



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων –

Ειδίκευση: Φαρμακολογία»

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Διπλωματική εργασία με θέμα:

**«Μελέτη της πιθανής ηπατοπροστατευτικής και
νεφροπροστατευτικής δράσης της διυδρομυρισετίνης
έναντι της επαγόμενης από την μεθοτρεξάτη
τοξικότητας »**

Δήμας Πολυζώης

ΑΜ: 200222

Φαρμακοποιός

Αθήνα, Ιανουάριος 2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων, με κατεύθυνση Φαρμακολογία» του τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας, Κας Ανδρεάδου Ιωάννας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας μελέτης, αλλά κυρίως θα ήθελα να την ευχαριστήσω από καρδιάς για την απεριόριστη καλοσύνη αγάπη και υπομονή που μου έδειξε, όχι μόνο στα 2 αυτά χρόνια των μεταπτυχιακών σπουδών, αλλά και σε προπτυχιακό επίπεδο. Από την πρώτη στιγμή που συνεργαστήκαμε, με έκανε να αγαπήσω τον τομέα της Φαρμακολογίας και με ενέπνευσε να ασχοληθώ περεταίρω με το κομμάτι αυτό. Η κυρία Ανδρεάδου είναι ένας άνθρωπος, ο οποίος ήταν ειλικρινής απέναντι μου από την πρώτη στιγμή και μου επισήμανε τις δυνατότητες μου, αλλά και τα ελαττώματά μου και μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της και να μάθω όσα μπορούσα κοντά της. Δεν θα ξεχάσω ποτέ αυτή μας την συνεργασία.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την επιτηρήτρια μου, Χριστοδούλου Ανδριάνα, διδακτορική ερευνήτρια στο εργαστήριο της κυρίας Ανδρεάδου Ιωάννας, η οποία με την καθοδήγηση, αλλά κυρίως και με την υπομονή της με βοήθησε σημαντικά στο πέρας αυτής της εργασίας. Εξαιρετικά σημαντική ήταν και η βοήθεια και προσφορά του μεταδιδακτορικού ερευνητή του εργαστηρίου Ζερικιώτη Στυλιανού, ο οποίος με στήριξε κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών από την πρώτη μέχρι την τελευταία στιγμή. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους σε οτιδήποτε είχα χρειαστεί κυρίως των μεταδιδακτορικό ερευνητή Εφεντάκη Παναγιώτη και την διδακτορική ερευνήτρια Νικολάου Παναγιώτας, οι οποίοι με τις αστείρευτες γνώσεις τους με καθοδήγησαν κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το πολύ φιλικό και ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, οι οποίοι μου στάθηκαν στις δύσκολες στιγμές, αλλά και χάρηκαν μαζί μου και τις ευχάριστες. Τέλος, δεν θα ήμουν εδώ που είμαι χωρίς την οικογένεια μου, την μητέρα μου και την αδερφή μου, οι οποίες με ωθούσαν να κάνω αυτά που πρέπει ώστε να προχωρήσω στη ζωή μου και να πετύχω αυτά που θέλω. Ότι έχω καταφέρει το οφείλω σε αυτές τις δύο γυναίκες.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. Γενικό μέρος – Εισαγωγή	6
1.1. Μεθοτρεξάτη	6
1.1.1. Χρήση και μηχανισμός δράσης	6
1.1.2. Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες	7
1.2. Διϋδρομυρισετίνη (DHM)	10
2. Σκοπός της εργασίας	11
3. Πειραματικό μέρος	12
3.1. Πειραματικό πρωτόκολλο <i>in vivo</i>	12
3.2. Ανάλυση αίματος	13
3.2.1 Βιοχημικές αναλύσεις στο αίμα και στο πλάσμα	13
3.2.2 Προσδιορισμός ομοκυστεΐνης στο πλάσμα με την μέθοδο ELISA.....	17
3.3 Ιστολογική αξιολόγηση	18
3.4 Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών στο ήπαρ και στους νεφρούς.....	19
3.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	19
3.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	20
3.4.3 Ηλεκτροφόρηση	20
3.4.4 Ημιποσοτικός προσδιορισμός φωσφορυλίωσης και έκφρασης πρωτεϊνών	22
3.5 Προσδιορισμός Οξειδωτικού στρες στο ήπαρ και στους νεφρούς.....	22
3.5.1 Μηλονική Διαλδεΰδη (MDA)	22
3.5.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια	24
3.6 Στατιστική Ανάλυση	26
4. Αποτελέσματα	27
4.1. Επιλογή των μυών 129/Sv ως καταλληλότερο στέλεχος για τη μελέτη της επαγόμενης από τη MTX ηπατοτοξικότητας.	27
4.2 Η DHM περιορίζει τα επίπεδα δεικτών ηπατικής και νεφρικής βλάβης στο πλάσμα που παρουσιάζονται αυξημένα ύστερα από χορήγηση MTX	28
4.3 Η MTX δεν επηρεάζει τους πληθυσμούς κυττάρων του αίματος	29
4.4 Η MTX δεν μεταβάλλει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα στο παρόν πειραματικό μοντέλο.....	30
4.5 Η MTX δεν προκαλεί σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις	31
4.6 Η MTX δεν επηρεάζει τα επίπεδα της MDA στο ήπαρ και στους νεφρούς.....	31
4.7 Η MTX αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς, ενώ η DHM αναστέλλει αυτή τη μεταβολή.	32
4.8 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών αναλύσεων με Western Blot.....	33
4.8.1 Αποτελέσματα Western Blot στο ήπαρ	33

4.8.2. Αποτελέσματα Western Blot στους νεφρικούς ιστούς	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η μεθοτρεξάτη (MTX) είναι ένας αντιμεταβολίτης που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική με δύο διαφορετικές χρήσεις. Σε χαμηλή δόση χορηγείται ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (DMARD) ή άλλων αυτοάνοσων διαταραχών, ενώ σε υψηλή δόση ως αντικαρκινική θεραπεία. Ωστόσο, η χορήγηση της MTX σε χαμηλή αλλά και σε υψηλή δόση έχει συσχετισθεί με διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες σε αρκετές περιπτώσεις περιορίζουν τη χρήση της, μεταξύ των οποίων είναι η ηπατική και η νεφρική δυσλειτουργία. Επειδή η MTX έχει σημαντική συνεισφορά και αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση των προαναφερθέντων ασθενειών, κρίνεται σημαντική η μελέτη και εύρεση ουσιών, οι οποίες θα μπορέσουν να μειώσουν αυτές τις ανεπιθύμητες ενέργειες και να καθιστούν την θεραπεία με την MTX πιο ασφαλή. Αυτό το ρόλο θα μπορούσε πιθανώς να διαδραματίσει μια φλαβονόλη απομονωμένη από το φυτό *Ampelopsis grossedentata*, οικογένεια Vitaceae, η διυδρομυρισετίνη (DHM). Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την πιθανή ηπατοπροστατευτική και νεφροπροστατευτική δράση της DHM σε μύες στους οποίους χορηγήθηκε MTX, και διερευνήσαμε τον μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνονται οι προστατευτικές αυτές δράσεις.

Μέθοδοι: Πραγματοποιήθηκε χορήγηση MTX ενδοπεριτοναϊκά (IP) σε μύες τριών διαφορετικών στελεχών (C57Bl6, BALBc, 129/Sv), ώστε να βρεθεί το κατάλληλο πειραματικό μοντέλο ηπατοτοξικότητας της MTX μέσω αξιολόγησης των δεικτών ηπατικής λειτουργίας ασπαρτική και αλανινική αμινοτρανσφεράση. Στη συνέχεια, μύες 129/Sv τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες και έλαβαν είτε MTX άπαξ είτε DHM από του στόματος για 5 ημέρες είτε και τον συνδυασμό MTX και DHM. Με το πέρας των χορηγήσεων έγινε αιμοληψία για τον προσδιορισμό δεικτών ηπατικής και νεφρικής βλάβης και αιματικής τοξικότητας στο πλάσμα. Τέλος, τα ζώα ευθανατώθηκαν για την παραλαβή του ήπατος και του νεφρού, προς ιστολογική αξιολόγηση και ανάλυση των υποκείμενων μηχανισμών τοξικότητας της MTX και προστασίας της DHM.

Αποτελέσματα: Στο πλάσμα των ζώων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών, κρεατινίνης και πρωτεϊνικών καρβονυλίων, υποδηλώνοντας πιθανή βλάβη στο ήπαρ και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Η ιστολογική αξιολόγηση των οργάνων, ωστόσο, δεν έδειξε σημαντικές βλάβες. Όσον αφορά τον υποκείμενο μηχανισμό στο ήπαρ, η MTX φαίνεται ότι επάγει βλάβη μέσω μηχανισμών της απόπτωσης και της φλεγμονής. Η DHM περιορίζει τη φλεγμονή μέσω μείωσης της έκφρασης του TNF- α , του p-STAT3 και του p- NF-Kb, καθώς και της iNOS. Παράλληλα, η DHM παρεμβαίνει και στο αποπτωτικό μονοπάτι, καθώς αναστρέφει τα αυξημένα επίπεδα της αποπτωτικής πρωτεΐνης BAX και τα μειωμένα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL που παρατηρούνται μετά από χορήγηση της MTX. Στους νεφρούς, η επιβλαβής δράση της MTX βασίζεται περισσότερο στη φλεγμονή, και λιγότερο στο οξειδωτικό στρες και την απόπτωση. Στους συσχετιζόμενους με την φλεγμονή δείκτες, η DHM μειώνει τη φωσφορυλίωση του STAT3 και του NF-Kb καθώς και την έκφραση της IL-6. Τέλος, η DHM παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς επαναφέρει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που αυξάνονται υπό την επίδραση της MTX τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς.

Συμπεράσματα: Η DHM έχει προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από την MTX ηπατοτοξικότητας και της νεφροτοξικότητας που μεσολαβεί από τη μείωση της φλεγμονής και της απόπτωσης ενώ περιλαμβάνει και αντιοξειδωτικές επιδράσεις.

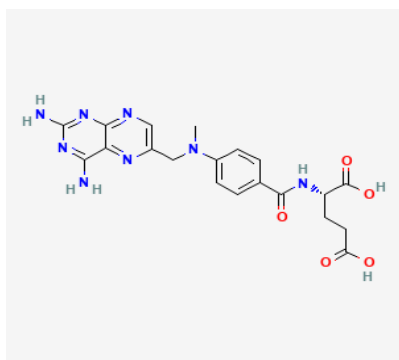
1.Γενικό μέρος – Εισαγωγή

1.1. Μεθοτρεξάτη

1.1.1. Χρήση και μηχανισμός δράσης

Η μεθοτρεξάτη (MTX) είναι ένας αντιμεταβολίτης που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική με δύο διαφορετικές χρήσεις. Σε χαμηλή δόση χορηγείται ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή άλλων αυτοάνοσων διαταραχών, ενώ σε υψηλή δόση ως αντικαρκινική θεραπεία για διάφορους τύπους καρκίνου, όπως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, τα οστεοσαρκώματα και τα λεμφώματα. Ο μηχανισμός δράσης της MTX ως χημειοθεραπευτικού παράγοντα είναι η παρεμβολή στην παραγωγή του τετραϋδροφυλλικού οξέος (THF). Πιο συγκεκριμένα, μόλις εισέλθει στο κύτταρο μέσω μεταφορέων (Reduced Folate Carriers, RFCs), η MTX λαμβάνει την πολυγλουταμική μορφή της και προσδένεται ισχυρά στο ένζυμο διϋδροφυλλική αναγωγάση, αναστέλλοντας ανταγωνιστικά τη μετατροπή του διϋδροφυλλικού οξέος σε THF. Το THF είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των πυριμιδινών και των πουρινών, επομένως η ανεπάρκειά του ανακόπτει τη σύνθεση του γενετικού υλικού και παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα, που εμφανίζουν πολύ αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα, πλήττονται περισσότερο από τη δράση της MTX και η εξέλιξη της νόσου περιορίζεται. Για την ανοσοτροποποιητική δράση της MTX η επικρατέστερη θεωρία εμπλέκει την αδενοσίνη, καθώς έχει βρεθεί ότι η MTX αναστέλλει την αμινο-ϊμιδαζολο-καρβοξαμιδο-ριβονουκλεοτιδική τρανσφορμυλάση (aminoimidazolecarboxamidoribonucleotide (AICAR) transformylase) οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα AICAR, συσσώρευση και απελευθέρωση αδενοσίνης.¹ Η AICAR επιπλέον αναστέλλει την διαμινάση της αδενοσίνης, οπότε αναστέλλει και την παραγωγή ινόςίνης από την αδενοσίνη. Η αδενοσίνη είναι ένα σηματοδοτικό μόριο και μπορεί να προσδεθεί σε 4 διαφορετικούς τύπους υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνη, τον A1 υποδοχέα αδενοσίνης (ADORA1), τον A2a υποδοχέα αδενοσίνης (ADORA2a), τον A2b υποδοχέα αδενοσίνης (ADORA2b) και τον A3 υποδοχέα αδενοσίνης (ADORA3). Στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των υποδοχέων αδενοσίνης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, άρα ασθενείς αυτής της κατηγορίας είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν σε θεραπεία που περιλαμβάνει την MTX. Η αδενοσίνη μέσω σηματοδότησης του A2A υποδοχέα έχει πολλές επιδράσεις στα διάφορα είδη κυττάρων, τα οποία εμπλέκονται στην φλεγμονή. Για παράδειγμα, στα ουδετερόφιλα αναστέλλει την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου, στα μακροφάγα προάγει την μετατροπή τους από την M1 μορφή (προφλεγμονώδη) στην M2 (αντιφλεγμονώδη) και στα T κύτταρα μειώνει την

ενεργοποίησή τους. Παράλληλα η σηματοδότηση των A2A υποδοχέων στα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγει την αγγειογένεση η οποία με την σειρά της οδηγεί σε αυξημένο οίδημα σε ασθενείς με αρθρίτιδα.^{2 3}



Εικόνα 1. Χημική δομή MTX

1.1.2. Τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες

Και για τις δύο χρήσεις της, η MTX έχει συμπεριληφθεί στη λίστα με τα βασικά φάρμακα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2021, υπογραμμίζοντας την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε βασικές ανάγκες του συστήματος υγείας. Παρά τον ενθαρρυντικά χαμηλό λόγο κόστους-οφέλους, η πιο συχνή αιτία διακοπής της θεραπείας είναι η εκδήλωση σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών.^{4 5} Οι πιο σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές, η ηπατική δυσλειτουργία, η πνευμονίτιδα, οι αιματολογικές διαταραχές, οι λοιμώξεις, η νεφροτοξικότητα, η δερματίτιδα κ.α. Κρίνεται, λοιπόν, σκόπιμο να διερευνηθούν οι μηχανισμοί πρόκλησης τοξικότητας και να ανευρεθούν παράγοντες που θα βελτιώσουν την ανεκτικότητα των ασθενών στη θεραπεία με MTX.

Η νεφροτοξικότητα είναι σχετικά συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια, αλλά εκδηλώνεται κυρίως σε θεραπεία με υψηλής δόσης MTX. Η βλάβη στα νεφρικά σωληνάκια μπορεί να είναι αποτέλεσμα καθυστερημένης απέκκρισης και άμεσης επιβλαβούς δράσης της MTX επί των σωληναριακών κυττάρων.⁶ Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν οι μεταφορείς OATPs (Organic Anion Polypeptides) στην πρόσληψη της MTX στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο.⁷ Παράλληλα, τόσο η MTX, όσο και οι κύριοι μεταβολίτες της (7-OH MTX, DAMPA) χαρακτηρίζονται από μικρή διαλυτότητα σε όξινο pH και μπορεί να συμβεί κατακρήμνιση του μορίου ή των μεταβολιτών εντός του νεφρικού σωληναρίου με τη μορφή κρυστάλλου. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται ελαττωμένος ρυθμός σπειραματικής διήθησης λόγω παρεμπόδισης,⁸ τα επιθηλιακά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τον κρύσταλλο τραυματίζονται, και η αιμάτωση περιορίζεται, επιφέροντας σοβαρό κίνδυνο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας.⁹ Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η MTX και οι κύριοι μεταβολίτες της απομακρύνονται κατά 90% μέσω των νεφρών, καθιστούν σαφές ότι η

παρουσία νεφροτοξικότητας συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα και αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης και άλλων μορφών τοξικότητας σε διαφορετικά όργανα και ιστούς.¹⁰ Επειδή δεν εκδηλώνονται κλινικά συμπτώματα κατά τα πρώιμα στάδια της νεφρικής βλάβης, είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται η κρεατινίνη ορού και τα επίπεδα MTX στο πλάσμα κατά την έναρξη της θεραπείας, προκειμένου να διαπιστωθεί εγκαίρως τυχόν καθυστερημένη απέκκριση ή νεφρική δυσλειτουργία.¹¹ Δείκτες μειωμένης νεφρικής λειτουργίας που πρέπει να ελέγχονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι ο όγκος των ούρων,¹⁰ το pH των ούρων η κρεατινίνη ορού και η ουρία αίματος.

Για να αποφευχθεί η εκδήλωση της νεφροτοξικότητας, σε θεραπεία υψηλής δόσης εφαρμόζονται υποστηρικτικά μέτρα, όπως η ενυδάτωση και η αλκαλοποίηση των ούρων. Συνιστάται, επίσης, η χορήγηση λευκοβορίνης. Πρόκειται για έναν παράγοντα που εισέρχεται στο κύτταρο από τον Reduced Folate Carrier (RFC), και παρέχει στο κύτταρο THF, ακόμη και όταν η διϋδροφυλλική αναγωγή είναι ανασταλμένη. Η λευκοβορίνη είναι πολύ αποτελεσματική στην προστασία από μυελοκαταστολή, νευροτοξικότητα και γαστρεντερικές διαταραχές, αλλά μπορεί εν μέρει να βελτιώσει και άλλες μορφές τοξικότητας, όπως η νεφροτοξικότητα.⁹ Ένας ακόμη φαρμακολογικός παράγοντας αποτελεσματικός στη μείωση των εξωκυτταρικών επιπέδων της MTX είναι η γλουκαρπιδάση, που μετατρέπει τη MTX στον ανενεργό μεταβολίτη DAMPA και γλουταμικό οξύ, μειώνοντας τελικά τα επίπεδα του δραστικού μορίου που φτάνουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Έτσι, η νεφροτοξικότητα που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δόση του φαρμάκου περιορίζεται σημαντικά.

Η ηπατοτοξικότητα, σε αντίθεση με τη νεφροτοξικότητα, δεν είναι δοσοεξαρτώμενη και μπορεί να είναι σοβαρή, έως και απειλητική για τη ζωή, ακόμη και σε χαμηλής δόσης θεραπευτικό σχήμα.¹¹ Ο μηχανισμός πρόκλησης ηπατοτοξικότητας δεν έχει διευκρινιστεί, αλλά έχουν διατυπωθεί τρεις υποθέσεις στη βιβλιογραφία. Η πρώτη βασίζεται στην ενεργοποίηση των κυττάρων Ιto, τα οποία μεταφέρονται στους μυελοϊνοβλάστες και επάγουν την έκκριση κολλαγόνου και πρωτεϊνών της μήτρας, με αποτέλεσμα την κυτταρική υπερτροφία.¹² Η δεύτερη υπόθεση αποδίδει την ιστική βλάβη στη μακροχρόνια ενδοκυτταρική συσσώρευση της MTX με την πολυγλουταμική μορφή της, και την επακόλουθη εξάντληση του φυλλικού οξέος.^{13 14} Τέλος, η παρατήρηση αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης στο πλάσμα ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με MTX¹⁵ ενδέχεται να υποδηλώνει οξειδωτικό στρες (εξάντληση NADPH και μείωση στη γλουταθειόνη) ή άμεση κυτταροτοξική δράση που οδηγούν σε λιπώδη διήθηση στο ήπαρ.¹⁶

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη,¹⁷ η MTX εισέρχεται στο ηπατοκύτταρο μέσω ενός μεταφορέα της κατηγορίας OATP (όπως αναφέρθηκε και για το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο). Πρόκειται

για μια κατηγορία σημαντικών μεμβρανικών μεταφορέων εισόδου που ρυθμίζουν την πρόσληψη υδρόφοβων οργανικών ανιόντων. Ο πιο μελετημένος τύπος είναι ο OATP1B1, που βρίσκεται αποκλειστικά στη βασική μεμβράνη των ανθρώπινων ηπατοκυττάρων και εμπλέκεται στη μεταφορά ενδογενών ουσιών, όπως τα χολικά άλατα, η οιστραδιόλη, η προσταγλανδίνη E2 και πολλών φαρμακευτικών μορίων μεταξύ των οποίων και η MTX. Η μελέτη του μεταφορέα παρουσιάζει ενδιαφέρον αφενός για τη μελέτη πιθανής αλληλεπίδρασης φαρμάκων λόγω ανταγωνισμού για τον μεταφορέα ενδοκυτταρικής πρόσληψης, και αφετέρου για τα επίπεδα του φαρμάκου που φτάνουν στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων ώστε να ελεγχθεί και η πιθανή τοξικότητα στον ιστό.

