



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΠΕΛΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΠΕΛΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΠΕΛΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ) : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΑΝΘΡΩΠΟΥ,

ΠΑΠΑΖΑΦΕΙΡΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΑΝΘΡΩΠΟΥ,

ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ : ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας στο Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, την κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη για την ουσιαστική συμπαράσταση, καθοδήγηση και στήριξη που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ τις Αναπλ.καθηγήτριες κ.Διδώ Βασιλακοπούλου και κ.Παναγιώτα Παπαζαφείρη για τις καίριες επισημάνσεις και την καθοδήγηση που μου παρείχαν ως μέλη της Τριμελούς μου Εξεταστικής Επιτροπής. Επιπλέον, ήταν μία ευτυχής συγκυρία η συνεργασία μας με την Αναπλ.καθηγήτρια κ.Αγγελική Κουρουνάκη και τον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξη Ματραλή από τον τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.ΠΑ.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τη Λέκτορα κ.Ιωάννα Αγγελή καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Κίρκη Ζηκάκη για τις συμβουλές τους στη δύσκολη καθημερινότητα του εργαστηρίου. Ακόμη, ήταν χαρά μου που βρέθηκα στο ίδιο εργαστήριο με την καλή φίλη και συνάδελφο του Μεταπτυχιακού μας Τζούλια Τρυφωνίδη η οποία με στήριξε και με βοήθησε ουσιαστικά σε πολλά επίπεδα.Επίσης, ευχαριστώ τις προπτυχιακές φοιτήτριες Ασπασία Καπογιαννάτου, Φένια Παρασκευοπούλου και όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους στο εργαστήριο για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Κλείνοντας, οφείλω να εκφράσω τη μεγάλη μου ευγνωμοσύνη και να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Μποδοσάκη για την οικονομική και πάνω από όλα ηθική στήριξη που μου προσέφερε απλόχερα κατά τη διάρκεια των Μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ειδικότερα, ευχαριστώ πολύ τους γραμματείς κ.Σ.Αγανόπουλο, κ.Ι.Μαθιουδάκη καθώς και την κ.Ε.Δέτση. Χωρίς αυτή την ανεκτίμητη στήριξη που μου παρείχαν δεν θα είχα καταφέρει όχι να ολοκληρώσω αλλά ούτε καν να αρχίσω αυτό τον κύκλο σπουδών.Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου καθώς και στον π.Στ.Αναγνωστόπουλο για τις συμβουλές,την ατέλειωτη αγάπη και την υπομονή τους.Τους χρωστάω τα πάντα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

(σελ.)

ΚΕΦ. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ.....	1
1.2. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases).....	2
1.2.1. Η υποοικογένεια ERKs (Extracellular Regulated Kinases).....	3
1.2.2 Η υποοικογένεια JNKs.....	5
1.3 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ c-Jun.....	7
1.3.1. Ο c-Jun ως μέλος του συμπλόκου AP-1.....	7
1.3.2. Ρύθμιση της ενεργότητας του c-Jun.....	8
1.4. Το ένζυμο Πολυμεράση της πολύ(ADP)ριβόζης/PARP.....	9
1.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΙ ΜΥΕΣ.....	10
1.5.1. Σχέση Οξειδωτικού στρες & Μυοπαθειών.....	11
1.5.1.α. Μυικές ατροφίες και Οξειδωτικό στρες.....	11
1.5.1.β. Μυικές Δυστροφίες και Οξειδωτικό Στρες.....	13
1.5.2. Το H₂O₂ (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) ως επαγωγέας συνθηκών οξειδωτικού στρες.....	14
1.5.3. Η Κουρκουμίνη ως επαγωγέας συνθηκών οξειδωτικού στρες.....	16
1.6 ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	18
1.6.1 Άμεσες δράσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων.....	18
1.6.1.α. Παρεμπόδιση της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών.....	18
1.6.1.β. Απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών μέσω αντιδράσεων αναγωγής.....	18
1.6.1.γ. Επιδιόρθωση των Οξειδωτικών Βλαβών.....	20

1.6.2 Έμμεσες δράσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων.....	21
1.6.2.α. Τροποποίηση της Μεταγωγής του Σήματος.....	21
1.6.2.β. Τροποποίηση Μεταγραφικών Παραγόντων & αλλαγή της Γονιδιακής Έκφρασης.....	22
1.7 ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	24
1.7.1 Η αντιοξειδωτική δράση της Μελατονίνης.....	25
1.7.1.α : Άμεσες δράσεις της Μελατονίνης.....	25
1.7.1.β. Έμμεσες Δράσεις της Μελατονίνης-Τροποποίηση της Μεταγωγής του Σήματος.....	26
1.7.2 Η Αντιοξειδωτική Δράση του ενζύμου Καταλάση.....	27
1.7.3. Η Αντιοξειδωτική & Προοξειδωτική Δράση του Ουρικού Οξέος.....	29
1.8. ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	30
1.8.1 Η Αντιοξειδωτική Δράση της Κουρκουμίνης.....	30
1.8.2. Η Αντιοξειδωτική & Προοξειδωτική Δράση του Ασκορβικού Οξέος (Βιταμίνη-c).....	33
1.8.3 Η Αντιοξειδωτική Δράση της Ρεσβερατρόλης.....	33
1.8.4 Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Δράσης των Νεοσυντιθέμενων Χημικών Ενώσεων Βενζοξασζίνη AK-AM1 & Βενζοθειαζίνη AK-AM2.....	34
ΚΕΦ.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1.ΥΛΙΚΑ.....	37
2.1.1. Βιολογικό υλικό.....	37
2.1.2.Βιοχημικά αντιδραστήρια.....	37
2.1.2.α. Συντήρηση κυτταροκαλλιιεργειών.....	37

2.1.2.β. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....	38
2.1.2.γ. Ανάλυση κατά Western.....	38
2.1.2.δ. Για τη χρώση Hoechst.....	39
2.1.2.ε. Παράγοντες επίδρασης.....	39
2.1.2.στ. Ομογενοποίηση.....	40
2.1.2.ζ. Μέθοδος Bradford.....	40
2.1.2.η. Υλικό εμφάνισης.....	40
2.1.2.θ. Όργανα.....	41
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες.....	42
2.2.1.α. Γενικά στοιχεία-Βασικοί τρόποι αποφυγής μολύνσεων.....	42
2.2.1.β. Συντήρηση & Ανακαλλιέργεια των κυττάρων.....	43
2.2.1.γ. Ψύξη & απόψυξη των κυττάρων.....	44
2.2.1.δ. Προετοιμασία τρυβλίων για επιδράσεις.....	46
2.2.1.ε. Πειραματικές συνθήκες.....	46
2.2.2.α Ομογενοποίηση των κυττάρων & απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών οι οποίες θα μελετηθούν με ανάλυση κατά Western.....	47
2.2.2.β. Υποκυτταρική κλασμάτωση-Ομογενοποίηση των κυττάρων & διαχωρισμός πυρηνικών & κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες θα μελετηθούν με ανάλυση κατά Western.....	48

2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	50
2.2.4. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	51
2.2.5. Ημίστεγνη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	54
2.2.6. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau.....	55
2.2.7. Ανάλυση κατά Western.....	55
2.2.8. Αποκόλληση ανοσοσυμπλόκων από τη νιτροκυτταρίνη (stripping).....	57
2.2.9. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....	57
2.2.10. Εκτίμηση του προτύπου κυτταρικής επιβίωσης ύστερα από χρώση με Hoechst και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.....	59
2.2.11. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων & Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	60
ΚΕΦ.3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ.....	62
3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ.....	64
3.2.1 Δοσοεξαρτώμενη προεπώση με Κουρκουμίνη.....	64
3.2.2 Δοσοεξαρτώμενη Προεπώση με Ρεσβερατρόλη.....	65
3.2.3 Δοσοεξαρτώμενη προεπώση με τη Βενζοξαζίνη AK-AM1.....	67
3.2.4 Δοσοεξαρτώμενη προεπώση με τη Βενζοθειαζίνη AK-AM2.....	69
3.2.5 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη, AK-AM1, AK-AM2, μελατονίνη, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ & καταλάση έναντι του H ₂ O ₂	71

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ.....	73
3.3.1. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των ERKs.....	73
3.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των JNKs.....	78
3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ.....	80
3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ & ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ.....	82
3.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ.....	84
3.6.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό ενεργοποίησης των ERKs.....	84
3.6.2 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό ενεργοποίησης των JNKs.....	86
3.6.3. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs.....	87
3.6.4. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των JNKs.....	89
3.6.5. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση του c-Jun.....	90

3.7 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΘΩΣ & ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	93
3.7.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό πρωτεόλυσης του PARP-1.....	93
3.7.2. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Χρώση πυρήνων με Hoechst & παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.....	95
3.8 ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	105
ΚΕΦ.4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	106
4.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ.....	106
4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H ₂ O ₂ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ.....	107
4.2.1 Δοσοεξαρτώμενη προεπάση με κουρκουμίνη.....	108
4.2.2. Δοσοεξαρτώμενη προεπάση με Ρεσβερατρόλη.....	108
4.2.3 Δοσοεξαρτώμενη προεπάση με τη Βενζοξαζίνη AK-AM1 & τη Βενζοθειαζίνη AK-AM2....	110
4.2.4 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη, AK-AM1, AK-AM2, μελατονίνη, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ & καταλάση έναντι του H ₂ O ₂	112
4.3. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ ενεργοποίηση των κινασών ERKs & JNKs.....	115

4.4. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων μελατονίνη (15μM), καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.....	118
4.5. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων μελατονίνη (15μM), καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη & το H ₂ O ₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.....	120
4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ.....	121
4.6.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των κινασών ERKs & JNKs....	121
4.6.2. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs.....	123
4.6.3. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των JNKs.....	125
4.6.4. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση του c-Jun.....	127
4.7 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΘΩΣ & ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	128
4.7.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό πρωτεόλυσης του PARP-1.....	128
4.7.2. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.....	129
ΚΕΦ.5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	

ΚΕΦ. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

Με τον όρο μεταγωγή σήματος εννοούμε το σύνολο των κυτταρικών διεργασιών μέσω των οποίων ένα ερέθισμα φυσικής ή χημικής φύσεως ενεργοποιεί συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς που έχουν ως αποτέλεσμα μία αντίστοιχη κυτταρική απόκριση.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν και αποκρίνονται σε μία μεγάλη ποικιλία βιολογικών σημάτων-πληροφοριών είτε εξωκυτταρικής είτε ενδοκυτταρικής προέλευσης (Cuadrado και Nebreda, 2010). Τα μονοπάτια της μεταγωγής του σήματος στην περίπτωση εξωκυττάρων ερεθισμάτων χαρακτηρίζονται από τα εξής βασικά στάδια: 1) σύνδεση σήματος-υποδοχέα , 2) ενεργοποίηση του υποδοχέα , 3) ενεργοποίηση ενδιάμεσων μεταγωγέων του σήματος , 4) ενεργοποίηση τελεστών (κατά κανόνα μεταγραφικοί παράγοντες που τροποποιούν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης ώστε το κύτταρο να προσαρμοσθεί στις νέες συνθήκες) , 5) κυτταρική απόκριση και ακολούθως καταστολή του σήματος.

Οι υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα ή ακόμη και στον πυρήνα και προσδέονται εκλεκτικά και αντιστρεπτά με τα βιολογικά μόρια (προσδέτες/ligands). Η σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα προκαλεί στη συνέχεια έναν καταρράκτη βιοχημικών αντιδράσεων (κατά κανόνα φωσφορυλιώσεις και πρωτεολύσεις) με σκοπό την ενεργοποίηση πρωτεϊνών-τελεστών και τελικά την αλλαγή της κυτταρικής απόκρισης (Kyriakis και Avruch 2001).

Τα ένζυμα εκείνα που καταλύουν την προσθήκη φωσφορικών ομάδων ονομάζονται κινάσες και διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις κινάσες Tyr (καταλύουν την προσθήκη φωσφορικών ομάδων σε κατάλοιπα τυροσίνης) και τις κινάσες Ser/Thr (καταλύουν την προσθήκη φωσφορικών ομάδων σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης). Αντίστοιχα, τα ένζυμα που καταλύουν την απομάκρυνση φωσφορικών ομάδων καλούνται φωσφατάσες και διακρίνονται πάλι σε φωσφατάσες Tyr και φωσφατάσες Ser/Thr. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ειδικά οι διαδοχικές φωσφορυλιώσεις και αποφωσφορυλιώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της ενεργότητας (ενεργοποίηση ή καταστολή) ποικιλίας πρωτεϊνικών υποστρωμάτων και γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο κατέχουν κομβικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος.

Μάλιστα, η λειτουργική ισορροπία ανάμεσα στα διάφορα πρωτεϊνικά μέλη των κινασών και των φωσφατασών είναι καθοριστική για την ειδικότητα, την ένταση αλλά και τη διάρκεια του βιολογικού σήματος (Roux και Blenis, 2004, Kyriakis και Avruch, 2001).

1.4. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases)

Όπως προαναφέραμε, τα ένζυμα που καταλύουν είτε την προσθήκη είτε την απομάκρυνση φωσφορικών ομάδων σε άλλα πρωτεϊνικά υποστρώματα κατέχουν κομβικό ρόλο στους μηχανισμούς μεταγωγής του σήματος. Μία από τις σπουδαιότερες οικογένειες τέτοιων πρωτεϊνών αποτελούν και οι ενεργοποιούμενες από τα μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) η ενεργοποίηση των οποίων συμβάλλει καθοριστικά στην πραγματοποίηση σημαντικότερων κυτταρικών διεργασιών όπως η αύξηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος –απόπτωση (Pearson και συν., 2001).

Η οικογένεια αυτή διακρίνεται περαιτέρω σε τρεις καλύτερα μελετημένες υποοικογένειες: την υποοικογένεια των ERKs, την υποοικογένεια των JNKs και την υποοικογένεια των p38-MAPKs.

Οι ERKs (κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα με δύο κύριες ισομορφές, την ERK1 και την ERK2) ενεργοποιούνται κυρίως από μιτογόνα και αυξητικούς παράγοντες και έχουν περισσότερο κυτταροπροστατευτικό ρόλο. Αντίθετα, οι p38-MAPKs (με 5 διακριτές ισομορφές τις α , β , β_2 , γ , δ) και οι JNKs (κινάσες του αμινοτελικού άκρου του c-Jun) ομαδοποιούνται συχνά σε μία κατηγορία και χαρακτηρίζονται ως κινάσες ενεργοποιούμενες από το στρες (Chang και Karin., 2001).

Σύμφωνα με τα όσα επισημάνθηκαν προηγουμένως, τα μονοπάτια της μεταγωγής του σήματος είναι ουσιαστικά καταρράκτες βιοχημικών αντιδράσεων, έτσι και στην περίπτωση των MAPKs έχουμε μία σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση τους. Οι ενεργές/φωσφορυλιωμένες MAPKs φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους μία μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνικών υποστρωμάτων προκειμένου να τροποποιηθεί κατάλληλα η σχετιζόμενη κυτταρική απόκριση.

Τέλος, η καταστολή του σήματος επιτυγχάνεται μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης κατά τον οποίο η απενεργοποίηση (αποφωσφορυλίωση) των MAPKs καταλύεται από ειδικές

φωσφατάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από τις ίδιες τις MAPKs (Tamura και συν., 2002). Ειδικότερα, μπορούμε να διακρίνουμε σε αυτήν την πορεία πέντε βασικά στάδια:

1) Αρχικά σηματοδοτικά μόρια που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη (π.χ. η πρωτεΐνη Ras που προσδένει GTP) οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης των κινασών MAPKKKs (κινάσες των MAPKKs) / MEKKs (Cowan και Storey, 2003, Kyriakis και Avruch, 2001).

2) Οι ενεργές/φωσφορυλιωμένες MAPKKs είναι κινάσες Ser/Thr (σερίνης-θρεονίνης) που ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τις κινάσες MAPKKs/MEKs.

3) Οι ενεργές/φωσφορυλιωμένες MAPKKs (κινάσες των MAPKs) /MEKs είναι αυτές που τελικά ενεργοποιούν πάλι μέσω φωσφορυλίωσης τις MAPKs. Ειδικότερα, οι MAPKKs αναγνωρίζουν ένα συντηρημένο μοτίβο Thr-X-Tyr (θρεονίνη-οποιοδήποτε αμινοξύ-τυροσίνη) που βρίσκεται στην καταλυτική περιοχή των MAPKs και καταλύουν τη διπλή φωσφορυλίωση των τελευταίων σε θέσεις Tyr-Thr (τυροσίνης και θρεονίνης), (Hanks και Hunter., 1995).

4) Οι ενεργοποιημένες MAPKs φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους ποικιλία πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Roux και Blennis., 2004) όπως άλλες κινάσες (MKs=κινάσες ενεργοποιούμενες από τις MAPKs π.χ. RSKs [ριβωσωμικές S6 κινάσες], MSKs [ενεργοποιούμενες από τα μιτογόνα & το στρες κινάσες], MNKs [κινάσες αλληλεπιδρούσες με τις MAPKs] κ.α.) , πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι ATF1/2 [ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας ½], p53, STAT1 [μεταγωγέας σήματος & ενεργοποιητής της μεταγραφής-1] κ.α (Roux και Blennis., 2004, Lee και συν., 2002, Shi και Gaestel., 2002). Για την επίτευξη της ειδικότητας των MAPKs ως προς τα υποστρώματα που αναγνωρίζουν και φωσφορυλιώνουν σε συγκεκριμένες θέσεις, καθοριστικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς/scaffolding proteins (Tanoue και συν., 2003, Kyriakis και Avruch, 2001).

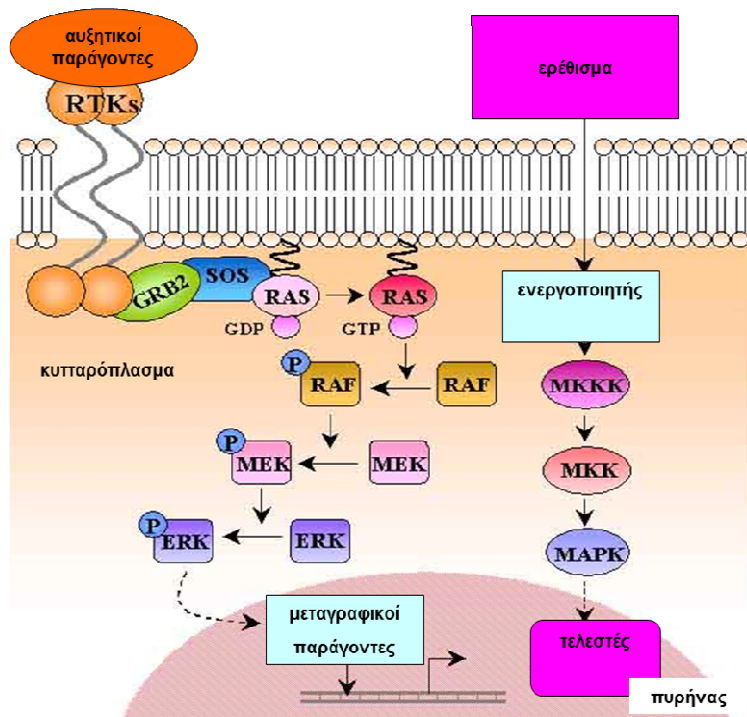
5) Τέλος, αφού ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση έχουμε καταστολή του σήματος που επάγεται σε πολλές περιπτώσεις από τις ίδιες τις MAPKs (αρνητική ανάδραση). Συγκεκριμένα, οι MAPKs ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης τις φωσφατάσες MKPs (φωσφατάσες των MAPKs) οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν/απενεργοποιούν τις MAPKs σε κατάλοιπα Tyr/Thr (τυροσίνης και θρεονίνης) αναγνωρίζοντας το συντηρημένο μοτίβο Thr-X-Tyr (θρεονίνη-οποιοδήποτε αμινοξύ-τυροσίνη) (Tamura και συν., 2002)

1.4.1. Η υποοικογένεια ERKs (Extracellular Regulated Kinases)

Η υποοικογένεια των ERKs αποτελείται από δύο βασικά μέλη την ERK1 με μοριακή μάζα 42KDa και την ERK2 με μοριακή μάζα 44 KDa. Η μεταξύ τους ομολογία αγγίζει το 85% ενώ έχουν καθολική έκφραση στα κύτταρα των μεταζώων και καίριο ρόλο στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος. Επιπλέον, στην υποοικογένεια των ERKs υπάρχει και ένα τρίτο μέλος η ERK5 με ιδιότητες όμως που τη διαφοροποιούν σε σημαντικό βαθμό από τις ERK1/2 (Turjanski και συν., 2007).

Αναφορικά με τον κυτταροβιολογικό ρόλο των ERKs, είναι αναγκαίο να διευκρινισθεί ότι η μελέτη τους, υπό στρεσογόνες για τα κύτταρα συνθήκες, έχει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν σημαντικότερους ρυθμιστές ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Γενικότερα, και σε αντίθεση με τις p38-MAPKs και τις JNKs, θεωρείται ότι οι ERKs συμμετέχουν σε αναβολικές διαδικασίες όπως η κυτταρική διαίρεση, η αύξηση και η διαφοροποίηση. Δηλαδή, φαίνεται να έχουν περισσότερο κυτταροπροστατευτικό και αντιαποπτωτικό ρόλο συμβάλλοντας έτσι στην κυτταρική επιβίωση (Cowan και Storey, 2003, Widmann και συν., 1999).

Το πρωταρχικό γεγονός στον καταρράκτη των βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση των ERKs μέσω φωσφορυλίωσης (εικ.1.1), είναι η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης (τύπου RTK/με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης π.χ. EGFR/υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα EGF ή τύπου GPCR/συζευγμένου με G πρωτεΐνες). Στη συνέχεια, ακολουθεί η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK. Η Ras είναι μια πρωτεΐνη αγκυροβολημένη στην κυτταρική μεμβράνη και έχει ενεργότητα GTPάσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται στη Ras ανταλλαγή του GDP με GTP (η οποία διευκολύνεται με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης Sos) η οποία και οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρώτης. Ακολουθεί ένας καταρράκτης διαδοχικών φωσφορυλίωσεων το τελικό αποτέλεσμα των οποίων είναι η ενεργοποίηση των ERK1/2. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργή Ras οδηγεί στην ενεργοποίηση της Raf (MAPKKK ή MEKK), (Chong και συν., 2003, Kolch και συν., 2000) η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην ενεργοποίηση των MEK1/2 (MAPKKs) οι οποίες και ενεργοποιούν τελικά τις ERKs (MAPKs), (Roux και Blennis , 2004, Khokhlatchev και συν., 1998).



Εικ.1.1: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών σταδίων του καταρράκτη των βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ERKs μέσω φωσφορυλίωσης. (Από Kabbarah και Chin., 2006)

1.2.2 Η υποοικογένεια JNKs

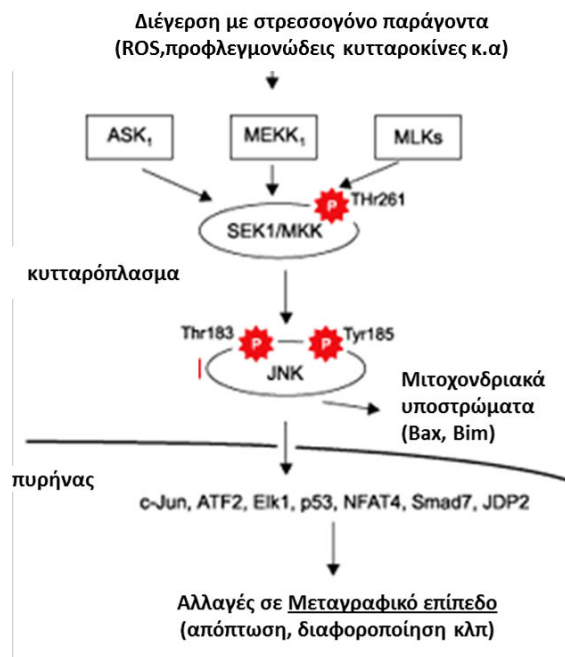
Η υποοικογένεια των JNKs (κινάσες του αμινοτελικού άκρου του c-Jun) συνιστά ακόμη μία εκ των τριών βασικών υποοικογενειών που συγκροτούν τις MAPKs και αποτελείται από δύο κύρια μέλη, την p54 και την p46-JNK. Όμοια με τις ERKs, οι JNKs ενεργοποιούνται ύστερα από αναγνώριση της αλληλουχίας θρεονίνη-προλίνη-τυροσίνη (Thr-Pro-Tyr) στη θηλιά ενεργοποίησης και διπλή φωσφορυλίωσή τους στα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης (Davis και συν., 1994). Ειδικότερα, ο καταρράκτης των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης που καταλήγει στην ενεργοποίησή τους (εικ.1.2) έχει ως εξής:

- 1) Ποικίλλες πρωτεΐνες όπως μικρές που προσδένουν GTP π.χ. Ras, Rho, ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς τύπου GPCR, πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τους υποδοχείς του TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όκων-α), οι κινάσες GCKs (κινάσες των βλαστικών κέντρων) καθώς και πολλές άλλες, φαίνεται ότι βρίσκονται αναρροϊκά αυτού του καταρράκτη και οδηγούν στην ενεργοποίηση κινασών τύπου

MAPKKK (Espagito και συν., 2001, Widmann και συν., 1999, Minden και Karin., 1997).

- 2) Κινάσες τύπου MAPKKK όπως δηλαδή οι MEKK1, 2 ή 3 ενεργοποιούν μέσω διπλής φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα θρεονίνης-σερίνης (Thr-Ser) άλλες κινάσες τύπου MAPKK όπως τις SEK1 (κινάση-4 των MAPKs), MKK7 (κινάση-7 των MAPKs) κ.α.
- 3) Οι κινάσες τύπου MAPKK ενεργοποιούν μέσω διπλής φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα θρεονίνης-τυροσίνης τις JNKs (Kyriakis και Avruch., 2001).

Μία βασική διαφορά των JNKs από τις ERKs, είναι ότι οι πρώτες ενεργοποιούνται συνήθως από στρεσογόνα ερεθίσματα π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία (Derijard και συν., 1994), ωσμωτικό στρες (Aggeli και συν., 2001, Galcheva-Gargova και συν., 1994), οξειδωτικό στρες (Kefaloyianni και συν., 2006, Miznkami και συν., 2001, Clerck και συν., 1998), ενώ οι δεύτερες συνήθως από μιτογόνα ερεθίσματα και αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, μία δεύτερη σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο σπουδαίων σηματοδοτικών πρωτεϊνών είναι ότι οι JNKs προάγουν κατά κανόνα σηματοδοτικά μονοπάτια που θα οδηγήσουν στην έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων και γενικά σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονώδης απόκριση (Li και συν., 2001, Fenerestein και Young., 2000, Widmann και συν., 1999.). Συγκεκριμένα, οι JNKs αποτελούν προλινοκατευθυνόμενες κινάσες σερίνης-θρεονίνης που ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης μία μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων όπως άλλες κινάσες ή μεταγραφικούς παράγοντες. (Davis και συν., 1994). Οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται άμεσα από τις JNKs είναι οι συστατικές υπομονάδες του AP-1 (ενεργοποιός πρωτεΐνη-1), ATF-2 και c-Jun (εξαρτώμενος από τις JNKs μεταγραφικός παράγοντας). Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι οι JNKs μπορούν να απενεργοποιηθούν μέσω αποφωσφορυλίωσης από ειδικές φωσφατάσες όπως οι DSP M3/6 (φωσφατάσες διπλής ειδικότητας τύπου M3/6), MKP 4 & 5 (φωσφατάσες 4 & 5 των MAPKs) κ.α. (Camps και συν., 1999).



Εικ.1.2: Διαγραμματική απεικόνιση των βασικών σταδίων του καταρράκτη των βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των JNKs μέσω φωσφορυλίωσης καθώς και των καταρροϊκών στόχων αυτών. (Από Wang και συν., 2004)

1.3 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ c-Jun

1.3.1. Ο c-Jun ως μέλος του συμπλόκου AP-1

Η πρωτεΐνη ν -Jun ανακαλύφθηκε αρχικά σε μετασχηματισμένα κύτταρα που έφεραν μέρος του γονιδιώματος του ASV17 (ιός σαρκώματος 17), ως μία πρωτεΐνη που κατεύθυνε την έκφραση μίας άλλης ιικής πρωτεΐνης 65KDa (Bos και συν., 1988, Maki και συν., 1987). Λίγο αργότερα ανακαλύφθηκε και το ομόλογο πρωτοογκογονίδιο c-Jun σε ιστούς ανθρώπου και ποντικού (Ryder και συν., 1988, Bohmann και συν., 1987). Το πιο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι ο c-Jun συγκατακριμνιζόταν μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα c-Fos σε πειράματα ανοσοκατακρίμνησης, δίνοντας έτσι την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ενός νέου μεταγραφικού παράγοντα, του AP-1, που αποτελεί ένα ετεροδιμερές των c-Fos και c-Jun (Angel και συν., 1988., Harshman και συν., 1988., Raucher και συν., 1988α & 1988β). Τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν πολυάριθμες δημοσιεύσεις που έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 περικλείει μία πολύ μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που συγκροτούν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή (Meng και Xia., 2011). Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής δεδομένα, ο AP-1 είναι ένα διμερές αποτελούμενο εν δυνάμει από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Jun (c-Jun, JunB, JunD), της οικογένειας Fos [c-Fos, FosB, Fra1, Fra2], ATF [ATF-2, ATF-3, B-ATF, JDP1, JDP2] και MAF/μυοαπονευρωτικοί παράγοντες ινοσαρκώματος [c-MAF, MAFB, MAFA, Nrl] (Angel και Karin., 1991., Hai και συν., 1988).

Μόλις προσδεθεί στο DNA ο ενεργοποιημένος AP-1 ρυθμίζει (προάγει ή αναστέλλει) την έκφραση μίας τεράστιας ποικιλίας γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με πολλές και συχνά αντικρουόμενες κυτταρικές διεργασίες όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός, κυτταρική επιβίωση, απόπτωση, καρκινογένεση, μορφογένεση ιστών, φλεγμονή κ.α (Shaulian και Karin., 2002).

1.3.2. Ρύθμιση της ενεργότητας του c-Jun

Ο c-Jun ενεργοποιείται μέγιστα παρουσία του φορβολεστέρα TPA (12-O-τετραδεκανούλοφορβολ-13-αιθυλεστέρας) και άλλων στρεσογόνων ερεθισμάτων (Devary και συν., 1991., Quantin και Breathnach., 1988., Lee και συν., 1987). Τα ερεθίσματα αυτά προάγουν ένα καταρράκτη διαδοχικών φωσφορυλιώσεων οι οποίες οδηγούν σε ταχείες αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του c-Jun. Αυτή η φωσφορυλίωση συμβαίνει αρχικά σε προϋπάρχοντα αποθέματα του μεταγραφικού παράγοντα και είναι ανεξάρτητη της de novo πρωτεϊνοσύνθεσής του (Paravassiliou και συν., 1992., Bohmann και συν., 1990). Ο c-Jun φέρει έξι θέσεις φωσφορυλίωσης, οι τέσσερις εξ' αυτών είναι δύο αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνης (231 & 239) και δύο κατάλοιπα σερίνης (243 & 249) στο καρβοξυτελικό του άκρο και οι άλλες δύο είναι αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης (63 & 73) στο αμινοτελικό. Οι φωσφορυλιώσεις στο καρβοξυτελικό του άκρο προάγουν αναστολή της ενεργότητάς του, ενώ αντίθετα οι φωσφορυλιώσεις στο αμινοτελικό προάγουν έντονη αύξηση της ικανότητας πρόσδεσής του στο DNA (Nikolakaki και συν., 1993., Link και συν., 1992., Smeal και συν., 1991).

Οι κινάσες GSK3 (κινάση-3 της συνθέτασης του γλυκογόνου) & CKII (κινάση-2 της καζεΐνης) φωσφορυλιώνουν τον c-Jun στο καρβοξυτελικό του άκρο αναστέλλοντας έτσι την πρόσδεσή του στο DNA (Boyle και συν., 1991). Από την άλλη πλευρά οι ERKs, προάγουν έμμεσα την φωσφορυλίωση/απενεργοποίηση της GSK3, επιτρέποντας έτσι τη διατήρηση του c-Jun σε μία ενεργό κατάσταση (Meng και Xia., 2011). Από όλες τις κομβικές κινάσες, που μετέχουν στη μεταγωγή του σήματος, οι πλέον αντιπροσωπευτικές, ως προς την επαγωγή φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης του c-Jun, είναι οι JNKs. Οι κινάσες αυτές, όπως δηλώνει και το όνομά τους (κινάσες του αμινοτελικού άκρου του c-Jun), φωσφορυλιώνουν τον c-Jun στις σερίνες 63 & 73, αφού προηγουμένως έχουν προσδεθεί σε μία κατάλληλη θηλιά trans ενεργοποίησης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα (Kyriakis και συν., 1994., Derijard και συν., 1994., Hibi και συν., 1993).

1.4. Το ένζυμο Πολυμεράση της πολύ(ADP)ριβόζης/PARP

Η πολύ(ADP)ριβοζυλίωση είναι ένα γεγονός απαραίτητο για τη διατήρηση της γενόμικης σταθερότητας σε καταστάσεις στρες που οδηγούν στη δημιουργία θραύσεων στη μία έλικα του DNA/SSBs (Sallmann και συν., 2000). Αυτά τα πολυμερή της (ADP)ριβόζης/PARs συντίθενται από μία οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται PARPs και χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα το NAD⁺, απελευθερώνοντας τελικά (ADP)ριβόζη και νικοτιναμίδιο (Hassa και συν., 2006). Η οικογένεια αυτή αριθμεί 17 μέλη με διαφορετικές δομές και λειτουργίες και ο κυριότερος εκπρόσωπός της είναι ο PARP-1 (Ame και συν., 2004). Ο PARP-1 φέρει τρεις κύριες επικράτειες : α) μία καταλυτική επικράτεια (54 KDa) στο καρβοξυτελικό του άκρο, β) μία επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (46 KDa) στο αμινοτελικό του άκρο με δύο δάχτυλα ψευδαργύρου (Zn) και γ) μία ενδιάμεση επικράτεια (22 KDa) αυτοτροποποίησης (D'Amours και συν., 1999).

Παρουσία μέτριων συνθηκών στρες π.χ. μεταβολικού στρες, υπερϊόδους ακτινοβολίας κ.α που δημιουργούν SSBs (θραύσεις στη μία αλυσίδα) στο DNA παρατηρείται άμεση ενεργοποίηση του PARP-1 ο οποίος και προσθέτει με ομοιοπολική σύνδρεση PARs σε μία μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών-στόχων οι οποίες εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην επιδιόρθωση του DNA (Hassa και συν., 2006). Σε αυτές τις πρωτεΐνες-στόχους συμπεριλαμβάνονται διάφορες ισομορφές των ιστονών, μεταγραφικοί παράγοντες αλλά και ο ίδιος ο PARP-1 (Heeres και Hergentrother., 2007). Τα PARs λειτουργούν τελικά ως ένα σήμα προσέγκυσης των κλασικών ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA όπως η DNA λιγάση III, η DNA πολυμεράση II κ.α (Isabelle και συν., 2010). Ωστόσο, όταν οι συνθήκες του στρες γίνουν πολύ ισχυρές η υπερενεργοποίηση του PARP ενδέχεται να οδηγήσει σε εξάντληση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων του NAD⁺ (δινουκλεοτίδιο της νικοτιναμιδοαδενίνης) προάγοντας έτσι έμμεση αναστολή της γλυκόλυσης και τελικά εξάντληση και των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων του ATP [τριφωσφορική αδενοσίνη] (Berger και συν., 1983). Το γεγονός αυτό αυξάνει έχει ως αποτέλεσμα να οδηγείται το κύτταρο σε νέκρωση και όχι στον ενεργειακό δαπανηρό αποπτωτικό θάνατο (Nagele και συν., 1995). Προκειμένου να αποφευχθεί η νέκρωση, καθώς είναι μία λιγότερο ελεγχόμενη διαδικασία που σε επίπεδο οργανισμού οδηγεί σε εντονότερα φαινόμενα φλεγμονής και αυτοανοσίας, τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση με παράλληλη πρωτεολυτική απενεργοποίηση του PARP-1 (Heeres και Hergentrother., 2007). Για το λόγο αυτό ο PARP-1 αποτελεί το χαρακτηριστικότερο

υπόστρωμα των κασπασών-3 & -7, καθώς και άλλων πρωτεασών που προάγουν των αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο π.χ. καλπαΐνες (Chaitanya και συν., 2010). Μάλιστα, η πρωτεόλυση του PARP από την κασπάση-3 οδηγεί στην απελευθέρωση δύο θραυσμάτων (89 & 24 KDa) η ανίχνευση των οποίων αποτελεί έναν από τους βασικότερους δείκτες της ύπαρξης αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Margolin και συν., 1997., Lazebnik και συν., 1994). Το θραύσμα των 89 KDa περιέχει την καταλυτική επικράτεια και μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Soldani και συν., 2001), ενώ το θραύσμα των 24 KDa παραμένει προσδεδωμένο στο DNA και λειτουργεί ως αναστολέας όχι μόνο του ακέραιου PARP-1 αλλά και πολλών άλλων ενζύμων που εμπλέκονται στην ενεργειακά δαπανηρή διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (D'Amours και συν., 2001., Alvarez-Gonzalez και συν., 1999).

1.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΙ ΜΥΕΣ

Με τον όρο οξειδωτικό στρες εννοούμε οποιαδήποτε ανισοροπία μεταξύ της παρουσίας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ή αζώτου (RNS) και της ικανότητας αντιμετώπισής τους από ένα βιολογικό σύστημα (Seddon και συν., 2006). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου περικλείουν δύο ευρείες κατηγορίες μορίων που είναι αφενός τα μόρια που δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια π.χ. H_2O_2 (υπεροξειδίο του υδρογόνου), μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen/ 1O_2), οργανικά υδροϋπεροξειδία (ROOH) κ.α και αφετέρου, οι δραστικότερες ελευθερές ρίζες που περιέχουν ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια π.χ. υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot), οργανικές ρίζες υπεροξειδίου (ROO^\cdot), αλκόξυ ρίζες (RO^\cdot) κ.α (Valko και συν., 2005 και εικόνα 1.3.1). Οι δραστικοί αυτοί παράγοντες προκαλούν όλοι αντιδράσεις οξείδωσης που μπορεί να γίνουν αλυσιδωτές και εξαιρετικά τοξικές ανάλογα με τη χημική φύση, τη συγκέντρωση και το χρόνο ημιζωής του δραστικού μορίου, την ταυτόχρονη παρουσία μεταλλικών μεταβατικών ιόντων π.χ. σιδήρου ή χαλκού (Fe^{2+} , Cu^+), συστατικών που εμπλέκονται στην οξειδοαναγωγική ανακύκλωση όπως οι κινόνες κ.α. (Rice-Evans και συν., 1995, Sies και συν., 1985).

Είναι αναγκαίο να τονισθεί ότι οι περισσότεροι από αυτούς τους δραστικούς παράγοντες δημιουργούνται φυσιολογικά από πολυάριθμες ενδοκυτταρικές πηγές (Bae και συν., 2011, Gough και Cotter., 2011) και μάλιστα αποτελούν πολύ σημαντικά δευτερά μυνήματα κατά τη μεταγωγή του σήματος (Antunes και συν., 2000). Γι'αυτό η παρουσία τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις, που διασφαλίζεται με τη δράση των πολυάριθμων ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όχι μόνο δεν είναι βλαπτική για τα κύτταρα αλλά αντίθετα

είναι απαραίτητη (Bae και συν., 2011, Forman και συν., 2007). Ωστόσο, εάν για κάποιο λόγο οι αντιοξειδωτικές άμυνες του κυττάρου είναι ανεπαρκείς ή εάν οι συνθήκες του οξειδωτικού στρες είναι πολύ ισχυρές προκαλούνται τελικά ανεπανόρθωτες βλάβες αφενός λόγω της μη αντιστρεπτής οξειδωσης λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Li και συν., 2004) και αφετέρου λόγω μη αναστρέψιμης διαταραχής των μηχανισμών μεταγωγής του σήματος (Shah και συν., 2004, Finkel και συν., 1999).

