως συνέπεια το σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζας λιπαρού οξέως. Σχεδόν άμεσα πραγματοποιείται ανασυνδυασμός με τα ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς, με συνέπεια την παραγωγή των συζυγών διενίων καθώς και μιας νέας ελεύθερης ρίζας. Η ρίζα αυτή είναι περισσότερο σταθερή και αντιδρά συνήθως με μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου, η οποία στη συνέχεια αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, ανακυκλώνοντας ουσιαστικά την αντίδραση (Σχήμα 4).

Τα αποτελέσματα της λιπιδιακής υπεροξείδωσης στις μεμβράνες είναι κυρίως η μείωση της ρευστότητας, η μείωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, η αύξηση της διαπερατότητας σε μόρια όπως το Ca^{+2} και τα H^+ και πιθανά η λύση του



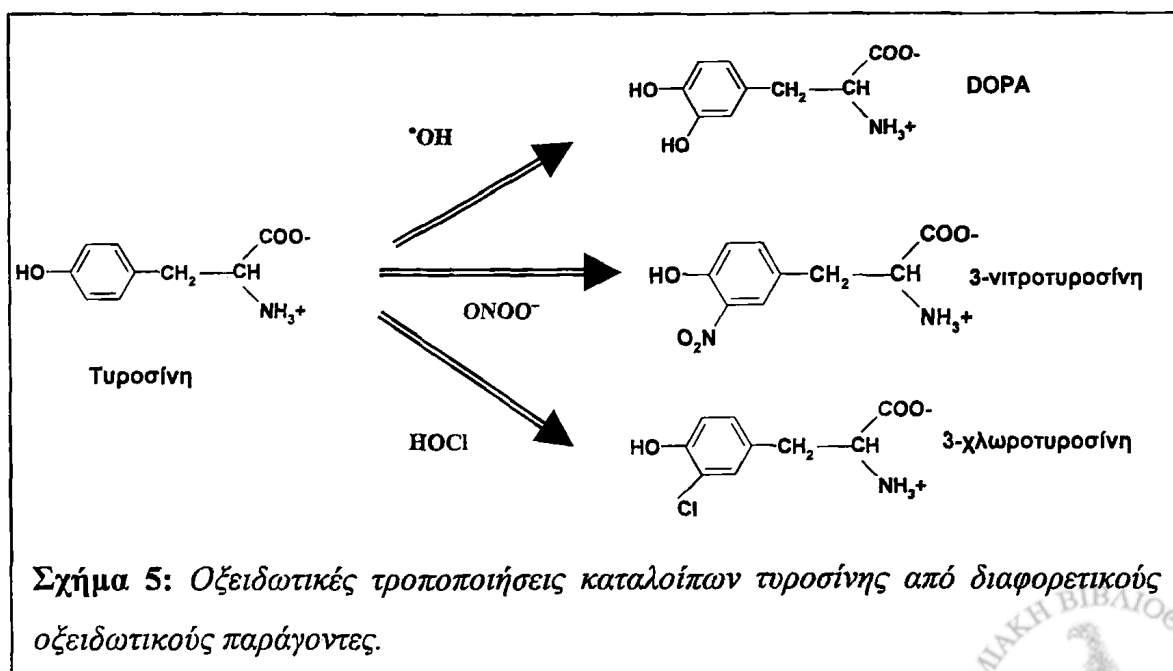
Σχήμα 4: Αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στην υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων



κυττάρου και η απελευθέρωση των συστατικών του. Παρατεταμένη λιπιδιακή υπεροξείδωση προκαλεί την ολική καταστροφή των βιολογικών μεμβρανών και το θάνατο των κυττάρων.

1.3.5.2 Οξείδωση πρωτεϊνών

Εκτός των λιπιδίων σημαντικό στόχο των ελεύθερων ριζών αποτελούν και οι πρωτεΐνες (Davies and Dean, 1997). Οι επιπτώσεις της δημιουργίας ελεύθερων ριζών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτώνται: α) από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αμινοξέα, τα οποία είναι ευαίσθητα στη δράση ελεύθερων ριζών, β) το πόσο σημαντικά είναι αυτά τα αμινοξέα για τη δράση της πρωτεΐνης, και γ) από την ικανότητα των κυττάρων να διορθώσουν τις βλάβες στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Davies, 2003). Κατά συνέπεια, πρωτεΐνες που περιέχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες από τα ευαίσθητα σε οξειδωτική τροποποίηση αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη προσβάλλονται πιο εύκολα, λόγω της υψηλής δραστηριότητας των θειούχων και ακόρεστων μορίων με ελεύθερες ρίζες. Ανάλογα με το είδος της ελεύθερης ρίζας ή της δραστικής μορφής-οξυγόνου, που επιτίθεται σε ένα αμινοξύ, προκύπτει το είδος της τροποποίησης που πραγματοποιείται. Έτσι, για παράδειγμα, ένα κατάλοιπο τυροσίνης μπορεί να μετατραπεί σε DOPA, νιτροτυροσίνη και χλωροτυροσίνη, μετά από αντίδρασή της με $\cdot\text{OH}$, ONOO^- και HOCl αντίστοιχα (Σχήμα 5).

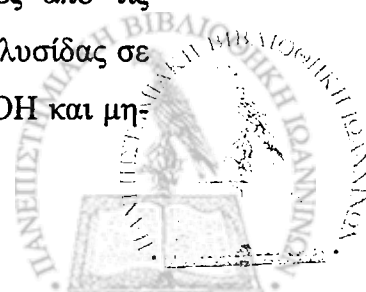


1.3.5.3 Βλάβες στο DNA

Το DNA και το RNA, παρά το γεγονός ότι αποτελούν τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων, δεν είναι αρκετά προστατευμένα, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες, που δημιουργούνται *in vivo*. Οξειδωτικές τροποποιήσεις των νουκλεϊκών οξέων οδηγούν σε αναστολή της μεταγραφής και του διπλασιασμού του DNA, προκαλούν μεταλλάξεις και τελικά μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο του κυττάρου. Το ποσοστό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA είναι ανιχνεύσιμο ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Υπολογίζεται ότι στο πυρηνικό DNA μια βάση στις 130.000 είναι τροποποιημένη οξειδωτικά. Στο μιτοχondριακό DNA η βλάβη είναι αρκετά πιο υψηλή, υπολογίζεται περίπου σε μια τροποποιημένη βάση ανά 8.000.

Η κύρια πηγή βλαβών στο DNA πιστεύεται πως είναι οι ρίζες υδροξυλίου. Οι ρίζες αυτές είναι πάρα πολύ δραστικές με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαχθούν, αλλά να αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους κατά τη στιγμή της δημιουργίας τους. Κατά συνέπεια το σημείο της δημιουργίας των ριζών υδροξυλίου καθορίζει και την εξειδίκευση της δράσης τους. Για παράδειγμα, αν οι $\cdot\text{OH}$ σχηματιστούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι απίθανο να διαχθούν και να προκαλέσουν βλάβη στο πυρηνικό DNA. Οι $\cdot\text{OH}$, για να προκαλέσουν βλάβη στο DNA, είτε πρέπει να δημιουργηθούν πάνω στο DNA, είτε, αν σχηματιστούν σε άλλα σημεία, πρέπει να προκαλέσουν τη δημιουργία δευτερευόντων μορίων, τα οποία να διαχθούν ως τον πυρήνα.

Η οξειδωτική τροποποίηση στο DNA μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σχάση των μονών και διπλών αλυσίδων, ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων, διασυνδέσεις τύπου DNA-DNA ή DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA (Martinez et al., 2003, Slupphaug et al., 2003). Από τις βάσεις του DNA, οι πιο ευαίσθητες σε οξειδωτικές τροποποιήσεις είναι οι πυριμιδίνες και ειδικά η θυμίνη (Σχήμα 6). Οι τροποποιημένες βάσεις μπορούν να απομακρυνθούν από το DNA με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων, σχηματίζοντας απουρινικές ή απυριμιδινικές θέσεις. Πέρα από τις βάσεις των αμινοξέων και ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μπορεί να υποστεί βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Οι βλάβες αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε σχάση της αλυσίδας σε ορισμένα σημεία και το σχηματισμό μη τυπικών 3' και 5' άκρων (μη-3'-OH και μη-



υπεροξυσωμάτια παράγουν H_2O_2 με απ' ευθείας μεταφορά $2e^-$ στο O_2 . Έχει υπολογιστεί, ότι η συγκέντρωσή του στα ηπατοκύτταρα κυμαίνεται μεταξύ 10^{-8} - 10^{-7} M (Boveris et al., 1973).

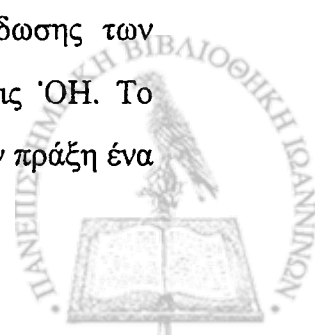
Το H_2O_2 είναι ασθενές οξειδωτικό μέσο, το οποίο μπορεί να οξειδώσει αρκετά βιολογικά μόρια, κυρίως αυτά τα οποία έχουν σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) (Brodie et al., 1987), σύμπλοκα σιδήρου θείου (Fe-S) (Pantopoulos et al., 1998), μόρια αίμης (Gutteridge, 1986, Paller et al., 1994). Λόγω του ότι είναι μικρό και μη φορτισμένο μόριο, μπορεί εύκολα να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, μια ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική για τη φυσιολογική του δράση. Όταν προστίθεται στο θεραπευτικό υλικό κυττάρων σε καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10-100 μ M, προξενεί βλάβες, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων. Οι περισσότερες από τις προκαλούμενες βλάβες, κυρίως στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA είναι έμμεσες μιας και το H_2O_2 δεν αντιδρά απευθείας με τα μόρια αυτά. Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι το H_2O_2 αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα μέταλλα μετάπτωσης (κυρίως Fe), δημιουργώντας δραστικές ρίζες $\cdot OH$ (Mello Filho et al., 1984a, Mello Filho et al., 1984b, Halliwell et al., 1991, Meneghini, 1997, Spencer et al., 1995a, Barbouti et al., 2001, Barbouti et al., 2002, Doulias et al., 2003).

1.3.6.1 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου

Η αντίδραση Fenton (αντίδραση 5) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1894 από τον H.J.H. Fenton



Όπως προαναφέρθηκε, οι ρίζες υδροξυλίου, λόγω της μεγάλης δραστικότητάς τους, αντιδρούν μη εξειδικευμένα με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους κατά την στιγμή του σχηματισμού τους. Προσθήκη H_2O_2 σε καλλιέργειες πολλών τύπων κυττάρων οδηγεί σε αύξηση των σχάσεων του DNA λίγα μόλις λεπτά μετά την προσθήκη του (Mello Filho et al., 1984, Mello Filho et al., 1984, Nassi-Calo et al., 1989). Ο τύπος της βλάβης αυτής (αύξηση των επιπέδων των διάφορων προϊόντων οξείδωσης των τεσσάρων βάσεων) είναι σύμφωνος με την προσβολή του DNA από τις $\cdot OH$. Το DNA, το οποίο έχει αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες, είναι στην πράξη ένα



μεγάλο ανιόν ικανό να δεσμεύει διάφορα κατιόντα. Έτσι έχει δειχθεί ότι σίδηρος και χαλκός, όταν είναι διαθέσιμα, έχουν την ικανότητα να συνδέονται στο DNA, με τη σταθερά πρόσδεσης του Fe(III) να έχει τιμή $2,1 \times 10^{14}$, σε pH 7,4, ενώ η αντίστοιχη του Cu(II) να είναι 2×10^4 (Halliwell and Gutteridge, 1999), με το χαλκό να συνδέεται επιλεκτικά σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη (Rodriguez et al., 1995). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές έχει επικρατήσει η άποψη, ότι η πρόκληση βλαβών στο πυρηνικό DNA από το H₂O₂ οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μορίου αυτού με τα ιόντα σιδήρου, που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA, με αποτέλεσμα το σχηματισμό $\cdot\text{OH}$ επάνω στο DNA, οι οποίες στη συνέχεια προλαβαίνουν να αντιδρούν με αυτό και να του προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες (Chevion et al., 1988, Halliwell et al., 1990, Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Galey, 1997, Meneghini, 1997, Stohs et al., 1995).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις, που δείχνουν ότι τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις, ο μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H₂O₂ είναι ανεξάρτητος της αλληλεπίδρασής του με τα ιόντα σιδήρου και χαλκού, αλλά συνδέεται άμεσα με αλλαγές στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου (Cantoni et al., 1989, Panayiotidis et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή υποστηρίζεται ότι η έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ αυξάνει αρχικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ειδικών ενδονουκλεασών, οι οποίες με τη σειρά τους, προκαλούν σχάσεις στο DNA. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός αυτός είναι ασβέστιο-εξαρτώμενος σε χαμηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ αλλά ανεξάρτητος του Ca²⁺ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Panayiotidis et al., 1999). Η παρατήρηση αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία, εάν ληφθεί υπόψη ότι όταν το H₂O₂ προστίθεται απευθείας στην κυτταρική καλλιέργεια, όπως συμβαίνει στις περισσότερες μελέτες (Chevion, 1988, Galey, 1997, Halliwell et al., 1990, Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Meneghini et al., 1997, Stohs et al., 1995), τα κύτταρα εκτίθενται αρχικά σε μία σχετικά υψηλή συγκέντρωση H₂O₂, η οποία σταδιακά μειώνεται εξαιτίας του μεταβολισμού του, κυρίως από τα ένζυμα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και καταλάση (Antunes and Cadenas, 2000).



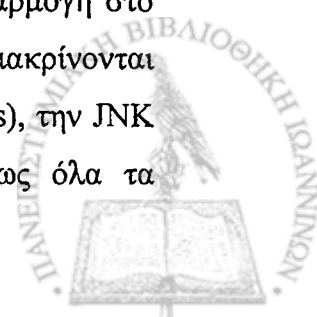
1.3.6.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου και μεταγωγή σήματος

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, ότι μικρές αλλαγές της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων και σχετίζονται με βασικές λειτουργίες, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο (Martindale et al, 2002). Έχει διαπιστωθεί ότι η σύνδεση ορισμένων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών στους αντίστοιχους υποδοχείς τους στην επιφάνεια του κυττάρου συνοδεύεται από γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου H_2O_2 (Das et al., 1992, Sundaresan et al., 1996, Thannickal et al., 1998, Ushio-Fukai et al., 1998). Η άμεση εμπλοκή του H_2O_2 στη σηματοδοτική δράση των μορίων αυτών υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι η απομάκρυνσή του, δια μέσου της υπερέκφρασης της καταλάσης, είχε σα συνέπεια την ολική ή μερική αναστολή της δράσης τους (Bae et al., 1997, Ushio-Fukai et al., 1999).

Παρόλο που η εμπλοκή του H_2O_2 στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς έχει μελετηθεί αρκετά, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης του παραμένουν άγνωστοι. Πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι η δράση του H_2O_2 σαν σηματοδοτικό μόριο σχετίζεται με την οξείδωση σουλφυδρυλικών ομάδων στα κυστεϊνικά κατάλοιπα ορισμένων πρωτεϊνών (Gotoh and Cooper, 1998, Saitoh et al., 1998). Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεϊνών, το H_2O_2 δεν οξειδώνει οποιαδήποτε, αλλά δρα επιλεκτικά μόνο σε ορισμένες από τις κυστεΐνες αυτές. Σημαντικό ρόλο, στο αν μια κυστεΐνη θα οξειδωθεί, παίζει το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται και συγκεκριμένα η παρουσία φορτισμένων αμινοξέων σε γειτονικές θέσεις. Ανάμεσα στις ποικίλες πρωτεΐνες που επηρεάζονται από το H_2O_2 περιλαμβάνονται οι MAP κινάσες, οι πρωτεϊνικές κινάσες B και C, καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες.

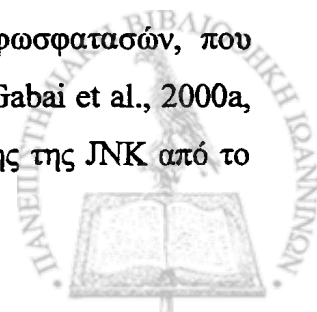
MAP κινάσες

Οι MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein kinases) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα κινασών, οι οποίες εμπλέκονται στην ρύθμιση βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες και η απόπτωση. Με βάση τις δομικές τους διαφορές διακρίνονται σε τρεις υποοικογένειες: την ERK (Extracellular signal Regulated Kinases), την JNK (c-Jun N-terminal Kinases) και τις κινάσες p38. Έχει αποδειχθεί πως όλα τα



παραπάνω μέλη θα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες και ότι το H_2O_2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση αυτή (Martindale et al., 2002). Έχει επίσης δειχθεί ότι το H_2O_2 έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει στη φωσφορυλίωση των υποδοχέων των παραγόντων ανάπτυξης EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) καθώς και του συμπλόκου υποδοχέων των T-κυττάρων, με συνέπεια την ενεργοποίηση της ERK (Sachsenmaier et al., 1994, Schieven et al., 1994, Huang et al., 1996, Knebel et al., 1996, Zanella et al., 1996, Chen et al., 1998). Η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των παραγόντων ανάπτυξης από το οξειδωτικό στρες έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση, πως χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 είναι μιτογόνες (Burdon, 1995). Το H_2O_2 θα μπορούσε να ξεκινήσει αυτά τα γεγονότα με δύο πιθανούς τρόπους. Πρώτον, θα μπορούσε να μιμηθεί τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης προσδέτη-υποδοχέα απευθείας, μέσω τροποποιήσεων (π.χ. οξειδώσεων) σε κυστεΐνες (Chen et al., 1998). Δεύτερον, είναι πιθανό το H_2O_2 να απενεργοποιεί κρίσιμες φωσφατάσες, που είναι απαραίτητες για την αποφωσφορυλίωση των συγκεκριμένων υποδοχέων (Knebel et al., 1996). Η ενεργοποίηση της ERK από το H_2O_2 φαίνεται να παίζει ρόλο ως παράγοντας επιβίωσης και προσαρμογής των κυττάρων στο H_2O_2 , όταν είναι σύντομη και παροδική (Aikawa et al., 1997, Wang et al., 1998, Ikeyama et al., 2001). Συνεχής ενεργοποίηση όμως της ERK έχει συνδεθεί με την πρόκληση απόπτωσης από το H_2O_2 σε ολιγοδενδροκύτταρα (Bhat and Zhang, 1999, Brand et al., 2001).

Τόσο η JNK όσο και η p38 αναφέρονται και ως SAPK (Stress Activated Protein Kinases), επειδή μπορούν να ενεργοποιηθούν από διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα. Στην περίπτωση αυτή το H_2O_2 φαίνεται να μπορεί να ενεργοποιεί αυτά τα μονοπάτια, αλλάζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Alder et al., 1999a). Για παράδειγμα, υπό φυσιολογικές συνθήκες οι πρωτεΐνη θειρεοδοξίνη (Trx) προσδέεται και αναστέλλει τη δράση της ASK 1 (Apoptosis Signal-regulating kinase 1), η οποία είναι μια MAPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase), δηλαδή μια κινάση, που ενεργοποιεί μέσω κάποιων MAPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) την JNK και την p38 (Saitoh et al., 1998). Σε κατάσταση οξειδωτικού στρες η Trx αποσυνδέεται από την ASK1, οδηγώντας τελικά σε ενεργοποίηση της JNK και της p38 (Zhu et al., 2001). Η ενεργοποίηση της JNK από το H_2O_2 μπορεί επίσης να προκληθεί μέσω αναστολής φωσφατάσων, που εμπλέκονται στην απενεργοποίηση της JNK (Meriin et al., 1999, Gabai et al., 2000a, Chen et al., 2001a). Όσον αφορά στις συνέπειες της ενεργοποίησης της JNK από το



οξειδωτικό στρες στο κύτταρο, φαίνεται πως σχετίζεται με την πρόκληση απόπτωσης και τον κυτταρικό θάνατο (Chen and Tan, 2000). Από την άλλη πλευρά, η πρωτεϊνική κινάση p38 φαίνεται να σχετίζεται τόσο με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου όσο και με την απόπτωση των κυττάρων (Kurata, 2000).

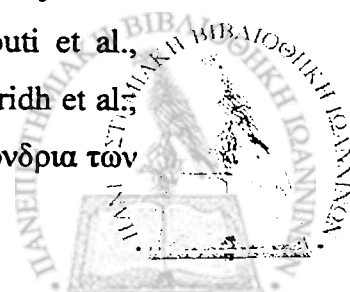
Πρωτεϊνικές κινάσες B και C

Η πρωτεϊνική κινάση B, ή Akt όπως αλλιώς λέγεται, καθώς και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Ειδικότερα η Akt ενεργοποιείται ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες ανάπτυξης, μέσω της PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), η οποία οδηγεί στη στρατολόγηση της Akt στην κυτταρική μεμβράνη. Σε HeLa κύτταρα το H_2O_2 μπορεί να ενεργοποιήσει την Akt μέσω του υποδοχέα του EGF (Wang et al., 2000b), ενώ σε B-λεμφοκύτταρα μέσω μιας πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης της Syk, η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων των κυττάρων αυτών (Ding et al., 2000). Η ενεργοποίηση της Akt από το H_2O_2 φαίνεται να προσφέρει προστασία στα κύτταρα ενάντια στη δράση του οξειδωτικού στρες, αφού η αναστολή της αύξησε περαιτέρω το θάνατο των κυττάρων από το H_2O_2 (Sonoda et al., 1999). Η PKC μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από το H_2O_2 , προκαλώντας απόπτωση σε λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ όταν αυτή ανασταλεί, τα κύτταρα οδηγήθηκαν σε νέκρωση (Li et al., 1999). Φαίνεται πως το H_2O_2 επάγει την φωσφορυλίωση μιας ισομορφής της PKC, την PKCδ, η οποία σχετίζεται με την πρόκληση της απόπτωσης (Majumder et al., 2001).

Από την άλλη πλευρά το H_2O_2 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως του STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) και του NFκB, οι οποίοι συνδέονται με την κυτταρική επιβίωση (Simon et al., 1998, Schreck et al., 1991). Κατά συνέπεια η κατάληξη των κυττάρων, που εκτίθενται σε H_2O_2 , εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα σε αυτές τις αντίρροπες αντιδράσεις και διαφοροποιείται ανάλογα με τη συγκέντρωση του H_2O_2 και το είδος των κυττάρων.

1.3.6.3 Υπεροξειδίου του υδρογόνου και απόπτωση

Έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων (Barbouti et al., 2002, Borutaite et al., 2001, Chandra et al., 2000, Hampton et al., 1997, Stridh et al., 1998). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι το H_2O_2 δρα κυρίως στα μιτοχόνδρια των



κυττάρων, προκαλώντας την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα επόμενα βήματα αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου (Alnemri et al., 1996, Stridh et al., 1998). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από την πρόκληση απόπτωσης, το H_2O_2 έχει την ικανότητα και να αναστέλλει τη διαδικασία της απόπτωσης στο στάδιο της ενεργοποίησης της κασπάσης-9, με συνέπεια την εκτροπή από τον κλασικό τύπο απόπτωσης σε ένα είδος θανάτου το οποίο προκαλείται από την έκλυση του AIF από τα μιτοχόνδρια (Barbouti et al., 2001, Barbouti et al., 2002).



1.4 Απόπτωση

1.4.1 Γενικά

Ο όρος «απόπτωση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 (Kerr et al., 1972) και περιέγραφε ένα είδος κυτταρικού θανάτου, που διέφερε από τη νέκρωση και ο οποίος απαιτούσε την κατανάλωση ενέργειας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί. Έτσι, ενώ η νέκρωση είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής βλάβης και αποτελεί παθητική διαδικασία, η απόπτωση πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου και είναι ενεργητική διαδικασία.

Στην περίπτωση της νέκρωσης η μορφολογία των κυττάρων χαρακτηρίζεται από διόγκωσή τους, με συνέπεια τη διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης και την έκχυση των κυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στους ιστούς, επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα, κυρίως μέσω της πρόκλησης φλεγμονωδών αντιδράσεων. Σε αντίθεση με τα παραπάνω τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η κυτταρική συρρίκνωση, η δημιουργία εξογκωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια και η εξωτερίκευση ενός συστατικού της κυταροπλασματικής μεμβράνης, της φωσφατίδυλο-σερίνης, προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στον πυρήνα πραγματοποιείται συμπύκνωση της χρωματίνης, καθώς και πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων, με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του DNA σε κλάσματα των 180 ζευγών βάσεων. Ο κατακερματισμένος πυρήνας και τα κυταροπλασματικά κατάλοιπα σχηματίζουν κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, απομακρύνονται από γειτονικά υγιή κύτταρα ή φαγοκύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν την εξωτερίκευση κατάλοιπων της φωσφατίδυλο-σερίνης στην πλασματική μεμβράνη, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για τους υπόλοιπους υγιείς ιστούς του οργανισμού (Vermes et al., 1995, Martin et al 1995).

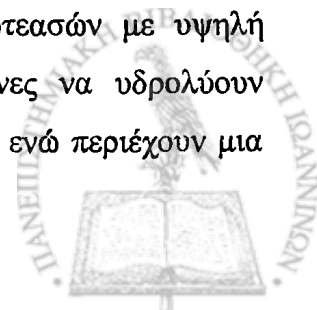


1.4.2 Φυσιολογική σημασία της απόπτωσης

Ο φυσιολογικός ρόλος της απόπτωσης τόσο στην ανάπτυξη του οργανισμού, όσο και στην ενήλικη ζωή του αποτέλεσε αντικείμενο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Φαίνεται πως η επιλεκτική κυτταρική «αυτοκτονία» είναι ένα γεγονός κεντρικής σημασίας για τη μορφοποίηση του εμβρύου, τον τερματισμό ανοσολογικών αποκρίσεων, τον περιορισμό εξάπλωσης των μολύνσεων και γενικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας στους ιστούς (Cory et al., 2002, Jacobson, 1997, Vaux and Korsmeyer, 1999, Rathmell and Thomson, 2002, Meier et al., 2000). Η επιβίωση ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από τη διατήρηση και την ανανέωση των κυττάρων διαφορετικών ιστών, μια διαδικασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απομάκρυνσης των κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης. Απορύθμιση της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από απώλεια κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι αυξημένα ή συσσώρευση των ανεπιθύμητων κυττάρων, όταν τα επίπεδα της απόπτωσης είναι ανεπαρκή. Στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων για παράδειγμα, αυξημένη απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, όπως συμβαίνει στη νόσο του AIDS (Arnoult et al., 2002). Η αυξημένη απόπτωση επίσης έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Αλτςχάϊμερ, η νόσος του Πάρκινσον και η σκλήρυνση κατά πλάκας (Haass, 1999, Hass, 2003). Από την άλλη πλευρά η αναστολή της απόπτωσης έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη όγκων και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome ALPS) (Thompson, 1995, Krammer, 2000).

1.4.3 Η οικογένεια των κασπασών

Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται από μια σειρά σημάτων, που ενεργοποιούνται ως απόκριση των κυττάρων σε διάφορα εξωτερικά ερεθίσματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα σήματα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράχτη των κασπασών, ο οποίος αποτελεί το τελικό στάδιο της εκτέλεσης της απόπτωσης. Οι κασπάσες αποτελούν μια οικογένεια πρωτεασών με υψηλή ομολογία και είναι όλες κυστεϊνικές πρωτεάσες εξειδικευμένες να υδρολύουν πεπτίδια σε σημεία που υπάρχουν κατάλοιπα ασπαρτικού οξέως, ενώ περιέχουν μια



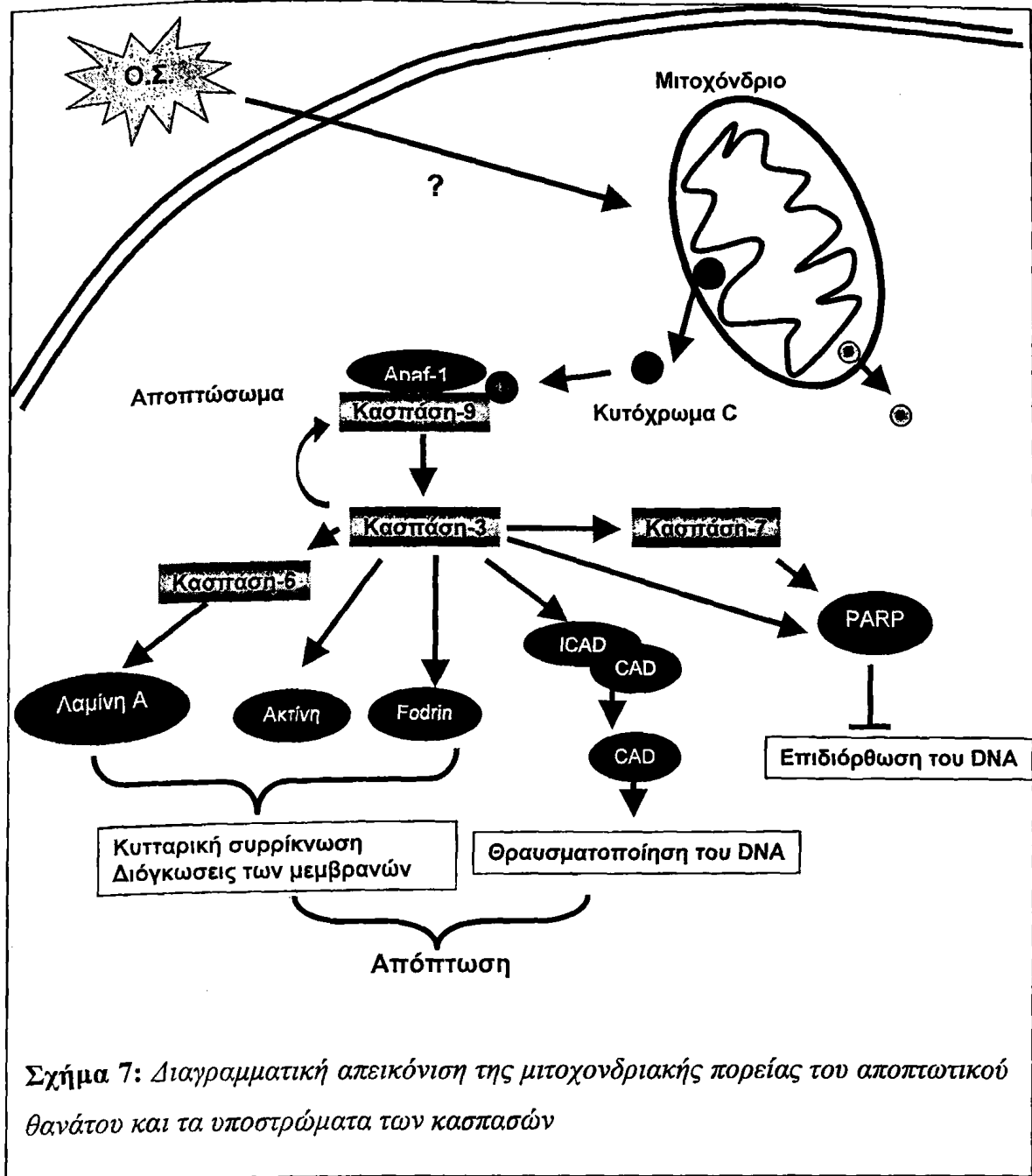
συντηρημένη ενεργή αλληλουχία πέντε αμινοξέων QACXG (το X μπορεί να είναι R, Q ή D). Πριν την ενεργοποίησή τους βρίσκονται με τη μορφή ζυμογόνων, τα οποία ονομάζονται προκασπάσες (Fan et al., 2005). Η ενεργοποίηση των προκασπασών περιλαμβάνει πρωτεολυτική σχάση στο καρβοξυτελικό άκρο συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέως, που ακολουθείται συνήθως από την απομάκρυνση της προπεριοχής από την ίδια την κασπάση. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή, που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης/μικρής υπομονάδας (Liang and Fesik, 1997, Launay et al., 2005).

Ανάλογα με τη δομική ομολογία τους οι κασπάσες διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες. Στους ενεργοποιητές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10 (εναρκτήριες κασπάσες), στους εκτελεστές της απόπτωσης, που είναι οι κασπάσες -3, -6 και -7 (εκτελεστικές κασπάσες), και στους μεσολαβητές της φλεγμονής, που είναι οι κασπάσες -1, -4, -5, -11, -12, -13 και -14. Οι ενεργοποιητές της απόπτωσης έχουν ιδιαίτερα μεγάλες προ-περιοχές, οι οποίες περιέχουν την περιοχή που συνεπάγεται το θάνατο (death effector domain, DED) στις προκασπάσες -8- και -10, ή την περιοχή στρατολόγησης των κασπασών (caspase recruitment domain, CARD) στις προκασπάσες -2 και -9. Οι περιοχές DED και CARD εμπλέκονται στη ρύθμιση των εκτελεστικών κασπασών μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Yuan et al., 2002).

1.4.3.1 Μηχανισμός ενεργοποίησης των κασπασών

Το μονοπάτι των μιτοχονδρίων αποτελεί τον κύριο τρόπο, με τον οποίο ξεκινά ο καταρράχτης των κασπασών και οδηγεί στην ενεργοποίηση της εναρκτήριας προκασπάσης-9 (Σχήμα 7). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή στο μονοπάτι αυτό συγκλίνουν τελικά τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση, συμπεριλαμβανομένου και του H_2O_2 . Έτσι, όταν υπάρχει κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα, διάφορες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και με την σειρά τους οδηγούν στη διάνοιξη πόρων διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (mitochondrion permeability transition pores, MPTPs). Ως συνέπεια της διάνοιξης πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, διάφοροι παράγοντες που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα.





Σχήμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της μιτοχονδριακής πορείας του αποπτωτικού θανάτου και τα υποστρώματα των κασπασών

Ο κυριότερος και καλύτερα μελετημένος παράγοντας, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα είναι το κυτόχρωμα C, το οποίο είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III (UQH₂-αναγωγή του κυτοχρώματος C) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος C) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έχει φυσιολογικό ρόλο ανεξάρτητο από την αποπτωτική του δράση. Μετά την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα C παίρνει μέρος στο σχηματισμού ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου, που καλείται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα Apaf-1 (apoptotic-protease

activating factor), από το κυτόχρωμα C και από την προκασπάση-9, ενώ ο σχηματισμός του εξαρτάται από την παρουσία dATP ή ATP. Τόσο το αμινοτελικό άκρο του παράγοντα Araf-1, όσο και η προ-περιοχή της προκασπάσης-9 περιέχουν τις περιοχές στρατολόγησης των κασπασών CARDS, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, οδηγώντας στη σχάση της προκασπάσης-9. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, σχάζει με την σειρά της τις εκτελεστικές προκασπάσεις -3, -6 και -7, ενώ η ενεργή κασπάση-3 μπορεί να λειτουργήσει ενισχυτικά στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9, μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης του φαινομένου (Jiang and Wang, 2000, Shi, 2002). Πρέπει εδώ να σημειωθεί, πως η κυτταροπλασματική κασπάση-6 μπορεί να σχάσει την εναρκτήρια προκασπάση-8, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιεί τον προαποπτωτικό παράγοντα Bid και με τον τρόπο αυτό ενισχύεται αντροφοδοτούμενο περαιτέρω το μονοπάτι των μιτοχονδρίων (Cowling and Downward, 2002).

Οι υπόλοιπες εναρκτήριες προκασπάσεις (προκασπάση-8, -10 και -2) μπορούν να ενεργοποιηθούν από διαφορετικές πορείες, όπως αυτές που εμπλέκουν τους υποδοχείς θανάτου. Στο μονοπάτι αυτό σήματα θανάτου, όπως είναι ο προσδέτης του υποδοχέα Fas (Fas ligand, FasL) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α), αναγνωρίζονται ειδικά από τους αντίστοιχους υποδοχείς (Fas receptor και TNF-receptor) στην κυτταρική μεμβράνη. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί στη δέσμευση ειδικών περιοχών θανάτου, των FADD (Fas associated death domain) και TRADD (TNFR associated death domain), με αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωματωμάτων και την αποκάλυψη των DEDs (death effector domains) που αλληλεπιδρώντας με τα DEDs της προ-περιοχής των προκασπασών -8 ή -10, ενεργοποιούνται (Wang et al., 2005, Arnoult et al., 2003). Στην περίπτωση της προκασπάσης-2, η ενεργοποίηση πραγματοποιείται μετά από στρατολόγησή της από την πρωτεΐνη RIP (receptor-interacting protein) (Read et al., 2002). Ανάλογα με το είδος των κυττάρων, η ενεργοποιημένη πλέον κασπάση-8, -10 ή -2 μπορεί να προκαλέσει την σχάση και την ενεργοποίηση των υπόλοιπων κασπασών, είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη διαμεσολάβηση ειδικών παραγόντων.

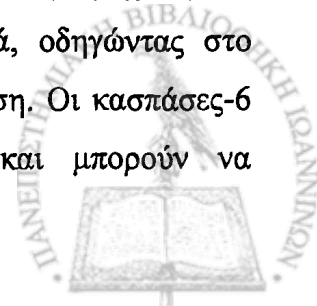


1.4.3.2 Υποστρώματα εκτελεστικών κασπάσων

Η εκτελεστική προκασπάση-3 αποτελεί έναν παράγοντα καίριας σημασίας για την αποπεράτωση του αποπτωτικού θανάτου. Εκτός από την κασπάση-9, που προαναφέρθηκε, η κασπάση-3 μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τις κασπάσες-8 και -10, ενώ είναι ικανή να αυτο-ενεργοποιηθεί (Yuan et al., 2002). Η ενεργοποιημένη πλέον κασπάση-3 έχει ως υποστρώματα τόσο τις προκασπάσες -6, -7 και -9, καθώς και ποικίλες άλλες πρωτεΐνες (ακτίνη, Gas, gelsolin κ.α), με συνέπεια να οδηγεί στον χαρακτηριστικό φαινότυπο των αποπτωτικών κυττάρων, δηλαδή τη συρρίκνωση τους και το σχηματισμό διογκώσεων στην κυτταρική μεμβράνη. Για παράδειγμα ένα από τα χαρακτηριστικά υποστρώματά της είναι η πρωτεΐνη Fordin, η σχάση της οποίας συνεπάγεται την αποκόλληση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από τον κυτταροσκελετό. Χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι και η θραυσματοποίηση του κυτταρικού DNA. Στην περίπτωση αυτή σημαντικό ρόλο παίζει ένα άλλο υπόστρωμα της εκτελεστικής κασπάσης-3, ο αναστολέας της εξαρτώμενης από τις κασπάσες δεοξυριβονουκλεάσης ICAD (inhibitor- of caspase-activated deoxyribonuclease). Όταν ο αναστολέας αυτός σχάζεται, απελευθερώνει τη δεοξυριβονουκλεάση CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), η οποία αποικοδομεί το κυτταρικό DNA (Enari et al., 1998).

Μια άλλη πρωτεΐνη που αποτελεί υπόστρωμα τόσο της κασπάσης-3 όσο και της κασπάσης-7 είναι η poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). Πρόκειται για μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 116 kDa, που παίρνει μέρος σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η πρωτεΐνη αυτή σχάζεται σε μια περιοχή DEVD↓G (μεταξύ των D και G) προς δύο θραύσματα, 24 kDa (αμινοτελικό άκρο, που περιέχει την περιοχή δεσμεύσεως στο DNA) και 89 kDa (καταλυτική περιοχή) (Kaufman et al., 1993). Η αλληλουχία DEVD αποτελεί κοινό συστατικό όλων των υποστρωμάτων της κασπάσης-3 και για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε το τεχνητό τετραπεπτίδιο Ac-DEVD-AMC, το οποίο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ενεργότητάς της (Yuan et al., 2002).

Παρά την εξαιρετική σημασία της κασπάσης-3 στην εκτέλεση της απόπτωσης, διαπιστώθηκε, πως σε κύτταρα στα οποία δεν εκφραζόταν (caspase-3^{-/-}) η σχάση των περισσότερων υποστρωμάτων της πραγματοποιούνταν κανονικά, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως δεν αποτελεί την μοναδική εκτελεστική κασπάση. Οι κασπάσες-6 και -7 εμφανίζουν υψηλή ομολογία με την κασπάση-3 και μπορούν να

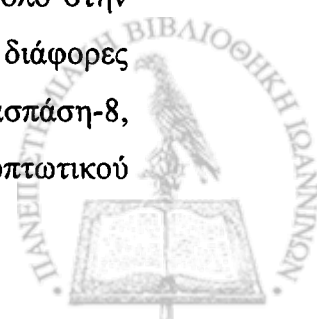


ενεργοποιηθούν από αυτή, αλλά και από άλλα ερεθίσματα. Οι δύο αυτές εκτελεστικές κασπάσες έχουν πολλά κοινά υποστρώματα με την κασπάση-3. Η κασπάση-6 μπορεί επιπλέον να σχάζει τη λαμίνη, μία δομική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, προκαλώντας έτσι συμπίκνωση της χρωματίνης (Cowling and Downward, 2002). Όταν τα διάφορα είδη υποστρωμάτων των εκτελεστικών κασπασών σχαστούν, το κύτταρο υπόκειται σε μια σειρά από αλλαγές, που καταλήγουν στον αποπτωτικό θάνατο.