Για την έγκαιρη διάγνωση πιθανής ηπατικής βλάβης που επάγεται από τη MTX, παλαιότερα προτεινόταν η συστηματική παρακολούθηση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων (ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase), της αλβουμίνης και δευτερευόντως τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης και της χολερυθρίνης. Νεότεροι και πιο αξιόπιστοι δείκτες βασίζονται στη βιοψία ήπατος (“LFTs”, liver biopsy and procollagen III aminopeptide(PIIINP)). Για την αποφυγή της εκδήλωσης ηπατοτοξικότητας μπορεί να χορηγηθεί συμπλήρωμα φυλλικού οξέος.¹⁸

Η αιματολογική τοξικότητα είναι σπάνια, αλλά περιλαμβάνεται στις πιο σοβαρές μορφές τοξικότητας και έχει συσχετιστεί με κακοήθεια. Εκδηλώνεται με μυελοκαταστολή, πανκυτταροπενία, θρομβοκυτταροπενία, λευκοπενία και μεγαλοβλαστική αναιμία.¹⁹ Ο μηχανισμός τοξικότητας δεν είναι γνωστός, αλλά η θρομβοκυτταροπενία έχει συσχετιστεί με απόπτωση των αιμοπεταλίων μέσω του c-Jun N-Terminal kinase (JNK) μονοπατιού.²⁰ Αυξημένος κίνδυνος αιματολογικής τοξικότητας έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία. Σε όλους τους ασθενείς, πριν την έναρξη της θεραπείας, αλλά και συστηματικά κατά τη διάρκεια αγωγής με MTX συνίσταται η μέτρηση όλων των κυττάρων του αίματος.²¹

Παρά τη συστηματική παρακολούθηση των ασθενών και τη χρήση υποστηρικτικών μέτρων και φαρμακολογικών παραγόντων, όπως η λευκοβορίνη και η γλουκαρπιδάση, η εκδήλωση των παραπάνω σοβαρών μορφών τοξικότητας περιορίζουν μέχρι και σήμερα τη χρήση της MTX. Πολλοί ασθενείς, που θα ωφελούνταν από την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, καταφεύγουν σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα, επειδή διαθέτουν παράγοντες κινδύνου εκδήλωσης τοξικότητας, και, παράλληλα, ένα ποσοστό των ασθενών διακόπτουν τη θεραπεία λόγω σημαντικών βλαβών που επάγονται από το φάρμακο. Για το λόγο αυτό το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε νέα μόρια, τα οποία φαίνεται ότι μπορούν να βελτιώσουν την ανεκτικότητα των ασθενών στις ανεπιθύμητες ενέργειες της MTX.²² Σε πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η *in vitro* επίδραση 99 διαφορετικών φλαβονοειδών στη δράση του μεταφορέα OATP1B1 και φάνηκε ότι μια πληθώρα μορίων τον αναστέλλουν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αναστολή της

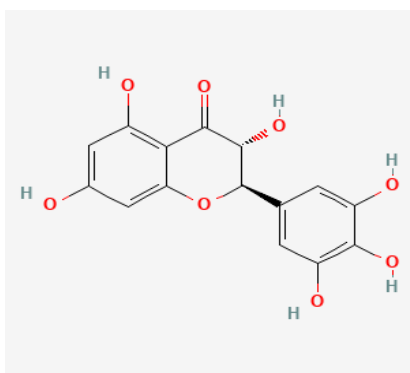
ενδοκυτταρικής πρόσληψης της MTX από τα ηπατοκύτταρα μπορεί να περιορίσει τη βλαπτική επίδραση του μορίου στο ήπαρ και να προσφέρει μια αποτελεσματική προληπτική ή θεραπευτική λύση έναντι της ηπατοτοξικότητας. Μεταξύ των δραστικών φλαβονοειδών ήταν και η διϋδρομυρισετίνη (DHM) (αναστολή OATP1B1 47%).¹⁷

1.2. Διϋδρομυρισετίνη (DHM)

Η DHM, γνωστή αλλιώς και ως αμπελοψίνη, είναι μια φλαβονόλη του φυτού *Ampelopsis grossedentata*, οικογένεια Vitaceae, η οποία περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα (20-30 % w/w) στους καρπούς και στα φύλλα του φυτού. Η ουσία αυτή έχει εμφανίσει διάφορες φαρμακολογικές δράσεις όπως αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική. Επιπλέον, έχει αρκετές ευεργετικές επιδράσεις στο ήπαρ, μεταξύ των οποίων, βελτιώνει την ηπατική λειτουργία σε οξεία ηπατική νόσο, καθώς και σε αλκοολική και μη αλκοολική ηπατική νόσο.²³⁻³¹ Στην περίπτωση της οξείας ηπατικής νόσου, έχει βρεθεί ότι η DHM έχει ευεργετική δράση, καθώς μειώνει την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων τύπου α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α) και επάγει τον ηπατοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των ηπατοκυττάρων μέσω αυξορύθμισης του JNK (c-Jun N-terminal kinase) μονοπατιού. Στην αλκοολική ηπατική νόσο φαίνεται να έχει σημαντική προστατευτική δράση μέσω αποτοξίνωσης του οργανισμού από την αιθανόλη, επάγοντας τον μεταβολισμό της από τα ηπατικά ένζυμα, ενώ στην μη αλκοολική ηπατική νόσο επιδρά με διάφορους μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, η επίδρασή της στον μηχανισμό των σιρτουίνων (sirtuins), η αντιφλεγμονώδης δράση μέσω μείωσης της έκφρασης φλεγμονωδών κυτοκινών και μέσω της μείωσης της αντίστασης στην ινσουλίνη. Τέλος, σε περιπτώσεις καρκίνου, μελέτες έχουν δείξει ότι η DHM επιδρά σε μονοπάτια απόπτωσης και επιβίωσης των κυττάρων, καθώς και σε οξειδοαναγωγικά μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του ήπατος μέσω της αναστολής των cyclin-dependant kinases (CDKs). Επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του p53-εξαρτώμενου αποπτωτικού μονοπατιού, αυξάνοντας την έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAX και της cleaved caspase-3 και μειώνοντας την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2. Σχετικά με την οξειδοαναγωγική ισορροπία, η DHM επάγει άμεσα ή έμμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα καρκινικά HepG2 κύτταρα του ήπατος μέσω μείωσης της παραγωγής γλουταθειόνης και ATP και μέσω της αναστολής του Transforming Growth Factor beta (TGF- β). Τέλος, η DHM επάγει την φυτοφαγία και αναστέλλει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.³²

Η DHM έχειδειχθεί ότι έχει χαμηλή απορρόφηση από του στόματος αλλά κατανέμεται σε διάφορα όργανα μεταξύ αυτών και στο ήπαρ. Χορήγηση 100 mg/kg δεξτροισομερούς και ρακεμικής DHM με από του στόματος χορήγηση είχε ως αποτέλεσμα μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα 81,3 και 107 ng/ml και χρόνους ημίσειας ζωής 288 και 367 λεπτά αντίστοιχα. Είναι σταθερή σε πιο όξινες συνθήκες ενώ σε ουδέτερες με ελαφρώς βασικές, υφίσταται αποικοδόμηση.³²

Σύμφωνα με τις δράσεις που ήδη υπάρχουν στη βιβλιογραφία, και την πρόσφατη μελέτη που συνδέει τη DHM με τον μεταφορέα της MTX, φαίνεται να υπάρχουν αρκετά στοιχεία και πιθανοί μηχανισμοί, ώστε να υποστηριχθεί η υπόθεση ότι η DHM μπορεί να εκδηλώσει ηπατοπροστατευτική και, ενδεχομένως, νεφροπροστατευτική δράση³³ έναντι της τοξικότητας που επάγεται από τη MTX. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταφορείς OATP1B1 υπάρχουν σε ομολογία και στους επίνυες και τους μύες (oat2), όπου εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς, επιβεβαιώνοντας ότι ένα ζωικό μοντέλο μπορεί να αναδείξει τη δράση που αναμένουμε, όσον αφορά το συγκεκριμένο μηχανισμό ηπατοπροστασίας και νεφροπροστασίας.



Εικόνα 2. Χημική δομή DHM.

2. Σκοπός της εργασίας

Στο παρόν πρωτόκολλο δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά μοντέλα για την ηπατοτοξικότητα που επάγεται από τη MTX σε διαφορετικά στελέχη μυών και αφού επιλέχθηκε το καταλληλότερο, μελετήθηκε *in vivo* η πιθανή προστατευτική δράση της DHM (σε 2 δόσεις, 100mg/kg και 200mg/kg). Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκαν οι πιθανές ιστικές βλάβες αλλά και οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί τοξικότητας και ενδεχόμενης προστασίας στο ήπαρ και στους νεφρούς.

3. Πειραματικό μέρος

3.1. Πειραματικό πρωτόκολλο *in vivo*

Για την παρασκευή της MTX σε διάλυμα κατάλληλο για ενδοπεριτοναϊκή (IP) χορήγηση πραγματοποιήθηκε διάλυση στερεής MTX σε διάλυμα NaOH 0,1 mol/L για το σχηματισμό του αντίστοιχου δινάτριου άλατος και αραιώση σε PBS 0,1 mol/L με αναλογία 1:10. Τέλος, το pH ρυθμίστηκε στο 7,4-7,6.

Για τη χορήγηση της DHM παρασκευάστηκαν 2 διαφορετικά διαλύματα από ξηρό εκχύλισμα Vine tea περιεκτικότητας 98% σε DHM μέσω διάλυσης σε φυσιολογικό ορό, με συγκεντρώσεις 11,5 mg/ml και 23,0 mg/ml για τις δόσεις των 100mg/kg και 200mg/kg αντίστοιχα.

Το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης περιλαμβάνει την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου ηπατοτοξικότητας επιλέγοντας το στέλεχος μυών στο οποίο οι επιδράσεις της MTX θα είναι εμφανείς, μετρήσιμες και θα ανταποκρίνονται στην επίδρασή τους και στον άνθρωπο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη αρσενικών μυών ηλικίας 8 εβδομάδων (n=5): C57Bl6, BALB/c και 129/Sv. Στους μύες πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την υπογνάθιο φλέβα και χορήγηση MTX IP σε δόση 20mg/kg. Η δόση επιλέχθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα^{52,61}, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες *in vivo* μελέτες σε μύες. 24 ώρες μετά τη χορήγηση επαναλήφθηκε η συλλογή αίματος για την παραλαβή του πλάσματος και τον προσδιορισμό δεικτών ηπατικής βλάβης. Ως καταλληλότερο στέλεχος αναδείχθηκε το 129/Sv.

Σύμφωνα με τα συλλεχθέντα αποτελέσματα σχεδιάστηκε το δεύτερο στάδιο της μελέτης, το οποίο στοχεύει στη διερεύνηση της πιθανής προστατευτικής δράσης της DHM στην ηπατοτοξικότητα που επάγεται από τη MTX.

Οι μύες ζυγίστηκαν και τυχαιοποιήθηκαν στις εξής 6 ομάδες (n=7):

1. Ομάδα ελέγχου: έλαβαν φυσιολογικό ορό gavage για 5 ημέρες και PBS IP την 5^η ημέρα
2. Ομάδα DHM 100mg/kg: έλαβαν DHM gavage σε δόση 100 mg/kg για 5 ημέρες και PBS IP την 5^η ημέρα
3. Ομάδα DHM 200mg/kg: έλαβαν DHM gavage σε δόση 200 mg/kg για 5 ημέρες και PBS IP την 5^η ημέρα
4. Ομάδα MTX: έλαβαν φυσιολογικό ορό gavage για 5 ημέρες και MTX IP 20mg/kg την 5^η ημέρα

5. Ομάδα MTX+DHM 100mg/kg: έλαβαν DHM gavage σε δόση 100 mg/kg για 5 ημέρες και MTX IP 20 mg/kg την 5^η ημέρα
6. Ομάδα MTX+DHM 200mg/kg, DHM gavage για 5 ημέρες και MTX IP 20 mg/kg την 5^η ημέρα



Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση του *in vivo* πειραματικού πρωτοκόλλου.

Την 6^η μέρα, 24 ώρες μετά τη χορήγηση της MTX, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την υπογνάθιο φλέβα.

Στη συνέχεια τα ζώα ευθανατώθηκαν για την παραλαβή ιστών. Ένα μέρος του ήπατος και του νεφρού σταθεροποιήθηκε σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για ιστολογική αξιολόγηση και ένα άλλο μέρος καταψύχθηκε σε υγρό άζωτο για περαιτέρω αναλύσεις.

Για την ολοκλήρωση του παρόντος πειραματικού πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 65 αρσενικοί μύες ηλικίας 10-12 εβδομάδων με μέσο βάρος 23,0 g. Οι μύες τρέφονταν με τη συνήθη εργαστηριακή διατροφή κατά βούληση, είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε αυτή και στο νερό. Έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα σύμφωνα την ισχύουσα νομοθεσία, η οποία εναρμονίστηκε με την Οδηγία 86/609 του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης και με το Προεδρικό Διάταγμα (ΠΔ) 160 περί της προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Το πειραματικό πρωτόκολλο και όλες οι διαδικασίες για ζώα εγκρίθηκαν από την Κτηνιατρική Επιτροπής Νομαρχίας Αθηνών (Αριθμός αδείας: 166556/01-03-2021) και υλοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3.2. Ανάλυση αίματος

3.2.1 Βιοχημικές αναλύσεις στο αίμα και στο πλάσμα

Κατά την αιμοληψία χρησιμοποιήθηκε ηπαρίνη ως αντιπηκτικό (σε αναλογία 1:10 του συνολικού όγκου αίματος) ώστε να παραληφθεί τελικά το πλάσμα. Αρχικά, στο ολικό αίμα, προσδιορίστηκε ο αριθμός των κυττάρων στον αυτόματο αναλυτή (Sysmex rocH-100/ V Diff), ώστε να διαπιστωθούν πιθανές μεταβολές στον αριθμό των αιμοπεταλίων, λευκών ή ερυθρών αιμοσφαιρίων στην ομάδα της MTX, και αν αυτές αντιστρέφονται με τη χορήγηση της DHM

Ακολούθως, το αίμα φυγοκεντρήθηκε στα 5000 rpm για 15 λεπτά στους 25 °C για την παραλαβή του πλάσματος, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

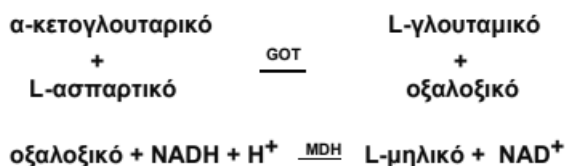
Στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με φωτομετρική μέθοδο τα επίπεδα των AST, ALT, Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH) και η Αλκαλική Φωσφατάση (ALP) ως δείκτες ηπατικής βλάβης. Επιπλέον, μελετήσαμε και την πιθανή εμπλοκή της MTX και της DHM στη νεφρική λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι δείκτες ουρία και κρεατινίνη ορού. Η ουρία και η κρεατινίνη είναι προϊόντα που παράγονται κατά την διάρκεια του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Και οι 2 αυτές ουσίες μεταφέρονται από την κυκλοφορία προς τους νεφρούς ώστε να απεκκριθούν με τα ούρα. Ωστόσο σε περιπτώσεις διαταραχής της λειτουργίας του νεφρού, οι ουσίες αυτές επαναρροφώνται και επιστρέφουν στην κυκλοφορία. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η χορήγηση MTX σε μεγάλη δόση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κρεατινίνης και της ουρίας, τιμές που υποδεικνύουν κάποια οξεία βλάβη της νεφρικής λειτουργίας³⁷. Αντίστοιχα, βιβλιογραφία σχετικά με την DHM, αναφέρει ότι χορήγηση της προκαλεί μείωση των δεικτών αυτών, υποδεικνύοντας έτσι μια προστατευτική δράση της σε περιπτώσεις νεφρικής δυσλειτουργίας⁷³. Τέλος, μετρήθηκαν τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, που έχει δειχθεί ότι αυξάνονται κατά τη θεραπεία με MTX και ενδέχεται να μεσολαβούν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες.

3.2.1.α Μέτρηση ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) αλανινικής αμινοτρανσφεράσης (ALT) στο πλάσμα

Για τον προσδιορισμό της AST στα δείγματα πλάσματος που έχουμε παραλάβει από κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκε kit και η μέτρηση έγινε φωτομετρικά.

Αρχή μεθόδου

Η δραστηριότητα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) προσδιορίζεται κινητικά. Η παρουσία του ενζύμου καταλύει την μεταφορά μιας αμινομάδας από το μόριο του L-ασπαρτικού στο μόριο του α-κετογλουταρικού οξέος. Το παραγόμενο οξαλοξικό οξύ παρουσία του ενζύμου μηλική αφυδρογονάση (MDH) ανάγεται προς L-μηλικό οξύ με ταυτόχρονη οξείδωση του συνενζύμου NADH σε NAD⁺. Η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της δραστηριότητας της AST στο δείγμα.



Εκτέλεση προσδιορισμού

Αρχικά πραγματοποιείται ανάμειξη του ρυθμιστικού διαλύματος με το διάλυμα ενζύμων με αναλογία 1:5, το οποίο επωάζεται στους 37°C. Παράλληλα, σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl δείγματος, το οποίο είναι πλάσμα αραιωμένο με φυσιολογικό ορό NaCl 0.9% σε αναλογία 1:5, ώστε να έχουμε τιμές εντός των ορίων ευαισθησίας της τεχνικής μας.

Σε κάθε κελί μεταφέρονται 200 μl από το διάλυμα εργασίας και ξεκινά άμεσα η φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 340 nm και θερμοκρασία 37 °C. Ακολουθούν διαδοχικές μετρήσεις στο ίδιο μήκος κύματος κάθε 1 λεπτό για 3 λεπτά στο φασματοφωτόμετρο (TECAN Infinite® 200 PRO). Με τις παραπάνω συνθήκες ο συντελεστής για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου στο πλάσμα έχει τιμή 1746 και υπολογίζεται από την σχέση:

$$AST_{(U/L)} = \Delta A/min \times 1746$$

Για τον προσδιορισμό της ALT ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία, με τη μόνη διαφορά ότι η αντίδραση περιλαμβάνει το α-κετογλουταρικό οξύ και την αλανίνη στα διαλύματα εργασίας και η διαδικασία καταλήγει στην αντίδραση του πυροσταφυλικού με το NADH για την

παραγωγή

L-γαλακτικού

οξέος.

$$ALT_{(U/L)} = \Delta A/min \times 1746$$

3.2.1.β Μέτρηση αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στο πλάσμα

Για τον προσδιορισμό της ALP στα δείγματα πλάσματος που έχουμε παραλάβει από κάθε ομάδα έγινε χρήση ενός kit και η μέτρηση έγινε φωτομετρικά.

Αρχή μεθόδου

Η δραστηριότητα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (ALP) προσδιορίζεται κινητικά. Η παρουσία του ενζύμου, σε αλκαλικό περιβάλλον διαιθανολαμίνης (DEA), καταλύει την υδρόλυση του υποστρώματος p- φωσφορική νιτροφαινόλη (pNPP) προς σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης π-νιτροφαινόλη. Η αύξηση της απορρόφησης στα 405 nm είναι ανάλογη της δραστηριότητας της ALP στο δείγμα.



Εκτέλεση προσδιορισμού

Πραγματοποιείται ανάμειξη του ρυθμιστικού διαλύματος με το διάλυμα ενζύμων με αναλογία 1:6. Χρησιμοποιήθηκαν 200 μl διαλύματος εργασίας και 4 μl δείγματος το οποίο είναι πλάσμα αραιωμένο με φυσιολογικό ορό NaCl 0.9% σε αναλογία 1:2, ώστε να έχουμε τιμές εντός των ορίων ευαισθησίας της τεχνικής μας. Τα δείγματα φωτομετρούνται άμεσα σε μήκος κύματος 405 nm και θερμοκρασία 37 °C και στη συνέχεια κάθε 1 λεπτό για 3 λεπτά. Με τις συνθήκες αυτές ο συντελεστής για τον υπολογισμό της ενεργότητας του ενζύμου έχει τιμή 2759 , δηλαδή:

$$ALP_{(U/L)} = \Delta A/min \times 2759$$

Με την ίδια τεχνική προσδιορίζεται και η LDH, με τη διαφορά ότι η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι:

$$\text{Πυροσταφυλικό} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-γαλακτικό} + \text{NAD}^+$$

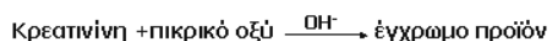
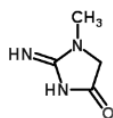
Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται από τη σχέση: $\text{LDH}_{(\text{U/L})} = \Delta A / \text{min} \times 8095$

3.2.1.γ Προσδιορισμός κρεατινίνης πλάσματος

Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στα δείγματα πλάσματος που έχουμε παραλάβει από κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκε kit και η μέτρηση έγινε φωτομετρικά.

Αρχή μεθόδου

Η κρεατινίνη αντιδρά με πικρικά ανιόντα σε αλκαλικό περιβάλλον προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης κιτρινοπορτοκαλόχρου χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 490 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στο δείγμα.



Πιο συγκεκριμένα, για το δικό μας πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 200 μl διαλύματος εργασίας για κάθε 20 μl αναραιώτου δείγματος.

Εκτέλεση προσδιορισμού

Μεταφέρουμε 200 μl από το διάλυμα εργασίας στους 37 °C σε 20 μl δείγματος, φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 490 nm και λαμβάνουμε τις ενδείξεις στα 30 δευτερόλεπτα και στα 90 δευτερόλεπτα από την στιγμή της ανάμειξης. Πέρα από τα δείγματα μας, μετράμε και στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές ένα πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης 2mg/dl. Και στις 2 περιπτώσεις υπολογίζουμε την διαφορά των απορροφήσεων για τις 2 αυτές χρονικές στιγμές (A_{Δ} δείγμα, A_S πρότυπο).

$$A_{\Delta} = A_{90} - A_{30}, A_S = A_{90} - A_{30}$$

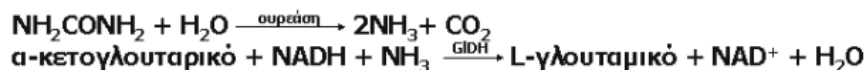
$$\text{Κρεατινίνη} = (A_{\Delta} / A_S) \times 2 \text{ (mg/dl)}$$

3.2.1.ε Μέτρηση ουρίας πλάσματος

Για τον προσδιορισμό της ουρίας στα δείγματα πλάσματος που έχουμε παραλάβει από κάθε ομάδα έγινε χρήση ενός kit και η μέτρηση έγινε φωτομετρικά.

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του ενζύμου ουρεάση η ουρία υδρολύεται προς NH_3 η οποία με την βοήθεια του ενζύμου γλουταμική αφυδρογονάση (GIDH) αντιδρά με α -κετογλουταρικό προς L-γλουταμικό οξύ με ταυτόχρονη οξείδωση του συνενζύμου NADH σε NAD^+ . Η ελάττωση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουρίας στο δείγμα.



Εκτέλεση προσδιορισμού

Για την Παρασκευή του διαλύματος εργασίας πραγματοποιείται ανάμειξη ίσης ποσότητας διαλύματος NADH με το ρυθμιστικό διάλυμα. Μεταφέρουμε σε κάθε κελί μιας πλάκας 96 θέσεων 200 μl από το διάλυμα εργασίας στους 37 °C και 2 μl δείγματος, φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 340 nm και λαμβάνουμε τις απορροφήσεις. Στη συνέχεια υπολογίζουμε την διαφορά της απορρόφησης στις μετρήσεις που λάβαμε και οι τιμές της απορρόφησης αντιστοιχούν σε επίπεδα κρεατινίνης σε mg/dl.

3.2.2 Προσδιορισμός ομοκυστεΐνης στο πλάσμα με την μέθοδο ELISA

Η ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) είναι μια ευαίσθητη τεχνική ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αναλυτών σε δείγματα τα οποία περιέχουν πολλές και πολύπλοκες πρωτεϊνικές δομές. Εντάσσεται στην κατηγορία των ανοσοχημικών προσδιορισμών και συγκεκριμένα στους ετερογενείς ανοσοχημικούς προσδιορισμούς στους οποίους δεν απαιτείται ο διαχωρισμός του ελεύθερου από το συνδεδεμένο αντιγόνο. Γίνεται χρήση αντισωμάτων για να εντοπιστούν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες που είναι ακινητοποιημένες στην επιφάνεια (υπόστρωμα) των κελιών μιας πλάκας. Υπάρχουν διάφορα είδη τεχνικών ELISA όπως είναι η άμεση, η έμμεση και η sandwich και διαχωρίζονται ανάλογα με την διαδικασία που ακολουθείται. Στην πρώτη περίπτωση έχουμε ένα πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο-αναλύτη ακινητοποιημένο σε μία πλάκα και έτσι με την εφαρμογή του δείγματος, το αντιγόνο-αναλύτης προσδένεται στο αντίσωμα. Στη συνέχεια ένα δευτερογενές αντίσωμα-μόριο αναφοράς προστίθεται και προσδένεται στον αναλύτη ολοκληρώνοντας την δομή sandwich και τέλος μετράμε το σήμα που εκπέμπεται και γίνεται ποσοτικοποίηση του αναλύτη. Στην περίπτωση της έμμεσης, το δευτερογενές αντίσωμα που προσδένεται στο αντιγόνο είναι από άλλο είδος και στη συνέχεια προσδένεται σε αυτό ένα μόριο αναφοράς το οποίο θα μας δώσει το σήμα προς ποσοτικοποίηση του αναλύτη.