Οι σκελετικοί μύες παρουσιάζουν μία εξαιρετική ικανότητα προσαρμογής στις οξειδοαναγωγικές ανισσοροπίες (Davies και συν., 1982) επειδή καθημερινά έρχονται αντιμέτωποι με πολύ υψηλά επίπεδα ROS που οφείλονται στην έντονη οξειδωτική φωσφορύλιωση κατά τη διάρκεια της μυικής άσκησης (McArdle και συν., 2005, Jackson και συν., 1985). Όταν οι συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι σχετικά ήπιες προάγονται τελικά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση (Aggeli και συν., 2010, Kefaloyianni και συν., 2006). Αντίθετα όταν οι συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι πολύ έντονες προάγονται σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αποπτωτικά φαινόμενα (Fan και συν., 2010, Siu και συν., 2009) ή ακόμη και σε νεκρωτικές διαδικασίες και συνεπακόλουθη φλεγμονή (Barbieri και συν., 2011).

1.5.1. Σχέση Οξειδωτικού στρες & Μυοπαθειών

1.5.1.α. Μυικές ατροφίες και Οξειδωτικό στρες

Με τον όρο μυικές ατροφίες εννοούμε τις παθολογικές κατάστασεις που χαρακτηρίζονται από απώλεια των πυρήνων των μυικών ινών με παράλληλη μείωση των επιπέδων των μυοιδιακών πρωτεϊνών (Powers και συν., 2007). Η μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών οφείλεται τόσο σε αυξημένη πρωτεόλυση όσο και σε μείωση του βαθμού πρωτεϊνοσύνθεσης (Thomason και συν., 1989., Booth και συν., 1979). Η απώλεια των μυικών πυρήνων στις περιπτώσεις των μυικών ατροφιών γνωρίζουμε ότι πραγματοποιείται μέσω και των τριών γνωστών αποπτωτικών μονοπατιών, δηλαδή : α) του Σαρκοπλασματικού Δικτύου, β) των μιτοχονδριών (ενδογενές μονοπάτι) και γ) των υποδοχέων τύπου Fas και TNFR (εξωγενές), στα οποία καθοριστικό ρόλο παίζουν το είδος και τα επίπεδα των ROS (Powers και συν., 2007). Συγκεκριμένα, οι Kondo και συν., 1991 έδειξαν ότι η ακινησία του σκελετικού μύος και η συνεπακόλουθη μυική ατροφία χαρακτηρίζονταν από πολύ αυξημένα επίπεδα ROS που συνέβαλαν στην εκδήλωση μυικών τραυματισμών. Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι τα φαινόμενα μυικής ατροφίας καθυστερούσαν σημαντικά ύστερα από εξωγενή προσθήκη αντιοξειδωτικών

παραγόντων προσφέροντας έτσι μία έμμεση ένδειξη για την ύπαρξη οξειδωτικού στρες (Betters και συν., 2004., Appel και συν., 1999).

Πληθώρα ερευνών έχουν συνολικά δείξει ότι τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται λόγω του οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια των μυικών ατροφιών είναι τρία : α) των καλπαϊνών, β) των MAPKs και γ) του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Powers και συν., 2007). Ειδικότερα, οι συνθήκες οξειδωτικού στρες φαίνεται ότι προάγουν την έξοδο ιόντων ασβεστίου από το Σαρκοπλασματικό Δίκτυο τα οποία και ενεργοποιούν τις πρωτεάσες καλπαΐνες. Οι ενεργοποιημένες καλπαΐνες πρωτεολύουν/ενεργοποιούν την κασπάση-12 η οποία και ενεργοποιεί άμεσα την κασπάση-3, οδηγώντας έτσι στα τελικά στάδια της απόπτωσης (Primeau και συν., 2002). Επίσης, οι καλπαΐνες ενεργοποιούν και το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης μέσω πρωτεόλυσης του Bid προς tBid και εξόδου του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια (Chen και συν., 2002).

Όσον αφορά τις MAPKs αξίζει να επισημάνουμε ότι η ενεργοποίηση των ERKs δεν φαίνεται να σχετίζεται ιδιαίτερα με την εκδήλωση μυικών ατροφιών και μάλιστα φαίνεται να έχουν προστατευτικό ρόλο σε αυτές τις ασθένειες (Qi και συν., 2005, Pearson και συν., 2001). Αντίθετα, η ενεργοποίηση της p38-MAPK και ιδιαίτερα η ενεργοποίηση των JNKs φαίνεται ότι δυσχεραίνουν τα συμπτώματα των μυικών ατροφιών (Shen και συν., 2006).

Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι συχνά ενεργοποιημένος στις περιπτώσεις των μυικών ατροφιών ενισχύοντας τα φαινόμενα θανάτου και πρωτεόλυσης (Pontano και συν., 2006., Kabe και συν., 2005). Οι Jackman και συν., 2004 έδειξαν ότι όταν μεταβαίνει στον πυρήνα προάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος. Μάλιστα, είναι αξιοσημείωτη η ύπαρξη ειδικότητας σε διαφορετικούς τύπους μυικών ατροφιών π.χ. καχεξία και απραγία , καθώς παρατηρείται ενεργοποίηση διαφορετικών μελών της οικογένειας του NF-κB (Li και Reid., 2000., Li και Schwartz., 1998).

1.5.1.β. Μυικές Δυστροφίες και Οξειδωτικό Στρες

Με τον όρο μυικές δυστροφίες εννοούμε ένα σύνολο κληρονομικών κατά κανόνα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από σταδιακή εξασθένηση του σκελετικού μυός και θάνατο των μυικών κυττάρων (Emerg και συν., 2002). Οι δύο βασικότεροι τύποι μυικών δυστροφιών ονομάζονται Duchenne και Becker και οφείλονται στην αδυναμία του σκελετικού μυός να

εκφράσουν τη λειτουργική πρωτεΐνη δυστροφίνη ή κάποια από τις πρωτεΐνες του σχετιζόμενου με αυτήν συμπλόκου/DPC (σχετιζόμενο με τη δυστροφίνη πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο). Η δυστροφίνη είναι μία ενδοκυτταρικά εντοπιζόμενη πρωτεΐνη η οποία συνδέει τον κυτταροσκελετό της ακτίνας με την εξωκυτταρική βασική μεμβράνη μέσω ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου αποτελούμενου από σαρκογλυκάνες, δυστρογλυκάνες και άλλες πρωτεΐνες (Turner και συν., 2010).

Παρόλο που είναι πλέον σαφές ότι οι μυικές δυστροφίες χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη έκθεση του σκελετικού μυός σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ακόμη δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο το εάν το οξειδωτικό στρες είναι προαπαιτούμενο για να ξεκινήσει εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος των μυικών ινών ή αν είναι απλώς μία συνέπεια της ασθένειας (Tidball και Wehling-Henricks., 2006). Σήμερα, πολλοί δέχονται το «μοντέλο των δύο χτύπημάτων» σύμφωνα με το οποίο δεν αρκεί απλώς κάποια βλάβη στο σύστημα της δυστροφίνης (πρώτο χτύπημα) για την εκδήλωση της ασθένειας, αλλά απαιτείται και μία ακόμη σοβαρή διαταραχή της ομοιόστασης (δεύτερο χτύπημα) π.χ. ένα σοβαρό επεισόδιο ισχαιμίας προκειμένου να οδηγηθούμε σε εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο (Rando και συν., 2001).

Μία πολύ βασική αιτία αύξησης των φαινομένων οξειδωτικού στρες στις δυστροφίες είναι η παρατηρούμενη σε πολλές περιπτώσεις παντελής έλλειψη της nNOS [νευρικής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου] (που αποτελεί μέλος του DPC) από την κυτταρική μεμβράνη των σκελετικών μυών καθώς και η δραματική μείωση της συγκέντρωσής της τόσο σε επιπέδο πρωτεΐνης όσο και mRNA (Chang και συν., 1996). Το παραγόμενο από το σκελετικό μυ NO δρα συχνά ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας και έτσι η μείωση των επιπέδων του, λόγω της έλλειψης της nNOS, οδηγεί σε συσσώρευση μακροφάγων τα οποία μέσω των ROS που παράγουν λύουν τις μυικές ίνες (Nguyen και συν., 2003., Liu και συν., 1998). Επιπλέον, το NO προάγει φαινόμενα αγγειοδιαστολής τα οποία αποτρέπουν την εμφάνιση επεισοδίων ισχαιμίας στο σκελετικό μυ (Thomas και συν., 1999). Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε και την ικανότητα του NO να μειώνει τα επίπεδα του υπεροξειδικού ανιόντος μέσω αναστολής της NADPH-οξειδάσης (Clancy και συν., 1992).

1.5.2. Το H₂O₂ (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου) ως επαγωγέας συνθηκών οξειδωτικού στρες

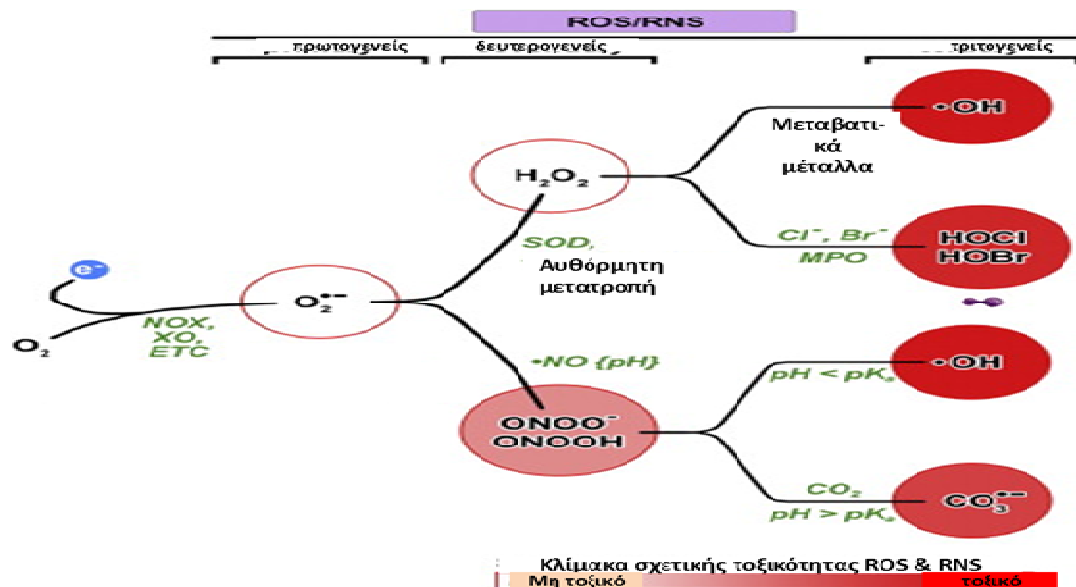
Το H₂O₂ και το υπεροξειδικό ανιόν (O₂⁻) συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον (εικ.1.3) μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου επειδή παράγονται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών κυτταρικών διαδικασιών, αποτελούν τις πρόδρομες μορφές πολλών

άλλων τύπων ελευθέρων ριζών και τέλος είναι πολύ σπουδαία δεύτερα μυνήματα κατά τη μεταγωγή του σήματος (Gough και συν., 2011). Μάλιστα επειδή το υπεροξειδικό ανιόν μετατρέπεται κατά κανόνα ταχύτατα σε H_2O_2 με τη δράση των υπεροξειδικών δισμουτασών, πολλοί ερευνητές θεωρούν το H_2O_2 ως τον κύριο εκπρόσωπο των δραστικών μορίων οξυγόνου (Fujita και συν., 2002). Οι κύριες ενδοκυτταρικές πηγές του υπεροξειδικού ανιόντος και κατ'έπекταση του H_2O_2 είναι τα σύμπλοκα I & III της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια (Poyton και συν., 2009, Chen και συν., 2003), οι μεμβρανικές NADPH οξειδάσες (Lambeth και συν., 2002), οι οξειδάσες του κυτοχρώματος p450 (Hanukoglu και συν., 2006, Zangar και συν., 2004, Gorsky και συν., 1984) και η οξειδάση της ξανθίνης (Berry και συν., 2004).

Αν και παλιότερα πιστεύαμε ότι το H_2O_2 είναι ένα πλήρως διαπερατό στις βιολογικές μεμβράνες μικρομόριο, σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτό είναι εν μέρει αληθές καθώς φαίνεται ότι οι ακουαπορίνες-3 & -8 (AQP-3 & -8) ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό την εξοκυτταρική πρόσληψή του (Miller και συν., 2010, Biener και συν., 2006). Σε κάθε περίπτωση το H_2O_2 έχει πολυάριθμους στόχους που αφορούν κυρίως τις -SH (σουλφυδριλομάδες) διάφορων πρωτεϊνών οι οποίες και οξειδώνονται (Forman και συν., 2007). Σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, αυτές οι αντιδράσεις οξειδωσης είναι αντιστρεπτές και επιφέρουν αλλαγές σε τρία επίπεδα προκαλώντας : α) απενεργοποίηση κομβικών φωσφατασών (απενεργοποιητών κινασών) όπως η PTEN (3-φωσφατάση της 3,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης), PP1 και PP2a [πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 & 2a] (Groeger και συν., 2009, Denu και συν., 1998), β) ενεργοποίηση κομβικών αναρροϊκών κινασών όπως η Src, ASK1 (κινάση-5 των MAPKKs) καθώς και μεμβρανικών υποδοχέων τύπου RTK [υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης] (Choi και συν., 2010, Giannoni και συν., 2008, Song και συν., 2003) και γ) απευθείας ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB (πυρηνικός παράγοντας κB), HIF-1a (ενεργοποιούμενος από την υποξία παράγοντας-1a), AP-1 κ.α. (Groeger και συν., 2009). Όλα αυτά τα γεγονότα σε επίπεδο σηματοδότησης έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που τελικά θα συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση (Gough και Cotter., 2011).

Αντίθετα η παρατεταμένη ή υψηλής συγκέντρωσης έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 προκαλεί μη αντιστρεπτές βλάβες τόσο από το μόριο αυτό καθ'αυτό όσο και από δευτερογενείς ελεύθερες ρίζες που παράγονται μέσω αυτού (Forman και συν., 2007). Καταρχάς οι οξειδώσεις των -SH ομάδων στα αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης γίνονται μη

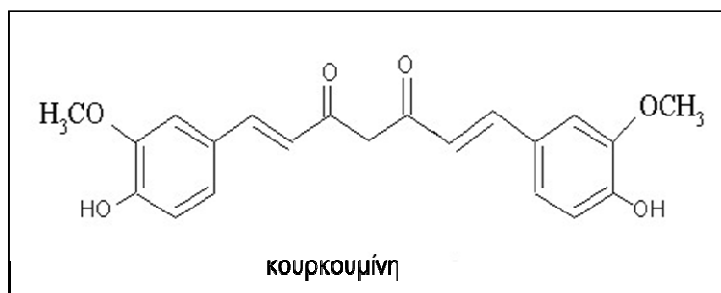
αντιστρεπτές και προάγουν τελικά τον κυτταρικό θάνατο (Tanner και συν., 2011). Επιπλέον, παρουσία μεταλλικών ιόντων το H_2O_2 δίνει γένεση σε πολύ πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες (αντίδραση Fenton), όπως οι ρίζες OH^\cdot , οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων και αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης (Hall και Bosken., 2009, Fujita και συν., 2001). Τέλος, κάτω από αυτές τις συνθήκες διαπιστώνεται έντονη ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο (Lambeth και συν., 2012, Brown και συν., 2009, Lee και συν., 2009, Groemping και συν., 2003) οι οποίες προάγουν μέσω των απελευθερούμενων H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ μία καθολική αύξηση των επιπέδων των ROS και RNS στο κύτταρο (Seddon και συν., 2007). Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ενεργοποίηση διάφορων συνθετασών του NO (Verhar και συν., 2004) καθώς και της οξειδάσης της ξανθίνης (Li και συν., 2004).



Εικ.1.3: Κύριοι τρόποι σχηματισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Το υπεροξειδικό ανιόν θεωρείται η βασική & χαμηλής δραστικότητας ελεύθερη ρίζα που δίνει γένεση σε δευτερογενή μόρια μέτριας δραστικότητας. Τα δευτερογενή μόρια μετατρέπονται με τη σειρά τους μέσω ενζυμικών (π.χ. MPO/μυελοϋπεροξειδασών) και μη ενζυμικών μηχανισμών στις τριτογενείς και πολύ τοξικές ελεύθερες ρίζες (Από Golena και συν., 2012)

1.5.3. Η Κουρκουμίνη ως επαγωγέας συνθηκών οξειδωτικού στρες

Η κουρκουμίνη [1,7-δισ(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-επταδιεν-3,5-διόνη] είναι μία χρωστική που εξάγεται από το ρίζωμα του φυτού *Curcuma longa* και παροδοσιακά χρησιμοποιείτο ως μπαχαρικό, συντηρητικό, καλλυντικό και



ως ενισχυτής του ανοσοποιητικού συστήματος (Basnet και συν., 2011). Από χημικής απόψεως, η κουρκουμίνη είναι ένα φλαβονοειδές που κατατάσσεται στις πολυφαινόλες (Galati και συν., 2002). Η χημική της φύση είναι τέτοια που τις επιτρέπει ανάλογα με τη συγκέντρωσή της και το είδος του προοξειδωτικού μορίου που πιθανά είναι παρόν να δρα άλλοτε ως προοξειδωτικός και άλλοτε ως αντιοξειδωτικός παράγοντας (Chen και συν., 2005). Συγκεκριμένα, ο ο-μεθόξυ δακτύλιός της που είναι συζευγμένος με μία α,β-δικετόνη φαίνεται ότι ενισχύει σε μεγάλο βαθμό την προοξειδωτική της δράση παρουσία μεταβατικών μετάλλων (Yoshino και συν., 2004). Ειδικότερα, οι δύο ακόρεστες καρβονυλομάδες της κουρκουμίνης είναι οι πλέον καθοριστικές για την εκδήλωση της προοξειδωτικής δράσης, καθώς η τετραϋδροκουρκουμίνη, το αηγημένο χημικό ανάλογό της, δεν παρουσιάζει προοξειδωτική δράση σε καμία περίπτωση (Atsumi και συν., 2005α).

Αν και γνωρίζουμε ότι η κουρκουμίνη ως προοξειδωτικό μόριο ελευθερώνει ποικιλία δραστικών μορφών οξυγόνου, είναι βασικό να τονισθεί ότι πολλά πράγματα παραμένουν ακόμη αδιευκρίνηστα σχετικά με το μηχανισμό δημιουργίας αυτών των μορίων (Marathe και συν., 2011). Είναι γνωστό ότι η κουρκουμίνη αποτελεί ένα πολύ λιποδιαλυτό μόριο που διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και επιπλέον επειδή είναι φλαβονοειδές μπορεί και αλληλεπιδρά πολύ καλά με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και συσσωρεύεται εκατέρωθεν αυτών (Verstraeten και συν., 2003). Σε μία πολύ σημαντική μελέτη τους οι Atsumi και συν., 2005α, έδειξαν ότι η κουρκουμίνη προάγει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την παραγωγή δραστικών μορίων οξυγόνου τα οποία συσσωρεύονται γύρω από την κυτταρική μεμβράνη και μειώνουν τη ρευστότητά της. Με χρήση κατάλληλων ειδικών αντιοξειδωτικών μορίων διαπίστωσαν την παραγωγή ριζών υδροξυλίου (OH[•]), H₂O₂ (υπεροξειδίου του υδρογόνου) και μοριακού οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης

(singlet oxygen/ $^1\text{O}_2$). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές πρότειναν έναν έμμεσο μηχανισμό απελευθέρωσής τους σύμφωνα με τον οποίο η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με τις δύο α,β ακόρεστες καρβονυλομάδες της με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, προάγοντας έτσι λιπιδική υπεροξειδωση και επακόλουθες αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης (Atsumi και συν., 2005α, Iqbal και συν., 2003, Began και συν., 1999). Οι Cui και συν., 2006, έδειξαν επίσης ότι η κουρκουμίνη αυξάνει τη συγκέντρωση ριζών υδροξυλίου (OH \cdot), υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και H_2O_2 , ενώ οι Atsumi και συν., 2005β, έδειξαν ότι η προοξειδωτική δράση της ενισχύεται από την παρουσία δισθενών μεταβατικών μετάλλων χαλκού (Cu^{2+}) και ψευδαργύρου (Zn^{2+}).

Γενικότερα, είναι γνωστό ότι η κουρκουμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις προάγει το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης και μάλιστα με μεγαλύτερη ειδικότητα στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Sandur και συν., 2007, Atsumi και συν., 2005α). Ενδοκυτταρικά, η κουρκουμίνη φαίνεται ότι μπορεί και αλληλεπιδρά με τα μιτοχονδριακά ένζυμα προάγοντας έτσι έμμεσα έντονη απελευθέρωση ROS και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Uddin και συν., 2005, Anto και συν., 2002). Ένας ακόμη έμμεσος μηχανισμός απελευθέρωσης ROS προκύπτει και λόγω της μη αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με την αναγωγή της θειορεδοξίνης η οποία και μετατρέπεται σε NADPH-οξειδάση (Fong και συν., 2005). Είναι αξιοσημείωτο το ότι η κουρκουμίνη αυτή καθ'αυτή, και σε αντίθεση με άλλα προοξειδωτικά μόρια όπως το H_2O_2 , δεν οξειδώνει αλλά αλκυλιώνει τις σουλφυδριλομάδες (-SH) των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά με ένα μηχανισμό προσθήκης κατά Michael (Linkova-Kostova και συν., 2001).

Κλείνοντας, πρέπει να επισημανθεί ότι η κουρκουμίνη οξειδώνεται και η ίδια με ένα μηχανισμό που απαιτεί την παρουσία κάποιας υπεροξειδάσης και έτσι μετατρέπεται σε μία φαινοξυλική ρίζα (Galati και συν., 2002).

1.6 ΓΕΝΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Με τον όρο αντιοξειδωτικά, σύμφωνα με τους Halliwell και Gutteridge ., 1989, εννοούμε οποιοδήποτε συστατικό, χημική ένωση ή ένζυμο, το οποίο όταν είναι παρόν σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση καθυστερεί ή και παρεμποδίζει σημαντικά την οξειδωσή του. Από αυτόν τον ορισμό, συνάγεται εύκολα το συμπέρασμα ότι η παράμετρος χαμηλή συγκέντρωση

είναι εξέχουσας σημασίας προκειμένου να εκδηλωθεί η προστατευτική δράση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα (Sies και συν., 1996).

1.6.1 Άμεσες δράσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων.

Η πλειοψηφία των αντιοξειδωτικών παραγόντων δρουν πρωταρχικά με ένα άμεσο τρόπο που μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρία επίπεδα αναχαίτησης των ελευθέρων ριζών : α) παρεμπόδιση της δημιουργίας τους, β) απενεργοποίησή τους μέσω αντιδράσεων αναγωγής και γ) επιδιόρθωση των οξειδωτικών βλαβών (Sies και συν., 1996).

1.6.1.α. Παρεμπόδιση της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών

Μία βασική στρατηγική για την παρεμπόδιση της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών είναι ο «εμφυής σχεδιασμός» ενζύμων που εγγενώς, λόγω του ρόλου που επιτελούν, είναι πολύ πιθανό να απελευθερώσουν μεγάλες ποσότητες ROS. Για παράδειγμα οι οξειδάσες του κυτοχρώματος p450 παρόλο που ανάγουν το μεγαλύτερο ποσοστό του μοριακού οξυγόνου σε νερό και περιέχουν μεταλλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου (που θεωρητικά μπορούν να επάγουν αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης), έχουν τέτοια τριτοταγή δομή ώστε απελευθερώνουν ελάχιστα ποσοστά υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) (Muramoto και συν., 2010). Τέλος, ακόμη πολύ σημαντικό επίπεδο παρεμπόδισης είναι η παρουσία πρωτεϊνών του ορού που προσδένουν μεταβατικά μεταλλικά ιόντα όπως η φερριτίνη, η σερούλοπλασμίνη κ.α, καθώς τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα και ιδίως ο χαλκός και ο σίδηρος μπορούν να πυροδοτήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης και έτσι να ενισχύσουν πολύ τα φαινόμενα οξειδωτικού στρες (Gutteridge και συν., 1986).

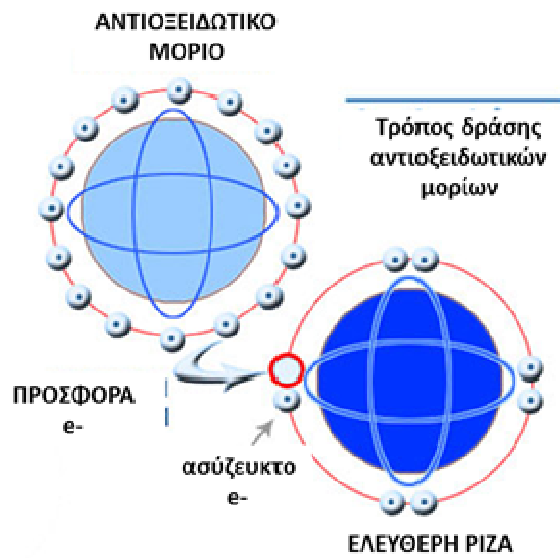
1.6.1.β. Απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών μέσω αντιδράσεων αναγωγής

Όπως είναι γνωστό, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή και περισσότερων ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Λόγω αυτών των ασύζευκτων ηλεκτρονίων, μπορούν να ξεκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης στις οποίες η ελεύθερη ρίζα οξειδώνει ένα μόριο-στόχο, αποσπώντας απ'αυτό ένα ηλεκτρόνιο, και η ίδια σταθεροποιείται, ενώ το μόριο-στόχος γίνεται τώρα αυτό ελεύθερη ρίζα που μπορεί με τη σειρά της να οξειδώσει ένα άλλο μόριο-στόχο κ.ο.κ. Τα αντιοξειδωτικά λοιπόν, τερματίζουν αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης δρώντας ως ηλεκτρονιοδότες (εικ.1.4) και επιτελώντας στην ουσία αναγωγή της ελεύθερης ρίζας (Brivida και Sies. 1994). Είναι αναγκαίο να επισημάνουμε την κρισιμότητα αυτού του σταδίου για τη δράση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα, καθώς λόγω της προσφοράς ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων

το αντιοξειδωτικό οξειδώνεται το ίδιο και ενδέχεται, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του και το είδος των εγγύς ελευθέρων ριζών, να δράσει και το ίδιο ως προοξειδωτικός παράγοντας (Schwartz και συν., 1996).

Επιπλέον, είναι βασικό να τονισθεί ότι συγκεκριμένου τύπου, από χημικής απόψεως, αντιοξειδωτικά απενεργοποιούν συγκεκριμένους αλλά όχι όλους τους τύπους των ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) καταλύει με ειδικότητα την αναγωγή του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ενώ η καταλάση την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε μοριακό οξυγόνο (O_2) και νερό (H_2O). Η βιταμίνη-ε (α-τοκοφερόλη) μπορεί να αποτρέψει αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδώσεις στις βιολογικές μεμβράνες μέσω απενεργοποίησης υπεροξειδικών ριζών ενώ τα φλαβονοειδή είναι αντιοξειδωτικά ευρέος φάσματος που μπορούν να απενεργοποιήσουν όχι μόνο υπεροξειδικές ρίζες αλλά και ρίζες υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$), (Palmer και συν., 1997).

Ένα καλό αντιοξειδωτικό μόριο θα πρέπει επιπλέον να έχει την ικανότητα, πέραν της προσφοράς ηλεκτρονίων, να απομακρύνει την ελεύθερη ρίζα από «ευαίσθητα» σημεία-στόχους προς υποκυτταρικά διαμερίσματα που παρέχουν ένα πιο ανηγμένο χημικά περιβάλλον. Γενικά αυτό σημαίνει τη μεταφορά της ελεύθερης ρίζας από ένα υδρόφοβο περιβάλλον όπως η κυτταρική μεμβράνη προς ένα υδρόφιλο όπως το κυτταρόπλασμα. Συνεπώς, ιδανικά αντιοξειδωτικά μόρια είναι αυτά που παρουσιάζουν αμφιφιλικότητα π.χ. μέσω φαινολικών δακτυλίων, ώστε να μπορούν εύκολα να αλληλεπιδρούν και με τη λιπιδική και με την υδατική φάση (Sies και Stahl., 1995).

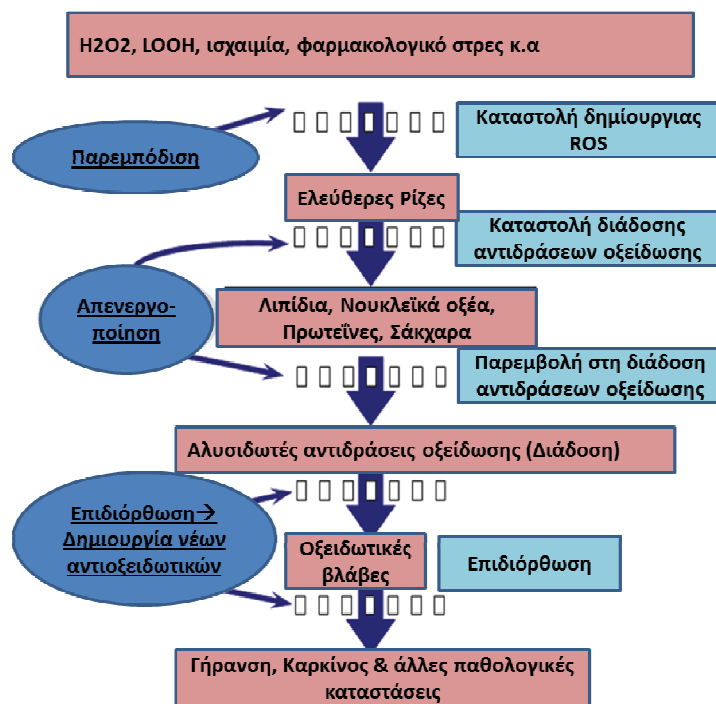


Εικ.1.4: Βασικός τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών μορίων ως αναγωγικοί παράγοντες / ηλεκτρονιοδότες

1.6.1.γ. Επιδιόρθωση των Οξειδωτικών Βλαβών

Επειδή τόσο το επίπεδο της παρεμπόδισης δημιουργίας όσο και της απενεργοποίησης των ελευθέρων ριζών δεν είναι απόλυτα αποτελεσματικά, τελικά συσσωρεύονται οξειδωτικές βλάβες στα σημαντικά βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) που αν δεν επιδιορθωθούν οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (Petropoulos και συν., 2006).

Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα διαθέτουν ένα ολόκληρο «οπλοστάσιο» ενζύμων και πρωτεϊνών που επιδιορθώνουν αυτές τις βλάβες (εικ.1.5) π.χ. πρωτεάσωμα, ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA κ.α (Hedge και συν., 2012).



Εικ.1.5: Τα τρία επίπεδα δράσης των αντιοξειδωτικών παραγόντων & οι συνέπειές τους (Από το βιβλίο "Biofarms for nutraceutical functional food & safety. Chapter / Category: Biotechnology: Endogenous Antioxidants and Free radicals scavengers" των Rizzo και συν.)

1.6.2 Έμμεσες δράσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων

Οι έμμεσες δράσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων (εικ.1.6), αν και λιγότερο προφανείς, είναι εξίσου σημαντικές με τις άμεσες και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κατηγορίες : α) τροποποίηση της μεταγωγής του σήματος και β) τροποποίηση μεταγραφικών παραγόντων και κατ'επέκταση της γονιδιακής έκφρασης (Ji και συν., 2000).

1.6.2.a. Τροποποίηση της Μεταγωγής του Σήματος

Η τροποποίηση της μεταγωγής του σήματος γίνεται τόσο στο εξωκυτταρικό όσο και στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Όσον αφορά την εξωκυτταρική δράση των αντιοξειδωτικών πρέπει να διευκρινηθεί ότι μπορούν και ανάγουν/απενεργοποιούν διάφορους μεμβρανικούς υποδοχείς και έτσι καταστέλλονται και καταρροϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το αντιοξειδωτικό μόριο NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη) εξαλείφει την επαγόμενη από τον EGFR (υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα EGF) καθώς και τον IRS-1 (υποδοχέας τύπου I της ινσουλίνης) μεταγωγή του σήματος, μέσω αναγωγής τους (Huang και συν., 1996, Coffey και συν., 1995, Sachsenmaier και συν., 1994).

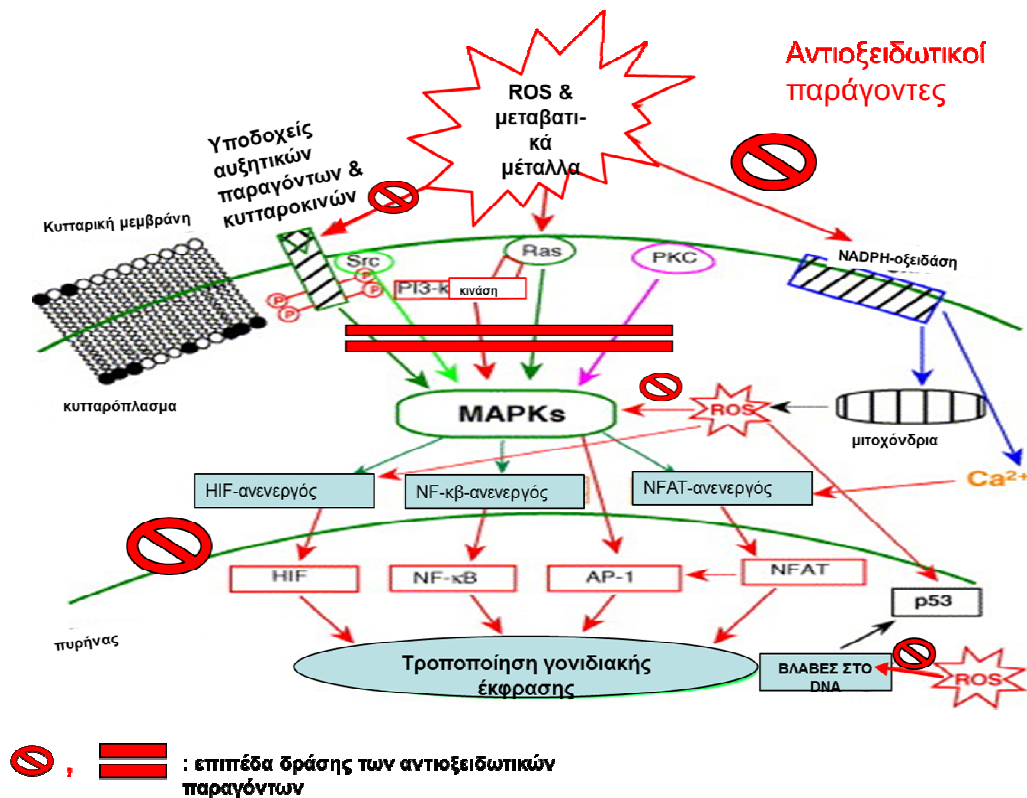
Ενδοκυτταρικά, τα αντιοξειδωτικά μόρια δρουν αλλάζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση σηματοδοτικών αναρροϊκών μορίων όπως οι πρωτεΐνες Ras, Rac, μικρές G πρωτεΐνες, φωσφατάσες κ.α (Suzuki και συν., 1997). Με αυτόν τον τρόπο προάγεται η ενεργοποίηση κάποιων κομβικών κινασών ενώ κάποιες άλλες αναστέλλονται. Είναι

σημαντικό να τονισθεί ότι το ποια σηματοδοτικά μόρια θα ενεργοποιηθούν και ποια όχι, είναι ένα φαινόμενο που παρουσιάζει ειδικότητα ανάλογα με το είδος του αντιοξειδωτικού μορίου που θα χρησιμοποιηθεί. Για παράδειγμα, ενώ το NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη) μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από τον EGFR ενεργοποίηση των ERKs και JNKs, η βιταμίνη-ε για τις ίδιες ακριβώς συνθήκες δεν μπορεί (Palmer και Paulson., 1997).

1.6.2.β. Τροποποίηση Μεταγραφικών Παραγόντων & αλλαγή της Γονιδιακής Έκφρασης

Οι σπουδαιότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση μίας πληθώρας γονιδίων στις περιπτώσεις οξειδοαναγωγικών ανισορροπιών είναι ο NF-κB και ο AP-1 (Allen και Tresini., 2000). Και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες περιέχουν κρίσιμα κατάλοιπα κυστεΐνης των οποίων οι σουλφιδρυλομάδες (-SH) μπορούν είτε να οξειδωθούν είτε να αναχθούν, αλλάζοντας έτσι την τριτοταγή τους δομή και τελικά τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με το DNA (Powis και συν., 1997, Xanthoudakis και συν., 1996, Walker και συν., 1993). Επιπλέον, πέραν της απευθείας τροποποίησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν και έμμεσα μέσω ενεργοποίησης ή αναστολής κομβικών κινασών που ρυθμίζουν αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες (Li και συν., 2007). Για παράδειγμα, ενώ ο καθιερωμένος ρόλος των ERKs είναι η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την αύξηση και την ανάπτυξη, οι Jiang και συν., 2004, έδειξαν ότι στα λεία μυϊκά κύτταρα η ενεργοποίηση των ERKs οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF-κB, ο οποίος με τη σειρά του προάγει αυξημένη έκφραση του γονιδίου της iNOS /επαγόμενης από καταστάσεις στρες συνθετάσης του NO (μονοξείδιο του αζώτου). Ωστόσο, προεπάση με συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μόρια αναστέλλει την ενεργοποίηση των ERKs και του NF-κβ και τελικά και την έκφραση της iNOS, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερα ποσοτά κυτταρικής επιβίωσης. Όσον αφορά τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1, ένα μοναδικό του χαρακτηριστικό είναι ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί τόσο από προοξειδωτικούς όσο και από αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Αν και το H₂O₂ συμπεριφέρεται σε κάποιες περιπτώσεις ως ενεργοποιητής του AP-1, μπορεί επίσης και να αναστείλει την πρόσδεσή του στο DNA ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες και τον κυτταρικό τύπο (Allen και Tresini., 2000). Από την άλλη πλευρά, κάποια αντιοξειδωτικά μόρια και γενικά αναγωγικοί παράγοντες όπως το DTT (διθειοθρεϊτόλη), η θειορεδοξίνη (Trx), φαινόλες κ.α. μπορούν και ενισχύουν την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA (Meyer και συν., 1994).

Βιβλιογραφικά, γνωρίζουμε ότι η πρόσδεση τόσο του NF-κβ όσο και του AP-1 στο DNA, παρουσία ήπιων συνθηκών οξειδωτικού στρες, προάγει την έκφραση ποικίλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα έχουν τελικά κυτταροπροστατευτική δράση π.χ. Mn-SOD (υπεροξειδική δισμουτάση που προσδένει μαγγάνιο), COX-2 (κυκλοξυγενάση-2), HOX-1 (οξυγενάση της αίμης-1) κ.α. (Aggeli και συν., 2010, Luhtala και συν., 1994, Ji και συν., 1990). Ωστόσο, όταν οι συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι πολύ ισχυρές προάγεται κατά κανόνα η έκφραση γονιδίων που ενισχύουν ακόμη περισσότερο τα φαινόμενα του οξειδωτικού στρες και μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο π.χ. iNOS, γονίδια προφλεγμονωδών κυτταροκινών κ.α., (Cai και συν., 2004). Όταν λοιπόν ένα αντιοξειδωτικό μόριο μπορεί και δρα και ως ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης, είναι ευνόητο ότι αφενός θα ενισχύει την έκφραση κάποιων εκ των προαναφερθέντων κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και αφετέρου θα παρεμποδίζει την έκφραση κάποιων που έχουν τελικά καταστροφική δράση (Nair και συν., 2007).