1.4.3.3 Ρυθμιστικοί παράγοντες των κασπασών

Η ενεργοποίηση ή η απενεργοποίηση των κασπασών ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως είναι οι πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης IAP (inhibitor of apoptosis proteins), καθώς και οι πρωτεΐνες GrapB και Cgm. Οι IAP χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά σε κύτταρα εντόμων, τα οποία είχαν μολυνθεί από ένα βακιλλοϊό. Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από ένα ιϊκό γονίδιο και μπορούν να αναστείλουν την εκτέλεση της απόπτωσης των-κυττάρων ξενιστών. Όλα τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών IAP περιέχουν 1 με 3 αμινοτελικά βακιλλοϊϊκά επαναλαμβανόμενα τμήματα, τα οποία ονομάζονται BIR (baculovirus IAP repeat) και μία συντηρημένη καρβοξυτελική αλληλουχία, τη RING (really interesting new gene). Τα τμήματα BIR αποτελούν δομές, που μπορούν και δεσμεύουν ψευδάργυρο, ενώ μπορούν να δεθούν στην επιφάνεια των κασπασών, έτσι ώστε τα αμινοξέα, που βρίσκονται ανάμεσα στις επαναλήψεις BIR, να καλύπτουν τις καταλυτικές αύλακες των κασπασών. Η αλληλουχία RING φαίνεται να έχει την ικανότητα να καταλύει την σύνδεση της ουμπικιτίνης με διαφορετικές πρωτεΐνες, οπότε είναι πιθανό να διευκολύνει την αποικοδόμηση των κασπασών, στις οποίες συνδέονται οι IAP (Ugen et al., 1998, Yang et al., 2000). Η ενεργότητα των πρωτεϊνών IAP μπορεί να ανασταλεί από τις πρωτεΐνες Smac/DIABLO, που απελευθερώνονται μαζί με το κυτόχρωμα C από τα μιτοχόνδρια και οι οποίες μπορούν και δεσμεύονται ανταγωνιστικά στην θέση πρόσδεσης των IAP στην κασπάση-9.

Η Grap B είναι μία πρωτεάση, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυτοτοξικών T κυττάρων. Μπορεί και ενεργοποιεί διάφορες προκασπάσες, όπως είναι η προκασπάση-3, η προκασπάση-7, η προκασπάση-8, καθώς και οι προκασπάσες -9 και -10, οδηγώντας έτσι σε εκκίνηση του αποπτωτικού



θανάτου. Επίσης έχει αναφερθεί πως η Gran B μπορεί και σχάζει το Bid, προκειμένου να ενεργοποιήσει το μιτοχονδριακό μονοπάτι κυτταρικού θανάτου. Η ενεργότητα της πρωτεΐνης Gran B αναστέλλεται από την πρωτεΐνη Ctm A, η οποία προέρχεται από ιό, και αποτελεί επίσης ισχυρό αναστολέα της κασπάσης-1 και της κασπάσης-8, καθώς και ασθενή αναστολέα των κασπασών -3 και -6 (Adrain et al., 2005).

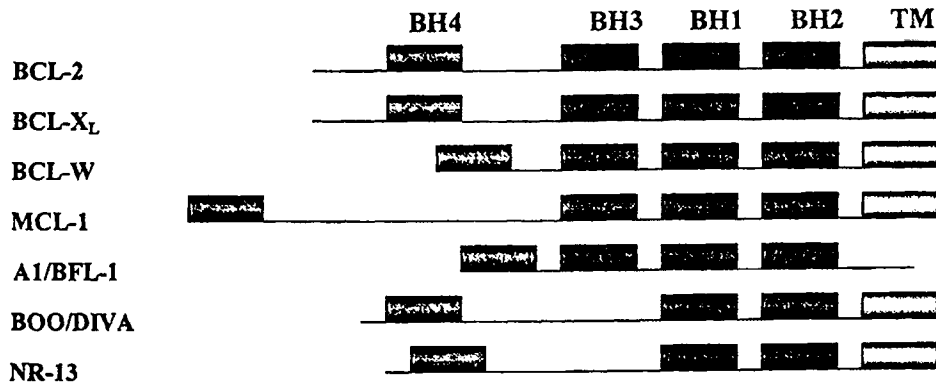
1.4.4 Η οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2

Η οικογένεια των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία, μιας και η ισορροπία ανάμεσα στη δράση των προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας αυτής καθορίζει την διάνοιξη πόρων διαπερατότητας στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα (Cory et al., 2002, Willis et al., 2003). Αρχικά μια σειρά από ερευνητικές εργασίες στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* αποκάλυψαν, ότι η πρωτεΐνη CED-9 (ομόλογη της Bcl-2) ρυθμίζει την ενεργοποίηση μιας κυστεϊνικής πρωτεάσης ασπαρτικού, η οποία αργότερα ονομάστηκε κασπάση (Vaux et al 1992). Έκτοτε χαρακτηρίστηκαν στα θήλαστικά περισσότερες από 25 συγγενείς πρωτεΐνες, οι οποίες μοιράζονται τουλάχιστον μία συντηρημένη Bcl-2 ομόλογη περιοχή (BH). Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορεί να εμπεριέχουν έως και 4 συντηρημένες ομόλογες περιοχές (BH), οι οποίες ονομάζονται BH1, BH2, BH3, και BH4, ενώ ανάλογα με τη λειτουργία τους, διαχωρίζονται σε αντιαποπτωτικές και προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Adams and Cory 1998; Kelekar and Thompson 1998; Reed 1998). Οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/BFL-1, BOO/DIVA και NR-13 αποτελούν τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας και προάγουν την κυτταρική επιβίωση, ενώ διαθέτουν 3 ή 4 περιοχές ομόλογης αλληλουχίας (BH1-4) (Σχήμα 8). Οι BH3-only πρωτεΐνες (οι πρωτεΐνες Bid, Bad, Bik/NBK, Blk, Hrk, Bim/Bod, NIP₃ και Nix/BNIP₃), οι οποίες, όπως φανερώνει και το όνομα τους, περιέχουν μόνο την περιοχή BH3, αποτελούν τη μία υποομάδα των προαποπτωτικών πρωτεϊνών. Μια επιπλέον υποομάδα των προαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, αποτελούν οι Bax, Bak, Bok/MTD και η BCL-X_s, οι οποίες ονομάζονται Bax-like πρωτεΐνες και συγγενεύουν με την Bcl-2 στις περιοχές BH1-3 (Σχήμα 8).



Οικογένεια ογκοπρωτεϊνών Bcl-2

Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες

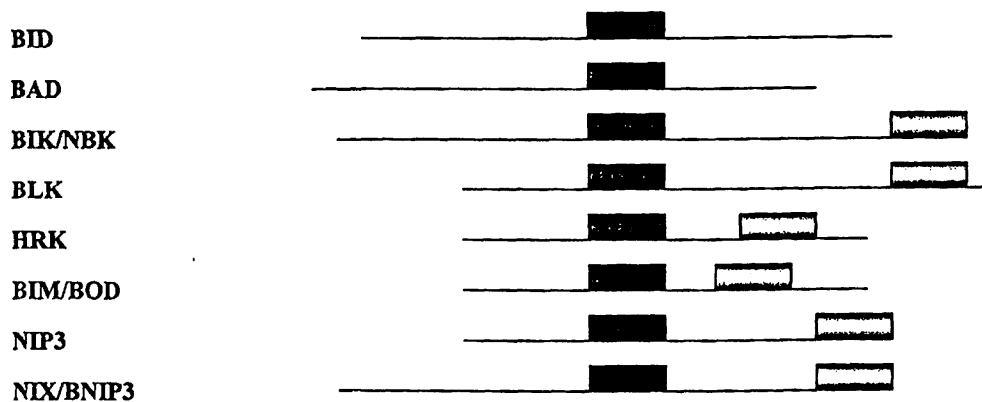


Προαποπτωτικές πρωτεΐνες

I) Bax-like πρωτεΐνες



II) BH3-only πρωτεΐνες



Σχήμα 8: Αντιαποπτωτικά και προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας ογκοπρωτεϊνών Bcl-2. Σημειώνονται οι ομόλογες περιοχές (BH1-4), καθώς και το υδροφοβικό καρβοξυτελικό άκρο (TM)



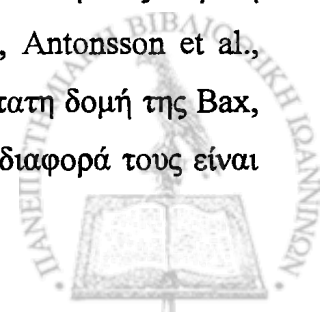
1.4.4.1 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2

Τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία, που προκαλείται από τα περισσότερα κυτταροτοξικά ερεθίσματα. Εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά μεμβρανών, όπως η εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και η μεμβράνη του πυρηνικού φακέλου, όπου συνδέονται με τη βοήθεια του υδρόφοβου καρβοξυτελικού τους άκρου. Η τρισδιάστατη δομή τους εμπεριέχει μια υδρόφοβη αύλακα, που σχηματίζεται από τις περιοχές BH1, BH2 και BH3, πάνω στην οποία μπορεί να δεσμευτεί η α-έλικα της BH3 μιας αλληλεπιδρούσας BH3-only πρωτεΐνης (Janíak et al., 1994) (Σχήμα 9A). Η Bcl-2 και η Bcl-X_L εμφανίζουν υψηλή ομολογία στην τριτοταγή δομή τους και εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, αναστέλλοντας έτσι τον ολιγομερισμό τους και τη διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια. Αυτό έχει ως συνέπεια την αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C και κατ' επέκταση της αποπτωτικής πορείας.

1.4.4.2 Bax-like πρωτεΐνες

Από τις πρωτεΐνες αυτής της υποομάδας η Bax και η Bak είναι οι πιο διαδεδομένες, ενώ η Bok βρίσκεται κυρίως στους ιστούς αναπαραγωγής. Απενεργοποίηση της Bax επηρέασε ελάχιστα την αποπτωτική διαδικασία, ενώ στην περίπτωση της Bak δεν προκάλεσε κάποιο εμφανές αποτέλεσμα. Παρ' όλα αυτά απενεργοποίηση και των δύο γονιδίων ταυτόχρονα προκάλεσε δραματική μείωση της απόπτωσης σε πολλούς ιστούς, αποκαλύπτοντας την αναγκαιότητα τουλάχιστον ενός εκ των δύο στην αποπτωτική διαδικασία (Cheng et al., 2001, Lindsten, et al., 2000, Wei et al., 2001). Τόσο η Bax όσο και η Bak θεωρείται ότι λειτουργούν κυρίως στα μιτοχόνδρια, ενώ αρκετό ενδιαφέρον εμφανίζει η πιθανή τους δράση στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Ειδικότερα η Bax, η οποία εξετάζεται στην παρούσα εργασία, αποτελεί κυτταροπλασματικό μονομερές στα υγιή κύτταρα, αλλά κατά την διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας αλλάζει διαμόρφωση και εισέρχεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου ολιγομερίζεται (Hsu et al., 1998, Antonsson et al., 2001, Mikhailov et al., 2001). Στο σχήμα 9B φαίνεται η τρισδιάστατη δομή της Bax, η οποία μοιάζει αρκετά με αυτή της πρωτεΐνης Bcl-X_L. Η κύρια διαφορά τους είναι

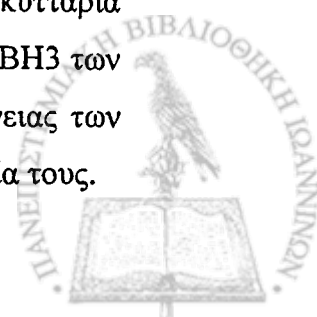


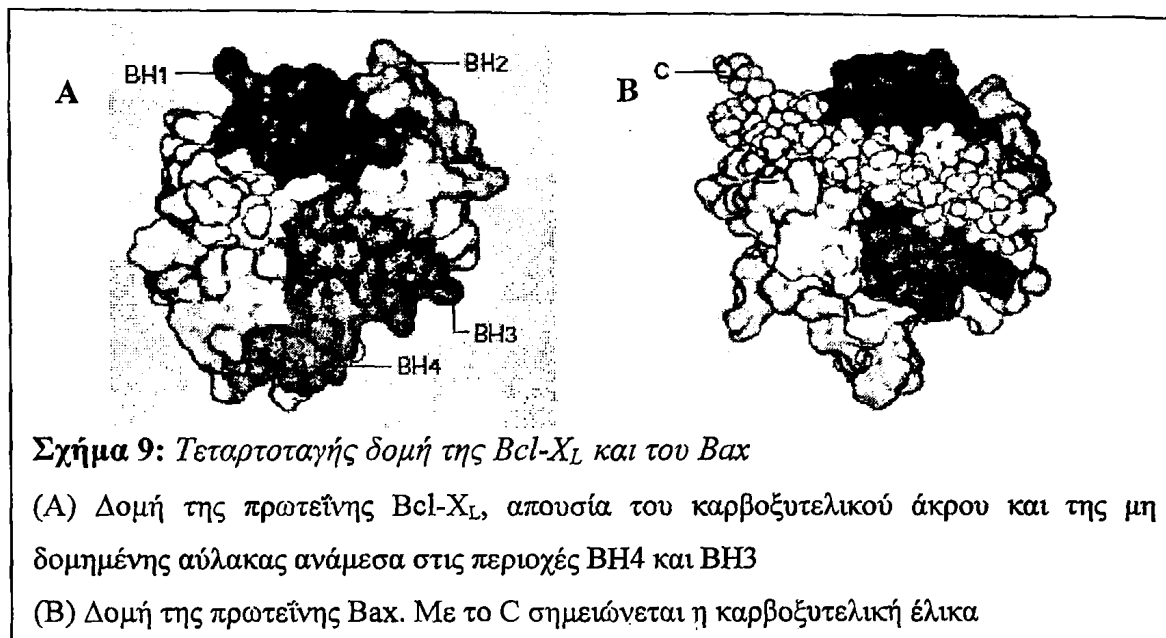
ότι η καρβοξυτελική έλικα της Bax είναι τοποθετημένη πάνω στην BH1/2/3 αύλακα. Από τη στιγμή που το καρβοξυτελικό άκρο είναι απαραίτητο για την εγκατάσταση των πρωτεϊνών Bcl-2 στα μιτοχόνδρια, είναι πιθανό η αλλαγή της θέσης αυτής της έλικας να αποτελεί την αλλαγή στη διαμόρφωση, που προκαλεί την μετατόπιση στα μιτοχόνδρια (σχήμα 9B). Τα ολιγομερή της Bax στη μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλούν ή τουλάχιστον συνεισφέρουν στη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων και στην απελευθέρωση των αποπτογενών παραγόντων, όπως είναι το κυτόχρωμα C. Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για τον ακριβή μηχανισμό σχηματισμού των πόρων από τα ολιγομερή της Bax. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει το σχηματισμό καναλιών και βασίζεται στη δομική της ομοιότητα με την τοξίνη της διφθέρια (Muchmore et al., 1996), καθώς και στο γεγονός ότι τα ολιγομερή της Bax σχηματίζουν πόρους, από τους οποίους μπορεί να διαπεράσει το κυτόχρωμα C (Antonsson et al., 2000, Korsmeyer et al., 2000). Εναλλακτικά η Bax θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με συστατικά του υπάρχοντος πόρου διαπερατότητας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεγαλύτερου καναλιού (Tsujiimoto et al., 2000, Zamzami et al., 2001).

Ο ακριβής μηχανισμός της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Bax, της μετατόπισής της από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και του ολιγομερισμού της δεν είναι ξεκάθαρος. Η επικρατούσα άποψη πάντως υποστηρίζει, πως η ρύθμιση της μετατόπισης της Bax πραγματοποιείται από την MAP κινάση JNK. Όσον αφορά στον ακριβή μηχανισμό ρύθμισης πιστεύεται πως πραγματοποιείται έμμεσα με φωσφορύλιωση της πρωτεΐνης Bim (επίσης μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2) (Putchu et al., 2003) ή των πρωτεϊνών ικρίώματος 14-3-3, οι οποίες στην αποφωσφορυλιωμένη μορφή τους συνδέονται με την Bax και την συγκρατούν στο κυτοσόλιο (scaffold protein) (Tsuruta et al., 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την άμεση φωσφορυλίωση της Bax από την JNK, ως το μηχανισμό ενεργοποίησής της.

1.4.4.3 BH3- only πρωτεΐνες

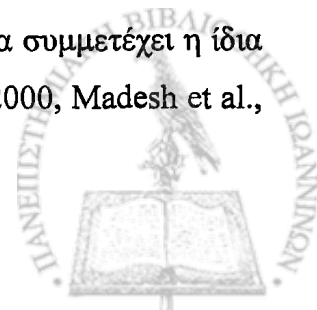
Οι BH3-only πρωτεΐνες περιέχουν μόνο την περιοχή BH3 και μπορούν να εκκινήσουν την αποπτωτική διαδικασία, ως απόκριση σε κάποια ενδοκυττάρια βλάβη. Φαίνεται πως η αμφιπαθής έλικα, που σχηματίζεται από την περιοχή BH3 των προαποπτωτικών πρωτεϊνών, δένεται σε μία υδρόφοβη αύλακα της επιφάνειας των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, αναστέλλοντας τη λειτουργία τους.





Παρά την προαποπτωτική τους δράση οι BH3-only πρωτεΐνες δεν μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, όταν η Bax ή η Bak απουσιάζουν (Zong et al., 2001, Cheng et al., 2001). Η καθεμία από αυτές τις πρωτεΐνες ρυθμίζεται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα η Bim και η Bmf στην ανενεργή τους μορφή είναι δεσμευμένες στις ελαφριές αλυσίδες της δυνεΐνης, που συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους ή την ακτίνη και κατά την ενεργοποίησή τους απελευθερώνονται και οδηγούνται στα μιτοχόνδρια (Puthalakath et al., 1999, Puthalakath et al., 2001). Μια διαφορετική περίπτωση είναι η αναστολή της λειτουργίας της Bad, μετά από φωσφορυλίωση από την Akt και δέσμευσή της στις 14-3-3 scaffold proteins (Zha et al., 1996)

Η πρωτεΐνη Bid βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σαν ανενεργό ζυμογόνο και ενεργοποιείται μετά από σχάση από την κασπάση-8. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με την Bax και την Bak προωθώντας την προαποπτωτική τους δράση (Li et al., 1998, Luo et al., 1998), ή να αναστείλει τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2. Έτσι το σχασμένο κομμάτι της Bid (truncated Bid, 15 kDa) μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, πιθανά λόγω τη έλξης από τις περιοχές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, που είναι πλούσιες σε καρδιολιπίνη (Lutter, et al., 2000). Εάν η Bax ή η Bak βρίσκονται ήδη εκεί, η Bid εξυπηρετεί στον ολιγομερισμό τους, έτσι ώστε να σχηματίσουν πόρους στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, χωρίς όμως να συμμετέχει η ίδια στα ολιγομερή, που σχηματίζονται (Chou et al., 1999, Wei et al., 2000, Madesh et al., 2002).



1.5 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιείται στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2001 με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων μελιών Ελληνικής προέλευσης να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Η μελέτη θα επεκταθεί στον εντοπισμό των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων και στην διερεύνηση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού της δράσης τους. Για το σκοπό αυτό ένας αριθμός συστατικών του μελιού αλλά και ενώσεις, που είναι γνωστό ότι ενυπάρχουν σε αυτό, θα εξετάσθουν ξεχωριστά στο ίδιο σύστημα μελέτης. Επιπλέον από τα συστατικά αυτά, κάποια επιλεγμένα φλαβονοειδή με μικρές δομικές διαφορές θα μελετηθούν ως προς την ικανότητα τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 , να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, καθώς και να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο, ούτως ώστε να διευκρινιστεί η βασική αρχή της δράσης τους. Παράλληλα με τις βλάβες στα επιμέρους βιολογικά συστατικά του κυττάρου, θα εξεταστεί και ο μηχανισμός με τον οποίο φλαβονοειδή μπορούν να επιδράσουν στη διαδικασία της απόπτωσης, που προκαλείται από το H_2O_2 . Ένα προς ένα τα βήματα του μονοπατιού της απόπτωσης θα μελετηθούν με σκοπό τον προσδιορισμό του ακριβούς σημείου δράσης των φλαβονοειδών.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από τις παρακάτω εταιρείες.

Sigma Company, St. Louis, MO, USA

Καλλιεργητικό υλικό (RPMI-1640, εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη), SDS (sodium dodecyl sulfate), οξειδάση της γλυκόζης (*Aspergillus niger*, 18000 U/gr), μετμοσφαιρίνη, ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphate]), Triton X-100, CHAPS (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate), διθειοθρεϊτόλη (DTT), pepstatin A, leupeptin, χρωστική Hoechst 33342, πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO), Trolox, θειϊκό αμμώνιο του σιδήρου, λουτεολίνη, 5-υδροξύφλαβόνη, 3-υδροξύφλαβόνη, 6-υδροξύφλαβανόνη, 7-υδροξύφλαβόνη και κατεχίνη.

Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England

Μονοκλωνικά αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού και έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθειϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA



Ορός από έμβρυο βοός (Fetal Calf Serum, FCS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως, PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride), πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και πρωτεΐνάση K.

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι των αμινοξέων 764-1014 του καρβοξυτελικού άκρου της poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)

Merck Company, Darmstadt, Germany

Βρωμιούχο αιθίδιο, κυανούν του τροπανίου (trypan blue), H₂O₂

Menzel-Glasert Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides)

Roche Diagnostics Company, Mannheim, Germany

Aprotinin

Boehringer Mannheim Company, Mannheim, Germany

RNAse-A

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)

Serva GmbH, Heidelberg, Germany

Αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως

Novartis Company, Basle, Switzerland

Desferrioxamine mesilate (DFO)

Cal. Biochem. Company, Schwalbach, Germany

Βαϊκαλεΐνη

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM)



R & D Systems

Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του κυτοχρώματος C

ROTH Company, Karlsruhe, Germany

Φλαβόνη, χρυσίνη, 7,8-διυδροξυφλαβόνη, απιγενίνη, γαλανγίνη, κεμφερόλη, φισετίνη, μορίνη, κερκετίνη, μυρικετίνη, ναριγενίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη

Ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή Prem Ponka (McGill University, Montreal, Canada). Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.



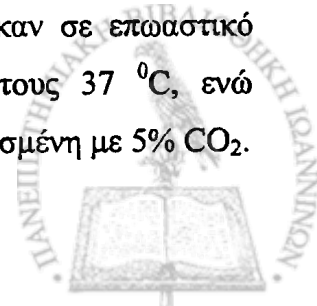
2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα Jurkat, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, διατηρήθηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατεψυγμένα σε δοχεία που περιείχαν υγρό άζωτο (-196°C). Η κυτταρική σειρά Jurkat προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Η διαδικασία κατάψυξης, που ακολουθήθηκε, ήταν η παρακάτω: Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα $700 \times g$ (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 5 λεπτά. Ακολούθησε επαναιώρηση σε 5 ml PBS και φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο διάλυμα κατάψυξης, που αποτελείται από 90% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) και 10% διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ένα ml του παραπάνω μίγματος ($5-7,5 \times 10^6$ κύτταρα) μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης, τα οποία ψύχθηκαν σταδιακά. Αρχικά τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο για 10 περίπου λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη -80°C για 48 ώρες, ενώ αργότερα τοποθετήθηκαν στο δοχείο υγρού αζώτου, όπου και διατηρήθηκαν. Η απόψυξή τους έγινε γρήγορα με τη μεταφορά του σωληναρίου κατάψυξης στους 37°C . Το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρήθηκε στα $700 \times g$ για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και καλλιεργήθηκαν στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες.

2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Τα κύτταρα Jurkat αναπτύχθηκαν σαν εναιώρημα σε RPMI-1640 το οποίο περιείχε 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ στρεπτομυκίνη. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37°C , ενώ επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO_2 .

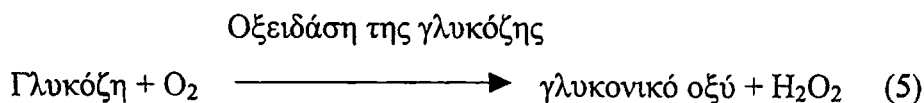


2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

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

2.2.4 Επώαση των κυττάρων

Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (250 x g, 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου), επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση $1,5 \times 10^6$ κύτταρα ανά ml και αφέθηκαν για 1,5 ώρα σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα προεπώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων μελιού (διαλυμένα σε μεθανόλη), δεσφεριοξαμίνης (διαλυμένη σε δισαπεσταγμένο H₂O) ή απομονωμένων συστατικών μελιού (διαλυμένα σε DMSO) για τα ενδεικνυόμενα σε κάθε περίπτωση χρονικά διαστήματα. Στο τελικό μίγμα προεπώασης η μέγιστη συγκέντρωση του διαλύτη δεν ξεπερνούσε το 3%. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε, ούτως ώστε να μην επηρεάζει την εκάστοτε μέθοδο, που χρησιμοποιήθηκε παρακάτω. Στην περίπτωση της μελέτης της βλάβης στο DNA ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη του θρεπτικού υλικού (5 mM) και O₂ και παράγει γλυκονικό οξύ και H₂O₂ σύμφωνα με την αντίδραση 5.



Η συγκέντρωση, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 600 ng/ ml, η οποία παράγει 12 μM H₂O₂ / λεπτό και ο χρόνος έκθεσης ήταν 10 λεπτά. Για τη μελέτη της απόπτωσης τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 250 μM H₂O₂, το οποίο προστέθηκε άμεσα στην κυτταρική καλλιέργεια για 6 ώρες.



Ο ρυθμός παραγωγής H_2O_2 από την οξειδάση της γλυκόζης προσδιορίστηκε σε φωτόμετρο (Schimadzu UV-3000, Kyoto, Japan). Διάφορες ποσότητες του ενζύμου προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος γλυκόζης (5 mM γλυκόζη σε PBS), σε θερμοκρασία $37\text{ }^\circ\text{C}$ και καταγράφηκε η απορρόφηση του μίγματος στα 240 nm για 15 περίπου λεπτά. Από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 (εκφρασμένος σε μM ανά λεπτό). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του H_2O_2 στα 240 nm είναι $43.6\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Η προσθήκη των φλαβονοειδών στο μίγμα της αντίδρασης, σε συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν, δεν επηρέασαν τον ρυθμό παραγωγής του H_2O_2 από την οξειδάση της γλυκόζης.

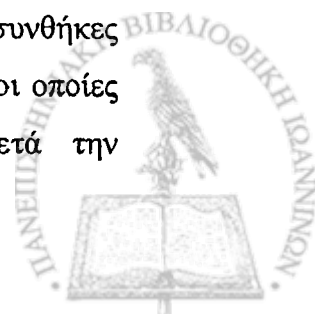


2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική της “ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πεκτητή αγαρόζης”, η οποία είναι γνωστή και ως “comet assay”. Η comet assay είναι μία απλή, εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μία αλυσίδα του κυτταρικού DNA. Η μέθοδος αυτή διαθέτει το πλεονέκτημα, ότι δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η βλάβη του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η πρώτη περιγραφή της “comet assay” πραγματοποιήθηκε από τους Ostling και Johanson, οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Ostling and Johanson, 1984). Λίγα χρόνια αργότερα οι Singh και συνεργάτες (Singh et al., 1988) τροποποίησαν την αρχική μορφή των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξη της μεθόδου. Από τη στιγμή που εμφανίστηκε μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει υποστεί διάφορες αλλαγές, με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητα της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η comet assay ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή τις διπλές αλυσίδες του DNA αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά από επώαση με κατάλληλα ένζυμα, που τις αναγνωρίζουν, απομακρύνονται και με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σχάσεις στο DNA, οι οποίες στη συνέχεια ανιχνεύονται με την comet assay.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, εκτιμήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Προκειμένου να γίνει αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ($pH > 13$), με αποτέλεσμα τη μετουσίωσή του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει τη μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την



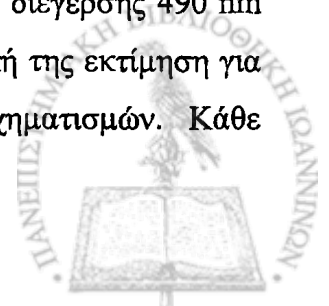
ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA, που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση, επανασηματίζονται. Έτσι οι σχηματισμοί, που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA, είναι στην πράξη “θηλιές” του DNA, που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικομένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

Πειραματική διαδικασία

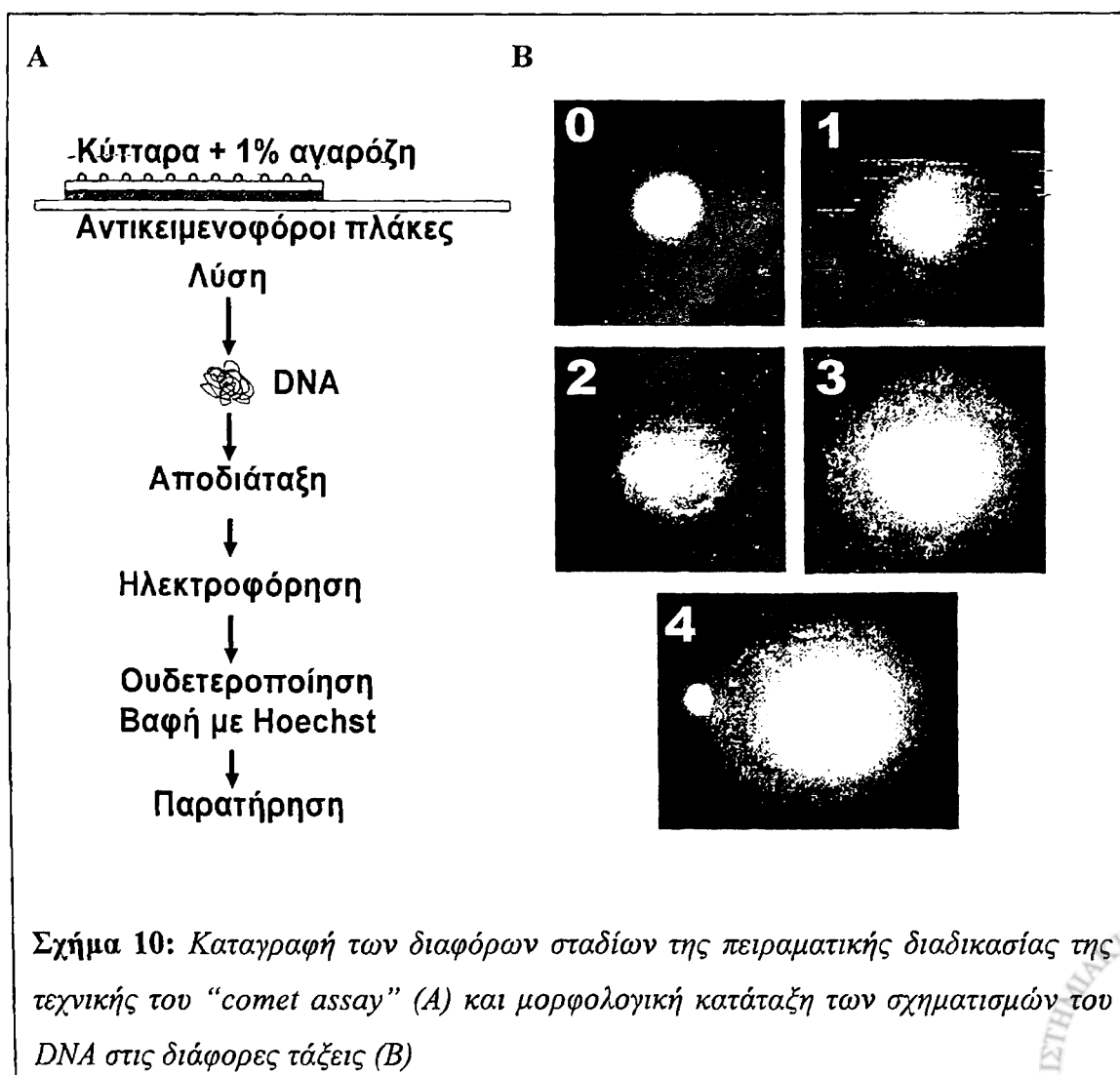
Μετά την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 , τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 450 x g (centrifuge 5415D, Eppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS), και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1% σε PBS), και σκεπάστηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για δέκα λεπτά, ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 μM Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 10) στους 4 °C. Στο στάδιο αυτό οι μεμβράνες και τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά διαλύονται, ενώ το DNA παραμένει εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης, υπερελικομένο και συσκευασμένο σε μία πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μία οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης, (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40 λεπτά, έτσι ώστε να ξεδιπλωθούν οι αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Στην συνέχεια η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30V, 300 mA) για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS (3 φορές από 5 λεπτά η κάθε μία) (Panayiotidis et al., 1999).

Αξιολόγηση των σχάσεων

Για την αξιολόγηση των σχάσεων πραγματοποιήθηκε χρώση του κυτταρικού DNA με προσθήκη 40 μl διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (2,5 μg/ml σε PBS) ανά πλάκα και παραμονή στο σκοτάδι για 10 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα. Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400. Η βλάβη δεν ήταν ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα βασίστηκε στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Κάθε

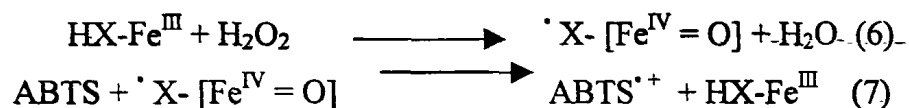


σχηματισμός κατατάχτηκε σε μία από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (σχήμα 10). Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε ολικά, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκε και εκφράζοντας τη βλάβη σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι η βλάβη του DNA λαμβάνει τιμές από 0 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 0) έως 400 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 4) αυθαίρετες μονάδες (Panayiotidis et al., 1999). Με αυτόν τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες. Η οπτική καταμέτρηση συσχετίζεται σχεδόν γραμμικά με άλλες παραμέτρους, όπως το επί τοις εκατό ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην «ουρά», το οποίο καθορίζεται με ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση ενός εξειδικευμένου προγράμματος (Collins et al., 1995, Duthie et al., 1998). Η μέτρηση των δειγμάτων και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε πάντα από το ίδιο πειραμένο άτομο, που χρησιμοποιεί ένα συγκεκριμένο τρόπο μετακίνησης της πλάκας.



2.3.2 Καθορισμός της ικανότητας εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών

Η ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες αξιολογήθηκε με τη χρήση μιας φωτομετρικής μεθόδου, η οποία βασίζεται στην ικανότητα ουσιών να μειώνουν την οξείδωση του ABTS στην αντίστοιχη ελεύθερη ρίζα (ABTS^{•+}). Η οξείδωση αυτή πραγματοποιείται από τις ελεύθερες ρίζες φερρυλικής-μυοσφαιρίνης, που παράγονται μετά την αλληλεπίδραση του H₂O₂ με την μετ-μυοσφαιρίνη (Rice-Evans et al., 1994). Ο σχηματισμός της ρίζας ABTS^{•+} εκτιμάται με την καταγραφή της απορρόφησης στα 600 nm, που εκφράζει την συγκέντρωσή της στο διάλυμα. Αν στο διάλυμα της αντίδρασης υπάρχει κάποια ουσία, που εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες, αντιδρά με τη ρίζα της φερρυλικής-μυοσφαιρίνης, αναστέλλοντας το σχηματισμό της ρίζας του ABTS και τελικά μειώνει τη μετρούμενη απορρόφηση. Η αρχή της μεθόδου περικλείεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



όπου $\text{HX-Fe}^{\text{III}}$ = Μετ-μυοσφαιρίνη

$\cdot\text{X-}[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ = Ελεύθερη ρίζα της φερρυλικής-μυοσφαιρίνης

ABTS = 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]

Πειραματική διαδικασία

Σε κυψελίδα τύπου Quartz, η οποία περιείχε 1 ml από το χρωμογόνο διάλυμα (φερρυλική-μυοσφαιρίνη και ABTS), προστέθηκαν 10 μM από το φλαβονοειδές ή την πρότυπη ένωση Trolox. Ακολούθησε προσθήκη H₂O₂ και μετά την πάροδο 3 λεπτών η απορρόφηση καταγράφηκε στα 600 nm. Τέλος η τιμή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) της κάθε ουσίας, η οποία εκφράζει την ικανότητά της να εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες σε ισοδύναμο του Trolox, ενός υδατοδιαλυτού αναλόγου της βιταμίνης E, υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

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

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

$\Delta\text{A τυφλού}$, η μεταβολή της απορρόφησης απουσία αντιοξειδωτικού.



2.3.3 Φασματοφωτομετρική ανάλυση της δέσμευσης σιδήρου από τα φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή δίνουν χαρακτηριστικά φάσματα στις περιοχές του υπεριώδους και του ορατού, δίνοντας δύο κορυφές, των οποίων το μήκος κύματος και η ένταση ποικίλουν, ανάλογα με τα ιδιαίτερα δομικά γνωρίσματα του καθενός. Η πρώτη κορυφή εμφανίζεται ανάμεσα στα 210 με 285 nm και αντιστοιχεί στον Α-δακτύλιο, ενώ η δεύτερη, που βρίσκεται ανάμεσα στα 300 με 550 nm, αντιστοιχεί στους δακτυλίους Β και C. Η αντιστοιχία αυτή είναι αδρή, αφού στην ουσία η μορφή της κάθε κορυφής επηρεάζεται συνολικά από τη δομή του φλαβονοειδούς. Όταν το μόριο αλλάζει μορφή, όπως για παράδειγμα συμβαίνει μετά από δέσμευση κάποιου μετάλλου, οι κορυφές αυτές μεταβάλλονται (Mira et al., 2002).

Με σκοπό τον έλεγχο της σιδηροδεσμευτικής δράσης των φλαβονοειδών, πραγματοποιήθηκε καταγραφή των φασμάτων τους ανάμεσα στα 210 και 550 nm, παρουσία άλατος σιδήρου σε αναλογία φλαβονοειδούς:άλατος 1:1, 1:2 και 1:3. Ακολούθησε σύγκριση των φασμάτων αυτών με τα φάσματα των αντίστοιχων φλαβονοειδών απουσία σιδήρου, και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές που συνέβησαν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δέσμευση σιδήρου εμφανίζεται στο φάσμα των φλαβονοειδών με μορφή «βαθυχρωμικής μετατόπισης», δηλαδή πτώσης της απορρόφησης και μετατόπισης της κορυφής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (Fernandez et al., 2002).

Πειραματική διαδικασία

Σε κυψελίδα τύπου Quartz, η οποία περιείχε 1 ml PBS, προστέθηκε το κάθε φλαβονοειδές σε τελική συγκέντρωση 25 μM και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα φάσματα από τα 210 έως τα 550 nm, σε θερμοκρασία δωματίου, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, και με τη χρήση φωτόμετρου Shimadzu UV-3000, με ταχύτητα καταγραφής 100 nm/min. Στη συνέχεια ο σίδηρος προστέθηκε με την μορφή του άλατος $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ σε αναλογία 1:1, 1:2 ή 1:3 και τα φάσματα καταγράφηκαν. Όλες οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν, έναντι του φάσματος 25 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

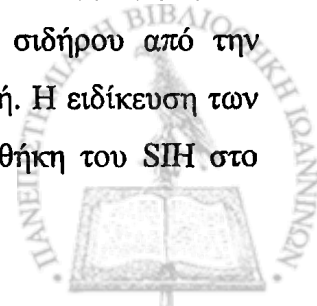


2.3.4 Μέτρηση δέσμευσης του ενδοκυττάριου σιδήρου

Ο προσδιορισμός του «ελεύθερου» σιδήρου, που ονομάζεται και LIP (Labile Iron Pool) πραγματοποιήθηκε, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν, με κάποιες μικρές τροποποιήσεις (Epsztejn et al., 1997). Η καλσεΐνη-AM αποτελείται από ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδεδεμένο με ένα μόριο EDTA. Το μόριο αυτό φέρει την ομάδα AM (ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης), προκειμένου να διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Στο εσωτερικό του κυττάρου ο εστερικός δεσμός υδρολύεται από μη εξειδικευμένες εστεράσες και αναστέλλεται η ικανότητα της καλσεΐνης να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευσή της. Επιπλέον, η απομάκρυνση της ομάδας αυτής την καθιστά ικανή να φθορίζει. Η σύνδεση της καλσεΐνης με δισθενή ιόντα μετάλλων (αναλογία 1:1) έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Με προσθήκη ισχυρότερων δεσμευτών σιδήρου, η καλσεΐνη χάνει το σίδηρο, που έχει προηγουμένως δεσμεύσει, και τότε αυξάνεται ο φθορισμός, της ανάλογα με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (Kakhlon et-al.; 2002).