Για το παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιήσαμε ELISA kit για τον προσδιορισμό της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα με την μέθοδο sandwich και την χρήση συστήματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης έχει βρει ευρεία εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό

ανοσομεθόδων. Η χρήση του δεν εξυπηρετεί την εκλεκτικότητα του ανοσοχημικού συστήματος, αλλά τη σύνδεση μεταξύ των διαφόρων τμημάτων. Με τη μεσολάβησή τους συχνά παρατηρείται βελτίωση της λειτουργικότητας του προσδιορισμού, είτε με ενίσχυση του σήματος και κατά συνέπεια της ευαισθησίας, είτε με την απλοποίηση των διαδικασιών.

Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των δειγμάτων πριν την έναρξη της μεθόδου. Στο απομονωμένο αποθηκευμένο πλάσμα έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 4 °C στα 1000g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό. Αιμολυμένα δείγματα δεν συμπεριλήφθηκαν καθώς είναι ακατάλληλα προς προσδιορισμό με την μέθοδο αυτή.

Πριν την έναρξη των διαδικασιών, κάνουμε 2 πλύσεις των κελιών σύμφωνα με τις προκαθορισμένες οδηγίες (παράρτημα). Αρχικά, προσθέτουμε 50 μl δείγματος, blank ή standard σε κάθε προεμποτισμένο κελί. Για blank χρησιμοποιούμε 50 μl sample dilution buffer και αμέσως προσθέτουμε 50 μl διαλύματος εργασίας αντισώματος επισημασμένου με βιοτίνη. Σφραγίζουμε την πλάκα και επωάζουμε στους 37°C για 45 λεπτά. Όλα τα διαλύματα προστίθενται στο κάτω μέρος των κελιών της ειδικής μικροπλάκας και αποφεύγεται η επαφή με τα τοιχώματα. Στη συνέχεια, ακολουθούν 3 κύκλοι πλύσεων σύμφωνα με τις οδηγίες και προσθήκη 100 μl του διαλύματος HRP-στρεπταβιδίνης (SABC). Σφραγίζουμε εκ νέου την πλάκα και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 37°C. Εκπλένουμε σύμφωνα με τις οδηγίες και επαναλαμβάνουμε για 5 φορές. Με το πέρας των πλύσεων συνεχίζουμε με προσθήκη 90 μl του υποστρώματος TMB σε κάθε κελί, σφραγίζουμε και επωάζουμε για 10-20 λεπτά στους 37 °C με ταυτόχρονη προστασία από το φως. Η διαδικασία αυτή διαρκεί ανάλογα με την ένταση του χρώματος των διαλυμάτων, αλλά δεν μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από 30 λεπτά. Τέλος, προσθέτουμε 50 μl του stop solution σε κάθε κελί και τα διαλύματα αποκτούν αμέσως ένα κίτρινο χρώμα. Η σειρά προσθήκης του stop solution πρέπει να είναι ίδια με αυτή του υποστρώματος TMB. Μετράμε την απορρόφηση στα 450 nm και υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων μας από την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τα standard. Το εύρος των τιμών των δειγμάτων μας πρέπει να κυμαίνονται 7813-500 pmol/ml.

3.3 Ιστολογική αξιολόγηση

Μετά την ευθανασία των ζώων, ένας λοβός του ήπατος και ο αριστερός νεφρός σε διαμήκη τομή τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασέτες και βυθίστηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης (4%) για 24 ώρες. Στη συνέχεια διατηρήθηκαν για μια εβδομάδα σε διάλυμα αιθανόλης 70% και ακολούθησε η διαδικασία της παραφινοποίησης. Έτσι, κάθε ιστός αφού αφυδατώθηκε, σταθεροποιήθηκε σε κύβο παραφίνης και κόπηκε σε τομές πάχους 5μm. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, έγινε χρώση με αιματοξυλίνη/ ηωσίνη και παρατήρηση στο μικροσκόπιο για ιστικές βλάβες. Τέλος, λήφθηκαν αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες με κάμερα προσαρτημένη στο μικροσκόπιο.

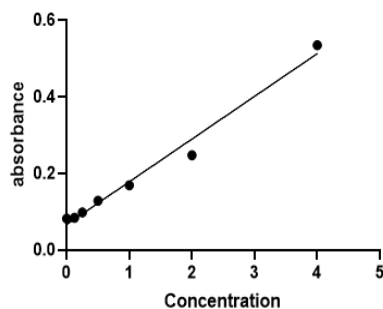
3.4 Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών στο ήπαρ και στους νεφρούς

Για τη διερεύνηση των υποκείμενων βιοχημικών μονοπατιών στο ήπαρ και στο νεφρό μελετήθηκαν οι μεταβολές που επάγονται από τη MTX και η επίδραση της DHM, σε μεσολαβητές της απόπτωσης (πχ BAX, Bcl-2), του οξειδωτικού στρες (Nrf2, ,CAT, GPx, MDA) και της φλεγμονής (πχ TNF-a, , IL-6, iNOS, STAT3 και NF-kB).

Τα τμήματα του ήπατος και του νεφρού που καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο ομογενοποιήθηκαν σε γουδί με τη βοήθεια ιγδίου εντός ξηρού πάγου και διαιρέθηκαν σε 2 eppendorf. Στην πρώτη σειρά ομογενοποιημένου ιστού προστέθηκε διάλυμα PBS (9μL PBS για κάθε mg πούδρας) και έγινε έντονη ανάδευση. Ακολούθησαν υπέρηχοι για τη λύση των μεμβρανών, επώαση υπό ανάδευση σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρωση (5000g για 5 λεπτά στους 4°C). Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε σε νέο περιέκτη και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των επιπέδων μηλονικής διαλδεύδης (MDA) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs). Στη δεύτερη σειρά δειγμάτων προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης (RIPA buffer) με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (1 δισκίο/10 mL διαλύματος) και έγινε πολύ καλή ανάδευση με vortex. Έτσι, παρελήφθησαν πυκνά εκχυλίσματα (Lysates), που περιείχαν το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε ιστού.

3.4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Και στις δύο σειρές δειγμάτων ήπατος και νεφρού υπολογίστηκε η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη χρωματομετρική μέθοδο Lowry, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα βόειας αλβουμίνης ορού (BSA-Bovine Serum Albumin) (0-4 mg/mL) για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκε αντιδραστήριο A+S με την ανάμιξη του αντιδραστηρίου A (Reagent A) το οποίο είναι ένα αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού, και του αντιδραστηρίου S (Reagent S) το οποίο είναι ένα επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις σε αναλογία 1:50. Σε κάθε κελί μιας πλάκας 96 θέσεων προστέθηκαν 5μL από κάθε διάλυμα άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης, 25 μL από το διάλυμα A+S και 200 μL αντιδραστηρίου B (Reagent B) το οποίο είναι αντιδραστήριο Folin. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 750 nm, υπολογίστηκε η συγκέντρωση προς πρωτεΐνης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε έχει $R^2=0.9831$

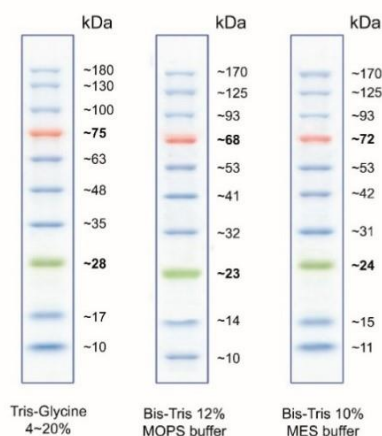


3.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα προς Western blot παρασκευάστηκαν με αραίωση των πυκνών εκχυλισμάτων με Lysis RIPA buffer και Sample buffer (SB) 6X (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue και 0.125 M Tris-HCl), σε τελικό όγκο που καθορίστηκε από την επιθυμητή ποσότητα πρωτεΐνης (protein load) και τον όγκο του δείγματος (volume load) που θα φορτωθεί σε κάθε κελί. Ακολούθησε γρήγορη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στους 100°C για 10 λεπτά, τα οποία είχαν διατηρηθεί στους -80°C.

3.4.3 Ηλεκτροφόρηση

Κατά την ηλεκτροφόρηση, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της γέλης ακρυλαμιδίου με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητά τους εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος με βάση το οποίο και διαχωρίζονται. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε δύο ειδών πηκτές: γέλη στοίβαξης (stacking gel) 5% και γέλη διαχωρισμού (running gel) 7.5% και 13% (**Πίνακας 3**, παράρτημα) στο ειδικό tank της Western blot εντός ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού (running buffer) 1X (**Πίνακας 4**, παράρτημα), μέχρι να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των μελετούμενων πρωτεϊνών. Η θέση των πρωτεϊνών στη γέλη προσδιορίστηκε με βάση την ανάπτυξη του ιχνηθέτη (marker).



Διαχωρισμός του marker Nippon Bluestar prestained protein marker (www.nippongenetics.eu)

Μόλις ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών (Transportation) από τη γέλη σε μεμβράνες φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (Polyvinylidene Difluoride, PVDF) 0.45 μm . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε εντός ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer) (**Πίνακας 5**, παράρτημα) σε πάγο και ηλεκτροφόρηση στα 100V για 90 λεπτά. Στη συνέχεια κάθε μεμβράνη εμβαπτίστηκε εντός της χρωστικής Ponceau, που βάφει μη ειδικά τις πρωτεΐνες, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταφορά του συνόλου των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών.

Προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος στις φορτισμένες, λιπόφιλες PVDF μεμβράνες ήταν απαραίτητη η επώασή τους για μία ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (blocking buffer, 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε TBS 1X 0.1% Tween) υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες κόπηκαν στα επιθυμητά μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που θέλαμε να ανιχνεύσουμε και επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα στους 4°C για τουλάχιστον 16 ώρες (overnight) υπό ανακίνηση. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι : iNOS (Mouse mAb,#610329,BD), phospho-eNOS (Mouse phosphor2393,BD), eNOS (Mouse mAb,#610297,BD), phospho-STAT3 (Mouse mAb,#9138S,Cell Signaling), STAT3 (Mouse mAb,#9139S Cell Signaling), phospho-NF κ B (Rabbit mAb,#3033,Cell Signaling), NF- κ B (Mouse mAb,#6956T,Cell Signaling), Bax (Rabbit mAb,#2772,Cell Signaling), Bcl2 (Rabbit mAb,#2764,Cell Signaling), phospho-6 (Rabbit mAb,#12912,Cell Signaling), phospho-Akt (Rabbit mAb,#9271S,Cell Signaling), Akt (Rabbit mAb,#9272,Cell Signaling), Nrf2 (Rabbit mAb #12721, Cell Signaling), Catalase (Rabbit mAb #12980, Cell Signaling), GPx1 (Rabbit mAb #3286, Cell Signaling), TNF- α (Rabbit mAb, Mouse Specific #11948, Cell Signaling), β -Tubulin (Rabbit mAb #5568, Cell Signaling) και Anti-SLCO2B1/OATP2B1 (Rabbit mAb, ab245246). Τα αντισώματα παρασκευάστηκαν σε

κατάλληλες αραιώσεις εντός διαλύματος 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος σε TBS 1X 0.1% Tween.

Στη συνέχεια, οι μεμβράνες εκπλύθηκαν με TBS 1X 0.1% Tween και επώαστηκαν 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερογενές αντίσωμα υπό ανακίνηση. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν anti-rabbit (#7074S, Cell Signaling) και anti-mouse (#7076S, Cell Signaling) σε αντιστοιχία με το πρωτογενές αντίσωμα και σε αραιώση 1:2000 εντός διαλύματος 5% αποβουτυρωμένου γάλακτος σε TBS 1X 0.1% Tween.

Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα TBS 1X 0.1% Tween και επώαστηκαν με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL, προστατευόμενες από το φως, για 5 λεπτά. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος εμφάνισης ImageQuant™ LAS 500. Προκειμένου οι μεμβράνες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για την εμφάνιση διαφορετικής πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομάκρυνσης του αντισώματος (stripping), όπως περιγράφεται στο παράρτημα.

2.4.4 Ημιποσοτικός προσδιορισμός φωσφορυλίωσης και έκφρασης πρωτεϊνών

Στις εικόνες από τη συσκευή εμφάνισης έγινε επεξεργασία στο πρόγραμμα ImageJ και η μέτρηση του σήματος επιτεύχθηκε με σχετική ανάλυση πυκνομέτρησης με τη βοήθεια του προγράμματος Gel Pro analyzer. Στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση κάθε πρωτεΐνης των δειγμάτων ως προς τη δομική πρωτεΐνη και της φωσφορυλιωμένης ως προς την ολική πρωτεΐνη. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ν μέσω του προγράμματος GraphPad Prism 8.0.1.

3.5 Προσδιορισμός Οξειδωτικού στρες στο ήπαρ και στους νεφρούς

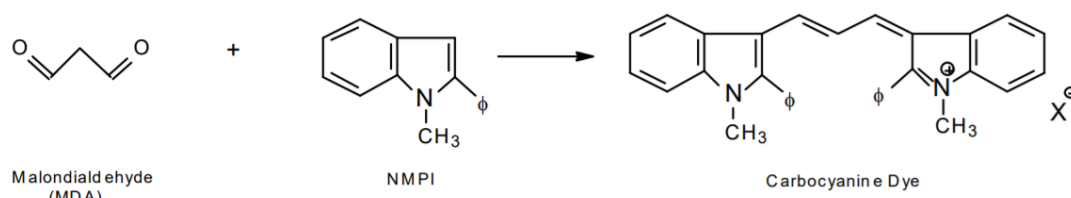
3.5.1 Μηλονική Διαλδεϋδη (MDA)

Η λιπιδική υπεροξειδωση περιγράφεται ως μια διαδικασία υπό την οποία οι ελεύθερες ρίζες ή οι δραστικές μορφές οξυγόνου προσβάλλουν λιπίδια που περιέχουν διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα, και ειδικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), και αφορούν την απόσπαση υδρογόνου από έναν άνθρακα, και την εισαγωγή οξυγόνου που οδηγεί σε σχηματισμό ριζών και υδροϋπεροξειδίων. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ως επί το πλείστον φωσφολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά μπορεί να είναι και γλυκολιπίδια ή χοληστερόλη (CL). Μετά το μεταβολισμό, η οξείδωση των PUFAs οδηγεί στη δημιουργία διαφόρων τελικών προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πιο συγκεκριμένα, το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ αραχιδονικό οξύ (ARA), οξειδώνεται προς τελικά προϊόντα όπως η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (HNE), η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) και άλλα παράγωγα όπως τα F2-ισοπροστάνια. Η αυξημένη παραγωγή ROS διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, με

αποτέλεσμα την εγκατάσταση προ-οξειδωτικής κατάστασης. Η MDA, η HNE και τα F2-ισοπροστάνια είναι κοινώς αποδεκτοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες, και ειδικότερα, λιπιδικής υπεροξείδωσης⁷⁴.

Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την ποσοτικοποίηση της MDA βασίζεται στην αντίδραση που προκύπτει, υπό όξινες συνθήκες και με την επίδραση ήπιας θερμοκρασίας, μεταξύ αυτής και του N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδολίου. Το N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο αποτελεί το βέλτιστο αντιδραστήριο λόγω της ταχείας αντίδρασης με την MDA. Η παραπάνω αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό σταθερού χρωμοφόρου προϊόντος κυανίνης, το οποίο εμφανίζει έντονη μέγιστη απορρόφηση στα 586 nm.

Πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:



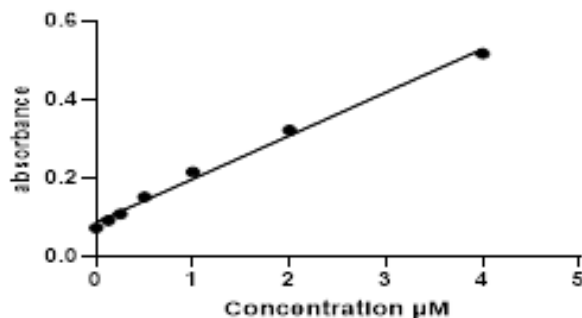
Καθώς η MDA και η 4-HNE αποτελούν τοξικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης, συνυπάρχουν και γι' αυτό είναι απαραίτητη η ανάγκη ειδικής απομόνωσης μόνο της MDA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία περιβάλλοντος αντίδρασης το οποίο να επιτρέπει μόνο την αντίδραση της MDA με το N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο. Για τον λόγο αυτό επιλέγεται η αντίδραση να πραγματοποιηθεί υπό όξινες συνθήκες. Έχει βρεθεί πως η μέγιστη ειδικότητα για MDA επιτυγχάνεται με τη χρήση HCl, καθώς, στις επαγόμενες από HCl όξινες συνθήκες, η 4-HNE υφίσταται μη αναστρέψιμη κυκλοποίηση.

Διαλύματα εργασίας:

1. Διάλυμα Beaker 0.01M. Παρασκευάζεται με διάλυση 0,106 gr 1-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδολίου σε 50 mL ACN.
2. Διάλυμα HCl 12N, 37%.

Πειραματική διαδικασία: 400 μ L δείγματος μεταφέρονται σε Eppendorf και προσθέτουμε 1300 μ L διαλύματος Beaker. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 300 μ L διαλύματος HCl 12N, 37%, επαναλαμβάνουμε το vortex και θερμαίνουμε όλα τα δείγματα για 1 ώρα στους 45°C σε υδατόλουτρο. Ακολουθώς τοποθετούμε τα Eppendorfs για 5 λεπτά στο πάγο και φυγοκεντρούμε στα 3500 rpm ,στους 4°C για 15 λεπτά. Μεταφέρουμε 150 μ L από το υπερκείμενο κάθε δείγματος σε πλάκα 96 θέσεων, και φωτομετρούμε έναντι τυφλού

(διαλύματος Beaker).Μετράμε την απορρόφηση στα 586 nm.



C(mM)	Μετρούμενη απορρόφηση
4	0,51864
2	0,32411
1	0,2178
0,5	0,1544
0,25	0,11074
0.125	0,094057

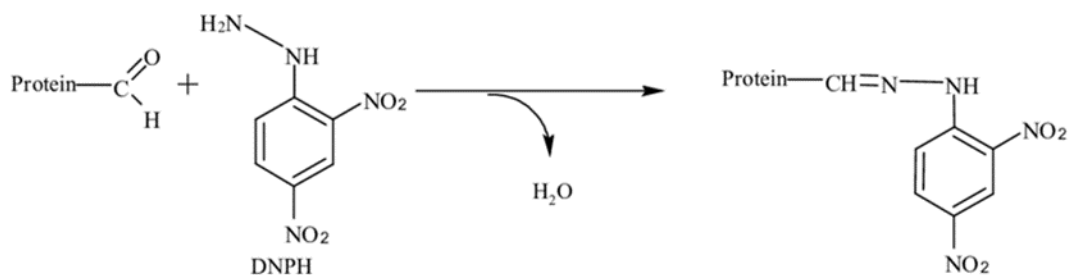
Με βάση την απορρόφηση (A) κάθε δείγματος και της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται από γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις (C) της MDA από τη σχέση: Συγκέντρωση MDA=απορρόφηση *10/0,1243. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη κάθε δείγματος.

3.5.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν ένα αξιόπιστο και σημαντικό δείκτη υπεροξειδωσης καθώς η διαδικασία της καρβονυλίωσης είναι μη αναστρέψιμη και με τον τρόπο αυτό τα προϊόντα και σταθερά και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν. Σημαντικό τους χαρακτηριστικό, επίσης, είναι ότι ως δείκτες εμφανίζονται στα αρχικά στάδια μιας ασθένειας και παραμένουν στην κυκλοφορία για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με άλλους βιοδείκτες όπως είναι η MDA. Πέρα από αυτά τα χρήσιμα χαρακτηριστικά, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια έχουν και κάποια επιπλέον επιθυμητά χαρακτηριστικά, τα οποία τα καθιστούν αξιόπιστο και ιδανικό δείκτη για την μέτρηση του οξειδωτικού στρες: υποδεικνύουν με ακρίβεια το επίπεδο της οξειδωτικής βλάβης, είναι πρώιμοι δείκτες της παθολογικής διαδικασίας, δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη φαρμακολογική απόκριση σε μια θεραπευτική παρέμβαση και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών παραγόντων⁷⁵.

Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων περιλαμβάνει την αντίδραση με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH), γνωστή και ως Brady's reagent, η οποία αντιδρά ειδικά με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια προς σχηματισμό της συζευγμένης με πρωτεΐνη 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνης (DNP). Τα συζευγμένα με πρωτεΐνη παράγωγα DNP, εμφανίζουν χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 365-375nm.

Πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:



Διαλύματα εργασίας

1. Υδατικό διάλυμα HCL 2N.
2. Διάλυμα DNPH 0,01 M, σε διαλύτη HCL 2N. Αναδεύεται ισχυρά με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων ή vortex.
3. Υδατικό διάλυμα TCA 20%
4. Διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα/αιθανόλης (v/v):50/50.
5. Διάλυμα γουανιδίνης 6M σε διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (K_3PO_4)-HCL με pH 2,3.

Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετούμε σε 2 σειρές Eppendorfs, όπου στη μία βάζουμε 70 μ L δείγματος με 350 μ L διαλύματος DNPH 0,01 M σε κάθε Eppendorf και στην άλλη 70 μ L του ίδιου δείγματος με 350 μ L διαλύματος HCL 2N σε κάθε Eppendorf.
2. Επωάζουμε στο σκοτάδι για 1 ώρα και ανά 15 λεπτά πραγματοποιούμε σε όλα τα Eppendorf ανάδευση σε vortex για 3 με 4 δευτερόλεπτα.
3. Μετά την επώση προστίθενται 420 μ L υδατικού διαλύματος TCA 20% και ξαναγίνεται ανάδευση σε vortex.
4. Τοποθέτηση όλων των δειγμάτων σε πάγο για 5 λεπτά
5. Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, στους 4°C για 10 λεπτά.
6. Με το πέρας αυτών των διαδικασιών απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό και παραλαμβάνουμε το ίζημα
7. Προσθήκη σε κάθε Eppendorf με το ίζημα 1 mL διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα /αιθανόλης: 50/50.
8. Ξύνουμε το ίζημα σε κάθε Eppendorf με πιπέτα έως ότου αναμιχθεί εντελώς και πραγματοποιούμε μια ακόμη ανάδευση με vortex σε όλα τα δείγματα πριν τα τοποθετήσουμε στην φυγόκεντρο.