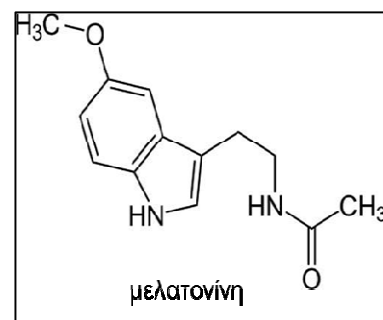
Εικ.1.6: Επαγόμενες από τις ROS αλλαγές στα σηματοδοτικά μονοπάτια και επίπεδα δράσης/αναστολής των αντιοξειδωτικών παραγόντων (Από Valko και συν., 2005).

1.7 ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Επειδή τα κύτταρα του οργανισμού μας έρχονται συνεχώς αντιμέτωπα με την παρουσία ελευθέρων ριζών διαθέτουν εγγενώς ένα εξαιρετικό «οπλοστάσιο» αντιμετώπισής τους που αποτελείται από ένζυμα, πρωτεΐνες, μικρά πεπτίδια καθώς και διάφορα οργανικά μόρια όπως ορμόνες (Keller και συν., 2006). Τα σπουδαιότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα είναι πέντε : α) οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs), β) οι καταλάσες, γ) οι υπεροξειδάσες, δ) το σύστημα της θειορεδοξίνης (Trx) και ε) το σύστημα της γλουταθειόνης (GSH) (Bouayed και Bohn., 2010). Άλλοι σημαντικοί ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες είναι το ουρικό οξύ του πλάσματος (Sautin και συν., 2008), η ορμόνη μελατονίνη (Galano και συν., 2011) καθώς και το ένζυμο οξυγενάση της αίμης-1/HOX-1 (Kirby και Adin, 2005).

1.7.1 Η αντιοξειδωτική δράση της Μελατονίνης

Η μελατονίνη (N-ακτύλο-μεθόξυ-τροπταμίνη) είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης που συντίθεται κατά κύριο λόγο στην επίφυση ως μία νευροορμόνη και εν συνεχεία απελευθερώνεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) προκειμένου να ασκήσει την κύρια φυσιολογική της δράση που είναι η ρύθμιση του εποχιακού και κιρκαδικού ρυθμού



(Zawilska και συν., 2009) . Πέραν αυτής της δράσης, η μελατονίνη στον υποχιασματικό πυρήνα λειτουργεί και ως ένας πολύ σημαντικός ρυθμιστής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, ενώ έχει και πολλές άλλες σπουδαίες περιφερειακές δράσεις.

Η μελατονίνη αποτελεί επίσης, ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό μόριο που μπορεί αφενός να απενεργοποιήσει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως αναγωγικός παράγοντας και αφετέρου να δράσει και έμμεσα επηρεάζοντας ποικιλοτρόπως τη μεταγωγή του σήματος με μηχανισμούς εξαρτώμενους αλλά και ανεξάρτητους από τους υποδοχείς της (Reiter και συν., 2009) . Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι η μελατονίνη εκδηλώνει γενικά την ορμονική της δράση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των nM , ενώ για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής της δράσης, ιδιαίτερα αν ο οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με σχετικά ισχυρές συνθήκες οξειδωτικού στρες, απαιτούνται τοπικά υψηλότερες συγκεντρώσεις της τάξεως των μM έως mM/φαρμακολογικές συγκεντρώσεις (Luchetti και συν., 2010) .

1.7.1.α : Άμεσες δράσεις της Μελατονίνης

Η Μελατονίνη έχει μία πληθώρα ιδιοτήτων που την καθιστούν ένα ιδεατό αντιοξειδωτικό μόριο όσον αφορά τον άμεσο τρόπο δράσης της. Καταρχάς, γνωρίζουμε ότι είναι ένα αντιοξειδωτικό μόριο ευρέος φάσματος (Tan και συν., 2002) που απενεργοποιεί ,μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων ή και δευτερευόντως ατόμων υδρογόνου, μία μεγάλη ποικιλία ελευθέρων ριζών όπως ρίζες υδροξυλίου (OH), περόξυ-, αλκόξυ- ρίζες,καθώς και άλλα πολύ δραστικά μόρια όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO), ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO-) και το μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen/¹O₂) (Galano και συν., 2011) . Οι πιο κρίσιμες χημικές ομάδες της μελατονίνης στις οποίες και οφείλει αυτήν την εκπληκτική πλειοτροπική δράση είναι η άκυκλο και η μεθόξυ ομάδα της (Gozzo και συν., 1999).

Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της ορμόνης είναι ότι αποτελεί ένα ενδιάμεσου μεγέθους αμφιφιλικό μόριο που παρουσιάζει εξαιρετική λιποδιαλυτότητα και ενδιάμεση υδατοδιαλυτότητα (Ceraulo και συν., 1999) . Έτσι, μπορεί πολύ εύκολα και διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες, αλληλεπιδρά με πληθώρα άλλων μορίων και πρωτεϊνών (πέραν των υποδοχών της) και εκδηλώνει ποικίλες ενδοκυτταρικές αντιοξειδωτικές δράσεις (Menendez-Pelaez και Reiter 1993).

Επιπλέον, η μελατονίνη μπορεί σχετικά εύκολα να αναγεννηθεί, δηλαδή να επιστρέψει στην ανηγμένη της μορφή μετά την αλληλεπίδρασή της με ένα προοξειδωτικό μόριο το οποίο προφανώς θα την οξειδώσει, με μία ποικιλία μηχανισμών (Pandi-Perumal και συν., 2006, Mahal και συν., 1999). Επιπρόσθετα, είναι εξέχουσας σημασίας το γεγονός ότι ακόμη και αν δεν επανέλθει στην ανηγμένη της μορφή, οι οξειδωμένοι μεταβολίτες της μπορούν ακόμη και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση (Tapias και συν., 2009, Tan και συν., 2001). Για το λόγο αυτό η μελατονίνη σπάνια εκδηλώνει προοξειδωτική δράση και έτσι παρουσιάζει πολύ λίγες παρενέργειες/φαινόμενα τοξικότητας ακόμη και αν την χορηγήσουμε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις.

Τέλος, η μελατονίνη μπορεί και ανάγει αποτελεσματικά πολύ σημαντικά ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια όπως η γλουταθειόνη/GSH (Sahin και συν., 2004), ενώ ανάγεται/αναγεννάται η ίδια από σημαντικά εν δυνάμει αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ασκορβικό Οξύ (βιτανίνη-c) και το ουρικό οξύ (Mahal και συν., 1999).

1.7.1.β. Έμμεσες Δράσεις της Μελατονίνης-Τροποποίηση της Μεταγωγής του Σήματος

Στα Θηλαστικά έχουν βρεθεί δύο υποδοχείς της Μελατονίνης τύπου GPCR (συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες), ο MT1 και ο MT2, οι οποίοι συγκροτούν ετεροδιμερή ή και ομοδιμερή (Dubocovich και συν., 2005). Η αλληλεπίδραση αυτής της ορμόνης με τους μεμβρανικούς υποδοχείς της είναι γενικά γνωστό ότι προάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras,Raf,MEK1/2,ERK1/2 (Bondi και συν., 2008), το σηματοδοτικό μονοπάτι των φωσφολιπασών PLC-β,PLC-η και εν γένει τη ρυθμιζόμενη από τα ιόντα ασβεστίου σηματοδότηση (Fucunaga και συν., 2002) και το μονοπάτι των κινασών PI3K,Akt (Choi και συν., 2008). Ακόμη, λόγω της αλληλεπίδρασης αυτών των υποδοχέων με την G-πρωτεΐνη Gis αναστέλλεται η αδενυλική κυκλάση (AC) με αποτέλεσμα τα επίπεδα του cAMP να διατηρούνται χαμηλά και να μην επιτρέπεται ούτε η ενεργοποίηση της κινάσης PKC [πρωτεϊνική κινάση C] (Godson και συν., 1997). Αντίστοιχη ανασταλτική δράση έχει διαπιστωθεί και για το μονοπάτι της Γουανυλικής Κυκλάσης (GC), cGMP, κινάση PKG [πρωτεϊνική κινάση G] (Hernandez-Pacheco και συν., 2008). Πέραν των μεμβρανικών υποδοχέων υπάρχουν και δύο γνωστοί πυρηνικοί υποδοχείς της μελατονίνης ο ROR (σχετιζόμενος με το ρετινοϊκό οξύ ορφανός υποδοχέας) και ο RZR (υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος τύπουZ) που φαίνεται να σχετίζονται με τις ορμονικές δράσεις της μελατονίνης και να αλληλεπιδρούν λειτουργικά και με τους μεμβρανικούς υποδοχείς (Raffi-El-Idrissi και συν., 1998).

Ο απώτερος στόχος όλων αυτών των αλλαγών στη μεταγωγή του σήματος είναι αφενός να διατηρηθεί η ακεραιότητα των μιτοχονδρίων και αφετέρου να διατηρηθούν σε υψηλά επίπεδα η γλουταθειόνη (GSH) και τα σχετιζόμενα με αυτήν ενζυμικά αποτοξινωτικά συστήματα π.χ. υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs), καταλάσες κ.α (Luchetti και συν., 2010). Είναι επίσης σημαντικό να τονισθεί ότι συχνά διαπιστώνεται αναστολή της ενεργότητας των ενεργοποιούμενων από καταστάσεις στρες κινασών p38-MAPKs και JNKs καθώς και μία καθολική μείωση της ικανότητας του NF-κβ για πρόσδεση στο DNA (Chan και συν., 2002). Αυτό συμβαίνει επειδή κάτω από συνθήκες αρκετά ισχυρού οξειδωτικού στρες ο NF-κβ προάγει την έκφραση προοξειδωτικών ή και προφλεγμονωδών γονιδίων (Mohan και συν., 1995). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ο NF-κβ επάγει περισσότερο κυτταροποστατευτικά φαινόμενα και γι'αυτό η μελατονίνη φαίνεται να ενισχύει τη δράση του (Cristofanon και συν., 2009). Τέλος, οι Urata και συν.,

1999 έδειξαν ότι η μελατονίνη μπορεί μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου της συνθετάσης της γλουταθειόνης.

1.7.2 Η Αντιοξειδωτική Δράση του ενζύμου Καταλάση

Οι καταλάσες συγκροτούν μία οικογένεια ενζύμων που είναι παρούσες σε όλα τα ζωικά και φυτικά είδη και ειδικά μεταξύ των θηλαστικών παρουσιάζουν ένα εξαιρετικό βαθμό συντηρητικότητας στα κρίσιμα για τη λειτουργικότητά τους αμινοξέα (Zamocky και συν., 1999). Οι καταλάσες των θηλαστικών συγκροτούν ένα ομοτετραμερές στο οποίο κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος 60KDa και φέρει στο ενεργό της κέντρο μία ομάδα αίμης συζευγμένης με τρισθενή σίδηρο/ Fe^{3+} (Nicholls και συν., 2001).

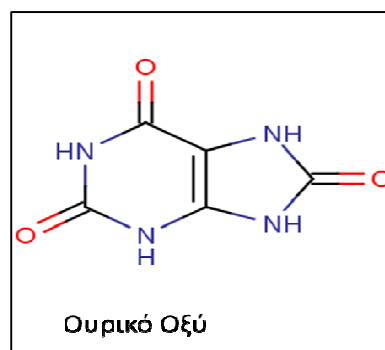
Η καταλάση εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξεισώματα και η κύρια αντίδραση που καταλύει είναι η αναγωγή δύο μορίων H_2O_2 προς ένα μόριο H_2O και ένα μόριο O_2 , (Kirkman και Gaetani., 2006). Αυτή η αντίδραση έχει δύο βασικές διαφορές σε σχέση με την αντίδραση που καταλύεται από τις υπεροξειδάσες, που επίσης ανάγουν το H_2O_2 προς H_2O . Κατ'αρχάς, στην περίπτωση της καταλάσης δεν ακολουθείται η κλασσική σιγμοειδής καμπύλη της κινητικής Michaelis-Menten, αλλά η ενεργότητα του ενζύμου είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του H_2O_2 (Nicholls και συν., 2001). Επιπλέον, οι υπεροξειδάσες παράλληλα με την αναγωγή του H_2O_2 προς H_2O , οξειδώνουν και κάποιο άλλο υπόστρωμα, ενώ κάτι τέτοιο δεν γίνεται στην κλασσική αντίδραση της καταλάσης (Holt και Palcic., 2006). Επειδή, όπως προαναφέρθηκε, το H_2O_2 είναι ένα αρκετά τοξικό μόριο που προάγει τη δημιουργία και άλλων ελευθέρων ριζών, η χρησιμότητα και η καθολική παρουσία της καταλάσης στα βιολογικά συστήματα είναι προφανής (Gaetani και συν., 1996). Ωστόσο, είναι αξιοπεριεργό το γεγονός ότι η ύπαρξη της δεν φαίνεται να είναι αναγκαία για την επιβίωση καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις υγιών ανθρώπων (Aebi και Suter., 1971) αλλά και ποντικών (Ho και συν., 2004) που παρουσίαζαν πλήρη έλλειψη της έκφρασης αυτού του ενζύμου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί και κάποιες μη αναμενόμενες ιδιότητες της καταλάσης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση H_2O_2 η καταλάση φαίνεται ότι μπορεί να δράσει και ως απλή υπεροξειδάση π.χ. οξειδώνοντας την αιθανόλη προς ακεταλδεΐδη και παράλληλα ανάγοντας το H_2O_2 προς H_2O (Nicholls και συν., 2001). Ακόμη, οι Vetrano και συν., 2005 διαπίστωσαν ότι απουσία H_2O_2 η καταλάση μπορεί να δράσει ως οξειδάση, οξειδώνοντας υποστρώματα όπως η ινδόλη και η β-φαινυλαιθυλαμίνη. Επίσης, οι de Groot και συν., 2006 διαπίστωσαν ότι όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι πολύ χαμηλή,

στα προϊόντα της αντίδρασης εντοπίζεται μόνο H₂O και όχι O₂ και αυτό πιθανά οφείλεται στην οξείδωση κάποιας χημικής ομάδας μέσα στην ίδια την καταλάση. Τέλος, ένα ακόμη μη ανάμενο και εντυπωσιακό εύρημα ήταν ότι η ακτινοβολημένη από UVB ακτινοβολία καταλάση μπορεί να προάγει, με ένα αδιευκρίνιστο προς το παρόν μηχανισμό, την απελευθέρωση ROS (Heck και συν., 2003).

1.7.3. Η Αντιοξειδωτική & Προοξειδωτική Δράση του Ουρικού Οξέος

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο και στα υπόλοιπα Πρωτεύοντα λόγω της έλλειψης του ενζύμου οξειδάση του ουρικού οξέος (Wu και συν., 1992). Γι' αυτό το λόγο, οι άνθρωποι έχουν σχετικά υψηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος στο πλάσμα τους και είναι πιο επιρρεπείς στην εκδήλωση υπερουρικαιμίας και



αρθρίτιδας (Johnson και συν., 2005). Το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση του ουρικού οξέος ονομάζεται οξειδάση της ξανθίνης και οξειδώνει αρχικά την ξανθίνη σε υποξανθίνη και εν συνεχεία την υποξανθίνη σε ουρικό οξύ. Κατά τη διάρκεια αυτών των αντιδράσεων απελευθερώνεται επίσης υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και υπεροξειδικό ανιόν (O₂⁻) που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει και στην εκδήλωση φαινομένων οξειδωτικού στρες (Hilley και Massey., 1981).

Πολλά *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι το ουρικό οξύ αποτελεί έναν ισχυρό απενεργοποιητή ποικιλίας δραστικών μορίων όπως το μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (¹O₂), αλκόξυ ρίζες καθώς και ρίζες υδροξυλίου (Stinefel και συν., 2005, Davies και συν., 1986, Becker και συν., 1993). Πολυάριθμες επίσης μελέτες έχουν συσχετίσει τα επίπεδα του ουρικού οξέος του πλάσματος με την αντιοξειδωτική του ικανότητα η οποία φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης και μείωσης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου (Sautin και Johnson., 2008, Ames και συν., 1981).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχει επίσης αφθονία μελετών που είτε δεν υποστηρίζουν αυτήν την αντιοξειδωτική-προστατευτική δράση του ουρικού οξέος είτε θεωρούν ότι έχει προοξειδωτική δράση, συμβάλλοντας στην εκδήλωση παθογενειών όπως η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II κ.α (Ogura και συν., 2004, Johnson και συν., 2003).

Το ότι το ουρικό οξύ δεν φαίνεται να εκδηλώνει σε αρκετές περιπτώσεις αντιοξειδωτική δράση εξηγείται εν μέρει από αυτήν καθ'αυτήν τη χημική φύση του μόριου το οποίο είναι ελάχιστα λιποδιαλυτό και ελάχιστα υδατοδιαλυτό. Έτσι, αφενός δεν μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες εκδηλώνοντας κυρίως εξωκυτταρική δράση και αφετέρου στο πλάσμα είναι «διαλυτό» μόνο εάν είναι προσδεμένο σε κατάλληλες πρωτεΐνες (Mugaoka και συν., 2003). Από την άλλη πλευρά, οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και προκαλούν σοβαρές ενδοκυτταρικές βλάβες που το ουρικό οξύ δεν μπορεί να αποτρέψει (Bartesaghi και συν., 2006 & 2007).

Πέραν της μειωμένης λιποφιλικότητας του, το ουρικό οξύ μπορεί να μετατραπεί και το ίδιο σε ελεύθερη ρίζα παρουσία άλλων προοξειδωτικών μορίων και να επάγει την οξειδωση λιπιδίων, εκκινώντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης (Bagnati και συν., 1999, Santos και συν., 1999).

1.8. ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Οι δύο βασικές κατηγορίες εξωγενών αντιοξειδωτικών χημικών ενώσεων είναι οι φυσικές και οι συνθετικές. Τα φυσικά, φυτικής κατά κανόνα προέλευσης, αντιοξειδωτικά μόρια είναι ποικίλων τύπων όπως φαινόλες, πολυφαινόλες, κινόνες, λακτόνες, καροτενοειδή, προκυανιδίνες κ.α. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά μόρια είναι προϊόντα οργανικής σύνθεσης που έχουν χημική δομή παρόμοια με των φυσικών αλλά τροποποιημένη ώστε να έχουν περισσότερες επιθυμητές ιδιότητες και λιγότερες παρενέργειες. Σχεδόν πάντα τα συνθετικά αντιοξειδωτικά φέρουν φαινολικούς δακτυλίους με ποικίλους βαθμούς υποκαταστατών όπως αλκύλια που τροποποιούν τις ιδιότητές τους (Από βιβλίο Antioxidant Methodology : In vitro and In Vivo Concepts. Hall & Cuppet, chapter 9)

1.8.1 Η Αντιοξειδωτική Δράση της Κουρκουμίνης

Πέραν της προαναφερθείσας προοξειδωτικής δράσης της σε υψηλές συγκεντρώσεις, η κουρκουμίνη (1,7-δις[4-υδροξυ-3μεθοξυφαινυλ]έπτα-1,6,διεν-3,5-διόνη) μπορεί επίσης να έχει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις εξαιρετικό αντιοξειδωτικό και γενικά κυτταροπροστατευτικό ρόλο (Baum και συν., 2004). Η αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τους αρωματικούς της δακτυλίους που είναι πυρηνόφιλοι και δρουν ως χηλικοί παράγοντες (Jung και συν., 2003). Ακόμη ως χηλικοί παράγοντες δρουν και οι υποκαταστάτες στους δύο αρωματικούς δακτυλίους, δεσμεύοντας μεταβατικά μέταλλα και αποτρέποντας την επαγόμενη από το υπεροξειδικό ανιόν αντίδραση

Fenton (Moran και συν., 1997). Τέλος η όρθο- θέση της μεθόξυ ομάδας στους δύο βενζολικούς δακτυλίους φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης (Marathe και συν., 2011, Rice-Evans και συν., 1997).

Η κουρκουμίνη ως αντιοξειδωτικό μόριο έχει τόσο άμεσες όσο και πολλές έμμεσες δράσεις. Μία από τις άμεσες δράσεις της είναι η αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, παρεμποδίζοντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης (Venkatesan και συν., 1998). Ακόμη, είναι πολύ ενδιαφέρουσα η ικανότητα της κουρκουμίνης να προσδένει εκλεκτικά οξειδοαναγωγικά ευαίσθητα μέταλλα π.χ. Cu^{2+} , Fe^{3+} , που όταν είναι ελεύθερα μπορούν επίσης να εκκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης (Baum και συν., 2004). Επίσης, η Κουρκουμίνη μπορεί και μειώνει την παρουσία ελευθέρων ριζών αζώτου μέσω απενεργοποίησης του δραστικού NO_2 (διοξειδίου του αζώτου), οδηγώντας έτσι σε μείωση του βαθμού οξείδωσης του NO (μονοξειδίου του αζώτου) καθώς και της συνθετάσης του (Brouet και συν., 1995).

Η κουρκουμίνη έχει επιπλέον και πολλές έμμεσες δράσεις μέσω των οποίων αυξάνει ενδοκυτταρικά τη συγκέντρωση σημαντικών αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη (GSH), η υπεροξειδική δισμουτάση Mn-SOD (Daosukho και συν., 2007, Venkatesan και συν., 1998) και η οξυγενάση της αίμης-1 (Pae και συν., 2007, Motterlini και συν., 2000). Σε πολλές περιπτώσεις, η αύξηση αυτών των παραγόντων γίνεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω ενεργοποίησης κομβικών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο Nrf-2 (Motterlini και συν., 2000).

Ένας επίσης πασίγνωστος μεταγραφικός παράγοντας του οποίου η δράση αναστέλλεται από την Κουρκουμίνη είναι ο NF-κβ (Farhangkholl και συν., 2006). Ο NF-κβ ενεργοποιείται σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες και προάγει την έκφραση προοξειδωτικών γονιδίων π.χ. iNOS (επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου) και προφλεγμονωδών γονιδίων π.χ. των κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF-α κ.α. Συνεπώς, η κουρκουμίνη μέσω της αναστολής του NF-κβ εκδηλώνει σημαντική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Yeh και συν., 2005).

Η οικογένεια του NF-κβ αριθμεί πέντε διαφορετικά μέλη (c-Rel, RelA[p65], RelB, p100, p105) τα οποία μπορούν εν δυναμεί να συγκροτήσουν 15 διαφορετικά ομοδιμερή και ετεροδιμερή. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι πρωτεΐνες p100 & p105 υφίστανται πρώτα μία πρωτεολυτική διάσπαση προκειμένου να δώσουν τις υπομονάδες p50 & p52 οι οποίες και

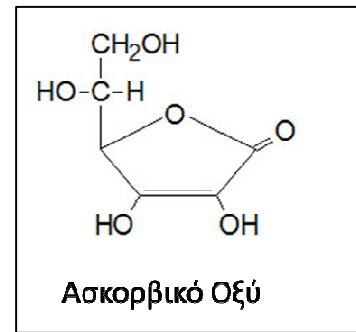
συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού NF-Κβ (Li και συν., 2008). Υπό κανονικές (μη στρεσογόνες) συνθήκες, ο NF-Κβ εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και παραμένει σε αδρανή κατάσταση καθώς πάνω του είναι προσδεδεμένος ο αναστολέας του IκB. Η οικογένεια πρωτεϊνών τύπου IκB αριθμεί επτά μέλη στα οποία μάλιστα συμπεριλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες p100 & p105. Παρουσία «κλασσικών» στρεσογόνων ερεθισμάτων π.χ. οξειδωτικό στρες και προφλεγμονωδών κυτταροκινών ενεργοποιείται το κλασσικό μονοπάτι του NF-Κβ ο οποίος είναι ένα διμερές των p50-p65 υπομονάδων, ενώ αντίθετα παρουσία ερεθισμάτων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των λεμφικών οργάνων και του ειδικού σκέλους της ανοσίας ενεργοποιείται το εναλλακτικό μονοπάτι στο οποίο ο NF-κΒ είναι ένα διμερές των υπομονάδων p52-RelB (Shih και συν., 2011). Ειδικότερα, στο κλασσικό μονοπάτι η ενεργοποίηση υποδοχέων τύπου TNFR, TLR, IL-R κ.α προάγει την ενεργοποίηση μίας κινάσης τύπου MEKK3 (MAPKKK) η οποία και φωσφορυλιώνει/ενεργοποιεί ένα σύμπλοκο κινασών τύπου IKKβ-IKKα-IKKγ[NEMO]. Η κινάση IKKβ φωσφορυλιώνει τόσο τον IκB-α, ο οποίος και οδηγείται προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, όσο και τον NF-κΒ ο οποίος και μεταβαίνει στον πυρήνα τροποποιώντας κατάλληλα τη γονιδιακή έκραση (Wietek και O'Neill., 2007). Οι διαφορές στο εναλλακτικό μονοπάτι είναι ότι αντί της κινάσης MEKK3 έχουμε μία κινάση τύπου NIK η οποία φωσφορυλιώνει την IKKα κινάση και ότι δεν υπάρχει κλασσικός IκB αναστολέας, αλλά η p100 υπομονάδα η οποία και πρωτεολύεται δίνοντας την p52 η οποία στη συνέχεια διμερίζεται με την RelB (Novack και συν., 2011).

Παρουσία συνθηκών οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικών συγκεντρώσεων της κουρκουμίνης παρατηρείται αναστολή του κλασσικού μονοπατιού σε πολλαπλά επίπεδα (Alamdari και συν., 2008). Συγκεκριμένα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγόμενη από την κουρκουμίνη αναστολή του NF-κΒ είναι έμμεση και οφείλεται στην αναστολή της φωσφορυλίωσης του IκBα από τις IKK κινάσες (Aggarwal και συν., 2006., Plummer και συν., 1999., Jobin και συν., 1999). Επιπλέον, ένας ακόμη έμμεσος μηχανισμός αναστολής οφείλεται στην απευθείας αναστολή του πρωτεασώματος η οποία και οδηγεί σε μεγάλη σταθεροποίηση του αναστολέα IκBα (Dikshit και συν., 2006). Ακόμη, ειδικά για τις περιπτώσεις των μυϊκών ατροφιών έχει βρεθεί ότι η αναστολή του NF-κΒ μπορεί να οφείλεται στη γενικότερη μείωση των ROS ή της αναστολής της p38-MAPK λόγω της παρουσίας της κουρκουμίνης (Chattopadhyay και συν., 2006., Carter και συν., 2003). Τέλος, πρέπει να επισημάνουμε ότι η κουρκουμίνη μπορεί να αποτρέψει φαινόμενα σήψης του σκελετικού μυός και λόγω άμεσης

αναστολής της ενεργότητας του NF-κB και συγκεκριμένα αναστολής τόσο της μετάβασής του στον πυρήνα όσο και την πρόσδεσή του στο DNA (Poylin και συν., 2008).

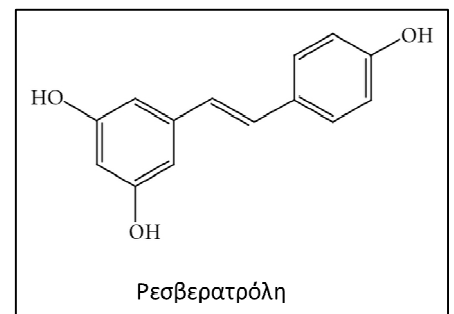
1.8.2. Η Αντιοξειδωτική & Προοξειδωτική Δράση του Ασκορβικού Οξέος (Βιταμίνη-c).

Το ασκορβικό οξύ (5-R-[(1S)-1,2-διυδροξυαιθυλ]-3,4-διυδροξυφουραν-2(5H)-όνη) είναι μία χημική ένωση απαραίτητη για την ολοκλήρωση σημαντικών μεταβολικών πορειών (Banhegyi και συν., 1996), για τη διατήρηση της ενεργότητας σημαντικών ενζύμων (Hewitson και συν., 2003) αλλά και ως εν δυνάμει αντιοξειδωτικό μόριο (Dhar-Mascareno και συν., 2005). Στον άνθρωπο υπάρχει έλλειψη του τελευταίου ενζύμου που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του ασκορβικού οξέος και γι'αυτό πρέπει να λαμβάνεται εξωγενώς και χαρακτηρίζεται ως βιταμίνη (Banhegyi και συν., 1996). Το ασκορβικό οξύ αποτελεί επίσης έναν απαραίτητο συμπαράγοντα πολλών εξαρτώμενων από τα μεταλλικά ιόντα σιδήρου μόνο & δι-Οξυγενασών που δεν περιέχουν αίμη (Hewitson και συν., 2003). Πέραν των προαναφερθέντων ρόλων του, το ασκορβικό οξύ αποτελεί και ένα απαραίτητο αναγωγικό/αντιοξειδωτικό μόριο σε οργανίδια που χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη παραγωγή ελευθερών ριζών όπως τα μιτοχόνδρια (Dhar-Mascareno και συν., 2005) και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Mandl και συν., 2009, Zangar και συν., 2004). Γενικά σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (από 50μM και κάτω) το ασκορβικό οξύ έχει κατά κανόνα αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε υψηλότερες (από 50μM έως και της τάξεως των mM) εκδηλώνει συχνά προοξειδωτική δράση ιδιαίτερα παρουσία μεταλλικών ιόντων σιδήρου ή χαλκού.



1.8.3 Η Αντιοξειδωτική Δράση της Ρεσβερατρόλης

Η ρεσβερατρόλη (5-[2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθυλ]βενζο-1,3-διόλη) είναι μία πολυφαινόλη ευρισκόμενη στις ταννίνες του κρασιού και ειδικότερα από χημικής απόψεως χαρακτηρίζεται ως στυλβένη (3,5,4',3'-υδροξύ-στυλβένη). Πληθώρα μελετών έχουν αποδείξει ότι χάρη σε αυτήν της τη χημική δομή, η ρεσβερατρόλη είναι ένα πολύ καλό υποψήφιο αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες μόριο έναντι καρδιαγγειακών ασθενειών (Csiszar και συν., 2011).



Ωστόσο, ένα δομικό μειονέκτημα αυτού του μορίου, σε σχέση με άλλες στυλβένες που είναι μεθυλιώμενες ή γλυκοζυλιώμενες, είναι ότι παρουσιάζει αρκετή υδροφιλικότητα με αποτέλεσμα να διαπερνά σχετικά δύσκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και να εμφανίζει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με άλλα περισσότερο υδρόφοβα μόρια (Frombaum και συν., 2011).

Πιο συγκεκριμένα, η ρεσβερατρόλη δρα τόσο σε άμεσο επίπεδο μέσω απευθείας εξωκυτταρικής απενεργοποίησης ποικίλων ελευθέρων ριζών, όσο και σε έμμεσο επίπεδο μέσω πρόσδεσης σε υποδοχείς οιστρογόνων ή σε κομβικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Frombaum και συν., 2011, Yang και συν., 2010). Οι έμμεσες αυτές δράσεις της Ρεσβερατρόλης οδηγούν σε τροποποίηση της μεταγωγής του σήματος και κατ'επέκταση της γονιδιακής έκφρασης, με αποτέλεσμα να αυξάνει συνολικά η ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου (Frombaum και συν., 2011). Όσον αφορά τον καρδιοπροστατευτικό της ρόλο, αυτός οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αγγειοδιασταλτική της δράση έπειτα από την πρόσδεσή της σε υποδοχείς οιστρογόνων και την ενεργοποίηση των κινασών Src, ERKs & AMPK (Chalopin και συν., 2010, Yang και συν., 2010). Αυτά τα γεγονότα φαίνεται ότι προάγουν αφενός αυξημένη μεταγραφική έκφραση της eNOS (ενδοθηλιακή συνθετάση του NO/Μονοξειδίου του Αζώτου) και αφετέρου μειωμένη μεταγραφή του γονιδίου της NADPH-Οξειδάσης που ενισχύει τα φαινόμενα οξειδωτικού στρες (Yang και συν., 2010, Wallerath και συν., 2002). Τέλος έχει βρεθεί ότι στα αιμοπετάλια, η ρεσβερατρόλη μειώνει τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών μέσω ενεργοποίησης της PI3K κινάσης και ταυτόχρονη αναστολή της p38-MAPK κινάσης (Gresele και συν., 2008).

Παρόλες τις προαναφερθείσες δράσεις της ρεσβερατρόλης σε επίπεδο σηματοδοτικό, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η αντιοξειδωτική της δράση είναι περισσότερο εξωκυτταρική και οφείλεται κατά κύριο λόγο στην άμεση απενεργοποίηση των ROS οι οποίες παγιδεύονται στις υδροξυλομάδες του στυλβενικού σκελετού του μορίου (Frombaum και συν., 2011)

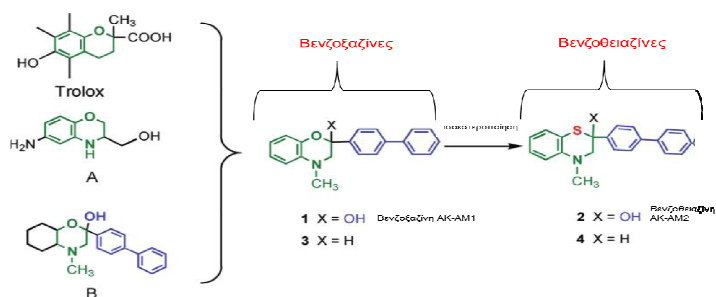
1.8.4 Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Δράσης των Νεοσυντιθέμενων Χημικών Ενώσεων Βενζοξαζίνη AK-AM1 & Βενζοθειαζίνη AK-AM2.

Η Kourounakis και συν., 2008, 2010 ανέπτυξαν αρχικά δύο ετεροαρωματικά και πολυαρωματικά μόρια που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων in vivo, έχουν in vitro αντιοξειδωτική δράση και τέλος αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου SQS (συνθετάση του σκουαλενίου). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της χοληστερόλης αλλά καταρροϊκά του ενζύμου HMG-CoA-Αναγωγή που αποτελεί τον εώς τώρα κύριο στόχο των στατινών (Charlton-Menys και συν., 2007). Το βασικότερο πρόβλημα με τη χορήγηση των στατινών είναι ότι παρουσιάζουν ήπατο- και μύο-τοξικότητα και γι'αυτό είναι επιτακτική ανάγκη ο σχεδιασμός φαρμακευτικών ουσιών που στοχεύουν άλλα ένζυμα και παρουσιάζουν έτσι λιγότερες παρενέργειες (Masters και συν., 1995). Τέλος, επειδή στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης εμπλέκονται πολλαπλοί μηχανισμοί όπως υπερλιπιδαιμία, οξειδωτικό στρες και φλεγμονή, είναι επιθυμητός ο σχεδιασμός φαρμακολογικών παραγόντων που έχουν τουλάχιστον δύο εκ των τριών προαναφερθέντων στόχων (Cavalli και συν., 2008).

Επεκτείνοντας λοιπόν αυτές τις μελέτες ο Matralis και συν., 2011 συνέθεσαν τη βενζοξαζίνη AK-AM1 [2-(4-διφαινυλ)-4μεθυλ-3-δύδρο-2H-βένζο(1,4)οξαζι-2-όλη] και τη βενζοθειαζίνη AK-AM2 [2-(4-διφαινυλ)-4μεθυλ-3-δύδρο-2H-βένζο(1,4)οξαθειαζιν-2-όλη], (εικ.1.7). Το AK-AM2 αποτελεί ένα ισοεστέρα του AK-AM1 και η μοναδική τους διαφορά είναι η αντικατάσταση του ατόμου του οξυγόνου (O) της βενζοξαζίνης AK-AM1 με ένα άτομο θείου (S) στη βενζοθειαζίνη AK-AM2. Και τα δύο αυτά μόρια σχεδιάσθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδυάζουν δομικά χαρακτηριστικά δύο «κλασσικών» αντιοξειδωτικών μορίων του Trolox και του μορίου [A] καθώς και του κλασσικού αντιυπερλιπιδαιμικού μορίου [B] (Liu και συν., 2009, Kourounakis και συν., 2008). Επίσης, σχεδιάσθηκαν τα μόρια (3) και (4) που είναι ίδια με τα AK-AM1 και AK-AM2 αντίστοιχα, με τη διαφορά ότι στη θέση της υδροξυλομάδας 2-OH των AK-AM1 & 2 τοποθετήθηκε ένα άτομο υδρογόνου (H).

Τα εώς τώρα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι τόσο οι βενζοξαζίνες όσο και οι βενζοθειαζίνες αναστέλλουν σε πολύ σημαντικό βαθμό την in vitro υπεροξειδωση των λιπιδίων και μάλιστα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το κλασσικό αντιοξειδωτικό μότιο Trolox, της τάξεως των μM (Kourounakis και συν., 2008, Koufaki και συν., 2001) . Αξίζει να επισημανθεί ότι οι δύο βενζοξαζίνες AK-AM1 & (3), λόγω της

παρουσίας του ατόμου του οξυγόνου (O) φαίνεται να είναι πιο δραστικά μόρια [IC₅₀=9 & 12μM] σε σχέση με τις δύο βενζοθειαζίνες AK-AM2 & (4) [IC₅₀=83 & 39 μM] (Matralis και συν., 2011). Επιπλέον, το AK-AM1 (10μM) μελετήθηκε περαιτέρω και δείχθηκε ότι αναστέλλει πολύ πιο αποτελεσματικά σε σχέση με το κλασικό αντιυπερλιπιδαιμικό μόριο [B], την επαγόμενη από τα ιόντα χαλκού Cu²⁺, οξείδωση της λιποπρωτεΐνης LDL. Το γεγονός αυτό οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στο ότι το AK-AM1 δεν έχει απλώς αντιυπερλιπιδαιμική αλλά και αντιοξειδωτική δράση η οποία φαίνεται να του εξασφαλίζει καλύτερη αλληλεπίδραση με τα LDL σωματίδια (Matralis και συν., 2011, Jeong και συν., 2004). Ακόμη, εξετάστηκε η ικανότητα και των τεσσάρων νέων μορίων για την in vitro αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου SQS (συνθετάση του σκουαλενίου) και διαπιστώθηκε ότι όλα τους είναι εξαιρετικοί αναστολείς και μάλιστα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, από 4-10μM (Matralis και συν., 2011). Μάλιστα τα μόρια (3) & (4) αποτελούν πιο ισχυρούς αναστολείς σε σχέση με τα AK-AM1 & AK-AM2, πράγμα που δείχνει ότι η απουσία της υδροξυλομάδας 2-OH κάνει τα μόρια (3) & (4) πιο υδρόφοβα και καλύτερα αλληλεπιδρώντα με την υδρόφοβη κοιλότητα του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Matralis και συν., 2011, Kourounakis και συν., 2010, Pandit και συν., 2000). Τέλος, μελετήθηκε η in vivo αντιυπερλιπιδαιμική και αντιοξειδωτική δράση των AK-AM1 & AK-AM2 σε υπερλιπιδαιμικούς αρουραίους και φάνηκε ότι και τα δύο μόρια οδηγούν σε στατιστικά σημαντική μείωση όλων των δεικτών της υπερλιπιδαιμίας του πλάσματος (τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, LDL, αναλογία LDL/HDL) καθώς και της MDA (μαλοναδιαλδεΐδη/δείκτης οξειδωτικού στρες). Για μία ακόμη φορά επιβεβαιώθηκε ότι η βενζοξαζίνη AK-AM1 είναι πιο δραστικό μόριο, δηλαδή δρα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, σε σχέση με τη βενζοθειαζίνη AK-AM2 και ότι οι in vivo δραστικές συγκεντρώσεις είναι της τάξεως των μM και παρόμοιες με τις in vitro (Matralis και συν., 2011).