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$) επωάστηκαν με $0,15 \mu\text{M}$ καλσεΐνη-AM για 10 λεπτά στους 37°C σε PBS που περιείχε 1mg/ml ορού βοός αλβουμίνης και 20mM ρυθμιστικού διαλύματος HEPES, pH 7,3. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση, ξεπλύθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε $2,2 \text{ml}$ του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, απουσία της καλσεΐνη-AM. Τα κύτταρα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενη κυβέττα (37°C), υπό ανάδευση, και ο φθορισμός της καλσεΐνης καταγράφηκε (excitation στα 488nm και emission στα 517nm) σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi). Τα φορτωμένα με καλσεΐνη κύτταρα έχουν μία ποσότητα φθορισμού (ΔF), η οποία αντιστοιχεί στην καλσεΐνη, που δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, και για το λόγο αυτό δε φανερώνεται. Η ποσότητα αυτή μπορεί να αποκαλυφτεί με την προσθήκη ενός εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή του SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone). Τα φλαβονοειδή προστέθηκαν άμεσα στην κυβέττα και η αύξηση στην απορρόφηση που καταγράφηκε θεωρήθηκε ότι καταδεικνύει την απόσπαση του σιδήρου από την καλσεΐνη και κατά συνέπεια τη δέσμευσή του από τα φλαβονοειδή. Η ειδικευση των φλαβονοειδών για σιδηροδέσμευση επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη του SIH στο



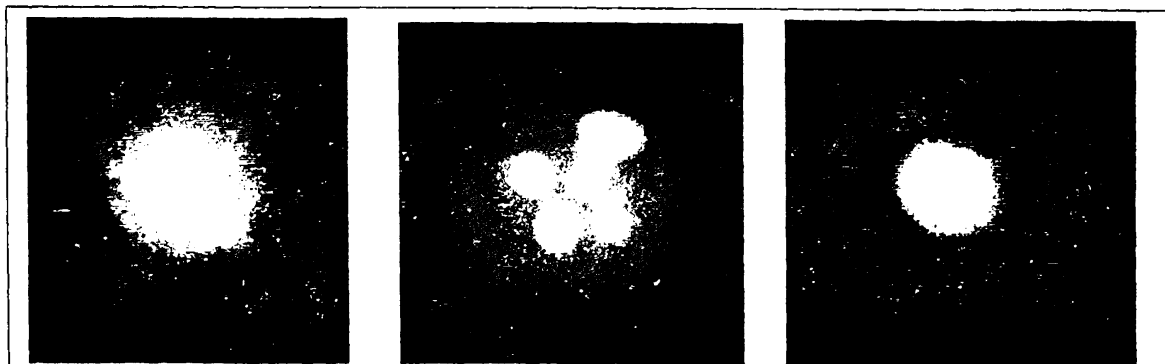
τελικό στάδιο του πειράματος, ούτως ώστε να καταγραφεί το ποσό του σιδήρου που περάμεινε δεσμευμένος στην καλσεΐνη, μετά την προσθήκη του φλαβονοειδούς.

2.3.5 Βαφή πυρήνων με Hoechst

Ένα από τα κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων είναι η συμπύκνωση και η θραυσματοποίηση της πυρηνικής χρωματίνης. Η πυρηνική μορφολογία παρατηρήθηκε μετά από βαφή των πυρήνων με Hoechst 33342 σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στο Σχήμα 11 φαίνονται ενδεικτικά φωτογραφίες πυρήνων μετά από βαφή με Hoechst 33342.

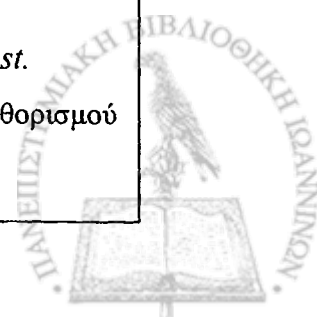
Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$), μετά την επώαση τους, ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS και επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml διαλύματος PBS. Ακολούθησε προσκόλληση τους για 15 λεπτά σε αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες ήταν καλυμμένες με διάλυμα 0,4 M πολυ-L-λυσίνης. Μετά την προσκόλληση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, με έκθεσή τους για 20 λεπτά σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδη σε PBS. Οι αλδεϋδικές ομάδες της παραφορμαλδεύδης εξουδετερώθηκαν με διάλυμα 50 mM NH_4Cl σε PBS για 15 λεπτά. Τέλος πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA με 35 μM Hoechst 33342. Η μορφολογία των πυρήνων εξετάστηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeiss) σε φίλτρο UV και μεγέθυνση x 400. Για να είναι εφικτή η σύγκριση της προκαλούμενης απόπτωσης, ο αριθμός των συμπυκνωμένων και των θραυσματοποιημένων πυρήνων καταμετρήθηκε και εκφράστηκε ως ποσοστό επι τοις εκατό πυρήνων ανά δείγμα.



Σχήμα 11: Χαρακτηριστικοί σχηματισμοί πυρήνων μετά από βαφή με Hoechst.

Οι πυρήνες φωτογραφήθηκαν μετά από βαφή με Hoechst 33342 σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeiss), φίλτρο UV και μεγέθυνση x 400

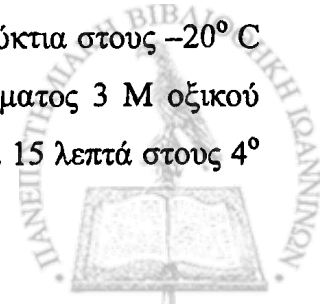


2.3.6 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των σχάσεων στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την εκχύλιση το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης και εμφανίζονται οι ζώνες του. Σε αντίθεση με το DNA των φυσιολογικών κυττάρων, που δεν μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρηση λόγω του υψηλού του μοριακού βάρους, το DNA των αποπτωτικών κυττάρων το οποίο σχάζεται από ειδικές ενδονουκλεάσες (Enari et al., 1998) εμφανίζει μια χαρακτηριστική μορφή με ευδιάκριτες ζώνες (ladder pattern) και οι οποίες είναι τμήματα DNA πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων. Αντίθετα, στο DNA των νεκρωτικών κυττάρων προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση και κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα αυτά μετατοπίζονται στην πηκτή και εμφανίζουν μια συνεχή ζώνη (smear). Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστεί η ενδονουκλεοσωμική σχάση, που είναι χαρακτηριστική του αποπτωτικού θανάτου, από την τυχαία σχάση στο DNA, που είναι αποτέλεσμα του νεκρωτικού θανάτου.

Απομόνωση του DNA

Μετά την επώαση τους 3×10^6 κύτταρα συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν 2 φορές με κρύο PBS (450- μ g, 4°C), επαναιωρήθηκαν σε 500 μ l διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 1% SDS, 0,1% NaCl), προστέθηκε διάλυμα 0,6 mg/ml πρωτεΐνάσης K 0,6 mg/ml και ακολούθησε ολονύκτια πέψη στους 37° C υπό ανάδευση. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου και αναδεύτηκαν ήπια για 1 ώρα. Το γαλάκτωμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στα 16000 x g για 10 λεπτά με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση, που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα από την οργανική φάση, ενώ η ενδιάμεση στοιβάδα περιέχει τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Η υδατική φάση συλλέχθηκε και επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα άλλες δύο φορές, ώστε να μη σχηματίζεται η ενδιάμεση πρωτεϊνική στοιβάδα. Ακολούθως αναμείχθηκε με 500 μ l χλωροφορμίου και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 16000 x g, ώστε να απομακρυνθεί η φαινόλη, που τυχόν παρέμεινε στο δείγμα. Η αποπρωτεϊνωμένη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη. Συγκεκριμένα επώαστηκαν ολονύκτια στους -20° C με 2 όγκους ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 15 λεπτά στους 4°



C και η στοιβάδα που κατακρημνίστηκε ξεπλύθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες με 70 % ψυχρής αιθανόλης για την απομάκρυνση αλάτων και μικρών οργανικών μορίων. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η στοιβάδα που περιείχε το DNA και το RNA, αφού ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Τέλος για την απομάκρυνση του RNA τα δείγματα επώαστηκαν στους 37° C για 2 ώρες με 50 μg απενεργοποιημένης RNάσης.

Ποσοτικοποίηση του DNA

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (φωτόμετρο MBA 2000, PERKIN ELMER) στην περιοχή του υπεριώδους. Τα νουκλεϊκά οξέα επιδεικνύουν μέγιστη απορρόφηση στα 260 nm, η οποία είναι περίπου ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA. Εμπειρικά υπολογίζεται ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50 μg/ml έχει A_{260} ίση με 1. Επιπλέον το πηλίκο A_{260}/A_{280} είναι χαρακτηριστικό για την καθαρότητα του DNA. Υψηλής-καθαρότητας DNA απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών ή RNA έχει $A_{260}/A_{280} \sim 1.8$. Μικρότερο πηλίκο αντιστοιχεί σε παρασκεύασμα που περιέχει ανάλογες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, ενώ, όταν το πηλίκο είναι ~ 2 , το δείγμα περιέχει RNA.

Ηλεκτροφόρηση του DNA

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA 20 μg αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 5:1 (v/v). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.02 % μπλε της βρωμοφαινόλης και 40 % γλυκερόλη σε TBE (89 mM Tris, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA pH 8,0). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του DNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,8 % σε TBE, στην οποία προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο- Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE σε συνθήκες 5 Volts/cm για περίπου 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα του DNA με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η αποθήκευση των αποτελεσμάτων έγινε με φωτογράφιση σε ψηφιακή κάμερα και μεταφορά σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (KODAK Digital Science 1D).



2.3.7 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

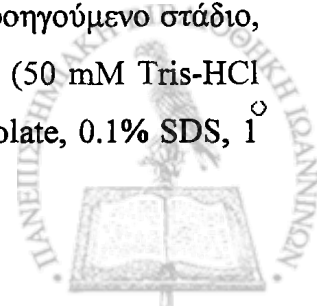
Ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα κύτταρα μετά την έκθεσή τους επαναιωρούνται σε ψυχρό διάλυμα λύσης, που περιείχε 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM DTT, 1mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin και aprotinin και 20 µg/ml leupeptin. Μετά από 10 λεπτά επώαση στον πάγο, τα κύτταρα λύθηκαν με επίδραση υπέρηχων (BRANSON Digital Sonifier) για 30 δευτερόλεπτα (3 φορές από 10 δευτερόλεπτα) και βράστηκαν για 10 λεπτά στους 65° C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C και το υπερκείμενο, που αντιστοιχεί στις ολικές πρωτεΐνες του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πυρηνικού ενζύμου PARP και των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot).

Διαχωρισμός μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του (Yang et al., 1997). Τα κύτταρα (80×10^6) μετά την επώαση επαναιωρήθηκαν σε πενταπλάσιο όγκο ψυχρού ισοτονικού με τα μιτοχόνδρια διαλύματος, που περιείχε 20 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 5 mM DTT, 250 mM σουκρόζη, 1 mM PMSF και 10 µg/ml aprotinin, pepstatin και leupeptin. Διαβιβάστηκαν 20 φορές μέσα από θραυσματοποιητή κυττάρων (EMBL, Mechanical Workshop), μέχρι το 60% τουλάχιστον των κυττάρων να γίνουν θετικά σε Trypan blue. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 700 x g, για 6 λεπτά στους 4° C, ώστε να απομακρυνθούν τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 10000 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Τα μιτοχόνδρια, που καταβυθίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες, ξεπλύθηκαν δύο φορές με το ίδιο ισοτονικό διάλυμα και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων, όπως αναφέρεται στην συνέχεια. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτεϊνών του υδατοδιαλυτού μέρους του κυτταροπλάσματος.

Στην συνέχεια τα μιτοχόνδρια, που απομονώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, λύθηκαν με επαναιώρηση για 15 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 % Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1



mM PMSF) και τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C και της πρωτεΐνης Bax με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στο υδατοδιαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος, το υπερκείμενο των 10000 x g από την απομόνωση των μιτοχονδρίων (~0,5 ml) φυγοκεντρείται περαιτέρω στα 100000 x g για 1 ώρα στους 4° C (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman). Στις συνθήκες αυτές καθιζάνουν άλλα οργανίδια του κυττάρου (όπως τα λυσοσωμάτια τα ριβοσωμάτια τα πολυσωμάτια αλλά και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες) και το υπερκείμενο που προκύπτει (S-100 κλάσμα) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C, των πρωτεϊνών Bax και Bid, καθώς και για το φθορισμομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας της κασπάσης-3.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

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

2.3.8 Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3

Η ενεργότητα της κασπάσης-3 μετρήθηκε φθορισμομετρικά, όπως περιγράφηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες του (Nicholson et al., 1995). Χρησιμοποιήθηκε το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin). Το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται από την ενεργοποιημένη κασπάση-3, της οποίας αποτελεί υπόστρωμα, και απελευθερώνεται η φθορίζουσα ουσία AMC. Επειδή το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται σε μικρότερο ποσοστό και από άλλες ενεργοποιημένες κασπάσες (-7, -6, -8, -10), η ενεργότητα που μετρείται με τη μέθοδο αυτή καλείται και caspase-3-like ή ενεργότητα DEVDase.



Πειραματική διαδικασία

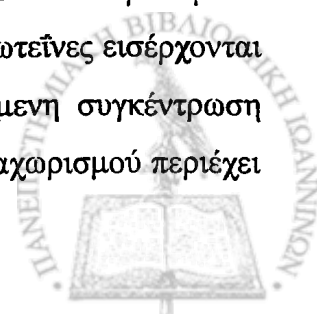
Το πρωτεϊνικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα (150 µg) επωάστηκε για 1 ώρα στους 37° C με το διάλυμα αντίδρασης (100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1 % CHAPS και 10 mM DTT), που περιείχε 100 µM του φθορογόνου υποστρώματος Ac-DEVD-AMC. Ο φθορισμός του AMC, που απελευθερώθηκε, μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi) με διέγερση στα 380 nm και εκπομπή στα 460 nm.

2.3.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Οι πρωτεΐνες, που απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής τους. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί προϊόν συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του N,N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου, ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ηλεκτρικά ουδέτερων, τρισδιάστατων πλεγμάτων, που το μέγεθος των πόρων τους εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο ((NH₄)₂S₂O₈, APS) με καταλύτη την N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), γι' αυτό και η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή δωδεκυλοθειικού νατρίου - πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Πειραματική διαδικασία

Το σύστημα της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel) και την πηκτή επιστοιβαξης (stacking gel), που παρασκευάστηκαν, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Στην πηκτή επιστοιβαξης γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος, πριν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, και περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH=6,8 και 0,1 % (w/v) APS και SDS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού, που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει



8, 10, 12 ή 15% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,39 M Tris pH=8,8, 0,1% SDS και APS. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C και των πρωτεϊνών Bid, Bcl-2, Bcl-X_L και Bax, οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πηκτή 15%, ενώ για την ανίχνευση της PARP σε πηκτή 8% SDS-ακρυλαμιδίου.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (50 µg) μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής, αφού πρώτα μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 3 λεπτά στους 100° C με το διάλυμα δείγματος. Το διάλυμα δείγματος (0,25 M Tris/HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% (w/v) γλυκερόλη, 0,2% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT) αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 (v/v) με το πρωτεϊνικό δείγμα και ο βρασμός διευκόλυνε την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών: το DTT ανήγαγε τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία περίπου 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εμφανίζουν περίπου το ίδιο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Έτσι η ταχύτητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στην πηκτή κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται μόνο από το μοριακό της βάρος. Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, οι οποίες έφεραν συνδεδεμένη χρωστική, εξυπηρετώντας τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ανάμεσα στο μοριακό βάρος και την απόσταση, που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 0,025 M Tris, 0,198 M γλυκίνη και 0,1 % SDS, στα 150 Volts για περίπου 1 ώρα (συσκευή MINI – PROTEAN II, BIO-RAD).

2.3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και διηθητικό χαρτί Whatman παρέμειναν για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (0,025 mM Tris, 0,190 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρθηκε πάνω από την πηκτή, τοποθετήθηκαν ανάμεσα από το χαρτί Whatman και όλα μαζί μεταφέρθηκαν σε συσκευή μεταφοράς (MINI TRANS – BLOT ELECTROPHORETIC TRANSFER CELL I, BIO – RAD), σχηματίζοντας ένα σάντουιτς με τη μεμβράνη να βρίσκεται



προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα μεταφοράς στα 250 mAmp για 4 ώρες ή στα 60 mAmp για 16 ώρες. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 0,45 μm. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη ξεπλύθηκε μια φορά με PBS. Για να εξεταστεί, εάν είχε λάβει χώρα σωστή μεταφορά από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και αν ίσες ποσότητες δείγματος είχαν φορτωθεί στην πηκτή, έγινε χρώση των πρωτεϊνών με 0.2 % Ponceau S σε 1% οξικό οξύ για 30 δευτερόλεπτα. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με νερό για μερικά δευτερόλεπτα και ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες, που μεταφέρθηκαν. Στη συνέχεια αποχρωματίστηκε με PBS και ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

Ανοσοαποτύπωση

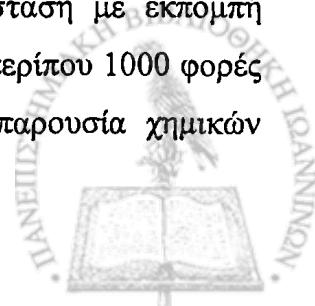
Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε υπό ανατάραξη με διάλυμα δέσμησης (blocking buffer), που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σε TBST (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl και 0,1% Tween-20) εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Η επώαση με το διάλυμα αυτό δεσμεύει όλες τις ελεύθερες θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε επίσης υπό ανατάραξη με ειδικό αντίσωμα, έναντι της κάθε πρωτεΐνης σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4° C. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών, συνδεδεμένο με υπεροξειδάση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας, που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση παρουσία H₂O₂ σε αλκαλικές συνθήκες σύμφωνα με την αντίδραση 8:



Αμέσως μετά την οξείδωση η λουμινόλη βρίσκεται στη διηγευμένη κατάσταση και στη συνέχεια καταλήγει στη θεμελιώδη κατάσταση με εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας. Η εκπομπή της ακτινοβολίας ενισχύεται περίπου 1000 φορές και η διάρκειά της παρατείνεται, όταν η αντίδραση γίνεται παρουσία χημικών



ενισχυτών όπως οι φαινόλες. Η μέγιστη ακτινοβολία, η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση, έχει μήκος κύματος 428 nm και ανιχνεύεται μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

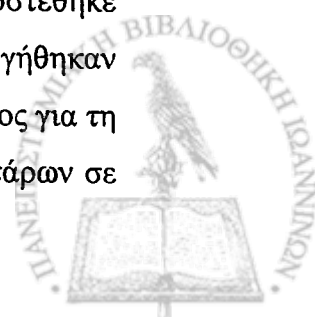
Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη, μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα, επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (0,125 ml υποστρώματος/cm² μεμβράνης) για 1 λεπτό. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για διάφορους χρόνους από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά την έκθεση το φιλμ εμφανίστηκε με τοποθέτηση στο διάλυμα εμφάνισης για 3 λεπτά και στη συνέχεια στο διάλυμα μονιμοποίησης για 7 λεπτά.

2.3.11 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων

Η σταθερότητα της μεμβράνης των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής, εξετάζοντας τη μετατόπιση της φθορίζουσας ουσίας πορτοκαλίτης ακριδίνης (acridine orange, AO) από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα (Yu et al., 2003, Person-et al., 2003). Το AO είναι φθορίζουσα ουσία, η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει κόκκινο φθορισμό, ενώ σε χαμηλές πράσινο (metachromatic fluorophore). Το AO είναι μία ασθενής βάση (pKa περίπου 10), η οποία πρωτονιώνεται ελάχιστα σε φυσιολογικό pH, αλλά πρωτονιώνεται και συσσωρεύεται σε οργανίδια με χαμηλό pH όπως τα λυσοσωμάτια (pH περίπου 4.5). Σε ανέπαφα κύτταρα το μεγαλύτερο μέρος του AO συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτια και φθορίζει έντονα κόκκινο και μόνο ένα μικρό του μέρος υπάρχει στο κυτταρόπλασμα, έχοντας ασθενή πράσινο φθορισμό. Επομένως, ο πράσινος φθορισμός του AO μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της σταθερότητας των λυσοσωματίων, αφού η αύξησή του θα σημαίνει τη μετανάστευση του AO από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια την αποσταθεροποίηση των οργανιδίων αυτών.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 λεπτά με 0.1 μg/ml AO (προστέθηκε απευθείας στο καλλιεργητικό υλικό) στους 37 °C και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για περίπου 45 λεπτά σε θρεπτικό μέσο χωρίς AO, ούτως ώστε να δοθεί χρόνος για τη συσσώρευση του AO στα λυσοσωμάτια και ακολούθησε η έκθεση των κυττάρων σε



H₂O₂. Με το πέρας της έκθεσης αυτής, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS, επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι την ανάλυσή τους. Η ανάλυση έγινε σε κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) και ο φθορισμός του AO καταγράφηκε με το πρόγραμμα CellQuest.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιολογική δράση εκχυλισμάτων μελιού

3.1.1. Προστατευτική ικανότητα εκχυλισμάτων μελιών ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το H₂O₂ στο πυρηνικό DNA

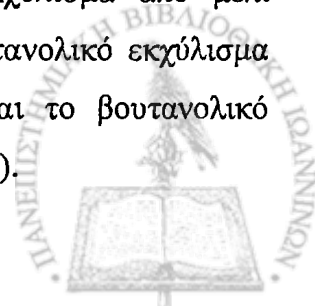
Στο πρώτο στάδιο της μελέτης αυτής ελέγχθηκε η ικανότητα εκχυλισμάτων μελιού από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, να προστατεύουν το DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H₂O₂. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων Jurkat (T-λεμφοκυτταρική καρκινική σειρά), που προεπώαστηκαν για 30 λεπτά με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, το οποίο, σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H₂O₂ (χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 600 ng/ml, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H₂O₂ ανά λεπτό). Στη συνέχεια έγινε αξιολόγηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA, χρησιμοποιώντας την ευαίσθητη τεχνική της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης ή “comet assay”, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Συνολικά εξετάστηκαν 15 εκχυλίσματα, τα οποία είχαν παρασκευαστεί στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η προστατευτική δράση τους αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της επί τοις εκατό μείωσης της βλάβης, που προκλήθηκε μετά από προεπώαση 30 λεπτών με 10 mg/ml από το κάθε εκχύλισμα. Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη, που προκαλείται στο DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά απουσία εκχυλίσματος σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα μάρτυρες είχαν σχάσεις στο DNA, πριν ακόμη εκτεθούν σε εξωγενές H₂O₂ (104 ± 7 αυθαίρετες μονάδες). Οι σχάσεις στο DNA αυξήθηκαν μετά από σύντομη έκθεση σε H₂O₂, φτάνοντας τις 311 ± 6, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά στην προαναφερόμενη ποσότητα του ενζύμου.



Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, τα οποία χαρακτηρίζονται από τη φυτική αλλά και τη γεωγραφική τους προέλευση, το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση, καθώς και η επί τοις εκατό μείωση της βλάβης του DNA, που προκλήθηκε μετά από επώαση με 10 mg/ml σκόνης των προστατευτικών εκχυλισμάτων. Έγινε φανερό ότι τέσσερα από τα 15 εκχυλίσματα, που ελέγχθηκαν είχαν προστατευτική δράση περιορίζοντας δραστικά τον αριθμό των σχάσεων που προκλήθηκαν από το H₂O₂. Κανένα από τα εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν με αυτή τη μέθοδο δεν είχε τοξικές επιπτώσεις στα κύτταρα στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Όλα τα εκχυλίσματα, τα οποία μπορούσαν να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H₂O₂, είχαν ως μέσο εκχύλισης την βουτανόλη. Η εκχύλιση με βουτανόλη, σε αντίθεση με αυτή που γίνεται με το διχλωρομεθάνιο, έχει ως συνέπεια την υψηλή περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων του μελιού σε φαινολικές ενώσεις που αυτό περιέχει. Είναι λογικό να συμπεράνει κανείς, πως η προστατευτική δράση των μελιών οφείλεται σε κάποια από τα φαινολικά συστατικά τους. Επιπλέον διαπιστώθηκε, πως η γεωγραφική προέλευση του κάθε μελιού έχει σημασία, αφού από τα μέλια Πορτοκαλιάς είχε προστατευτική δράση μόνο αυτό που προερχόταν από τη Λακωνία, ενώ από τα μέλια Πεύκου τα κύτταρα προστατεύσε μόνο αυτό που προερχόταν από την Εύβοια. Από την άλλη πλευρά το μέλι από έλατο ήταν προστατευτικό ανεξαρτήτως της γεωγραφικής του προέλευσης.

Στο σχήμα 12 φαίνεται η δράση των εκχυλισμάτων, που προσέφεραν προστασία. Προεπώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βουτανολικών εκχυλισμάτων από μέλι Πορτοκαλιάς Λακωνίας (σχήμα 12Α), μέλι Έλατου Βυτίνας (σχήμα 12Β), μέλι Έλατου Καρπενησίου (σχήμα 12Γ) και μέλι Πεύκου Εύβοιας (σχήμα 12Δ), πριν από την έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂, προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση της βλάβης στο κυτταρικό DNA. Η μέγιστη μείωση της βλάβης του κυτταρικού DNA παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με 10 mg/ml εκχυλίσματος, πριν από την έκθεσή τους, στην οξειδάση της γλυκόζης. Τη μεγαλύτερη προστατευτική δράση είχε το βουτανολικό εκχύλισμα από μέλι Έλατου Καρπενησίου, το οποίο στη συγκέντρωση 10 mg/ml προσέφερε 94% προστασία (σχήμα 12Γ, Πίνακας 2). Ακολούθησαν το βουτανολικό εκχύλισμα από μέλι Πορτοκαλιάς Λακωνίας (67% προστασία, σχήμα 12Α), το βουτανολικό εκχύλισμα από μέλι Πεύκου Εύβοιας (64% προστασία, σχήμα 12Δ) και το βουτανολικό εκχύλισμα από μέλι Έλατου Βυτίνας (46% προστασία, σχήμα 12Β).

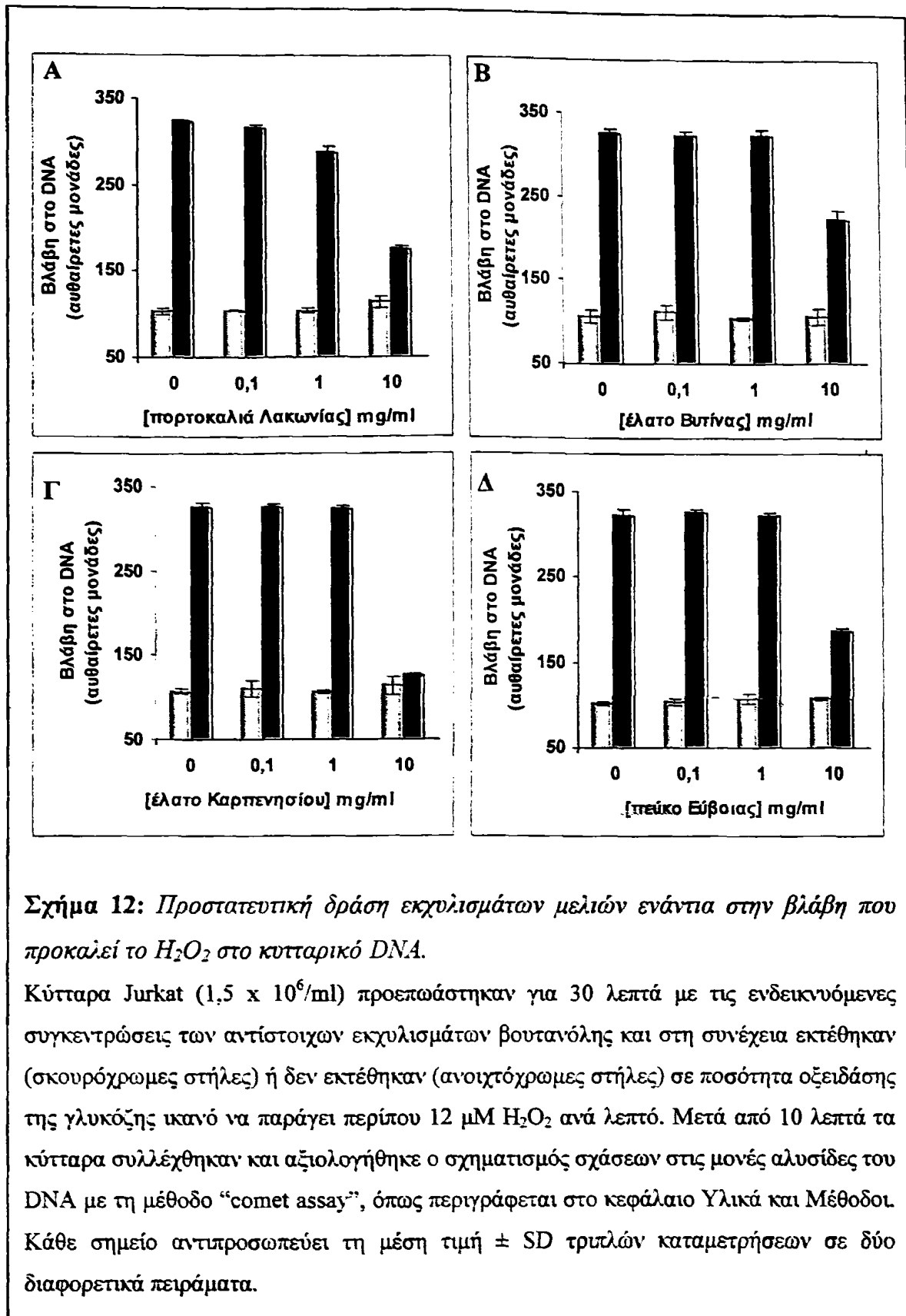


Φυτική προέλευση	Γεωγραφική προέλευση	Είδος διαλύτη	Προστατευτική δράση ^a (%)
Πορτοκαλιά	Λακωνία	Βουτανόλη	67
		Διχλωρομεθάνιο	0
	Άρτα	Βουτανόλη	0
	Άργος	Βουτανόλη	0
Θυμάρι	Κέα	Βουτανόλη	0
		Διχλωρομεθάνιο	0
	Κύθηρα	Βουτανολικό	0
		Διχλωρομεθάνιο	0
Πεύκο	Κρήτη	Βουτανόλη	0
	Μακεδονία	Βουτανόλη	0
		Διχλωρομεθάνιο	0
	Εύβοια	Βουτανόλη	64
Έλατο	Βυτίνα	Βουτανόλη	46
		Διχλωρομεθάνιο	0
	Καρπενήσι	Βουτανόλη	94

Πίνακας 2: Φυτική προέλευση, γεωγραφική προέλευση, είδος διαλύτη και προστατευτική δράση εκχυλισμάτων μελιού.

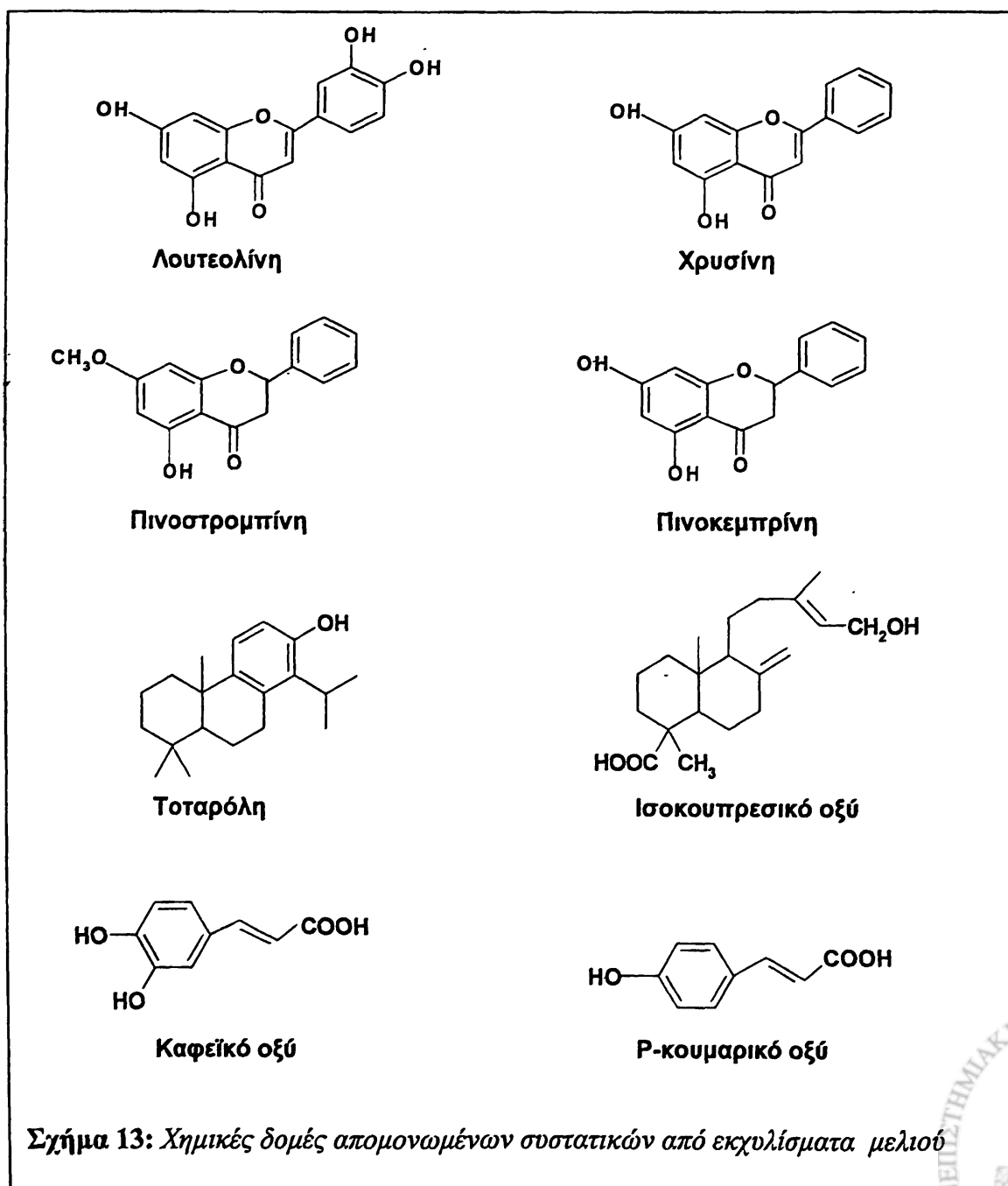
^a Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράστηκε ως η μείωση της επί τοις εκατό βλάβης στο DNA μετά από επώαση με 10 mg/ml των εκχυλισμάτων, όπως αυτή αξιολογήθηκε με την μέθοδο "comet assay". Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη που προκαλείται στο κυτταρικό DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά απουσία εκχυλίσματος σε 60ng/100μl οξειδάση της γλυκόζης. Οι αναγραφόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.





3.1.2. Προστατευτική ικανότητα απομονωμένων συστατικών του μελιού

Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψαν δύο ερωτήματα: α) ποια είναι τα βιοδραστικά συστατικά, που περιέχονται στο μέλι και ευθύνονται για την προστατευτική του δράση και β) ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός της προσφερόμενης προστασίας. Για το σκοπό αυτό, από τα εκχυλίσματα μελιού που έδειξαν προστασία απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή και ταυτοποιήθηκαν διάφορα συστατικά στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι δομές μερικών από αυτά φαίνονται στο σχήμα 13. Στη συνέχεια τα απομονωμένα συστατικά ελέγχθηκαν για την προστατευτική τους δράση στο σύστημα που προαναφέρθηκε.



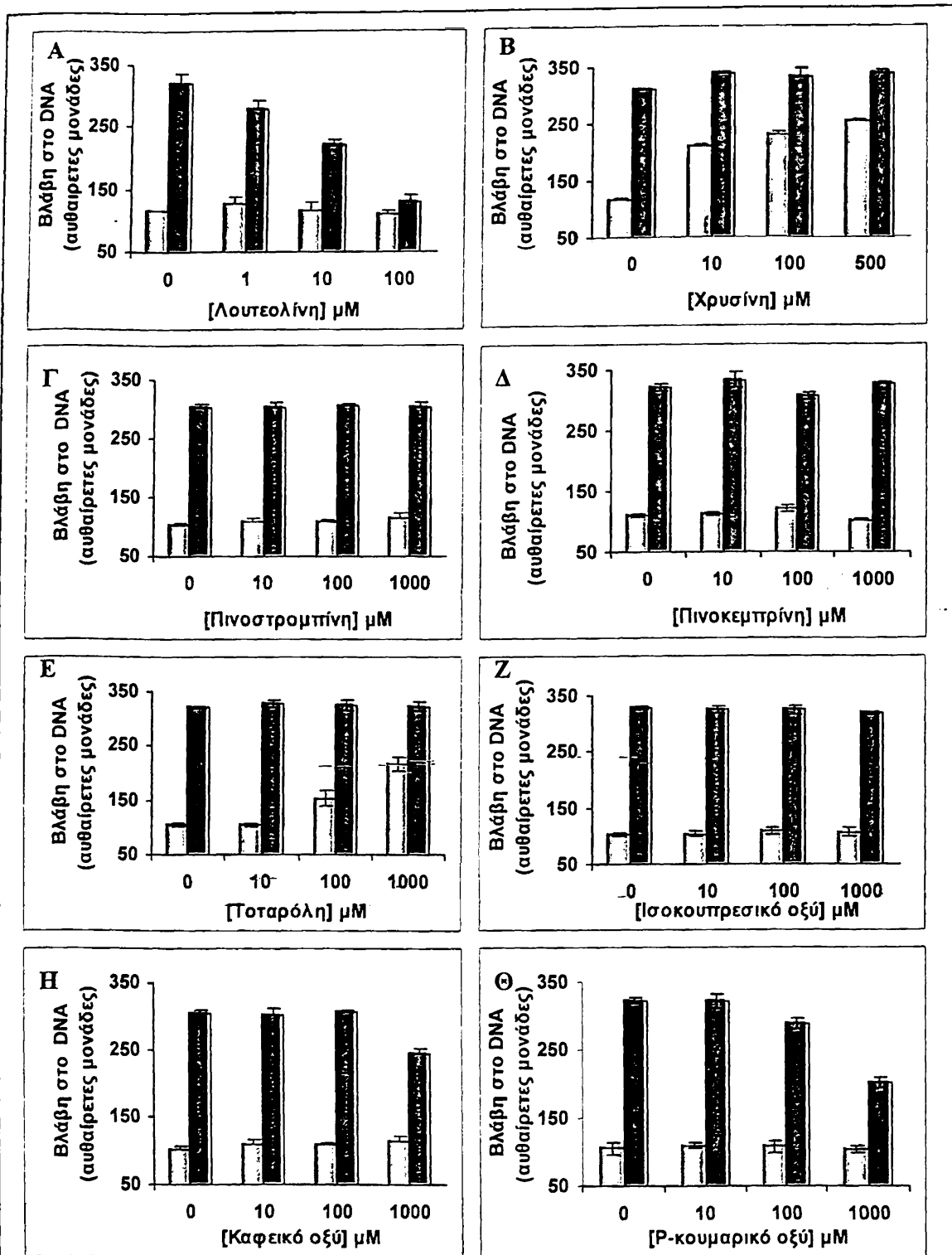
Σχήμα 13: Χημικές δομές απομονωμένων συστατικών από εκχυλίσματα μελιού



Όπως φαίνεται στο σχήμα 14Α η λουτεολίνη, μια πολυφαινολική ένωση που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, ήταν ικανή να προστατέψει το κυτταρικό DNA. Ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις του συστατικού αυτού των μελιών, μπορούσαν να προσφέρουν προστασία ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA. Παρά τη μεγάλη ομοιότητα που διαθέτει η δομή της λουτεολίνης με τις δομές των άλλων φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μέλι, δηλαδή τη χρυσίνη (σχήμα 14Β), την πινοκεμπρίνη (σχήμα 14Γ) και την πινοστρομπίνη (σχήμα 14Δ), κανένα από τα τρία αυτά φλαβονοειδή δεν προσέφερε προστασία στις υπό μελέτη συγκεντρώσεις. Αντίθετα μάλιστα η χρυσίνη μπορούσε να προκαλέσει βλάβη στο κυτταρικό DNA απουσία της έκθεσης σε H_2O_2 (σχήμα 14Β). Παρόμοια με την χρυσίνη και η τοταρόλη δεν προσέφερε προστασία ενώ ήταν τοξική για τα κύτταρα (σχήμα 14Ε). Από τα φαινολικά οξέα που απομονώθηκαν, το ισοκουμπρεσικό δεν προσέφερε προστασία στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (σχήμα 14Ζ). Αντίθετα το καφεϊκό οξύ είχε μικρή προστατευτική δράση στη συγκέντρωση 1000 μM (σχήμα 14Η), ενώ το Ρ-κουμαρικό οξύ προσέφερε σημαντικότερη προστασία στην ίδια συγκέντρωση (σχήμα 14Θ). Προκειμένου να συγκριθεί η προστατευτική δράση των συστατικών του μελιού, υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} (Inhibitory Concentration 50 %). Ως IC_{50} ορίζεται η συγκέντρωση της ουσίας, που όταν χρησιμοποιηθεί για επώαση, προσφέρει 50 τοις εκατό μείωση της βλάβης που προκαλείται στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 . Η λουτεολίνη, με IC_{50} ίσο με 19,5 μM είναι πενήντα φορές πιο προστατευτική από το Ρ-κουμαρικό οξύ (IC_{50} , 1079 μM) και εκατό περίπου φορές πιο προστατευτική από το καφεϊκό οξύ (IC_{50} , 2031 μM).