9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 5-8 τρεις φορές, δηλαδή μέχρι να διενεργηθούν συνολικά 4 φυγοκεντρήσεις και 3 ξυσίματα.
10. Ύστερα από την τελευταία φυγοκέντρωση κι αφού απορριφθεί πάλι το υπερκείμενο, όλα τα δείγματα αφήνονται στον πάγκο μέχρι να ξηρανθεί εντελώς το ίζημά τους. Για την επιτάχυνση της ξήρανσης χρησιμοποιείται ρεύμα αέρα.
11. Προσθέτουμε 420 mL διαλύματος γουανιδίνης 6M σε κάθε Eppendorf και στη συνέχεια αναδεύουμε σε vortex.
12. Θερμαίνουμε τα δείγματα για μισή ώρα στους 45 °C σε heat block ή υδατόλουτρο.
13. Αποθήκευση των δειγμάτων στο ψυγείο και μέτρηση της απορρόφησης την επόμενη μέρα.
14. Για τον προσδιορισμό της απορρόφησης μεταφέρουμε με τη βοήθεια πιπέτας 150 μ L από κάθε δείγμα σε ειδική πλάκα, καθώς επίσης και 150 μ L διαλύματος γουανιδίνης 6M, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
15. Μετράμε την απορρόφηση στα 360 nm στοTECAN Infinite[®] 200 PRO.

Από την μετρούμενη απορρόφηση κάθε δείγματος με DNPH αφαιρείται η μετρούμενη απορρόφηση του τυφλού δείγματος γουανιδίνης 6M και από την μετρούμενη απορρόφηση του ίδιου δείγματος με HCl αφαιρείται επίσης η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος γουανιδίνης 6M. Στην συνέχεια, από τη διορθωμένη απορρόφηση κάθε δείγματος DNPH αφαιρείται η διορθωμένη απορρόφηση του ίδιου δείγματος HCl. Έτσι, προκύπτει η πραγματική απορρόφηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κάθε αγνώστου δείγματος (A). Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mL)} = A \times 1000 / 150 / 0,022$$

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης (ϵ) του DNPH στα 360 nm είναι 22 mM $\cdot$ cm⁻¹.

3.6 Στατιστική Ανάλυση

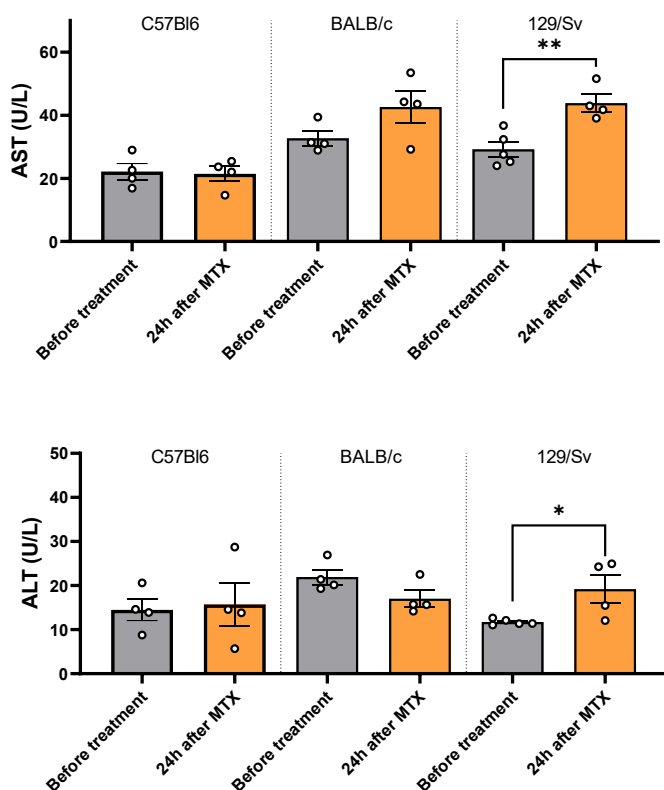
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8.0.1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται γραφικά ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (Mean $\pm$ SEM). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση one-way ANOVA για τη σύγκριση μεταξύ περισσότερων από 2 ομάδων και με unpaired t-test για τη σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων.

Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4. Αποτελέσματα

4.1. Επιλογή των μυών 129/Sv ως καταλληλότερο στέλεχος για τη μελέτη της επαγόμενης από τη MTX ηπατοτοξικότητας.

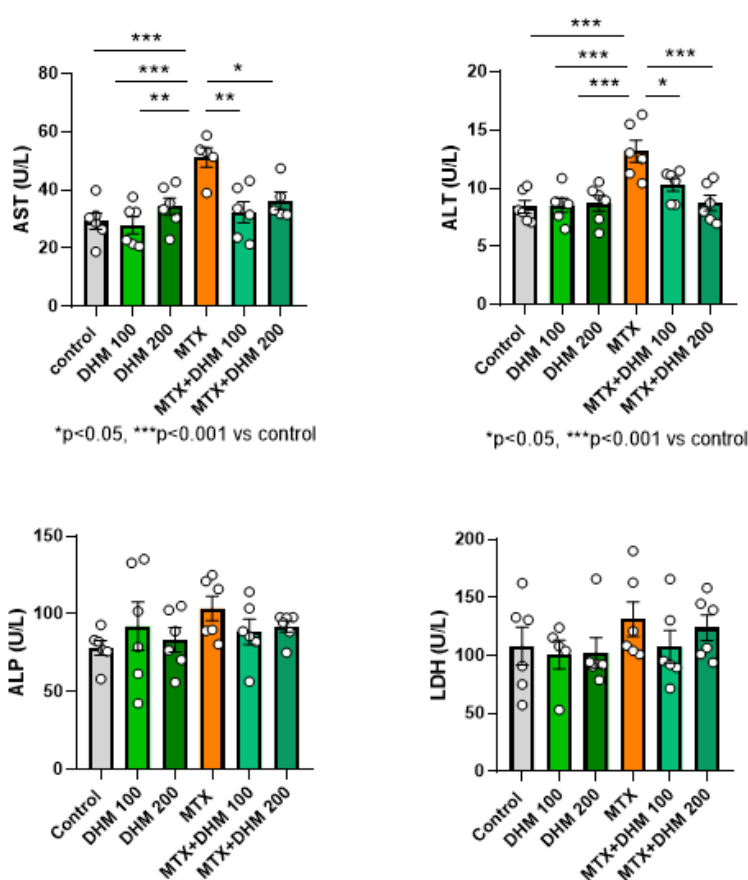
Η επιλογή του καταλληλότερου πειραματικού μοντέλου για την επαγόμενη από MTX ηπατοτοξικότητα βασίστηκε στην αξιολόγηση των δεικτών ηπατικής βλάβης AST και ALT. Στα στελέχη C57Bl6 και BALBc δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των τρανσαμινασών, ενώ στους μύες 129/Sv τόσο η AST όσο και η ALT αυξήθηκαν σημαντικά 24 ώρες μετά τη λήψη MTX. Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση unpaired t-test για να διαπιστωθούν οι πιθανές διαφορές μεταξύ των επιπέδων των δεικτών πριν και 24 ώρες μετά τη MTX. Το στέλεχος 129/Sv αναδείχθηκε ως το καταλληλότερο για τη μελέτη της πιθανής ηπατοπροστατευτικής δράσης της DHM.



Εικόνα 4. Επίπεδα τρανσαμινασών (AST και ALT) στο πλάσμα σε 3 στελέχη μυών πριν και 24 ώρες μετά τη χορήγηση της MTX. Στους μύες C57Bl6 και BALBc η χορήγηση της MTX δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μεταβολή των τρανσαμινασών. Αντιθέτως, στους μύες 129/Sv τόσο η AST όσο και η ALT παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένες. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με unpaired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2 Η DHM περιορίζει τα επίπεδα δεικτών ηπατικής και νεφρικής βλάβης στο πλάσμα που παρουσιάζονται αυξημένα ύστερα από χορήγηση MTX

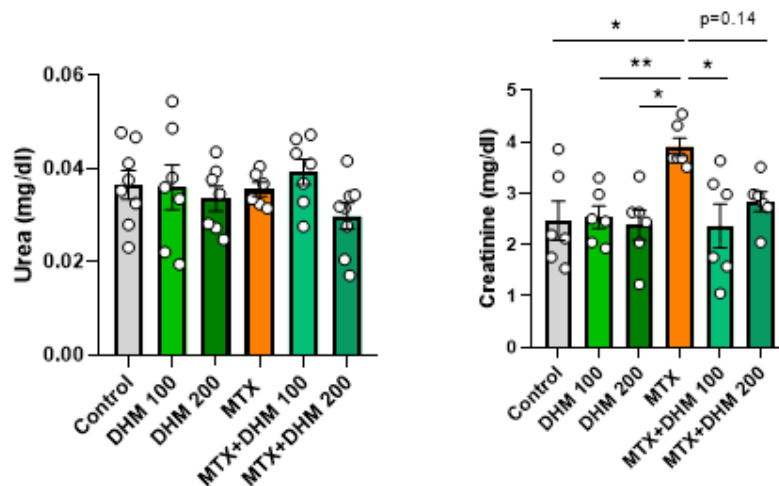
Από τον προσδιορισμό των δεικτών ηπατικής και νεφρικής βλάβης στο πλάσμα φαίνεται ότι η MTX προκαλεί μία στατιστικά σημαντική αύξηση στην AST και στην ALT, ενώ στην ALP και στην LDH η αύξηση δεν φτάνει σε στατιστική σημαντικότητα. Συγχρόνως, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της AST και της ALT στις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε και MTX και DHM σε σχέση με την ομάδα της MTX και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα στην περίπτωση της ALT, καθώς η μείωση είναι μεγαλύτερη στην ομάδα υψηλής δόσης DHM. Αυτό υποδηλώνει μια πιθανή προστατευτική δράση της DHM κατά της ηπατοτοξικότητας, που επάγεται από τη MTX.



Εικόνα 5. Επίπεδα δεικτών βλάβης AST, ALT, ALP, LDH στο πλάσμα. Η MTX προκαλεί μία στατιστικά σημαντική αύξηση στην AST και στην ALT, ενώ δεν επηρεάζει την ALP και την LDH. Η DHM μειώνει τα αυξημένα από τη MTX επίπεδα της AST και της ALT. (n=5-6, one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μέτρηση δύο δεικτών νεφρικής βλάβης: της κρεατινίνης και της ουρίας. Στην περίπτωση της κρεατινίνης παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι ομάδες χαμηλής και υψηλής δόσης DHM κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με αυτές της ομάδας ελέγχου και είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένες σε σχέση με αυτές στην ομάδα της MTX. Σημαντικό είναι ότι στις ομάδες

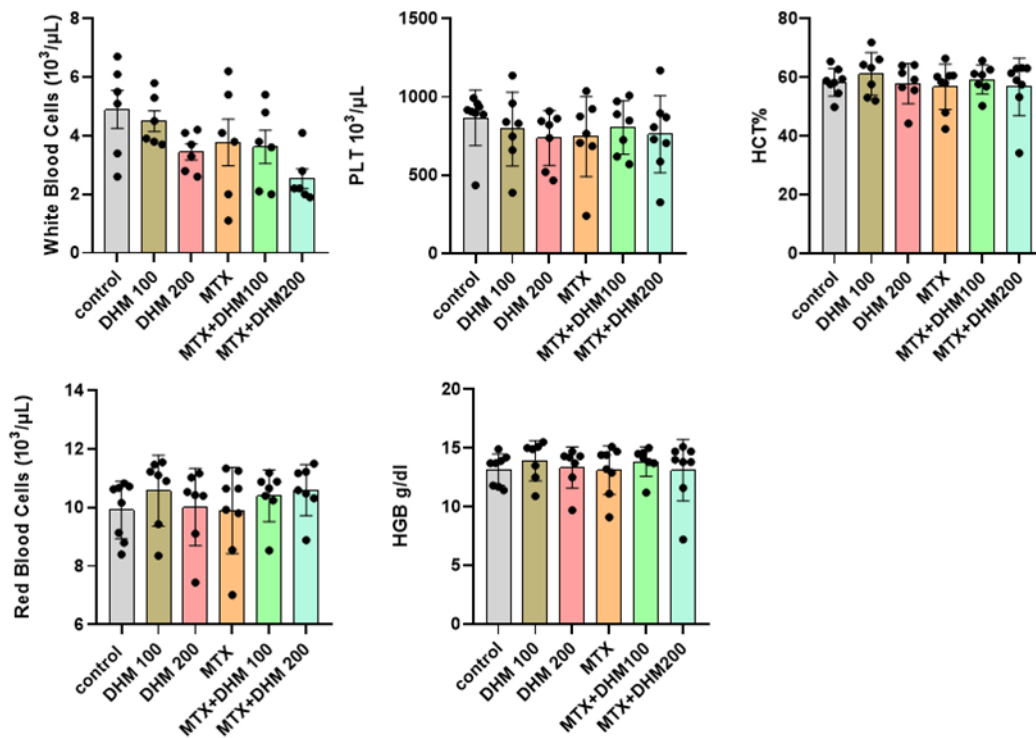
τις οποίες χορηγήθηκε και MTX και DHM οι τιμές της κρεατινίνης μειώνονται σε σχέση με αυτές της MTX. Αυτή η μείωση στις ομάδες των συγχορηγήσεων στις τιμές της κρεατινίνης, δείχνει μία πιθανή προστατευτική δράση έναντι της πιθανής νεφρικής βλάβης. Τέλος, στην περίπτωση της ουρίας, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 6. Επίπεδα δεικτών νεφρικής βλάβης. Η MTX αυξάνει τα επίπεδα κρεατινίνης στο πλάσμα, τα οποία μπορεί να μειώσει η DHM. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της ουρίας (one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3 Η MTX δεν επηρεάζει τους πληθυσμούς κυττάρων του αίματος

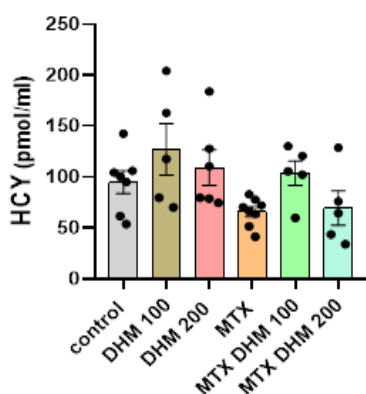
Κατά τη μέτρηση των κυττάρων του αίματος στον αυτόματο αναλυτή δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές των: λευκοκυττάρων, ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη. Αυτό υποδεικνύει ότι η οξεία χορήγηση της MTX δεν προκαλεί άμεσα κάποια αιματολογική διαταραχή και η DHM δεν επηρεάζει αντίστοιχα τους δείκτες αυτούς.



Εικόνα 7. Αριθμός κυττάρων των διαφορετικών πληθυσμών του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια) αιμογλοβίνη (HGB) και αιματοκρίτης (HCT). Η MTX και η DHM δεν επηρεάζουν αυτές τις παραμέτρους..

4.4 Η MTX δεν μεταβάλλει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα στο παρόν πειραματικό μοντέλο

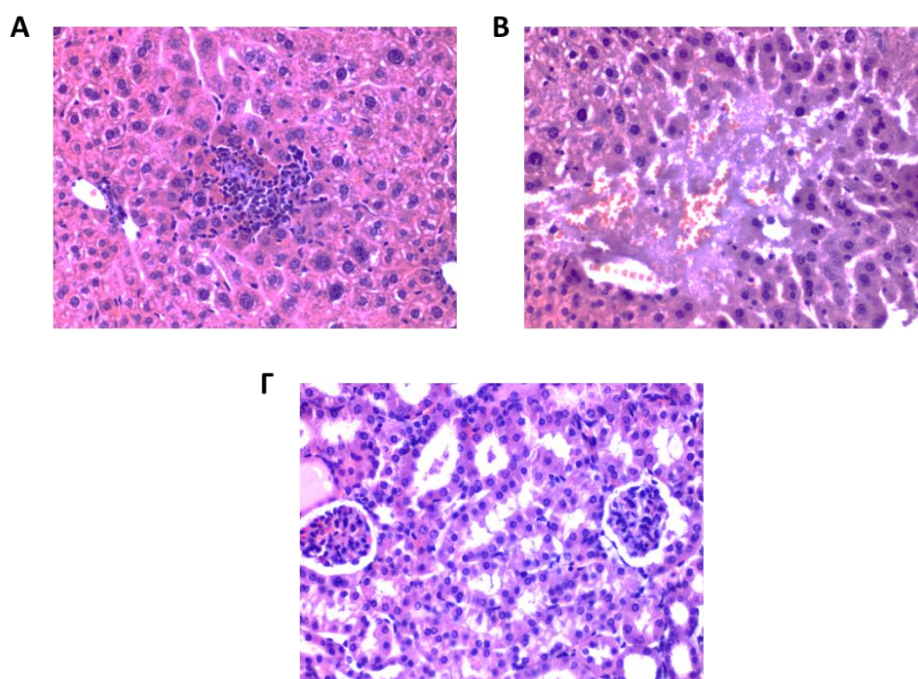
Όπως αναφέρθηκε και στον πειραματικό σχεδιασμό, η μέτρηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης έγινε με την τεχνική ELISA και υπολογίσαμε την συγκέντρωση της (pmol/ml) μετά από ποσοτικοποίηση της απορρόφησης κάθε δείγματος στα 450 nm. Στην ομάδα της MTX δε φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα ομοκυστεΐνης έπειτα από μία δόση MTX 20 mg/kg σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Με την χορήγηση της DHM επίσης δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή.



Εικόνα 8. Συγκέντρωση ομοκυστεΐνης (HCY) στο πλάσμα. Καμία μεταβολή δεν επάγεται ούτε από τη χορήγηση της MTX ούτε από τη χορήγηση της DHM, (one-way ANOVA)

4.5 Η MTX δεν προκαλεί σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις

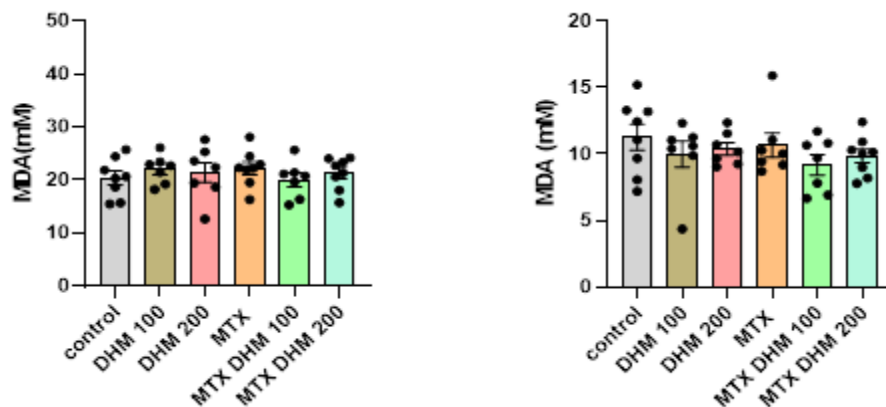
Τομές ηπατικού και νεφρικού ιστού παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Στο ήπαρ κάποιων ζώων που έλαβαν MTX παρατηρήθηκαν περιορισμένες ιστικές αλλοιώσεις, όπως η διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων και λίγες εστιακές νεκρώσεις. Τα ευρήματα αυτά όμως αφορούσαν μικρό αριθμό δειγμάτων και δεν φαίνεται να χαρακτηρίζουν την ομάδα της MTX. Με τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί λοιπόν δεν μπορούμε να αποδώσουμε τις παρατηρούμενες ιστικές βλάβες στη χορήγηση της MTX. Όσον αφορά τους νεφρούς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στην ομάδα που έλαβε MTX σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες, όπου χορηγήθηκε είτε μόνο DHM είτε DHM και MTX δεν υπήρχαν παθολογικά ευρήματα.



Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μικροσκοπίου (x400) από ιστούς ήπατος (A, B) και νεφρού (Γ) με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Στο ήπαρ παρατηρήθηκαν σε κάποια από τα ζώα που έλαβαν MTX: διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων (A) και μικρές εστιακές νεκρώσεις (B). Στους νεφρούς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ο ιστός παρουσίασε φυσιολογική μορφολογία σε όλες τις ομάδες (Γ).

4.6 Η MTX δεν επηρεάζει τα επίπεδα της MDA στο ήπαρ και στους νεφρούς

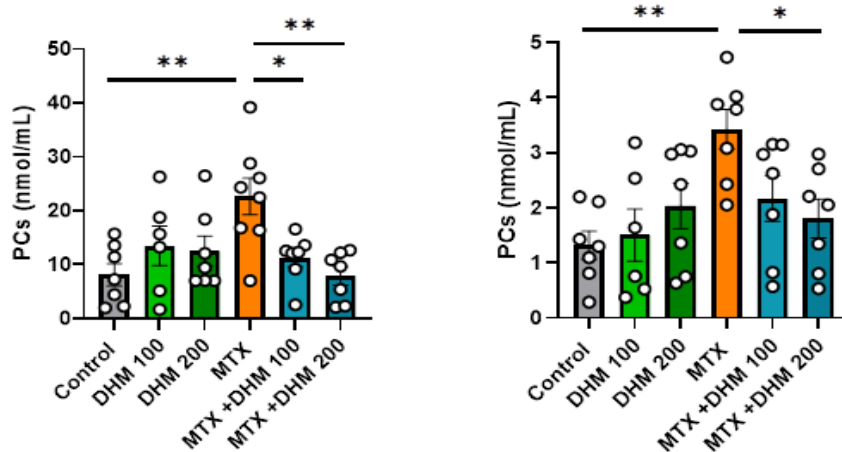
Η MDA ως δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης, φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται ούτε από τη χορήγηση της MTX ούτε και από τη χορήγηση της DHM καθώς κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα σε όλες τις ομάδες τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς.



Εικόνα 10. Συγκέντρωση MDA στο ήπαρ (αριστερά) και στους νεφρούς (δεξιά). Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (one-way ANOVA)

4.7 Η MTX αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς, ενώ η DHM αναστέλλει αυτή τη μεταβολή.

Από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων, τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς, φαίνεται ότι η χορήγηση της MTX προκαλεί μια σημαντική αύξηση, ενδεικτική της επαγωγής οξειδωτικού στρες. Στα ζώα που έλαβαν DHM πριν τη λήψη της MTX παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση του συγκεκριμένου δείκτη γεγονός που αποκαλύπτει μια πιθανή αντιοξειδωτική δράση της DHM.