Εικ.1.7: Χημικές ενώσεις «οδηγοί» (Trolox, αντιοξειδωτικό μόριο A & αντιυπερλιπιδαιμικό μόριο B) και βασικός τρόπος σχεδιασμού των βενζοξαζινών AK-AM1(μόριο[1]), μόριο [2] & των βενζοθειαζινών AK-AM2(μόριο[2]) & μόριο[4]. (Από Matralis και συν., 2011).

ΚΕΦ.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Βιολογικό υλικό

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C2. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι σκελετικοί μυοβλάστες ποντικού που έχουν απομονωθεί από C3H ποντίκια (Yaffe & Saxel,1977) και αποτελούν ευγενική παραχώρηση του Dr.David Yaffe (Weizmann Institute, Israel).

2.1.2.Βιοχημικά αντιδραστήρια

2.1.2.α. Συντήρηση κυτταροκαλλιέργειών

Για τη συντήρηση των κυτταροκαλλιέργειων έγινε χρήση των παρακάτω υλικών:

- Θρεπτικό μέσο DMEM(Dubesco's modified Eagle's medium), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Ορός εμβρύου βοδιού(Fetal Bovine Serum,FBS), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Αντιβιοτικά που προστίθενται στο θρεπτικό μέσο(10x)(στρεπτομυκίνη 1000 µg/ml και πενικιλίνη 10000 units/ml), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,5-0,2% σε PBS(10x), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.Το διάλυμα αραιώνεται σε PBS ώστε να προκύψει τελικά διάλυμα 1x.
- Διάλυμα αιθανόλης για απολύμανση από την εταιρεία Merck.
- Διάλυμα Incuwater-Clean (για αποφυγή μολύνσεων στο νερό του κλιβάνου) από την εταιρεία Applichem.

2.1.2.β. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

Για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και χημικές ουσίες:

- MTT (thiazolylblue-tetrazolium bromide) από την εταιρεία Applichem (#A2231.0001)
- HCl 37% w/v από την εταιρεία Applichem (#A0659.2500)

- 2-προπανόλη από την εταιρεία Merck (#1.09634.2511)

2.1.2.γ. Ανάλυση κατά Western

Για την ανοσοεντόπιση των μελετούμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των p44-ERK, p-42-ERK του ανθρώπου στα αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνη 202/τυροσίνη 204 (#9101S από την εταιρεία Cell Signalling Technology-USA).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή των p54-JNK, p-46-JNK του ανθρώπου στα αμινοξικά κατάλοιπα θρεονίνη 183/τυροσίνη 185 (#9251 από την εταιρεία Cell Signalling Technology-USA).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει τη θέση πρωτεόλυσης του PARP από την κασπάση-3. Το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει τόσο τον πλήρη PARP (116KDa) όσο και τα δύο θραύσματα που προκύπτουν από την πρωτεόλυσή του (#9542 από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αναγνωρίζει το φωσφορυλιωμένο μεταγραφικό παράγοντα c-Jun (48KDa) στη θέση σερίνη-63. (#9261S από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι των ολικών επίπεδων της ακτίνης και συγκεκριμένα έναντι του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (#A2103 από την εταιρεία Sigma-Aldrich Chemie GmbH).
- Δεύτερο αντίσωμα γίδας συζευγμένο με υπεροξειδάση που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G (IgGs) του κουνελιού προερχόμενο από την εταιρεία DAKO (#P0447).

2.1.2.δ. Για τη χρώση Hoechst

- Χρωστική Hoechst 10 mg/ml σε νερό από την εταιρεία Invitrogen (#H3569).

2.1.2.ε. Παράγοντες επίδρασης

- H₂O₂ 30% w/v (#141076.1211 από την εταιρεία Panreac Quimica SA)
- Κουρκουμίνη (#81025 από την εταιρεία Cayman Chemical Company)
- NH₃ 25 % w/v (# 1054321000 από την εταιρεία Merck)
- Καταλάση (# C-30, Lot:33H7185 από την εταιρεία Sigma)
- Ασκορβικό οξύ (#A4403-100MG από την εταιρεία Sigma)
- Μελατονίνη (#0.14537.0001 από την εταιρεία Merck)
- Ουρικό Οξύ (#A2562.0025 από την εταιρεία Applichem)
- Βενζοξαζίνη AK-AM1, Βενζοθειαζίνη AK-AM2 & Ρεσβερατρόλη (ευγενική παραχώρηση του εργαστηρίου της δρ.Α.Κουρουνάκη [τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α] το οποίο και τις συνέθεσε)

2.1.2.στ. Ομογενοποίηση

Κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης των κυττάρων χρησιμοποιούμε τα εξής υλικά:

- Αναστολείς πρωτεασών : leupeptin(#L2884-5MG), DDT(#4315-1G), PMSF(#P7626-250MG) και E64(#E3132-1MG) προερχόμενοι από την εταιρεία Sigma.
- Απορρυπαντικό Triton X-100 από την εταιρεία Sigma.

2.1.2.ζ. Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών και θα αναλυθεί διεξοδικά παρακάτω. Το αντιδραστήριο Bradford προέρχεται από την εταιρεία BIORAD (Biorad protein assay, #500-0006) και είναι αρχικά συμπυκνωμένο. Γι' αυτό λίγο πριν από την χρήση του αραιώνεται με απιονισμένο νερό (1:5 v/v)

2.1.2.η. Υλικό εμφάνισης

Για την αποτύπωση των πρωτεϊνών σε φωτογραφικό φιλμ, κατά τη διαδικασία της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL (enhanced chemiluminescence) από την εταιρεία Amersham Bioscience(#RPN 2209).
- Φιλμ (superRXfilm 24x18 cm, από την εταιρεία Fujifilm Europe).
- Εμφανιστής(Developer-LX24-Kodak)
- Σταθεροποιήτης(Fixer-AL4-Kodak)

2.1.2.θ. Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν τα εξής:

- Κλίβανος επώασης για τις κυτταροκαλλιέργειες (SANYO,MCO 15AC).
- Οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων(Nova,IN834)
- Θάλαμος νηματικής ροής (KB/KBM horizontal laminar airflow bench,class100,faster)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean III cell, Biorad)
- Συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transblot SD, Biorad).
- Τροφοδοτικό (Power Pac 1000, Biorad)
- Φασματοφωτόμετρο (Ultospect 2000, Pharmacia Biotech)
- Φωτόμετρο ELISA (DENLEY, West Sussex, U.K)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Jouan BR4i)
- Υπερκαταψύκτης (Forma Scientific)

- Φυγόκεντρος (Micro 12-24 από την εταιρεία Hettich)
- Υδατόλουτρο (SWB35, No209 από την εταιρεία Bacacos Scientific)

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1.α. Γενικά στοιχεία-Βασικοί τρόποι αποφυγής μολύνσεων.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συντήρηση των κυτταροκαλλιεργειών είναι όλοι οι χειρισμοί να γίνονται κάτω από άσηπτες συνθήκες.

Για το σκοπό αυτό όλες οι εργασίες γίνονται μέσα στο *θάλαμο νηματικής ροής* ο οποίος αποστειρώνει τον αέρα με τη μέθοδο της διήθησης. Συγκεκριμένα, ο θάλαμος διαθέτει ηθμούς υψηλής απόδοσης οι οποίοι κατακρατούν το 99,97% των σωματιδίων διαμέτρου 0,3 μm και η χρήση του θεωρείται ασφαλής περίπου 20 λεπτά αφού τεθεί σε λειτουργία.

Για περαιτέρω προφύλαξη *ακτινοβολούμε με UV* για περίπου 15 λεπτά τόσο το χώρο των κυτταροκαλλιεργειών όσο και το θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε καθημερινή βάση και πριν την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται θανάτωση πολύ μεγάλου ποσοστού των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο χώρο (η υπεριώδης ακτινοβολία ως γνωστόν δημιουργεί σοβαρότατες και πολλές φορές μη αναστρέψιμες βλάβες στο DNA των μικροοργανισμών π.χ. διμερή θυμίνης, με αποτέλεσμα αυτοί να νεκρώνονται άμεσα.)

Επιπλέον χρησιμοποιείται όσο πιο συχνά γίνεται *διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)* για απολυμαντικούς σκοπούς. Όσον αφορά το θρεπτικό μέσο των κυττάρων, πραγματοποιείται *θερμική απενεργοποίηση του ορού* στους 56°C για 30 λεπτά και επακόλουθο *φιλτράρισμα* ενώ προστίθενται και τα *αντιβιοτικά* στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη αφού προηγουμένως φιλτραριστούν.

Τέλος σε *εβδομαδιαία βάση καθαρίζονται σχολαστικά* όλο το δωμάτιο και ο κλίβανος των κυτταροκαλλιεργειών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται απολύμανση με αιθανόλη όλων των επιφανειών του χώρου, αντικατάσταση του νερού στο δίσκο του κλιβάνου με 1L αποστειρωμένου και εμπλουτισμένου με 10 ml incuwater (περιέχει αντιβιοτικό) και τέλος

ακτινοβολήση με UV τόσο όλου του χώρου όσο και του θαλάμου νηματικής ροής για 20 λεπτά.

2.2.1.β. Συντήρηση & Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Τα κύτταρα διατηρούνται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ κορεσμένη σε υδρατμούς. Για την αύξηση των κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2 απαιτείται η χρήση του θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με: ορό βοδιού FBS 15%v/v (αναλυτικότερη περιγραφή στα υλικά) και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν την ιδιότητα να διατηρούνται προσκολλημένα σε σταθερά υποστρώματα όπως αυτά των πλαστικών φιαλών (φλάσκες) ή των τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας διευκολύνοντας έτσι πολύ τους πραγματοποιούμενους χειρισμούς.

Η διατήρηση των κυττάρων σε μία κυτταροκαλλιέργεια απαιτεί την τακτική ανανέωση του θρεπτικού μέσου στο οποίο πολλαπλασιάζονται προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα εκφυλισμού λόγω εξάντλησης των θρεπτικών και παραγωγής τοξικών μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιούμε αλλαγή του θρεπτικού μέσου της κυτταροκαλλιέργειας κάθε 2-3 ημέρες και διαίρεση αυτής όταν η πυκνότητα φθάνει σε ποσοστό κάλυψης ~70%. Συνοπτικά, η διαδικασία ανακαλλιέργειας έχει ως εξής:

- Απομάκρυνση και απόρριψη του παλιού θρεπτικού μέσου.
- Ξέπλυμα με την προσθήκη 3ml (για τις μεγαλύτερου μεγέθους φλάσκες) ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-PBS- (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄ & pH=7.4). Συγκεκριμένα, με την προσθήκη του PBS γίνεται απομάκρυνση των υπολειμμάτων του παλιού θρεπτικού και νεκρών κυττάρων, χαλαρά προσκολλημένων που πιθανόν έχουν απομείνει στη φλάσκα.
- Αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS & προσθήκη 1,5 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA προσπαθώντας με ήπια ανακίνηση να καλυφθούν όλα τα προσκολλημένα με αυτό κύτταρα. Η προσθήκη αυτού του διαλύματος στοχεύει στην πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης ώστε να αποκολληθούν όλα τα

κύτταρα από το στερεό υπόστρωμα της φλάσκας. Ο χειρισμός του διαλύματος θρυψίνης πρέπει να γίνεται με πολύ μεγάλη προσοχή διότι η θρυψίνη ως πρωτεολυτικό ένζυμο διασπά και τον εαυτό της. Γι' αυτό το λόγο φυλάσσεται συνεχώς στο ψυγείο και επανατοποθετείται άμεσα σε αυτό, αμέσως μόλις χρησιμοποιηθεί.

- Επώαση για 2-3 λεπτά των κυττάρων με το διάλυμα της θρυψίνης στον κλίβανο στους 37°C και εν συνεχεία παρατήρηση της φλάσκας στο οπτικό μικροσκόπιο για να επιβεβαιώσουμε ότι όντως πραγματοποιήθηκε η αποκόλληση.
- Τερματισμός της αντίδρασης της θρυψίνης με την προσθήκη 3,5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου(DMEM+FBS).Ακολουθεί ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων (που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της επώασης με το διάλυμα θρυψίνης)και έπειτα το εναιώρημα μοιράζεται σε νέες φλάσκες ή και τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας.

2.2.1.γ. Ψύξη & απόψυξη των κυττάρων

Για τη διατήρηση μίας κυτταρικής σειράς για μεγάλα χρονικά διαστήματα είναι απαραίτητο να υπάρχει διαθέσιμο απόθεμα κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη επειδή η πολλαπλασιαστική τους ικανότητα φθίνει με το πέρασμα του χρόνου. Με αυτόν τον τρόπο, έχουμε ανά πάσα στιγμή διαθέσιμα κύτταρα νεαρής γενιάς, τα οποία και αποψύχουμε κατά βούληση για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Διαδικασία ψύξης

Τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα με την προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA, ακριβώς όπως και στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων, και στη συνέχεια αφού τερματιστεί η αντίδραση της θρυψίνης με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου, το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 12000 rpm (στροφές/λεπτό). Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml μέσου κατάψυξης (90%v/v FBS & 10%v/v DMSO) και τοποθετούνται σε ειδικές αμπούλες(ανθεκτικές στις χαμηλές θερμοκρασίες).

Η παρουσία του DMSO που αποτελεί κρυοπροστατευτικό και η *σταδιακή* ψύξη [-20,-80,-196°C (θερμοκρασία υγρού άζωτου)] εξασφαλίζουν τον περιορισμό σχηματισμού κρυστάλλων πάγου και τη διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Διαδικασία απόψυξης

Η διαδικασία της απόψυξης, αντίθετα με τη ψύξη, πρέπει να γίνει γρήγορα ώστε να περιορισθούν οι βλάβες στα κύτταρα από τους κρυστάλλους πάγου που πιθανόν έχουν σχηματιστεί μέσα σε αυτά. Έτσι, η αμπούλα με τα παγωμένα κύτταρα τοποθετείται άμεσα στους 37°C (στο υδατόλουτρο ή στον κλίβανο) και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκα με πλήρες θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται στον κλίβανο. Συνήθως το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτήν τη φάση είναι πολύ υψηλό αφενός λόγω του στρες που υφίστανται τα κύτταρα κατά τη διαδικασία της ψύξης και αφετέρου λόγω της παρουσίας του DMSO που είναι πολύ τοξικό. Για το λόγο αυτό την επόμενη ημέρα γίνεται απαραίτητως αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

2.2.1.δ. Προετοιμασία τρυβλίων για επιδράσεις

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν θέλουμε να πραγματοποιήσουμε ένα πείραμα δηλ. όταν θέλουμε να μελετήσουμε την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Ειδικότερα, την προηγούμενη ημέρα απ'αυτήν του πειράματος πραγματοποιούμε την ίδια διαδικασία με αυτήν της ανακαλλιέργειας των κυττάρων αλλά αφού τερματίσουμε την αντίδραση της θρυψίνης με πλήρες θρεπτικό μέσο, ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Συγκεκριμένα μετράμε τον αριθμό των κυττάρων στα 8 μεγάλα τετράγωνα της πλάκας, υπολογίζουμε το μέσο όρο και στη συνέχεια πολλαπλασιάζουμε επί 10^4 προκειμένου να βρούμε τον αριθμό των κυττάρων/ml. Το κατάλληλο μέγεθος τρυβλίου επιλέγεται κάθε φορά ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε. Στην παρούσα εργασία

χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία διαμέτρου 35mm και χωρητικότητας 2ml στα οποία τοποθετούσαμε ~800.000 κύτταρα προκειμένου να είναι η επιφάνεια τους καλυμμένη σε ποσοστό 70-80% την επόμενη ημέρα. Το κάθε τρυβλίο συμπληρώνεται τελικά με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 2ml και αναδεύεται με ήπιες κυκλικές κινήσεις ώστε να έχουμε ομοιόμορφη επίστρωση των κυττάρων στην επιφάνειά του. Μάλιστα, είναι καλύτερο να προηγείται η προσθήκη του θρεπτικού μέσου και μετά να ακολουθεί η προσθήκη των κυττάρων.

Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση.

2.2.1.ε. Πειραματικές συνθήκες

Την επόμενη ημέρα και εφόσον η επιφάνεια των τρυβλίων είναι καλυμμένη από κύτταρα σε ποσοστό 70-80%, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Ξέπλυμα με 1 ml PBS (για τα τρυβλία διαμέτρου 35mm)
- Πλήρωση του τρυβλίου με 2 ml (για τα τρυβλία διαμέτρου 35mm) θρεπτικού μέσου χωρίς ορό.
- Επώαση των τρυβλίων με το θρεπτικό χωρίς ορό για 3 ώρες στον κλίβανο χωρίς να κάνουμε κανένα χειρισμό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *στέρηση* και είναι απαραίτητη προκειμένου να είμαστε βέβαιοι ότι η παρατηρούμενη κυτταρική απόκριση, μετά το τέλος του πειράματος οφείλεται στους παράγοντες με τους οποίους επιδράσαμε και όχι σε πιθανή επίδραση συστατικών του ορού.
- Μετά την παρέλευση των 3 ωρών είναι δυνατή η επίδραση με τους επιθυμητούς παράγοντες οι οποίοι διαλύονται στο θρεπτικό μέσο του τρυβλίου (που δεν περιέχει δηλαδή ορό). Στην περίπτωση χρησιμοποίησης διάφορων αναστολέων είναι απαραίτητο να γίνει προεπώαση των κυττάρων με τον κατάλληλο αναστολέα για 30 λεπτά ή 1 ώρα, ανάλογα με την περίπτωση, και μετά να ακολουθήσει η προσθήκη του παράγοντα επίδρασης.

2.2.2.a Ομογενοποίηση των κυττάρων & απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών οι οποίες θα μελετηθούν με ανάλυση κατά Western.

Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος των επιδράσεων τα τρυβλία μεταφέρονται στον πάγο και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αφαίρεση και απόρριψη του θρεπτικού υλικού.
- Ξέπλυμα με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Προσθήκη στο κάθε τρυβλίο περίπου 90 μl διαλύματος λύσης [Buffer G: 20 mM Tris/HCl, 200μM leupeptin, 10 μM E-64, 5μM DTT, 300 μM PMSF, Triton X-100 0.5%(v/v)]. Με την προσθήκη αυτού του διαλύματος πραγματοποιείται ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου. Επειδή κατά την πορεία αυτή απελευθερώνονται πρωτεάσες και φωσφατάσες οι οποίες μπορεί να τροποποιήσουν τα επίπεδα ή και την ενεργότητα των μελετώμενων πρωτεϊνών, το διάλυμα λύσης περιέχει αναστολείς έναντι αυτών των ενζύμων (λευπεπτίνη, E-64, DTT, PMSF).
- Αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο με χρήση κατάλληλου εμβόλου και μεταφορά σε πλαστικά σωληνάκια φυγοκέντρωσης.
- Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση σε 14000 rpm (στροφές/λεπτό) για 10 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή από κάθε δείγμα ~75 μl υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια φυγοκέντρωσης αφού όμως προηγουμένως κρατηθεί 1μl για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών κάθε δείγματος με τη μέθοδο Bradford (σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης που ήδη περιέχουν 99 μl νερό).
- Έπειτα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford ακολουθεί προσθήκη στα σωληνάκια φυγοκέντρωσης 1/3 του όγκου των δειγμάτων Sample Buffer4x [διάλυμα κατεργασίας: 300mM Tris/HCl pH=6.8, 10%(w/v)SDS, 13%(v/v)γλυκερόλη, 20%(v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2%(w/v) κυανό της βρωμοφαινόλης]. Το διάλυμα κατεργασίας είναι απαραίτητο αφενός για τη δημιουργία

αποδιατακτικών συνθηκών και αφετέρου για να είναι ορατά τα πρωτεϊνικά δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση.

- Βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά και φύλαξη τους στην κατάψυξη μέχρι την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

2.2.2.β. Υποκυτταρική κλασμάτωση-Ομογενοποίηση των κυττάρων & διαχωρισμός πυρηνικών & κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες θα μελετηθούν με ανάλυση κατά Western.

Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται μεγάλα τρυβλία καλλιέργειας χωρητικότητας 6 ml (100mm) προκειμένου να απομονώσουμε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Τα βήματα που ακολουθούνται έχουν ως εξής:

- Αφαίρεση και απόρριψη του υπερκειμένου θρεπτικού υλικού.
- Ξέπλυμα με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- Ομογενοποίηση των κυττάρων στον πάγο με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων Buffer A (~250μl/τρυβλίο). Η σύσταση του Buffer A [10mM HEPES pH 7.9, 10mM NaCl, 0.1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 10mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 20μM β-φωσφατάση του γλυκερινικού οξέος] είναι τέτοια ώστε να πραγματοποιείται λύση μόνο των κυτταρικών μεμβρανών και απελευθέρωση του κυτταροπλασματικού κλάσματος. Επιπλέον, περιέχονται και οι αναστολείς πρωτεασών (0.5 mM PMSF, 4 μg/ml απροτινίνη, 1 mM DTT & 2 μg/ml λευπεπτίνη).
- Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα το οποίο και συλλέγεται σε ξεχωριστά erpendorfs. Η μετέπειτα κατεργασία του κυτταροπλασματικού κλάσματος είναι ακριβώς η ίδια με την προαναφερθείσα (2.2.2.α) για τις ολικές πρωτεΐνες. Δηλαδή, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια προσθήκη του 1/3 του όγκου του υπερκειμένου sample buffer, βρασμός για 3 λεπτά και φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C.

- Στο ίζημα προσθέτουμε 225 μl διαλύματος έκπλυσης (Buffer A το οποίο επίσης περιέχει 0,6% v/v διαλύματος Nonidet P-40). Το Nonidet χρησιμεύει για...Ακολουθεί πολύ ισχυρή ανάδευση και χρήση εμβόλου ή πιπέτας προκειμένου να γίνει πλήρης επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος.
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα 60 μl/δείγμα διαλύματος Buffer B [20mM HEPES pH 7.9, 400mM NaCl, 1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 10mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 20mM β-φωσφατάση του γλυκερινικού οξέος & γλυκερόλη 20 % v/v]. Η σύσταση αυτού του διαλύματος εξασφαλίζει την απομόνωση των πυρηνικών πρωτεϊνών και την παράλληλη αναστολή των πρωτεασών που είναι παρούσες. Η αναστολή των πρωτεασών επιτυγχάνεται πάλι με προσθήκη αναστολέων πρωτεασών κατάλληλης συγκέντρωσης (0.5 mM PMSF, 4 μg/ml απροτινίνη, 0.2 mM DTT & 2 μg/ml λευπεπτίνη) στο Buffer B. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται επίσης πολύ ισχυρή ανάδευση και χρήση εμβόλου ή πιπέτας προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί πλήρως το ίζημα και να απελευθερωθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πυρηνικές πρωτεΐνες.
- Επώαση για 1 ώρα στους 4°C (πάγος) υπό συνεχή ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή του υπερκειμένου το οποίο και αποτελεί το πυρηνικό κλάσμα. Όμοια με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες κρατείται μία ποσότητα δείγματος για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και στο υπόλοιπο δείγμα προστίθεται 1/3 του όγκου sample buffer.
- Ακολουθεί βρασμός για 3 λεπτά και φύλαξη στους -20°C.

2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματά μας είναι απαραίτητη προϋπόθεση πριν την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης καθώς σε κάθε πηγαδάκι στο πήκτωμα πρέπει να φορτώσουμε ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης προκειμένου να έχουμε συγκρίσιμα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford η οποία περιγράφηκε από τον ομώνυμο ερευνητή το 1976.

Αρχή μεθόδου: Το αντιδραστήριο Bradford περιέχει όξινο διάλυμα της χρωστικής Coomassie brilliant blue G-250 η οποία συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών του δείγματος. Κατά τη σύνδεση αυτή έχουμε μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595 nm λόγω σταθεροποίησης της ανιονικής μορφής της. Έτσι η οπτική πυκνότητα της απορρόφησης στα 595 nm είναι ευθέως ανάλογη της περιεχόμενης στα δείγματα πρωτεΐνης.

Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάζεται αρχικά πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης προερχόμενης από διάλυμα αλβουμίνης ορού του βοδιού (BSA). Ακολουθεί συμπλήρωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100μl και στη συνέχεια προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου Bradford, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα της πρότυπης καμπύλης καθώς και στα δείγματα στα οποία θα προσδιορίσουμε τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση όλων των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων και της πρότυπης, και φωτομέτρησή τους στα 595 nm. Τελικά, μετά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και τον υπολογισμό της αντίστοιχης εξίσωσης της ευθείας υπολογίζονται τα μg της πρωτεΐνης που περιέχονται στα μl του δείγματος στα οποία προστέθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Μετά τις κατάλληλες αναγωγές και ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης κατά την ηλεκτροφόρηση υπολογίζονται τα μl του δείγματος ώστε σε κάθε θέση στο πήκτωμα να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεϊνών.

2.2.4. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE/Poly-Acrylamide-Gel-Electrophoresis)

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Laemli.1970). Βασική αρχή αυτής της μεθόδου είναι η δημιουργία αποδιατακτικών συνθηκών με χρήση SDS (καταστροφή ομοιοπολικών δεσμών και απόδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες) και β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγή

δισουλφιδικών δεσμών και καταστροφή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών) τα οποία περιέχονται στο διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων (sample buffer). Με αυτόν τον τρόπο όλες οι πρωτεΐνες είναι αποδιαταγμένες και έχουν μόνο αρνητικό φορτίο. Έτσι, πραγματοποιείται διαχωρισμός αποκλειστικά και μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος, δηλαδή πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος και θα τις εντοπίσουμε πιο χαμηλά σε αυτό, σε σχέση με τις πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemli σε κάθετη συσκευή, δημιουργούμε 2 είδη πηκτώματος: το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοιβάξης που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και το pH. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται πρώτα στο πήκτωμα επιστοιβάξης για να εξασφαλισθεί ότι στη συνέχεια θα έχουμε ομοιόμορφη και ταυτόχρονη είσοδο τους στο πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος. Και τα 2 είδη πηκτωμάτων σχηματίζονται με πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια δις-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$).

Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη που χρησιμεύει αφενός για να παρακολουθείται η πορεία της ηλεκτροφόρησης και αφετέρου για τον προσδιορισμό (κατά προσέγγιση) του μοριακού βάρους των μελετούμενων πρωτεϊνών. Ειδικότερα, το μίγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους [από την εταιρεία New England Biolabs (prestained protein marker, Broad Range, P7708S)] που χρησιμοποιήθηκε έχει την εξής σύσταση πρωτεϊνών:

- MBP-β-γαλακτοσιδάση από *Escherichia coli*, M.W.175 KDa.
- MBP-παραμυοσίνη από *Escherichia coli*, M.W.83 KDa.
- Αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος από ήπαρ βοδιού, M.W.62 KDa.
- Αλδολάση από μυ κουνελιού, M.W.47,5 KDa.
- Ισομεράση της φωσφορικής τριόζης από μυ κουνελιού, M.W.32,5 KDa.

- β-λακτοσφαιρίνη από γάλα βοδιού, M.W.25 KDa.
- Λυσοζύμη από τη λέκιθο αυγού κοτόπουλου, M.W.16.5 KDa.
- Απροτινίνη από πνεύμονα βοδιού, M.W.6,5 KDa.

Συνοπτικά τα στάδια της ηλεκτροφόρησης είναι τα παρακάτω:

- Καθαρισμός των 2 γυάλινων πλακών ανάμεσα από τις οποίες θα τοποθετηθεί αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια το πήκτωμα επιστοίβαξης.
- Προσθήκη του πηκτώματος διαχωρισμού [375mM Tris/HCl, pH 8.8, 10% (w/v) ακρυλαμίδη, 0.275% (w/v) δις-ακρυλαμίδη, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS & 0.07% (v/v) TEMED].
- Πριν προλάβει να πολυμερισθεί το πήκτωμα διαχωρισμού προσθέτουμε στην κορυφή του απιονισμένο νερό ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του.
- Αφαίρεση του νερού και προσθήκη του πηκτώματος επιστοίβαξης [125mM Tris/HCl, pH 6.8, 5% (w/v) ακρυλαμίδη, 0.165% (w/v) δις-ακρυλαμίδη), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS & 0.07% (v/v) TEMED)] με ταυτόχρονη τοποθέτηση ειδικής «χτένας» προκειμένου να δημιουργηθούν οι θέσεις (πηγαδάκια) όπου θα τοποθετηθούν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα.
- Τοποθέτηση των γυάλινων πλακών (μόλις ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοίβαξης) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων [(Running buffer) 25mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% (w/v) SDS].
- Βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά και τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια του πηκτώματος με τη βοήθεια μικροσύριγγας των 50 μl.
- Ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση (180 Volts) για περίπου 1 ώρα. Ειδικότερα, η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη βοήθεια του διαλύματος

κατεργασίας (sample buffer) και τερματίζεται όταν η χρωστική εξέλθει από το πήκτωμα.

2.2.5. Ημίστεγνη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται αποτύπωση των πρωτεϊνικών ζωνών (με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις) όπως ακριβώς διαχωρίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση. Κατά τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στο φίλτρο της νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν χαρτιά Whatmann No3 και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προερχόμενα από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι η διαδικασία της ημίστεγνης μεταφοράς είναι απαραίτητη καθώς είναι αδύνατον να γίνει η ανοσοεντόπιση μέσα στο τρισδιάστατο πλέγμα του πηκτώματος .

Τα βασικά στάδια της μεταφοράς έχουν ως εξής:

- Κόψιμο 8 χαρτιών Whatman και 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης περίπου στο μέγεθος του πηκτώματος (9*4,5cm).
- Εμβαπτισμός του πηκτώματος, των 8 χαρτιών Whatman και της μεμβράνης σε διάλυμα μεταφοράς [(Transfer buffer) 25mM Tris pH=8.3, 192mM γλυκίνη, 10% (v/v) μεθανόλη] και ανάδευση του πηκτώματος για 10 λεπτά της μεμβράνης και των χαρτιών για 15 λεπτά.
- Διάβρεξη της συσκευής με διάλυμα μεταφοράς και τοποθέτηση από την άνοδο προς την κάθοδο : 4 χαρτιών Whatman, μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, πηκτώματος διαχωρισμού, 4 χαρτιών Whatman. Σε όλη αυτήν την πορεία ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε να μην εγκλωβισθούν φυσαλίδες και εάν αυτό συμβεί απομακρύνονται με τη βοήθεια δοκιμαστικού σωλήνα.
- Μεταφορά σε σταθερή τάση (12 Volts για 1 μεμβράνη) και για 1 ώρα.

2.2.6. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, προκειμένου αφενός να επιβεβαιώσουμε ότι όντως έγινε η μεταφορά και αφετέρου να εκτιμήσουμε με έναν αδρό τρόπο κατά πόσον έγινε ισοφόρτωση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση που προηγήθηκε. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Ponceau [0.4% (w/v) Ponceau, 7.5% TCA (w/v) (τριχλωροξικό οξύ)] να προσδένεται σε πολυπεπίδια αλλά σε αντίθεση με τη χρωστική Coomassie brilliant blue, αυτή δεν προκαλεί προβλήματα στην ανάλυση κατά Western γιατί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μπορεί να αποχρωματιστεί ύστερα από εκπλύσεις σε TBS-T [20mM Tris pH=7.6, 137 mM NaCl και 0.05% (v/v) Tween-20].

2.2.7. Ανάλυση κατά Western

Η ανάλυση κατά Western πραγματοποιείται προκειμένου να εντοπίσουμε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη μέσω ανοσοανίχνευσης.

Τα βασικά στάδια αυτής της τεχνικής έχουν ως εξής:

- Αμέσως μετά τον τερματισμό της μεταφοράς (ή τη χρώση με Ponceau) η μεμβράνη σημαδεύεται με νυστέρι στις θέσεις των δεικτών και τοποθετείται σε δοχείο με 50ml διαλύματος κάλυψης [Blocking solution: 5% (w/v) γάλα σε TBS-T] για 1 ώρα και υπό ανάδευση. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων προκειμένου να έχουμε στη συνέχεια όσο το δυνατό πιο ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.
- 4x5min εκπλύσεις με TBS-T
- Έγκλειση της μεμβράνης σε πλαστικό σακουλάκι και προσθήκη 2 ml πρώτου αντισώματος αραιωμένου 1:1000 σε διάλυμα 5% (w/v) BSA σε TBS-T (2ml TBS-T, 0.1g BSA, 2ml αντισώματος). Το πρώτο αντίσωμα είναι αυτό που αναγνωρίζει ειδικά ένα ή περισσότερους συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε.
- Ολονύκτια επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με το πρώτο αντίσωμα στους 4°C

- Αφαίρεση του πρώτου αντισώματος και 4x5min εκπλύσεις με TBS-T για αφαίρεση της περίσσειας του πρώτου αντισώματος που πιθανόν να προσδέθηκε σε μη ειδικές θέσεις.
- Επώαση σε 5 ml διαλύματος δεύτερου αντισώματος αραιωμένου 1:5000 σε Blocking solution (διάλυμα κάλυψης) [1% (w/v) γάλα σε TBS-T]. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει το Fc τμήμα (σταθερή περιοχή) του πρώτου αντισώματος και ταυτόχρονα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση.
- Επώαση και ανάδευση με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4x5min εκπλύσεις με TBS-T
- Εμφάνιση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη μεθοδολογία της **ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ECL (enhanced chemiluminescence) :**
 - Το διάλυμα ECL περιέχει H_2O_2 , λουμινόλη και ενισχυτές σήματος. Τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται κατάλληλα αμέσως πριν από την χρήση τους και η μεμβράνη επώζεται για 1 λεπτό με το ECL υπό ανάδευση, σκουπίζεται και τοποθετείται στην ειδική κασετίνα.
 - Τοποθέτηση του φιλμ και ερμητικό κλείσιμο τη κασετίνας.
 - Μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρόνου έκθεσης ο οποίος εξαρτάται από την προς ανίχνευση πρωτεΐνη, ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ στο διάλυμα του εμφανιστή (developer) για περίπου 1 λεπτό [μέχρι να αρχίσουν να εμφανίζονται οι ζώνες της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε].
 - Ξέπλυμα με νερό
 - Εμβάπτιση στο διάλυμα του σταθεροποιητή (fixer)
 - Το φιλμ στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πυκνομέτρηση σε κατάλληλο πρόγραμμα στον H/Y.

2.2.8. Αποκόλληση ανοσοσυμπλόκων από τη νιτροκυτταρίνη (stripping).

Με τη μεθοδολογία αυτή αφαιρούμε τα αντισώματα από μία μεμβράνη νιτροκυταρίνης και στη συνέχεια μπορούμε να την επαναχρησιμοποιήσουμε εκθέτοντάς τη σε διαφορετικό πρώτο αντίσωμα. Με αυτόν τον τρόπο : α)εξοικονομούμε χρόνο και αντιδραστήρια & β)μπορούμε να ελέγξουμε εάν έγινε ισοφόρτωση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιώντας πρώτο αντίσωμα έναντι μίας πρωτεΐνης που εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα μέσα στο κύτταρο π.χ. ακτίνη.

Τα βασικά στάδια αυτής της διαδικασίας έχουν ως εξής:

- Επώαση της μεμβράνης με 20 ml διαλύματος που περιέχει 62.5mM Tris/HCl, pH=6.7, 100 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη και 2% (w/v) SDS για 1 ώρα στους 55°C υπό ανάδευση.
- 4x5 min εκπλύσεις με TBS-T υπό ανάδευση.
- Επώαση με το νέο πρώτο αντίσωμα και συνέχιση της ανάλυση κατά Western όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2.2.9. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των ζώντων κυττάρων, να ανάγουν τους δακτυλίους του τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT προς κρυστάλλους φορμαζανίου. Με προσθήκη διαλύματος ισοπροπανόλης/ HCl 0.1M γίνεται διαλυτοποίηση των κρυστάλλων και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φωτόμετρο ELISA με φίλτρο 540 nm.

Πιο αναλυτικά, τα βήματα αυτής της μεθόδου έχουν ως εξής :

- Τοποθετούμε $10-12 \cdot 10^4$ κύτταρα / πηγαδάκι σε μία πλάκα MTT 96 θέσεων , φροντίζοντας κάθε πηγαδάκι να περιέχει 100 λ θρεπτικού υλικού (DMEM & FBS 15%).
- Την επόμενη μέρα και εφόσον η κάλυψη στην επιφάνεια κάθε πηγαδιού είναι περίπου 70% απομακρύνουμε με πολυπιπέτα το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούμε τρίωρη στέρηση με προσθήκη 100 λ DMEM χωρίς FBS/πηγαδάκι.

- Παρασκευή σε eppendorfs μέγιστης χωρητικότητας 1,5 ml των κατάλληλων διαλυμάτων με τους αντιοξειδωτικούς ή (και) τους προοξειδωτικούς παράγοντες σε DMEM.
- Προεπάση των κυττάρων για 30 λεπτά με τα διαλύματα των αντιοξειδωτικών κατάλληλης συγκέντρωσης (100 λ διαλύματος/πηγαδάκι).
- Απομάκρυνση των προεπαστικών διαλυμάτων & προσθήκη νέων διαλυμάτων που εκτός από τα αντιοξειδωτικά περιέχουν και την κατάλληλη συγκέντρωση του εκάστοτε προοξειδωτικού παράγοντα (100 λ διαλύματος/πηγαδάκι).
- Επάση με τους οξειδωτικούς παράγοντες (παρουσία ή απουσία των αντιοξειδωτικών) για 24 ώρες.
- Προσθήκη 20λ διαλύματος MTT (2,5 mg MTT/ml PBS) / πηγαδάκι, χωρίς την απομάκρυνση του υπερκειμένου διαλύματος, 4 ώρες πριν τη λήξη των επιδράσεων.
- Ήπια απόρριψη του υπερκειμένου με μεγάλη προσοχή ώστε να μην ξεκολλήσουν και οι κρύσταλλοι από την επιφάνεια του κάθε πηγαδιού.
- Προσθήκη 100 λ διαλύματος ισοπροπανόλης/HCl 0.1 M/πηγαδάκι.
- Κάλυψη της πλάκας MTT με αλουμινόχαρτο και ισχυρή ανάδευση σε ανάκινουμενη πλάκα για περίπου 1 ώρα μέχρι να διαπιστωθεί μακροσκοπικά πλήρης διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης.
- Φωτομέτρηση στα 540 nm σε φωτόμετρο ELISA.

2.2.10. Εκτίμηση του προτύπου κυτταρικής επιβίωσης ύστερα από χρώση με Hoechst και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Η Hoechst αποτελεί μία φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται για σήμανση του DNA και επακόλουθη εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής ή παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Απορροφά στο υπεριώδες φως (350nm) και εκπέμπει μπλε/κυανό φθορίζον χρώμα με μέγιστο στα 461nm. Η χρωστική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε ζωντανά

όσο και σε μονιμοποιημένα κύτταρα και συνήθως διαπερνά πιο εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες σε σχέση με τη χρωστική DAPI. Συγκεκριμένα, το μόριο της χρωστικής προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA αλληλεπιδρώντας ειδικά με τις βάσεις A & T και το σήμα φθορισμού είναι ανάλογο του βαθμού συμπύκνωσης του DNA. Συνεπώς, όταν πραγματοποιούνται αποπτωτικά φαινόμενα (που χαρακτηρίζονται εκτός των άλλων και από συμπύκνωση και κατακερματισμό της χρωματίνης) έχουμε και πιο έντονο σήμα φθορισμού (Mocharla R. και συν., 1987).