Είναι προφανές, ότι η προστατευτική δράση του κάθε είδους μελιού εξαρτάται από τις ιδιότητες των συστατικών που το αποτελούν. Το γεγονός ότι τα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις εκχυλίσματα βουτανόλης προσέφεραν προστασία οδήγησε στην απομόνωση κάποιων συστατικών τους και από τη μελέτη της δράσης τους προέκυψε το συμπέρασμα, ότι ορισμένα συστατικά παρέχουν ισχυρότερη προστασία, ενώ άλλα δεν είναι προστατευτικά αλλά μπορούν να προκαλούν από μόνα τους σχάσεις στο DNA. Τη μεγαλύτερη προστασία προσέφερε το φλαβονοειδές λουτεολίνη και για το λόγο αυτό τα φλαβονοειδή επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη, έτσι ώστε να διερευνηθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους.





Σχήμα 14: Δράση των απομονωμένων συστατικών από μέλι ενάντια στην βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA.

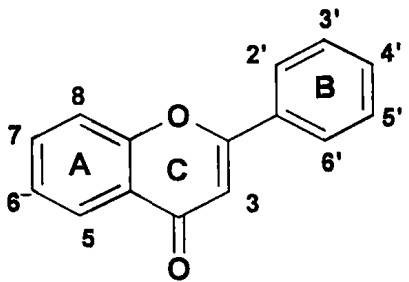
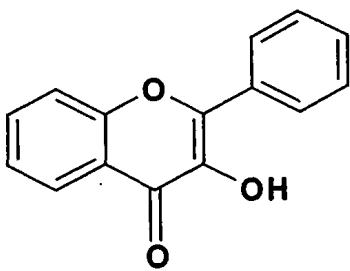
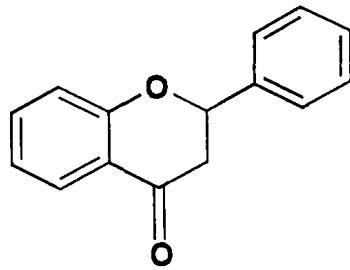
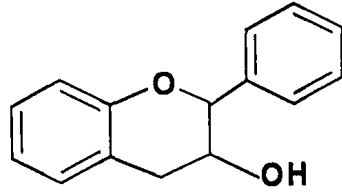
Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6/ml$) προεπεώσθησαν για 15 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις των αντίστοιχων ουσιών και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε ποσό οξειδάσης της γλυκόζης ικανό να παράγει περίπου $12 \mu M H_2O_2$ ανά λεπτό (σκουρόχρωμες και ανοιχτόχρωμες στήλες αντίστοιχα). Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο "comet assay". Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm SD$ τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.



3.2 Προστασία του πυρηνικού DNA από επιλεγμένα φλαβονοειδή

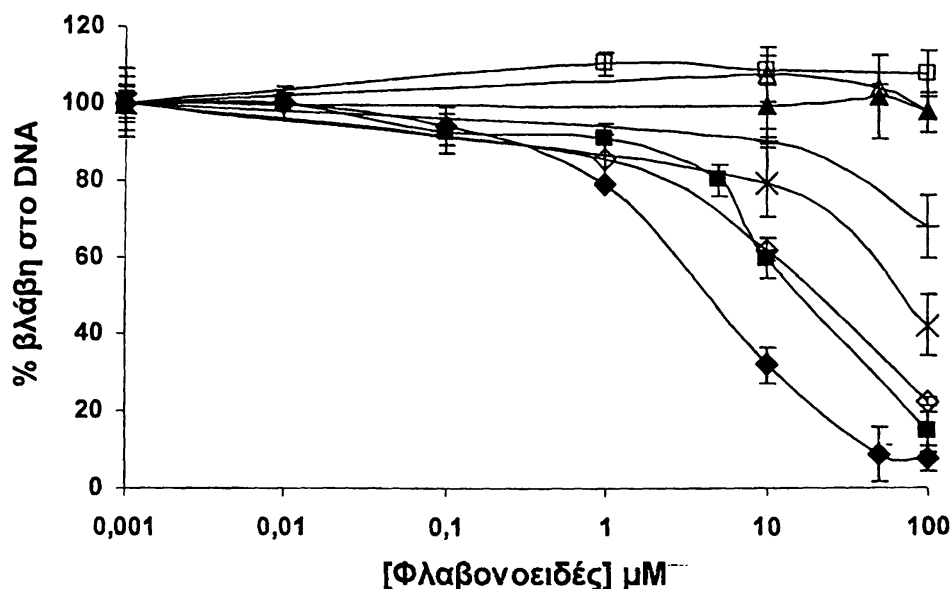
3.2.1. Προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες στο κυτταρικό DNA

Στη συνέχεια, έγινε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί η συσχέτιση της χημικής δομής με τη δράση ορισμένων φλαβονοειδών. Ανάμεσα στην πληθώρα των φλαβονοειδών, που υπάρχουν στην φύση, επιλέχθηκαν προς μελέτη ορισμένα με ελάχιστες χαρακτηριστικές δομικές διαφορές (σχήμα 15), έτσι ώστε να καταγραφούν τα δομικά γνωρίσματα των φλαβονοειδών που είναι απαραίτητα για την προστασία.

	Φλαβόνες	Υδροξυλικό υποκαταστάτες
	Φλαβόνη 5-υδροξυφλαβόνη 7-υδροξυφλαβόνη Χρυσίνη 7,8-διυδροξυφλαβόνη Βαϊκαλεΐνη Απιγενίνη Λουτεολίνη	- 5 7 5,7 7,8 5,6,7 5,7,4' 5,7,3',4'
	3-υδροξυφλαβόνη Γαλανγίνη Κεμφερόλη Φισετίνη Μορίνη Κερκετίνη Μυρικετίνη	3 3,5,7 3,5,7,4' 3,7,3',4' 3,5,7,2',4' 3,5,7,3',4' 3,5,7,3',4',5'
	Φλαβονόνες 6-υδροξυφλαβανόνη Ναριγενίνη Εριδικτυόλη Ταξιφολίνη	6 5,7,4' 5,7,3',4' 3,5,7,3',4'
	Φλαβανοτριόλες Κατεχίνη	3,5,7,3',4'

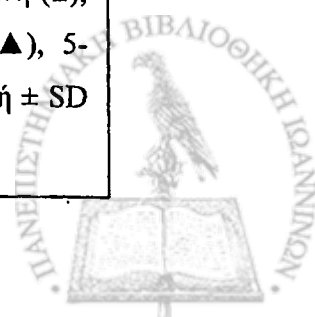
Σχήμα 15: Χημική δομή των φλαβονοειδών, που μελετήθηκαν

Στο σχήμα 16 φαίνεται, πως αρκετά από τα φλαβονοειδή, που μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις ανάμεσα στο 1 και στα 100 μM , προσέφεραν αξιόλογη προστασία ενάντια στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2 . Υπήρξαν παρόλα αυτά ορισμένα, που προσέφεραν προστασία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ κάποια άλλα δε προστάτευαν καθόλου το κυτταρικό DNA στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.



Σχήμα 16: Προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στη βλάβη του DNA

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του κάθε φλαβονοειδούς και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ποσό οξειδάσης της γλυκόζης ικανό να παράγει περίπου $12 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο "comet assay", όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η επιπλέον βλάβη, που προκαλείται στο κυτταρικό DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά απουσία φλαβονοειδούς σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης. Κατά μέσο όρο οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες ανέπαφων κυττάρων είναι 104 ± 7 αυθαίρετες μονάδες και φτάνουν τις 311 ± 6 , όταν τα κύτταρα εκτεθούν στην προαναφερόμενη ποσότητα του ένζυμου. Στο διάγραμμα φαίνονται αντιπροσωπευτικά κάποια από τα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν: 7,8-διυδροξυφλαβόνη (♦), γαλανγίνη (■), λουτεολίνη (◇), 3-υδροξυφλαβόνη (x), εριοδικτυόλη (+), 7-υδροξυφλαβόνη (▲), 5-υδροξυφλαβόνη (Δ) και απιγενίνη (□). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα.



Στον Πίνακα 3 (στήλη 3) φαίνεται η προστατευτική ικανότητα του κάθε φλαβονοειδούς, όπως εκφράζεται με τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} . Τα παρακάτω φλαβονοειδή είχαν ισχυρή προστατευτική δράση (τιμές IC_{50} ανάμεσα σε 1 και 100 μM): 7,8-διϋδροξυφλαβόνη (IC_{50} , $5,2 \pm 0,8 \mu M$), κερκετίνη ($5,4 \pm 1,2 \mu M$), γαλανγίνη ($18,5 \pm 1,5 \mu M$), λουτεολίνη ($19,5 \pm 2,1 \mu M$, η τιμή IC_{50} της αγορασμένης ένωσης δεν απέκλειε από την τιμή της απομονωμένης), μυρικετίνη ($21,3 \pm 0,5 \mu M$), βαϊκαλεΐνη ($24,5 \pm 0,8 \mu M$), φισετίνη ($41 \pm 1,2 \mu M$), και 3-υδροξυφλαβόνη ($88,5 \pm 5,5 \mu M$). Από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή ορισμένα προσέφεραν προστασία σε υψηλές συγκεντρώσεις (τιμές IC_{50} από 100 έως 500 μM), όπως η κεμφερόλη (IC_{50} , $195,1 \pm 5,9 \mu M$), η εριοδικτυόλη ($198 \pm 3,1 \mu M$), η ταξιφολίνη ($257 \pm 4,4 \mu M$) και η μορίνη ($496,2 \pm 5,2 \mu M$), ενώ η φλαβόνη, η 5-υδροξυφλαβόνη, η 7-υδροξυφλαβόνη, η χρυσίνη, η απιγενίνη, η 6-υδροξυφλαβανόνη, η ναριγενίνη και η κατεχίνη ήταν αναποτελεσματικές σε συγκεντρώσεις μέχρι και 500 μM .

Από τη σύγκριση των επιμέρους δομών των φλαβονοειδών, με την ικανότητα τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις βλάβες που προκαλεί το H_2O_2 , μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα για τα δομικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών. Ορισμένες από τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στο σχήμα 17. Η μόνη δομική διαφορά για παράδειγμα ανάμεσα στην μορίνη και την κερκετίνη (σχήμα 17A), είναι το γεγονός ότι στο δεύτερο φλαβονοειδές τα δύο υδροξύλια του φαινολικού δακτυλίου B βρίσκονται σε όρθο- θέση μεταξύ τους, ενώ στην πρώτη όχι. Το γεγονός αυτό είναι αρκετό, για να προκαλέσει μείωση του IC_{50} και κατ' επέκταση αύξηση της προστατευτικής δράσης από τα 496,2 μM (μορίνη) στα 5,4 μM (κερκετίνη). Οι δομές της χρυσίνης και της γαλανγίνης διαφέρουν στην παρουσία ενός μόνο υδροξυλίου, που εμφανίζεται στην θέση 3 του μορίου της γαλανγίνης. Στο υδροξύλιο αυτό αποδίδεται η προστατευτική δράση της γαλανγίνης ($IC_{50} = 18,5 \mu M$), μιας και η χρυσίνη, από τη δομή της οποίας απουσιάζει δεν μπορεί να προστατεύσει το πυρηνικό DNA (σχήμα 17B). Στην τελευταία σύγκριση (σχήμα 17Γ) αποκαλύπτεται η σπουδαιότητα του C2-C3 διπλού δεσμού στο δακτύλιο C, αφού η παρουσία του στο μόριο της λουτεολίνης την καθιστά δέκα περίπου φορές πιο προστατευτική από την εριοδικτυόλη (τιμές IC_{50} 19,5 και 198 μM αντίστοιχα).

Από τις παραπάνω, καθώς και από άλλες συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψε ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την



ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	ΘΕΣΕΙΣ -OH	IC ₅₀ (μM) ^a	EC ₅₀ (μM) ^b	TEAC (mM Trolox) ^c	LogP ^d
Φλαβόνες					
Φλαβόνη	–	Δ.Π.	Δ.Π.	0,03 ± 0,01	Δ.Μ.
5-υδροξυφλαβονη	5	Δ.Π.	Δ.Π.	0,93 ± 0,15	Δ.Μ.
7-υδροξυφλαβονη	7	Δ.Π.	Δ.Π.	0,15 ± 0,01	Δ.Μ.
Χρυσίνη	5,7	Δ.Π.	Δ.Π.	0,98 ± 0,04	2,67
7,8-διυδροξυφλαβόνη	7,8	5,2 ± 0,8	17	4,27 ± 0,21	Δ.Μ.
Βαϊκαλεΐνη	5,6,7	24,5 ± 0,8	Δ.Μ.	1,93 ± 0,04	1,31
Απιγενίνη	5,7,4'	Δ.Π.	Δ.Π.	1,04 ± 0,06	1,70
Λουτεολίνη	5,7,3',4'	19,5 ± 2,1	21	2,51 ± 0,12	2,05
Φλαβονόλες					
3-υδροξυφλαβονη	3	88,5 ± 5,5	40	3,82 ± 0,07	Δ.Μ.
Γαλαγγίνη	3,5,7	18,5 ± 1,5	18,5	1,93 ± 0,19	2,86
Κεμφερόλη	3,5,7,4'	195,1 ± 5,9	151,2	1,98 ± 0,13	2,72
Φισετίνη	3,5,3',4'	41,0 ± 1,2	42	4,10 ± 0,15	2,20
Μορίνη	3,5,7,2',4'	496,2 ± 5,2	398	2,62 ± 0,23	0,66
Κερκετίνη	3,5,7,3',4'	5,4 ± 1,2	13	4,30 ± 0,16	2,26
Μυρικετίνη	3,5,7,3',4',5'	21,3 ± 0,5	15,1	2,45 ± 0,35	1,71
Φλαβανόνες					
6-υδροξυφλαβανόνη	6	Δ.Π.	Δ.Π.	2,29 ± 0,11	Δ.Μ.
Ναριγενίνη	5,7,4'	Δ.Π.	Δ.Π.	0,59 ± 0,08	2,05
Εριοδικτυόλη	5,7,3',4'	198,0 ± 3,1	202	1,96 ± 0,05	1,55
Ταξιφολίνη	3,5,7,3',4'	257,0 ± 4,4	>500	2,43 ± 0,12	1,24
Φλαβανοτριόλες					
Κατεχίνη	3,5,7,3',4'	Δ.Π.	Δ.Μ.	2,42 ± 0,07	0,08

Πίνακας 3: Δομικά χαρακτηριστικά και τιμές IC₅₀, TEAC, EC₅₀ και LogP των φλαβονοειδών, που μελετήθηκαν

^a Οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν από τριπλή μέτρηση τριών διαφορετικών πειραμάτων, όπως περιγράφεται στο σχήμα 16, και αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του φλαβονοειδούς, η οποία προσέφερε 50% προστασία ενάντια στη βλάβη, που προκαλείται από το H₂O₂ στο DNA.

^b Οι τιμές EC₅₀ υπολογίστηκαν από δύο διαφορετικά πειράματα για κάθε συγκέντρωση και αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του φλαβονοειδούς, η οποία απέσπασε 50% από το σίδηρο, που είναι δεσμευμένος στην καλσεΐνη.

^c Οι τιμές TEAC υπολογίστηκαν με το σύστημα μιοσφαιρίνης/H₂O₂-ABTS, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ±SD μετά από τριπλή καταμέτρηση δύο διαφορετικών πειραμάτων.

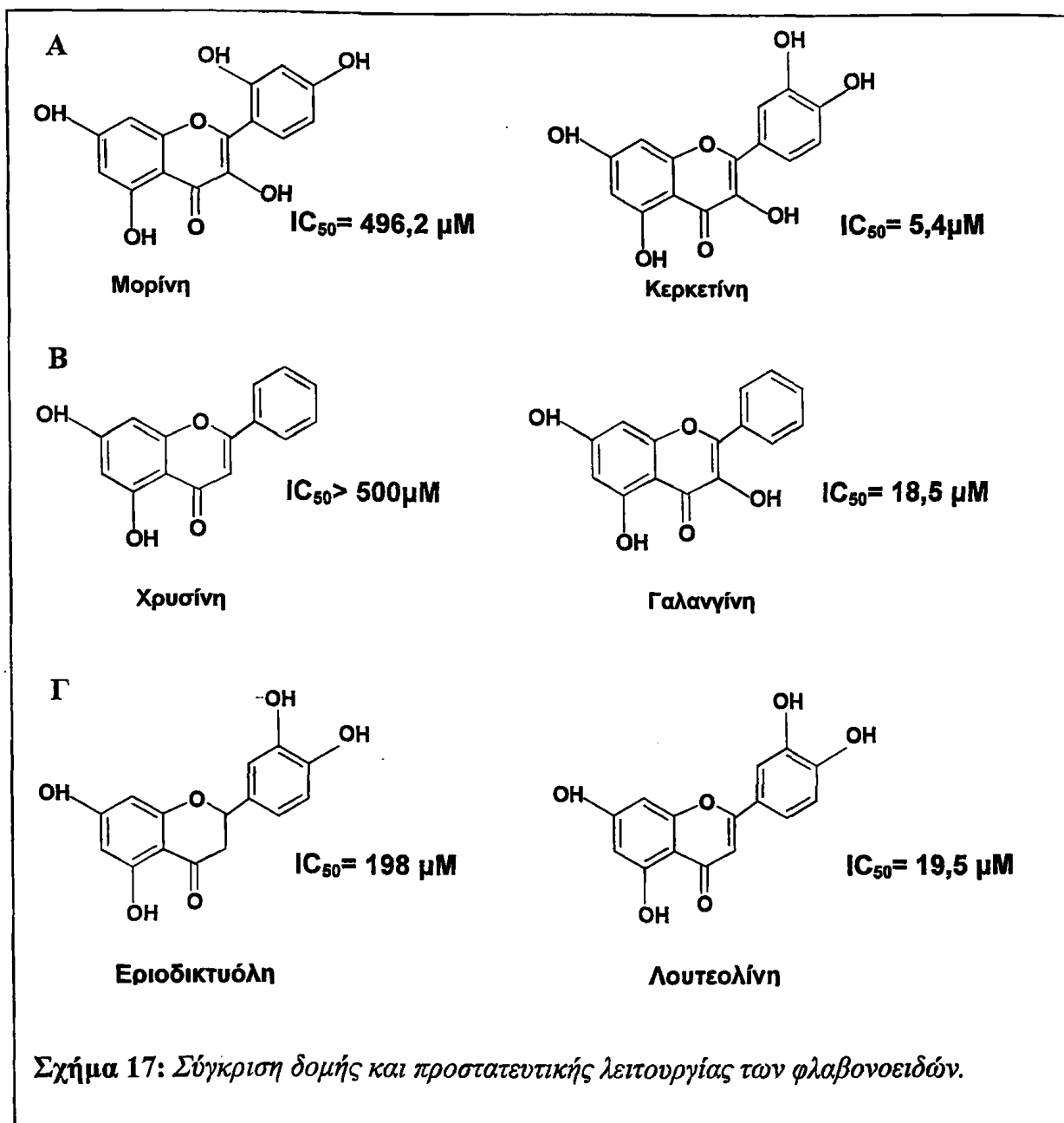
^d Οι τιμές log P προέρχονται από το άρθρο των Moridani et al. (Moridani et al., 2003) και αντιπροσωπεύουν τον συντελεστή κατανομής ανάμεσα σε διάλυμα MOPS and 1-οκτανόλη.

Το Δ.Π. συμβολίζει το «δεν παρατηρήθηκε» και υποδηλώνει τα φλαβονοειδή, τα οποία δεν έδωσαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

Το Δ.Μ. συμβολίζει το «δεν μελετήθηκε» και υποδηλώνει τα φλαβονοειδή, που δεν εξετάστηκαν με την αντίστοιχη μέθοδο.



προστατευτική δράση των φλαβονοειδών είναι: α) η παρουσία της όρθο-διυδροξυ δομής στο δακτύλιο A ή B, β) η παρουσία της 3-υδροξυλομάδας στο δακτύλιο C σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση και γ) η παρουσία του C2-C3 διπλού δεσμού στο δακτύλιο C.

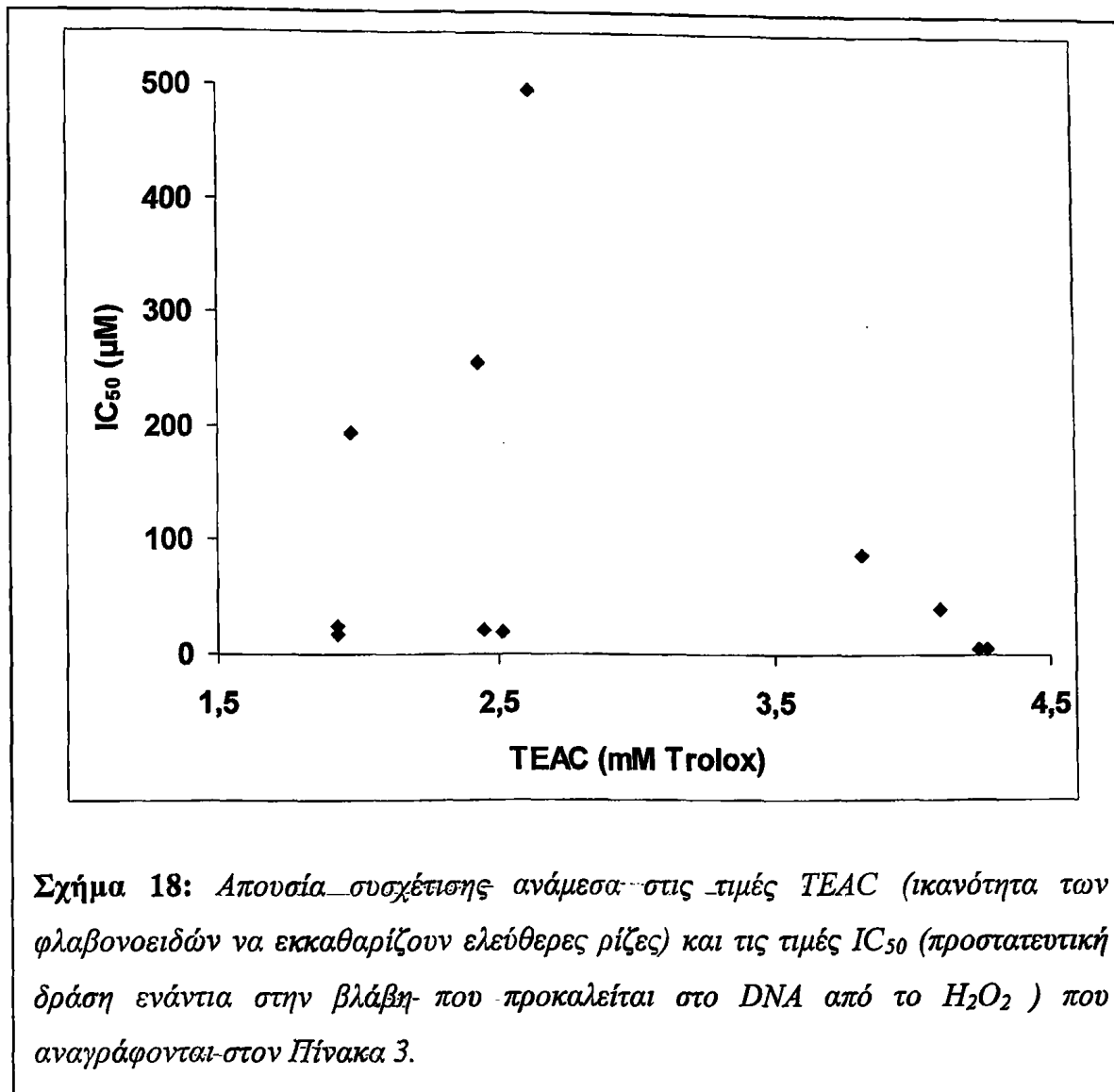


3.2.2 Ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες

Η επικρατούσα γενικά άποψη αποδίδει την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών στην ικανότητα τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αποδέκτες των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, προστατεύοντας τα βιολογικά μακρομόρια από τις καταστρεπτικές τους συνέπειες (Rice-Evans et al., 1996, Ishige et al., 2001, Lemanska et al., 2001). Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ιδιότητα τους αυτή εμπλέκεται στο μηχανισμό προστατευτικής δράσης του κυτταρικού DNA, η ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες αξιολογήθηκε με μία συμβατική χημική μέθοδο, την TAS (Total Antioxidant Status), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στον Πίνακα 3 στην στήλη 5 φαίνονται οι τιμές TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) των φλαβονοειδών, που μελετήθηκαν. Ακολούθησε σύγκριση της ικανότητας των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες με την προστατευτική τους δράση ενάντια στη βλάβη στο DNA. Για παράδειγμα, παρά το γεγονός ότι η βαϊκαλείνη, η γαλανγίνη, η κεμφερόλη και η εριοδικτυόλη έχουν παρόμοια εκκαθαριστική δράση (τιμές TEAC 1,93, 1,93, 1,98 και 1,96 mM Trolox αντίστοιχα), οι δύο πρώτες είναι σχεδόν δέκα φορές καλύτερα προστατευτικά από τις δύο τελευταίες.

Στο σχήμα 18 φαίνεται, ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην εκκαθαριστική (τιμές TEAC) και την προστατευτική δράση (τιμές IC₅₀) των φλαβονοειδών, που μελετήθηκαν (συντελεστής του Spearman $\rho = -0,1$, $p = 0,84$). Πρέπει εδώ να σημειωθεί, πως ενώ η προστατευτική δράση των φλαβονοειδών υπολογίστηκε ενδοκυττάρια, η ικανότητα τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες αξιολογήθηκε απουσία κυττάρων. Για το λόγο αυτό στην προσπάθεια συσχέτισης τους θα έπρεπε να συμπεριληφθεί και άλλος ένας παράγοντας, η ικανότητα των ενώσεων να διαχέονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Η ικανότητα αυτή συνήθως εκφράζεται με το συντελεστή καταμερισμού ανάμεσα στην 1-οκτανόλη και το νερό (τιμές log P). Οι τιμές log P ορισμένων φλαβονοειδών, παρουσιάζονται στην έκτη στήλη του Πίνακα 3, όπως υπολογίστηκαν από τους Morigani et al. (Morigani et al., 2003). Ακόμη και όταν αυτή η ιδιότητα συμπεριλήφθηκε στην πολυπαραγοντική καμπύλη, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην προστατευτική δράση και την ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες ($p = 0,64$ για τις τιμές TEAC και $p = 0,07$ για την λιποφιλικότητα).





Σχήμα 18: Απουσία συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές TEAC (ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες) και τις τιμές IC₅₀ (προστατευτική δράση ενάντια στην βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H₂O₂) που αναγράφονται στον Πίνακα 3.

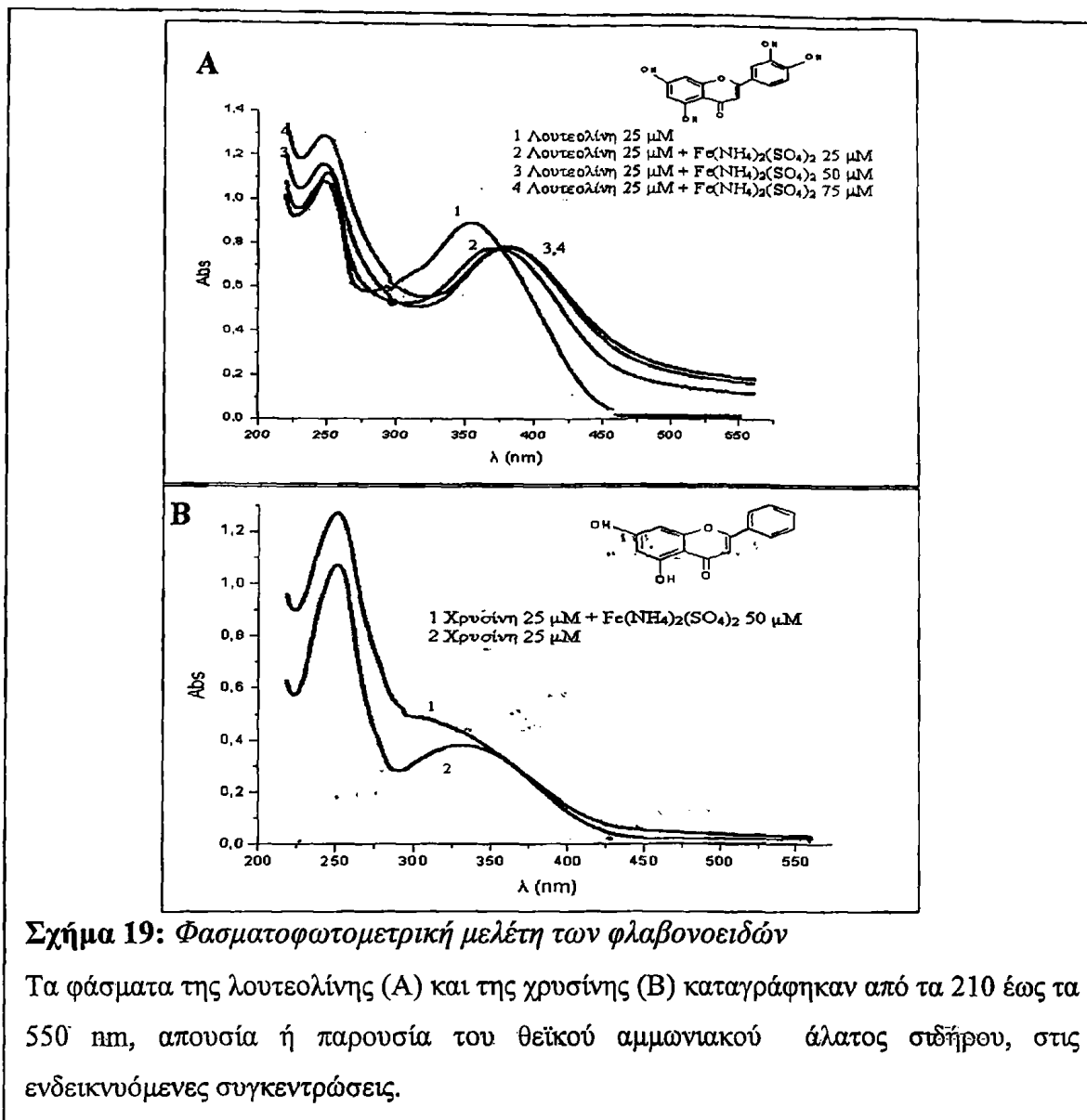
Συμπερασματικά προκύπτει, πως σε αντίθεση με τη γενική αντίληψη ότι η προστατευτική δράση των φλαβονοειδών μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι, τουλάχιστον στο υπό μελέτη σύστημα, η ιδιότητα αυτή δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό προστασίας ενάντια στις βλάβες του DNA.

3.2.3 Φασματοφωτομετρική μελέτη της σιδηροδεσμευτικής ικανότητας των φλαβονοειδών

Η δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου έχει προταθεί στο παρελθόν ως ο μηχανισμός προστασίας ενάντια στη βλάβη του DNA, όταν αυτή προκαλείται από το H_2O_2 (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2003). Με σκοπό την εξέταση αυτού του ενδεχόμενου προσδιορίστηκε εάν και σε ποια θέση μπορούν τα φλαβονοειδή να δεσμεύσουν σίδηρο. Η σιδηροδεσμευτική δράση των φλαβονοειδών ελέγχθηκε με καταγραφή των φασμάτων τους παρουσία άλατος σιδήρου, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ακολούθησε σύγκριση των φασμάτων αυτών με τα φάσματα των αντίστοιχων φλαβονοειδών απουσία σιδήρου και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές που συνέβησαν.

Στο σχήμα 19Α το φάσμα της λουτεολίνης εμφανίζει μία κορυφή στα 268 nm και μία δεύτερη στα 363 nm (φάσμα 1). Στην πρώτη κορυφή, που αντιστοιχεί στο δακτύλιο A, η προσθήκη σιδήρου προκαλεί αύξηση της απορρόφησης, που αποτελεί αθροιστικό αποτέλεσμα της απορρόφησης του φλαβονοειδούς με την απορρόφηση του άλατος του σιδήρου. Στη δεύτερη κορυφή, που αντιστοιχεί στους δακτυλίους B και C, παρατηρείται πτώση της απορρόφησης και μετατόπιση προς τα δεξιά στα 380 nm (φάσμα 2). Αυτή η βαθυχρωμική αλλαγή καταδεικνύει το σχηματισμό συμπλόκου της λουτεολίνης με το σίδηρο, ο οποίος θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα, είτε ανάμεσα στις 3'-4' υδροξυλομάδες του B-δακτυλίου, είτε ανάμεσα στην 4-όξο και 5-υδροξυλομάδα. Διπλασιασμός της ποσότητας άλατος σιδήρου, που προστέθηκε, προκαλεί επιπλέον μετατόπιση στα 388 nm, ενώ ο τριπλασιασμός δεν επέφερε επιπλέον αλλαγή, καταδεικνύοντας τον κορεσμό της ένωσης σε σίδηρο (φάσματα 3 και 4 αντίστοιχα). Στο φάσμα της χρυσίνης, στο σχήμα 19B, εμφανίζονται δύο κορυφές στα 271 nm και στα 342 nm (φάσμα 2). Προσθήκη σιδήρου δεν οδήγησε σε μετατόπιση των κορυφών, αποδεικνύοντας την απουσία σιδηροδεσμευτικής δράσης (φάσμα 1). Η μόνη διαφορά ανάμεσα στα μόρια της χρυσίνης και της λουτεολίνης, που προαναφέρθηκε, είναι η παρουσία της ορθοδιυδροξυ δομής στον δακτύλιο B της δεύτερης. Φαίνεται λοιπόν η δέσμευση σιδήρου από την λουτεολίνη να πραγματοποιείται στην ορθοδιυδροξυ δομή, ενώ αντίθετα η 5-υδροξυλομάδα σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση δεν μπορεί να δεσμεύσει ιόντα σιδήρου.





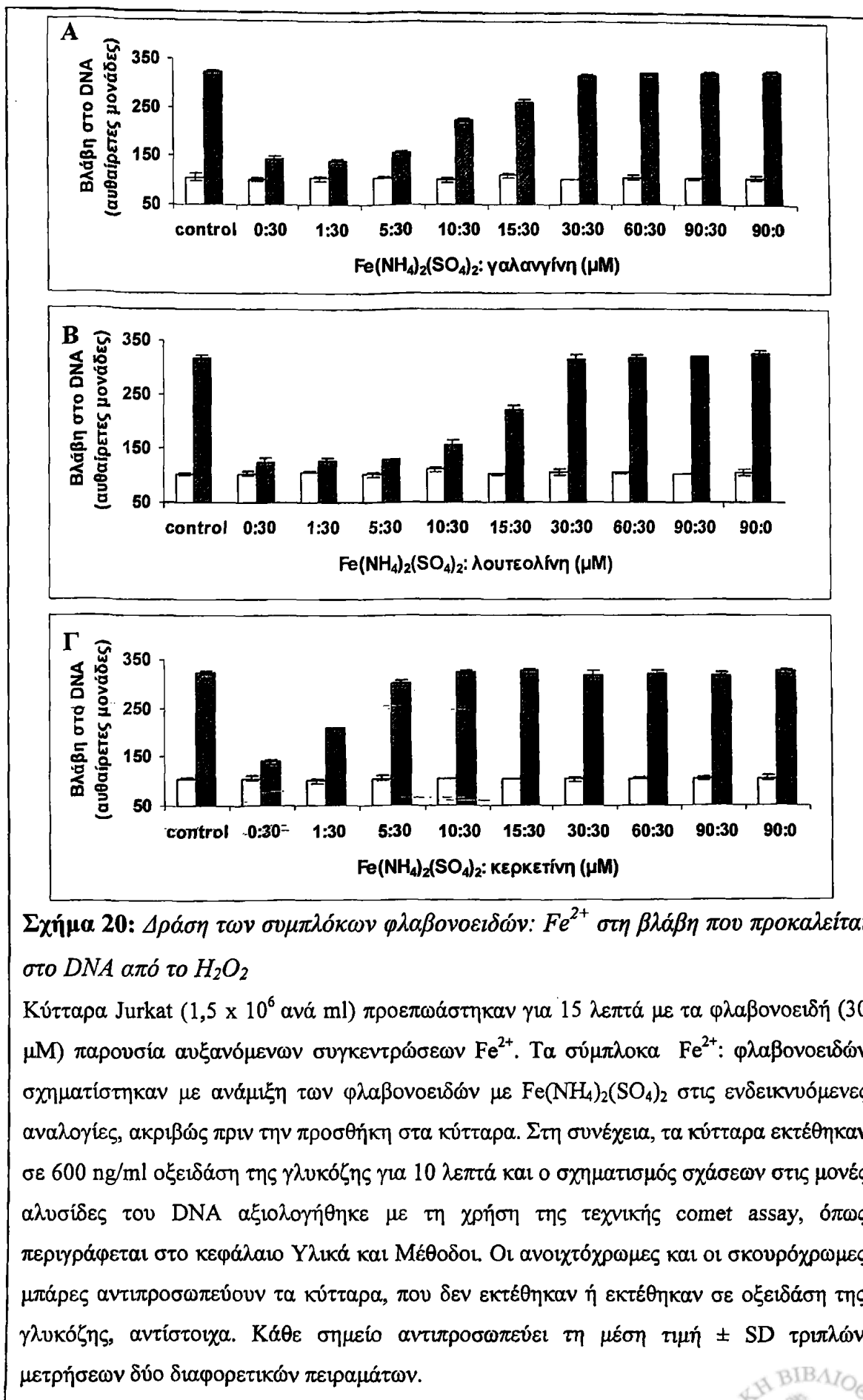
Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν για όλα τα φλαβονοειδή, που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής αυτής μελέτης, προκύπτει το συμπέρασμα, ότι ορισμένα φλαβονοειδή μπορούν και δεσμεύουν το σίδηρο, εφόσον διαθέτουν τα κατάλληλα δομικά χαρακτηριστικά. Οι πιθανές θέσεις σιδηροδέσμευσης είναι η ορθοδιύδροξυ δομή, η οποία μπορεί να εντοπίζεται στο δακτύλιο A (7,8-διυδροξυφλαβόνη) ή στο δακτύλιο B (λουτεολίνη) και η 3-υδροξυλομάδα σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση (γαλανγίνη, 3-υδροξυφλαβονη). Τέλος φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή, που διαθέτουν και τα δύο προαναφερόμενα δομικά χαρακτηριστικά, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με δύο μόρια σιδήρου (κερκετίνη, φισετίνη). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία, με τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών ενάντια στη βλάβη του κυτταρικού DNA, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση, ότι η σιδηροδεσμευτική δράση τους μπορεί να εμπλέκεται στο μηχανισμό της προσφερόμενης προστασίας.

3.2.4. Δέσμευση σιδήρου και προστατευτική δράση

Εάν η προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών ενάντια στη βλάβη του DNA οφείλεται στη δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου, τότε τα κορεσμένα με σίδηρο φλαβονοειδή θα έπρεπε να χάσουν την προστατευτική τους δράση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 20, η προστασία, που προσέφεραν τα φλαβονοειδή, βαθμιαία μειώθηκε, καθώς η ποσότητα του σιδήρου στο σύμπλοκο σιδήρου:φλαβονοειδούς αυξανόταν. Στην περίπτωση της λουτεολίνης (σχήμα 20Α) και της γαλανγίνης (σχήμα 20Β) η προστασία εξαφανίστηκε τελείως, όταν ο λόγος $[Fe^{2+}]$: [φλαβονοειδούς] ήταν ίσος ή μεγαλύτερος του 1, ενώ στην περίπτωση της κερκετίνης (σχήμα 20Γ) αυτό συνέβη σε αναλογία 1:3. Η πιο προφανής εξήγηση για τη μείωση της προστατευτικής δράσης των δύο πρώτων φλαβονοειδών είναι το γεγονός ότι ο σχηματισμός συμπλόκου σε αναλογία 1:1 πριν την επώαση οδηγεί στην έλλειψη δυνατότητας για περαιτέρω σιδηροδέσμευση, κάτι το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική προστασία του κυτταρικού DNA. Έτσι βαθμιαία αύξηση της ποσότητας του σιδήρου στο σύμπλοκο- $[Fe^{2+}]$: [φλαβονοειδές] μειώνει το «ελεύθερο» φλαβονοειδές, που είναι ικανό να δεσμεύσει ενδοκυττάριο σίδηρο και να προστατέψει το κυτταρικό DNA. Η παρατήρηση ότι η κερκετίνη απενεργοποιείται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις σιδήρου πιθανά συσχετίζεται με την γνωστή ιδιότητά της να ανάγει τον Fe^{3+} (ο οποίος πιθανά σχηματίζεται μετά από αλληλεπίδραση με το H_2O_2) σε Fe^{2+} με ταυτόχρονη οξείδωση της (Moridani et al., 2003).

Η εύρεση των πιθανών θέσεων δέσμευσης του σιδήρου από τα φλαβονοειδή με τη φασματοφωτομετρική μελέτη τους, καθώς και η απουσία προστατευτικής δράσης από τα κορεσμένα σε σίδηρο φλαβονοειδή αποτελούν σημαντικές ενδείξεις της σπουδαιότητας της σιδηροδεσμευτικής δράσης των φλαβονοειδών στην προστασία ενάντια στην βλάβη του κυτταρικού DNA. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρόλα αυτά δεν αποδεικνύουν, ότι η δέσμευση σιδήρου από τα φλαβονοειδή πραγματοποιείται ενδοκυττάρια και για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη αυτής της ιδιότητάς τους.