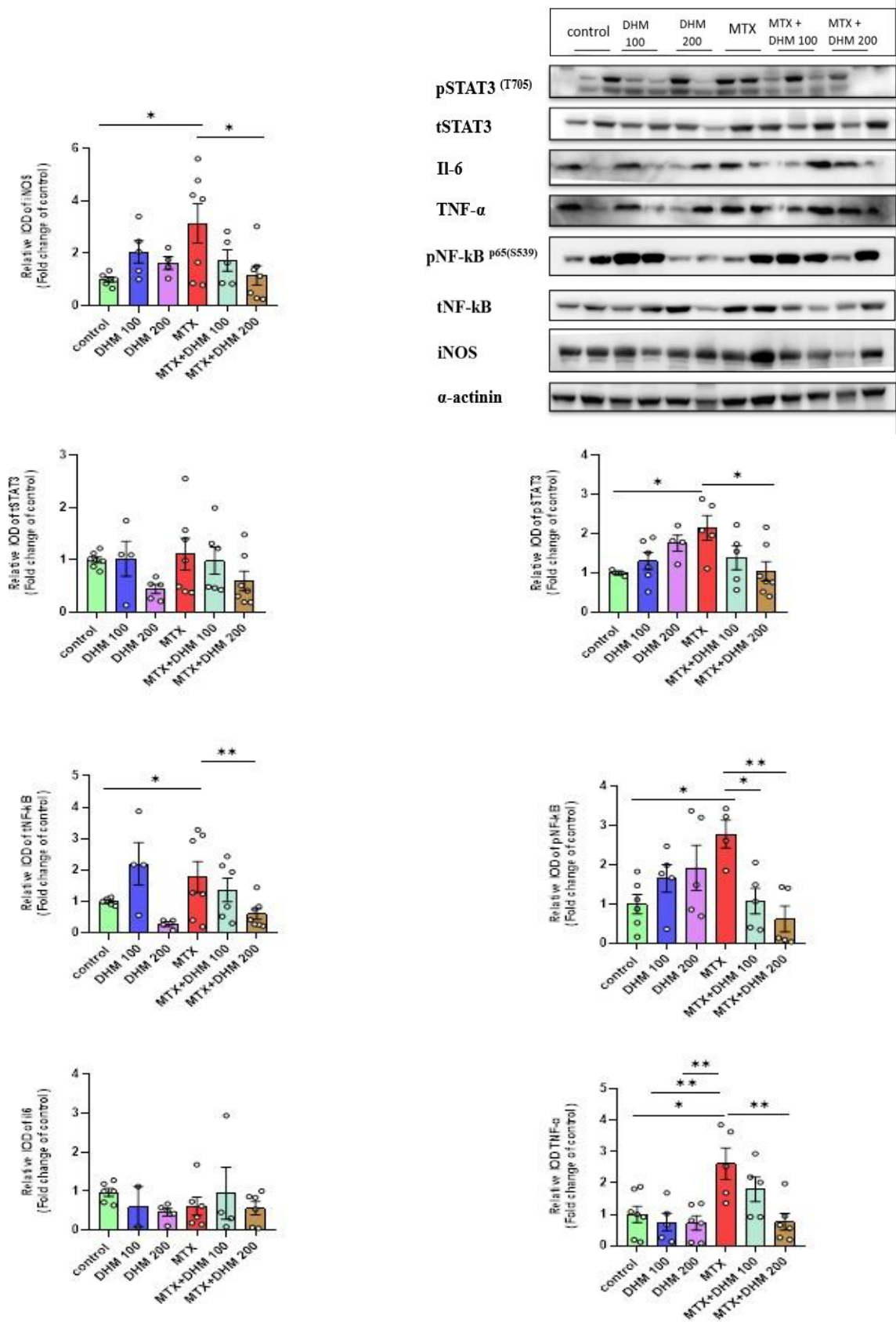


Εικόνα 11. Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ (αριστερά) και στους νεφρούς (δεξιά). Η MTX αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς, ενώ η χορήγηση της DHM, και στις δύο δόσεις για το ήπαρ και στην υψηλή δόση για τους νεφρούς, αποτρέπει την αύξηση αυτή. (one-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.8 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών αναλύσεων με Western Blot

4.8.1 Αποτελέσματα Western Blot στο ήπαρ

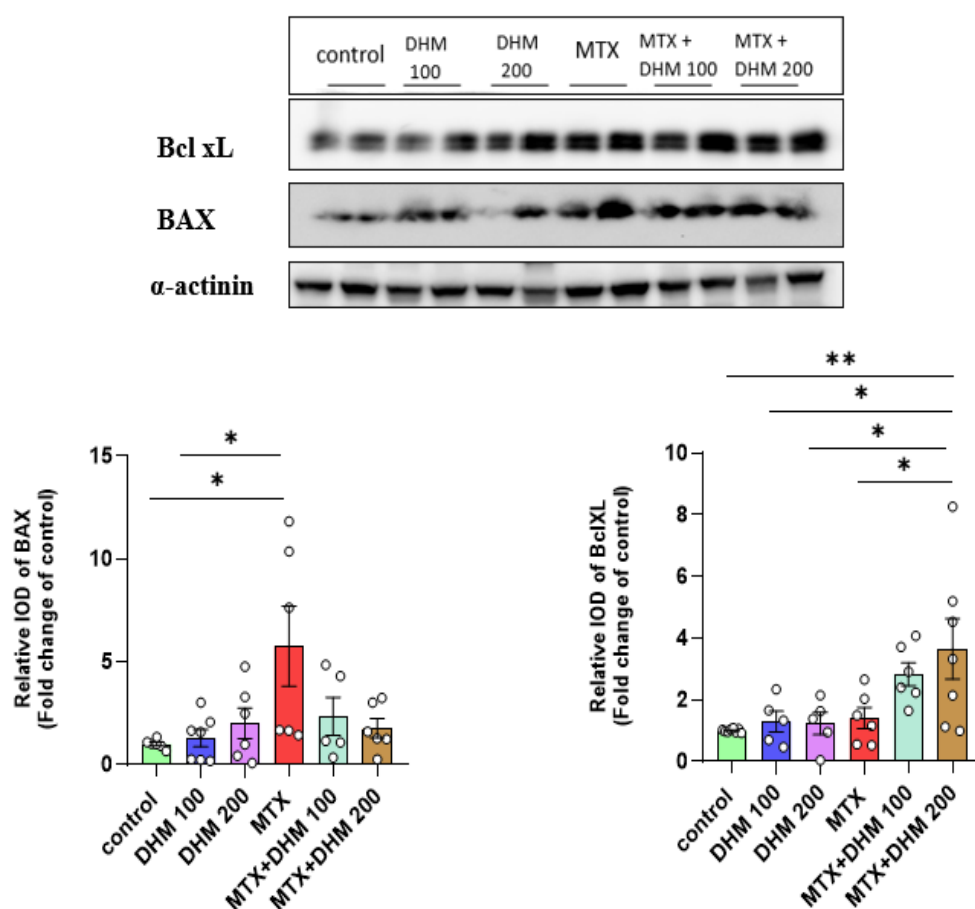
Μελέτη έκφρασης και ενεργοποίησης μεσολαβητών της φλεγμονής στο ήπαρ. Αρχικά, μελετήσαμε την έκφραση μεσολαβητών της φλεγμονής όπως είναι η IL-6 και ο TNF- α , καθώς και την έκφραση και φωσφορυλίωση των STAT3 και NF- κ B παραγόντων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται μια αύξηση της έκφρασης της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF- α στην ομάδα χορήγησης της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες ζώων που έλαβαν μόνο DHM. Η αύξηση αυτή περιορίζεται στην ομάδα συγχορήγησης MTX και DHM και στις δύο δόσεις. Όσον αφορά τη φωσφορυλίωση του STAT3, παρατηρήθηκε μία αύξηση στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς να υπάρχει μεταβολή στην έκφραση του ολικού STAT3. Αυτή η αυξημένη φωσφορυλίωση του STAT3 αναστρέφεται στις ομάδες χορήγησης MTX και DHM και μάλιστα δόσοεξαρτώμενα καθώς στην ομάδα συγχορήγησης με την χαμηλή δόση DHM έχουμε μείωση αλλά όχι στατιστικώς σημαντική, ενώ στην ομάδα συγχορήγησης με την υψηλή δόση DHM έχουμε στατιστικώς σημαντική μείωση. Τα επίπεδα έκφρασης της iNOS στην ομάδα της MTX είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και αναστέλλονται με την συγχορήγηση της DHM, με εμφάνιση στατιστικώς σημαντικής μείωσης κατά την υψηλή δόση. Επιπλέον, η ολική έκφραση του NF- κ B παρατηρείται να είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και η αύξηση αυτή αντιστρέφεται με στατιστικώς σημαντικό τρόπο με την χορήγηση υψηλής δόσης της DHM. Παράλληλα, η φωσφορυλίωση του NF- κ B είναι αυξημένη μετά τη χορήγηση της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ελαττώνεται στατιστικώς σημαντικά με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στις ομάδες της συγχορήγησης. Άρα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η επαγόμενη από την MTX ηπατοτοξικότητα φαίνεται να μεσολαβείται από τη φλεγμονή, όπως πιστοποιείται από τα αυξημένα επίπεδα TNF- α και iNOS και φαίνεται να διενεργείται μέσω των JAK/STAT3 και NF- κ B μονοπατιών. Η DHM μειώνει τα επίπεδα των TNF- α , iNOS, pSTAT3 και pNF- κ B βελτιώνοντας την εικόνα της φλεγμονής (εικόνα 17).



Εικόνα 12. Πρωτεϊνική έκφραση και ενεργοποίηση βασικών μεσολαβητών της φλεγμονής (pSTAT3/tSTAT3, il-6, TNF-α, pNF-kB/tNF-kB, iNOS) στο ήπαρ. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Μελέτη της έκφρασης και της ενεργοποίησης μεσολαβητών της απόπτωσης στο ήπαρ.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση μεσολαβητών που σχετίζονται με την απόπτωση όπως είναι η προαποπτωτική πρωτεΐνη BAX και η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl xL (εικόνα 17). Στην περίπτωση της BAX, παρατηρείται μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα αναφοράς, η οποία αντιστρέφεται στις ομάδες της συγχορήγησης. Στην περίπτωση της BclxL, στην ομάδα της συγχορήγησης με την υψηλή δόση DHM, έχουμε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασής της σε σχέση με την ομάδα της MTX, αλλά και με την ομάδα ελέγχου.

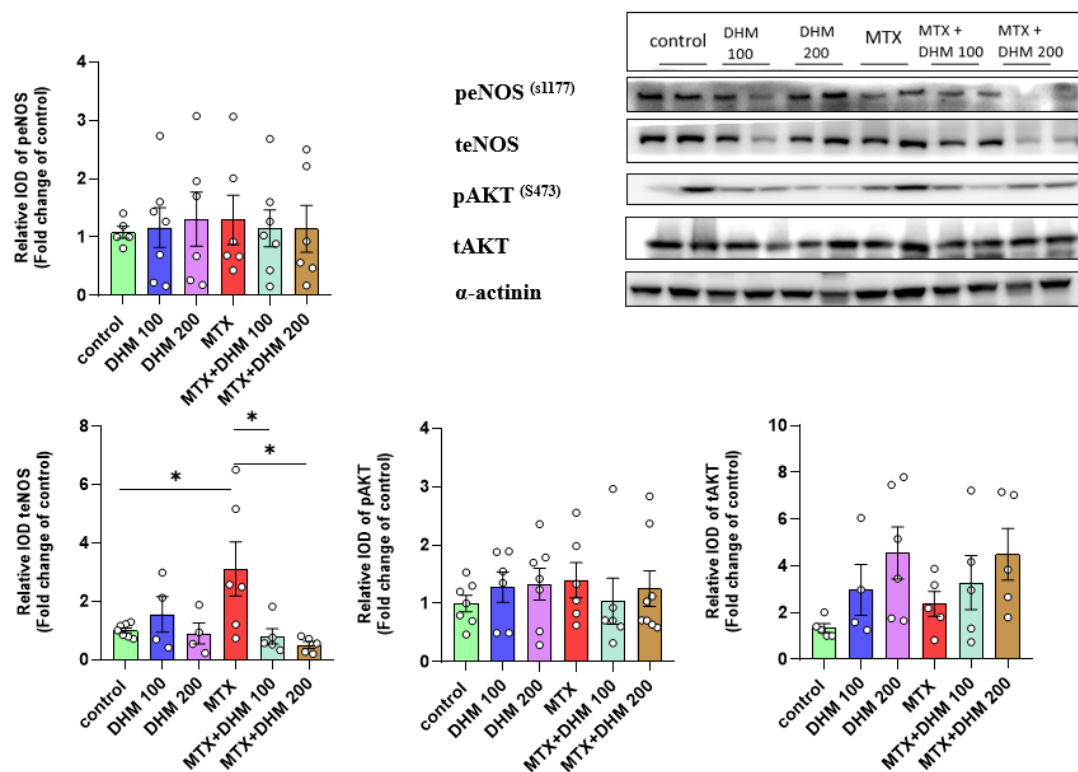


Εικόνα 13. Έκφραση και ενεργοποίηση βασικών μεσολαβητών της απόπτωσης (BAX, Bcl-xL) στο ήπαρ. Η MTX αυξάνει την αποπτωτική πρωτεΐνη BAX, ενώ η DHM μειώνει τη BAX και παράλληλα αυξάνει την αντιαποπτωτική Bcl xL. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Μελέτη της πιθανής ενεργοποίησης του PI3K/AKT/eNOS μονοπατιού στο ήπαρ.

Αμελετήσαμε την έκφραση των μεσολαβητών ενός άλλου μονοπατιού στο οποίο πιθανόν να εμπλέκεται τόσο η MTX όσο και η DHM, το οποίο είναι το PI3K/AKT/eNOS.⁵³⁻⁵⁵ Στην μελέτη αυτού του μονοπατιού δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων στους δείκτες p-eNOS, p-AKT και t-AKT, ωστόσο στην περίπτωση της t-eNOS παρατηρούμε μία αύξηση στην έκφρασή της στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα

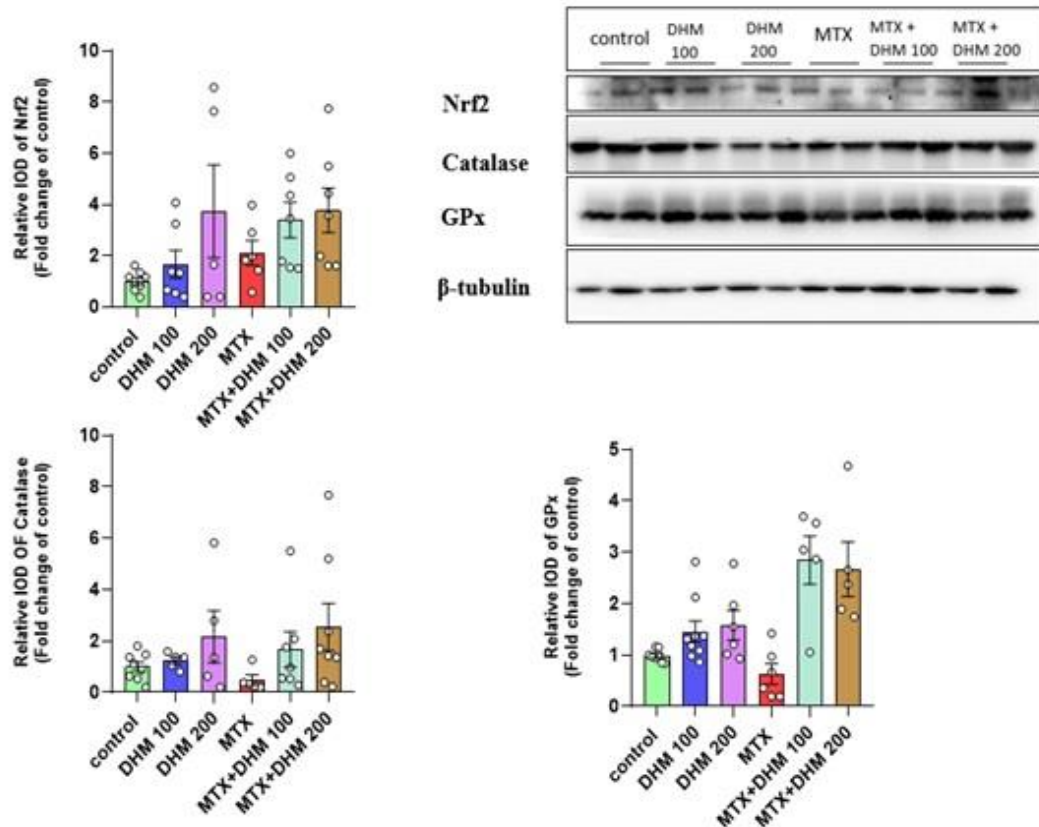
αναφοράς, η οποία αναστρέφεται με την συγχορήγηση της DHM τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή δόση.



Εικόνα 14. Έκφραση και ενεργοποίηση πρωτεϊνών του *PI3K/AKT/eNOS* μονοπατιού (*peNOS/teNOS*, *pAKT/tAKT*) στο ήπαρ. Η χορήγηση της MTX φαίνεται ότι αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της *Enos*, μεταβολή που αναστρέφει η DHM. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$)

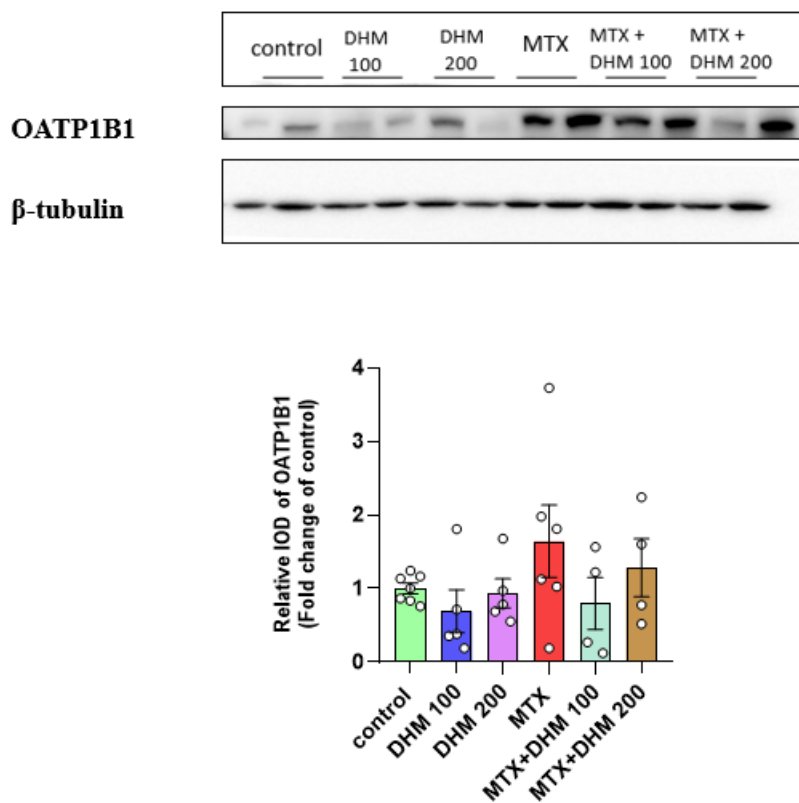
Μελέτη της έκφρασης αντιοξειδωτικών μεσολαβητών στο ήπαρ. Μελετήσαμε την ενδεχόμενη προστατευτική επίδραση της DHM στη μείωση του επαγόμενου από τη MTX οξειδωτικού στρες. Αρχικά, μελετήσαμε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος έχει την ικανότητα να διαπερνά την μεμβράνη του πυρήνα, να προσδένεται σε μία αλληλουχία του πυρήνα γνωστή ως area response element (ARE) και να επάγει την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση^{47,57}. Η έκφραση και η ενεργοποίηση του Nrf2 δε φαίνεται να μεταβάλλεται από τη χορήγηση της MTX και της DHM. Παράλληλα, μελετήθηκε και η έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και καταλάση (CAT). Στην περίπτωση της GPx, παρατηρούμε μείωση της έκφρασής της στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου δηλαδή, πιθανώς λόγω του οξειδωτικού στρες που προκαλεί η χορήγηση της MTX. Με την χορήγηση της DHM παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης στην έκφραση της GPx είτε όταν χορηγείται μόνη της είτε σε συνδυασμό με την MTX χωρίς, όμως, οι μεταβολές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για την έκφραση της καταλάσης. Τα δύο αυτά αντιοξειδωτικά ένζυμα δεν

εμπλέκονται στο ίδιο αντιοξειδωτικό μονοπάτι, ωστόσο υπάγονται σε κοινό έλεγχο έκφρασης από τον Nrf2 (εικόνα 17).

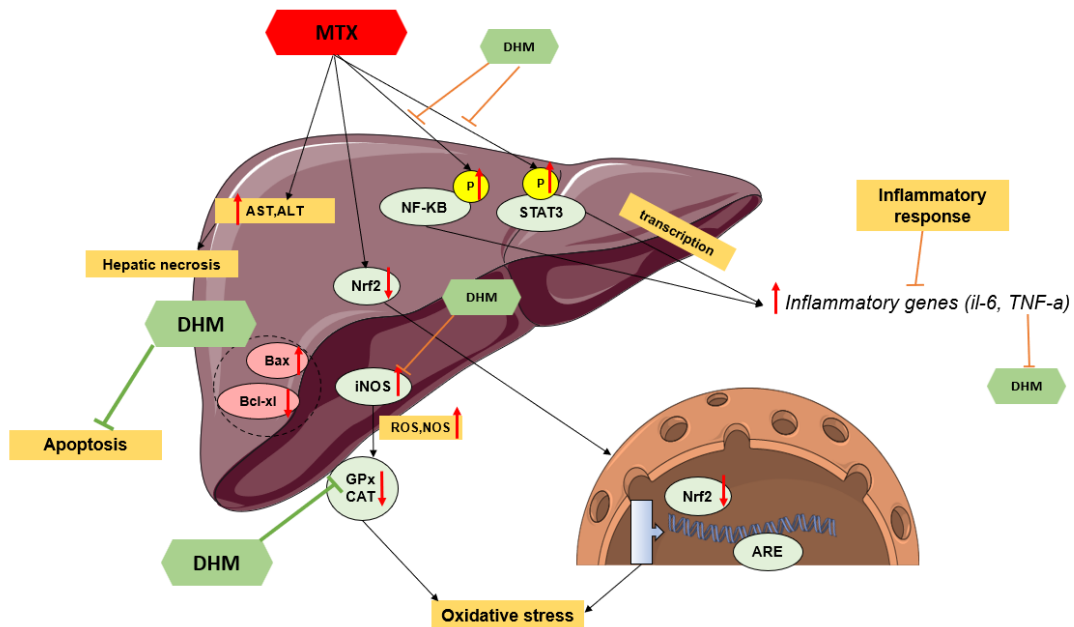


Εικόνα 15. Έκφραση του Nrf2 και σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων (GPx και CAT) στο ήπαρ. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές αλλά υπάρχει μια τάση αύξησης της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων στις ομάδες που έλαβαν DHM. (one-way ANOVA)

Μελέτη της έκφρασης του μεταφορέα OATP1B1 στο ήπαρ. Η έκφραση του μεταφορέα OATP1B1 (organic anion transporting polypeptide 1B1) που είναι υπεύθυνος για την είσοδο της MTX στα ηπατοκύτταρα φαίνεται να είναι αυξημένη στην ομάδα της MTX χωρίς ωστόσο να φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα. Τα επίπεδα έκφρασης, λοιπόν, του μεταφορέα φαίνεται να είναι παρόμοια σε όλες τις ομάδες.