Συνοπτικά τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα εξής:

- Τοποθέτηση σε πλάκα 24 θέσεων ειδικών στρογγυλών καλυπτρίδων και ακτινοβόληση της με UV για 15 λεπτά.
- Τοποθέτηση σε κάθε θέση στην πλάκα 50.000 κυττάρων.
- Επώαση των κυττάρων για περίπου 2 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν στο υπόστρωμα της καλυπτρίδας
- Προσθήκη θρεπτικού με ορό μέχρι τελικού όγκου 1 ml.
- Όταν η καλυπτρίδα καλυφθεί πλήρως από κύτταρα πραγματοποιείται αφαίρεση του πλήρους θρεπτικού μέσου και αντικατάστασή του με θρεπτικό χωρίς ορό.
- Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες (στέρηση).
- Επιδράσεις με τους επιθυμητούς παράγοντες .
- Προσθήκη σε κάθε θέση 10 λεπτά πριν τη λήξη της επίδρασης 1μl χρωστικής Hoechst (συγκέντρωση stock=10mg/ml).
- Παρασκευή 1.5 ml mounting medium (υλικό συγκόλλησης που βοηθά στον φθορισμό) [2 κόκκοι PDA (p-φαινυλενοδιαμίνη), 30μl DMSO, 144.8 μl Na₂HPO₄ (0.5M), 45.2μl NaH₂PO₄ (0.5M) και γλυκερόλη μέχρι τελικού όγκου 1.5ml)].
- Προσθήκη σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα μίας σταγόνας mounting medium και στη συνέχεια τοποθέτηση της καλυπτρίδας με τέτοιο τρόπο ώστε τα κύτταρα να έρχονται σε επαφή με το mounting medium.
- Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού την επόμενη ημέρα .

Σημείωση: Όλα τα βήματα από τη στιγμή της προσθήκης της χρωστικής Hoechst γίνονται σε όσο το δυνατόν πιο σκοτεινό χώρο γιατί χειριζόμαστε φωτοευαίσθητες ουσίες.

2.2.11. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων & Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

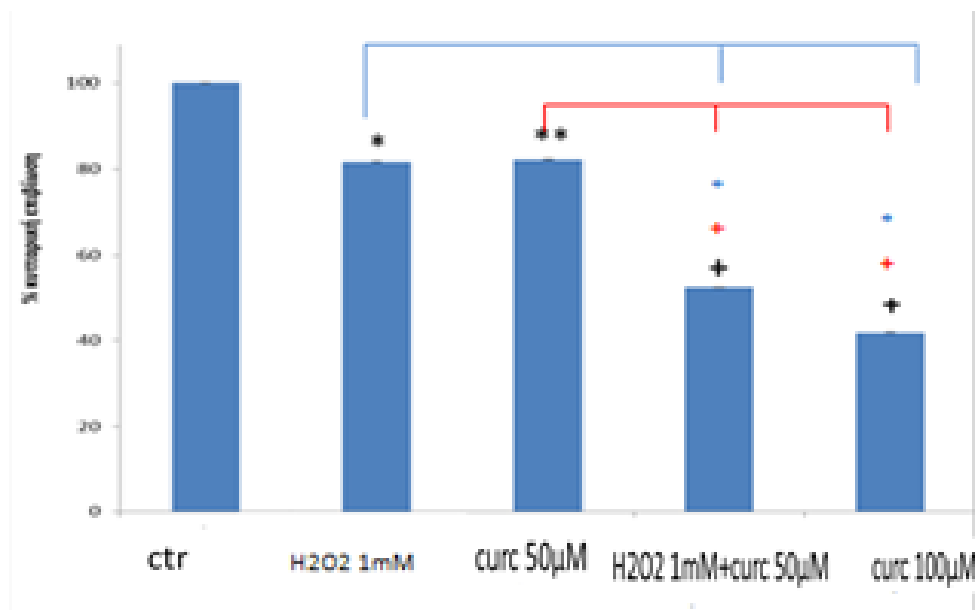
- Gel analyzer 1.0 για την πυκνομέτρηση των ζωνών των πηκτωμάτων και των φιλμ.
- Adobe Photoshop 7.0 για την επεξεργασία των εικόνων.
- Graph Pad Prism 4 & Microsoft Office Excel 2010 για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και το σχεδιασμό των γραφημάτων.
- Microsoft Office Word & Powerpoint 2010

Ειδικότερα, όσον αφορά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίσθηκαν οι φορές ενεργοποίησης σε αυθαίρετες μονάδες σε σχέση με το μάρτυρα (θεωρώντας την τιμή του μάρτυρα ίση με την μονάδα) και ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (SD) μεταξύ των τιμών για τα πειράματα που επαναλήφθηκαν 2 ή περισσότερες φορές. Πραγματοποιήθηκε επίσης στατιστική ανάλυση με χρήση του Student's t-test με σκοπό την εύρεση της στατιστικής σημαντικότητας (στατιστικά σημαντικές θεωρούνται οι τιμές για τις οποίες $p < 0.05$)

ΚΕΦ.3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ

Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας γνωρίζουμε ότι το H₂O₂ σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση (1mM) προκαλεί κυτταρικό θάνατο της τάξεως ~ 20% ο οποίος μάλιστα είναι νεκρωτικός και όχι αποπτωτικός (Kefaloyianni και συν., 2006). Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να συγκρίνουμε, με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, την προοξειδωτική δράση του H₂O₂ 1mM με αυτήν της κουρκουμίνης που είναι γνωστό ότι δημιουργεί περισσότερες μορφές ROS (Marathe και συν., 2011). Η κουρκουμίνη βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων (Pae και συν., 2007) χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 50 & 100 μM μόνη της αλλά έγινε και συνδυαστική επίδραση με κουρκουμίνη 50μM & H₂O₂ 1mM. Διαπιστώσαμε για μία ακόμη φορά ότι παρουσία H₂O₂ 1mM έχουμε στατιστικά σημαντική πτώση της κυτταρικής επιβίωσης της τάξεως του 20% (81,67±0,04% σε σχέση με το 100% του μάρτυρα) . Η κουρκουμίνη προκαλεί και αυτή στατιστικά σημαντική πτώση της κυτταρικής επιβίωσης και μάλιστα με ένα δόσοεξαρτώμενο πρότυπο (82,18±0,06% για την κουρκουμίνη 50 μM και 52,42±0,03% για την κουρκουμίνη 100 μM σε σχέση με το 100% του μάρτυρα). Τέλος η ταυτόχρονη χορήγηση κουρκουμίνης 50μM & H₂O₂ 1mM φαίνεται να έχει συνδυαστική δράση καθώς μειώνει περισσότερο από 50% την κυτταρική βιωσιμότητα (κ.επιβ: 41,80±0,01%) σε σχέση με το μάρτυρα (εικ.3.1. και πιν.3.1).



Εικ.3.1 : Επίδραση του H₂O₂ (1mM), της κουρκουμίνης[κρκ] (50 & 100μM) καθώς και του συνδυασμού τους (H₂O₂ 1mM & της κουρκουμίνης 50μM) στη βιωσιμότητα των σκελετικών μυοβλαστών. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p<0,05, **p<0,01, +p<0,001

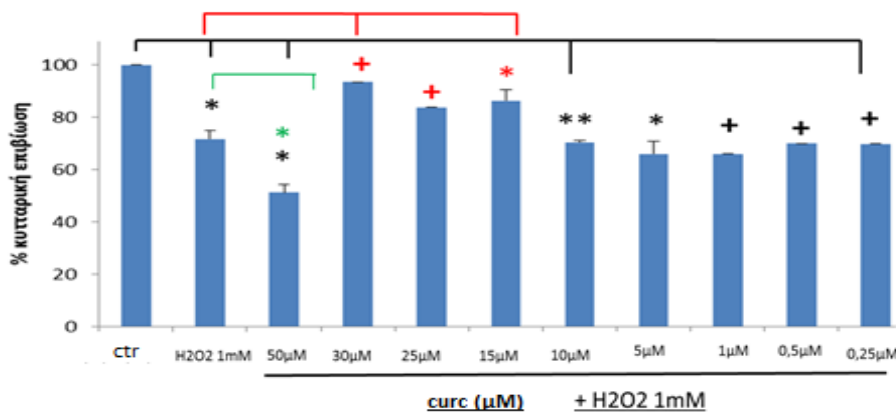
Πιν.3.1: Επίδραση του H₂O₂ και της Κουρκουμίνης στη βιωσιμότητα των σκελετικών μυοβλαστών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% κ.επιβ	SD
ctr	100	0
curc 50μM	82,18	0,06
H2O2 1mM	81,67	0,04
H2O2 1mM+curc 50μM	52,42	0,03
curc 100μM	41,8	0,01

3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

3.2.1 Δοσοεξαρτώμενη προεπώαση με Κουρκουμίνη

Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η κουρκουμίνη είναι ένα μόριο που παρουσιάζει, ανάλογα με τη συγκέντρωσή της και το είδος του προοξειδωτικού παράγοντα που είναι παρόν, άλλοτε προοξειδωτική και άλλοτε αντιοξειδωτική δράση (Fujisawa και συν., 2006). Για το σκοπό αυτό έγινε μισάωρη προεπώαση με κουρκουμίνη από 50-0,25μM και ακολούθως επίδραση με H₂O₂ 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι η προεπώαση με κουρκουμίνη 50 μM προκαλεί στατιστικά σημαντική πτώση της κυτταρικής επιβίωσης (κ.επιβ:51,16±3,03%) σε σχέση με το μάρτυρα αλλά και σε σχέση με το H₂O₂ 1mM (κ.επιβ:71,76±3,23%). Αντίθετα, η κουρκουμίνη στο εύρος συγκεντρώσεων 30-15μM βελτιώνει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης (κ.επιβ: 93,52±0,02% για τα 30 μM & 86,39±4,02% για τα 15μM) σε σχέση με το H₂O₂ 1mM (κ.επιβ:71,76±3,23%). Τέλος, η κουρκουμίνη στο εύρος συγκεντρώσεων 10-0,25 μM δεν φαίνεται να μπορεί να αναστείλει τον επαγόμενο από το H₂O₂ 1mM κυτταρικό θάνατο (εικ.3.2. & πίν.3.2).



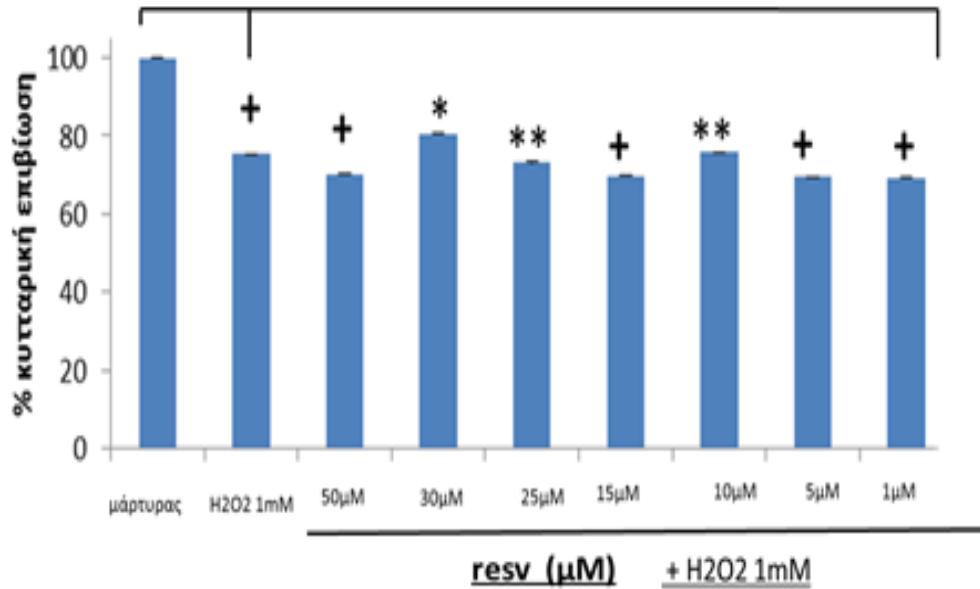
Εικ.3.2: Επίδραση της κουρκουμίνης στην επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM & 24 ώρες) μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Πραγματοποιήθηκε μισάωρη δοσοεξαρτώμενη προεπώαση με κουρκουμίνη στο εύρος συγκεντρώσεων 50-0,25μM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p<0,05, **p<0,01, +p<0,001

Πιν.3.2: Επίδραση της προεπώασης με κουρκουμίνη στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης[%κ.επιβ.].

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% κ.επιβ.	SD
ctr	100	0
H2O2 1mM	71,76	3,23
H2O2 1mM+curc 50μM	51,16	3,03
H2O2 1mM+curc 30μM	93,52	0,02
H2O2 1mM+curc 25μM	83,75	0,02
H2O2 1mM+curc 15μM	86,39	4,02
H2O2 1mM+curc 10μM	70,45	0,54
H2O2 1mM+curc 5μM	65,97	4,96
H2O2 1mM+curc 1μM	65,96	0,01
H2O2 1mM+curc 5μM	69,95	0,01
H2O2 1mM+curc 0,25μM	69,78	0,01

3.2.2 Δοσοεξαρτώμενη Προεπώση με Ρεσβερατρόλη

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης που είναι ένα επίσης γνωστο από τη βιβλιογραφία αντιοξειδωτικό μόριο (Frombaum και συν., 2011). Για το σκοπό αυτό έγινε μισάωρη προεπώση με ρεσβερατρόλη από 50-0,25μM και ακολούθως επίδραση με H₂O₂ 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν μπορούσαν να βελτιώσουν στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από το H₂O₂ 1mM μείωση (κ.επιβ:75,32±0,04%) της κυτταρικής επιβίωσης[%κ.επιβ.]. Ωστόσο, επειδή στα 30 μM ρεσβερατρόλης (κ.επιβ:80,53±0,09%) διαπιστώσαμε την πιο μεγάλη, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με το H₂O₂ 1mM (κ.επιβ:75,32±0,04%), αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε αυτή τη συγκέντρωση στα περαιτέρω πειράματα (εικ.3.3 & πιν.3.3).



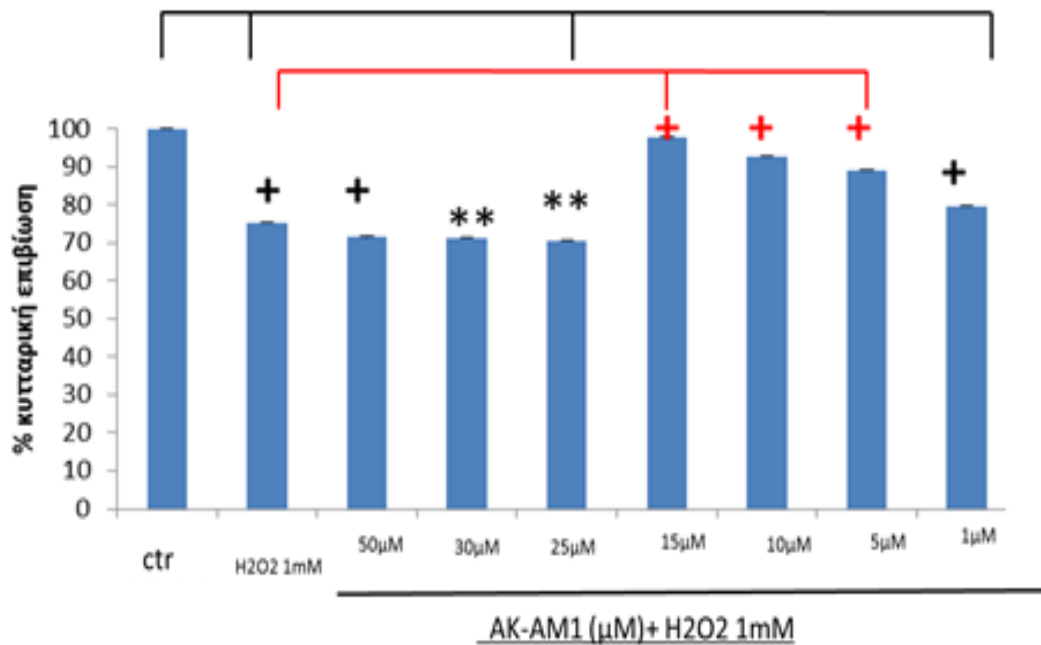
Εικ.3.3: Επίδραση της ρεσβερατρόλης στην επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM & 24 ώρες) μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Πραγματοποιήθηκε μισάωρη δοσοεξαρτώμενη προεπάση με ρεσβερατρόλη στο εύρος συγκεντρώσεων 50-1μM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student *t*-test. **p*<0,05, ***p*<0,01, +*p*<0,001

Πιν.3.3: Επίδραση της προεπάσης με ρεσβερατρόλη[ρεσβ] στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης[%κ.επιβ.].

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% κ.επιβ.	SD
ctr	100	0
H2O2 1mM	75,32	0,04
H2O2 1mM+resv 50μM	70,23	0,02
H2O2 1mM+resv 30μM	80,53	0,09
H2O2 1mM+resv 25μM	73,24	0,05
H2O2 1mM+resv 15μM	69,84	0,01
H2O2 1mM+resv 10μM	75,82	0,07
H2O2 1mM+resv 5μM	69,61	0,03
H2O2 1mM+resv 1μM	69,41	0,03

3.2.3 Δοσοεξαρτώμενη προεπώση με τη Βενζοξαζίνη AK-AM1

Η Βενζοξαζίνη AK-AM1 [2-(4-διφαινυλ)-4μεθυλ-3-δύδρο-2H-βένζο(1,4)οξαζι-2-όλη] αποτελεί ένα νέο μόριο που συνέθεσαν οι Martalis και συν., 2011 του οποίου η πιθανή αντιοξειδωτική δράση δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε σχέση με το επαγόμενο από το H₂O₂ οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μισάωρη προεπώση με το AK-AM1 από 50-1μM και ακολούθως επίδραση με H₂O₂ 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι το AK-AM1 βελτιώνει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης στο εύρος συγκεντρώσεων 15-5μM (κ.επιβ: 97,68±0,02% για τα 15μM και 89,08±0,03% για τα 5μM) σε σχέση με το H₂O₂ 1mM (κ.επιβ:75,32±0,04%). Αντίθετα, συγκεντρώσεις AK-AM1 μεγαλύτερες ή ίσες των 30μM και μικρότερες των 5μM δεν φαίνεται να μπορούν να αποτρέψουν την επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης (εικ.3.4 & πιν.3.4)



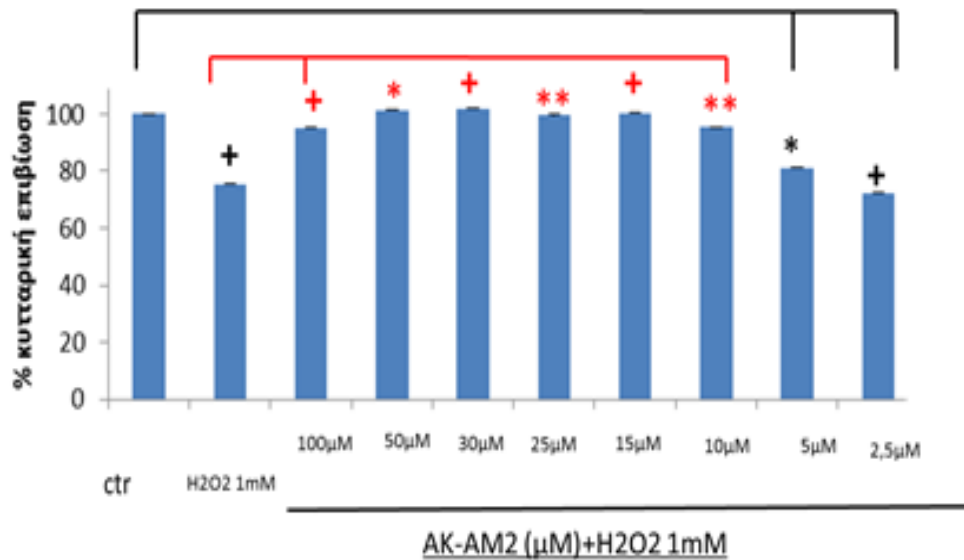
Εικ.3.4: Επίδραση της βενζοξαζίνης AK-AM1 στην επαγόμενη από το H_2O_2 (1mM & 24 ώρες) μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Πραγματοποιήθηκε μισάωρη δόσοεξαρτώμενη προεπάωση με AK-AM1 στο εύρος συγκεντρώσεων 50-1μM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student *t*-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

Πιν.3.4: Επίδραση της προεπώασης με βενζοξαζίνη AK-AM1 στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης[%κ.επιβ.].

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	%κ.επιβ.	SD
ctr	100	0,04
H2O2 1mM	75,32	0,04
H2O2 1mM+AK-AM1 50μM	71,54	0,05
H2O2 1mM+AK-AM1 30μM	71,28	0,05
H2O2 1mM+AK-AM1 25μM	70,61	0,04
H2O2 1mM+AK-AM1 15μM	97,68	0,02
H2O2 1mM+AK-AM1 10μM	92,76	0,03
H2O2 1mM+AK-AM1 5μM	89,08	0,03
H2O2 1mM+AK-AM1 1μM	79,63	0,03

3.2.4 Δοσοεξαρτώμενη προεπώαση με τη Βενζοθειαζίνη AK-AM2

Η Βενζοθειαζίνη AK-AM2 [2-(4-διαφαινυλ)-4μεθυλ-3-δihυδρο-2H-βένζο(1,4)οξαθειαζιν-2-όλη] αποτελεί ένα ακόμη νέο μόριο που συνέθεσαν οι Martalis και συν., 2011 του οποίου επίσης η πιθανή αντιοξειδωτική δράση δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε σχέση με το επαγόμενο από το H₂O₂ οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μισάωρη προεπώαση με το AK-AM2 από 100-2,5μM και ακολούθως επίδραση με H₂O₂ 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι το AK-AM2 στο εύρος συγκεντρώσεων 100-10μM, επαναφέρει την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα (95,16±0,08% για τα 100μM & 95,43±0,07% για τα 10μM). Ωστόσο σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το AK-AM2 δεν μπορεί τελικά να βελτιώσει με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης (εικ.3.5 & πιν.3.5).



Εικ.3.5: Επίδραση της βενζοθειαζίνης AK-AM2 στην επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM & 24 ώρες) μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Πραγματοποιήθηκε μιάωρη δόσοεξαρτώμενη προεπάωση με AK-AM2 στο εύρος συγκεντρώσεων 100-2,5μM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p<0,05, **p<0,01, +p<0,001

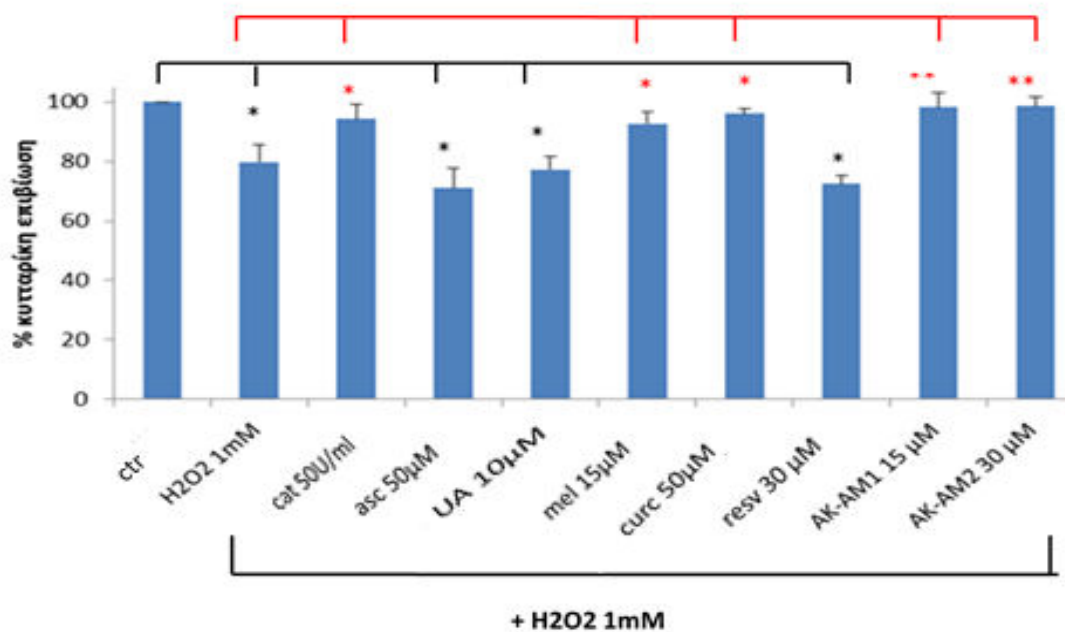
Πιν.3.5: Επίδραση της προεπώασης με βενζοθειαζίνη AK-AM2 στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης[%κ.επιβ.].

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% κ.επιβ.	SD
ctr	100	0
H2O2 1mM	75,32	0,04
H2O2 1mM+AK-AM2 100μM	95,16	0,08
H2O2 1mM+AK-AM2 50μM	101,34	0,17
H2O2 1mM+AK-AM2 30μM	101,96	0,04
H2O2 1mM+AK-AM2 25μM	99,65	0,04
H2O2 1mM+AK-AM2 15μM	100,32	0,02
H2O2 1mM+AK-AM2 10μM	95,43	0,07
H2O2 1mM+AK-AM2 5μM	81,12	0,08
H2O2 1mM+AK-AM2 2,5μM	72,27	0,02

3.2.5 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη, AK-AM1, AK-AM2, μελατονίνη, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ & καταλάση έναντι του H₂O₂.

Με τη βοήθεια των παραπάνω πειραμάτων καταλήξαμε ότι για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων έναντι του H₂O₂ είναι : κουρκουμίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM). Στη συνέχεια θελήσαμε να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των τεσσάρων μορίων με τρία σημαντικά ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα δηλ.το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση (50U/ml), την αντιοξειδωτική ορμόνη μελατονίνη (15μM) καθώς και το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών, ουρικό οξύ (10μM). Επιπλέον, εξετάσαμε και την πιθανή αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη-c) το οποίο και χορηγήθηκε σε μία κλασσική φαρμακολογική (Chen και συν., 2007) συγκέντρωση (50μM). Οι δύο συγκεντρώσεις για την καταλάση και τη μελατονίνη στηρίχθηκαν σε προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα (Aggeli και συν., 2010, Luchetti και συν., 2010). Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος αποφασίστηκε τόσο βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων (Sautin και Johnson., 2008) όσο και βάσει των σοβαρών περιορισμών που μας έθεσε η διαλυτότητά του.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η προεπώση με την κουρκουμίνη (κ.επιβ:96,05±1,74%), καθώς και με τα νεοσυντιθέμενα μόρια AK-AM1 (κ.επιβ:98,15±5,03%) & AK-AM2 (κ.επιβ:98,56±3,05%) επαναφέρει την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα και οδηγεί σε μία αντιοξειδωτική δράση εφάμιλλη της καταλάσης (κ.επιβ:94,2±4,89%) και της μελατονίνης (κ.επιβ:92,74±4,10%). Αντίθετα, το ουρικό οξύ (κ.επιβ:77,2±4,31%), το ασκορβικό οξύ (κ.επιβ:70,93±6,85) και η ρεσβερατρόλη (κ.επιβ:72,38±2,96%) αδυνατούν να βελτιώσουν, με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο, την επαγόμενη από το H₂O₂ (κ.επιβ:79,75±5,72%) πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας (εικ.3.6 & πιν.3.6).



Εικ.3.6: Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη 15μM, ρεσβερατρόλη[ρεσβ] 30μM, AK-AM1 15μM, AK-AM2 30μM, μελατονίνη[μελ] 15μM, ουρικό οξύ[ουρ.οξύ] 10μM, ασκορβικό οξύ[ασκ.οξύ] 50μM & καταλάση[κατ] 50U/ml έναντι του H₂O₂ 1mM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p<0,05, **p<0,01, +p<0,001

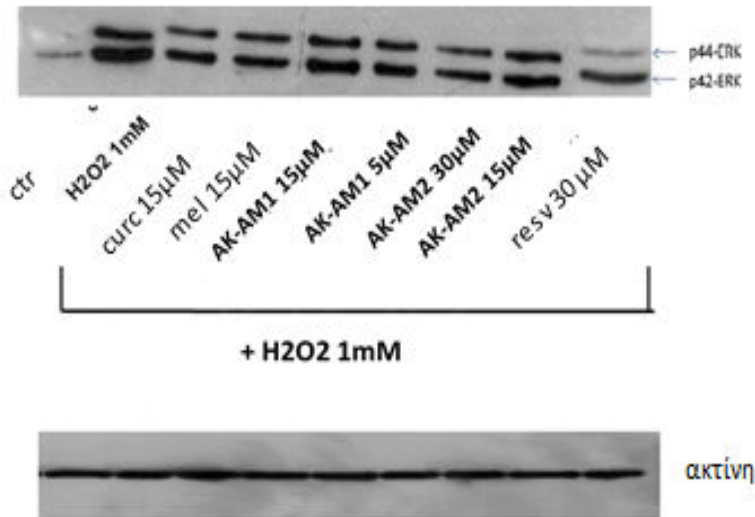
Πιν.3.6: Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη, AK-AM1, AK-AM2, μελατονίνη, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ & καταλάση έναντι του H₂O₂.

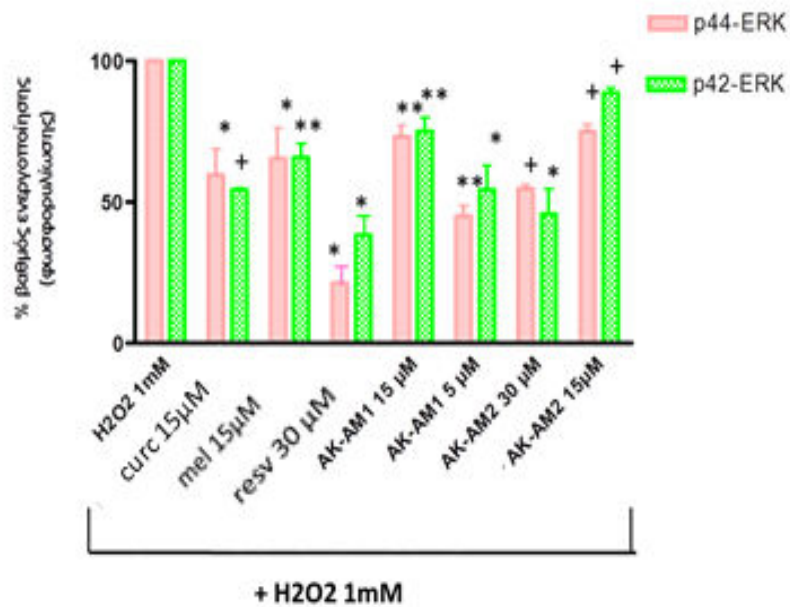
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	%κ.επιβ.	SD
ctr	100	0
H ₂ O ₂ 1mM	79,75	5,72
H ₂ O ₂ 1mM+cat 50U/ml	94,2	4,89
H ₂ O ₂ 1mM+asc 50μM	70,93	6,85
H ₂ O ₂ 1mM+UA 10μM	77,2	4,31
H ₂ O ₂ 1mM+mel 15μM	92,74	4,1
H ₂ O ₂ 1mM+curc 15μM	96,05	1,74
H ₂ O ₂ 1mM+resv 30μM	72,38	2,96
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM1 15μM	98,15	5,03
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM2 30μM	98,56	3,05

3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

3.3.1. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των ERKs.

Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας (Kefaloyianni και συν., 2006) γνωρίζουμε ότι η επίδραση με H₂O₂ 1mM για 15' προάγει έντονη ενεργοποίηση των κινασών p44-ERK & p42-ERK μέσω φωσφορυλίωσης. Με ανάλυση κατά Western, διαπιστώθηκε ότι η μισάωρη προεπώαση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες κουρκουμίνη (15μM), μελατονίνη (15μM), AK-AM1 (15 & 5μM), AK-AM2 (30 & 15μM), ρεσβερατρόλη (30μM) & ουρικό οξύ (10μM) οδηγεί σε μία στατιστικά σημαντική αναστολή της % ενεργοποίησης των ERKs σε σχέση με το H₂O₂ 1mM για 15 λεπτά (εικ.3.7). Τα συγκεκριμένα % ποσοστά ενεργοποίησης για την p44-ERK & p42-ERK, παρουσία των διάφορων αντιοξειδωτικών παραγόντων δείχνονται στον πίνακα 3.7.



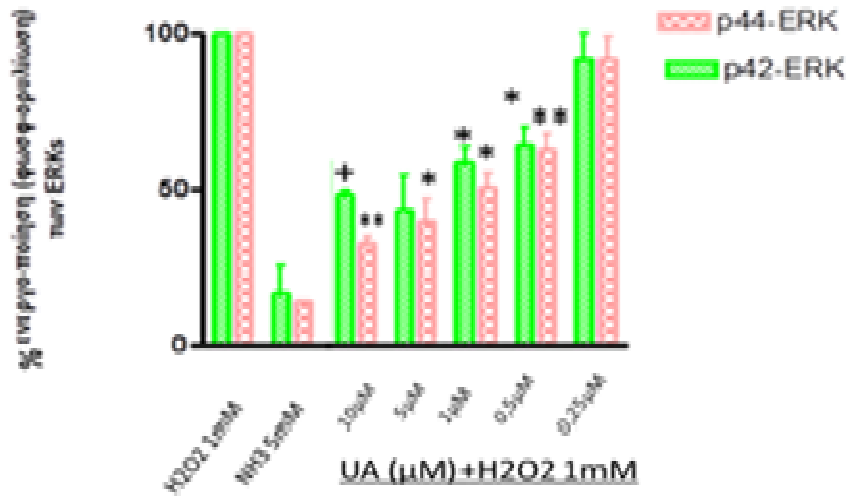
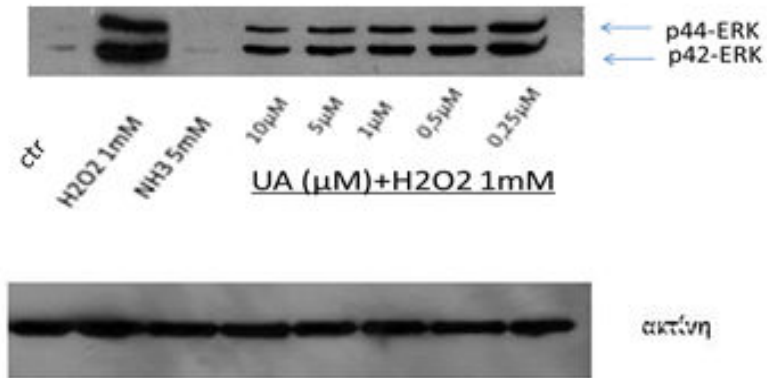


Εικ.3.7: Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη (15μM), μελατονίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15 & 5μM) & AK-AM2 (30 & 15μM) παρουσία H₂O₂ (1mM για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορύλιωσης/ενεργοποίησης των ERKs. Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM για 15 λεπτά) ενεργοποίηση. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ισόφορτωση των δειγμάτων έγινε επίσης ανίχνευση της ακτίνης που εκφράζονται σε σταθερά επίπεδα μέσα στο κύτταρο. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p<0,05, **p<0,01, +p<0,001

Πιν.3.7 : Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2 & ρεσβερατρόλη στην επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των ERKs.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	p44-ERK		p42-ERK	
	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)
H ₂ O ₂ 1mM	100	-----	100	-----
H ₂ O ₂ 1mM+curc 15μM	59,51	8,29	54,3	1,25
H ₂ O ₂ 1mM+mel 15μM	65,59	9,19	65,74	7,15
H ₂ O ₂ 1mM+resv 30μM	25,5	3,26	47,53	5,31
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM1 15μM	73,09	6,04	75,08	7,13
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM1 5μM	45,1	5,39	54,47	8,66
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM2 30μM	54,68	2,43	45,86	8,57
H ₂ O ₂ 1mM+AK-AM2 15μM	74,99	3,57	88,81	2,28

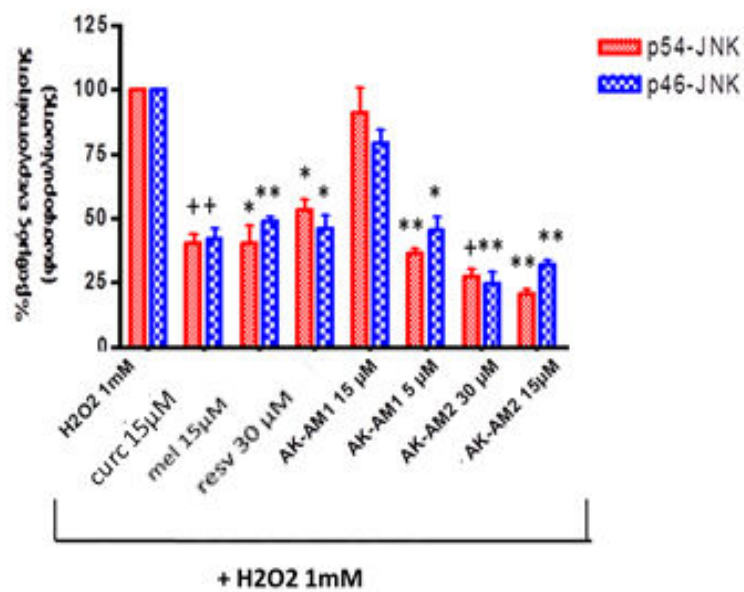
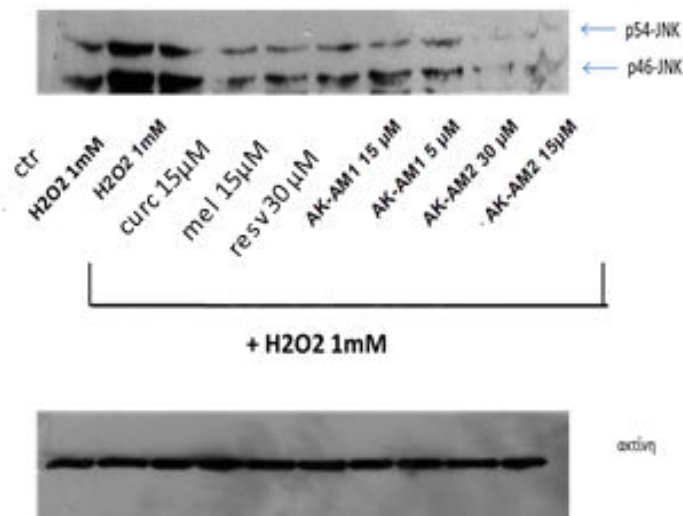
Η ικανότητα του ουρικού οξέος να αναστέλλει την επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των ERKs μελετήθηκε σε μία ξεχωριστή ομάδα πειραμάτων λόγω των πολλών ιδιοτεροτήτων που παρουσιάζει η διαλυτότητά του. Συγκεκριμένα, το ουρικό οξύ διαλύθηκε σε ένα αμμωνιακό υδατικό διάλυμα που είναι αλκαλικό και άρα επηρεάζει αρνητικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο, η μέγιστη συγκέντρωση ουρικού οξέος, διαλυμένου στο συγκεκριμένο διαλύτη, που μπορούσαμε να χορηγήσουμε με ασφάλεια στο θεραπευτικό μέσο των κυττάρων ήταν τα 10μM. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε ένα εύρος συγκεντρώσεων ουρικού οξέος από 10-0,25μM καθώς και το διαλύτη του ουρικού οξέος μόνο του. Διαπιστώθηκε ότι η μισάωρη προεπάση με ουρικό οξύ αναστέλλει με ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο την επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM για 15 λεπτά) ενεργοποίηση των ERKs και είναι μέγιστη για τα 10μM ουρικού οξέος (32,28±3,08% για την p44-ERK & 48,14± 1,83% για την p42-ERK). Τέλος, ο διαλύτης του ουρικού οξέος μόνος του δεν φάνηκε να προκαλεί κάποια στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση των ERKs (εικ.3.8).