Σχήμα 20: Δράση των συμπλόκων φλαβονοειδών: Fe^{2+} στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τα φλαβονοειδή (30 μM) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Fe^{2+} . Τα σύμπλοκα Fe^{2+} : φλαβονοειδών σχηματίστηκαν με ανάμιξη των φλαβονοειδών με $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ στις ενδεικνυόμενες αναλογίες, ακριβώς πριν την προσθήκη στα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης για 10 λεπτά και ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA αξιολογήθηκε με τη χρήση της τεχνικής comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι ανοιχτόχρωμες και οι σκουρόχρωμες μπάρες αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα, που δεν εκτέθηκαν ή εκτέθηκαν σε οξειδάση της γλυκόζης, αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών μετρήσεων δύο διαφορετικών πειραμάτων.

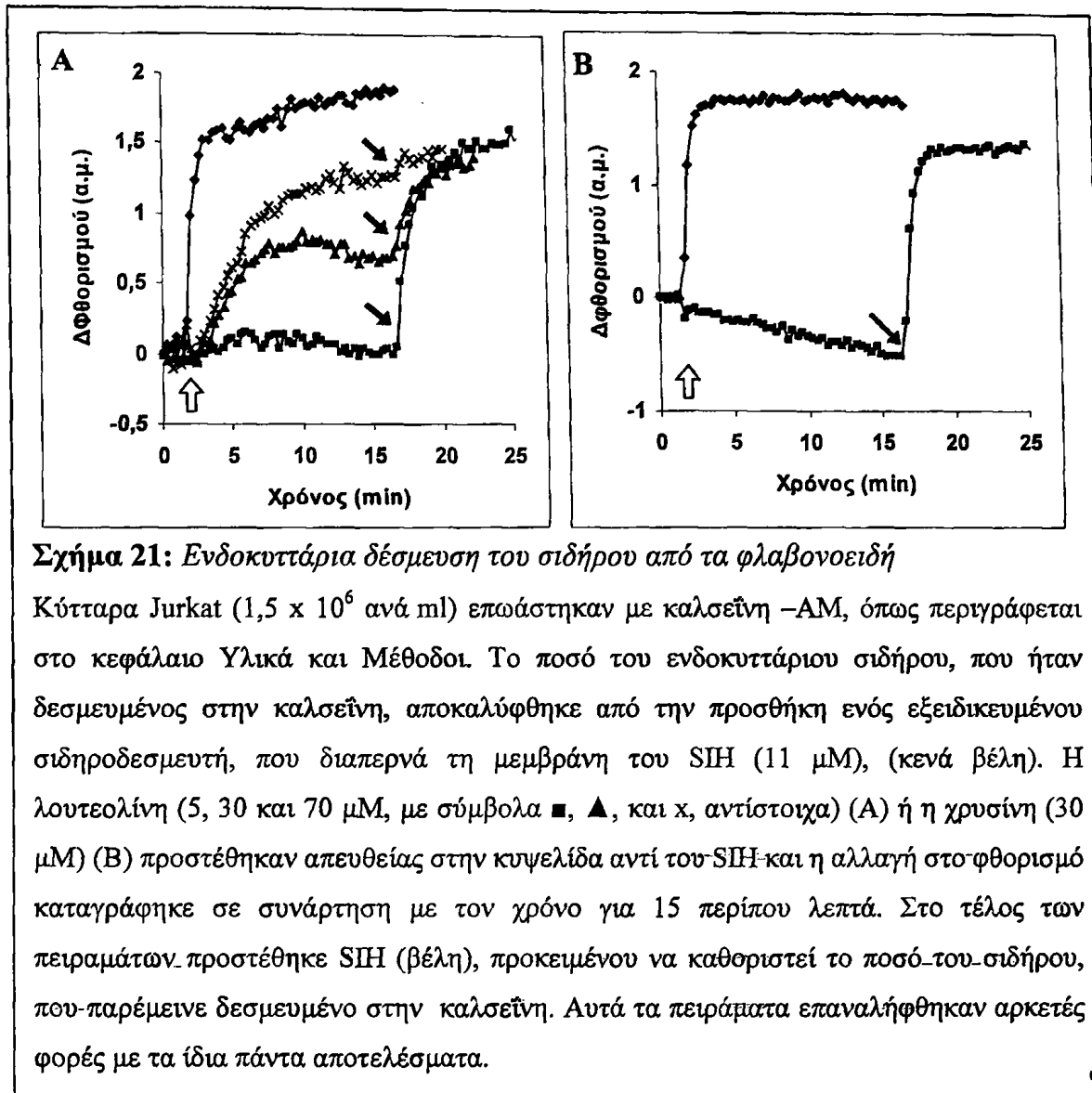
3.2.5 Ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν σίδηρο ενδοκυττάρια

Προκειμένου να αποδειχθεί ο ρόλος της σιδηροδέσμευσης στο μηχανισμό προστασίας, καθώς και να επιτευχθεί η σύγκριση της ικανότητας δέσμευσης του σιδήρου και της προστατευτικής δράσης ενάντια στις βλάβες του DNA, προσδιορίστηκε η ενδοκυττάρια δέσμευση του σιδήρου στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με αυτές, στις οποίες παρατηρήθηκε η προστασία. Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, τα κύτταρα, που περιέχουν καλσεΐνη, έχουν ένα ποσό φθορισμού (ΔF), το οποίο «σβήνεται» από τον ενδοκυττάριο σίδηρο και μπορεί να αποκαλυφτεί με την προσθήκη του SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone), που αποτελεί έναν εξειδικευμένο σιδηροδεσμευτή, που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Τροποποιώντας αυτή τη μέθοδο, αντί του SIH, τα φλαβονοειδή προστέθηκαν άμεσα στην κυψελίδα και η αύξηση στην απορρόφηση που καταγράφηκε, θεωρήθηκε ότι καταδεικνύει την απόσπαση του σιδήρου από την καλσεΐνη και κατά συνέπεια τη δέσμευση του ενδοκυττάριου σιδήρου.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 21A, προσθήκη της λουτεολίνης σε κύτταρα φορτωμένα με καλσεΐνη οδήγησε στη βαθμιαία αύξηση του φθορισμού, υποδηλώνοντας την απομάκρυνση του σιδήρου, που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη. Αντιθέτως, η χρυσίνη, η οποία δεν ήταν ικανή να προστατεύσει το DNA ($IC_{50} > 500\mu M$), δεν μπορούσε να αποσπάσει το σίδηρο από την καλσεΐνη (σχήμα 21B). Η ειδίκευση της λουτεολίνης για σιδηροδέσμευση επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη του SIH στο τελικό στάδιο του πειράματος. Η απουσία περαιτέρω αύξησης του φθορισμού με την προσθήκη αυτή αποδεικνύει ότι η αύξηση του φθορισμού οφείλεται στην δέσμευση Fe από τη λουτεολίνη.

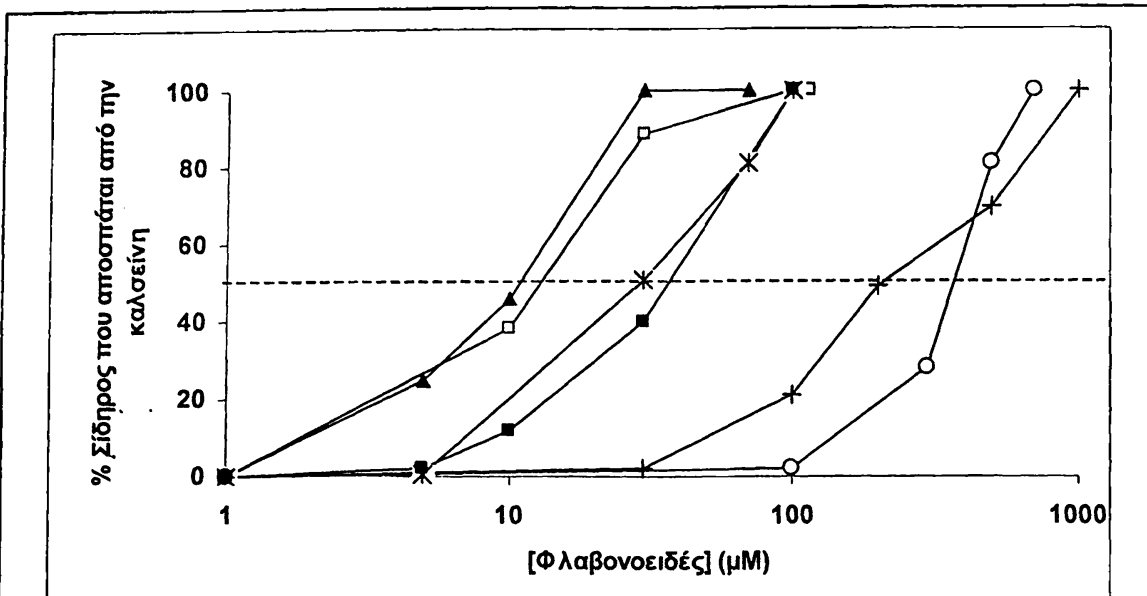
Θεωρώντας ως 100% την αύξηση του φθορισμού, που προκαλείται με την προσθήκη του SIH, υπολογίστηκε η επί τοις 100 αύξηση του φθορισμού από τις διάφορες συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών (σχήμα 22). Ως EC_{50} ορίστηκε η συγκέντρωση του φλαβονοειδούς, η οποία μπορεί να αποσπάσει 50% του συνολικού σιδήρου, που δεσμεύει η καλσεΐνη. Στον Πίνακα 3 αναγράφονται τα φλαβονοειδή, που μελετήθηκαν, οι τιμές IC_{50} , όπως προέκυψαν από τη μέθοδο του "comet assay" και οι τιμές EC_{50} . Με μία πρώτη ματιά διαπιστώνεται, πως εκείνα τα φλαβονοειδή, που προσέφεραν προστασία στα κύτταρα, μπορούν ταυτόχρονα να δεσμεύσουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο.





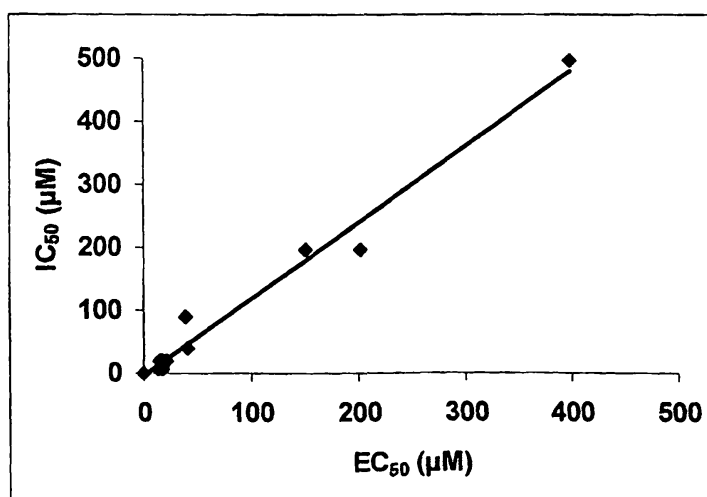
Η καμπύλη συσχέτισης (σχήμα 23) ανάμεσα στις τιμές IC_{50} και στις τιμές EC_{50} αποκαλύπτει μια εξαιρετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με συντελεστή του Spearman ρ ίσο με 0,9 ($p = 0,005$). Τα πειράματα αυτά δείχνουν καθαρά, ότι η προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες του κυτταρικού DNA, που προκαλούνται από το H_2O_2 , οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο διαθέσιμο σίδηρο. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση, ότι κλασικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως το α -λιποϊκό οξύ, η N-ακέτυλο-κυστεΐνη και το trolox, δεν προσέφεραν προστασία ενάντια στη βλάβη του κυτταρικού DNA, ενώ αντίθετα σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, όπως είναι η δεσφερριζαμίνη (DFO), μπορούσαν να προστατεύσουν το κυτταρικό DNA από το H_2O_2 . (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2003, Tenopoulou et al., 2005).





Σχήμα 22: Υπολογισμός τιμών EC_{50} των φλαβονοειδών.

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπωάστηκαν για 10 λεπτά καλσεΐνη-AM, όπως περιγράφεται στο σχήμα 7. Τα διάφορα φλαβονοειδή προστέθηκαν στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις απευθείας στην κυψελίδα και από την αύξηση του φθορισμού μετά την πάροδο δεκαπέντε λεπτών υπολογίστηκε το ποσοστό επί τοις εκατό του σιδήρου, που αποσπάστηκε από την καλσεΐνη. Ως εκατό τοις εκατό του σιδήρου, που αποσπάται από την καλσεΐνη, θεωρήθηκε η αύξηση του φθορισμού, που προκαλείται από την προσθήκη $11 \mu\text{M}$ SIH. Στο διάγραμμα φαίνονται αντιπροσωπευτικά κάποια από τα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν: γαλαγγίνη (□), κερκετίνη (▲), 3-υδροξυφλαβόνη (*), μορίνη (○), εριοδικτυόλη (+) και φισετίνη (■). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή τριών διαφορετικών πειραμάτων.



Σχήμα 23: Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές EC_{50} (ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν το σίδηρο ενδοκυττάρια) και IC_{50} (προστατευτική δράση ενάντια στη βλάβη που προκαλείται στο DNA από το H_2O_2).

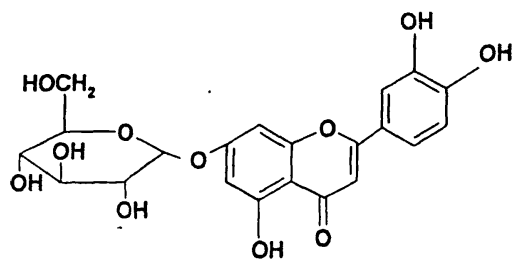


3.2.6. Επίδραση της γλυκοσιλίωσης των φλαβονοειδών στην προστατευτική τους ικανότητα

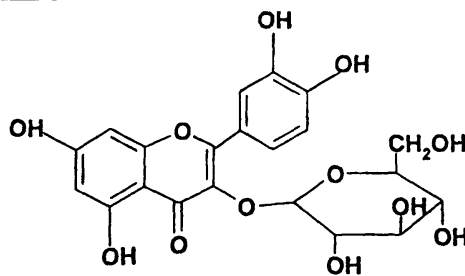
Επειδή τα φλαβονοειδή βρίσκονται με την γλυκοσιλωμένη τους μορφή στα προϊόντα φυτικής προέλευσης, ήταν σημαντικό να μελετηθεί το αποτέλεσμα της γλυκοσιλίωσης στην προστασία, που προσφέρουν τα φλαβονοειδή στο κυτταρικό DNA. Για την μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τα γλυκοσίδια της κερκετίνης και της λουτεολίνης, που είναι δύο από τα φλαβονοειδή, που παρείχαν την υψηλότερη προστασία στα κύτταρα. (τιμές IC_{50} 5,4 μ M και 19,5 μ M αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν, πως η γλυκοσιλίωση επηρεάζει ανασταλτικά την προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα το 7-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης έχει $IC_{50} = 441 \mu$ M, δηλαδή είναι περίπου είκοσι φορές λιγότερο προστατευτικό από την αντίστοιχη άγλυκη μορφή. Όσον αφορά στο 3-γλυκοσίδιο της κερκετίνης, αυτό έχει $IC_{50} = 983 \mu$ M, είναι δηλαδή περίπου διακόσιες φορές λιγότερο προστατευτικό από την κερκετίνη. Στην τελευταία περίπτωση βέβαια το μόριο της γλυκόζης καλύπτει τη θέση 3 του φλαβονοειδούς, που όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να είναι σημαντική για την προστατευτική δράση του στο σύστημα που χρησιμοποιείται (σχήμα 24). Η μεγάλη αυτή απόκλιση στις τιμές των IC_{50} των φλαβονοειδών και των γλυκοσιδίων τους οφείλεται στην παρουσία του μορίου της γλυκόζης πάνω στα φλαβονοειδή και έτσι μια πιθανή εξήγηση είναι η δυσκολία εισόδου των γλυκοσιλωμένων ουσιών στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό παρακολουθήθηκε η προστασία, που πρόσφεραν τα φλαβονοειδή στα κύτταρα σε συνάρτηση με το χρόνο επώασής τους. Όντως, ενώ οι άγλυκες μορφές των φλαβονοειδών είχαν πλήρη δράση από τα πρώτα 15 λεπτά της επώασης, στην περίπτωση των γλυκοσιλωμένων αυξημένος χρόνος επώασης συνεπάγεται αυξημένη προστασία (σχήμα 25).



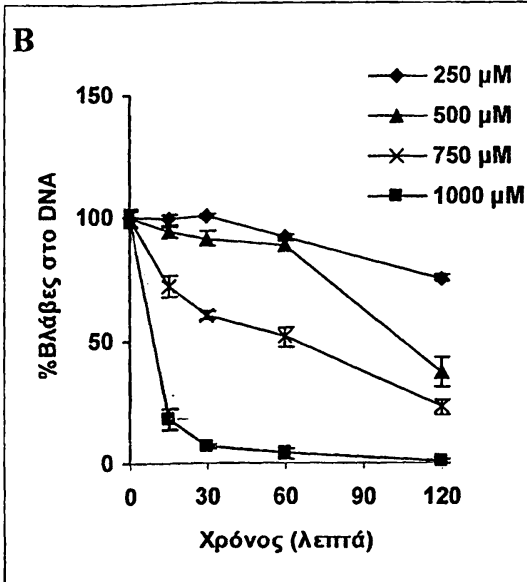
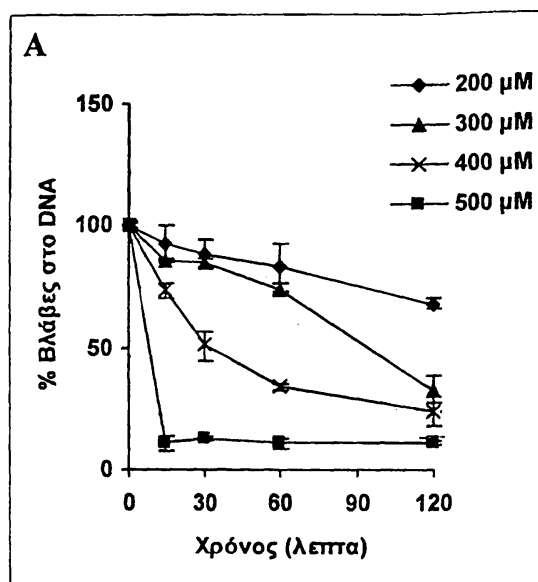


7-γλυκοσιλιωμένη λουτεολίνη
 $IC_{50} = 441 \mu M$



3-γλυκοσιλιωμένη κερκετίνη
 $IC_{50} = 983 \mu M$

Σχήμα 24: Δομή και τιμές IC_{50} των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών που μελετήθηκαν



Σχήμα 25: Προστατευτική δράση των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών έναντι της βλάβης στο DNA σε σχέση με τον χρόνο.

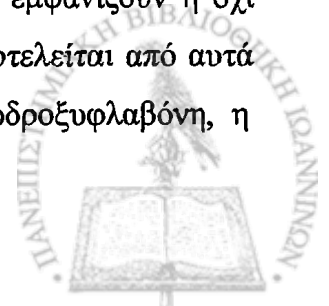
Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπωάστηκαν για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα με διάφορες συγκεντρώσεις της 7-γλυκοσιλιωμένης λουτεολίνης (A) και της 3-γλυκοσιλιωμένης κερκετίνης (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ποσό οξειδάσης της γλυκόζης ικανό να παράγει περίπου $12 \mu M H_2O_2$ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο "comet assay", όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη που προκαλείται στο κυτταρικό DNA, όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά απουσία φλαβονοειδούς σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα

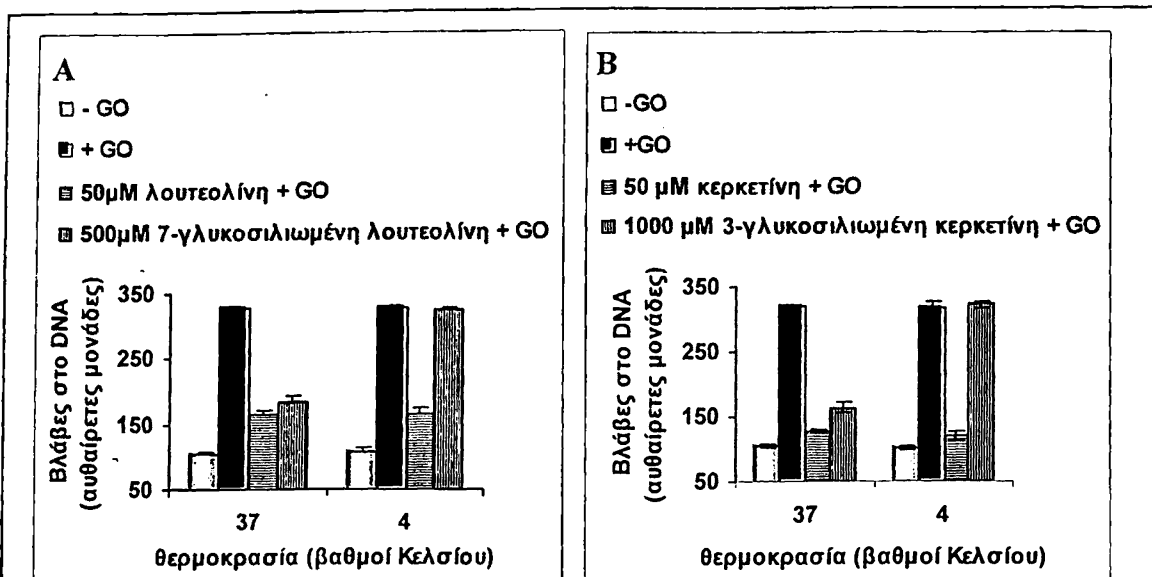
Η διαφορετική κινητική, που ακολουθούσε η προστατευτική δράση των γλυκοσιλιωμένων σε σχέση με αυτή των άγλυκων μορφών των φλαβονοειδών, υπονοεί ένα διαφορετικό μηχανισμό μεταφοράς τους μέσα στα κύτταρα. Είναι γνωστό πως οι ενζυμικές λειτουργίες, καθώς και οι μηχανισμοί ενεργητικής μεταφοράς των κυττάρων, διακόπτονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Με σκοπό λοιπόν να διερευνηθεί, αν στον μηχανισμό εισόδου εμπλέκεται κάποια ενεργητική διαδικασία, μελετήθηκε το αποτέλεσμά τους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37° C και στους 4° C. Σε αντίθεση με τις άγλυκες μορφές τους τα γλυκοσιλιωμένα φλαβονοειδή δεν μπορούσαν να προσφέρουν προστασία, όταν η προεπάση πραγματοποιούταν στους 4° C (σχήμα 26). Από τα πειράματα αυτά προέκυψε, ότι η προστατευτική ικανότητα των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών σε κύτταρα, που εκτίθενται σε H₂O₂, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και κατ' επέκταση η είσοδός τους στα κύτταρα από κάποιον μηχανισμό ενεργητικής μεταφοράς.

3.2.7 Τοξική δράση των φλαβονοειδών

Εκτός από την προστατευτική δράση ορισμένα από τα φλαβονοειδή, που μελετήθηκαν, εμφάνισαν τοξική δράση εναντίον των κυττάρων, είχαν δηλαδή την ικανότητα να προκαλούν βλάβη στο κυτταρικό DNA απουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο σχήμα 27A φαίνεται η τοξική δράση της φλαβόνης, η οποία, ακόμη και σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις (50 μM), προκάλεσε αύξηση της βλάβης του DNA απουσία της οξειδάσης της γλυκόζης. Το πιο εντυπωσιακό είναι, ότι σε μερικές περιπτώσεις τα ίδια φλαβονοειδή, που δρούσαν προστατευτικά σε μικρές συγκεντρώσεις, ήταν τοξικά σε μεγαλύτερες. Για παράδειγμα στο σχήμα 27B γίνεται φανερή η διπλή δράση της γαλανγίνης, δηλαδή η προστατευτική της δράση στις μικρές συγκεντρώσεις και η τοξικότητά της στις υψηλές. Όταν η συγκέντρωσή της είναι 250 μM, μπορεί και προκαλεί βλάβη στο πυρηνικό DNA απουσία του H₂O₂, ενώ σε συγκέντρωση 100 μM μειώνει κατά 100% τη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στο κυτταρικό DNA (σχήμα 27B).

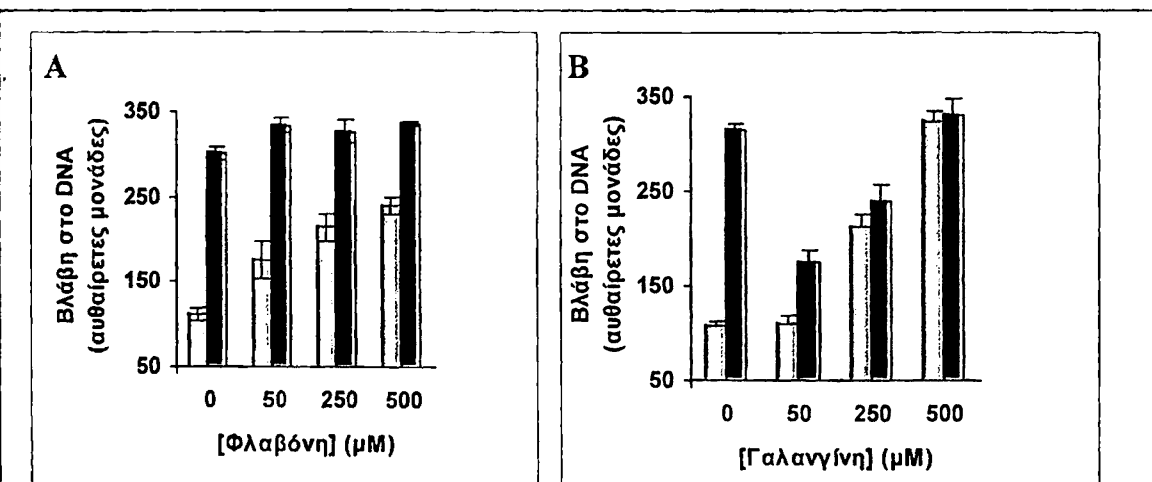
Με τον ίδιο τρόπο παρατηρήθηκε η παρουσία ή μη τοξικότητας και των υπόλοιπων φλαβονοειδών. Έτσι είναι δυνατό, ανάλογα με το αν εμφανίζουν ή όχι τοξικό χαρακτήρα, να διαχωριστούν σε δύο ομάδες. Η πρώτη αποτελείται από αυτά που δεν έχουν τοξικότητα και είναι η 7-υδροξυφλαβόνη, η 7,8-διυδροξυφλαβόνη, η





Σχήμα 26: Προστατευτική δράση των γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών έναντι της βλάβης στο DNA σε σχέση με την θερμοκρασία επώασης.

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπώαστηκαν με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις των αντίστοιχων γλυκοσιλιωμένων και άγλυκων φλαβονοειδών για 15 λεπτά στους 37°C ή στους 4°C . Μετά από φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε θερμό θρεπτικό υλικό εκτέθηκαν για 10 λεπτά στην οξειδάση της γλυκόζης (37°C). Ακολούθησε ανάλυση με τη μέθοδο "comet assay". Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 27: Τοξική δράση των φλαβονοειδών

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις της φλαβόνης (A) και της γαλανγίνης (B). Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 600 ng/ml οξειδάση της γλυκόζης για 10 λεπτά και ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA αξιολογήθηκε με τη χρήση του comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι ανοιχτόχρωμες και οι σκουρόχρωμες στήλες αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα, που δεν εκτέθηκαν ή εκτέθηκαν σε οξειδάση της γλυκόζης, αντίστοιχα. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών μετρήσεων δύο διαφορετικών πειραμάτων.



βαϊκαλεΐνη, η 3-υδροξυφλαβόνη, η κεμφερόλη, η μυρικετίνη, η 6-υδροξυφλαβανόνη, η εριοδικτυόλη, η ταξιφολίνη και η κατεχίνη. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν εκείνα, που εμφανίζουν τοξικότητα, και είναι η φλαβόνη, η 5-υδροξυφλαβόνη, η χρυσίνη, η απιγενίνη, η λουτεολίνη, η γαλανγίνη, η φισετίνη, η μορίνη, η κερκετίνη και η ναριγενίνη. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η παρουσία ή όχι τοξικότητας δε φαίνεται να συνδέεται άμεσα με κάποια ιδιαίτερα δομικά γνωρίσματα. Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει από μεγάλο αριθμό ερευνητών (Sergediene et al., 1999, Galati et al., 2002, Galati and O'Brien, 2004, Silva et al., 2000, Moridani et al., 2002), περαιτέρω μελέτη είναι αναγκαία, προκειμένου να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός της τοξικότητας των φλαβονοειδών.



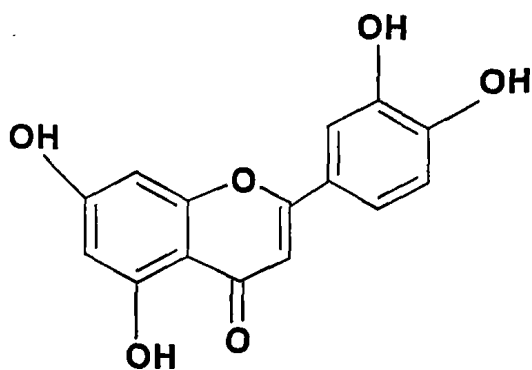
3.3 Φλαβονοειδή και απόπτωση

3.3.1. Επίδραση των φλαβονοειδών στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2

Μετά την απόδειξη της προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες, που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA, η εργασία αυτή επεκτάθηκε στη μελέτη της δράσης των ενώσεων αυτών στη διαδικασία της απόπτωσης. Για το σκοπό αυτό, ανάμεσα στα διαφορετικά φλαβονοειδή, που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκε να μελετηθεί η λουτεολίνη, η οποία προσφέρει προστασία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ ταυτόχρονα έχει εξαιρετική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (σχήμα 28Α). Παράλληλα με τη λουτεολίνη ελέγχθηκε ένα δομικό ανάλογό της, η απιγενίνη, που έχει ακριβώς την ίδια δομή, με μοναδική διαφορά την απουσία από το μόριό της ενός υδροξυλίου στην θέση 4' και κατ' επέκταση της ορθοδιωδρόξυ δομής στο δακτύλιο Β. Όπως αποδείχθηκε παραπάνω, εξαιτίας της μοναδικής αυτής διαφοράς, η απιγενίνη δε δεσμεύει ενδοκυττάριο σίδηρο και κατ' επέκταση δεν μπορεί να προστατεύσει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 (σχήμα 28).

Η συμπύκνωση και η θραυσματοποίηση της κυτταρικής χρωματίνης αποτελεί ένα από τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του αποπτωτικού θανάτου. Προκειμένου να εξεταστούν οι επιδράσεις των δύο φλαβονοειδών στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 , κύτταρα Jurkat, αφού προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με διάφορες συγκεντρώσεις λουτεολίνης ή απιγενίνης, εκτέθηκαν για 6 ώρες σε 250 μM H_2O_2 . Η μορφολογία του πυρήνα εξετάστηκε μετά από βαφή με Hoechst 33342 και χαρακτηριστικές φωτογραφίες των δειγμάτων, που επωάστηκαν με λουτεολίνη ή απιγενίνη φαίνονται στα σχήματα 29 και 30 αντίστοιχα. Ο αριθμός των συμπυκνωμένων και των θραυσματοποιημένων πυρήνων καταμετρήθηκε και εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό των συνολικών πυρήνων ανά δείγμα (σε κάθε δείγμα καταμετρήθηκαν περίπου 500 συνολικοί πυρήνες). Όπως ήταν αναμενόμενο, έκθεση των κυττάρων σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες οδήγησε σε εκτεταμένη συμπύκνωση και θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA ($41,7 \pm 1,62$ % έναντι $2,4 \pm 0,7$ % των ανέπαφων κυττάρων, σχήματα 29 και 30).

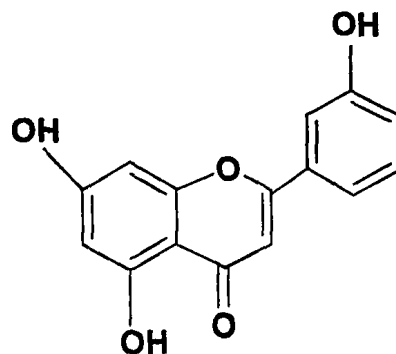




Λουτεολίνη

$$IC_{50}^a = 19,5 \pm 2,1 \mu M$$

$$EC_{50}^b = 21 \mu M$$



Απιγενίνη

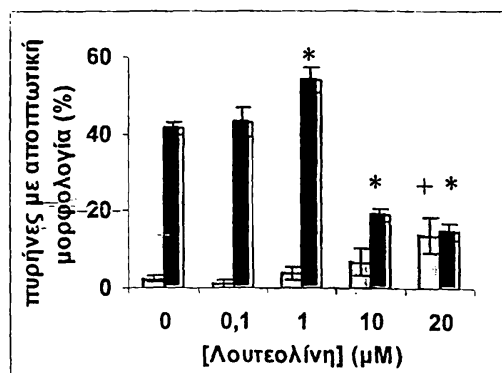
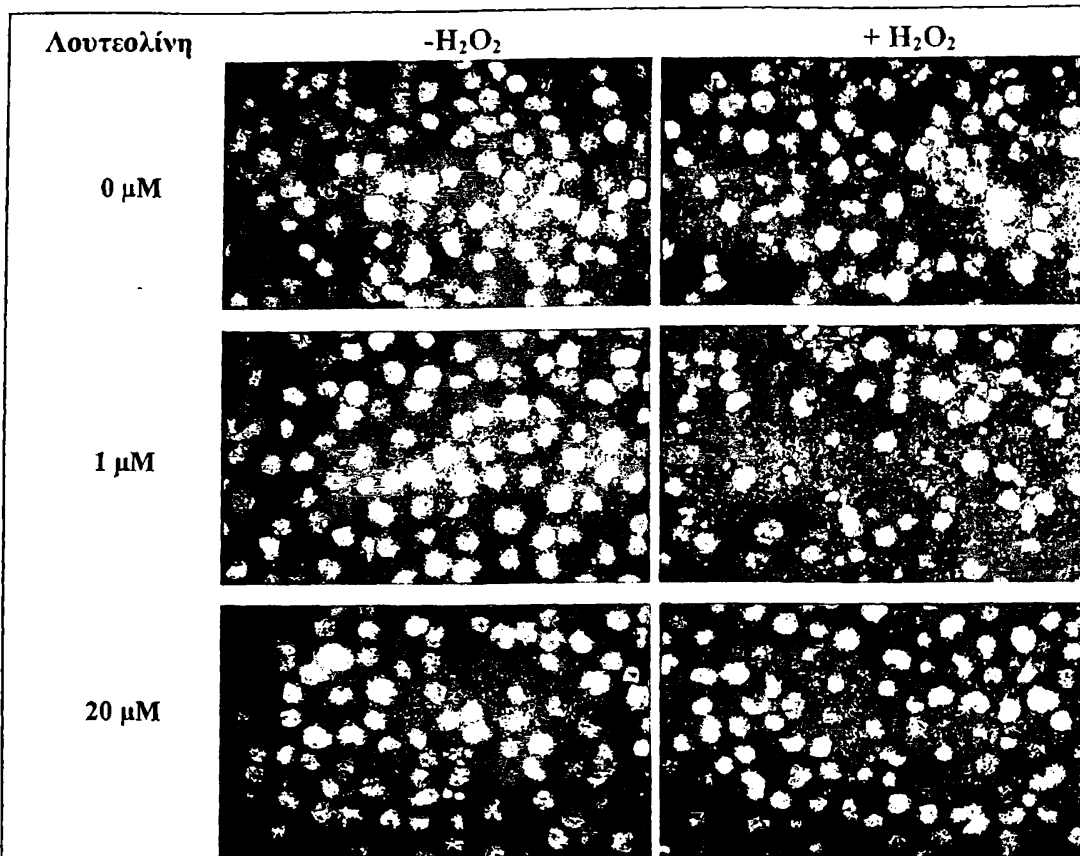
$$IC_{50}^a > 1mM$$

$$EC_{50}^b > 1mM$$

Σχήμα 28: Μοριακές δομές, τιμές IC_{50} και τιμές EC_{50} της λουτεολίνης και της απιγενίνης

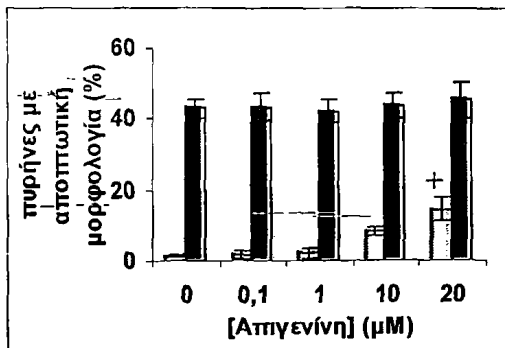
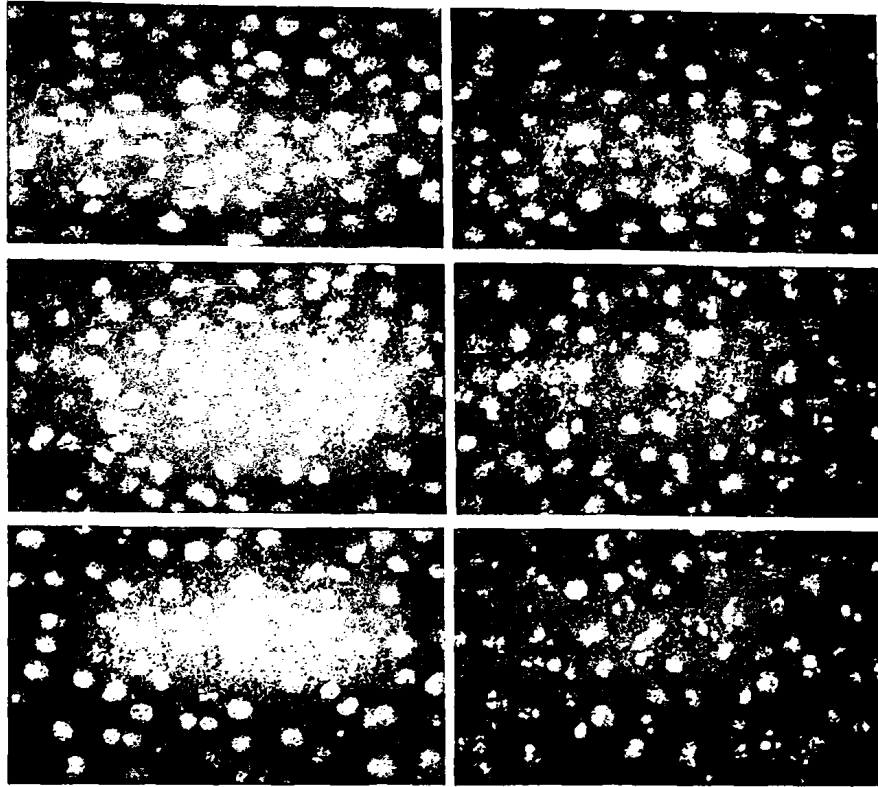
^aΟι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν από τριπλή μέτρηση τριών διαφορετικών πειραμάτων, όπως περιγράφεται στο σχήμα 16, και αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του φλαβονοειδούς, η οποία προσέφερε 50% προστασία ενάντια στη βλάβη, που προκαλείται από το H_2O_2 στο DNA.

^bΟι τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν από δύο διαφορετικά πειράματα για κάθε συγκέντρωση, όπως περιγράφεται στο σχήμα 22, και αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του φλαβονοειδούς, η οποία απέσπασε 50% από το σίδηρο, που είναι δεσμευμένος στην καλσεΐνη.



Σχήμα 29: Συνέπειες της λουτεολίνης στη συμπίκνωση και τη θραυσματοποίηση των πυρήνων που προκαλεί το H₂O₂

Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) προεπώαστηκαν με τις ενδεικνύμενες συγκεντρώσεις λουτεολίνης για 15 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες. Η μορφολογία των πυρήνων παρατηρήθηκε μετά από χρώση με Hoechst, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι και οι πυρήνες φωτογραφήθηκαν, ενώ αριθμός των πυρήνων με αποπτωτική μορφολογία καταμετρήθηκε και εκφράστηκε ως ποσοστό 500 καταμετρούμενων πυρήνων σε κάθε δείγμα. Στο διάγραμμα οι ανοιχτόχρωμες στήλες αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα, τα οποία προεπώαστηκαν με τις ενδεικνύμενες συγκεντρώσεις της λουτεολίνης, χωρίς ακόλουθη έκθεση σε H₂O₂, ενώ οι σκουρόχρωμες εκείνα στα οποία μετά την προεπώαση με τα φλαβονοειδή ακολούθησε έκθεση σε H₂O₂. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα. *p < 0,005 έναντι των δειγμάτων, που εκτέθηκαν σε H₂O₂, +p < 0,005 έναντι των ανέπαφων κυττάρων.

-H₂O₂+ H₂O₂

ινέπειες της απιγενίνης στη συμπύκνωση και τη θραυσματοποίηση των προκαλεί το H₂O₂

t (1.5x10⁶ ανά ml) προεπεώστηκαν με τις ενδεικνύμενες συγκεντρώσεις 15 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες. Η εν πυρήνων παρατηρήθηκε μετά από χρώση με Hoechst, όπως περιγράφεται Υλικά και Μέθοδοι και οι πυρήνες φωτογραφήθηκαν, ενώ ο αριθμός των ποπτωτική μορφολογία καταμετρήθηκε και εκφράστηκε ως ποσοστό 500 των πυρήνων σε κάθε δείγμα. Στο διάγραμμα, οι ανοιχτόχρωμες στήλες ουν τα κύτταρα, τα οποία προεπεώστηκαν με τις ενδεικνύμενες ; της απιγενίνης, χωρίς ακόλουθη έκθεση σε H₂O₂, ενώ οι σκουρόχρωμες οία μετά την προεπώαση με τα φλαβονοειδή ακολούθησε έκθεση σε H₂O₂. αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία εράματα. †p < 0,005 έναντι των ανέπαφων κυττάρων.