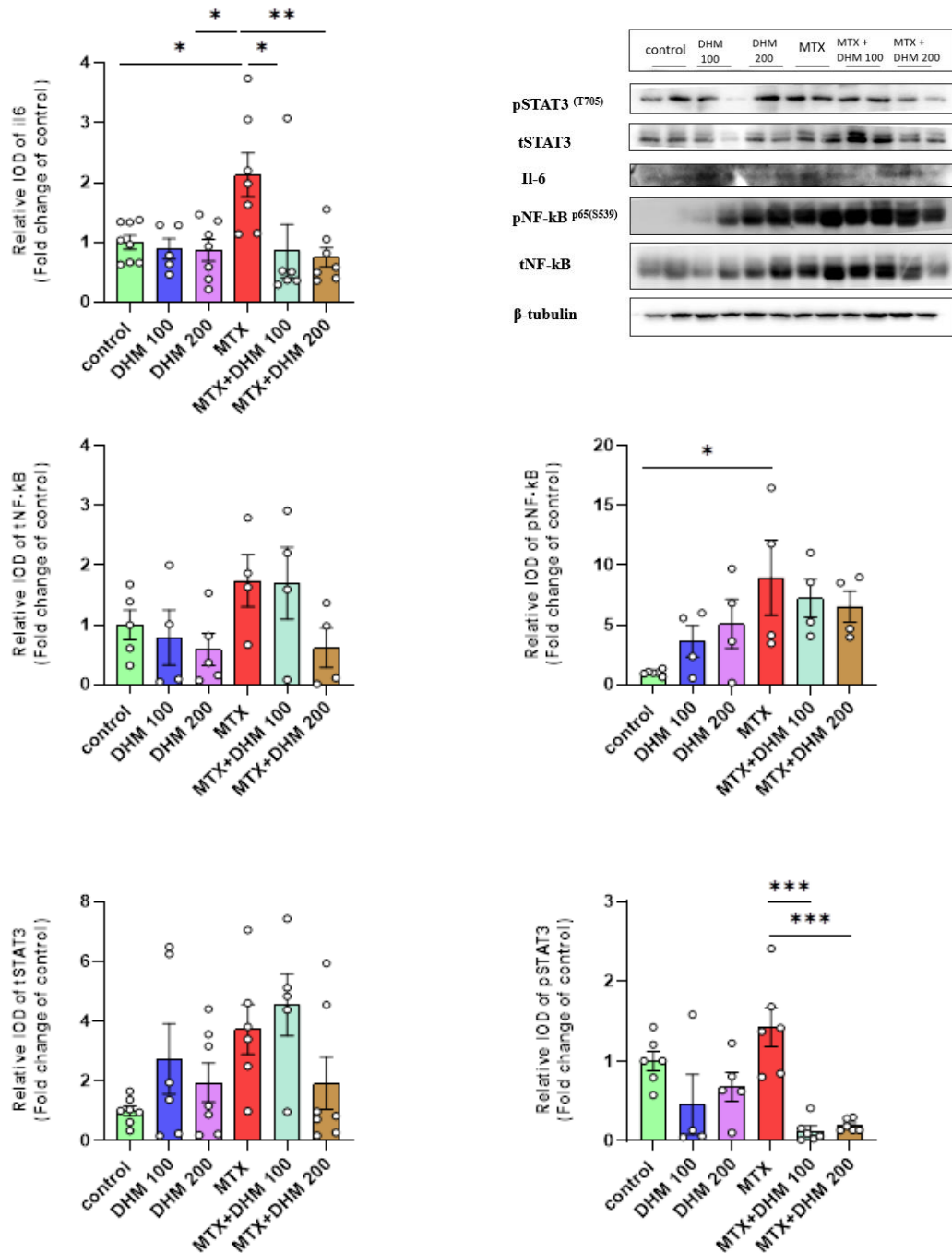
Εικόνα 16. Επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα OATP1B1 στο ήπαρ. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων (one-way ANOVA)



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων η Διϋδρομυρισετίνη ασκεί την προστατευτική της επίδραση έναντι της επαγόμενης από τη MTX ηπατοτοξικότητας.

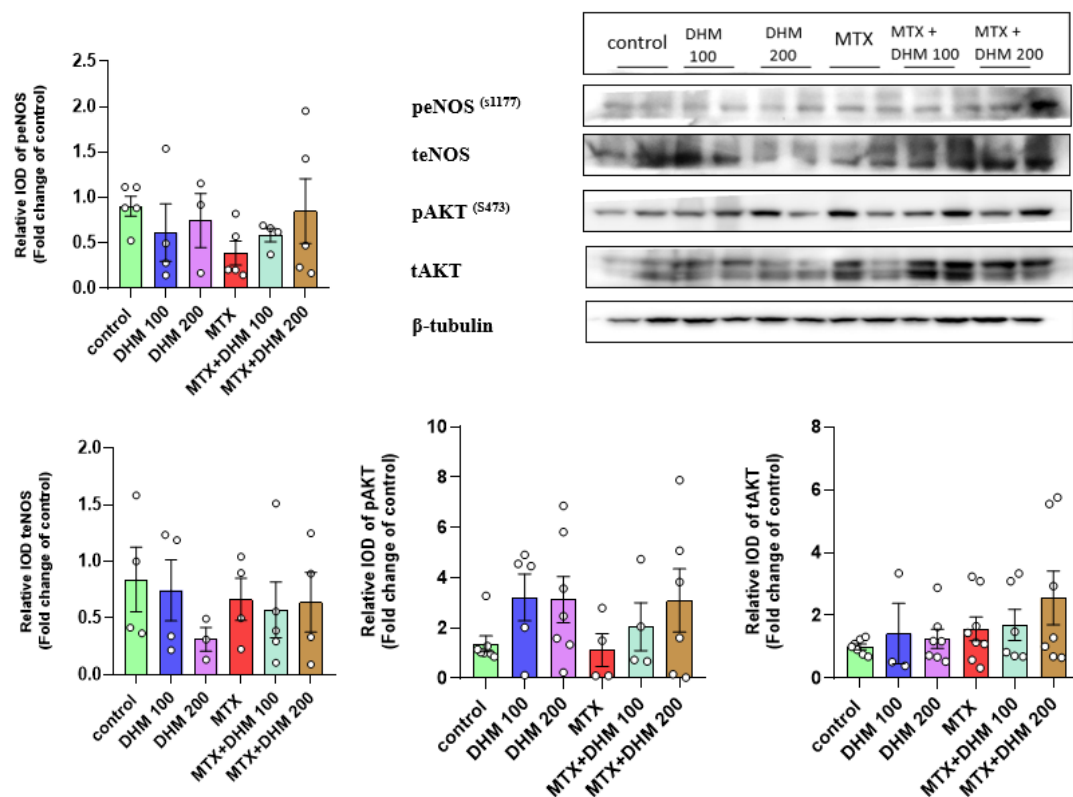
4.8.2. Αποτελέσματα Western Blot στους νεφρικούς ιστούς.

Μελέτη της έκφρασης και ενεργοποίησης βασικών μεσολαβητών της φλεγμονής στους νεφρούς. Σε αντιστοιχία με τη μελέτη μας στο ήπαρ, και στην περίπτωση των νεφρικών ιστών, διερευνήσαμε για πιθανές μεταβολές στη φωσφορυλίωση και στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων NF-kB και STAT3, καθώς και στην έκφραση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-6. Παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση του STAT3 στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η οποία μειώνεται στατιστικά σημαντικά όταν στα ποντίκια χορηγήθηκε DHM σε συνδυασμό με την MTX. Επιπλέον, η έκφραση της IL-6 δείχνει να αυξάνεται σημαντικά στην ομάδα της MTX, με την DHM να επιφέρει στατιστικά σημαντική ελάττωση στα επίπεδά της με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε και αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του NF-kB στην ομάδα της MTX σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με την DHM να τείνει να μειώσει τα επίπεδα αυτά, όπως φαίνεται στις ομάδες των συγχωρηγήσεων (εικόνα 22).



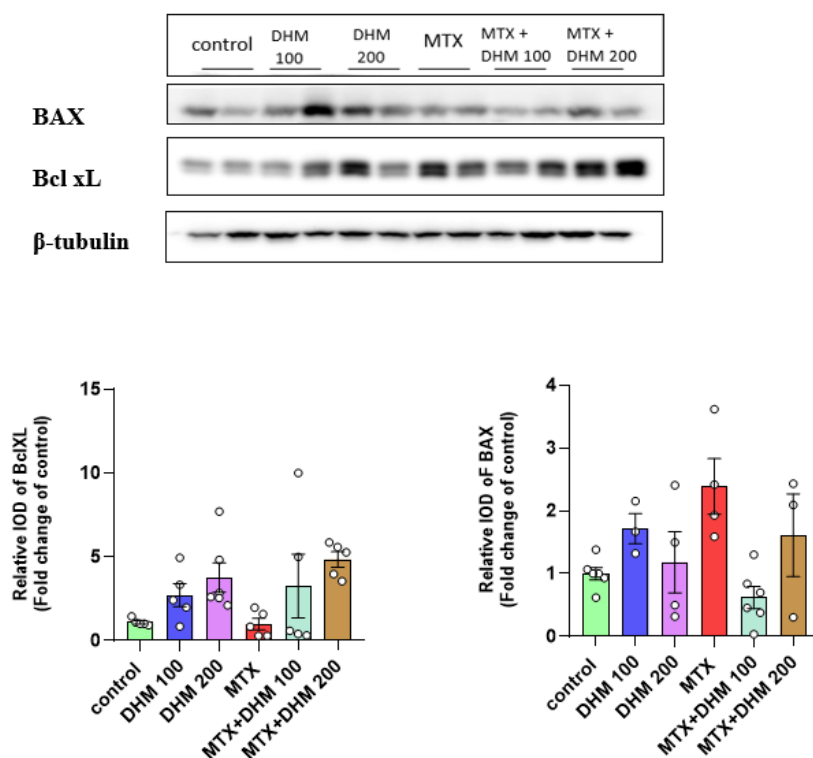
Εικόνα 18. Πρωτεϊνική έκφραση και ενεργοποίηση μεσολαβητών της φλεγμονής στους νεφρούς. Η MTX αυξάνει την έκφραση της IL-6 και τη φωσφορυλίωση του NF-kB, ενώ η DHM μειώνει τα αυξημένα επίπεδα IL-6 και παράλληλα περιορίζει την ενεργοποίηση του STAT-3. (one-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Μελέτη της πιθανής ενεργοποίησης του PI3K/AKT/eNOS μονοπατιού στους νεφρούς.
 Κατά τη μελέτη αυτού του μονοπατιού δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ των ομάδων πειραματοζώων στα επίπεδα φωσφορυλίωσης και πρωτεϊνικής έκφρασης των eNOS και AKT είτε με χορήγηση της MTX, είτε με την χορήγηση της DHM.



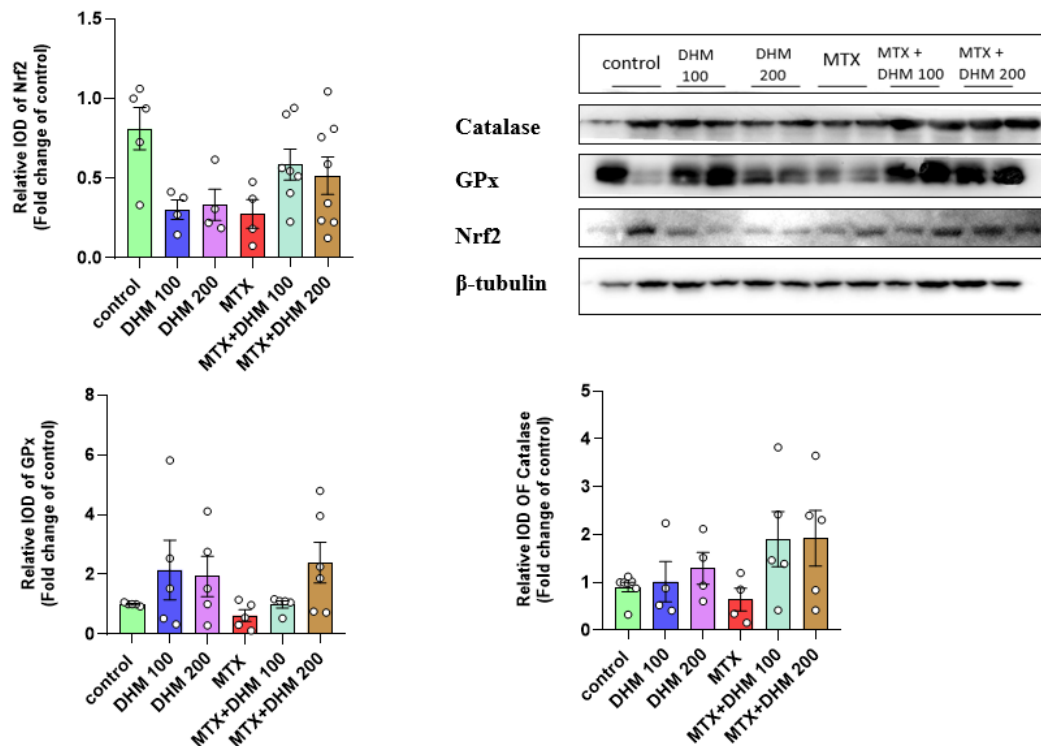
Εικόνα 19. Έκφραση και ενεργοποίηση μεσολαβητών του PI3K/AKT/eNOS μονοπατιού (peNOS/teNOS, pAKT/tAKT) στους νεφρούς. (one-way ANOVA).

Μελέτη της έκφρασης και ενεργοποίησης βασικών μεσολαβητών της απόπτωσης στους νεφρούς. Στην περίπτωση των νεφρών σε αντίθεση με τον ηπατικό ιστό, η απόπτωση δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα που επάγεται από τη MTX καθώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε μεσολαβητές του συγκεκριμένου μονοπατιού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

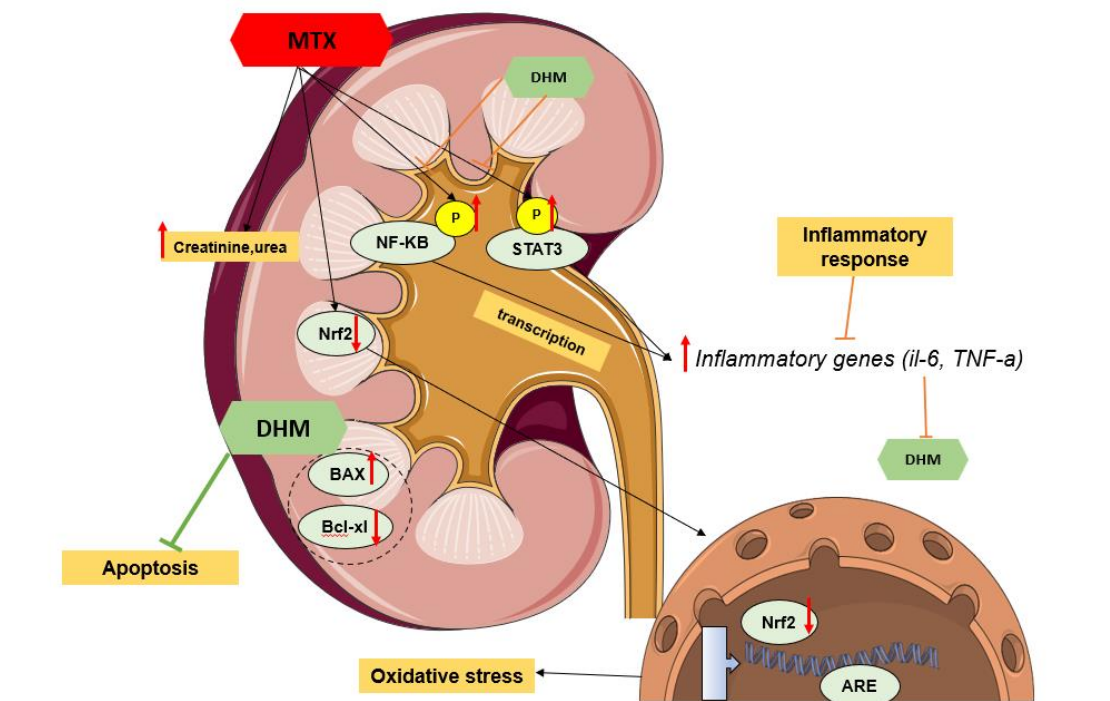


Εικόνα 20. Έκφραση μεσολαβητών της απόπτωσης στους νεφρούς. (one-way ANOVA)

Μελέτη έκφρασης αντιοξειδωτικών μεσολαβητών στους νεφρούς. Μελετήθηκε η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και των ενζύμων καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, όπως και στο ήπαρ (εικόνα 22). Τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων παρουσιάζουν μία τάση αύξησης κατά τη χορήγηση της DHM είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με την MTX, χωρίς τα αποτελέσματά μας αυτά να είναι στατιστικά σημαντικά.



Εικόνα 21. Πρωτεϊνική έκφραση του Nrf2 και των σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων (Catalase, GPx) στους νεφρούς. (one-way ANOVA).



Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση των πιθανών μηχανισμών προστασίας της DHM έναντι της νεφρικής βλάβης που επάγεται από τη MTX.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεθοτρεξάτη (MTX) δρα ως ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος και είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή άλλων αυτοάνοσων διαταραχών σε χαμηλή δόση, και για διάφορους τύπους καρκίνου, όπως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, τα οστεοσαρκώματα και τα λεμφώματα σε υψηλή δόση⁷⁶. Παρά τον ενθαρρυντικά χαμηλό λόγο κόστους-οφέλους, η πιο συχνή αιτία διακοπής της θεραπείας είναι η εκδήλωση σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, μεταξύ των οποίων η νεφροτοξικότητα και η ηπατοτοξικότητα⁷⁷. Συνεπώς, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθούν οι μηχανισμοί πρόκλησης τοξικότητας και να ανευρεθούν παράγοντες που θα βελτιώσουν την ανεκτικότητα των ασθενών στη θεραπεία με MTX.

Στα πλαίσια εξεύρεσης μιας εναλλακτικής φαρμακολογικής προσέγγισης, η Διυδρομυρισετίνη (DHM), ένα φλαβονοειδές το οποίο εξάγεται από τους μίσχους και τα φύλλα των ειδών *Ampelopsis japonica*, *megalophylla* και *grossedanta*, επιλέχθηκε λόγω του ευρέος φάσματος φαρμακολογικών ιδιοτήτων της, όπως οι αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές δράσεις της⁷⁸. Παράλληλα, για την πρόσληψη της MTX στα ηπατοκύτταρα και στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο στους νεφρούς σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν οι μεταφορείς της κατηγορίας OATPs (Organic Anion Polypeptides)⁷⁹. Η διυδρομυρισετίνη έχειδειχθεί να αποτελεί αναστολέα της δράσης του πιο μελετημένου μεταφορέα της μεθοτρεξάτης (OATP1B1), που βρίσκεται αποκλειστικά στη βασική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων⁸⁰.

Συνεπώς, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής προστατευτικής δράσης της Διυδρομυρισετίνης (DHM) ενάντια στην επαγόμενη από Μεθοτρεξάτη (MTX) ηπατοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα, καθώς και η διερεύνηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών.

Αρχικά, προσδιορίστηκε το κατάλληλο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της τοξικότητας και οι συνθήκες του πειραματικού μας πρωτοκόλλου (δοσολογικό σχήμα, χρονική διάρκεια) με βάση ευρήματα από προκαταρκτικά πειράματα, που διεξήγαμε, μετά από μέτρηση των δεικτών ηπατικής λειτουργίας AST και ALT στο πλάσμα των πειραματοζώων. Επιλέχθηκε το μοντέλο των 129/SV μυνών, στο οποίο δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν η τοξικότητα της MTX, και τα ποντίκια διαχωρίστηκαν τυχαία σε 6 ομάδες. Εκτός από την ομάδα ελέγχου (Control) και την ομάδα Μεθοτρεξάτης (MTX), σχηματίστηκαν, επίσης, οι ομάδες που έλαβαν διά του στόματος για 5 συνεχόμενες ημέρες μόνο τις δύο διαφορετικές δόσεις DHM (100 and 200 mg/Kg) ή πριν από τη χορήγηση μίας δόσης MTX (20 mg/kg) ενδοπεριτοναϊκά την 5^η ημέρα.

Σύμφωνα λοιπόν με τις μετρήσεις στο *in vivo* μοντέλο μας, η DHM φάνηκε να επαναφέρει τις αυξημένες από τη MTX τιμές των ηπατικών ενζύμων AST και ALT στο πλάσμα, που αποτελούν βασικούς δείκτες βλάβης του ήπατος, αλλά και της κρεατινίνης, υποδεικνύοντας και βλάβη των νεφρών. Αντίθετα, η MTX δεν μετέβαλε σημαντικά τις δραστηριότητες των ALP και LDH, αλλά ούτε και τα επίπεδα της ουρίας στο πλάσμα. Αυξημένη δραστηριότητα των σημαντικών αυτών ενζύμων δεικτών της τοξικότητας έχουν δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες μετά από χορήγηση ^{MTX81.82}. Η αύξηση στα κυτοσολικά αυτά ηπατικά ένζυμα στο πλάσμα υποδεικνύει μια διαρροή στην κυτταρική μεμβράνη, η οποία με τη σειρά της σχετίζεται με θάνατο των ηπατοκυττάρων. Τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, συμπεριλαμβανομένων των ALT και AST στον εξωκυττάριο χώρο. Τα ένζυμα που απελευθερώνονται τελικά εισέρχονται στην κυκλοφορία και έτσι αυξάνουν τα επίπεδα στον ορό. Η ALT εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, καθώς και σε χαμηλότερα επίπεδα στους σκελετικούς μύες και τον καρδιακό ιστό. Η δραστηριότητα της AST του ορού θεωρείται λιγότερο ειδικός βιοδείκτης της ηπατικής λειτουργίας σε σύγκριση με τη δραστηριότητα της ALT. Η AST απελευθερώνεται από κατεστραμμένα μυοκύτταρα καθώς και από ηπατοκύτταρα⁸³. Αντίστοιχα, τα αυξημένα αποτελέσματα κρεατινίνης (ή και ουρίας) μπορεί να οφείλονται στη νεφρική δυσλειτουργία που προκαλείται από την κατακρήμνιση της MTX και των μεταβολιτών της μέσα στα νεφρικά σωληνάρια.

Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη MTX ως μοντέλο για την επαγωγή ηπατοτοξικότητας. Η MTX έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αλλοιώσεις στην ιστοπαθολογία του ήπατος όπως συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων, ίνωση και νέκρωση του ιστού^{84.85}, ωστόσο στην δική μας μελέτη, στους ηπατικούς ιστούς των μυών που έλαβαν MTX παρατηρήθηκαν εστιακές νεκρώσεις, οι οποίες δεν μπορούν να χαρακτηρίσουν όλη την ομάδα, συνεπώς δεν έχουμε κάποια εκτεταμένη ιστική βλάβη. Αυτή η διαφορά πιθανόν να οφείλεται στη χρήση του συγκεκριμένου είδους μυός και στην πιθανή αντοχή του στην MTX.