Εικ.3.8: Δοσοεξαρτώμενο πρότυπο επίδρασης του αντιοξειδωτικού παραγόντα ουρικού οξέος παρουσία H_2O_2 (1mM για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των ERKs. Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από το H_2O_2 (1mM για 15 λεπτά) ενεργοποίηση. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student *t*-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$ (στατιστικά σημαντική μείωση της % ενεργοποίησης σε σχέση με το H_2O_2).

3.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H_2O_2 ενεργοποίηση των JNKs.

Πέραν της προαναφερθείσας ενεργοποίησης των ERKs, οι προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Kefaloyianni και συν., 2006) έδειξαν ότι η επίδραση με H_2O_2 1mM για 15' προάγει έντονη ενεργοποίηση και των κινασών p54-JNK & p46-JNK μέσω φωσφορυλίωσης. Διαπιστώθηκε ότι η μισάωρη προεπάση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες κουρκουμίνη (15μM), μελατονίνη (15μM), AK-AM1 (5μM), AK-AM2 (30 & 15μM) & ρεσβερατρόλη (30μM) οδηγεί σε μία στατιστικά σημαντική αναστολή της % ενεργοποίησης των JNKs σε σχέση με το H_2O_2 1mM για 15 λεπτά (εικ.3.9). Πρέπει ωστόσο να επισημανθεί ότι το ουρικό οξύ παρουσιάζει την καλύτερη ανασταλτική δράση πάλι στα 10μM αλλά η % αναστολή της ενεργοποίησης των JNKs είναι στατιστικά σημαντική μόνο για την p46 ισομορφή (32,28±3,08% ενεργοποίηση σε σχέση με το 100% του H_2O_2), αλλά όχι για την p54 (δεδομένα που δεν φαίνονται στην εικόνα 3.9). Τα συγκεκριμένα % ποσοστά ενεργοποίησης για την p44-ERK & p42-ERK, παρουσία των διάφορων αντιοξειδωτικών παραγόντων δείχνονται στον πίνακα 3.8.



Εικ.3.9: Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη (15µM), μελατονίνη (15µM), ρεσβερατρόλη (30µM), AK-AM1 (15 & 5µM) & AK-AM2 (30 & 15µM) παρουσία H₂O₂ (1mM για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των JNKs. Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM για 15 λεπτά) ενεργοποίηση. Το πείραμα

επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$ (στατιστικά σημαντική μείωση της % ενεργοποίησης σε σχέση με το H_2O_2).

Πιν.3.8 : Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2 & ρεσβερατρόλη στην επαγόμενη από το H_2O_2 ενεργοποίηση των JNKs.

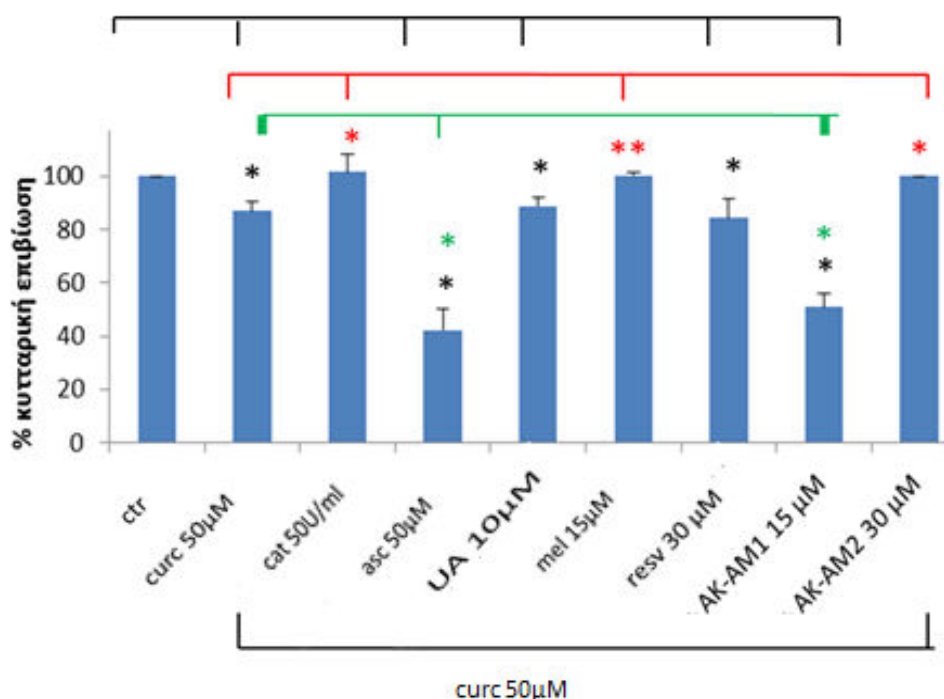
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	p54-JNK		p46-JNK	
	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)
H2O2 1mM	100	-----	100	-----
H2O2 1mM+curc 15μM	40,32	6,38	42,31	6,7
H2O2 1mM+mel 15μM	40,66	9,1	48,96	2,14
H2O2 1mM+resv 30μM	53,25	5,77	46,34	6,58
H2O2 1mM+AK-AM1 15μM	91,31	9,06	79,13	9,51
H2O2 1mM+AK-AM1 5μM	36,4	2,61	45,29	7,25
H2O2 1mM+AK-AM2 30μM	27,34	3,88	24,71	6,49
H2O2 1mM+AK-AM2 15μM	20,81	2,25	31,74	2,72

3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τον τρόπο δράσης των αντιοξειδωτικών παραγόντων καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), μελατονίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM), αποφασίσαμε να χορηγήσουμε ως προοξειδωτικό παράγοντα την κουρκουμίνη (50 μM) που παράγει περισσότερες μορφές ROS σε σχέση με το H_2O_2 1mM. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι η μισάωρη προεπώαση με τη νεοσυντιθέμενη βενζοθειαζίνη AK-AM2 (κ.επιβ:99,98±0,03%), το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση (κ.επιβ:100±0,08%) και την αντιοξειδωτική ορμόνη μελατονίνη (κ.επιβ:100±0,01%) επαναφέρουν την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα. Αντίθετα, το ουρικό οξύ (κ.επιβ:90,07±0,03%) και η ρεσβερατρόλη (81,71±0,08%) αδυνατούν, όπως και στην περίπτωση του H_2O_2 1mM, να

βελτιώσουν τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με την κουρκουμίνη (κ.επιβ:87,12±3,51%).

Τέλος, είναι αξιοσημείωτη η αλλαγή της δράσης του ασκορβικού οξέος (κ.επιβ:44,22±8,12%) και της βενζοξαζίνης AK-AM1 (κ.επιβ:50,88±5,3%) σε προοξειδωτικά μόρια, καθώς η κυτταρική επιβίωση μειώθηκε στατιστικά σημαντικά όχι μόνο ως προς το μάρτυρα αλλά και ως προς την κουρκουμίνη (εικ.3.10 & πιν.3.9).



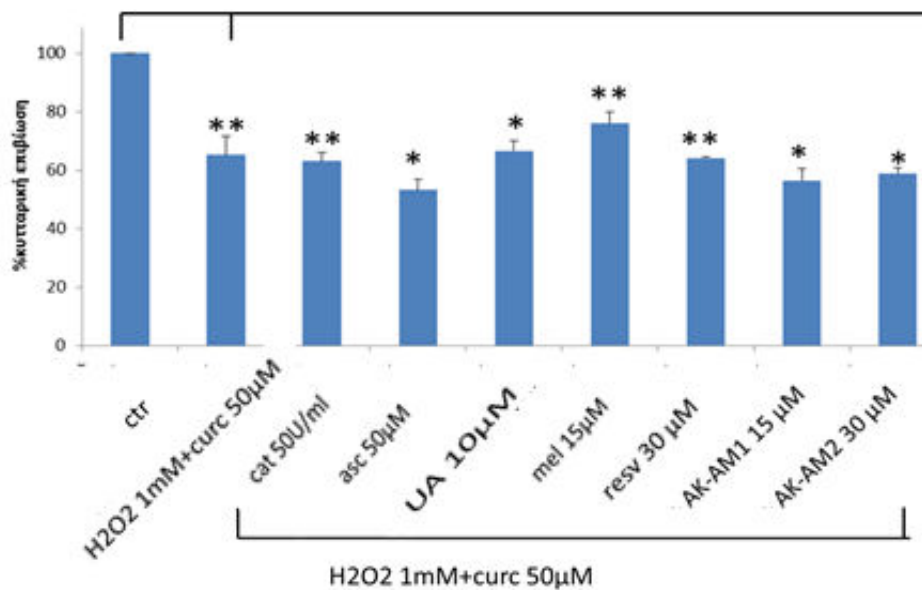
Εικ.3.10: Σύγκριση της δράσης των παραγόντων ρεσβερατρόλη 30μM, AK-AM1 15μM, AK-AM2 30μM, μελατονίνη 15μM, ουρικό οξύ 10μM, ασκορβικό οξύ 50μM & καταλάση 50U/ml έναντι της κουρκουμίνης 50μM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

Πιν.3.9: Σύγκριση της δράσης των παραγόντων ρεσβερατρόλη 30μM, AK-AM1 15μM, AK-AM2 30μM, μελατονίνη 15μM, ουρικό οξύ 10μM, ασκορβικό οξύ 50μM & καταλάση 50U/ml έναντι της κουρκουμίνης 50μM.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% Κ.ΕΠΙΒ.	SD
ctr	100	-----
curc 50μM	87,12	3,51
curc 50μM+cat 50U/ml	100	0,08
curc 50μM+asc 50μM	42,22	8,12
curc 50μM+UA 10μM	90,07	0,03
curc 50μM+mel 15μM	100	0,01
curc 50μM+resv 30μM	87,71	0,08
curc 50μM+AK-AM1 15μM	50,88	5,3
curc 50μM+AK-AM2 30μM	99,98	0,03

3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H₂O₂ & ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε το κατά πόσον κάποιος από τους παράγοντες καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), μελατονίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) μπορεί να παρουσιάσει αντιοξειδωτική δράση έναντι πολύ ισχυρού οξειδωτικού στρες επαγόμενου από τη συνδυαστική παρουσία κουρκουμίνης 50μM & H₂O₂ 1mM. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώσαμε ότι κανένας από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν μπορεί να βελτιώσει στατιστικά σημαντικά την κυτταρική επιβίωση (εικ.3.11& πιν.3.10) σε σχέση με την κουρκουμίνη 50μM & H₂O₂ 1mM (κ.επιβ:65,19±6,44%).



Εικ.3.11: Σύγκριση της δράσης των παραγόντων ρεσβερατρόλη 30μM, AK-AM1 15μM, AK-AM2 30μM, μελατονίνη 15μM, ουρικό οξύ 10μM, ασκορβικό οξύ 50μM & καταλάση 50U/ml έναντι της συνδυαστικής παρουσίας κουρκουμίνης 50μM & H₂O₂ 1mM. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

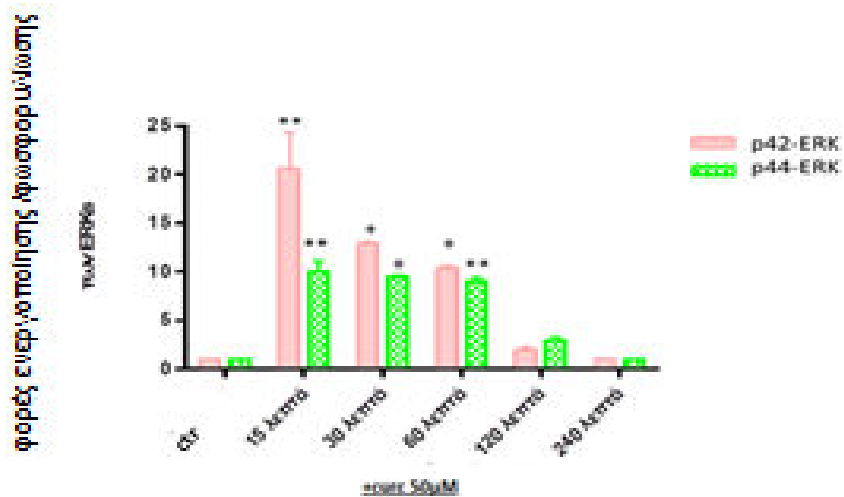
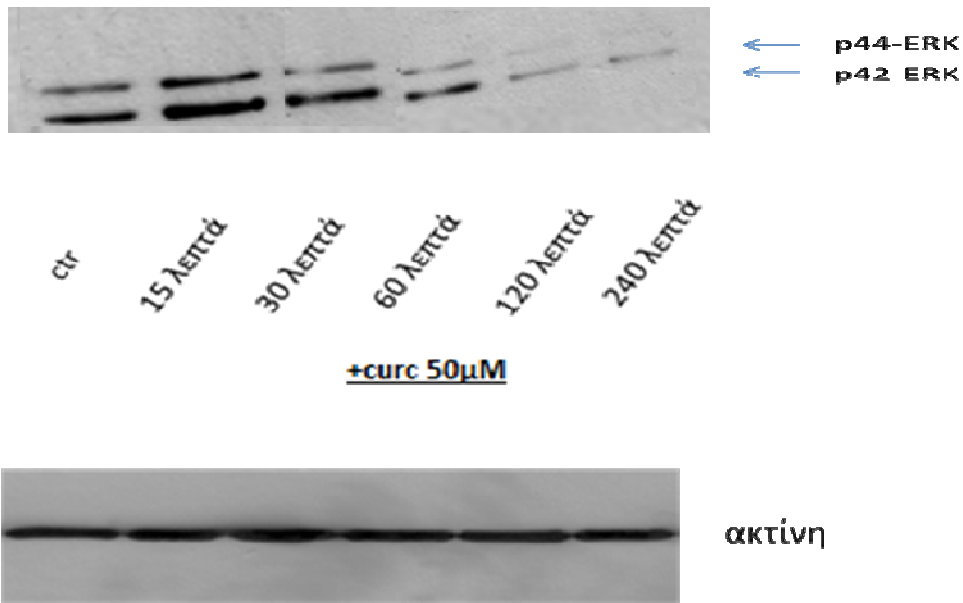
Πιν.3.10: Σύγκριση της δράσης των παραγόντων ρεσβερατρόλη 30μM, AK-AM1 15μM, AK-AM2 30μM, μελατονίνη 15μM, ουρικό οξύ 10μM, ασκορβικό οξύ 50μM & καταλάση 50U/ml έναντι της κουρκουμίνης 50μM & H₂O₂ 1mM .

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% Κ.ΕΠΙΒ.	SD
ctr	100	-----
H2O2 1mM+curc 50μM	65,16	6,44
H2O2 1mM+curc 50μM+cat 50U/ml	63,05	3,14
H2O2 1mM+curc 50μM+asc 50μM	53,16	3,56
H2O2 1mM+curc 50μM+UA 10μM	66,55	3,65
H2O2 1mM+curc 50μM+mel 15μM	75,96	3,89
H2O2 1mM+curc 50μM+resv 30μM	64,11	0,49
H2O2 1mM+curc 50μM+AK- AM1 15μM	56,51	0,97
H2O2 1mM+curc 50μM+AK- AM2 30μM	58,97	3,89

3.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ

3.6.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό ενεργοποίησης των ERKs

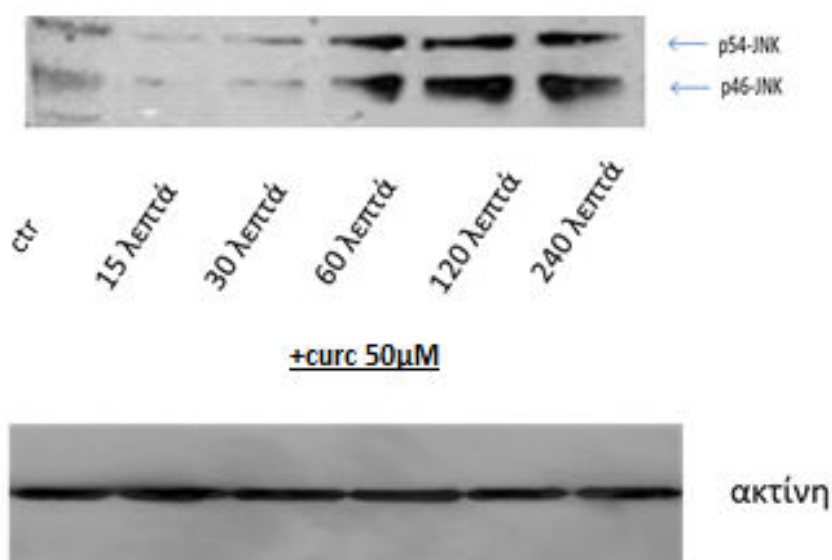
Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω την προοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης 50μM αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τα πιθανά επλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια. . Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης των ERKs ύστερα από επίδραση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 50 μM. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική & μέγιστη αύξηση (εικ.3.12) της ενεργοποίησης των ERKs στα 15 λεπτά επίδρασης (10,10±1,39 φορές ενεργοποίησης για την p44-ERK & 26,61±5,19 φορές ενεργοποίησης για την p42-ERK σε σχέση με το μάρτυρα), η οποία σταδιακά μειώνεται από τα 30 λεπτά (9,48±0,21 φορές ενεργοποίησης για την p44-ERK & 12,9±0,2 φορές ενεργοποίησης για την p42-ERK), ενώ φτάνει σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα 120 λεπτά επίδρασης (2,98±0,42 φορές ενεργοποίησης για την p44-ERK & 2,05±0,26 φορές ενεργοποίησης για την p42-ERK). Τέλος στα 240 λεπτά επίδρασης με κουρκουμίνη 50 μM τα επίπεδα ενεργοποίησης είναι ίδια με του μάρτυρα. Βάσει αυτού του αποτελέσματος, τα πειράματα που ακολούθησαν για τη μελέτη του ρόλου των p-ERKs πραγματοποιήθηκαν στα 15 λεπτά επίδρασης.

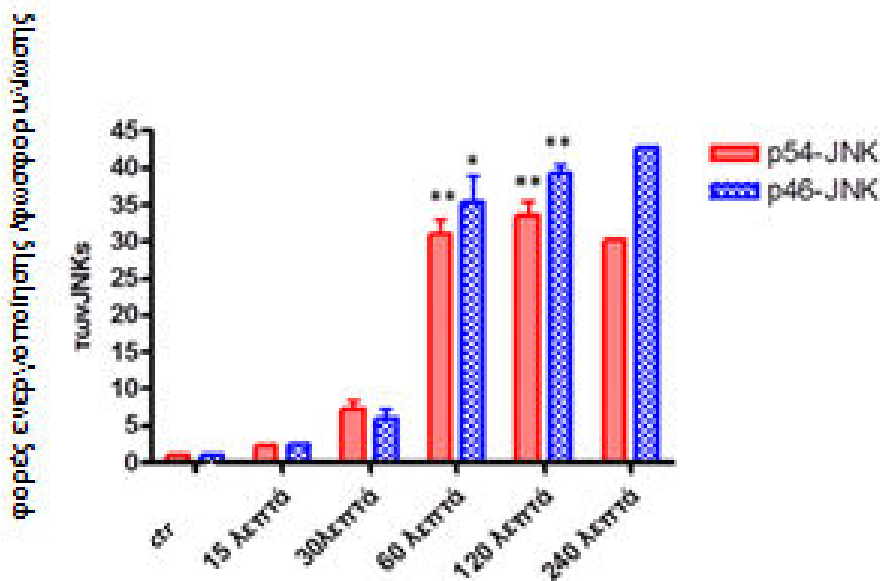


Εικ.3.12: Μελέτη του χρονοεξαρτώμενου προτύπου ενεργοποίησης των ERKs ύστερα από επίδραση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 50μM. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$ (στατιστικά σημαντική αύξηση του βαθμού ενεργοποίησης ως προς το μάρτυρα)

3.6.2 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό ενεργοποίησης των JNKs.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε και τον πιθανό ρόλο των JNKs στο επαγόμενο από την κουρκουμίνη οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης των JNKs ύστερα από επίδραση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 50 μ M. Διαπιστώθηκε ότι αυξανόμενου του χρόνου επίδρασης με την κουρκουμίνη έχουμε και σταδιακή αύξηση του βαθμού ενεργοποίησης των JNKs ο οποίος και μεγιστοποιείται μεταξύ 60 και 240 λεπτών (εικ.3.13). Βάσει αυτού του δεδομένου, αποφασίσαμε τα μετέπειτα πειράματα να πραγματοποιούνται στα 120 λεπτά χρόνου επίδρασης ($33,52 \pm 2,83\%$ ενεργοποίηση για την p54-JNK & $39,31 \pm 1,66\%$ για την p46-JNK σε σχέση με το μάρτυρα).



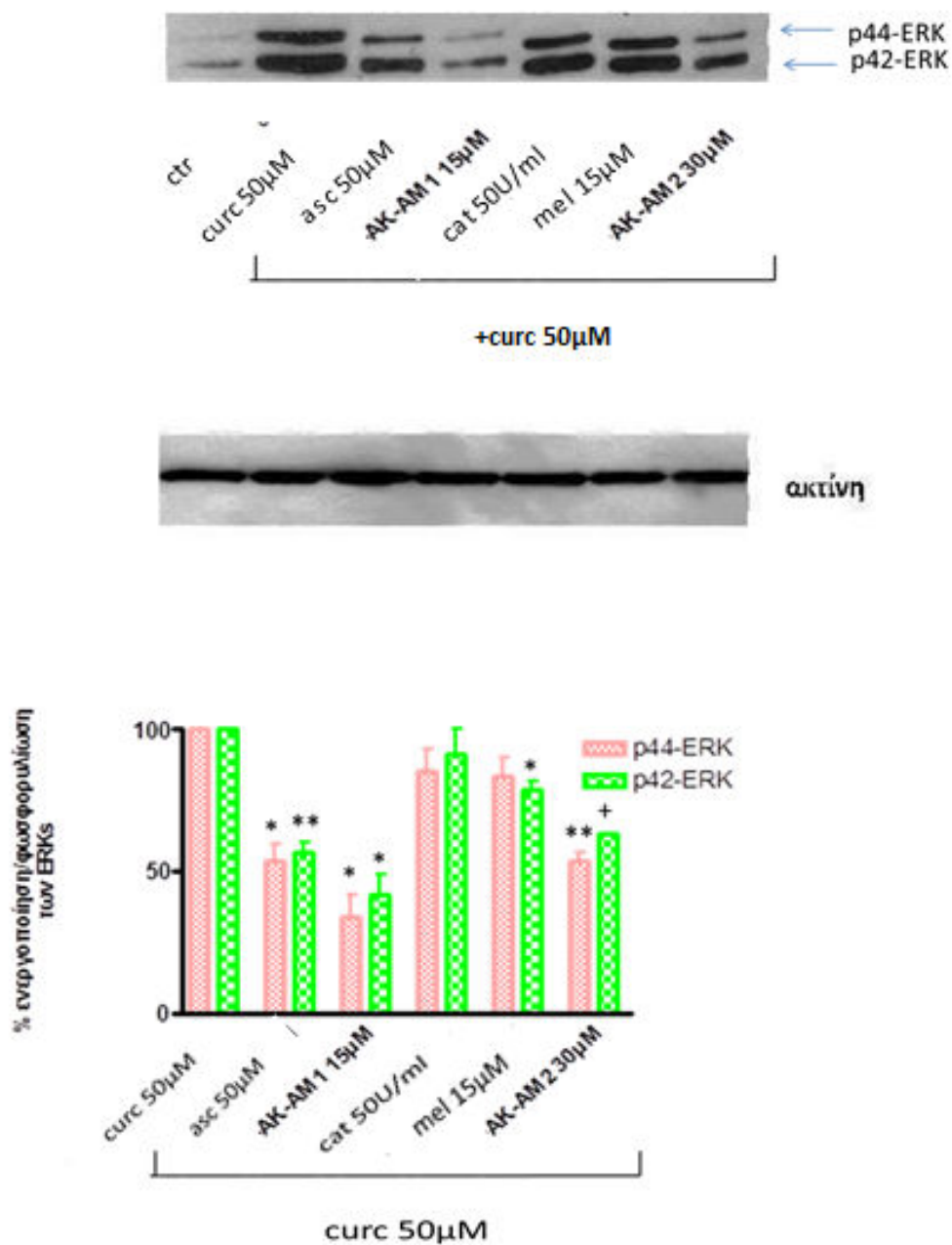


Εικ.3.13: Μελέτη του χρονοεξαρτώμενου προτύπου ενεργοποίησης των JNKs ύστερα από επίδραση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 50μM. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$ (στατιστικά σημαντική αύξηση του βαθμού ενεργοποίησης ως προς το μάρτυρα).

3.6.3. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs.

Θέλοντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα της δράσης των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2(30μM) στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη κυτταρικό θάνατο πραγματοποιήσαμε στη συνέχεια ανάλυση κατά Western. Συγκεκριμένα, έγινε μισάωρη προεπώαση με όλους τους παράγοντες και κατόπιν επίδραση με κουρκουμίνη (50μM) για 15 λεπτά. Διαπιστώθηκε ότι τα προοξειδωτικά μόρια AK-AM1 (15μM) καθώς και το ασκορβικό οξύ (50μM) αναστέλλουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs (εικ.3.14). Επίσης, μία μερική αλλά στατιστικά σημαντική αναστολή διαπιστώνεται και παρουσία της βενζοθειαζίνης AK-AM2 (30μM) καθώς και της μελατονίνης (15μM). Αξίζει να επισημανθεί ότι για την μελατονίνη η αναστολή αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο για την p42-ERK

αλλά όχι για την p44-ERK. Τα συγκεκριμένα % ποσοστά ενεργοποίησης για την p44-ERK & p42-ERK, παρουσία των διάφορων παραγόντων δείχνονται στον πίνακα 3.10.



Εικ.3.13: Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM), & AK-AM2 (30μM) παρουσία κουρκουμίνης (50μM για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορύλιωσης/ενεργοποίησης των ERKs. Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από την κουρκουμίνη (50μM για 15 λεπτά) ενεργοποίηση. Το πείραμα επαναλήφθηκε

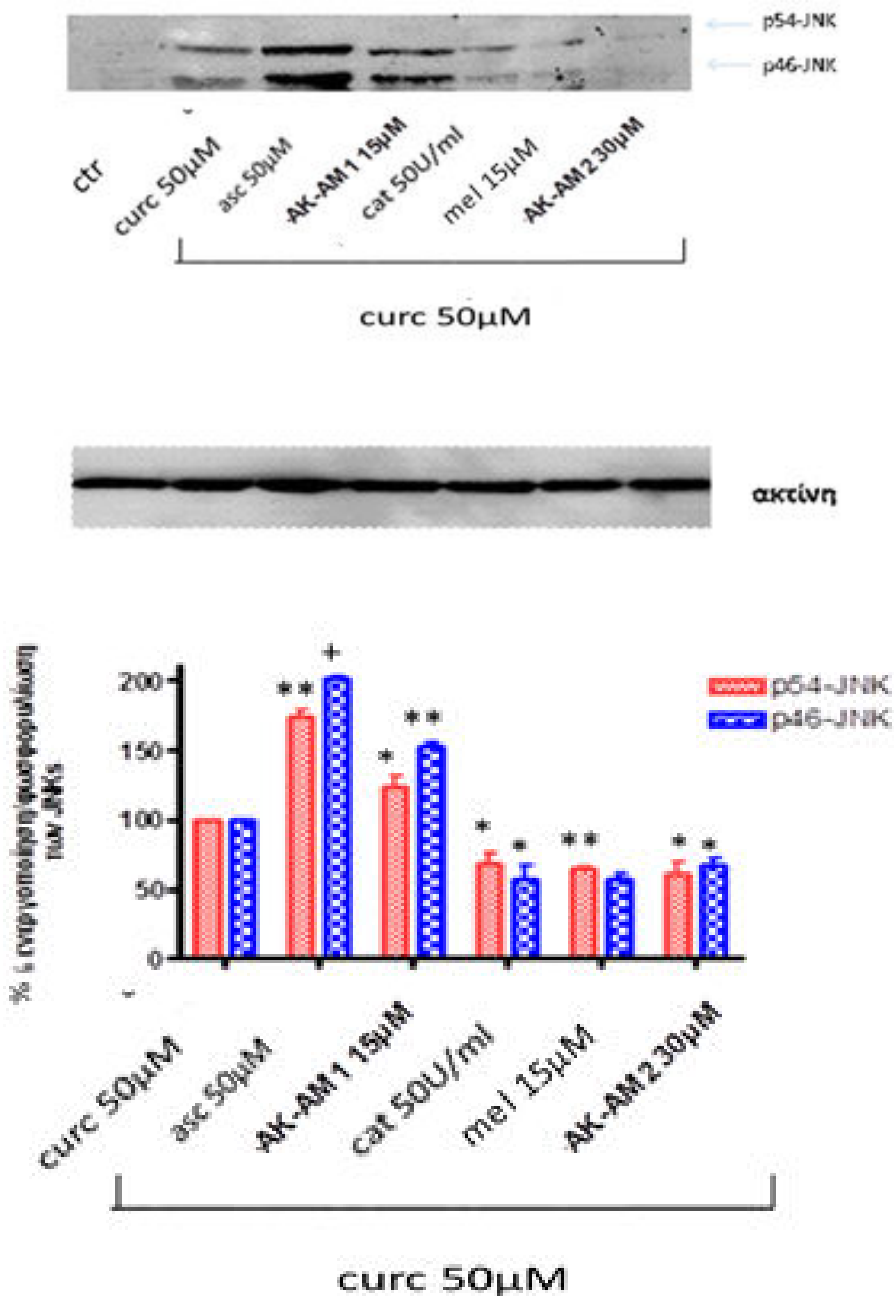
3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

Πιν.3.10: Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50 μ M), AK-AM1 (15 μ M), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M), & AK-AM2 (30 μ M) παρουσία κουρκουμίνης (50 μ M για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορύλιωσης/ενεργοποίησης των ERKs.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	p44-ERK		p42-ERK	
	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(\pm)	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(\pm)
curc 50 μ M	100	-----	100	-----
curc 50 μ M+asc 50 μ M	53,55	8,63	59,92	4,32
curc 50 μ M+AK-AM1 15 μ M	34,04	10,51	41,8	10,09
curc 50 μ M+cat 50U/ml	85,55	10,38	91,22	12,41
curc 50 μ M+mel 15 μ M	83,63	9,08	78,81	3,84
curc 50 μ M+AK-AM2 30 μ M	53,91	3,73	63,37	0,02

3.6.4. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των JNKs.

Οι παράγοντες ασκορβικό οξύ (50 μ M), AK-AM1 (15 μ M), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) & AK-AM2 (30 μ M) φάνηκε ότι επηρεάζουν με πολύ διαφορετικό τρόπο την επαγόμενη από την κουρκουμίνη (50 μ M για 2 ώρες) ενεργοποίηση των JNKs, σε σχέση με τις κινάσες ERKs. Συγκεκριμένα, η προεπάση για 30 λεπτά με τους προοξειδωτικούς παράγοντες ασκορβικό οξύ (50 μ M) & AK-AM1 (15 μ M) αυξάνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από την κουρκουμίνη % ενεργοποίηση των JNKs. Αντίθετα, η προεπάση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) & AK-AM2 (30 μ M) μειώνει με ένα στατιστικά σημαντικό πρότυπο αυτή την ενεργοποίηση (εικ.3.14). Τα συγκεκριμένα ποσοστά της % ενεργοποίησης δίνονται στον πίνακα 3.11.



Εικ.3.14: Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50 μM), AK-AM1 (15 μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μM), & AK-AM2 (30 μM) παρουσία κουρκουμίνης (50 μM για 15 λεπτά) στον % βαθμό φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των JNKs. Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από την κουρκουμίνη (50 μM για 2 ώρες) ενεργοποίηση. Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. *p < 0,05, **p < 0,01, +p < 0,001

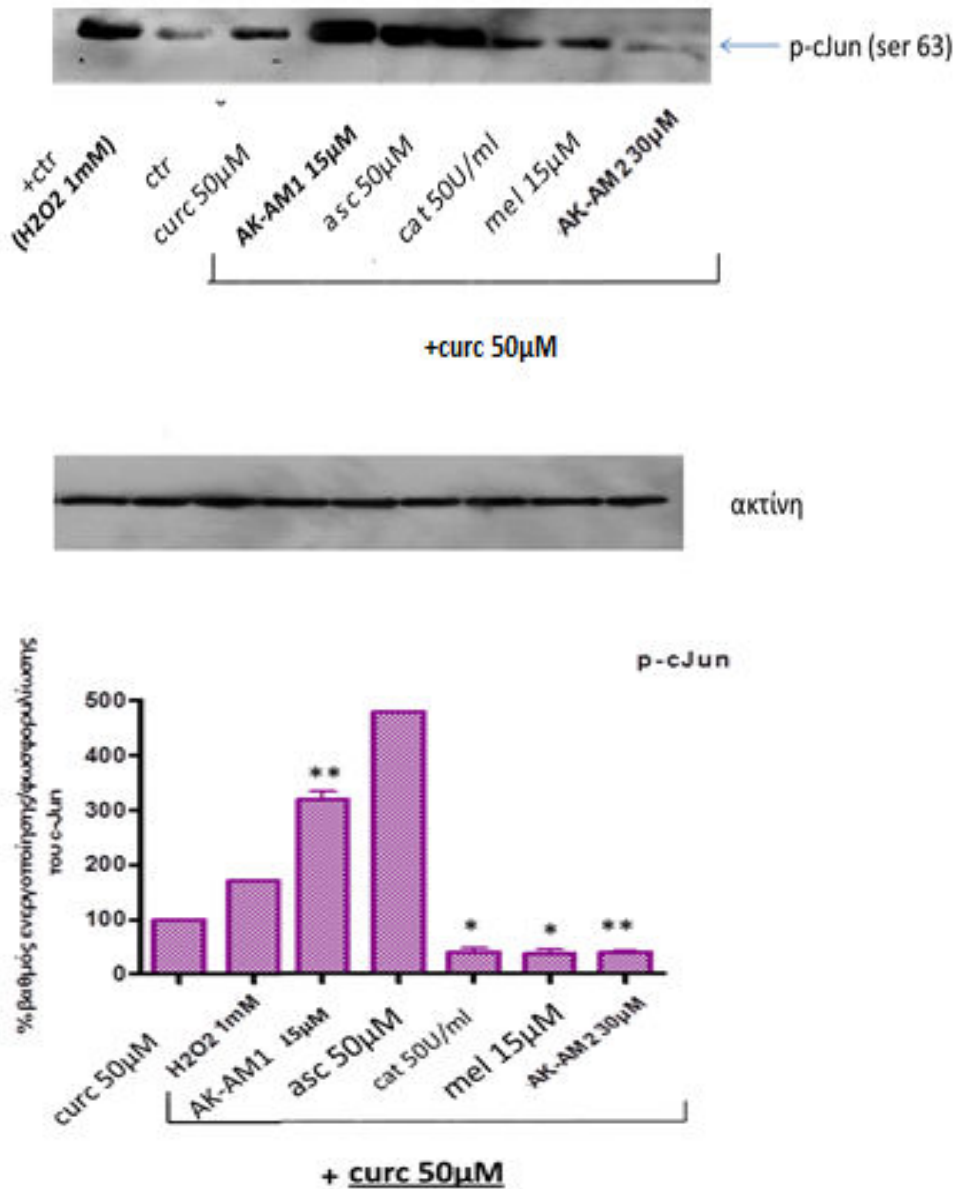
Πιν.3.11: Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM), & AK-AM2 (30μM) παρουσία κουρκουμίνης (50μM για 2 ώρες) στον % βαθμό φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των JNKs.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	p54-JNK		p46-JNK	
	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	SD(±)
curc 50μM	100	-----	100	-----
curc 50μM+asc 50μM	174,25	6,57	202,12	1,85
curc 50μM+AK-AM1 15μM	123,23	8,42	152,25	3,42
curc 50μM+cat 50U/ml	68,47	7,47	57,52	13,05
curc 50μM+mel 15μM	64,57	1,44	57,06	5,25
curc 50μM+AK-AM2 30μM	61,13	14,31	67,29	8,7

3.6.5. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση του c-Jun.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν οι παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2 (30μM) επηρεάζουν το πρότυπο ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης του c-Jun με ένα τρόπο αντίστοιχο των JNKs, καθώς είναι γνωστό ότι ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας αποτελεί το χαρακτηριστικότερο υπόστρωμά τους (Hibi και συν., 1993). Για το σκοπό αυτό έγινε προεπάαση για 30 λεπτά με όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες και στη συνέχεια επίδραση με κουρκουμίνη (50μM για 3 ώρες). Επιπλέον, έγινε επίδραση με H₂O₂ 1mM για 30 λεπτά (θετικός μάρτυρας) καθώς γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Aggeli και συν., 2010) ότι ενεργοποιεί σε πολύ μεγάλο βαθμό τον c-Jun. Με ανάλυση κατά Western ανιχνεύσαμε το βαθμό ενεργοποίησης /φωσφορυλίωσης του c-Jun στη σερίνη 63 και διαπιστώσαμε ότι οι προοξειδωτικοί παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM) & AK-AM1 (15μM) αυξάνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την % ενεργοποίηση του c-Jun, σε σχέση με την κουρκουμίνη (50μM) αλλά και το θετικό μάρτυρα. Αντίθετα, παρουσία των αντιοξειδωτικών παραγόντων καταλάση

(50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) & AK-AM2 (30 μ M) διαπιστώνεται μία στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από την κουρκουμίνη (50 μ M) ενεργοποίησης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα (εικ.3.15). Τα συγκεκριμένα ποσοστά της % ενεργοποίησης δίνονται στον πίνακα 3.12.