Προεπώαση των κυττάρων με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις λουτεολίνης ή απιγενίνης (0,1-10 μM) δεν επηρέασαν τη μορφολογία των κυτταρικών πυρήνων. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 20 μM λουτεολίνης, απουσία H_2O_2 , υπήρξε αύξηση της αποπτωτικής μορφολογίας από 2,4 % σε $13,8 \pm 4,7\%$ (σχήμα 29). Παρομοίως 20 μM απιγενίνης, χωρίς προσθήκη H_2O_2 , προκάλεσαν αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών πυρήνων από 2,4 % στα ανέπαφα κύτταρα σε $14,6 \pm 5,1\%$ (σχήμα 30). Η παρατήρηση αυτή αποκαλύπτει την προαποπτωτική δράση των δύο ουσιών. Στην περίπτωση της λουτεολίνης, ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις, όπως 50 και 100 μM , ανεβάζουν το ποσοστό των αποπτωτικών πυρήνων στο 21,7% και 34% αντίστοιχα .

Στην περίπτωση που τα κύτταρα προεπώαστηκαν με λουτεολίνη πριν από την έκθεση σε H_2O_2 , ο αριθμός των συμπυκνωμένων και θραυσματοποιημένων πυρήνων μειώθηκε σχεδόν στα επίπεδα των ανέπαφων κυττάρων. Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με 10 και 20 μM λουτεολίνης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 , το επί τοις εκατό ποσοστό των πυρήνων με αποπτωτική μορφολογία μειώθηκε από 41,7 % σε $19,24 \pm 1,6 \%$ και $14,8 \pm 2,1 \%$ αντίστοιχα (σχήμα-29), υποδηλώνοντας την αντιαποπτωτική δράση της ουσίας. Αντιθέτως προεπώαση των κυττάρων με παρόμοιες συγκεντρώσεις της απιγενίνης (10-20- μM) δεν οδήγησε σε μείωση της αποπτωτικής μορφολογίας των πυρήνων. Μία απρόσμενη παρατήρηση που έγινε, ήταν, ότι όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις λουτεολίνης (1 μM), πριν από την έκθεση τους σε H_2O_2 , η ένταση της απόπτωσης, που προκαλείται από το H_2O_2 , αυξήθηκε. Παρά το γεγονός ότι 1 μM λουτεολίνης δεν επηρέασε την πυρηνική μορφολογία, ακόλουθη έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 είχε ως συνέπεια την αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών πυρήνων από 41,7 των κυττάρων, που δεν προεπώαστηκαν με λουτεολίνη, σε $54 \pm 3,23\%$ (σχήμα 29). Αντιθέτως, η προεπώαση των κυττάρων με χαμηλές συγκεντρώσεις απιγενίνης (1 μM), πριν την έκθεση τους σε H_2O_2 , δεν προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών πυρήνων (σχήμα 30).

Από τα πειράματα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα, ότι τόσο η λουτεολίνη όσο και η απιγενίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις (20 μM) μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση. Σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (10-20 μM) η λουτεολίνη, σε αντίθεση με την απιγενίνη, έχει την ικανότητα να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 , ενώ σε μικρότερες (1 μM) να επάγει περαιτέρω την αποπτωτική δράση του H_2O_2 . Οι δύο τελευταίες δράσεις της λουτεολίνης φαίνεται να



οφείλονται στην ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός, ότι η απιγενίνη, που έχει παρόμοια δομή με την λουτεολίνη, αλλά δεν διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, δεν προσέφερε προστασία, καθώς και δεν μπορούσε να επάγει περαιτέρω την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 .

3.3.2 Επίδραση της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων από το H_2O_2

Εκτός από τη μορφολογία των πυρήνων, μελετήθηκε επίσης και ο σχηματισμός ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA, ο οποίος πραγματοποιείται στο τελικό στάδιο της απόπτωσης. Όπως παρατηρήθηκε και με τη μορφολογία των πυρήνων, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις λουτεολίνης (1 μ M) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 , παρατηρήθηκε αύξηση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο κυτταρικό DNA (σχήμα 31A). Αντίθετα προεπάση των κυττάρων με ενδιάμεσες συγκεντρώσεις λουτεολίνης (15-20 μ M) για 15 λεπτά, πριν την έκθεση σε H_2O_2 , είχε ως συνέπεια τη μείωση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων, που προκαλεί το H_2O_2 (σχήμα 31B). Από την άλλη πλευρά, η απιγενίνη δεν προστάτευσε το κυτταρικό DNA από τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις, αφού προεπάση των κυττάρων με 10, 20 και 50 μ M απιγενίνης δεν μπόρεσε να μειώσει το χαρακτηριστική εμφάνιση των θραυσμάτων του DNA (Σχήμα 31Γ). Έκθεση των κυττάρων με υψηλότερες συγκεντρώσεις (50 μ M) λουτεολίνης και απιγενίνης προκάλεσαν από μόνες τους ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στο DNA, απουσία του H_2O_2 , φανερώνοντας την προαποπτωτική δράση των ενώσεων αυτών.



Λουτεολίνη (μM)	-	-	0,1	0,1	1	1	10	10
H ₂ O ₂ 250 μM	-	+	-	+	-	+	-	+

A



Λουτεολίνη (μM)	-	-	10	10	15	15	20	20
H ₂ O ₂ 250 μM	-	+	-	+	-	+	-	+

B



Απιγενίνη (μM)	-	-	10	10	20	20	50	50
H ₂ O ₂ 250 μM	-	+	-	+	-	+	-	+

Γ



Σχήμα 31: Συνέπειες της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην πρό- ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων του DNA, που προκαλούνται από H₂O₂

Κύτταρα Jurkat (1,5 x 10⁶ ανά ml) προεπωάστηκαν με τις ενδεικνύμενες συγκεντρ λουτεολίνης για 15 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μM H₂O₂ για 6 Οι ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις του DNA παρατηρήθηκαν μετά την απομόνωσή όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές δίνοντας πάντα τα ίδια αποτελέσματα.

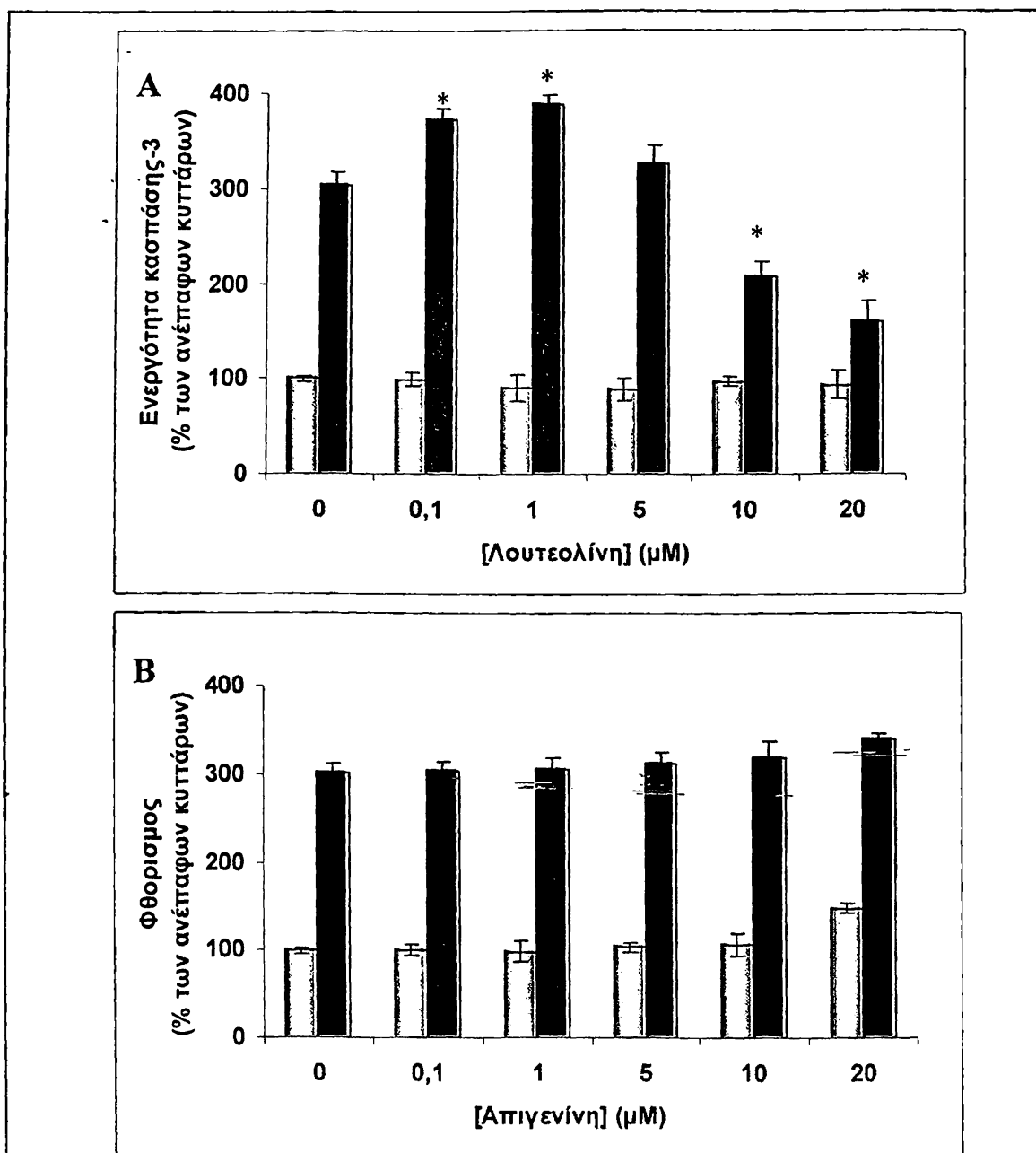


3.3.3 Επίδραση της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης-3, με τη χρήση του φθορογόνου υποστρώματος Ac-DEVD-AMC, καθώς και με εξέταση της σχάσης της πρωτεΐνης PARP, που αποτελεί ενδοκυττάριο υπόστρωμά της. Η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 κατά 203 % σε σχέση με την ενεργότητά της στα ανέπαφα κύτταρα (σχήμα 32). Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με 0,1 και 1 μM λουτεολίνης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 , η ενεργότητα αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με αυτήν, που προέκυψε από την έκθεση σε H_2O_2 (σχήμα 32A, επιπλέον αύξηση 69 και 83 % αντίστοιχα). Όπως και παραπάνω αποκαλύπτεται η ικανότητα της λουτεολίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,1-1 μM), να αυξάνει την ένταση της απόπτωσης που προκαλεί το H_2O_2 . Αντιθέτως προεπώαση των κυττάρων με χαμηλές συγκεντρώσεις απιγενίνης (0,1-1 μM) δεν προκάλεσε αλλαγή στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, από το H_2O_2 (σχήμα 32B). Προεπώαση των κυττάρων με 10 και 20 μM λουτεολίνης προκάλεσε βαθμιαία μείωση στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 που προκαλείται από το H_2O_2 , φέρνοντας τα επίπεδα της ενεργότητας κοντά σε αυτά των ανέπαφων κυττάρων (σχήμα 32A). Προεπώαση των κυττάρων με παρόμοιες συγκεντρώσεις απιγενίνης (5-20 μM) δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην ενεργότητα της κασπάσης-3 (σχήμα 32B).

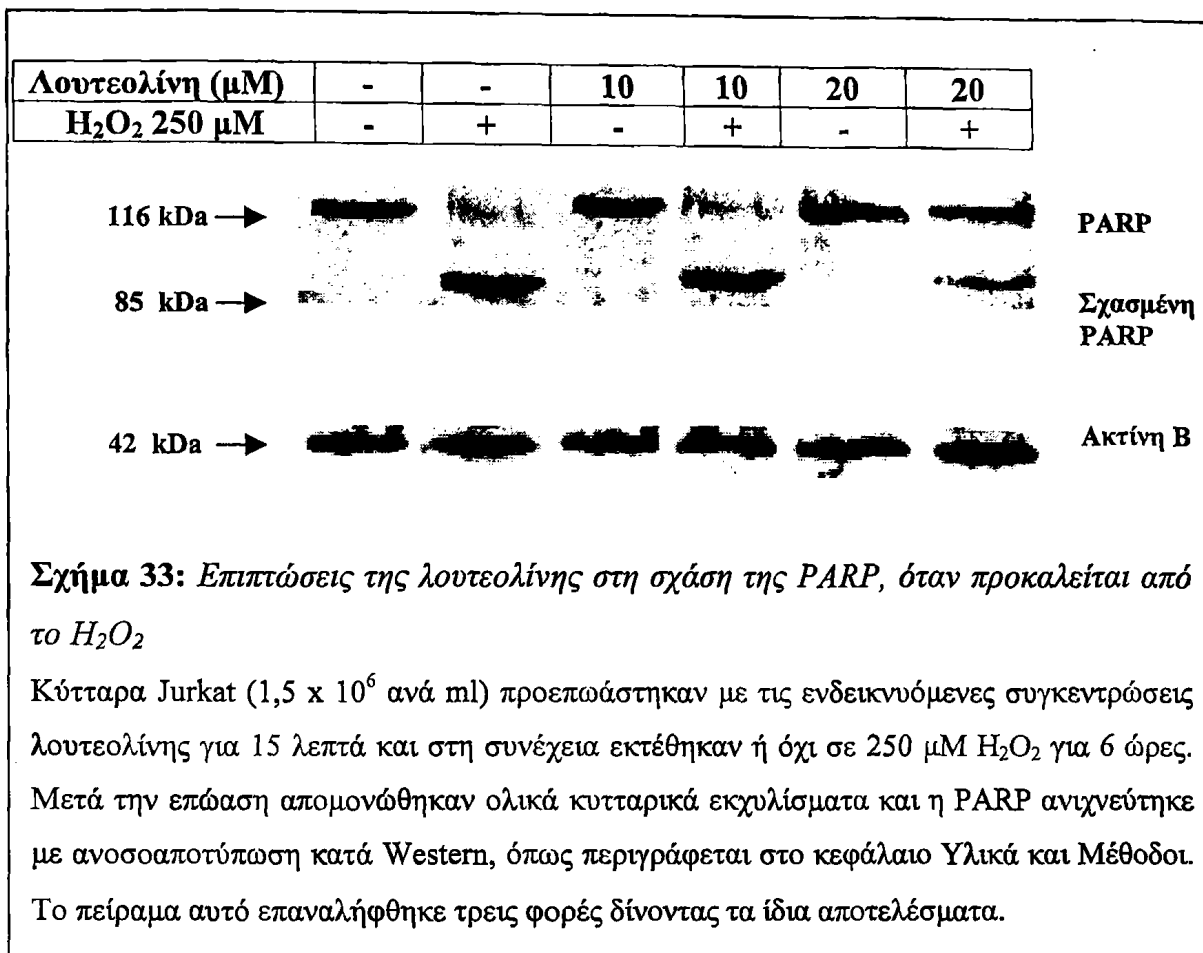
Ένα από τα χαρακτηριστικά υποστρώματα της κασπάσης-3 είναι η πρωτεΐνη PARP. Μετά την επώαση των κυττάρων με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις λουτεολίνης και την ακόλουθη έκθεση σε H_2O_2 , η PARP ανιχνεύτηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western και, όπως φαίνεται στο σχήμα 33, έκθεση των κυττάρων σε 250 μM H_2O_2 οδήγησε σε σχάση της PARP (116 kDa), όπως υποδεικνύεται από την εμφάνιση μίαντας χαμηλότερου μοριακού βάρους (85 kDa). Επώαση με 10 και 20 μM λουτεολίνης, πριν από την προσθήκη H_2O_2 , οδήγησε στη βαθμιαία προστασία της PARP από τη σχάση, που της προκαλεί η ενεργοποιημένη κασπάση-3 (σχήμα 33). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται, πως η λουτεολίνη και όχι η απιγενίνη μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα από την απόπτωση, που προκαλείται μετά από έκθεση τους σε H_2O_2 . Για να αποκαλυφθεί το ακριβές σημείο στο μονοπάτι της απόπτωσης, στο οποίο δρα η λουτεολίνη, ελέγχθηκε η δράση της στα στάδια που προηγούνται της ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Το

ζήτημα της περαιτέρω επαγωγής της απόπτωσης, που προκαλούν χαμηλές συγκεντρώσεις λουτεολίνης (0,1-1 μM) παρουσία H_2O_2 , δεν έχει προς το παρόν διευκρινιστεί και απαιτεί πιο διεξοδική έρευνα.



Σχήμα 32: Συνέπειες της λουτεολίνης και της απιγενίνης στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από το H_2O_2

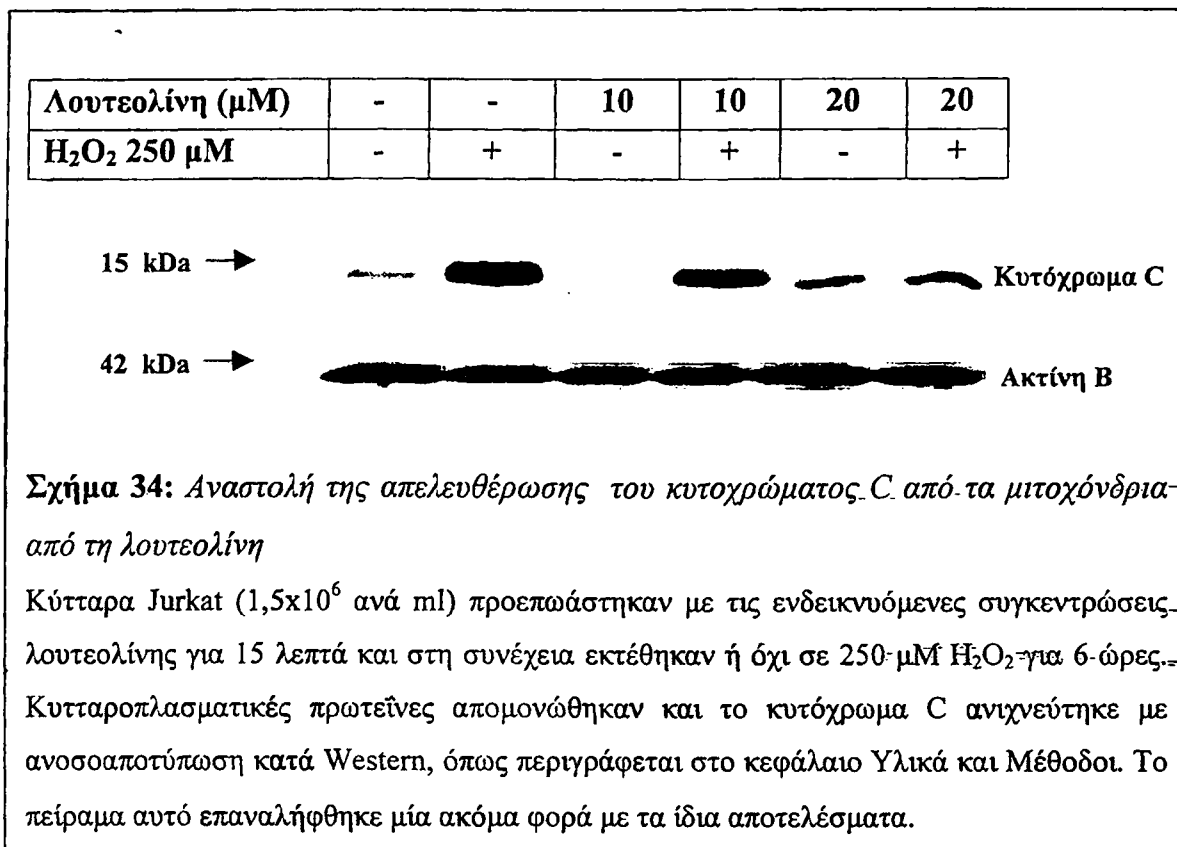
Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) προεπεώσθησαν με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις λουτεολίνης (A) ή απιγενίνης (B) για 15 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν (σκουρόχρωμες μπάρες) ή όχι (κενές μπάρες) σε $250 \mu\text{M}$ H_2O_2 για 6 ώρες. Οι κυτοσολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν και η ενεργότητα της κασπάσης-3 αξιολογήθηκε με τη χρήση του φθορογόνου πεπτιδικού υποστρώματος Ac-DEVD-AMC, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm SD τριπλών καταμετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα. * $p < 0,005$ έναντι των δειγμάτων που εκτέθηκαν σε H_2O_2 .



3.3.4 Η λουτεολίνη προστατεύει από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C

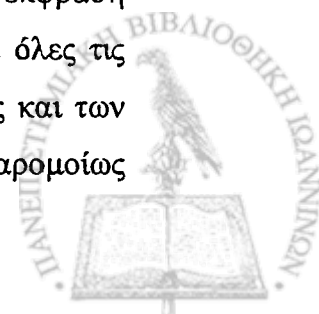
Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και της μεταφοράς του στο κυτταροδιάλυμα, όπου, μαζί με τον παράγοντα Araf-1, σχηματίζουν το λεγόμενο αποπτώσωμα (Adrain and Martin, 2001). Έτσι στην προσπάθεια να εντοπιστεί το σημείο, στο οποίο δρα ανασταλτικά η λουτεολίνη, η περιεκτικότητα του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο ανιχνεύθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Κύτταρα Jurkat, αφού προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με 10 και 20 μM λουτεολίνης, εκτέθηκαν για 6 ώρες σε 250 μM H₂O₂. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, με τη χρήση εξειδικευμένου αντισώματος έναντι του κυτοχρώματος-C. Διαπιστώθηκε πως έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂, οδηγεί στην εμφάνιση του κυτοχρώματος-C στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 34). Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με 10 μM λουτεολίνης, πριν την προσθήκη H₂O₂, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στην ποσότητα του κυτοχρώματος C, που ανιχνεύθηκε στο κυτταρόπλασμα, ενώ στα 20 μM λουτεολίνης η μείωση ήταν αρκετά

μεγαλύτερη. Όπως και προηγουμένως, ο προαποπτωτικός χαρακτήρας της ουσίας φανερώθηκε, αφού επώαση με 20 μM λουτεολίνης, απουσία έκθεσης των κυττάρων σε H_2O_2 είχε σαν συνέπεια σημαντική απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 34). Από τα παραπάνω πειράματα γίνεται φανερό, πως το σημείο δράσης της λουτεολίνης βρίσκεται σε κάποιο στάδιο, που προηγείται της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια.



3.3.5 Επίδραση της λουτεολίνης στη ρύθμιση της οικογένειας των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2

Η οικογένεια των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2 (Bcl-2 family proteins), όπως προαναφέρθηκε στην Εισαγωγή, αποτελεί τον κεντρικό ρυθμιστή πολλών σημάτων, που οδηγούν στη διάνοιξη πόρων στα μιτοχόνδρια και συνεπώς στην απόπτωση. Για το λόγο αυτό έγινε η αξιολόγηση των επιπτώσεων του H_2O_2 και της λουτεολίνης στην έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L. Όπως φαίνεται στο σχήμα 35, η έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL παρέμεινε σταθερή σε όλες τις περιπτώσεις. Είναι φανερό, ότι δεν υπάρχει αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες. Παρομοίως

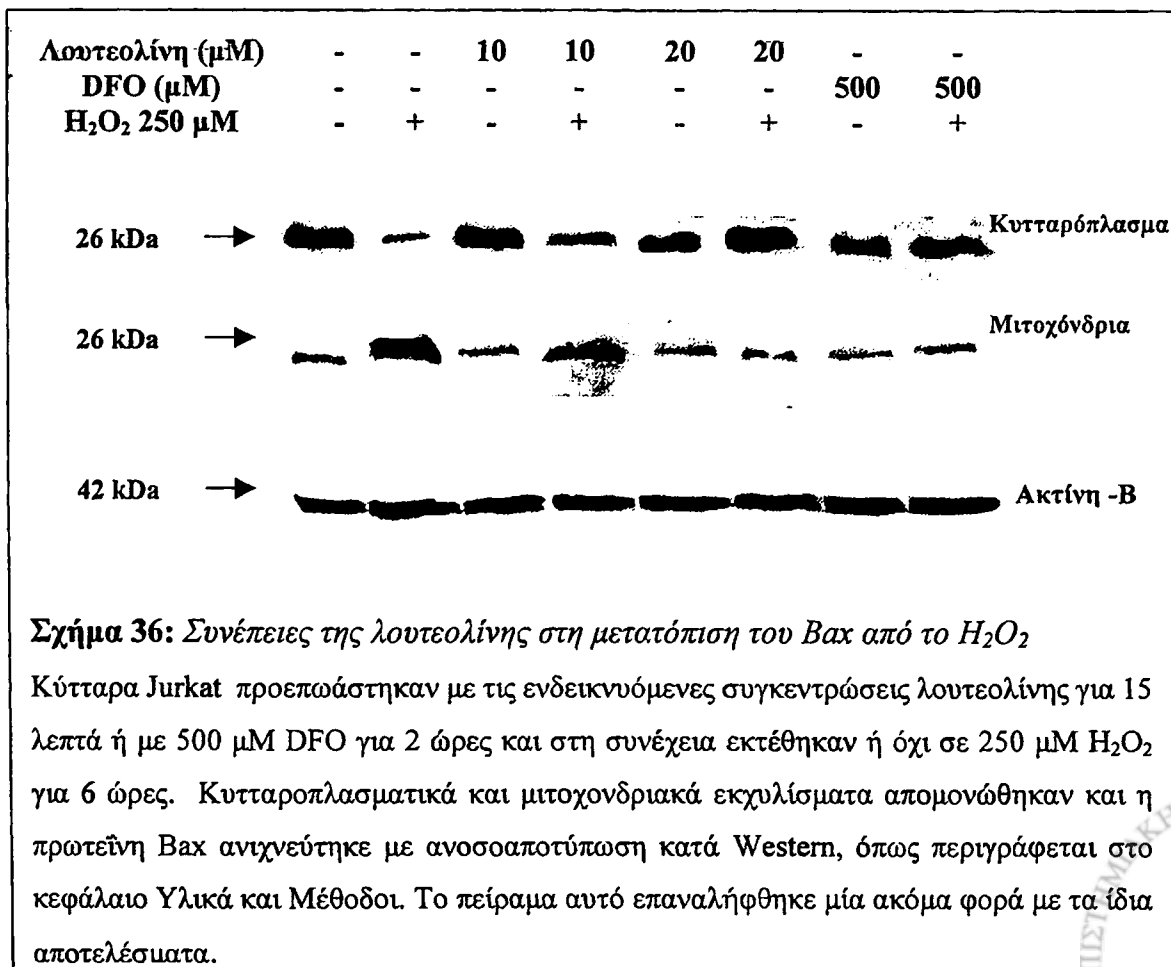
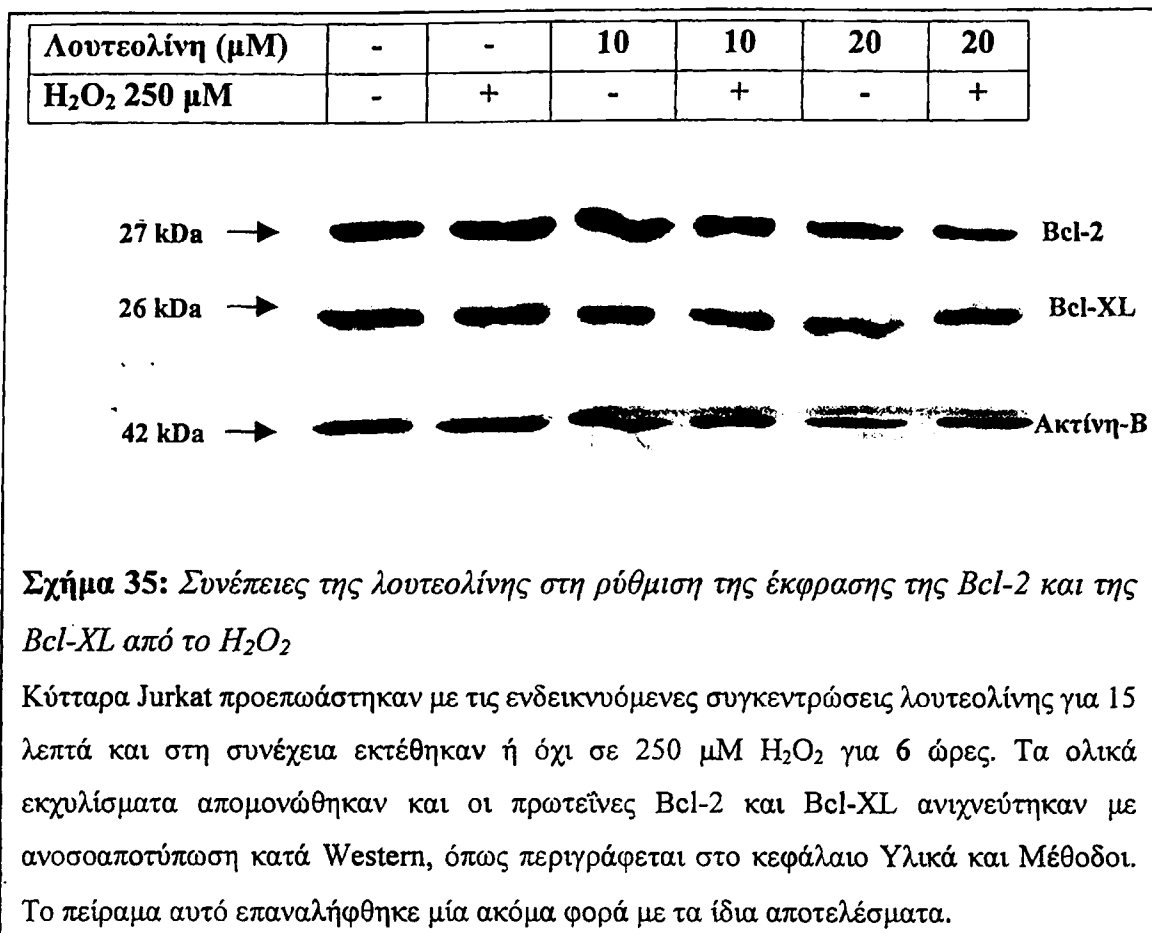


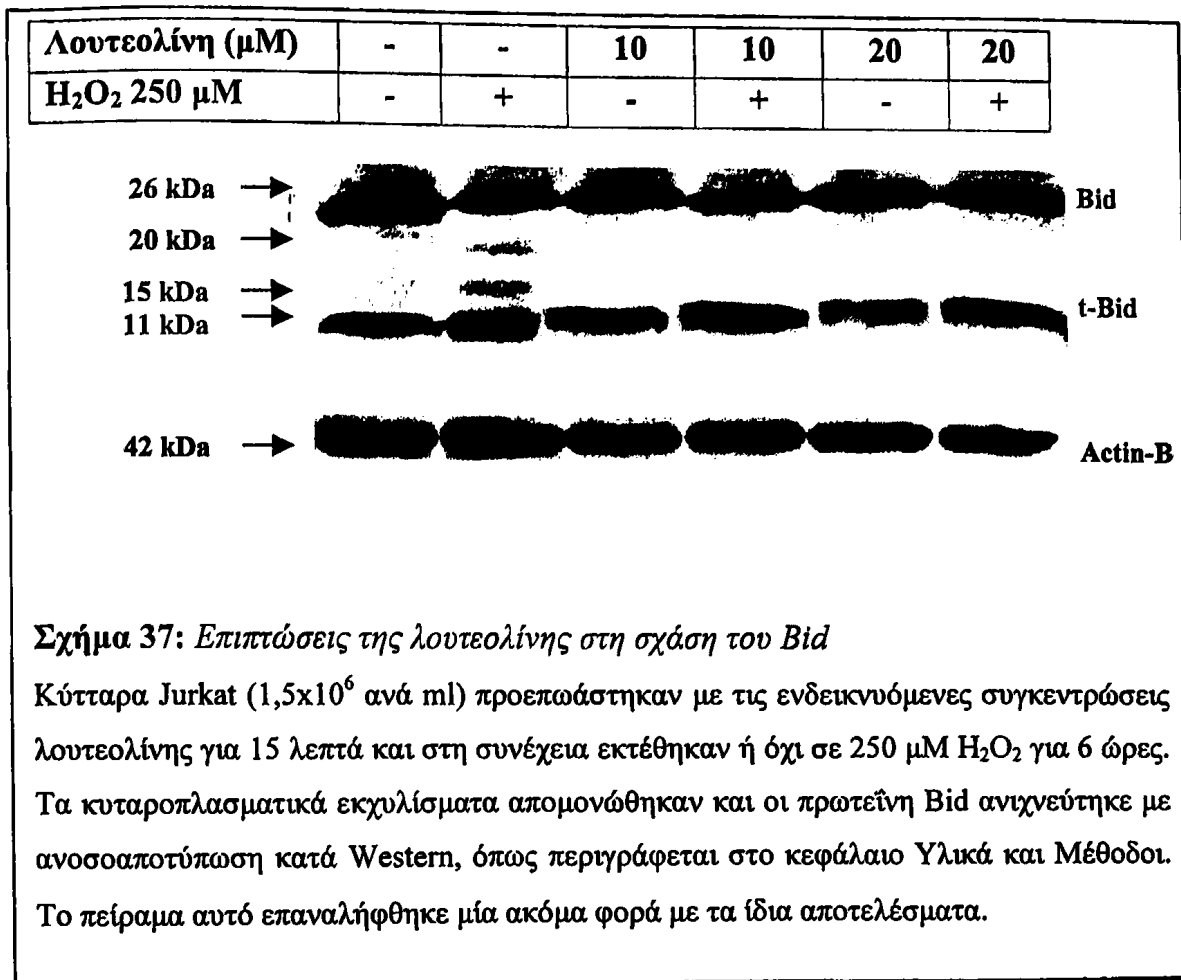
η έκφραση της Bcl-2 (27 kDa) και της Bcl-XL (26 kDa) δεν επηρεάζεται από την έκθεση των κυττάρων σε 10 και 20 μM λουτεολίνης (σχήμα 35).

Αντίθετα, όπως φαίνεται στο σχήμα 36, η πρωτεΐνη Bax μετατοπίζεται μαζικά από το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Προεπώαση των κυττάρων με 10 και 20 μM λουτεολίνης πριν από την έκθεση σε H_2O_2 , προστάτευσε τα κύτταρα από τη μετατόπιση αυτή, μιας και οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση του Bax από τα μιτοχονδριακά εκχυλίσματα και αύξηση των επιπέδων του στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 36). Επειδή υπήρχε η υποψία ότι η προστατευτική δράση της λουτεολίνης οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, εξετάστηκαν οι συνέπειες ενός γνωστού ισχυρού σιδηροδεμευτικού παράγοντα, της δεσφεριοξαμίνης (DFO), στη μετατόπιση του Bax. Κύτταρα Jurkat προεπώαστηκαν με 500 μM DFO (συγκέντρωση που ήταν γνωστό πως προστάτευε, έναντι στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2) (Tenopoulos et al., 2005) για 2 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 250 μM of H_2O_2 . Όπως φαίνεται στο σχήμα 36 και η δεσφεριοξαμίνη ανέστειλε τη μετατόπιση του Bax στα μιτοχόνδρια, όταν αυτή προκαλούταν από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 (σχήμα 36).

Το τελευταίο μέλος της οικογένειας Bcl-2, που εξετάστηκε, ήταν η πρωτεΐνη Bid, η οποία, όπως φαίνεται στο σχήμα 37, σχάζεται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 για 6 ώρες. Τα σχασμένα κομμάτια του Bid αποτελούν ένα κομμάτι, των 11 kDa, το οποίο εμφανίζεται και στα ανέπαφα κύτταρα, πιθανά λόγω της μικρής ενδογενούς απόπτωσης, το truncated Bid (15 kDa), το οποίο αποτελεί το κομμάτι, που μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και προκαλεί την απόπτωση και ένα κομμάτι στα 20 kDa, το οποίο πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως αποτέλεσμα της σχάσης του Bid, που προκαλείται μετά από την ενεργοποίηση μιας MAP κινάσης, της JNK, και ονομάζεται jun-Bid. Προεπώαση με 10 και 20 μM λουτεολίνης προστατεύει από τη σχάση του Bid, που προκαλεί το H_2O_2 (σχήμα 37). Από τα παραπάνω πειράματα προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η λουτεολίνη έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bid από το H_2O_2 .



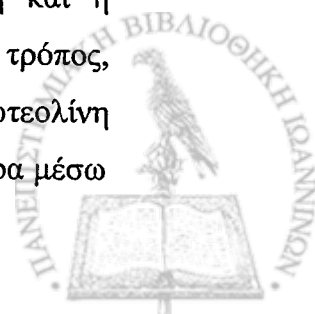


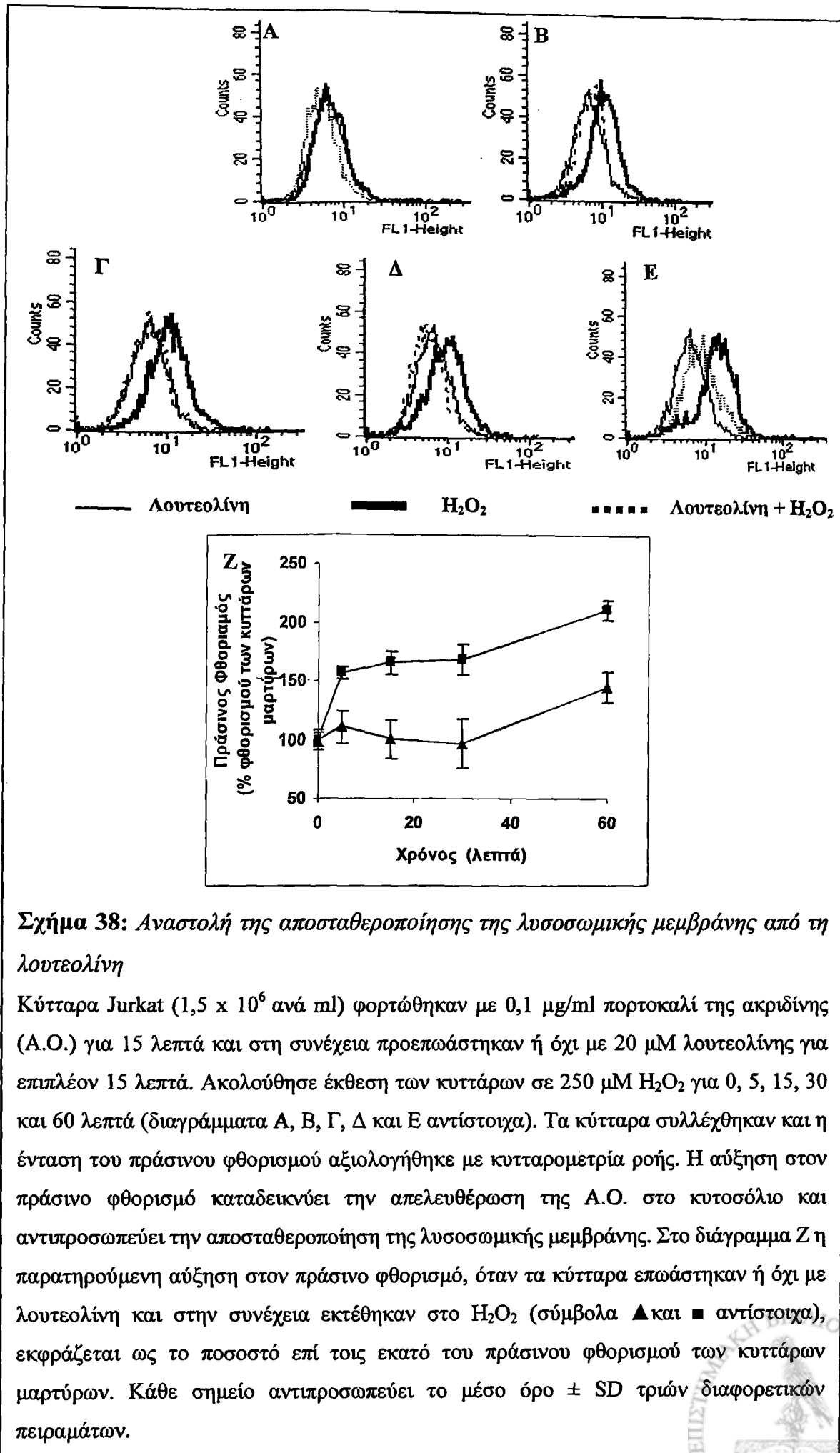


3.3.6 Προστατευτική δράση της λουτεολίνης έναντι στην αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης που προκαλείται από το H₂O₂

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις, που υποστηρίζουν, ότι ένα από τα πρώτα βήματα της απόπτωσης, που προκαλείται από το H₂O₂ (αλλά και από άλλα ερεθίσματα), είναι η αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των λυσοσωματίων (Guicciardi et al., 2004). Για το λόγο αυτό εξετάστηκε η δράση της λουτεολίνης στην αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης, που προκαλείται από το H₂O₂. Η ακεραιότητα των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής, εξετάζοντας την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα της φθορίζουσας χρωστικής acridine orange (AO), η οποία είχε προηγουμένως συσσωρευτεί στα λυσοσωμάτια. Στο σχήμα 38 φαίνεται, ότι η έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα οδήγησε στη μετατόπιση της χρωστικής από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα, όπως υποδηλώνει η αύξηση φθορισμού στο πράσινο. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η αύξηση του πράσινου φθορισμού, ορίστηκε ως 100 % ο φθορισμός των κυττάρων μαρτύρων και ο φθορισμός των υπόλοιπων δειγμάτων εκφράστηκε ως ποσοστό επί τοις εκατό των μαρτύρων. Παρατηρήθηκε αύξηση στον πράσινο φθορισμό 5 λεπτά μετά την προσθήκη του H₂O₂ (56,7% αύξηση έναντι των ανέπαφων κυττάρων), υποδεικνύοντας την απελευθέρωση του AO από τα λυσοσωμάτια (σχήμα 38B). Η αρχική απότομη απελευθέρωση σταθεροποιήθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα για 30 λεπτά (σχήματα 38Γ και 38Δ αντίστοιχα), ενώ ακολούθησε μία δεύτερη φάση σταδιακής αύξησης του πράσινου φθορισμού (110.4 % αύξηση έναντι των ανέπαφων κυττάρων, σχήμα 39E). Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αποτελεί η θεωρία, ότι η αρχική αποσταθεροποίηση, που προκαλείται από το H₂O₂, συνεπάγεται την απελευθέρωση κάποιων στοιχείων των λυσοσωματίων στο κυτταρόπλασμα, τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν ακόμη μεγαλύτερη βλάβη στη λυσοσωμική μεμβράνη μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης (feedback effect).