Οι παρατηρούμενες επιδράσεις της MTX στα ένζυμα ALT και AST αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό βιβλιογραφικά στο επαγόμενο από τη μεθοτρεξάτη οξειδωτικό στρες και στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, που οδηγούν σε ηπατική βλάβη και διαταραχή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας των ηπατοκυττάρων⁸⁶. Το ήπαρ και οι νεφροί είναι τα όργανα, που επηρεάζονται πιο σοβαρά από την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από την MTX⁸⁷ και για το λόγο αυτό, στη συνέχεια, προσδιορίσαμε δείκτες του οξειδωτικού στρες τόσο στους ηπατικούς όσο και στους νεφρικούς ιστούς, και φάνηκε ότι παρόλο που τα επίπεδα της Μηλονικής Διαλδεύδης (MDA) παρέμειναν ανεπηρέαστα, η DHM μείωσε τα αυξημένα από την MTX επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCS).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ σε προηγούμενες μελέτες μελετήθηκαν τα επίπεδα της MDA και παρατηρήθηκαν αυξημένα στις ομάδες που έλαβαν MTX, στη δική μας μελέτη δεν παρατηρήσαμε κάποια μεταβολή. Αυτό ίσως οφείλεται στη χρήση διαφορετικού πειραματικού μοντέλου από ότι στις υπόλοιπες μελέτες. Για τον λόγο αυτό μετρήσαμε και τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCS) και παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδά τους ήταν αυξημένα στην ομάδα της MTX και μειώνονται με την χορήγηση της DHM γεγονός που υποδηλώνει μία προστατευτική αντιοξειδωτική δράση της DHM.

Μία εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση MTX (20 mg/kg) σε αρουραίους έχει αναφερθεί να προκαλεί οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακή τοξικότητα, ηπατική ίνωση και ενδογενή απόπτωση⁸⁸. Η χορήγηση MTX σε αρουραίους έχει αποδειχθεί να επάγει το οξειδωτικό στρες αυξάνοντας την παραγωγή ROS και μειώνοντας τα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα στους νεφρούς και στο ήπαρ, με ελάττωση της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), καθώς και παρεμποδίζοντας την επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης^{89,90} (εικόνα 17).

Για τον λόγο αυτό θελήσαμε να ανιχνεύσουμε περαιτέρω τις συνθήκες του οξειδωτικού στρες και κατά πόσο συμβάλλει στην επαγόμενη από την MTX τοξικότητα. Έχει δειχθεί ότι αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με MTX⁹¹ ενδέχεται να υποδηλώνει οξειδωτικό στρες (εξάντληση NADPH και μείωση στη γλουταθειόνη) ή άμεση κυτταροτοξική δράση που οδηγούν σε λιπώδη διήθηση στο ήπαρ⁹². Ο Nrf2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να λειτουργήσει ως αισθητήρας για το οξειδωτικό στρες. Υπό κανονικές συνθήκες, ο Nrf2 διατηρείται στο κυτταρόπλασμα με την πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), που διευκολύνει στην αποικοδόμησή του. Σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, το Nrf2 σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω της απελευθέρωσής του από την κυτταροπλασματική Keap1 και της πυρηνικής του μετατόπισης, όπου προσδένεται σε μία αλληλουχία του πυρήνα γνωστή ως ARE (area response element) και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την προστασία από την οξειδωτική βλάβη και τη φλεγμονή, ανάμεσα στα οποία και για τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση, οδηγώντας σε προστασία των κυττάρων⁹³.

Επομένως, με βάση αυτά τα δεδομένα, προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και τη δράση και έκφραση βασικών αντιοξειδωτικών ενζύμων και την ενεργοποίηση του Nrf2 αντιοξειδωτικού μονοπατιού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, παρατηρήθηκε μία μη στατιστικά σημαντική τάση μείωσης της πρωτεϊνικής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 όσο και των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT και GPx τόσο στους ηπατικούς

όσο και στους νεφρικούς ιστούς, με την DHM να επαναφέρει τα επίπεδα αυτά στα αρχικά. Παράλληλα και για τις τιμές συγκέντρωσης ομοκυστεΐνης στο πλάσμα δεν υπήρξαν διαφορές ανάμεσα στις ομάδες πειραματοζώων. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι το οξειδωτικό στρες και η ενεργοποίηση του Nrf2-αντιοξειδωτικού μονοπατιού εμπλέκονται σε μικρό βαθμό στην προκαλούμενη από την MTX τοξικότητα και την προστασία της DHM, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε άλλους πιθανούς μηχανισμούς που συμβάλλουν πιθανά στην τοξικότητα και την ευεργετική δράση της DHM, ήτοι μέσω της φλεγμονής και της αποπτωτικής διαδικασίας. Η χορήγηση MTX στα πειραματόζωα έχει δεχτεί ότι προκαλεί υπερρύθμιση των προφλεγμονωδών δεικτών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου- α (TNF- α), ο NF- κ B, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η IL-1 β και η IL-12⁹⁴. Ο NF- κ B είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα. Στην ανενεργή του μορφή είναι προσδεμένος με τον αναστολέα του, την πρωτεΐνη I κ B α . Μέσω εξωτερικών σημάτων ή μεταβολών, ενεργοποιείται η I κ B πρωτεϊνική κινάση (IKK), η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει την I κ B α . Η φωσφορυλίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της I κ B α από τον NF- κ B και την αποικοδόμηση της πρώτης από το πρωτεάσωμα. Ο ελεύθερος πλέον NF- κ B φωσφορυλιώνεται και εισέρχεται στον πυρήνα επάγοντας τη μεταγραφή διάφορων προφλεγμονωδών γονιδίων, όπως για διάφορες κυτοκίνες και χημειοκίνες, μεταξύ των οποίων είναι και για την παραγωγή TNF- α και IL-6⁴⁵. Ο TNF- α είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που παίζει κεντρικό ρόλο στη μεσολάβηση της φλεγμονώδους απόκρισης. Εκκρίνεται ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα (κυρίως από τα μακροφάγα) και επάγει την απελευθέρωση άλλων κυτοκινών και την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, επεκτείνοντας τη βλάβη (εικ. 17). Ο STAT3 με τη σειρά του είναι και αυτός ένας μεταγραφικός παράγοντας που φωσφορυλιώνεται και εισέρχεται στον πυρήνα ώστε να επάγει την μεταγραφή γονιδίων μεταξύ των οποίων και της φλεγμονής⁴⁷.

Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Western blotting και αποκαλύφθηκε ότι η DHM ανέστειλε την MTX-επαγόμενη ηπατοτοξικότητα, η οποία φαίνεται να διαμεσολαβείται κυρίως μέσω της φλεγμονής, όπως πιστοποιείται από τα αυξημένα επίπεδα των TNF- α και iNOS και την ενεργοποίηση των JAK/STAT3 και NF- κ B μονοπατιών, καθώς και της αποπτωτικής διαδικασίας, όπως φαίνεται από την αύξηση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAX και τη μείωση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xl. Η χορήγηση της DHM επανέφερε την ισορροπία στα επίπεδα των σημαντικών αυτών μελών της Bcl2 οικογένειας. Αντίστοιχα, η επαγόμενη από MTX νεφρική βλάβη φαίνεται να προκαλείται κυρίως μέσω της φλεγμονής, όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη έκφραση της IL-6 και τη φωσφορυλίωση των NF- κ B και STAT-3, ενώ η απόπτωση φαίνεται να εμπλέκεται σε μικρότερο βαθμό, με την DHM να επιτυγχάνει σε κάποιο βαθμό νεφροπροστασία, μειώνοντας την έκφραση των παραπάνω σηματοδοτικών μορίων (εικ. 22).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, έχει αναφερθεί ότι ο NF-κΒ διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της επαγόμενης από MTX ηπατοτοξικότητας⁴¹, ενώ αυξανόμενα στοιχεία στη βιβλιογραφία υποδηλώνουν ότι η άμεση στόχευση του NF-κΒ θα μπορούσε να αποτελεί μια βιώσιμη θεραπευτική επιλογή για ηπατική νόσο. Η MTX έχει δειχθεί να υπερρυθμίζει την έκφραση του (NF-κΒ) και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και να ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης⁴⁸. Παράλληλα, τα επίπεδα των NF-κΒ και TNF-α ήταν σημαντικά αυξημένα σε ηπατικό, νεφρικό και καρδιακό ιστό σε επίμυες που έλαβαν MTX⁹⁵, καθώς και τα επίπεδα των NF-κΒ, IL-6, IL-1β, iNOS και TNF-α σε Swiss albino ποντίκια⁹⁴ και συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες⁹⁶ (εικ.17). Για την ενεργοποίηση του NF-κΒ σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κινάσων σερίνης/θρεονίνης, το MAPK (και κυρίως το p38 MAPK μονοπάτι), με αποτέλεσμα το σηματοδοτικό MAPK/NF-κΒ μονοπάτι να θεωρείται στρατηγικής σημασίας στην οργάνωση και επαγωγή των φλεγμονωδών διαδικασιών. Η μεθοτρεξάτη έχει αναφερθεί να ενεργοποιεί τη MAPK σηματοδοτική οδό σε διάφορες μελέτες⁹³.

Η τοξικότητα της MTX έχει συσχετιστεί στη βιβλιογραφία με τη φλεγμονή και την απόπτωση με πολλαπλές μελέτες να αποδεικνύουν τη φλεγμονώδη απόκριση μετά από χορήγηση MTX σε τρωκτικά⁹⁷. Η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες εργάζονται συντονισμένα για να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη και απόπτωση. Η ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση ελέγχεται από την Bcl-2 οικογένεια γονιδίων, η οποία περιλαμβάνει προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (όπως η Bax) και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (όπως οι Bcl-2 και Bcl-xL) και θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές της απόπτωσης. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναδείξει τη συμβολή της απόπτωσης στην τοξικότητα της MTX τόσο στους νεφρούς των πειραματοζώων^{92,94} με αύξηση του λόγου Bax/Bcl2, της p53 και της ενεργοποίησης των κασπασών -9 και -3⁹³, όσο και στο ήπαρ⁹⁷, όπου αναφέρθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της Bax και μειωμένα επίπεδα του Bcl-2 σε ηπατικούς ιστούς επίμυων μετά από χορήγηση MTX, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Κατά τη διάρκεια της προκαλούμενης από MTX απόπτωσης των ηπατοκυττάρων, επάγεται η μετατόπιση της Bax στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, που ενεργοποιεί καθοδικά το μονοπάτι των κασπασών (κασπάση-9, κασπάση-3)⁹⁶. Η αυξημένη και συνεχής απόπτωση των ηπατοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση και η διαταραχή της ισορροπίας της Bcl2 οικογένειας και η ενεργοποίηση του STAT3 έχουν δειχτεί να συμβάλλουν προς αυτή την κατεύθυνση⁹⁸. Αντίθετα, στη μελέτη μας, στους νεφρικούς ιστούς ενεργοποιείται σε πολύ μικρότερο βαθμό η αποπτωτική διαδικασία.

Τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των NF-κΒ και STAT3 δείχνουν τη συμβολή της φλεγμονώδους απόκρισης στην προκαλούμενη από MTX ηπατοτοξικότητα και

νεφροτοξικότητα. Η αύξηση της IL-6 δρα ως επαγωγέας της φωσφορυλίωσης του STAT3 στην Tyr705, ο οποίος και αυτός με την σειρά του εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται τόσο με την φλεγμονή όσο και με την αποπτωτική διαδικασία. Η αυξημένη λόγω της μεθοτρεξάτης φωσφορυλίωσης του STAT3, οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAX και μείωση της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2, ενεργοποιώντας το εσωτερικό μιτοχονδριακό μονοπάτι^{42,45}. Επίσης, η έκφραση της iNOS αυξήθηκε στον ηπατικό ιστό πειραματοζώων που τους είχε χορηγηθεί MTX.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν αναλυθεί για να εξηγήσουν την MTX-επαγόμενη τοξικότητα. Σε μία μελέτη προτάθηκε η εμπλοκή του PI3K/Akt/eNOS μονοπατιού στην παθογένεση νεφροτοξικότητας από τη μεθοτρεξάτη³⁸. Το PI3K/Akt μονοπάτι έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση και την καταστολή της απόπτωσης, και διαταράσσεται από μια πλειάδα ερεθισμάτων και τοξικών προσβολών. Η ενεργοποιημένη Akt ενορχηστρώνει την κυτταρική επιβίωση πυροδοτώντας τη φωσφορυλίωση πολλαπλών καθοδικών στόχων με επακόλουθη αναστολή μιας σειράς προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ανάμεσα στα οποία και οι Bax και Bad. Επιπλέον, η Akt μπορεί να ενεργοποιήσει τη ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), η οποία παράγει NO, ενώ η φωσφορυλίωση των Akt (Ser473) και eNOS (Ser1177), υπερρυθμίζει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνικών μελών της Bcl-2 και απενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κασπάσης-3⁷⁸. Για το λόγο αυτό στη συνέχεια της μελέτης μας εξετάσαμε τη φωσφορυλίωση και έκφραση των Akt και eNOS, με τα αποτελέσματά μας να δείχνουν ότι το PI3K/AKT/eNOS μονοπάτι δεν φαίνεται να συμβάλει σημαντικά στην τοξικότητα της MTX τόσο στο ήπαρ όσο και στους νεφρούς των πειραματοζώων.

Όσον αφορά τη διϋδρομυρισετίνη, τα βιβλιογραφικά δεδομένα συμφωνούν με τα αποτελέσματά μας, καθώς έχει αναφερθεί να εξασθενεί την ηπατική²⁵(εικ.17) και νεφρική²⁶(εικ.22) βλάβη, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιαποπτωτικών της δράσεων³¹. Η DHM έχει δειχθεί να καταστέλλει τη φλεγμονή με μείωση της έκφρασης και παρεμπόδισης της πυρηνικής μετατόπισης του NF-Kb²⁸, ενώ παρέμβαση με DHM μείωσε τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-1β, η IL-6 και ο TNF-α, ανέστειλε την παραγωγή NO από την iNOS και αύξησε τα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους IL-10 σε διαφορετικά *in vivo* και *in vitro* μοντέλα φλεγμονής^{11,31}. Παράλληλα, είχε την ικανότητα να καταστείλει και την απόπτωση με αναστολή του NF-KB/p53/Bax μονοπατιού²⁹. Τέλος, η εμπλοκή του μεταφορέα OATP1B1 στην παθογένεση από τη μεθοτρεξάτη και στην προστατευτική επίδραση της DHM απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Μελλοντικά, θα είχε ενδιαφέρον το πρωτόκολλο αυτό να διεξαχθεί και σε μύες στους οποίους έχει προκληθεί ρευματοειδή αρθρίτιδα ή νεοπλασία, οπότε θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση της DHM σε τέτοιο πειραματικό μοντέλο. Επιπλέον, θα μπορούσε να εξεταστεί και η δράση της DHM σε επίπεδο mRNA και η πιθανή εμπλοκή διάφορων miRNAs στον μοριακό της μηχανισμό.

Συμπερασματικά, η DHM φάνηκε ότι καταστέλλει την ενεργοποίηση κρίσιμων μονοπατιών, υπεύθυνων για τις επιβλαβείς επιπτώσεις της MTX στο ήπαρ και τους νεφρούς και οι ευεργετικές αυτές επιδράσεις της, θα μπορούσαν να την καταστήσουν ως ένα εξαιρετικό υποψήφιο φαρμακολογικό παράγοντα για την υποστήριξη ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με MTX, ελαττώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες της MTX και καθιστώντας τη χορήγησή της πιο ασφαλή, χωρίς παράλληλα να επηρεάζει τη δραστηριότητα και την αποτελεσματικότητά της. Παρόλα αυτά θα πρέπει να διεξαχθούν και άλλες μελέτες τόσο σε αυτό το πειραματικό μοντέλο όσο και σε άλλα ώστε να πιστοποιηθεί η προστατευτική δράση της DHM.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K. & Revillard, J. P. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* **47**, 247–257 (2000).
2. Bedoui, Y. *et al.* Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
3. Chan, E. S. L. & Cronstein, B. N. Methotrexate--how does it really work? *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 175–178 (2010).
4. Jenei, K. *et al.* Cancer medicines on the WHO Model List of Essential Medicines: processes, challenges, and a way forward. *Lancet. Glob. Heal.* **10**, (2022).
5. Nikiphorou, E. *et al.* Indispensable or intolerable? Methotrexate in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis: a retrospective review of discontinuation rates from a large UK cohort. *Clin. Rheumatol.* **33**, 609–614 (2014).
6. Grönroos, M. *et al.* Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. *Pediatr. Blood Cancer* **46**, 624–629 (2006).
7. Hagos, Y. & Wolff, N. A. Assessment of the role of renal organic anion transporters in drug-induced nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. **2**, 2055–2082 (2010).
8. Erdbrügger, U. & De Groot, K. Nierenschädigung durch methotrexat? Dosisabhängigkeit, komorbidität und komedikation. *Z. Rheumatol.* **70**, 549–552 (2011).
9. Howard, S. C., McCormick, J., Pui, C.-H., Buddington, R. K. & Harvey, R. D. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* **21**, 1471–1482 (2016).
10. Widemann, B. C. & Adamson, P. C. Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity. *Oncologist* **11**, 694–703 (2006).
11. Wang, W., Zhou, H. & Liu, L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* **158**, 502–516 (2018).
12. Hautekeete, M. L. & Geerts, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch.* **430**, 195–207 (1997).
13. Kremer, J. M., Galivan, J., Streckfuss, A. & Kamen, B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* **29**, 832–835 (1986).
14. Morgan, S. L. *et al.* The effect of folic acid supplementation on the toxicity of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**, 9–18 (1990).
15. Desouza, C., Keebler, M., McNamara, D. B. & Fonseca, V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs* **62**, 605–616 (2002).
16. Vardi, N., Parlakpınar, H., Cetin, A., Erdogan, A. & Ozturk, I. C. Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol. Pathol.* **38**, 592–597 (2010).
17. Fan, X. *et al.* Drug interaction study of flavonoids toward OATP1B1 and their 3D structure activity relationship analysis for predicting hepatoprotective effects. *Toxicology* **437**, (2020).

18. Bath, R. K., Brar, N. K., Forouhar, F. A. & Wu, G. Y. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *J. Dig. Dis.* **15**, 517–524 (2014).
19. Gonzalez-Ibarra, F. *et al.* Methotrexate induced pancytopenia. *Case Rep. Rheumatol.* **2014**, 1–4 (2014).
20. Paul, M. *et al.* Methotrexate Promotes Platelet Apoptosis via JNK-Mediated Mitochondrial Damage: Alleviation by N-Acetylcysteine and N-Acetylcysteine Amide. *PLoS One* **10**, (2015).
21. Pavy, S. *et al.* Methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: clinical practice guidelines based on published evidence and expert opinion. *Jt. bone spine* **73**, 388–395 (2006).
22. Wessels, J. A. M., Huizinga, T. W. J. & Guchelaar, H. J. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **47**, 249–255 (2008).
23. Dong, S., Ji, J., Hu, L. & Wang, H. Dihydromyricetin alleviates acetaminophen-induced liver injury via the regulation of transformation, lipid homeostasis, cell death and regeneration. *Life Sci.* **227**, 20–29 (2019).
24. Xie, J. *et al.* Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice. *World J. Gastroenterol.* **21**, 5473–5481 (2015).
25. Chen, S. *et al.* Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Pharmacol. Res.* **99**, 74–81 (2015).
26. Qiu, P. *et al.* Dihydromyricetin modulates p62 and autophagy crosstalk with the Keap-1/Nrf2 pathway to alleviate ethanol-induced hepatic injury. *Toxicol. Lett.* **274**, 31–41 (2017).
27. Silva, J. *et al.* Dihydromyricetin Protects the Liver via Changes in Lipid Metabolism and Enhanced Ethanol Metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **44**, 1046–1060 (2020).
28. Zeng, Y. *et al.* Dihydromyricetin ameliorates foam cell formation via LXR α -ABCA1/ABCG1-dependent cholesterol efflux in macrophages. *Biomed. Pharmacother.* **101**, 543–552 (2018).
29. Guo, L., Zhang, H. & Yan, X. Protective effect of dihydromyricetin reverts fatty liver through nuclear factor- κ B/p53/B-cell lymphoma 2-associated X protein signaling pathways in a rat model. *Mol. Med. Rep.* **19**, 1638–1644 (2019).
30. Le, L. *et al.* Metabolomics reveals the protective of Dihydromyricetin on glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
31. Liu, T. T. *et al.* Dihydromyricetin ameliorates atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis* **262**, 39–50 (2017).
32. Gong, H., Xu, H., Li, M. & Zhang, D. Molecular mechanism and therapeutic significance of dihydromyricetin in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Pharmacol.* **935**, 175325 (2022).
33. Chen, J. *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic implications of dihydromyricetin in liver disease. *Biomed. Pharmacother.* **142**, 111927 (2021).
34. Schmajuk, G. *et al.* Identification of risk factors for elevated transaminases in methotrexate users through an electronic health record. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **66**, 1159–1166 (2014).

35. Kalantari, H., Asadmasjedi, N., Abyaz, M. reza, Mahdavinia, M. & Mohammadtaghvaei, N. Protective effect of inulin on methotrexate- induced liver toxicity in mice. *Biomed. Pharmacother.* **110**, 943–950 (2019).
36. Khalifa, M. M. A., Bakr, A. G. & Osman, A. T. Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 529–535 (2017).
37. Aladaileh, S. H. *et al.* Formononetin upregulates nrf2/ho-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats. *Antioxidants* **8**, (2019).
38. Arab, H. H., Salama, S. A. & Maghrabi, I. A. Camel milk attenuates methotrexate-induced kidney injury: Via activation of PI3K/Akt/eNOS signaling and intervention with oxidative aberrations. *Food Funct.* **9**, 2661–2672 (2018).
39. Mahmoud, A. M. *et al.* Commiphora molmol protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 499–509 (2018).
40. Alfwuaires, M. A. Galangin mitigates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in a rat model of methotrexate hepatotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **29**, 20279–20288 (2022).
41. Dar, A. A. *et al.* The protective role of luteolin against the methotrexate-induced hepato-renal toxicity via its antioxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **40**, 1194–1207 (2021).
42. Mehra, L. *et al.* In-vitro and in-vivo functional observation studies to establish therapeutic potential of alpha-ketoglutarate against methotrexate induced liver injury. *Biomed. J.* **44**, 611–619 (2021).
43. Fouad, A. A., Hafez, H. M. & Hamouda, A. A. H. Hydrogen sulfide modulates IL-6/STAT3 pathway and inhibits oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rat model of methotrexate hepatotoxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **39**, 77–85 (2020).
44. Li, Z. *et al.* Dihydromyricetin Alleviates Pulmonary Fibrosis by Regulating Abnormal Fibroblasts Through the STAT3/p-STAT3/GLUT1 Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
45. Sherif, I. O. & Al-Shaalan, N. H. Hepatoprotective effect of Ginkgo biloba extract against methotrexate-induced hepatotoxicity via targeting STAT3/miRNA-21 axis. *Drug Chem. Toxicol.* **45**, 1723–1731 (2022).
46. Morsy, M. A., Abdel-Latif, R., Hafez, S. M. N. A., Kandeel, M. & Abdel-Gaber, S. A. Paeonol Protects against Methotrexate Hepatotoxicity by Repressing Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis-The Role of Drug Efflux Transporters. *Pharmaceuticals (Basel)*. **15**, (2022).
47. Abd El-Ghafar, O. A. M. *et al.* Hepatoprotective effect of acetovanillone against methotrexate hepatotoxicity: Role of Keap-1/Nrf2/ARE, IL6/STAT-3, and NF-κB/AP-1 signaling pathways. *Phytother. Res.* **36**, 488–505 (2022).
48. Dogra, A. *et al.* Glabridin ameliorates methotrexate-induced liver injury via attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Life Sci.* **278**, 119583 (2021).
49. Bu, T. *et al.* Hepatoprotective effect of rhein against methotrexate-induced liver toxicity. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 266–273 (2018).