Εικ.3.15: Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50 μ M), AK-AM1 (15 μ M), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M), & AK-AM2 (30 μ M) παρουσία κουρκουμίνης (50 μ M για 3 ώρες) στον % βαθμό φωσφορύλιωσης/ενεργοποίησης του c-Jun. Έγινε επίσης επίδραση με H₂O₂ 1mM

για 30 λεπτά (θετικός μάρτυρας). Ως 100% θεωρήθηκε η επαγόμενη από την κουρκουμίνη (50μM για 3 ώρες) ενεργοποίηση. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

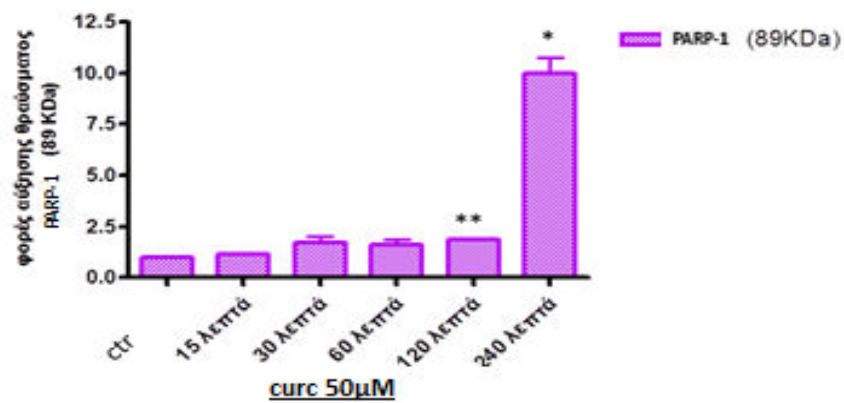
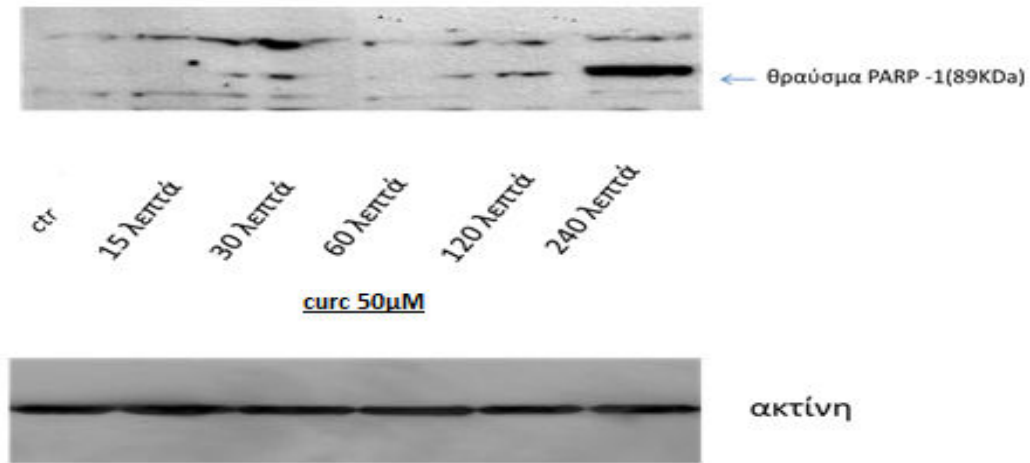
Πιν.3.12: Επίδραση των παραγόντων AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM), & AK-AM2 (30μM) παρουσία κουρκουμίνης (50μM για 3 ώρες) στον % βαθμό φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης του c-Jun.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	% ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ c-Jun	SD(±)
curc 50μM	100	-----
curc 50μM + AK-AM1 15μM	318,84	19,37
curc 50μM + cat 50 U/ml	40,16	10,4
curc 50μM + mel 15 μM	36,07	10,6
curc 50μM + AK-AM2 30μM	38,81	5,69

3.7 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΘΩΣ & ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

3.7.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό πρωτεόλυσης του PARP-1

Προκειμένου να έχουμε μία πιο ολοκληρωμένη άποψη για τον τρόπο με τον οποίο η κουρκουμίνη επηρεάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια, ήταν αναγκαίο να διαλευκάνουμε το είδος του κυτταρικού θανάτου που αυτή προάγει. Για το σκοπό αυτό έγινε επίδραση με κουρκουμίνη 50μM για αυξανόμενους χρόνους και ανίχνευση του, χαρακτηριστικού της απόπτωσης (Chaitanya και συν., 2010), βαθμού πρωτεόλυσης του PARP-1 (εικ.3.16). Με ανάλυση κατά Western διαπιστώσαμε ότι στους μικρούς χρόνους επίδρασης (15, 30 & 60 λεπτά) δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική αύξηση αυτής της πρωτεόλυσης. Ωστόσο, στα 120 λεπτά χρόνου επίδρασης τα επίπεδα του θραύσματος (89KDa) του PARP-1 εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένα (1,87±0,06 φορές σε σχέση με το μάρτυρα) και μεγιστοποιούνται στα 240 λεπτά (10,02±1,02 φορές σε σχέση με το μάρτυρα).



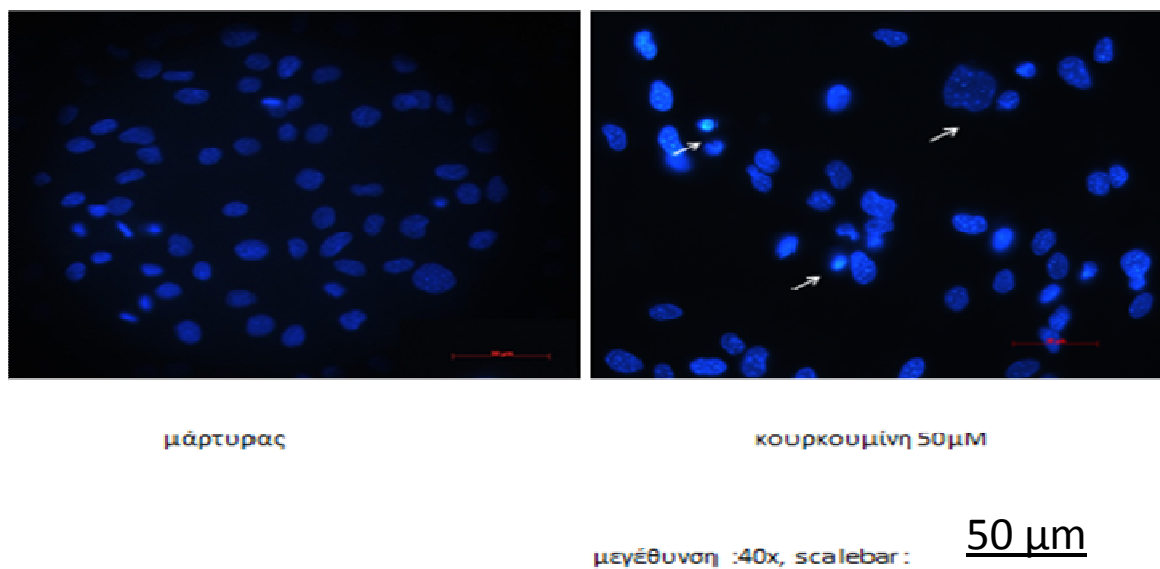
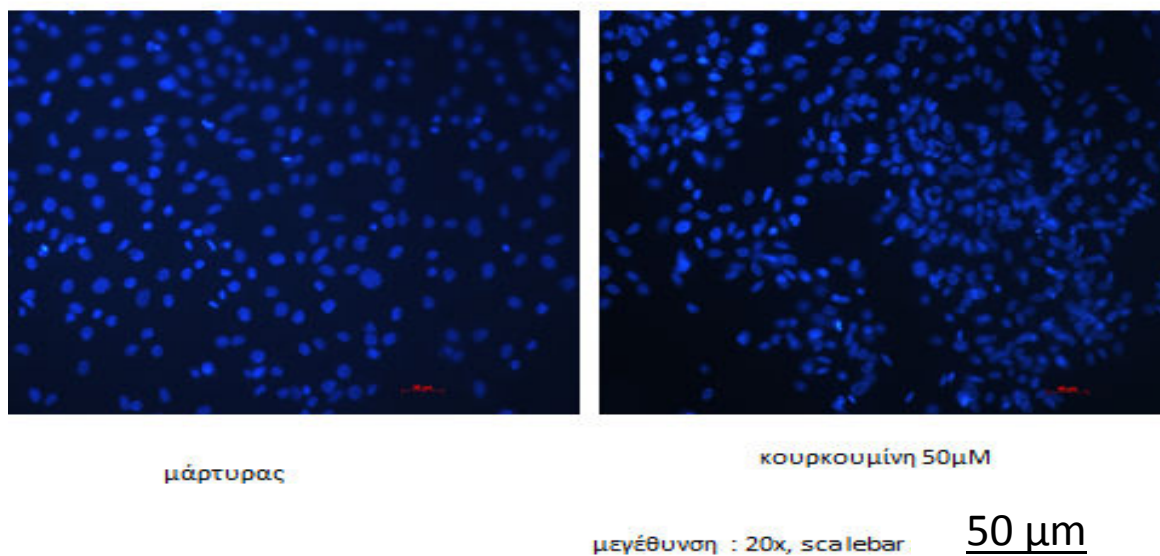
Εικ.3.16: Μελέτη του χρονοεξαρτώμενου προτύπου πρωτεόλυσης του PARP-1 ύστερα από επίδραση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 50μM. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές & η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το Student t-test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, + $p < 0,001$

3.7.2. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Χρώση πυρήνων με Hoechst & παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι η κουρκουμίνη προάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στους C2 σκελετικούς μυοβλάστες πραγματοποιήσαμε επίδραση με κουρκουμίνη 50μM για 24 ώρες και ανίχνευση της μορφολογίας των πυρήνων ύστερα από χρώση Hoechst και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Επιπλέον, έγινε προεπάση για 30 λεπτά με τους παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50 U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2 (30μM). Τέλος έγινε και συνδυαστική επίδραση με H₂O₂ 1 mM & κουρκουμίνη σε μία προοξειδωτική (50μM) και μία αντιοξειδωτική (15μM) συγκέντρωση.

Παρουσία κουρκουμίνης 50μM διαπιστώσαμε χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου όπως αύξηση του βαθμού φθορισμού των πυρήνων, συμπύκνωση της χρωματίνης και αλλαγή της μορφολογίας των πυρήνικών μεμβρανών (εικ.3.17).

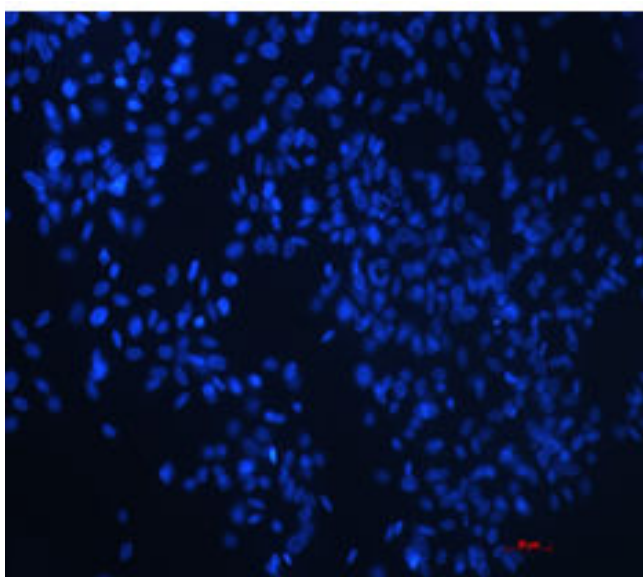
Εικ.3.17 : Σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πυρήνων μεταξύ κουρκουμίνης 50μM & μάρτυρα.



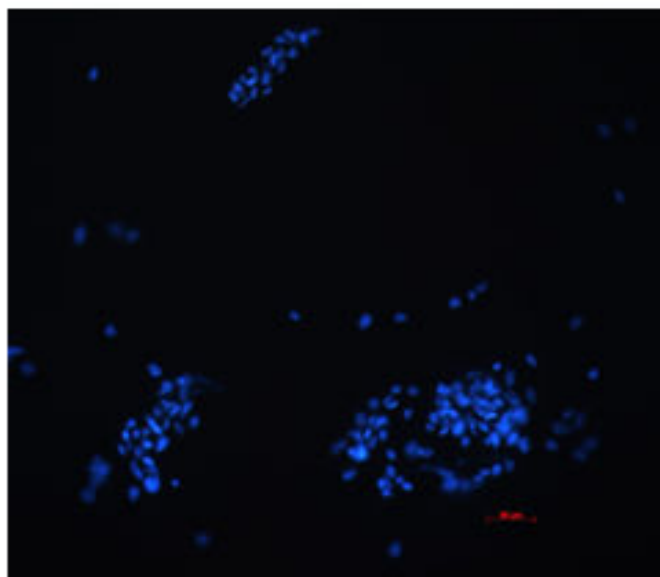
Όταν έγινε προεπάση με τους προοξειδωτικούς παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM) , AK-AM1 (15μM) & H₂O₂ 1mM και εν συνεχεία επίδραση με κουρκουμίνη 50μM διαπιστώσαμε αφενός πολύ πιο έντονα μορφολογικά γνωρίσματα αποπτωτικού κυτταρικού

θανάτου (εικ.3.18) και αφετέρου πολύ μικρότερο αριθμό κυττάρων στο οπτικό πεδίο (20x), σε σχέση με την κουρκουμίνη 50 μ M.

Εικ.3.18 : Σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πυρήνων μεταξύ κουρκουμίνης 50 μ M, κουρκουμίνης 50 μ M + AK-AM1 15 μ M, κουρκουμίνης 50 μ M + ασκ.οξέος 50 μ M & κουρκουμίνης 50 μ M + H₂O₂ 1mM.

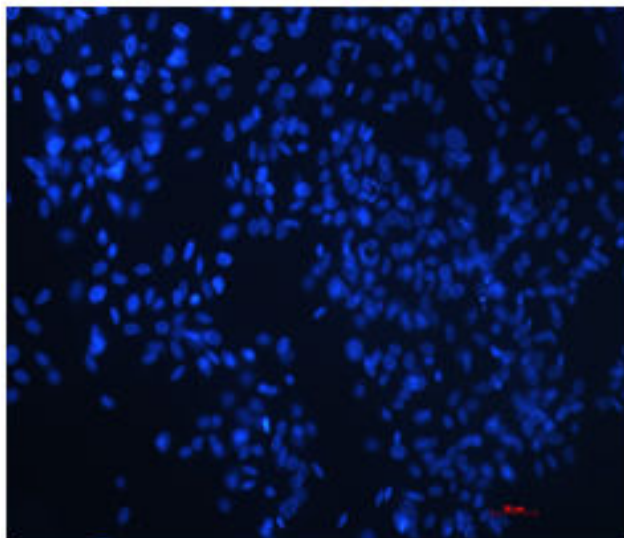


κουρκουμίνη 50 μ M

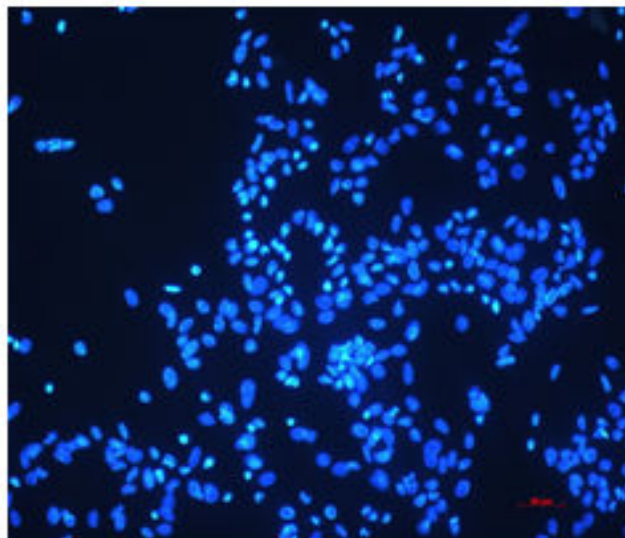


κουρκουμίνη 50 μ M + AK-AM1 15 μ M

μεγέθυνση : 20x, scalebar : 50 μ m



κουρκουμίνη 50μM

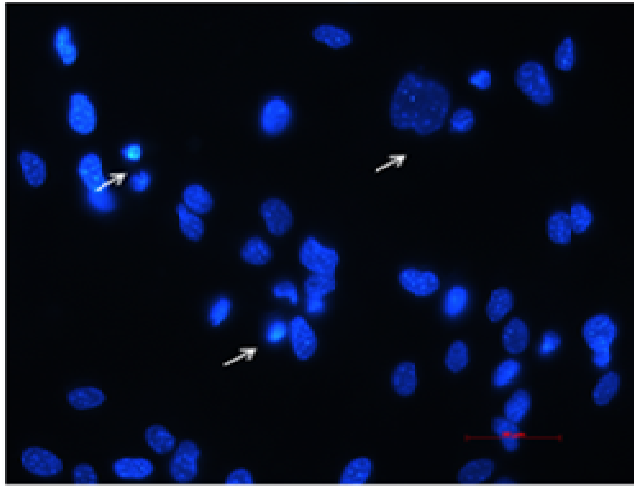


H2O2 1mM+κουρκουμίνη 50μM

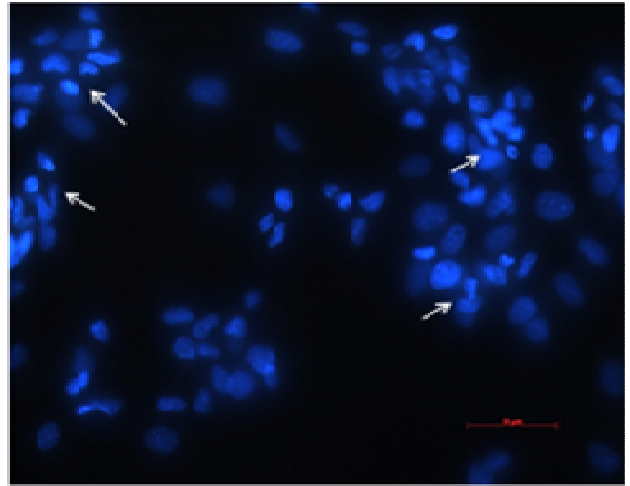
μεγέθυνση : 20x, scalebar

50 μm

50 μm

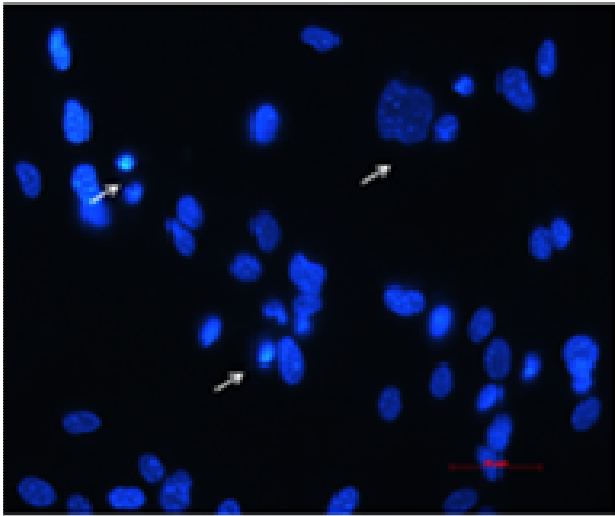


κουρκουμίνη 50 μ M

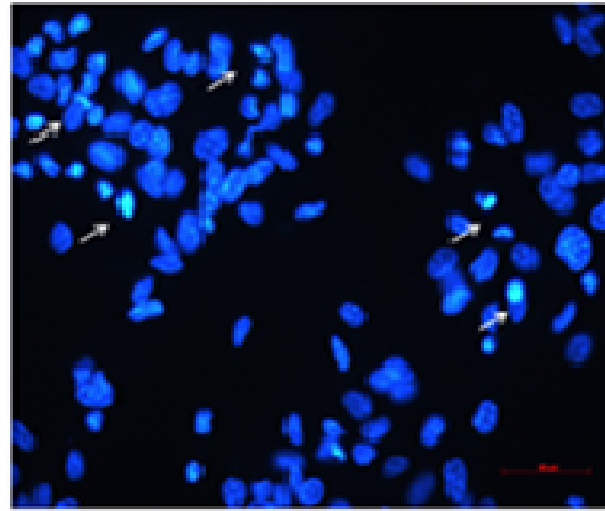


κουρκουμίνη 50 μ M + AK-AM1 15 μ M

μεγέθυνση : 40x, scalebar : 50 μ M

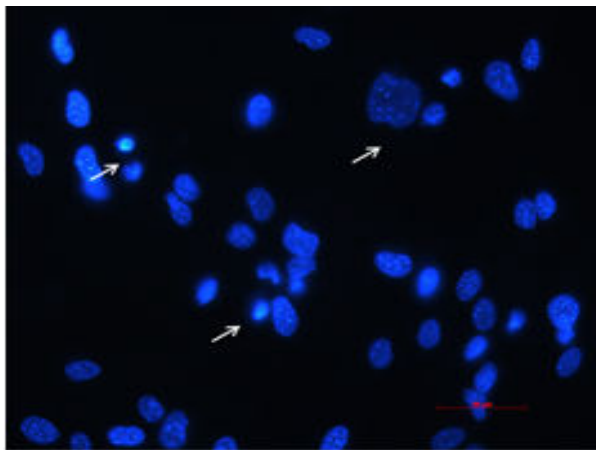


κουρκουμίνη 50μM

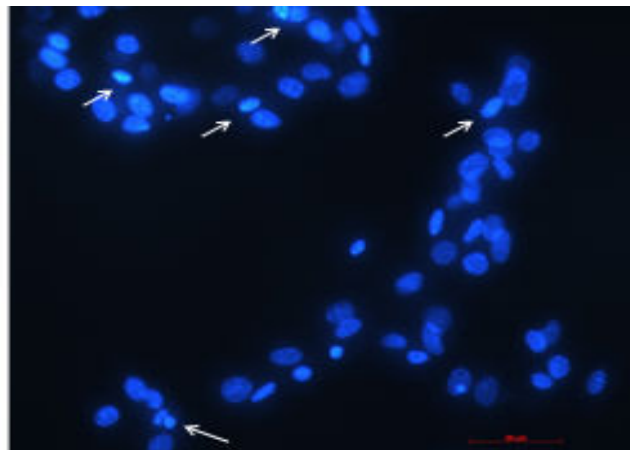


H2O2 1mM+κουρκουμίνη 50μM

μεγέθυνση :40x, scalebar : 50 μm



κουρκουμίνη 50μM

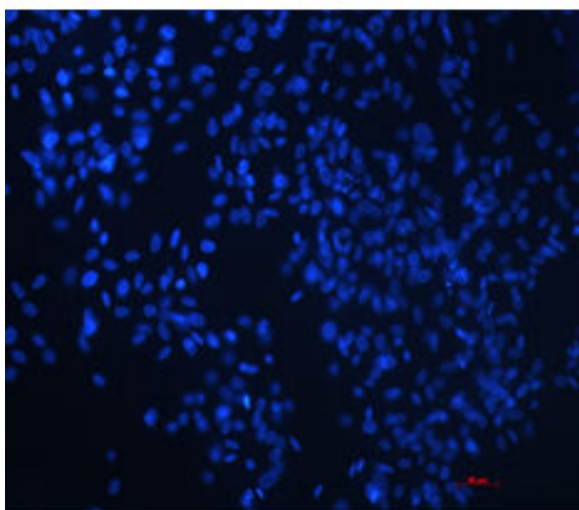


κουρκουμίνη 50μM + ασκ.οξύ 50μM

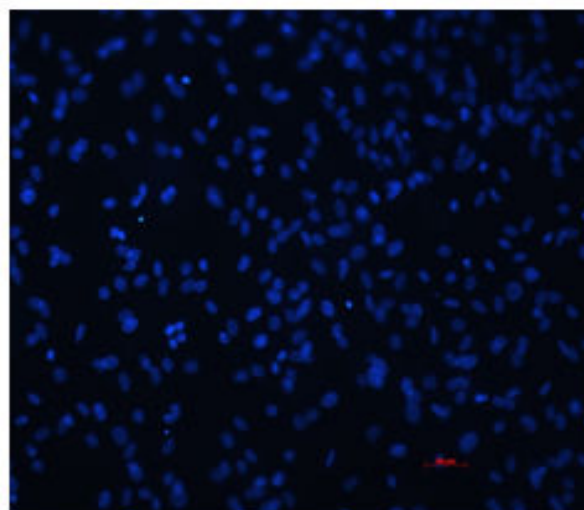
μεγέθυνση : 40x, scalebar 50 μm

Αντίθετα, όταν γίνει προεπόαση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες καταλάση (50 U/ml), μελατονίνη (15μM) και AK-AM2 (30μM) και στη συνέχεια επίδραση με κουρκουμίνη (50μM), παρατηρούμε μεγάλο περιορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των αποπτωτικών πυρήνων, σε σχέση με την κουρκουμίνη (50μM) (εικ.3.19). Δηλαδή, διαπιστώσαμε μικρότερο βαθμό φθορισμού των πυρήνων (20x μεγέθυνση) αλλά και μικρότερο βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης (40x μεγέθυνση).

Εικ.3.19 : Σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πυρήνων μεταξύ κουρκουμίνης 50μM, κουρκουμίνης 50μM +καταλάσης 50U/ml,κουρκουμίνης 50μM + μελατονίνης 15μM & κουρκουμίνης 50μM + AK-AM2 30μM..



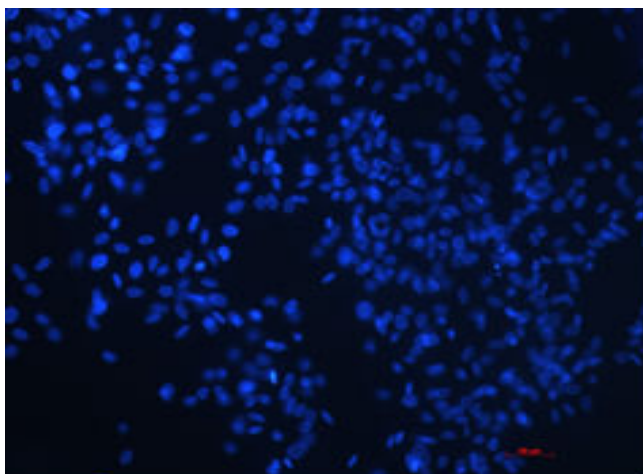
κουρκουμίνη 50μM



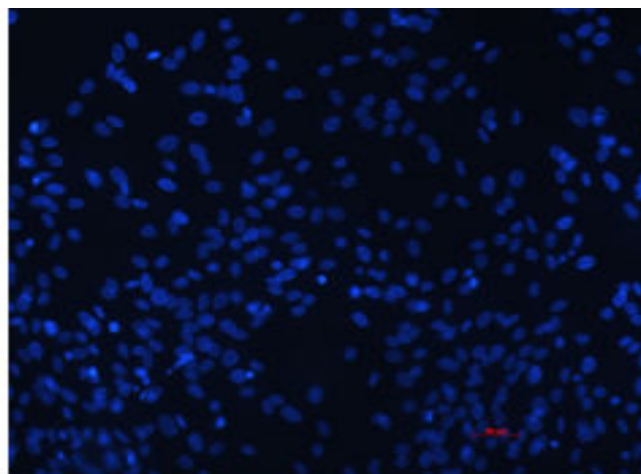
κουρκουμίνη 50μM +καταλάση 50U/ml

μεγέθυνση : 20x, scalebar

50 μm

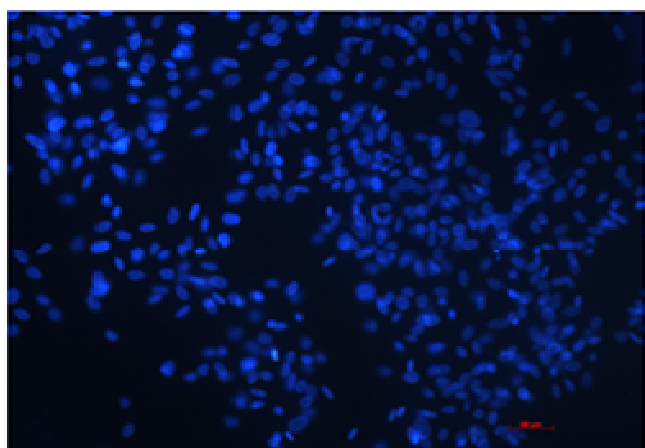


κουρκουμίνη 50μM

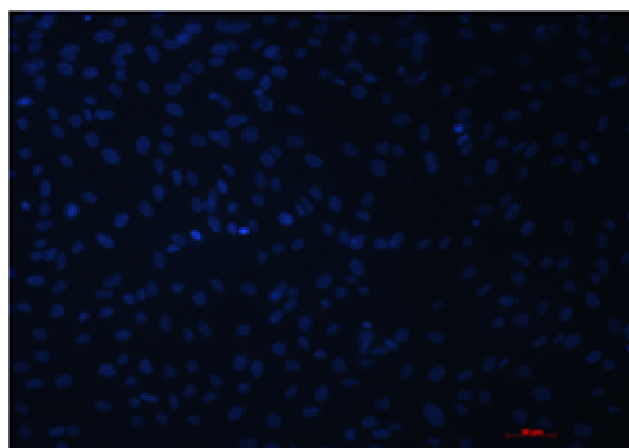


κουρκουμίνη 50μM+μελατονίνη 15 μM

μεγέθυνση : 20x, scalebar 50 μm

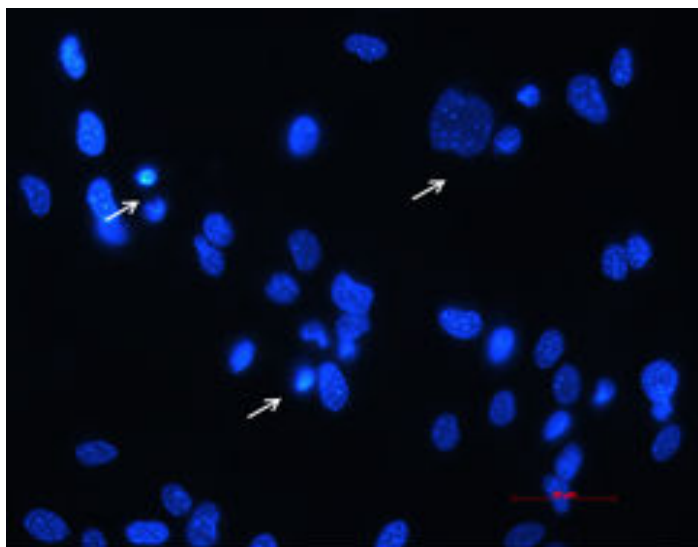


κουρκουμίνη 50μM

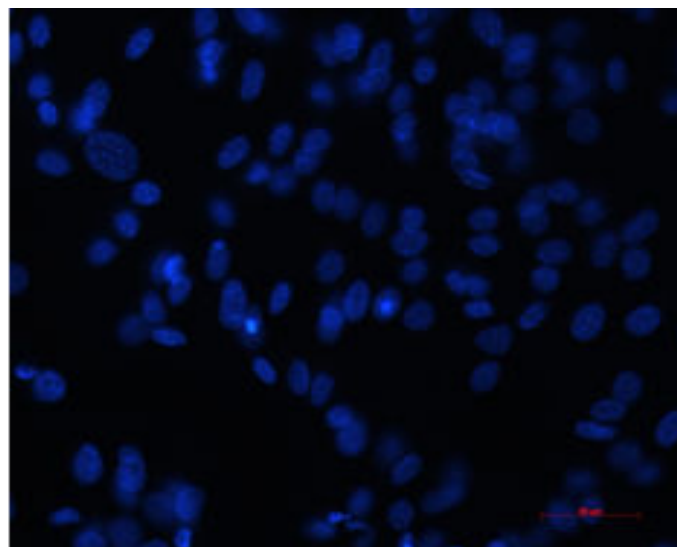


κουρκουμίνη 50μM+AK-AM2 15μM

μεγέθυνση : 20x, scalebar 50 μm

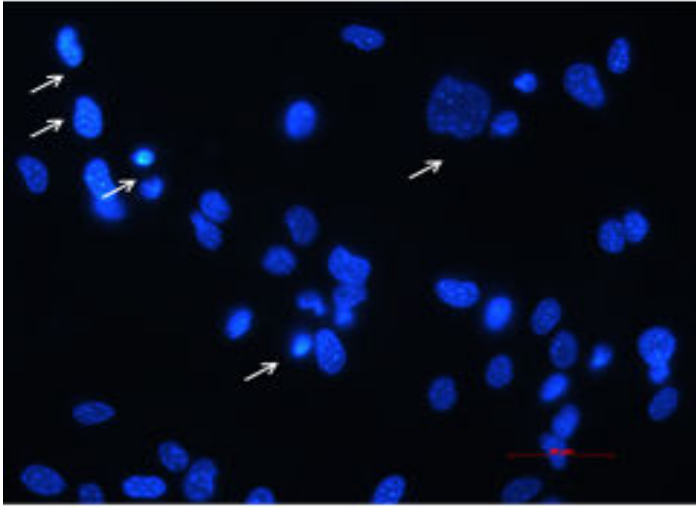


κουρκουμίνη 50 μ M

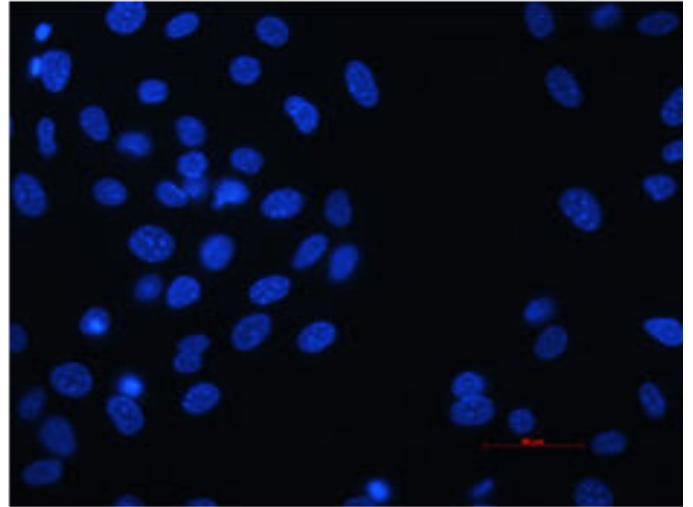


κουρκουμίνη 50 μ M +καταλάση 50U/ml

μεγέθυνση :40x, scaleb: 50 μ m

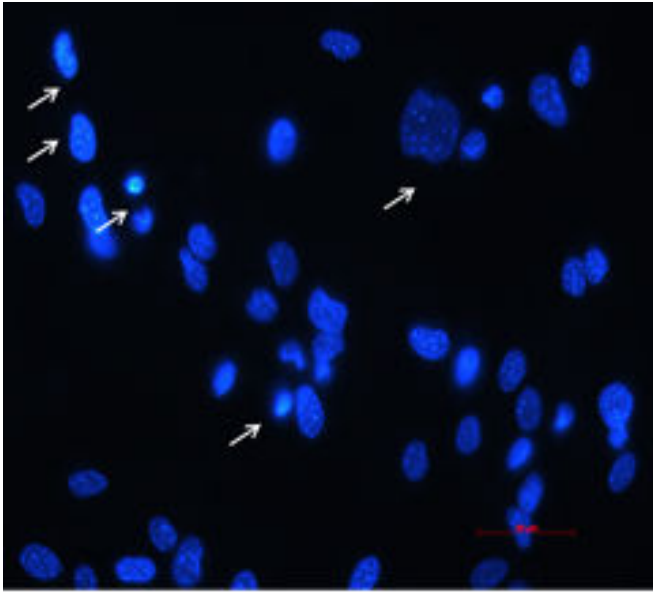


κουρκουμίνη 50 μ M

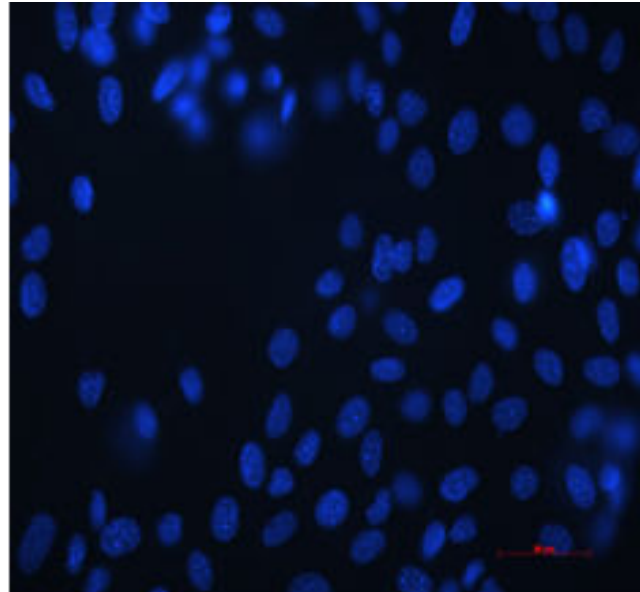


κουρκουμίνη 50 μ M+μελατονίνη 15 μ M

μεγέθυνση :40x, scalebar : 50 μ m



κουρκουμίνη 50μM



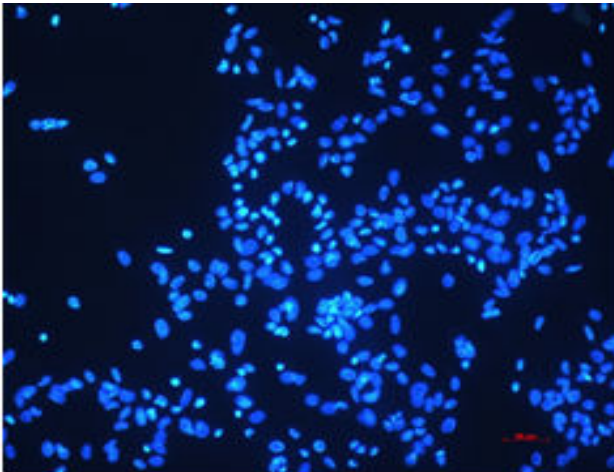
κουρκουμίνη 50μM+AK-AM2 15μM

μεγέθυνση :40x, scalebar

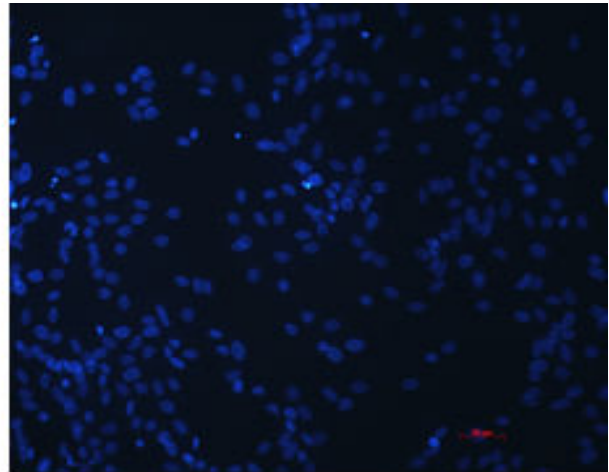
50 μm

Τέλος, είναι παρατηρήσαμε ότι ήταν πολύ μεγαλύτερος τόσο ο βαθμός φθορισμού των πυρήνων (μεγέθυνση 20x), όσο και ο βαθμός συμπύκνωσης της χρωματίνης (μεγέθυνση 40x) παρουσία H_2O_2 1 mM + κουρκουμίνης 50μM, σε σχέση με το H_2O_2 1 mM + κουρκουμίνη 15μM (εικ.3.20).

Εικ.3.20 : Σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πυρήνων μεταξύ κουρκουμίνης 50μM+H2O2 1mM & κουρκουμίνης 15μM+H2O2 1mM.



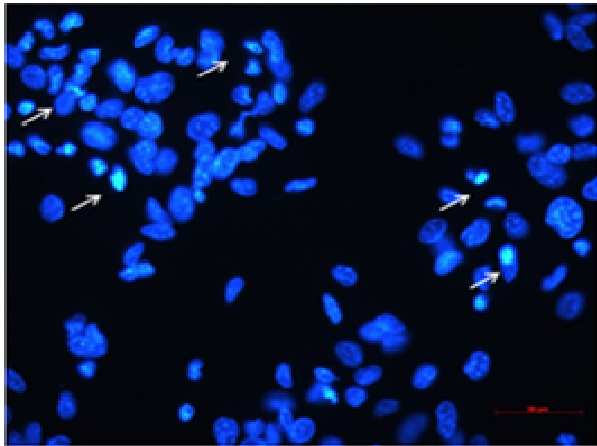
H2O2 1mM+κουρκουμίνη 50μM



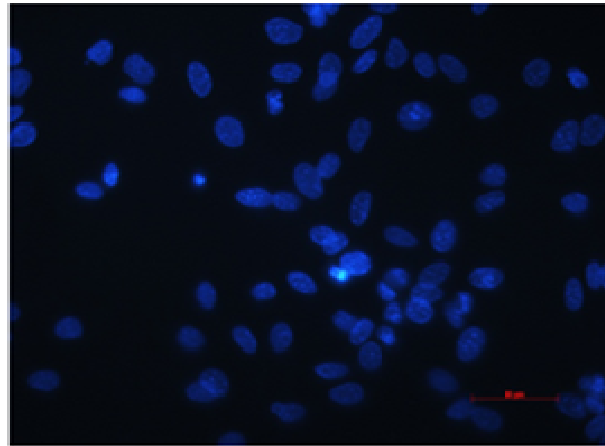
H2O2 1mM+κουρκουμίνη 15μM

μεγέθυνση :20x, scale bar

50 μm



H₂O₂ 1mM+κουρκουμίνη 50μM



H₂O₂ 1mM+κουρκουμίνη 15μM

μεγέθυνση :40x, scale: 50 μm

3.8 ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Curc=κουρκουμίνη
- Resv=ρεσβερατρόλη
- UA=ουρικό οξύ
- Cat=καταλάση
- Mel=μελατονίνη
- Asc=ασκορβικό οξύ
- AK-AM1=Βενζοξάζίνη (1)
- AK-AM2=Βενζοθειαζίνη (2)

ΚΕΦ.4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ H₂O₂ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΜΥΟΒΛΑΣΤΩΝ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσουμε τη συμπεριφορά ποικίλων εν δυνάμει αντιοξειδωτικών παραγόντων κάτω από διαφορετικές συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε ως προοξειδωτικούς παράγοντες το H₂O₂ και την κουρκουμίνη που είναι δύο εντελώς διαφορετικά από χημικής άποψης μόρια (Basnet και συν., 2011, Forman και συν., 2006). Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, επιβεβαιώσαμε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Aggeli και συν., 2010, Kefaloyianni και συν., 2006) που δείχνουν ότι οι σκελετικοί μυοβλάστες παρουσιάζουν εξαιρετική ανθεκτικότητα στο επαγόμενο από το H₂O₂ οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, απαιτούνται συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες του 1mM προκειμένου να διαπιστωθεί κυτταρικός θάνατος της τάξεως του 20%. Αντίστοιχα αποτελέσματα που καταδεικνύουν την πολύ υψηλή ανθεκτικότητα του σκελετικού μυός όταν εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα ROS έχουν διαπιστωθεί και από τους Winokur και συν., 2003 και Rando και συν., 1998. Οι σκελετικοί μύες κατά τη διάρκεια της μυικής άσκησης έρχονται αντιμέτωποι με υψηλές συγκεντρώσεις ROS και RNS οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στη σηματοδότηση και στη γονιδιακή έκφραση με αποτέλεσμα την αυξημένη προσαρμοστική ικανότητά τους σε αυτές τις συνθήκες (Ji και συν., 2008).