Προεπάση των κυττάρων με 20 μM λουτεολίνης πριν από την έκθεση σε H₂O₂ ανέστειλε την αύξηση του πράσινου φθορισμού (σχήματα 39B-E). Παρόμοια προστατευτική δράση με τη λουτεολίνη έχει η σιδηροδεσμευτική ένωση δεσφεριοξαμίνη (δεν αναφέρονται τα αποτελέσματα). Η δεσφεριοξαμίνη και η λουτεολίνη διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τη δομή τους, ενώ ακόμη και ο τρόπος, με τον οποίο εισέρχονται στα κύτταρα είναι διαφορετικός. Έτσι, ενώ η λουτεολίνη διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, η δεσφεριοξαμίνη εισέρχεται στα κύτταρα μέσω





Σχήμα 38: Αναστολή της αποσταθεροποίησης της λυσοσωμικής μεμβράνης από τη λουτεολίνη

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ ανά ml) φορτώθηκαν με $0,1 \mu\text{g/ml}$ πορτοκαλί της ακριδίνης (A.O.) για 15 λεπτά και στη συνέχεια προεπωάστηκαν ή όχι με $20 \mu\text{M}$ λουτεολίνης για επιπλέον 15 λεπτά. Ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε $250 \mu\text{M}$ H₂O₂ για 0, 5, 15, 30 και 60 λεπτά (διαγράμματα A, B, Γ, Δ και Ε αντίστοιχα). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η ένταση του πράσινου φθορισμού αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Η αύξηση στον πράσινο φθορισμό καταδεικνύει την απελευθέρωση της A.O. στο κυτοσόλιο και αντιπροσωπεύει την αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης. Στο διάγραμμα Z η παρατηρούμενη αύξηση στον πράσινο φθορισμό, όταν τα κύτταρα επωάστηκαν ή όχι με λουτεολίνη και στην συνέχεια εκτέθηκαν στο H₂O₂ (σύμβολα ▲ και ■ αντίστοιχα), εκφράζεται ως το ποσοστό επί τοις εκατό του πράσινου φθορισμού των κυττάρων μαρτύρων. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο \pm SD τριών διαφορετικών πειραμάτων.

ενδοκύττωσης υγρής φάσης (Doulias et al., 2003). Το μοναδικό, αλλά από ότι φαίνεται πολύ μεγάλης σημασίας, κοινό τους στοιχείο είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει, πως η προστασία από την αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης από το H_2O_2 , οφείλεται στη δέσμευση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου εντοπίζεται στα λυσοσωμάτια. Αυτό έχει ως συνέπεια την αναστολή της αντίδρασης Fenton και κατ' επέκταση της παραγωγής των πολύ δραστικών ριζών υδροξυλίου, που, όπως περιγράφεται στην Εισαγωγή, επιτίθενται στα διάφορα βιολογικά συστατικά και ευθύνονται για τις βλαβερές του συνέπειες στο κύτταρο.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των λυσοσωματίων και η απελευθέρωση ορισμένων συστατικών τους μπορούν να προκαλέσουν τις ακολουθίες των αντιδράσεων που οδηγούν τελικά στην απόπτωση, είναι προς το παρόν άγνωστος και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

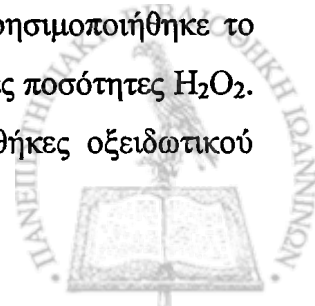


4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Σύστημα μελέτης

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2001 με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων μελιών Ελληνικής προέλευσης, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις, που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Ως οξειδωτικός παράγοντας επιλέχθηκε το H_2O_2 , μιας και αποτελεί ένα μόριο, που δημιουργείται *in vivo* σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, διαπερνά με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες και μέσω των ελεύθερων ιόντων σιδήρου (αντιδράσεις τύπου Fenton) οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου. Οι ρίζες αυτές είναι πολύ δραστικές και προκαλούν βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια, μεταξύ των οποίων και στο DNA, που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη δράση τους. Η αξιολόγηση των επιπέδων της 8-όξο-γουανίνης, που αποτελεί το κύριο παράγωγο της οξείδωσης των βάσεων του DNA, είναι η πιο συνήθης τακτική για την αξιολόγηση της οξείδωσης του DNA. Παρά το γεγονός ότι η προσέγγιση αυτή -προσφέρει ένα σχετικά καλό χαρακτηρισμό των προϊόντων οξείδωσης, διαπιστώθηκαν αρκετά προβλήματα στην επεξεργασία των δειγμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση αξιολόγησης της βλάβης του DNA, η οποία καταγράφει και ποσοτικοποιεί τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του και ονομάζεται «ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης», ή αλλιώς “comet assay” (Ostling and Johanson, 1984). Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα της υψηλής ευαισθησίας, αφού μικρός αριθμός σχάσεων μπορεί να επηρεάσει τη φυσικό-χημική συμπεριφορά του πυρηνικού DNA. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε, προκειμένου να αξιολογηθεί η βιολογική δράση εκχυλισμάτων μελιού, καθώς και χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των κυτταροπροστατευτικών ιδιοτήτων των φλαβονοειδών.

Στην παρούσα εργασία, αντί για την απευθείας εξωγενή προσθήκη του H_2O_2 σε καλλιέργεια κυττάρων, που αποτελεί τη συνήθη πρακτική, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, το οποίο παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H_2O_2 . Το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε, προκειμένου να εξασφαλίσει συνθήκες οξειδωτικού



στρες, που μοιάζουν με αυτές, που είναι πιθανό να απαντηθούν σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως για παράδειγμα συμβαίνει κατά τη διάρκεια διαφόρων φλεγμονών.

4.2 Προστατευτική δράση του μελιού

Το μέλι, ένα από τα συστατικά της Μεσογειακής διαίτας, έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, την ικανότητα του να επιταχύνει την επούλωση των πληγών και των εγκαυμάτων, καθώς και τη δράση του έναντι σε διάφορες γαστροεντερικές και άλλες παθήσεις (Bergman et al., 1983, Subrahmanyam, 1993, Subrahmanyam, 1996, Bilsel et al., 2002, Alnaqdy et al., 2005, El-Arab et al., 2006). Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δράσης του συστατικού αυτού της διατροφής, παρόλα αυτά, παραμένουν άγνωστοι. Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα εκχυλισμάτων μελιού να προστατεύουν από τη βλάβη που προκαλείται στο DNA κυττάρων που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε, πως ορισμένα από τα βουτανολικά εκχυλίσματα μπορούσαν να προσφέρουν ισχυρή προστασία ενάντια στη βλάβη, που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA. Το γεγονός ότι τα βουτανολικά και όχι τα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα μπορούσαν να δράσουν προστατευτικά, οφείλεται πιθανά στο είδος των ουσιών που εκχυλίζονται σε κάθε περίπτωση. Κατά συνέπεια η σύσταση των εκχυλισμάτων ήταν αποφασιστικής σημασίας για την προστατευτική τους δράση. Το εύλογο ζήτημα, το οποίο δημιουργήθηκε, ήταν ο προσδιορισμός των βιοδραστικών συστατικών, καθώς και η εύρεση του ακριβούς μηχανισμού δράσης τους. Η μεγάλη περιεκτικότητα των βουτανολικών εκχυλισμάτων σε φαινολικές ουσίες, συνδυασμένη με την πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων αυτών, κατεύθυνε την έρευνά μας στην απομόνωση και την αξιολόγηση ορισμένων συστατικών του μελιού. Από τα συστατικά αυτά το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στα φλαβονοειδή, τα οποία είχαν και τη μεγαλύτερη προστατευτική δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

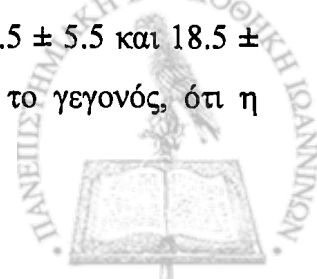


4.3 Φλαβονοειδή και προστασία ενάντια στις βλάβες στο DNA

4.3.1 Συσχέτιση προστατευτικής δράσης και δομής των φλαβονοειδών

Αν και υπάρχουν κάποια βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών, έναντι στις βλάβες, που προκαλούνται στο κυτταρικό DNA (Noroozi et al., 1998, Yoshikawa et al., 2004, Horvathova et al., 2004), ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα εργασία 20 επιλεγμένα φλαβονοειδή, τα οποία μοιράζονται ειδικά δομικά χαρακτηριστικά, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν από τις βλάβες στο DNA κυττάρων Jurkat που εκτίθενται σε H_2O_2 . Από τη σύγκριση των επιμέρους δομών με την ικανότητά τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA, εξήχθησαν συμπεράσματα για τα δομικά χαρακτηριστικά, που ευνοούν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών. Προέκυψε ότι τα δομικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών, είναι: α) η παρουσία της ορθοδιύδροξυ δομής στο δακτύλιο A ή B, β) η παρουσία της 3-υδροξυλομάδας στο δακτύλιο C σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση και γ) η παρουσία του C2-C3 διπλού δεσμού στο δακτύλιο C (Σχήμα 17).

Πράγματι, όλα τα φλαβονοειδή τα οποία περιείχαν δύο υδροξύλια σε όρθο-θέση μεταξύ τους, παρείχαν προστασία ενάντια στη βλάβη στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 (λουτεολίνη, φισετίνη, κερκετίνη, μυρικετίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη). Αξίζει να αναφερθεί εδώ, ότι η ορθοδιύδροξυ δομή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική ακόμη και αν εντοπίζεται στο δακτύλιο A (7,8-διυδροξυφλαβόνη και βαϊκαλεΐνη). Ο συνδυασμός της υδροξυλομάδας στη θέση 3 με την όξο δομή στη θέση 4 στο δακτύλιο C αποδείχθηκε, ότι δημιουργεί μια λειτουργική ομάδα, η οποία καθιστά το φλαβονοειδές που την περιέχει προστατευτικό. Το γεγονός αυτό φανερώνεται από την παρατήρηση ότι η 3-υδρόξυφλαβόνη, η οποία περιέχει αποκλειστικά αυτή τη λειτουργική ομάδα, μπορούσε να μειώσει τη βλάβη στο κυτταρικό DNA. Η επιπλέον παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη θέση 5 αύξησε περαιτέρω την αποτελεσματικότητα της προστασίας, κάτι το οποίο φανερώνεται από τη σύγκριση ανάμεσα στην 3-υδρόξυφλαβόνη και τη γαλανγίνη (τιμές IC_{50} , 88.5 ± 5.5 και 18.5 ± 1.5 , αντίστοιχα). Η παρατήρηση αυτή πιθανά να σχετίζεται με το γεγονός, ότι η



παρουσία της 5 υδροξυλομάδας προσφέρει τη δυνατότητα ταυτομερισμού στο αντίστοιχο φλαβονοειδές (Moridani et al., 2003). Από την άλλη πλευρά ο συνδυασμός της 5 υδροξυλομάδας με την 4 όξο δομή απουσία της 3 υδροξυλομάδας δεν προσφέρει καμία προστασία, παρά το γεγονός ότι είναι γνωστό, πως το δομικό αυτό χαρακτηριστικό συμμετέχει στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φλαβονοειδών που το περιέχουν (Rice-Evans et al., 1996).

Όλες οι φλαβονόλες, η ομάδα των φλαβονοειδών, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία της 4 όξο θέσης και της 3-υδροξυλομάδας, με εξαίρεση την κεμφερόλη και την μορίνη, προσέφεραν σχετικά υψηλή προστατευτική δράση. Η εξήγηση για το γεγονός ότι τα δύο τελευταία μόρια είναι λιγότερο δραστικά από τις υπόλοιπες φλαβονόλες είναι πιθανό να σχετίζεται με την επιπλέον παρουσία υδροξυλικών υποκαταστατών στην θέση 4' (κεμφερόλη) ή στις θέσεις 2' και 4' (μορίνη), οι οποίες επιδρούν αρνητικά στην προστατευτική ικανότητα των αντίστοιχων φλαβονοειδών. Έχει προταθεί στο παρελθόν, ότι η υδροξυλίωση στη θέση 4' είναι πιθανό να συντελεί στην οξείδωση της 3 υδροξυλομάδας, με συνέπεια την παραγωγή μιας κινόνης ως προϊόν-οξείδωσης (Moridani et al., 2003). Πέρα από αυτό, η υδροξυλίωση στη θέση αυτή έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητη, για την ικανότητα ορισμένων φλαβονοειδών να προκαλούν απόπτωση σε κύτταρα σε καλλιέργεια (Ko et al., 2004).

Η παρουσία του C2, C3 διπλού δεσμού αύξησε την προστατευτική ικανότητα των φλαβονοειδών περισσότερο από 10 φορές, όπως καταδεικνύεται από τη σύγκριση της λουτεολίνης με την εριοδικτυόλη με τιμές IC_{50} , 19.5 ± 2.1 και 198 ± 3.1 μ M, αντίστοιχα, και της κερκετίνης με την ταξιφολίνη με τιμές 5.4 ± 1.2 και 257 ± 4.4 μ M, αντίστοιχα. Από τη στιγμή που αυτά τα φλαβονοειδή έχουν πανομοιότυπες χημικές δομές με εξαίρεση την απουσία του C2, C3 διπλού δεσμού στα δεύτερα, είναι ότι ένα ευρύ σύστημα σύζευξης αυξάνει την προστατευτική δράση των αντίστοιχων φλαβονοειδών. Οι ακριβείς λεπτομέρειες για το μηχανισμό δράσης, με τον οποίο τα παραπάνω δομικά στοιχεία συμβάλλουν στην ικανότητα των φλαβονοειδών να προστατεύουν το κυτταρικό DNA, διερευνήθηκαν και αναλύονται παρακάτω.



4.3.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών

Η ικανότητα των φλαβονοειδών, να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, έχει προκαλέσει έντονο ενδιαφέρον και αντιπροσωπεύει προς το παρόν την επικρατούσα θεωρία για τις ευεργετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών *in vivo* (Pietta, 2000, Rice-Evans et al., 1996, Ishige et al., 2001, Lemanska et al., 2001). Η πλειοψηφία των ερευνητών, που μελέτησε την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες του DNA, καταδεικνύει την αντιοξειδωτική δράση τους ως μηχανισμό της προσφερόμενης προστασίας (Noroosi et al., 1998, Yoshikawa et al., 2004, Horvathova et al., 2004). Παρόλα αυτά από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας δεν επιβεβαιώθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην προστατευτική ικανότητα και την εκκαθαριστική δράση των φλαβονοειδών που εξετάστηκαν (σχήμα 18). Το γεγονός ότι η προστατευτική δράση αξιολογήθηκε ενδοκυττάρια, σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αξιολογήθηκε *in vitro* απουσία κυττάρων, οδήγησε στην αναγκαιότητα να συμπεριληφθεί η ικανότητα των φλαβονοειδών να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη-στη-συσχέτιση των δύο ιδιοτήτων. Η ικανότητα αυτή εκφράζεται με τις τιμές logP, που αντιστοιχούν στη λιποφιλικότητα του κάθε φλαβονοειδούς (Moridani et al., 2003). Ακόμη και όταν αυτή η ιδιότητα συμπεριλήφθηκε στην πολυπαραγοντική καμπύλη, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην προστατευτική δράση και την ικανότητα των φλαβονοειδών να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες.

Η παρατήρηση αυτή δε μας ξάφνιασε, αφού προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι κλασικές αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως το α-λιποϊκό οξύ, η Ν-ακέτυλο-κυστεΐνη και το trolox, δεν προσέφεραν προστασία ενάντια στην βλάβη του κυτταρικού DNA. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια αυξάνει ο αριθμός των ερευνητών, οι οποίοι αμφισβητούν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών ως μηχανισμό δράσης τους, προτείνοντας διαφορετικές λειτουργίες όπως είναι η αναστολή ενζύμων και η τροποποίηση της μεταγωγής σήματος. (Lotito et al., 2004, Williams et al., 2004, Halliwell et al., 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας σε συνδυασμό με τις παραπάνω πληροφορίες αποκαλύπτουν πως η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών δεν αποτελεί το μηχανισμό της προστατευτικής του δράσης ενάντια στις βλάβες στο κυτταρικό DNA.



4.3.3 Σιδηροδέσμευτική δράση των φλαβονοειδών

Η δεύτερη ιδιότητα των φλαβονοειδών, που θα μπορούσε να θεωρηθεί υπεύθυνη για την προστατευτική τους δράση, είναι η σιδηροδεσμευτική ικανότητα. Πράγματι, αντίθετα με τα κλασικά αντιοξειδωτικά, όλες οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, που δοκιμάστηκαν στο σύστημά μας, είναι προστατευτικές ενάντια στις βλάβες στο DNA, όταν αυτές προκαλούνται από το H_2O_2 (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε άλλωστε, ο ενδοκυττάριος οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος είναι κύριος διαμεσολαβητής στις προκαλούμενες αυτές βλάβες. Στο παρελθόν αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την ικανότητα των φλαβονοειδών, να δημιουργούν σύμπλοκα με μέταλλα μετάπτωσης, όπως είναι ο σίδηρος και ο χαλκός (Borsari et al., 2001, Kostyuk et al., 2001, Mira et al., 2002, Fernandez et al., 2002, Moridani et al., 2003, Nest et al., 2004). Οι ακριβείς θέσεις σιδηροδέσμευσης παρόλα αυτά αποτελούν αντικείμενο αντιπαράθεσης και για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία αρκετά από τα φλαβονοειδή, που μελετήθηκαν, ελέγχθηκαν με φασματοφωτομετρική ανάλυση, για την ικανότητα τους να δεσμεύουν δισθενή σίδηρο *in vitro*. Από την παραπάνω ανάλυση προέκυψε το συμπέρασμα, ότι ορισμένα φλαβονοειδή δεσμεύουν τα δισθενή ιόντα σιδήρου *in vitro* και πως οι πιθανές θέσεις δέσμευσης είναι τα δύο υδροξύλια σε όρθο- θέση, είτε στο δακτύλιο A, είτε στο δακτύλιο B, καθώς και η 3-υδροξυλομάδα σε συνδυασμό με την 4-όξο θέση. Τα δομικά αυτά χαρακτηριστικά αναφέρονται παραπάνω ως ευνοϊκά για την προστασία του DNA, οδηγώντας μας στην υπόθεση πως η προστατευτική αυτή δράση μπορεί να οφείλεται στη δέσμευση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, που υπάρχει φυσιολογικά μέσα στα κύτταρα.

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός, ότι η προστασία που προσέφεραν τα φλαβονοειδή βαθμιαία μειώθηκε, καθώς η ποσότητα του σιδήρου στο σύμπλοκο σιδήρου:φλαβονοειδούς που χρησιμοποιήθηκε για προεπάση αυξανόταν. Η πιο προφανής εξήγηση αυτών των παρατηρήσεων είναι το γεγονός, ότι τα κορεσμένα με σίδηρο φλαβονοειδή δεν είναι ικανά να δεσμεύσουν επιπλέον σίδηρο, κάτι το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική προστασία του κυτταρικού DNA. Το γεγονός ότι η λουτεολίνη και η γαλανγίνη έχασαν την προστατευτική τους δράση, όταν συμπλοκοποιήθηκαν με σίδηρο σε αναλογία 1:1, ενώ αντίθετα η κερκετίνη σε αναλογία 1:3, οφείλεται πιθανά στη



γνωστή ιδιότητα της τελευταίας, να ανάγει τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} , με ταυτόχρονη οξείδωσή της (Moridani et al., 2003).

Προκειμένου να μπορέσουμε να συγκρίνουμε την ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου με την προστατευτική δράση ενάντια στις βλάβες του DNA, ήταν απαραίτητο να προσδιορίσουμε την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν σίδηρο στις ίδιες συνθήκες με αυτές, στις οποίες παρατηρήθηκε προστασία, δηλαδή ενδοκυττάρια. Παρά το μεγάλο αριθμό των δημοσιεύσεων σε σχέση με την ικανότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν το σίδηρο *in vitro*, ποτέ στο παρελθόν δεν πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ικανότητας αυτής ενδοκυττάρια. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ενδοκυττάριας ποσότητας σιδήρου, που είναι χαλαρά δεσμευμένος σε διάφορα κυτταρικά συστατικά (Epsztejn et al., 1997). Σε αυτό το ποσό του σιδήρου οφείλεται πιθανά η παραγωγή ελεύθερων ριζών από το H_2O_2 μέσω των αντιδράσεων τύπου Fenton. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων απέδειξαν ότι τα φλαβονοειδή μπορούν και δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Η ικανότητα αυτή εκφράστηκε με τον υπολογισμό των τιμών EC_{50} , που αναγράφονται στον Πίνακα 3. Η συσχέτιση των τιμών EC_{50} με τις τιμές IC_{50} s είχε μια ισχυρή, στατιστική σημαντικότητα με συντελεστή του Spearman ρ ίσο με 0,9 ($p = 0,005$). Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προστατευτική δράση των φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες του κυτταρικού DNA, όταν αυτές προκαλούνται από το H_2O_2 , οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου από το H_2O_2 .

Οι σταθερές δέσμευσης των φλαβονοειδών με το σίδηρο είναι προς το παρόν άγνωστες και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Πολλά φλαβονοειδή περιέχουν περισσότερο από μία θέση δέσμευσης μετάλλων, κάνοντας ιδιαίτερα δύσκολο να υπολογιστεί η σιδηροδεσμευτική ικανότητα της κάθε θέσης. Παρά το γεγονός αυτό οι σταθερές δέσμευσης φλαβονοειδών, που περιείχαν μόνο μια πιθανή θέση πρόσδεσης του σιδήρου, υπολογίστηκαν πρόσφατα από τους Engelmann et al. (Engelmann et al., 2005). Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποκάλυψαν, ότι η ορθοδιύδροξυ δομή και η 4-όξο θέση σε συνδυασμό με την 3-υδροξυλομάδα αποτελούν τις θέσεις, στις οποίες δεσμεύεται ο σίδηρος. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας και ενισχύει περαιτέρω τη θεωρία της σιδηροδέσμευσης ως το μηχανισμό της προστατευτικής δράσης.



4.3.4 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης

Μια από τις προϋποθέσεις της προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών ήταν η ικανότητά τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχονται στα κύτταρα. Όντας στο εσωτερικό των κυττάρων, τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να προστατεύουν τα κύτταρα με ποικίλους διαφορετικούς μηχανισμούς. Βασισμένοι σε αυτά τα αποτελέσματα είναι δυνατό να υποθέσει κανείς, πως η αναστολή της παραγωγής ελεύθερων ριζών υδροξυλίου σε θέσεις, που εντοπίζεται ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος, είναι πολύ πιο αποτελεσματική στρατηγική αντιμετώπισης της βλάβης του DNA από ότι η εκκαθάρισή τους. Για τους παραπάνω λόγους προκύπτει το συμπέρασμα πως τα φλαβονοειδή πρέπει να διαθέτουν τις παρακάτω ιδιότητες, προκειμένου να μπορούν να προσφέρουν ικανοποιητική προστασία ενάντια στις βλάβες, που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA: α) να είναι ικανά να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και β) να είναι ικανά να απομακρύνουν τον χαλαρά δεσμευμένο οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο από ειδικές ενδοκυτταρικές περτοχές. Αν και τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου συχνά θεωρούνται ότι είναι δεσμευμένα σε χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες, η υπόθεση αυτή δε στηρίζεται σε πειραματικά δεδομένα. Τίποτα δεν αποκλείει ένα μέρος από τα ιόντα αυτά να είναι χαλαρά δεσμευμένα σε μακρομόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες, το DNA, το RNA και οι υδατάνθρακες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες μελέτες, οι οποίες αποδεικνύουν ότι ένα σχετικά υψηλό ποσοστό του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου εντοπίστηκε στα λυσοσωμάτια και ότι ο σίδηρος αυτός έχει κεντρικό ρόλο ως διαμεσολαβητής της βλάβης στο DNA και στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 (Doulias et al., 2003, Tenopoulou et al., 2005, Tenopoulou et al., 2007).

Τέλος, πρέπει να τονιστεί πως παρά το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπέρασαν κατά πολύ τις πιθανές φυσιολογικές τιμές, η βιολογική τους σημασία δεν θα έπρεπε να υποτιμηθεί, αφού τα τελικά αποτελέσματα εξαρτώνται από παραμέτρους, όπως είναι η πυκνότητα των κυττάρων, ο ρυθμός παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου, η διάρκεια της επώασης κ.α. Πρέπει εδώ να σημειωθεί, πως στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε σχετικά χαμηλός χρόνος έκθεσης των κυττάρων στα φλαβονοειδή (15 λεπτά), προκειμένου να αποφευχθούν μεταβολικές τροποποιήσεις



τους, που θα επηρέαζαν την προστατευτική τους δράση, καθώς και την πιθανότητα τα φλαβονοειδή να επιδρούν στην αλλαγή της έκφρασης κάποιων γονιδίων.

4.3.5 Τοξική δράση των φλαβονοειδών

Εκτός από την προστατευτική δράση ορισμένα από τα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν εμφάνισαν τοξική δράση εναντίον των κυττάρων, είχαν δηλαδή την ικανότητα να προκαλούν βλάβη στο κυτταρικό DNA απουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας δεν αρκούν για να προτείνουμε κάποιο μηχανισμό για την τοξική δράση των φλαβονοειδών, καθιστώντας αναγκαία επιπλέον πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση. Η διαλεύκανση του μηχανισμού της τοξικότητας των φλαβονοειδών αποτέλεσε αντικείμενο μεγάλου αριθμού μελετών (Sergediene et al., 1999, Galati et al., 2002, Galati and O'Brien, 2004). Οι Silva et al. αποδίδουν την τοξικότητα των φλαβονοειδών στην ικανότητα του να αυτοοξειδώνονται, ενώ η ερευνητική ομάδα του Moridani θεωρεί την λιποφιλικότητα των φλαβονοειδών ως το σημαντικότερο παράγοντα, που επηρεάζει την τοξικότητα (Silva et al, 2000, Moridani et al., 2002).

Είναι πολύ σημαντικό να ληφθεί αυτή η παράμετρος υπ' όψιν, αφού υψηλές δόσεις από ένα προστατευτικό φλαβονοειδές θα μπορούσαν, αντί να δράσουν προς όφελος του οργανισμού, να είναι τοξικές. Αντί λοιπόν της λήψης εμπλουτισμένων σκευασμάτων (βιταμίνες, συμπληρώματα κ.α.), η ισορροπημένη διατροφή, που περιλαμβάνει πολλά φυσικά προϊόντα, ανάμεσά τους και το μέλι, θα μπορούσε να προφυλλάσει από την εμφάνιση διάφορων ασθενειών. Όσον αφορά στη χρήση των φλαβονοειδών, ως στοιχεία φαρμακευτικών σκευασμάτων, έναντι σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, λόγω της τοξικότητάς τους, απαιτούνται προσεχτικές και εκτενείς κλινικές μελέτες



4.4 Φλαβονοειδή και απόπτωση

4.4.1 Γενικά

Μετά την αποδεδειγμένη προστατευτική δράση ορισμένων φλαβονοειδών ενάντια στις βλάβες, που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA, ήταν λογικό η εργασία αυτή να επεκταθεί στη μελέτη της δράσης τους στη διαδικασία της απόπτωσης. Ανάμεσα στα προστατευτικά φλαβονοειδή επιλέχθηκε, για περαιτέρω μελέτη, η λουτεολίνη, η οποία συνδυάζει την υψηλή προστατευτική ικανότητα με το γεγονός ότι δεν οξειδώνεται εύκολα, εξαιτίας του γεγονότος, ότι από τη δομή της απουσιάζει η 3-υδροξυλομάδα. Παράλληλα με τη λουτεολίνη ελέγχθηκε και το δομικό της ανάλογο, η απιγενίνη, που έχει ακριβώς την ίδια δομή, με μοναδική διαφορά την απουσία από το μόριό της ενός υδροξυλίου στη θέση 4' και κατ' επέκταση της ορθοδιυδροξυ δομής στο δακτύλιο B. Όπως αποδείχθηκε παραπάνω, εξαιτίας της μοναδικής αυτής διαφοράς, η απιγενίνη-δεν μπορεί να προστατεύσει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H_2O_2 , ενώ δε δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Η επώαση κυττάρων Jurkat με υψηλές συγκεντρώσεις (20-50 μM) λουτεολίνης ή απιγενίνης μπορούσε να προκαλέσει απόπτωση στα κύτταρα απουσία προσθήκης του H_2O_2 . Προεπάση των κυττάρων με ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (10-20 μM) λουτεολίνης μπορούσε να μειώσει τις αποπτωτικές συνέπειες, που προκαλούνται από το H_2O_2 . Αντιθέτως, σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, η απιγενίνη δεν προσέφερε προστασία στα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 . Μία επιπλέον, μη αναμενόμενη δράση της λουτεολίνης, αλλά όχι της απιγενίνης, η οποία αποκαλύφθηκε από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, ήταν η περαιτέρω επαγωγή της απόπτωσης, που προκαλεί το H_2O_2 από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (1 μM).

4.4.2 Προστατευτική δράση της λουτεολίνης ενάντια στην απόπτωση

Από τις προαναφερόμενες δράσεις της λουτεολίνης αυτή που μελετήθηκε εκτενώς ως προς τον μηχανισμό της είναι η προστατευτική της δράση ενάντια στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας αποκαλύπτεται, πως προεπάση των κυττάρων με 10-20 μM λουτεολίνης πριν από



την έκθεσή τους σε H_2O_2 , έχει ως συνέπεια την αναστολή της απόπτωσης, που αυτό προκαλεί (σχήματα 29, 31-34). Αντιθέτως το δομικό της ανάλογο, η απιγενίνη, δεν μπορούσε να δράσει προστατευτικά σε παρόμοιες ή και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Όπως προαναφέρθηκε, η μόνη δομική διαφορά ανάμεσα στη λουτεολίνη και την απιγενίνη είναι η παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη θέση 4' και κατ' επέκταση της ορθοδιυδροξυ δομής στο δακτύλιο Β της λουτεολίνης (Σχήμα 28). Στην ενότητα 3.2.3 συμπεραίνεται ότι η ορθοδιυδροξυ δομή αποτελεί θέση δέσμευσης του δισθενούς σιδήρου, ενώ στην ενότητα 3.2.4 αποδείχτηκε, ότι σε αντίθεση με την απιγενίνη, η λουτεολίνη δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Ήταν λοιπόν λογική η υπόθεση ότι η προστατευτική δράση της λουτεολίνης οφείλεται πιθανά στην ικανότητά της να δεσμεύει ενδοκυττάριο σίδηρο.

Αν και ήταν ήδη γνωστό, πως η οικογένεια των ογκοπρωτεϊνών Bcl-2 ρυθμίζει την αποπτωτική διαδικασία (Cory et al., 2002), ο ακριβής τρόπος, με τον οποίο πραγματοποιείται η ρύθμιση αυτή στις πειραματικές συνθήκες της παρούσας εργασίας, ήταν άγνωστος. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η δράση του H_2O_2 στην ρύθμιση ορισμένων μελών της οικογένειας πρωτεϊνών-Bcl-2, καθώς και η επίδραση της λουτεολίνης στη ρύθμιση αυτή. Διαπιστώθηκε, πως επώαση των κυττάρων με 250 μM H_2O_2 για 6 ώρες οδήγησε στη μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια. Η πλειοψηφία των ερευνητών υποστηρίζει, πως η ρύθμιση της μετατόπισης της πρωτεΐνης Bax πραγματοποιείται από την MAP κινάση JNK (Putchal et al., 2003, Tsuruta et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.3.7.2 το H_2O_2 μπορεί και ενεργοποιεί την JNK και βάση αυτού, μπορούμε να εξηγήσουμε την παρατηρούμενη μετατόπιση της Bax στα μιτοχόνδρια. Είναι γνωστό, ότι η μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια είναι ιδιαίτερα σημαντική για το σχηματισμό πόρων στη μεμβράνη τους και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C (Cheng et al., 2001, Lindsten, et al., 2000, Wei et al., 2001), οπότε και αποτελεί σημαντικό βήμα στο μηχανισμό πρόκλησης της απόπτωσης από το H_2O_2 .

Η μετατόπιση αυτή αναστέλλεται μετά από προεπάση των κυττάρων με 10 και 20 μM λουτεολίνης, ενώ παρόμοιο αποτέλεσμα έχει και η προεπάση των κυττάρων με μία εξειδικευμένη σιδηροδεσμευτική ένωση, τη δεσφεριοξαμίνη. Η δεσφεριοξαμίνη και η λουτεολίνη διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στη δομή τους, ενώ ακόμη και ο τρόπος, με τον οποίο εισέρχονται στα κύτταρα, είναι διαφορετικός. Έτσι, ενώ η λουτεολίνη διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, η δεσφεριοξαμίνη εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης υγρής φάσης (Doulas et al., 2003). Το

μόνο, αλλά από ότι φαίνεται μεγάλης σημασίας, κοινό τους στοιχείο είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει, πως ο μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης ενάντια στη μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax, που προκαλείται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 , οφείλεται στη δέσμευση του ενδοκυττάρου σιδήρου.

Ένα διαφορετικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, το οποίο επηρεάστηκε από την έκθεση των κυττάρων με H_2O_2 , είναι η πρωτεΐνη Bid. Επώαση των κυττάρων με H_2O_2 για 6 ώρες οδήγησε στην εμφάνιση του σχασμένου Bid (truncated Bid, 15 kDa), ενώ προεπώαση με 10 και 20 μM λουτεολίνης προστατεύει από τη σχάση αυτή. Η πρωτεΐνη Bid αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-8, η οποία συνήθως σχάζεται μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (Wang et al., 2005, Arnoult et al., 2003). Στην περίπτωση του H_2O_2 παρόλα αυτά δεν υπάρχει ενεργοποίηση τέτοιων υποδοχέων, αντιθέτως η κασπάση-6, που αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3, μπορεί να σχάσει την εναρκτήρια προκασπάση-8, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιεί το Bid και ενισχύει περαιτέρω το μονοπάτι των μιτοχονδρίων (Cowling and Downward, 2002). Ήταν αναμενόμενο λοιπόν πως η λουτεολίνη (σε συγκεντρώσεις 10-20 μM), εφόσον προστατεύει από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, να εμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης-6 και την επακόλουθη σχάση της πρωτεΐνης Bid.

4.4.3 Λυσοσωμάτια και απόπτωση

Τα τελευταία χρόνια έχει συγκεντρωθεί ένας εντυπωσιακός όγκος πληροφοριών, που υποστηρίζουν, ότι τα λυσοσωμάτια έχουν κεντρικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία. Παρόλα αυτά οι ακριβείς μηχανισμοί, που συνδέουν τα λυσοσωμάτια με τα ήδη γνωστά αποπτωτικά μονοπάτια, παραμένουν άγνωστοι (Guicciardi et al., 2004). Σε πολλές περιπτώσεις η αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης φαίνεται να είναι πρώιμο βήμα στο αποπτωτικό μονοπάτι, που προηγείται κλασικών συμβάντων της απόπτωσης όπως είναι η αποσταθεροποίηση των μιτοχονδρίων και η επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποκάλυψαν πως αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης πραγματοποιείται από τα 5 πρώτα λεπτά της έκθεσης των κυττάρων στο H_2O_2 .

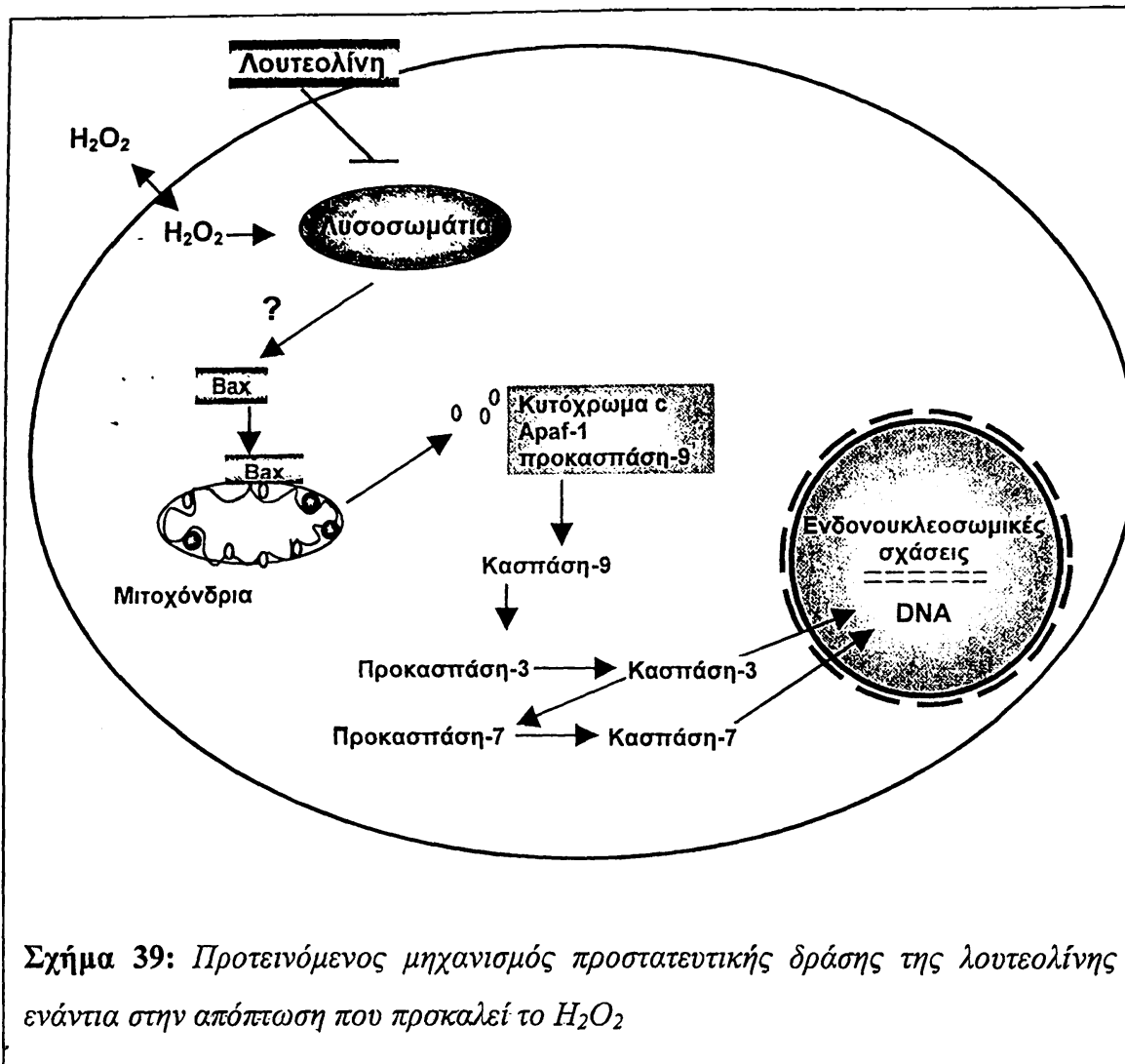


Έχει προταθεί ότι, αποτέλεσμα της αποσταθεροποίησης των λυσοσωματίων είναι η απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα πρωτεολυτικών λυσοσωμικών ενζύμων όπως οι καθεψίνες. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια αποπτωτικού θανάτου, είτε δρώντας άμεσα στα μιτοχόνδρια (Roberg et al., 1998, Roberg, 2001, Zhao et al., 2001a, Zhao et al., 2001b) είτε ενεργοποιώντας την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Bid (Stoka et al., 2001). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μία πιο πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η απόπτωση, που προκαλείται λόγω της αποσταθεροποίησης των λυσοσωματίων, είναι ανεξάρτητη της δράσης των καθεψινών (Boya et al., 2003). Πειράματα του εργαστηρίου μας καθώς και άλλων ερευνητών υποστηρίζουν πως ο παράγοντας, που διαφεύγει από τα οργανίδια αυτά και ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης, θα μπορούσε να είναι ο σίδηρος (Radisky et al., 1998, Douliás et al., 2003, Yu et al., 2003, Persson et al., 2003, Tenopoulou et al., 2005). Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου των λυσοσωματίων θα οδηγεί στο σχηματισμό $OH\cdot$, οι οποίες στη συνέχεια θα προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών, με επακόλουθο την απελευθέρωση του λυσοσωμικού σιδήρου στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, η παρουσία της λουτεολίνης στα κύτταρα πιθανά αποτρέπει την αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου και αναστέλλει ή περιορίζει σημαντικά τον καταρράκτη των γεγονότων, που οδηγούν στην απόπτωση.