50. Abdelaziz, R. M., Abdelazem, A. Z., Hashem, K. S. & Attia, Y. A. Protective effects of hesperidin against MTX-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **393**, 1405–1417 (2020).
51. Wan, Z. *et al.* Hepatoprotective effect of gentiopicroside in combination with leflunomide and/or methotrexate in arthritic rats. *Life Sci.* **265**, (2021).
52. Soliman, M. M. *et al.* The ameliorative impacts of Moringa oleifera leaf extract against oxidative stress and methotrexate-induced hepato-renal dysfunction. *Biomed. Pharmacother.* **128**, 110259 (2020).
53. Yang, J. Y. *et al.* The PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways are involved in the protective effects of Lithocarpus polystachyus (sweet tea) on APAP-induced oxidative stress injury in mice. *RSC Adv.* **10**, 18044–18053 (2020).
54. Zheng, Y., Wang, J., Zhao, T., Wang, L. & Wang, J. Modulation of the VEGF/AKT/eNOS signaling pathway to regulate liver angiogenesis to explore the anti-hepatic fibrosis mechanism of curcumin. *J. Ethnopharmacol.* **280**, 114480 (2021).
55. Pugazhenthi, S. *et al.* Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 10761–10766 (2000).
56. Jayasuriya, R. *et al.* Targeting Nrf2/Keap1 signaling pathway by bioactive natural agents: Possible therapeutic strategy to combat liver disease. *Phytomedicine* **92**, 153755 (2021).
57. Al-khawalde, A. A. marddyah A. *et al.* Punicalagin Protects against the Development of Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice via Activating Nrf2 Signaling and Decreasing Oxidative Stress, Inflammation, and Cell Death. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
58. Sun, J. *et al.* Liver-specific Nrf2 deficiency accelerates ethanol-induced lethality and hepatic injury in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **426**, (2021).
59. Wang, Z. *et al.* Nrf2-mediated liver protection by 18 β -glycyrrhetic acid against pyrrolizidine alkaloid-induced toxicity through PI3K/Akt/GSK3 β pathway. *Phytomedicine* **102**, 154162 (2022).
60. Goudarzi, M., Kalantar, M., Sadeghi, E., Karamallah, M. H. & Kalantar, H. Protective effects of apigenin on altered lipid peroxidation, inflammation, and antioxidant factors in methotrexate-induced hepatotoxicity. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **394**, 523–531 (2021).
61. Azadnasab, R., Kalantar, H., Khorsandi, L., Kalantari, H. & Khodayar, M. J. Epicatechin ameliorative effects on methotrexate-induced hepatotoxicity in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **40**, S603–S610 (2021).
62. Fan, X. *et al.* Drug interaction study of flavonoids toward OATP1B1 and their 3D structure activity relationship analysis for predicting hepatoprotective effects. *Toxicology* **437**, 152445 (2020).
63. Masuo, Y. *et al.* 6-Hydroxyindole is an endogenous long-lasting OATP1B1 inhibitor elevated in renal failure patients. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **35**, 555–562 (2020).
64. Kiander, W. *et al.* Functional in vitro characterization of SLCO1B1 variants and simulation of the clinical pharmacokinetic impact of impaired OATP1B1 function. *Eur. J. Pharm. Sci.* **176**, 106246 (2022).
65. Osman, A. T., Sharkawi, S. M. Z., Hassan, M. I. A., Abo-youssef, A. M. & Hemeida, R. A. M. Empagliflozin and neohesperidin protect against methotrexate-induced renal

- toxicity via suppression of oxidative stress and inflammation in male rats. *Food Chem. Toxicol.* **155**, 112406 (2021).
66. Chauhan, P. *et al.* Protective effects of Glycyrrhiza glabra supplementation against methotrexate-induced hepato-renal damage in rats: An experimental approach. *J. Ethnopharmacol.* **263**, 113209 (2020).
 67. Elsayy, H., Alzahrani, A. M., Alfwuaires, M., Abdel-Moneim, A. M. & Khalil, M. Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. *Biomed. Pharmacother.* **143**, 112180 (2021).
 68. Li, Z. *et al.* Dihydromyricetin Alleviates Pulmonary Fibrosis by Regulating Abnormal Fibroblasts Through the STAT3/p-STAT3/GLUT1 Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **13**, 1–15 (2022).
 69. Pan, J., Shi, M., Guo, F., Ma, L. & Fu, P. Pharmacologic inhibiting STAT3 delays the progression of kidney fibrosis in hyperuricemia-induced chronic kidney disease. *Life Sci.* **285**, 119946 (2021).
 70. Arab, H. H. *et al.* Targeting inflammation, autophagy, and apoptosis by troxerutin attenuates methotrexate-induced renal injury in rats. *Int. Immunopharmacol.* **103**, 108284 (2022).
 71. Hassanein, E. H. M., Shalkami, A. G. S., Khalaf, M. M., Mohamed, W. R. & Hemeida, R. A. M. The impact of Keap1/Nrf2, P 38 MAPK/NF- κ B and Bax/Bcl2/caspase-3 signaling pathways in the protective effects of berberine against methotrexate-induced nephrotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 47–56 (2019).
 72. Dalaklioglu, S., Genc, G. E., Aksoy, N. H., Akcit, F. & Gumuslu, S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum. Exp. Toxicol.* **32**, 662–671 (2013).
 73. Wang JT, Jiao P, Zhou Y, Liu Q. Protective Effect of Dihydromyricetin Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury in a Rat Model. *Med Sci Monit.* 2016 Feb 11;22:454-9. doi: 10.12659/msm.897076. PMID: 26866356; PMCID: PMC4754091.
 74. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017 May 1;524:13-30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27789233.
 75. Weber D, Davies MJ, Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol.* 2015 Aug;5:367-380. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.005. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26141921; PMCID: PMC4506980.
 76. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology.* 2000 May;47(2-3):247-57. doi: 10.1016/s0162-3109(00)00189-2. PMID: 10878292.
 77. Nikiphorou E, Konan S, MacGregor AJ, Haddad FS, Young A. The surgical treatment of rheumatoid arthritis: a new era? *Bone Joint J.* 2014 Oct;96-B(10):1287-9. doi: 10.1302/0301-620X.96B10.34506. PMID: 25274910.
 78. Liu D, Mao Y, Ding L, Zeng XA. Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci Technol.* 2019 Sep;91:586-

597. doi: 10.1016/j.tifs.2019.07.038. Epub 2019 Jul 25. PMID: 32288229; PMCID: PMC7127391.
79. Hagos, Yohannes, and Natascha A. Wolff. 2010. "Assessment of the Role of Renal Organic Anion Transporters in Drug-Induced Nephrotoxicity" *Toxins* 2, no. 8: 2055-2082. <https://doi.org/10.3390/toxins2082055>
80. Xiaoqing Fan, Jie Bai, Minwan Hu, Yanxia Xu, Shengyu Zhao, Yanhong Sun, Baolian Wang, Jinping Hu, Yan Li, Drug interaction study of flavonoids toward OATP1B1 and their 3D structure activity relationship analysis for predicting hepatoprotective effects, *Toxicology*, Volume 437 2020
81. Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E. Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *Acta Cir Bras*. 2015 Nov;30(11):778-84. doi: 10.1590/S0102-865020150110000009. PMID: 26647798.
82. Rizk FH, Saadany AAE, Dawood L, Elkaliny HH, Sarhan NI, Badawi R, Abd-Elsalam S. Metformin ameliorated methotrexate-induced hepatorenal toxicity in rats in addition to its antitumor activity: two birds with one stone. *J Inflamm Res*. 2018 Nov 8;11:421-429. doi: 10.2147/JIR.S178767. PMID: 30519070; PMCID: PMC6233475.
83. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008 Mar 20;245(3):194-205. doi: 10.1016/j.tox.2007.11.021. Epub 2007 Dec 5. PMID: 18291570.
84. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*. 2006 Aug;12(8):BR274-8. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16865059.
85. Ezhilarasan D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology*. 2021 Jun 30;458:152840. doi: 10.1016/j.tox.2021.152840. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34175381.
86. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*. 2013 Jun;32(6):662-71. doi: 10.1177/0960327112468178. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23424212.
87. Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist*. 2016 Dec;21(12):1471-1482. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0164. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496039; PMCID: PMC5153332.
88. Ebrahimi R, Sepand MR, Seyednejad SA, Omid A, Akbariani M, Gholami M, Sabzevari O. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the I κ B α /NF κ B in rats. *Daru*. 2019 Dec;27(2):721-733. doi: 10.1007/s40199-019-00309-9. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31736017; PMCID: PMC6895372.
89. Moodi H, Hosseini M, Abedini MR, Hassanzadeh-Taheri M, Hassanzadeh-Taheri M. Ethanolic extract of *Iris songarica* rhizome attenuates methotrexate-induced liver and kidney damages in rats. *Avicenna J Phytomed*. 2020 Jul-Aug;10(4):372-383. PMID: 32850294; PMCID: PMC7430963.
90. Alturkistani HA, Abuzinadah OAH, Kelany AM, Abd El-Aziz GS, Alrafiah AR. The combined effect of honey and olive oil against methotrexate mediated hepatotoxicity in rats: A biochemical, histological and immunohistological study. *Histol Histopathol*. 2019 Dec;34(12):1313-1327. doi: 10.14670/HH-18-126. Epub 2019 May 9. PMID: 31070230.

91. Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs*. 2002;62(4):605-16. doi: 10.2165/00003495-200262040-00005. PMID: 11893229.
92. Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*. 2010 Jun;38(4):592-7. doi: 10.1177/0192623310367806. Epub 2010 May 6. PMID: 20448084.
93. Younis NS, Elsewedy HS, Shehata TM, Mohamed ME. Geraniol Averts Methotrexate-Induced Acute Kidney Injury via Keap1/Nrf2/HO-1 and MAPK/NF-κB Pathways. *Curr Issues Mol Biol*. 2021 Oct 24;43(3):1741-1755. doi: 10.3390/cimb43030123. PMID: 34889889; PMCID: PMC8929074.
94. Abo-Haded HM, Elkablawy MA, Al-Johani Z, Al-Ahmadi O, El-Agamy DS. Hepatoprotective effect of sitagliptin against methotrexate induced liver toxicity. *PLoS One*. 2017 Mar 23;12(3):e0174295. doi: 10.1371/journal.pone.0174295. PMID: 28334048; PMCID: PMC5363865.
95. Yan MK, Wang C, Wolfe R, Mar VJ, Wluka AE. Association Between Low-Dose Methotrexate Exposure and Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2022 Oct 1;158(10):1157-1166. doi: 10.1001/jamadermatol.2022.3337. PMID: 36044236; PMCID: PMC9434483.
96. Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Adhikary A, Manna K, Dey S, Sa G, Das T, Chattopadhyay S. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF-κB pathways. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec;24(12):2040-50. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.07.005. PMID: 24231097.
97. Ayman M. Mahmoud, Walaa G. Hozayen, Shimaa M. Ramadan, Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPARγ, and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 94, 2017
98. Chakraborty, D., Šumová, B., Mallano, T. *et al*. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun* **8**, 1130 (2017)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Western Blot

Σύσταση Lysis buffer (RIPA)

- 1% Triton X100: Μη ιοντικός επιφανειοδραστικός παράγοντας υπεύθυνος για την καταστροφή των λιπιδίων των μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που εντοπίζονται εντός των κυτταρικών οργανιδίων που περικλείονται από τις μεμβράνες
- 20mM Tris: Το Tris χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που υπάρχουν εντός του κυττάρου (pH 7.4-7.6)
- 150 mM NaCl: Αναστέλλει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών
- 50 mM NaF: Αναστολέας Φωσφατάσης ώστε να μην χωνευτεί το δείγμα.
- 1 mM EDTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca^{2+} με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των ασβεστιο-επαγόμενων ενζύμων
- 1 mM EGTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων Ca^{2+}
- 1 mM Glycerolphosphatase: Ανταγωνισμός των ενδογενών φωσφατασών που αποσπών φωσφορικές ομάδες από τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες
- 1% SDS: Φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση. Επιφανειοδραστικό.
- 100 mM PMSF
- Protease phosphatase inhibitors

Στο εργαστήριο παρασκευάζονται 100mL διαλύματος Lysis με την προσθήκη των στερεών σε ποτήρι ζέσεως και την προσθήκη 80mL περίπου νερού. Το διάλυμα πεχαμετρείται με HCl 2N έως το pH να φτάσει στο 7.4. Έπειτα, σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθεται όγκος νερού έως τα 100mL.

Μέθοδος Lowry

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα lysates χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Lowry, η οποία βασίζεται σε δύο χημικές αντιδράσεις. Πρώτον, στην αναγωγή των ιόντων χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζοντας σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες στο δείγμα και δεύτερον στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, που προσδίδει μπλε χρώμα στο διάλυμα.

Ως πρώτο βήμα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας διαλύματα της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA-Bovine Serum Albumin), με βάση την οποία προσδιορίστηκε η ολική πρωτεΐνη στα δείγματα. Για το σκοπό αυτό, το αρχικό διάλυμα 5μL BSA 40 mg/mL αραιώθηκε με 45 μL διαλύματος λύσης, οπότε προέκυψε τελικό διάλυμα συγκέντρωσης 4 mg/mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με το διάλυμα λύσης και δημιουργήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις BSA της καμπύλης αναφοράς: 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0 mg/mL (χωρίς BSA). Από τα διαλύματα αυτά καθώς και από τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ελήφθησαν 5 μL, που τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πλάκας. Επιπλέον, παρασκευάστηκε μείγμα των αντιδραστηρίων A+S σε αναλογία 1S:50A και προστέθηκαν 25μL σε κάθε βοθρίο. Το αντιδραστήριο A (Reagent A) είναι αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού και το αντιδραστήριο S (Reagent S) είναι επιφανειοδραστικό διάλυμα για χρωματομετρικές αναλύσεις. Ακολούθησε η προσθήκη 200μL/βοθρίο αντιδραστηρίου B (Reagent B), που είναι το αντιδραστήριο Folin. Τέλος, η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στο Infinite® 200 PRO NanoQuant Tecan στα 750 nm, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

Για την **παρασκευή των gel** υπάρχουν τα διαλύματα Stacking gel Buffer και Running gel Buffer που δημιουργούν τις κατάλληλες αναγωγικές συνθήκες και συνθήκες pH ώστε οι πρωτεΐνες να αναδιατάσσονται και να διαχωρίζονται αντίστοιχα.

Πίνακας 1: Σύσταση Stacking gel Buffer

Συστατικά	Ποσότητα
Tris Base (0.5M)	30.285g
SDS (0.4%)	2g
ddH ₂ O	q.s 500mL

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 450 mL ddH₂O και αναδεύονται. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.8 με πυκνό HCl 12N. Ακολούθως προστίθεται ddH₂O έως τα 500mL.

Πίνακας 2: Σύσταση Running gel Buffer

Συστατικά	Ποσότητα
Tris Base (1.5M)	91g

SDS (0.4%)	2g
ddH ₂ O	q.s 500mL

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 450 mL ddH₂O και αναδεύονται. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.8 με αραιό HCl 1N. Ακολούθως προστίθεται ddH₂O έως τα 500mL.

Πίνακας 3: Σύσταση των gel

Συστατικά	Running gel 13% Συνταγή για 2 gel (16 mL)	Running gel 7,5% Συνταγή για 2 gel (16 mL)	Stacking gel 5% Συνταγή για 2 gel (6 mL)
30% Polyacrylamide	6.93 mL	4 mL	1.02 mL
Running gel buffer/ Stacking Gel Buffer	4.16 mL	4.16mL	810 µL
ddH ₂ O	4.75 mL	7.68 mL	4.08 mL
10% APS	160 µL	160 µL	60 µL
TEMED	16 µL	16 µL	6 µL
8% Bromophenol blue	-	-	6 µL

Πίνακας 4: Σύσταση Running Buffer 10X

Συστατικά	Ποσότητα
Glycine	144.2 g
SDS	10 g
Tris Base	30.3 g
ddH ₂ O	q.s 1L

Για **διάλυμα running buffer 1X** 1L αραιώνονται 100 mL διαλύματος running buffer 10X σε ddH₂O έως 1L.

Η παρασκευή των gel πραγματοποιήθηκε σε ειδικά ζεύγη πλακών που αφήνουν μεταξύ τους κενό 1.5mm. Κάτω τοποθετήθηκε το running gel και αφού έπηξε προστέθηκε από πάνω του το

stacking gel και τοποθετήθηκε ειδικό πλαστικό εξάρτημα-χτενάκι (10 ή 15 θέσεων) για τη δημιουργία των κελιών-πηγαδιών. Στο stacking gel σχηματίζονται τα κελιά για να τοποθετηθούν τα δείγματα, να πακεταριστούν και να σχηματίσουν λεπτές και διακριτές μπάντες, ενώ στο το running gel επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Παρασκευάστηκαν λοιπόν stacking gel 5% και running gel 7.5% και 13% και τοποθετήθηκαν στο ειδικό tank της Western blot. Σε αυτό προστέθηκε running buffer 1X, με το οποίο καθαρίστηκαν τα κελιά από τυχόν υπολείμματα μη πολυμερισμένης πολυακρυλαμίδης (Flashing). Στο πρώτο και το τελευταίο κελί κάθε gel φορτώθηκε ο ιχνηθέτης (marker), που δηλώνει τη θέση που έχουν πρωτεΐνες συγκεκριμένου μοριακού βάρους στο gel και δίνει μια σαφή εικόνα για το διαχωρισμό τους. Αμέσως μετά φορτώθηκαν τα δείγματα, αφού πρώτα ξεπάγωσαν και φυγοκεντρήθηκαν σε υψηλές στροφές (spin down). Σε περίπτωση που υπήρχαν κενά κελιά προστέθηκε SB 1X στον ίδιο όγκο με τα δείγματα. Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία της φόρτωσης, ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση στα 80V έως ότου διαχωριστεί ο marker και συνεχίστηκε στα 130V μέχρι να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των μελετούμενων πρωτεϊνών.

Πίνακας 5: Σύσταση Transfer Buffer

Συστατικά	Ποσότητα
Glycine	14.4 g
Tris Base	3.03 g
MeOH	200 mL
ddH ₂ O	q.s 1L

Το transfer buffer παρασκευαζόταν φρέσκο κάθε φορά και αποθηκευόταν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Λίγο πριν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση ξεκίνησε η προετοιμασία του **Transportation**. Μεμβράνες PVDF 0.45 μm κόπηκαν στο μέγεθος του gel και επώστηκαν αρχικά για 10 λεπτά σε μεθανόλη με ανακίνηση για να ενεργοποιηθούν και κατόπιν σε transfer buffer. Σε γυάλινο σκεύος εντός του transfer buffer τοποθετήθηκαν οι κασέτες του transportation, τα σφουγγαράκια και 4 διηθητικά φύλλα για κάθε gel κομμένα κι αυτά στο μέγεθός του.

Μόλις ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, οι πλάκες που περιείχαν τα gel ανοίχτηκαν με προσοχή. Το stacking gel αφαιρέθηκε και το εναπομείναν gel, που περιείχε τις πρωτεΐνες, επώστηκε σε transfer buffer. Στη συνέχεια πάνω στην μαύρη πλευρά της κασέτας τοποθετήθηκαν διαδοχικά ένα σφουγγαράκι, τα 2 διηθητικά και το gel, η μεμβράνη PVDF, τα άλλα δύο διηθητικά και το δεύτερο σφουγγαράκι. Κατά την τοποθέτηση της μεμβράνης και των διηθητικών βεβαιώθηκε η απουσία φυσαλίδων, ώστε να μην υπάρξουν προβλήματα κατά τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Αυτό έγινε για κάθε gel και μετά οι κασέτες τοποθετήθηκαν στο tank μαζί με παγοκύστη εντός πάγου. Το tank πληρώθηκε με transfer buffer, ώστε να

καλύπτονται πλήρως οι κασέτες, και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα 100V για 90 λεπτά.

Πίνακας 6: Σύσταση διαλύματος TBS 10X

Συστατικά	Ποσότητα
NaCl	80 g
Tris Base	30 g
ddH ₂ O	q.s 1L

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 900mL ddH₂O και αναδεύονται. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.6 με πυκνό HCl. Ακολούθως προστίθεται ddH₂O έως 1L.

Για **διάλυμα TBS 1X** 1L αραιώνονται 100 mL διαλύματος TBS 10X σε ddH₂O έως 1L.

Πίνακας 7: Σύσταση διαλύματος TBS Tween 1X 0.1% Tween

Συστατικά	Όγκος
TBS 1X	1L
Tween 20	1 mL

Πίνακας 8: Σύσταση Stripping Buffer

Συστατικά	Όγκος
Glycine 25 mM	9 mL
SDS (10%)	1 mL
Tween 20	50 µL

Προκειμένου οι μεμβράνες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για την εμφάνιση διαφορετικής πρωτεΐνης, πλύθηκαν με διάλυμα TBS 1X 0.1% Tween και επώαστηκαν με stripping buffer για 45 λεπτά υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αφαιρεθεί το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα. Στη συνέχεια εκπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα TBS 1X 0.1% Tween και επώαστηκαν για μία ώρα σε Blocking Buffer υπό ανακίνηση. Ακολούθησε η επώασή τους με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα και η εμφάνιση των πρωτεϊνών.

Πίνακας 9:Σύσταση PBS 10X

Συστατικά	Ποσότητα
KH ₂ PO ₄	2.4g
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	26.8g
NaCl	80g

KCl	2g
ddH ₂ O	q.s 1L

Τα στερεά αντιδραστήρια προστίθενται σε όγκο 900mL ddH₂O και αναδεύονται. Ακολούθως προστίθεται ddH₂O έως 1L και αποθηκεύεται σε γυάλινο δοχείο στους 4°C.

Για **διάλυμα PBS 1X** 1L αραιώνονται 100 mL διαλύματος PBS 10X σε ddH₂O έως 1L (pH=7.4).

Πίνακας 10 : διαδικασία εκπλύσεων για kit ομοκυστεΐνης

Αναρρόφηση του προηγούμενου διαλύματος και προσθήκη 350 μl washing buffer. Παραμονή του διαλύματος στο κάθε κελί για 1 με 2 λεπτά και απομάκρυνση του με ελαφρό χτύπημα της ειδικής πλάκας. Επανάληψη της διαδικασίας όσες φορές αναγράφεται στο φύλλο οδηγιών. Η διαδικασία έκπλυσης είναι σημαντική για την ορθότητα της μεθόδου, για αυτό και η απομάκρυνση των διαλυμάτων μετά από κάθε διαδικασία πρέπει να γίνεται σχολαστικά.

Πίνακας 11 : lysis buffer για ομογενοποιημένο ιστό σε μέτρηση SOD

Συστατικά	Ποσότητα
Tris/HCL	0,1 M
Triton-X	0,5 %
β-μερκαπτοεθανόλη	5 mM
Ταμπλέτες αναστολέων πρωτεασών	2,5 tabs