4.4.4 Μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης

Συνοψίζοντας τα παραπάνω φαίνεται πως η λουτεολίνη, ένα φλαβονοειδές που δεσμεύει σίδηρο, σε αντίθεση με την απιγενίνη, που δεν αποτελεί σιδηροδεσμευτή (σχήμα 28), προστατεύει από την απόπτωση, που προκαλεί το H_2O_2 (σχήματα 29, 31-34). Η προστασία αυτή προηγείται της διάνοιξης πόρων στα μιτοχόνδρια και της επακόλουθης απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C (Σχήμα 34). Κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων φαίνεται να έχει η πρωτεΐνη Bax, της οποίας η μετατόπιση στα μιτοχόνδρια αναστέλλεται από τη λουτεολίνη (σχήμα 36), καθώς και από ένα άλλο σιδηροδεσμευτή την δεσφεριοξαμίνη, ενισχύοντας την υπόθεση, ότι ο μοριακός μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης είναι η δέσμευση του σιδήρου.

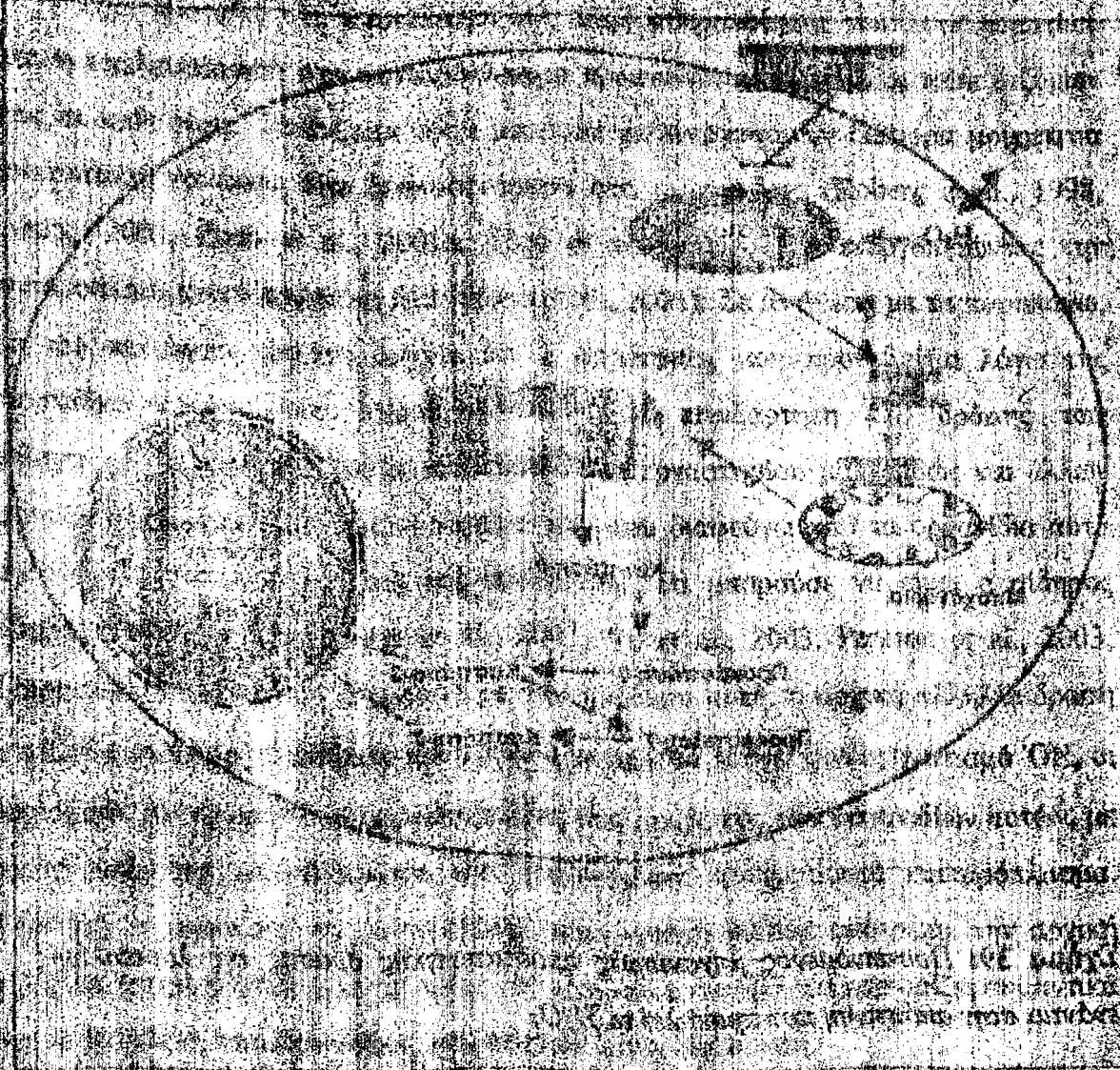




Σχήμα 39: Προτεινόμενος μηχανισμός προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης ενάντια στην απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2

Το πιο πρώιμο βήμα της ακολουθίας αντιδράσεων που προκαλούνται από το H_2O_2 και οι οποίες έχουν σαν συνέπεια την απόπτωση φαίνεται να είναι η αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης (που πραγματοποιείται στα πρώτα λεπτά της έκθεσης), η οποία ανατρέπεται τόσο από τη λουτεολίνη όσο και από την κλασική σιδηροδεσμευτική ένωση δεσφεριοξαμίνη (σχήμα 38). Επειδή στα λυσοσωμάτια συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, φαίνεται πως το σημείο κλειδί στο μηχανισμό προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης, όπως και στην περίπτωση της προστασίας του κυτταρικού DNA, είναι η δέσμευση του ενδοκυτταρίου και πολύ πιθανά του λυσοσωμικού οξειδοαναγωγικά σιδήρου (σχήμα 39). Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη, προκειμένου να προσδιοριστεί ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο συνδέεται η βλάβη στα λυσοσωμάτια με τη μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax από τα κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και την επάκόλουθη διάσπαση των μεμβράνες τους.





The text in this section is extremely faint and largely illegible due to the quality of the scan. It appears to be a series of paragraphs or a list of items, but the specific content cannot be discerned. The text is arranged in several lines, following the general layout of the page.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος της δέσμευσης σιδήρου στον μηχανισμό προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών σε κύτταρα που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες

Ο ρόλος της Μεσογειακής διαίτας στην ανθρώπινη υγεία έχει αποτελέσει αντικείμενο μεγάλου αριθμού μελετών, ενώ ένα από τα πιο υποτιμημένα συστατικά της είναι το μέλι. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη ξεκίνησε με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων μελιών Ελληνικής προέλευσης να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις, που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Η διαπίστωση, πως κάποια από τα εκχυλίσματα βουτανόλης, τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, προσέφεραν προστασία, οδήγησε στην απομόνωση και στον έλεγχο της βιολογικής δράσης κάποιων συστατικών τους. Ανάμεσα στα βιοδραστικά συστατικά του μελιού επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τα φλαβονοειδή, τα οποία αποτελούν ενώσεις, που πέρα από το μέλι περιέχονται σε όλα τα προϊόντα φυτικής προέλευσης.

Ένας αριθμός φλαβονοειδών, με μικρές δομικές διαφορές, μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από την δράση του H_2O_2 , να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, καθώς και να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο σίδηρο, ούτως ώστε να διευκρινιστεί η βασική αρχή της προστασίας. Διαπιστώθηκε, πως σε αντίθεση με την γενική αντίληψη, ότι οι ωφέλιμες βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών μπορούν να αποδοθούν στην ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, στο υπό μελέτη σύστημα, η ιδιότητα αυτή δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό προστασίας ενάντια στις βλάβες του DNA. Αντιθέτως η εξαιρετική, στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ικανότητα των φλαβονοειδών να προστατεύουν το κυτταρικό DNA και στην ενδοκυττάρια σιδηροδεσμευτική τους δράση οδήγησε στο συμπέρασμα, πως κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό της προσφερόμενης προστασίας έχει η δέσμευση των ενδοκυττάρων ιόντων σιδήρου.

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε και η δράση δύο επιλεγμένων φλαβονοειδών, της λουτεολίνης και της απιγενίνης, ενάντια στη διαδικασία της απόπτωσης που προκαλείται από το H_2O_2 . Παρατηρήθηκε πως η λουτεολίνη, η οποία έχει την



ικανότητα να δεσμεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο, σε αντίθεση με το δομικό της ανάλογο, την απιγενίνη, που δε διαθέτει την ικανότητα αυτή, μπορεί να προστατεύει από την απόπτωση που προκαλεί το H_2O_2 . Ένα προς ένα τα βήματα του μονοπατιού της απόπτωσης εξετάστηκαν και έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί το ακριβές σημείο δράσης της λουτεολίνης, προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός προστασίας ενάντια στην απόπτωση. Διαπιστώθηκε πως κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό έχει η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax, της οποίας η μετατόπιση στα μιτοχόνδρια αναστέλλεται από την λουτεολίνη, καθώς και από ένα άλλο σιδηροδεσμευτή, τη δεσφεριοξαμίνη. Το πιο πρώιμο βήμα της αποπτωτικής δράσης του H_2O_2 φαίνεται να είναι η αποσταθεροποίηση της λυσοσωμικής μεμβράνης, η οποία αναστέλλεται από τη λουτεολίνη. Επειδή στα λυσοσωμάτια συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, φαίνεται πως το σημείο κλειδί στο μηχανισμό προστατευτικής δράσης της λουτεολίνης, όπως και στην περίπτωση της προστασίας του κυτταρικού DNA, είναι η δέσμευση του ενδοκυττάριου και πολύ πιθανά του λυσοσωμικού οξειδοαναγωγικά σιδήρου. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστεί ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο συνδέεται η βλάβη στα λυσοσωμάτια με την μετατόπιση της πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και την επακόλουθη διάνοιξη πόρων στις μεμβράνες τους.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω προκύπτει, πως το σημείο κλειδί στο μηχανισμό προστατευτικής δράσης των φλαβονοειδών ενάντια στο H_2O_2 , αποτελεί η δέσμευση των οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου. Παρά το γεγονός, ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν την ικανότητα αυτή ως την κύρια αιτία της προσφερόμενης προστασίας, επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες, για τον εντοπισμό του ακριβούς μοριακού μηχανισμού της προστατευτικής δράσης.



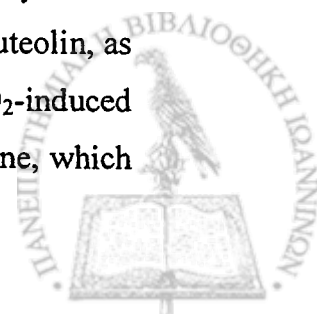
6. SUMMARY

The role of iron chelation in the mechanism of protection offered by flavonoids to cells exposed to oxidative stress

The role of Mediterranean diet in human health has been the subject of a large number of studies. One of the most underestimated constituents of this diet is honey. In the present study, the ability of Greek honey extracts to protect cellular DNA against H_2O_2 -induced damage was evaluated. The observation that some butanolic honey extracts, which were rich in phenolic substances, were able to offer protection, led to isolation and evaluation of some of their constituents. Among the bioactive constituents of honey, flavonoids were selected for further investigation.

Flavonoids, with minimal structural differences, were selected and evaluated for their abilities: a) to protect cellular DNA against H_2O_2 -induced damage, b)-to scavenge free radicals, and c) to chelate intracellular iron, in order to elucidate the molecular mechanism of the offered protection. It was revealed that despite the prevailing idea that flavonoids exert their beneficial effects through their ability to scavenge free radicals; this ability did not correlate with their protective capacity against H_2O_2 -induced DNA damage. Instead, it was shown an excellent correlation between the protection offered by flavonoids and their capacity to chelate intracellular iron existed. It was concluded, that chelation of intracellular redox iron by flavonoids plays a crucial role in the molecular mechanism of the protection against H_2O_2 -induced DNA damage.

In addition the effects of two selected flavonoids, namely luteolin and apigenin, against H_2O_2 -induced apoptosis were evaluated. It was revealed that luteolin, which is able to chelate intracellular iron, but not apigenin, that does not chelate iron, is able to protect against H_2O_2 -induced apoptosis. The pathway of the apoptotic procedure was examined step by step, in an effort to indicate the exact point of interaction. It was revealed that a crucial step in the apoptotic pathway is the translocation of Bax from cytosol to mitochondria, which is suppressed by luteolin, as well as desferioxamine, an iron-chelating agent. The earliest step in H_2O_2 -induced apoptotic pathway seems to be the destabilization of the lysosomal membrane, which



is blocked when cells are preincubated with luteolin. Lysosomes contain the high concentrations of redox-active iron, and it is plausible to speculate that luteolin exerts its protective action through iron-chelation in lysosomes. Further investigation is necessary in order to elucidate the exact mechanistic details that connect lysosomal destabilization with Bax translocation to mitochondria, and the following release of cytochrome c to the cytosol.

In conclusion it is revealed that chelation of intracellular redox-active iron is crucial for the protective action offered by flavonoids against H_2O_2 induced DNA damage and apoptosis. However, further investigations are necessary for the elucidation of the exact molecular mechanisms underlying these effects.



7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adlercreutz, H., van der Wildt, J., Kinzel, J., Attalla, H., Wähälä, K., Mäkelä, T., Hase, T., Fotsis, T. (1995) Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J. Ster. Biochem. Molec. Biol.* **52**, 97-103.

Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, A., Potapovitch, A.I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1763-1769.

Agarwal, R. (2000) Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1051-1059.

Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2000) Lack of effect of the flavonoids myricetin, quercetin and rutin on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. *Nutr. Cancer* **38**, 106-115.

Alnaqdy, A., Al-Jabri, A., Mahrooqi, Z.A., Nzeako, B., Nsanze, H. (2005) Inhibition effect of honey on the adherence of *Salmonella* to intestinal epithelial cells in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 347-351.

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

Anderson, R.F., Amarasinghe, C., Fisher, L.J., Mak, W.B., Packer, J.E. (2000) Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Rad. Res.* **33**, 91-103.

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



Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., Martinou, J.C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 11615–11623.

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

Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J., Ameisen, J.C. (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J. Cell Biol.* **159**, 923-929.

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

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

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

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, Quirion, R. (2000) The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1882-1890.

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



Bergman, A., Yanai, J., Weiss, J., Bell, D., Menachem, P.D. (1983) Acceleration of wound healing by topical application of honey. An animal model. *Am. J. Surg.* **145**, 374-376.

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

Bilsel, Y., Burga, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., Turkoglu, U. (2002) Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Digest. Surg.* **19**, 306-312.

Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* **90**, 157-177.

Bodini, M.E., Valle M.A.D., Tapia, R., Leighton, F., Berrios, P. (2001) Zinc catechin complexes in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion. *Polyhedron.* **20**, 1005-1009.

Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi, S., Borella, F. (2001) Silybin, a new iron-chelating agent. *J. Inorg. Chem.* **85**, 123-129.

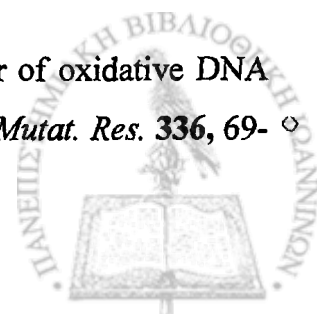
Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **134**, 707-716.

Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jäättelä, M., Kroemer, G. (2003) Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondria dependent fashion. *J. Exp. Med.* **197**, 1323-1334.

Brodie, A., Reed, D.J. (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 120-125.



- Bruyninckx, W., Mason, H.S., Morse, S.A. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature* **274**, 606-607.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 323-333.
- Chang, J., Hsu, Y., Kuo, P., Kuo, Y., Chiang, L., Lin, C. (2005) Increase of Bax/ Bcl-X_L ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life Sci.* **76**, 1883-1893.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Liu, H.Y. (2003) Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1139-1150.
- Cheng, A.C., Huang T.C., Lai, C.S., Pan, M.H. (2005) Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **509**, 1-10.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., Korsmeyer, J. (2001) BCL-2, BCL-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* **8**, 705-711.
- Choi, Y.J., Lee, M.K., Lee, Y.J., Jeong, Y.J., Park, J.H.Y., Lim, S.S., Kang, Y.H. (2004) Inhibition of hydrogen peroxide-induced endothelial apoptosis by 2',4',7-trihydroxyflavanone, a flavonoid form. *J. Med. Food* **7**, 408-416.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* **96**, 615-624.
- Collins, A.R., Ma, A., Duthie, S.J. (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* **336**, 69-77.



Cooke, M.S. (1997) Immunogenicity of DNA damaged by ROS-implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Rad. Biol. Med.* **22**,151-156.

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

Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 35-43.

Cowling, V., Downward, J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* **9**, 1046-1056.

Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-692.

Das, S., White, A.C., Fanburg, B.L. (1992) Modulation of transforming-growth factor- beta T antiproliferative effects on endothelial cells by cysteine, cystine, and N-acetylcysteine. *J. Clin. Invest.* **90**, 1649-1656.

Da Silva, J., Herrman, S.M., Heuser, V., Peres, W., Marroni, N.P., Gonzalez-Gallego, J., Erdtmann, B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 941-947.

Davies M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 761-770.

Davis, J.N., Kucuk, O., Djuric, Z., Sarkar, H. (2001) Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1293-1302.

Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (2000) Dietary flavonoid and isoflavone



- glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **468**, 166-170.
- Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**, 71-75.
- De Groot, L.C., van Staveren, W.A., Burema, J. (1996) Survival beyond age 70 in relation to diet. *Nutr. Rev.* **54**, 211-212.
- De Souza, R.F.V., de Giovani, W.F. (2004) Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Red. Rep.* **9**, 97-104.
- Dogan, A., Kolankaya, D. (2005) Protective effect of Anzer honey against ethanol-induced increased vascular permeability in the rat stomach. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57**, 173-178.
- Doulias, P.T., Christoforidis, S., Brunk, U. and Galaris D. (2003) Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: Protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell cycle arrest. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 719-728.
- Doulias, P.T., Nouis, L., Zhu, B.Z., Frei, B. and Galaris, D. (2005) Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radic. Res.* **39**, 125-135.
- Dreosti, I.E. (2000) Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutr.* **16**, 692-694.
- Duthie, S.J., Hawdon, A. (1998) DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J.* **14**, 1491-1497.



Eaton, S.B., Konner, M. (1985) Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N. Engl. J Med.*, **312**, 283–289.

El-Arab, A.M.E., Girgis, S.M., Hegazy, E.M., El-Khalek, A.B.A. (2006) Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. *Compl. Alt. Med.* **6**, 6-18.

Elsisi, N.S., Darling-Reed, S., Lee, E.Y., Oriaku, E.T., Soliman, K.F. (2005) Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. *Neurosci. Lett.* **375**, 91-96.

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

Engelmann, M.D., Hutcheson, R., Cheng, I.F. (2005) Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), and 3'-4'-dihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2953-2960.

Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., Cabantchik, Z.I. (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* **248**, 31-40.

Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., Aro, A. (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 545-553.

Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florencio, M.Z., Jennings, K.R. (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Chem.* **92**, 105-111.

Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane



by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* **416**,123-129.

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

Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Raksu, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R. and Schweigerer, L. (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* **57**, 2916-2921.

Fraga, C.G., Oteiza, P. I. (2002) Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicol.* **180**, 23-32.

Galati, G., O'Brien, P. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 287-303.

Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J. (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of flavonoids and other polyphenolics. *Toxicol.* **177**, 91-104.

Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5870-5877.

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

Gower, J.D. (1998) A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. *Free Rad. Biol. Med.* **5**, 95-100.

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



Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H.J. (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 229-234.

Guicciardi, M.E., Leist, M., Gores, G.J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**, 2881-2890.

Gutteridge, J. (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* **201**, 291-305.

Haass, C. (1999) Dead end for neurodegeneration? *Nature* **399**, 204-207.

Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R. (1999) Content of the flavonoids quercetin, myricetin and, kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2274-2279.

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

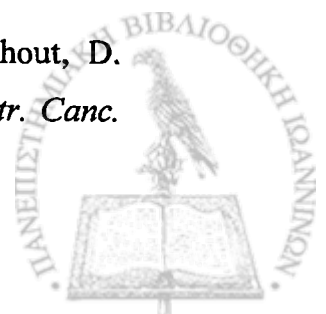
Halliwell, B., Cuttidge J.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Clarendon Press, Oxford 500pp

Hass, U. (2003) Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicol Lett.* **11**, 155-159.

Hegsted, D.M., Ausman, L.M., Johnson, J.A., Dallal, G.E. (1993) Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 875-883.

Hempel, W., Böhm, H. (1996) Quality and quantity of prevailing flavonoid glucosides of yellow and green French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2114-2116.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1994) Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutr. Canc.* **22**, 175-184.



Hertog, M.G.L., Hollman P.C.H., Katan, M.B. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379-2383.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* **20**, 21-29.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., et al. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch. Intern. Med.* **155**, 381-386.

Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., Katan, M.B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276-1282.

Horvathova, K., Chalupa, I., Sebova, L., Tothova, D., Vachalkova, A. (2005) Protective effects of quercetin and luteolin in human melanoma-HMB-2 cells. *Mut. Res.* **565**, 105-112.

Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Liu, C.F., Lin, C.C. (2004) Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small lung cancer A549 cells. *Canc. Lett.* **212**, 53-60.

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

Ichiyanagi, T., Rahman, M.M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Tsuda, T., Konishi, T. (2004) Absorption and metabolism of delphinidin 3-O- β -D-glucopyranoside in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 930-937.



Ishige, K., Shubert, D., Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 433-446.

Jacobson, M.D. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

Jacques, P.F., Tucker, K.L. (2001) Are dietary patterns useful for understanding the role of diet in chronic disease? *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 1-2.

Jagetia, G.C., Reddy, T.K., Venkatesha, V.A., Kedlaya, R. (2004) Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin. Chim. Acta.* **347**, 189-197.

Janiak, F., Leber, B., Andrews, D.W. (1994) Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 9842-9849.

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

Johnson, E.J. (2002) The role of carotenoids in human health. *Nutr. Clin. Care* **5**, 56-65.

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

Kanno, S.I., Shouji, A., Asou, K., Ishikawa, M. (2003) Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **92**, 166-170.

Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.



- Kensler, T.W., Teffe, B.G. (1986) Free radicals in tumour promotion. *Free Rad. Biol. Med.* **2**, 347-351.
- Kerr, J.F., Wyllie, X., Currie, A. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Keys, A. (1970) Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* **41**, 1-211.
- Khokhar, S., Apenten, R.K.O. (2003) Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem.* **81**, 133-140.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Obstet. Gynecol.* **87**, 897-904.
- Ko, C.H., Shen S.C., Chen, Y.C. (2004) Hydroxylation at C4' or C6 is essential for apoptosis inducing activity of flavanone through activation of the caspase-3 cascade and production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 897-910.
- Kok, F.J., Kromhout, D. (2004) Atherosclerosis. Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur. J. Nutr.* **43**, 2-5.
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Vladykovskaya, E.N., Korkina, L.G., Afanas'ev, I.B.A. (2001) Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 129-137.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Kuo, P.C., Liu, H.F., Chao, J.I. (2004) Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 55875-55885.



Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.C. and Halliwell, B. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1673-1681.

Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2005) Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **24**, 5137-5148.

Lee, E.R., Kang, Y.J., Kim, J.H., Lee, H.T., Cho, S.G. (2005) Modulation of apoptosis in HaCaT keratinocytes via differential regulation of ERK signaling pathway by flavonoids. *J. Biol. Chem.* **280**, 31498-31507.

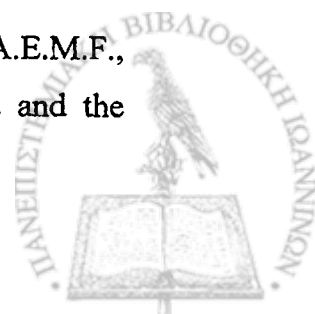
Lee, H.J., Wang, C.J., Kuo, H.C., Chou, F.P., Jean, L.F., Tseng, T.H. (2005) Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **203**, 124-131.

Lee, L.T., Huang, Y.T., Hwang, J.J., Lee, P.P.H., Ke, F.C., Nair, M.P., Kanadaswami, C., Lee, M.T. (2002) Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticanc. Res.* **22**, 1615-1628.

Lee, S.W., Song, G.S., Kwon, C.H., Kim, Y.K. (2005) Beneficial effect of flavonoid baicalein in cisplatin-induced cell death of human glioma cells. *Neuroscienc. Lett.* **382**, 71-75.

Lee, W.R., Shen, S.C., Lin, H.Y., Hou, W.C., Yang, L.L., Chen, Y.C. (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 225-236.

Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A.E.M.F., Rietjens, I.M.C.G. (2001) The influence of pH on antioxidant properties and the



mechanism of antioxidant action of hydroxyflavons. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 433-446.

Leung, H.W.C., Wu, C.H., Lin, C.H., Lee, H.Z. (2005) Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* **508**, 77-83.

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

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

Lien, E.J., Ren, S., Bui H.H., Wang R. (1999) Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Medic.* **26**, 285-294.

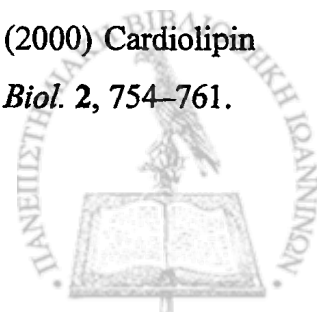
Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.K., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth et.al. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* **6**, 1389-1399.

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

Louie, S., Halliwell, B., Cross, C.E. (1997) Adult respiratory distress syndrome: a radical perspective. *Adv. Pharmacol.* **38**, 457-490.

Luo, X., Budlhardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.

Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **2**, 754-761.



Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., Halliwell, B. (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **68**, 2061-2067.

Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Hajnóczky, G. (2002) Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome *c* and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J. Biol. Chem.* **277**, 5651-5659.

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

Martinez, G.R., Loureiro, A.P., Marques, S.A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L.F., Onuki, J., Almeida, E.A., Garcia, C.C., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H., Di-Mascio, P. (2003) Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res.* **544**, 115-27.

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

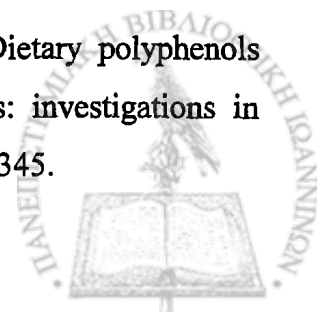
Martos, I., Ferreres, F., Tomas-Barberan F.A. (2000a) Identification of flavonoid markers for the botanical origin of eucalyptus honey. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1498-1502.

Martos, I., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., Tomas-Barberan, F.A. (2000b) Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4744-4748.

Matsui, J., Kiyokawa, N., Takenouchi, H., Taguchi, T., Suzuki, K., Shiozawa, Y., Saito, M., Tang, W., Katagiri, Y.U., Okita, H., Fujimoto, J. (2005) Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leuk. Res.* **29**, 573-581.



- McCord, J. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* **185**, 529-531.
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969a) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-55.
- McCord, J.M., Fridovich, I.(1969b) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **244**, 6056-6063.
- McCord, J.M., Turrens, J.F. (1994) Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion. *Curr. Top. Bioenerg.* **17**, 173-179.
- Meda, A., Lamien, C.E., Millogo, J., Romito, M., Nacoulma, O.G. (2004) Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmac.* **95**, 103-107.
- Meier, P., Finch A., Evan G. (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Mello Filho, A., Hoffmann, M.E., Meneghini, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* **218**, 273-275.
- Meneghini R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 783-792.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D., Katan, M.B. (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a metaanalysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1146-1155.
- Mercer, L.D., Kelly, B.L., Horne, M.K., Beart, P.M. (2005) Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 339-345.



Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 577-599.

Middleton, E.J., Kandaswami, C. (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1167-1179.

Mikhailov, V. Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A., Saikumār, P. (2001) Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 18361-18374.

Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L., Rice-Evans, C. (1996) The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett.* **392**, 40-44.

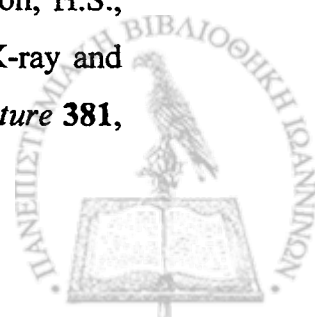
Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennigs, K.R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* **36**, 1199-1208.

Moon, J.H., Tsushida, T., Nakahara, K., Terao, J. (2001) Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1274-1285.

Moridani, M.Y., Galatti, G., O'Brien, P.J. (2002) Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 251-264.

Moridani, M.Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., O'Brien, P.J. (2003) Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 243-253.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettekheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L. et al. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.



Nakagawa, H., Wachi, M., Woo, J.T., Kato, M., Kasai, S., Takahashi, F., Lee, I.S., Nagai, K. (2002) Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (—)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **292**, 94-101.

Nest, G.L., Caille, O., Woudstra, M., Roche, S., Guerlesquim, F., Lexa, D. (2004) Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorg. Chim. Acta* **357**, 775-784.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.

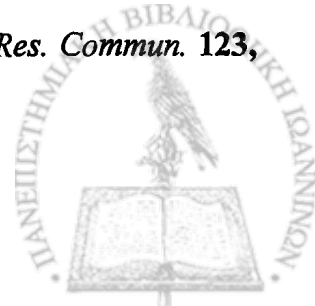
Noroozi, M., Angerson, W.J., Lean, M.E.J. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA-damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1210-1218.

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

O'Coinceanainn, M., Bonnely, S., Baderschneider, B., Hynes, M.J. (2004) Reaction of iron(III) with theaflavin: complexation and oxidative products. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 657-663.

O'Prey, J., Brown, J., Fleming, J., Harrison, P.R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 2075-2088.

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



Otake, Y., Walle, T. (2001) Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 103-105.

Paller, M., Jacob, H. (1994). Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7002-7006.

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

Pantopoulos, K., Hentze, M.W. (1998). Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10559-10563.

Papanga, G., Rice-Evans, C.A. (1997) The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.* **401**, 78-82.

Parthasarathy, S., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1992) The role of oxidized LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.* **43**, 219-225.

Peet, G.W. and Li, J. (1999) I κ B kinases α and β show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J. Biol. Chem.* **274**, 32655-32661.

Persson, H.L., Yu, Z., Tirosh, O., Eaton, J.W., Brunk, U.T. (2003) Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1295-1305.

Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.



Pong Ng, S., Wong, K.Y., Zhang, L., Zuo, Z. (2005) Evaluation of the first-pass glucuronidation of selected flavones in gut by Caco-2 monolayer model. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **8**, 1-9.

Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., Johnson, E.M. (2003) JNK-mediated Bim phosphorylation potentiates Bax-dependent apoptosis. *Neuron* **38**, 899-914

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., Strasser, A. (2001) Bmf: a pro-apoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.

Puthalakath, H., Huang, D.C.S., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A. (1999) The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* **3**, 287-296.

Radisky, D.C., Kaplan, J. (1998) Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. *Biochem. J.* **336**, 201-205.

Rao, A.V., Rao, L.G. (2004) Lycopene and human health. *Cur. Topics Nutr. Res.* **2**, 127-136.

Rathmell, J., Thomson, C.R. (2002) Pathway of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109**, 97-107.

Read, S.H., Baliga, B.C., Ekert, P.G., Vaux, D.L., Kumar, S. (2002) A novel apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J. Cell Biol.* **159**, 739-745.

Riboli, E., Hunt, K.J., Slimani, N., Ferrari, P., Norat, T., Fahey, M. (2002) European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr.* **5**, 1113-1124.



Rice-Evans, C., Miller, N.J. (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol.* **234**, 279-293.

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

Roberg, K. (2001) Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab. Invest.* **81**, 149-158.

Roberg, K., Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.* **52**, 1151-1156.

Saito, M., Korsmeyer, S.J., Schlesinger, P.H. (2000) BAX dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 553-555.

Samhan-Arias, A.K., Martin-Romero, F.J., Gutierrez-Merino, C. (2004) Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 48-61.

Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M., Keen, C.L. (2004) Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1732-1735.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E., Williams, R.J., Cadenas, E. and Rice-Evans, C. (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging.* **23**, 861-880.

Schroeter, H., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., Williams, R.J. (2001) Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* **358**, 547-557.



Sergediene, E., Jönsson, H., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I.M.C.M., Cenas, N. (1999) Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett.* **462**, 392-396.

Serra-Majem, L., de la Cruz, J. N., Ribas, L., Salleras, L. (2004) Mediterranean diet and health: is all the secret in olive oil? *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **33**, 461-465.

Sestili, P., Guidarelli, A., Dacha, M., Cantoni, O. (1998) Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by *tert*-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, 196-200.

Shen, S.C., Chen, Y.C., Hsu, F.L., Lee, W.R. (2003) Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase-3 cascade. *J. Cell. Biochem.* **89**, 1044-1055.

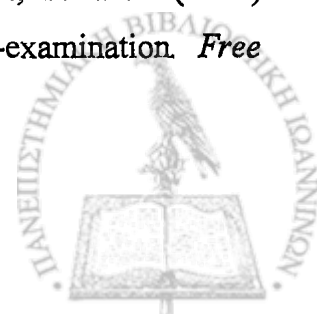
Shi, Y. (2002) Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb.)* **10**, 285-288.

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

Sies, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, M.C., Rat, P. and Suschelet, M. (1995) Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**, 73-78.

Silva, I.D., Gaspar, J., da Costa, G.G., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J. (2000) Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chem. Biol. Interact.* **124**, 29-51.

Silva, M.M., Santos, M.R., Caroco, G., Rocha R., Justino, G., Mira L. (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic. Res.* **36**, 1219-1277.



Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 438–463.

Simopoulos, A. P. (1998) Overview of evolutionary aspects of ω 3 fatty acids in the diet. *World Rev. Nutr. Diet.*, **83**, 1–11.

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

Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* **531**, 231-251.

Spencer, J.P.E., Jenner, A., Chimel, K., Aruoma, O.I., Cross, C.E., Wu, R., Halliwell, B. (1995) DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS-Lett.* **375**, 179-182.

Spencer, J.P.E., Kuhnle, G.G.C., Williams, R.J., Rice-Evans, C. (2003a) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. *Biochem J.* **372**, 173-181.

Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. and Williams, R.J. (2003b) Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underly their action on neuronal viability. *J. Biol. Chem.* **278**, 34783-34793.

Stahl, W., Sies, H. (1996) Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.* **336**, 1-9.

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

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272**, 20963-20966.



Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L, Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, et al. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* **276**, 3149-3157.

Subrahmanyam, M. (1993) Honey impregnated gauze versus polyurethane film (Opsite) in the treatment of burns- a prospective randomized study. *Br. J. Plast. Surg.* **46**, 322-323.

Subrahmanyam, M. (1996) Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burns: a prospective randomized study. *Burns* **22**, 491-493.

Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, J.S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., Finkel, T. (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J.* **318**, 379-382.

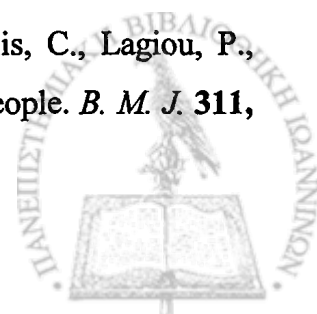
Suzuki, T., Nakano, T., Masuda, M., Ohshima, H. (2004) Epigallocatechin gallate markedly enhances formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanoside in the reaction of 2'-deoxyguanosine with hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.* **36**, 1087-1093.

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

Thannickal, V.J., Aldweib, K.D.L., Fanburg, B.L. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta 1. *J. Biol. Chem.* **273**, 23611-23615.

Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease *Science* **276**, 1456-1462.

Trichopoulou, A., Kouris-Blazos, A., Wahlqvist, M.L., Gnardellis, C., Lagiou, P., Polychronopoulos, E. (1995) Diet and overall survival in elderly people. *B. M. J.* **311**, 1457-1460.



Trichopoulou, A., Orfanos, P., Norat, T., Bueno-de-Mesquita, B., Ockl, M., Peeters, P.H. (2005) Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *B. M. J.* **330**, 991-997.

Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, C., Foufa, E., Kaloudis, T., (2000) Nutritional composition and flavonoid content of edible wild green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chem.* **70**, 319-23.

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

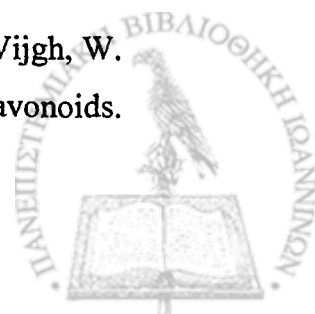
Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* **7**, 1174-1181.

Uren, A.G., Coulson, E.J., Vaux, D.L. (1998) Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 159-162.

Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Griending, K.K. (1998) P38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **273**, 15022-15029.

Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., Griending, K.K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of akt/protein kinase B by angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 22699-22704.

Van Acker, S.A.B.E., van Baten, G.P., van den Berg, D.J., Bast, A., van der Vijgh, W. J.F. (1998) Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 935-943.



Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffon, D.H., van der Bennekom, W.B., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 331-342.

Vaux, D., Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.

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

Vestergaard, M., Kerman, K., Tamiya, E. (2005) An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses. *Analyt. Chim. Act.* **538**, 273-281.

Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., Galli, C. (2005) Mediterranean food and health: building human evidence. *J. Physiol. Pharmacol.* **56**, 37-49.

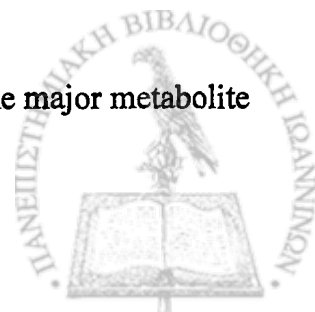
Visioli, F., Galli, C. (1994) Oleuropein protects low-density lipoprotein from oxidation. *Life Sci.* **55**, 1965-1971.

Visioli, F., Galli, C. (2003) Olives and their production waste products as sources of bioactive compounds. *Curr. Topics Nutr. Res.* **1**, 85-88.

Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Lindenmayer, G.E., Walle, T. (2000) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 830-836.

Walle, T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 829-837.

Walle, T., Walle, U.K., Halushka, P.V. (2001) Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.* **131**, 2648-2652.



Wang, H., Provan, G.J., Helliwell K. (2000) Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci. Techn.* **11**, 152-160.

Wang, Z.B, Liu, Y.Q., Cui, Y.F. (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol. Int.* **29**, 489-496.

Waterhouse, A.L., Shirley, J.R., Donovan, J.L. (1996) Antioxidants in chocolate. *Lancet* **348**, 1514-?

Way, T.D., Kao, M.C., Lin, J.K. (2005) Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett.* **579**, 145-152.

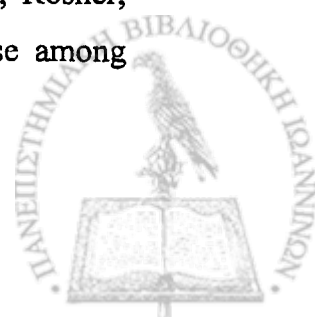
Wei, M.C, Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* **14**, 2060-2071.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Röfh, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.

Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Droge, W., Lehmann, V. (1995) HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J.* **3**, 546-554.

White, J.W. (1979) Composition of honey. In, *Honey: A Comprehensive Survey*. Edited by: Crane, E., Russak & Company, New York, 157-206.

Willett, W.C., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Rosner, B.A. (1993) Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet* **341**, 581-585.



- Williams, R.J., Spencer, J.P.E. and Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 838-849.
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650-653.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T-I., Jones D.P., Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1133.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-877.
- Yao, L., Jiang, Y., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, C. (2004) Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian eucalyptus honeys. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 210-214.
- Ye, C.L., Qian, F., Wei, D.Z., Lu, Y.H., Liu, J.W. (2005) Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'methoxy-3',5'-dimethylchalcone. *Leuk. Res.* **29**, 887-892.
- Yin, F., Giuliano, A.E., Van Herle, A.J. (1999) Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticanc. Res.* **19**, 4297-4304.
- Yoshikawa, Y., Suzuki, M., Yamada, N., Yoshikawa, K. (2004) Double-strand break of giant DNA: protection by glucosyl-hesperidin as evidenced through direct observation on individual DNA molecules. *FEBS Lett.* **566**, 39-42.
- Yu, Z., Persson, H.L., Eaton, J.W., Brunk, U.T. (2003) Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1243-1252.



Zamzami, N., Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 67–71.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-xL. *Cell* **87**, 619–628.

Zhao, M., Brunk, U.T, Eaton, J.W. (2001a). Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.*, **509**, 399-404.

Zhao, M., Eaton, J.W., Brunk, U.T. (2001b). Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett.*, **509**, 405-412.

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* **15**, 1481–1486.



Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side of the document.