Η κουρκουμίνη από την άλλη πλευρά παρουσιάζει προοξειδωτική δράση σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (50-100μM) σε σχέση με το H₂O₂ και μάλιστα με ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο. Είναι αξιοσημείωτο ότι η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 50μM είναι ένα τόσο δραστικό μόριο που προκαλεί περίπου ίδιο βαθμό κυτταρικού θανάτου με το H₂O₂ 1mM. Επιπλέον η κουρκουμίνη 50μM και το H₂O₂ 1mM φαίνεται ότι έχουν συνδυαστική προοξειδωτική δράση μειώνοντας την κυτταρική επιβίωση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη είναι ένα μόριο που ανάλογα με τη συγκέντρωσή του και το είδος του προοξειδωτικού παράγοντα που είναι παρόν, δρα άλλοτε ως προοξειδωτικά και άλλοτε αντιοξειδωτικά (Chen και συν., 2005, Yoshino και συν., 2004). Μάλιστα, οι Chauhan και συν., 2003 απέδειξαν ότι in vitro η κουρκουμίνη μπορεί να οξειδωθεί από το H₂O₂ και να παρουσιάσει έντονη προοξειδωτική δράση. Ακόμη οι Chen και συν., 2011 απέδειξαν την ύπαρξη συνεργιστικής προοξειδωτικής δράσης μεταξύ H₂O₂ και κουρκουμίνης στα HepG2 ηπατικά κύτταρα.

Το γεγονός ότι οι σκελετικοί μυοβλάστες παρουσιάζουν πολύ μικρότερη ανθεκτικότητα στην κουρκουμίνη σε σχέση με το H_2O_2 θα μπορούσε να ερμηνευτεί με βάση το ότι το H_2O_2 αποτελεί ένα φυσιολογικό παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού με πολύ ήπια προοξειδωτική δράση (Golena και συν., 2012, Hancock και συν., 2001). Ενδογενώς ο οργανισμός διαθέτει μία μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων όπως οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες που απενεργοποιούν άμεσα το H_2O_2 . Αντίθετα, η κουρκουμίνη είναι ένα εξωγενές μόριο που δημιουργεί μία μεγάλη ποικιλία πολύ δραστηκότερων και τοξικότερων μορφών ROS π.χ. ρίζες υδροξυλίου ($OH\cdot$), μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen/ 1O_2), υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$) κ.α (Cui και συν., 2006, Atsumi και συν., 2005α). Οι συνθήκες οξειδωτικού στρες σε αυτή την περίπτωση είναι τόσο έντονες που δεν μπορούν να αντιμετωπισθούν από τα κύτταρα, προάγοντας τελικά φαινόμενα απόπτωσης και αυτοφαγίας (Lee και συν., 2011, Sandur και συν., 2007).

4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ H_2O_2 ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Παρόλη την προαναφερθείσα υψηλή ανθεκτικότητα του σκελετικού μυός στις συνθήκες οξειδωτικού στρες γνωρίζουμε ότι η έντονη ή η παρατεταμένη έκθεσή του σε ROS συνεισφέρει στην πρόκληση σοβαρών μυικών τραυματισμών (Jackson και συν., 1998) και χαρακτηρίζει ποικίλες μυικές δυστροφίες (Rando και συν., 2002) και ατροφίες (Powers και συν., 2005, Kondo και συν., 1993). Έχει δειχθεί ότι η έγκαιρη χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων κατάλληλης συγκέντρωσης μπορεί να αποτρέψει σε πολλές περιπτώσεις τέτοια παθολογικά φαινόμενα (Radley και συν., 2007). Για το σκοπό αυτό κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης ποικίλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων όπως η κουρκουμίνη, η ρεσβερατρόλη, το ουρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη-c), το ένζυμο καταλάση, η ορμόνη μελατονίνη και τέλος η νεοσυντιθέμενη βενζοξιαζίνη AK-AM1 και η βενζοθειαζίνη AK-AM2.

4.2.1 Δοσοεξαρτώμενη προεπάση με κουρκουμίνη

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μισάωρη προεπάση με κουρκουμίνη διαφορετικών συγκεντρώσεων και ακολούθως η επίδραση με H_2O_2 1mM επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των σκελετικών μυοβλαστών. Συγκεκριμένα, όπως αναφέραμε και παραπάνω, η κουρκουμίνη σε συγκεντρώση 50 μ M παρουσιάζει έντονη προοξειδωτική και συνεργιστική με το H_2O_2 1mM δράση. Αντίθετα, στο εύρος συγκεντρώσεων 30-15 μ M δρα αντιοξειδωτικά επαναφέροντας τη βιωσιμότητα στα επίπεδα του μάρτυρα. Τέλος, η κουρκουμίνη σε συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες των 10 μ M δεν φαίνεται να μπορεί να αποτρέψει τον επαγόμενο από το H_2O_2 1mM κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με πολυάριθμες μελέτες που δείχνουν ότι η κουρκουμίνη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δρα προοξειδωτικά, ενώ σε χαμηλότερες αντιοξειδωτικά (Marathe και συν., 2011, Hadi και συν., 2000). Ειδικότερα, είναι γνωστό ότι η κουρκουμίνη μπορεί και απενεργοποιεί άμεσα μία μεγάλη ποικιλία ROS π.χ. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ κ.α. (Ak και Gulcin., 2008) κυρίως μέσω των αρωματικών της δακτυλίων που δρουν ως πυρηνόφιλα κέντρα/ηλεκτρονιοδότες (Jung και συν., 2003). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι σε άλλους κυτταρικούς τύπους η κουρκουμίνη παρουσιάζει προοξειδωτική δράση σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις της τάξεως των 10-20 μ M (Cui και συν., 2006, Atsumi και συν., 2005α & β, Fujisawa και συν., 2004). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει για μία ακόμη φορά την πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των σκελετικών μυοβλαστών στις συνθήκες οξειδωτικού στρες. Τέλος, αξίζει να επισημάνουμε ότι ενώ υπάρχουν στη βιβλιογραφία αρκετές, κυρίως in vivo, μελέτες που αποδεικνύουν την ευεργετική και αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης (Roylin και συν., 2008, Siddiqui και συν., 2006, Thaloog και συν., 1999), δεν υπάρχουν αντίστοιχες δημοσιεύσεις σχετικά με την προοξειδωτική της δράση στο σκελετικό μυ.

4.2.2. Δοσοεξαρτώμενη προεπάση με Ρεσβερατρόλη

Στη συνέχεια, θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης που είναι ένα επίσης πασίγνωστο από τη βιβλιογραφία αντιοξειδωτικό μόριο (Frombaum και συν., 2011). Για το σκοπό αυτό έγινε μισάωρη προεπάση με ρεσβερατρόλη από 50-0,25 μ M και ακολούθως επίδραση με H_2O_2 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δεν μπορούσαν να βελτιώσουν στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από το H_2O_2 1mM μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 50μΜ έχει κυτταροτοξική δράση (Morita και συν., 2012, Ahmad και συν., 2005), ενώ αντίθετα σε συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες των 30μΜ παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Gao και συν., 2011, Kathasamy και συν., 2010). Ειδικότερα, γνωρίζουμε ότι η ρεσβερατρόλη έχει εξαιρετική νευροπροστατευτική δράση αποτρέποντας το επαγόμενο από το αμυλοειδές β-πεπτίδιο οξειδωτικό στρες (Han και συν., 2004, Conte και συν., 2003, Savaskan και συν., 2003), ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζει και καρδιοπροστατευτική (Das και συν., 2008, Rohrbach και συν., 2006) δράση π.χ. μέσω απενεργοποίησης του H₂O₂ (Movahed και συν., 2012). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν διαθέσιμες in vivo μελέτες που καταδεικνύουν την αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης και στο σκελετικό μυ (Elmalı και συν., 2007, Ikizler και συν., 2006) κυρίως λόγω αυξημένης γονιδιακής έκφρασης της θειορεδοξίνης-2/Trx-2 (Rohrbach και συν., 2006). Ακόμη, ο Kaminski και συν., 2012 έδειξαν ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης σε C2C12 σκελετικούς μυοβλάστες προάγει φαινόμενα κυτταρικής διαφοροποίησης και δεν επηρεάζει αρνητικά την κυτταρική βιωσιμότητα. Επίσης, οι Wyke και Tisdale 2006., έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη λειτουργεί ως αναστολέας του NF-κβ και αποτρέπει την επαγόμενη από τον φορβολεστέρα TPA ενεργοποίηση του πρωτεασώματος, σε πλήρως διαφοροποιημένες μυικές ίνες ποντικού. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική είναι η μελέτη των Saini και συν., 2012 που έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη αποτρέπει το επαγόμενο από τον TNF-α οξειδωτικό στρες, μειώνει τα επίπεδα του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και παράλληλα προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση των C2C12 σκελετικών μυοβλαστών. Ωστόσο, αξίζει να επισημάνουμε ότι οι συγκεκριμένοι ερευνητές τονίζουν ότι οι C2 σκελετικοί μυοβλάστες δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη συμπεριφορά και ότι γενικά δεν υπάρχει εώς τώρα κανένα βιβλιογραφικό δεδομένο που να αποδεικνύει την αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Εξάλλου, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η ρεσβερατρόλη λόγω των δομικών της χαρακτηριστικών διαπερνά σχετικά δύσκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και έτσι παρουσιάζει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με άλλα περισσότερο λιπόφιλα μόρια (Frombaum και συν., 2011). Κλείνοντας, πρέπει να επισημάνουμε ότι το γεγονός ότι η ρεσβερατρόλη δεν αποτρέπει τον επαγόμενο από το H₂O₂ κυτταρικό θάνατο, δεν αποκλείει την ύπαρξη μίας μερικής αντιοξειδωτικής δράσης της. Για παράδειγμα, ο De Almeida και συν., 2008α & β., έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί και απενεργοποιεί μερικώς την

οξειδωτική ικανότητα του H_2O_2 σε καλλιέργειες αστροκυττάρων, αλλά αυτό δεν είναι αρκετό για τη βελτίωση της κυτταρικής επιβίωσης.

4.2.3 Δοσοεξαρτώμενη προεπώση με τη Βενζοξαζίνη AK-AM1 & τη Βενζοθειαζίνη AK-AM2.

Η Βενζοξαζίνη AK-AM1 [2-(4-διφαινυλ)-4μεθυλ-3-δihδρο-2H-βένζο(1,4)οξαζι-2-όλη] αποτελεί ένα νέο μόριο που συνέθεσαν ο Martalis και συν., 2011 του οποίου η πιθανή αντιοξειδωτική δράση δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε σχέση με το επαγόμενο από το H_2O_2 οξειδωτικό στρες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μισάωρη προεπώση με το AK-AM1 από 50-1μM και ακολούθως επίδραση με H_2O_2 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι το AK-AM1 βελτιώνει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης στο εύρος συγκεντρώσεων 15-5μM σε σχέση με το H_2O_2 1mM. Αντίθετα, συγκεντρώσεις AK-AM1 μεγαλύτερες ή ίσες των 30μM και μικρότερες των 5μM δεν φαίνεται να μπορούν να αποτρέψουν την επαγόμενη από το H_2O_2 μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.

Η Βενζοθειαζίνη AK-AM2 [2-(4-διφαινυλ)-4μεθυλ-3-δihδρο-2H-βένζο(1,4)οξαθειαζιν-2-όλη] αποτελεί ένα ακόμη νέο μόριο που συνέθεσαν ο Martalis και συν., 2011 του οποίου επίσης η πιθανή αντιοξειδωτική δράση δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε σχέση με το επαγόμενο από το H_2O_2 οξειδωτικό στρες. Πρέπει να επισημάνουμε ότι και τα δύο μόρια συνδυάζουν χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικών και αντιυπερλιπιδαιμικών μορίων και η μόνη τους διαφορά είναι η αντικατάσταση ενός ατόμου οξυγόνου της βενζοξαζίνης AK-AM1 με ένα άτομο θείου στη βενζοθειαζίνη AK-AM2 (Martalis και συν., 2011, Liu και συν., 2009, Kourounakis και συν., 2008). Κατ'αντιστοιχία με το AK-AM1, πραγματοποιήθηκε και σε αυτήν την περίπτωση μισάωρη προεπώση με το AK-AM2 από 100-2,5μM και ακολούθως επίδραση με H_2O_2 1mM για 24 ώρες. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι το AK-AM2 στο εύρος συγκεντρώσεων 100-10μM, επαναφέρει την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα. Ωστόσο, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το AK-AM2 δεν μπορεί τελικά να βελτιώσει με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι αφενός και τα δύο μόρια παρουσιάζουν πολύ σημαντική αντιοξειδωτική δράση και αφετέρου ότι το AK-AM1 είναι ένα πολύ δραστικότερο μόριο σε σχέση με το AK-AM2 καθώς δρα σε ένα χαμηλότερο και πολύ στενότερο εύρος συγκεντρώσεων. Γενικά είναι γνωστό ότι οι βενζοξαζίνες, ακόμη και αυτές που αποκλίνουν

πολύ ως προς τα δομικά τους χαρακτηριστικά, παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση (Blattes και συν., 2005, Largeton και συν., 2001). Επιπλέον, σε προηγούμενες μελέτες τους οι Kourounakis και συν., 2008 & 2010., συνέθεσαν πολυάριθμους τύπους βενζοξαζινών που παρουσιάζαν αντιοξειδωτική, αντιυπερλιπιδαιμική και αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, ο Matralis και συν., 2011 έδειξαν για πρώτη φορά ότι σημαντική αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν και παράγωγα βενζοθειαζινών, εκτός από τις βενζοξαζίνες. Μάλιστα, σε αυτή τη δημοσίευση φάνηκε ότι η βενζοξαζίνη AK-AM1 είναι ένα πιο δραστικό μόριο σε σχέση με τη βενζοθειαζίνη AK-AM2. Συγκεκριμένα, το AK-AM1 είναι δραστικό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, αποτρέποντας την *in vitro* υπεροξειδωση των λιπιδίων σε συγκέντρωση 9μM και αναστέλλοντας την ενεργότητα του ενζύμου SQS σε συγκέντρωση 12,8μM. Αντίθετα, το AK-AM2 πετυχαίνει τα ίδια αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (83 και 16,5 μM αντίστοιχα), γεγονός που δείχνει ότι είναι ένα λιγότερο δραστικό μόριο. Επιπρόσθετα, μελέτες άλλων ερευνητικών ομάδων στον καρδιακό και λείο μυ (Studenik και συν., 1999) έχουν επίσης δείξει ότι το άτομο του οξυγόνου, που διαφοροποιεί τις βενζοξαζίνες από τις βενζοθειαζίνες, είναι αυτό που τους προσδίδει τη μεγαλύτερη δραστικότητα. Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της εργασίας μας, όσον αφορά τη διαφορετική δραστικότητα των βενζοξαζινών και βενζοθειαζινών, είναι σύμφωνα με τα προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα. Επιπλέον, το καινούριο και πολύ ενδιαφέρον εύρημα της εργασίας μας είναι ότι η βενζοθειαζίνη AK-AM2 δρα αντιοξειδωτικά σε ένα πάρα πολύ μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (100-10μM) σε σχέση με τη βενζοξαζίνη AK-AM1 (15-5μM). Αυτό πιθανά σημαίνει ότι η βενζοθειαζίνη AK-AM2, λόγω του ατόμου του θείου που διαθέτει, είναι ένα σταθερότερο και αποτελεσματικότερο στη χρήση του αντιοξειδωτικό μόριο σε σχέση με τη δραστικότερη βενζοξαζίνη AK-AM1.

4.2.4 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόντων κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη, AK-AM1, AK-AM2, μελατονίνη, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ & καταλάση έναντι του H₂O₂.

Προκειμένου να έχουμε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τον τρόπο δράσης της κουρκουμίνης (15μM), της ρεσβερατρόλης (30μM) και των AK-AM1 (15μM) και AK-AM2 (30μM), αποφασίσαμε να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με αυτήν άλλων γνωστών αντιοξειδωτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, χορηγήσαμε, πέραν των

προαναφερθέντων μορίων, και την αντιοξειδωτική ορμόνη μελατονίνη (15μM), το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση (50U/ml), τον σπουδαίο αντιοξειδωτικό παράγοντα του πλάσματος ουρικό οξύ (10μM) καθώς και το ασκορβικό οξύ/βιταμίνη-c (50μM). Ειδικότερα, πραγματοποιήσαμε δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT κατά την οποία έγινε μισάωρη προεπάση με όλους τους παραπάνω αντιοξειδωτικούς παράγοντες και εν συνεχεία επίδραση με H₂O₂ 1mM για 24 ώρες. Διαπιστώσαμε ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες που μπορούν και επαναφέρουν την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα είναι η ορμόνη μελατονίνη (15μM), το ένζυμο καταλάση (50U/ml), η κουρκουμίνη (15μM) και τέλος το AK-AM1 (15μM) & το AK-AM2 (30μM). Αντίθετα, το ουρικό οξύ (10μM), το ασκορβικό οξύ (50μM) και η ρεσβερατρόλη (30μM) δεν μπορούν να βελτιώσουν στατιστικά σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η ορμόνη μελατονίνη είναι ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό μόριο που απενεργοποιεί άμεσα τους περισσότερους τύπους ROS (Galano και συν., 2011, Gozo και συν., 1999), ενώ δρα και έμμεσα επηρεάζοντας ποικιλοτρόπως τη σηματοδότηση (Luchetti και συν., 2010, Bondi και συν., 2008, Choi και συν., 2008). Η αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης έχει επίσης αποδειχθεί σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε πλήρως διαφοροποιημένες μυικές ίνες (Hibaoui και συν., 2009) αλλά και σε *in vivo* πειράματα που προσομοίωναν συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Erkani και συν., 2005), έντονης άσκησης (Alonso και συν., 2006) και σήψης (Escames και συν., 2005) στο σκελετικό μυ. Ωστόσο, πρέπει να τονίσουμε ότι αντίστοιχα πειράματα δεν έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα σε καμία από τις γνωστές κυτταρικές σειρές σκελετικών μυοβλαστών όπως η C2, η C2C12 και η L6.

Το ένζυμο καταλάση είναι επίσης πασίγνωστο για τις αντιοξειδωτικές και κυτταροπροστατευτικές του ιδιότητες έναντι του H₂O₂ καθώς καταλύει τη μετατροπή του σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Kirkman και Gaetani., 2006, Gaetani και συν., 1996). Η αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση αυτού του ενζύμου που αποδείχθηκε στην παρούσα εργασία έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα της ομάδας μας (Aggeli και συν., 2011) που έδειξαν ότι η χορήγηση καταλάσης βελτιώνει τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης, απενεργοποιώντας τις παραγόμενες μέσω της ινσουλίνης ROS στους σκελετικούς μυοβλάστες C2. Επιπλέον, είναι γνωστές από τη βιβλιογραφία περιπτώσεις στις

οποιές η καταλάση απενεργοποιεί ειδικά το H_2O_2 σε κυτταρικές σειρές σκελετικών μυοβλαστών. Για παράδειγμα, ο Sciancalepore και συν., 2012 έδειξαν ότι η χορήγηση της καταλάσης εξαλείφει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα H_2O_2 σε σκελετικούς μυοβλάστες ποντικού. Ακόμη, ο Ding και συν., 2008 παρατήρησαν ότι η εξωγενής προσθήκη καταλάσης μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα H_2O_2 και συσχαιρένει την πορεία της κυτταρικής διαφοροποίησης των C2C12 μυοβλαστών. Τέλος, πολυάριθμες in vivo μελέτες (Avei και συν., 2012, Ozkan και συν., 2012, Yu και συν., 2012) έχουν δείξει ότι η αυξημένη ενεργότητα της καταλάσης στον σκελετικό μυ περιορίζει κατά πολύ τις επαγόμενες από τις ROS ιστολογικές βλάβες.

Το ουρικό οξύ και το ασκορβικό οξύ αν και αποτελούν ευρέως γνωστούς από τη βιβλιογραφία αντιοξειδωτικούς παράγοντες (Mandl και συν., 2009, Sautin και Johnson., 2008, Dher-Mascareno και συν., 2005, Zangar και συν., 2004), εν τούτοις δεν φαίνεται ότι είναι ικανοί να αποτρέψουν τον επαγόμενο από το H_2O_2 κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματά μας συμβαδίζουν με προηγούμενες αναφορές που καταδεικνύουν ότι και τα δύο αυτά είδη μορίων σε αρκετές περιπτώσεις όχι μόνο δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση αλλά αντίθετα μπορούν να μετατραπούν και σε οξειδωτικούς παράγοντες (Chen και συν., 2007, Bagnati και συν., 1999, Santos και συν., 1999). Ειδικότερα, όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, το ουρικό οξύ είναι ελάχιστα λιποδιαλυτό με αποτέλεσμα να εκδηλώνει κυρίως εξωκυτταρική αντιοξειδωτική δράση η οποία όμως πολλές φορές δεν είναι αρκετή ώστε να παρέχει πλήρη προστασία στα κύτταρα (Mugaoka και συν., 2003). Είναι αναγκαίο να επισημάνουμε ότι το ουρικό οξύ μπορεί να δράσει και ενδοκυτταρικά υπό την προϋπόθεση ότι στα κύτταρα-στόχους εκφράζονται οι κατάλληλοι μεταφορείς (Sautin και Johnson., 2008). Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε την ύπαρξη πέντε μεταφορέων του ουρικού οξέος (URAT-1, OAT-3,-4 & -10 & GLUT-9) οι οποίοι εκφράζονται στους νεφρούς, στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό και στο έντερο αλλά όχι στο σκελετικό μυ (So και Thorens., 2010, Sautin και συν., 2007, Joost και συν., 2001). Σύνεπως, η δράση του ουρικού οξέος στο σκελετικό μυ είναι κατά κύριο λόγο εξωκυτταρική και όχι κατ'ανάγκη κυτταροπροστατευτική, καθώς μία επιδημιολογική μελέτη του Beavers και συν., 2009 είχε συσχετίσει θετικά τα επίπεδά του στον ορό με την απώλεια μυϊκής μάζας και την εκδήλωση σαρκοπενίας.

Αναφορικά με το ασκορβικό οξύ (50μM), αξίζει να επισημάνουμε ότι πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα της ομάδας μας έδειξαν ότι μπορεί και παρέχει προστασία έναντι των παραγόμενων από την ινσουλίνη ROS (Aggeli και συν., 2011), ενώ στην παρούσα

εργασία δεν παρατηρήσαμε αντιοξειδωτική δράση έναντι του H_2O_2 1mM. Αντίστοιχα, η Pechtelidou και συν., 2008, διαπίστωσαν ότι το ασκορβικό οξύ σε αντιοξειδωτικές συγκεντρώσεις δεν μπορεί να αναστρέψει τον επαγόμενο από το H_2O_2 κυτταρικό θάνατο στους καρδιακούς μυοβλάστες H9C2. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανά δείχνουν ότι το ασκορβικό οξύ είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην απενεργοποίηση άλλων τύπων ROS, πέραν του H_2O_2 . Είναι γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ απενεργοποιεί άμεσα κυρίως περόξυλ-ρίζες $[ROO\cdot]$ καθώς και το μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης/singlet oxygen $[^1O_2]$ (Sies και συν., 1992). Ωστόσο, δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένη η ικανότητά του να απενεργοποιεί και το H_2O_2 καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις στις οποίες το H_2O_2 μπορεί να μετατρέψει το ασκορβικό οξύ σε προοξειδωτικό μόριο και μάλιστα το φαινόμενο αυτό εμφανίζει ειδικότητα σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους (Hardaway και συν., 2012, Parker και συν., 2011).

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι το πιο σημαντικό εύρημα απ' αυτή τη συγκριτική μελέτη των αντιοξειδωτικών παραγόντων είναι το γεγονός ότι τα δύο νεοσυντιθέμενα μόρια AK-AM1 (15 μ M) και AK-AM2 (30 μ M) καθώς και η κουρκουμίνη (15 μ M) παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση αντίστοιχη δύο πολύ σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων όπως το ένζυμο καταλάση (50U/ml) και η ορμόνη μελατονίνη (15 μ M). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό ειδικά αν λάβουμε υπόψη ότι άλλα πολύ σπουδαία αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και η ρεσβερατρόλη αδυνατούν να αποτρέψουν τα επαγόμενα από το H_2O_2 γεγονότα κυτταρικού θανάτου. Μάλιστα αξίζει να επισημάνουμε ότι η συμπεριφορά της βενζοθειαζίνης AK-AM2 προσομοιάζει πολύ με της μελατονίνης, καθώς η ορμόνη αυτή, όμοια με το AK-AM2, παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση σε ένα πολύ μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (Luchetti και συν., 2010, Urata και συν., 1999).

4.3. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων κουρκουμίνη, μελατονίνη, AK-AM1, AK-AM2, ρεσβερατρόλη & ουρικό οξύ στην επαγόμενη από το H_2O_2 ενεργοποίηση των κινασών ERKs & JNKs.

Προκειμένου να διαλευκάνουμε το μηχανισμό δράσης των προαναφερθέντων αντιοξειδωτικών παραγόντων θελήσαμε στη συνέχεια να εξετάσουμε το εάν τροποποιούνται τα επαγόμενα από το H_2O_2 σηματοδοτικά μονοπάτια. Από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Kefaloyianni και συν., 2006) γνωρίζουμε ότι η παρουσία H_2O_2 1 mM προάγει έντονη

ενεργοποίηση των κινασών ERKs και JNKs με μέγιστο τα 15 λεπτά χρόνου επίδρασης. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε προεπώαση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες κουρκουμίνη (15 μ M), μελατονίνη (15 μ M), AK-AM1 (15 & 5 μ M), AK-AM2 (30 & 15 μ M) & ρεσβερατρόλη (30 μ M) & εν συνεχεία επίδραση με H₂O₂ 1 mM για 15 λεπτά. Επιπλέον, σε μία ξεχωριστή ομάδα πειραμάτων έγινε δοσοεξαρτώμενη προεπώαση με ουρικό οξύ από 10-0,25 μ M. Τέλος, πρέπει να επισημάνουμε ότι η καταλάση (50U/ml) και το ασκορβικό οξύ (50 μ M) δεν χορηγήθηκαν καθώς είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι μπορούν να αναστέλλουν την επαγόμενη από το H₂O₂ (Li και συν., 2011, Ding και συν., 2001) αλλά και από άλλους τύπους ROS (Aggeli & Theofilatos., 2011, Cidrova-Davies και συν., 2007) ενεργοποίηση των κινασών ERKs & JNKs.

Πειραματικά, διαπιστώσαμε ότι όλοι οι χορηγούμενοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ακόμη και το ουρικό οξύ και η ρεσβερατρόλη, μπορούν και αναστέλλουν με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο την επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των κινασών ERKs και JNKs. Είναι αναγκαίο να επισημάνουμε την ύπαρξη μιας μικρής διαφοροποίησης μεταξύ των δύο υποοικογενειών, όσον αφορά τις δραστικές/ανασταλτικές συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, η βενζοξαζίνη AK-AM1 μπορεί και αναστέλλει αποτελεσματικά την ενεργοποίηση των ERKs τόσο στα 15 όσο και στα 5 μ M, ενώ για τις κινάσες JNKs η αναστολή αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο για τα 5 μ M. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος αυξάνει και ο βαθμός της % αναστολής των ERKs ο οποίος και μεγιστοποιείται στα 10 μ M. Ωστόσο, για τις κινάσες JNKs η αναστολή αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο για τα 10 μ M ουρικού οξέος και αφορά μόνο την p46 ισομορφή. Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι και για τα δύο είδη κινασών, η βενζοξαζίνη AK-AM1 έχει ισχυρότερη ανασταλτική δράση στα 5 μ M, ενώ η βενζοθειαζίνη AK-AM2 στα 30 μ M. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με την προηγούμενη μελέτη των Matralis και συν., 2011 που έδειξαν ότι η βενζοξαζίνη AK-AM1 είναι ένα δραστικότερο αντιοξειδωτικό μόριο σε σχέση με τη βενζοθειαζίνη AK-AM2, καθώς αφενός αναστέλλει σε χαμηλότερη συγκέντρωση την *in vitro* υπεροξειδωση των λιπιδίων και αφετέρου προκαλεί μεγαλύτερη μείωση όλων των δεικτών της υπελιπιδαιμίας του πλάσματος (τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, LDL, αναλογία LDL/HDL) καθώς και της MDA.

Από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (Aggeli και συν., 2010, Kefaloyianni και συν., 2006) γνωρίζουμε ότι η επαγόμενη από το H₂O₂ ενεργοποίηση των ERKs και των JNKs

προάγει τελικά σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης. Συνεπώς, εφόσον παρουσία των αντιοξειδωτικών παραγόντων διαπιστώνουμε αναστολή της ενεργοποίησης αυτών των κινασών αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι δρουν σε ένα άμεσο επίπεδο απενεργοποιώντας τόσο το H_2O_2 όσο και τις πιθανά δευτερογενείς παραγόμενες μέσω αυτού ελευθερές ρίζες. Με άλλα λόγια, αυτό υποδεικνύει ότι ίσως έχουμε μία καθολική μείωση των ROS και έτσι δεν χρειάζεται να ενεργοποιηθούν τόσο έντονα οι ERKs & οι JNKs για να προστατεύσουν τα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι τόσο η μελατονίνη όσο και η κουρκουμίνη παρουσιάζουν άμεση δράση απενεργοποιώντας ποικιλία ROS όπως ρίζες υδροξυλίου (OH \cdot), περόξυ-, αλκόξυ- ρίζες, καθώς και άλλα πολύ δραστικά μόρια όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO), ο υπεροξυνιτρίτης (ONOO $^-$) και το μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen/ 1O_2) (Galano και συν., 2011, Baum και συν., 2004). Επιπλέον, οι Chen και συν., 2006 διαπίστωσαν ότι σε καρκινικά κύτταρα γλοιώματος, η προεπώαση με φλαβονοειδή αναστέλλει την επαγόμενη από το H_2O_2 ενεργοποίηση των ERKs λόγω άμεσης απενεργοποίησης των ROS που αυτό παράγει. Εξάλλου και προηγούμενα αποτελέσματα της ομάδας μας (Aggeli & Theofilatos., 2011) έχουν δείξει ότι οι παραγόμενες από την ινσουλίνη ROS προάγουν μία παροδική ενεργοποίηση των κινασών ERKs και JNKs η οποία συμβάλλει σε φαινόμενα κυτταρικής επιβίωσης μέσω αυξημένης έκφρασης του ενζύμου HOX-1. Ωστόσο, αυτή η ενεργοποίηση αναστέλλεται όταν γίνει προεπώαση με τα αντιοξειδωτικά ασκορβικό οξύ (50 μ M), καταλάση (50U/ml) & κουρκουμίνη (1 μ M), καταδεικνύοντας έτσι έναν άμεσο μηχανισμό απενεργοποίησης των ROS από αυτούς τους παράγοντες.

Από την άλλη πλευρά, είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες ουρικό οξύ (10 μ M) και ρεσβερατρόλη (30 μ M) αναστέλλουν με στατιστικά σημαντικό τρόπο την ενεργοποίηση και των ERKs και των JNKs, αλλά αυτό δεν είναι αρκετό για να αποτρέψει τον κυτταρικό θάνατο. Τα αποτελέσματα αυτά συνδυαστικά δείχνουν ότι οι δύο αυτές ενώσεις ενώ παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, αυτή δεν είναι τελικά επαρκής για να διατηρήσει την κυτταρική επιβίωση σε υψηλά επίπεδα. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι και οι δύο αυτές χημικές ενώσεις λόγω δομής έχουν μειωμένη λιποφιλικότητα και έτσι εκδηλώνουν κυρίως μία μερική εξωκυτταρική δράση (Frombaum και συν., 2011, Muraoka και συν., 2003). Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Chen και συν., 2011, χορηγώντας την κουρκουμίνη ως

αντιοξειδωτικό παράγοντα και εν συνεχεία επιδρώντας με H₂O₂ στα HepG2 ηπατικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι η προεπάση με κουρκουμίνη κατάλληλης συγκέντρωσης μειώνει δραματικά τις παραγόμενες μέσω του H₂O₂ ROS, αλλά τελικά αυτό δεν είναι αρκετό ώστε να αποφευχθεί η αύξηση διάφορων προαποπτωτικών δεικτών και τελικά η επαγωγή αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν αρκεί μόνο η άμεση δράση ενός αντιοξειδωτικού μορίου προκειμένου να έχουμε πλήρη προστασία από ένα προοξειδωτικό μόριο. Με βάση όλα τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες κουρκουμίνη (15μM), μελατονίνη (15μM), AK-AM1 (15 & 5μM) & AK-AM2 (30 & 15μM) έχουν και άλλες δράσεις, πέραν της άμεσης, και χάρη σε αυτές μπορούν τελικά και αποτρέπουν τον επαγόμενο από το H₂O₂ κυτταρικό θάνατο.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η μελατονίνη όσο και η κουρκουμίνη, λόγω της λιποφιλικότητας τους, διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και τροποποιούν ενδοκυτταρικά διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Galati και συν., 2002, Ceraulo και συν., 1999, Menendez-Pelaez και Reiter 1993). Για παράδειγμα, η μελατονίνη είναι γενικά γνωστό ότι προάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras,Raf,MEK1/2,ERK1/2 (Bondi και συν., 2008), το σηματοδοτικό μονοπάτι των φωσφολιπασών PLC-β,PLC-η (Fucunaga και συν., 2002) καθώς και το μονοπάτι των κινασών PI3K,Akt (Choi και συν., 2008). Επίσης, παρουσία της μελατονίνης, συχνά διαπιστώνεται αναστολή της ενεργότητας των ενεργοποιούμενων από καταστάσεις στρες κινασών p38-MAPKs και JNKs καθώς και μία καθολική μείωση της ικανότητας του NF-κβ για πρόσδεση στο DNA (Chan και συν., 2002). Η κουρκουμίνη από την πλευρά της δρώντας ως αντιοξειδωτικό μόριο, έχει βρεθεί ότι μπορεί και αναστέλλει την επαγόμενη από τον LPS (Jung και συν., 2006) και τον VEGF (Binion και συν., 2008) ενεργοποίηση και των τριών μελών των MAPKs. Αναφορικά με τα νεοσυντιθέμενα μόρια AK-AM1 & AK-AM2 είναι αναγκαίο να τονίσουμε ότι δεν υπάρχουν προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τον τρόπο δράσης τους ενδοκυτταρικά. Ωστόσο, επειδή τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μεγάλη λιποφιλικότητα (Matralis και συν., 2011), κατά πάσα πιθανότητα διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες & επηρεάζουν ποικιλοτρόπως και τη μεταγωγή του σήματος.

4.4. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων μελατονίνη (15μM), καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.

Θέλοντας να διερευνήσουμε περαιτέρω τον τρόπο δράσης των αντιοξειδωτικών παραγόντων καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), μελατονίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM), αποφασίσαμε να χορηγήσουμε ως προοξειδωτικό παράγοντα την κουρκουμίνη (50 μM) που παράγει περισσότερες μορφές ROS σε σχέση με το H₂O₂ (Cui και συν., 2006, Atsumi και συν., 2005α & β). Η συγκέντρωση των 30μM για το AK-AM2 επιλέχθηκε με βάση το γεγονός ότι σε αυτήν παρουσιάζεται η μέγιστη αναστολή των κινασών ERKs και JNKs και ταυτόχρονα αποτρέπεται ο επαγόμενος από το H₂O₂ κυτταρικός θάνατος.

Για το AK-AM1, επιλέξαμε τη συγκέντρωση των 15μM και όχι αυτή των 5μM, επειδή σε αυτήν παρουσιάζε πιο ήπια ανασταλτική δράση έναντι του H₂O₂ σε επίπεδο σηματοδότησης. Με βάση την παραπάνω ένδειξη υποθέσαμε ότι αυτή η συγκέντρωση του AK-AM1 έναντι της κουρκουμίνης, που είναι ένα πολύ δραστικότερο μόριο σε σχέση με το H₂O₂, μπορεί να οδηγούσε σε αλλαγή του τρόπου δράσης του. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώθηκε ότι η μισάωρη προεπάση με τη νεοσυντιθέμενη βενζοθειαζίνη AK-AM2, το αντιοξειδωτικό ένζυμο καταλάση και την αντιοξειδωτική ορμόνη μελατονίνη επαναφέρει την κυτταρική επιβίωση στα επίπεδα του μάρτυρα. Αντίθετα, το ουρικό οξύ και η ρεσβερατρόλη αδυνατούν, όπως και στην περίπτωση του H₂O₂ 1mM, να βελτιώσουν τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με την κουρκουμίνη. Τέλος, είναι αξιοσημείωτη η μετατροπή του ασκορβικού οξέος και της βενζοξαζίνης AK-AM1 σε προοξειδωτικά μόρια, καθώς η κυτταρική επιβίωση μειώθηκε στατιστικά σημαντικά όχι μόνο ως προς το μάρτυρα αλλά και ως προς την κουρκουμίνη.

Η ικανότητα της καταλάσης να αποτρέπει τον επαγόμενο από την κουρκουμίνη κυτταρικό θάνατο δείχνει ότι πιθανότατα υπάρχει παραγωγή H₂O₂ ή (και) O₂⁻/υπεροξειδικού ανιόντος (το οποίο μετατρέπεται άμεσα σε H₂O₂ με τη δράση των υπεροξειδικών δισμουτασών). Αρκετές μελέτες στο παρελθόν έχουν καταλήξει σε αντίστοιχα αποτελέσματα, αν και οι περισσότερες εξ'αυτών αφορούν καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, οι Zheng και συν., 2012, έδειξαν ότι η προοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης σε καρκινικά κύτταρα

αναστέλλεται όταν γίνει αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της ενδογενώς παραγόμενης καταλάσης, αλλά όχι ύστερα από εξωγενή προσθήκη της. Άλλοι ερευνητές (Lu και συν., 2012, Atsumi και συν., 2005α) χρησιμοποιώντας διαφορετικές καρκινικές σειρές διαπίστωσαν ότι αρκεί και η προσθήκη εξωκυτταρικά εντοπιζόμενης καταλάσης προκειμένου να μετριασθεί η προοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η εξωγενής προσθήκη καταλάσης μπορεί και αναστέλλει μερικώς και την οξειδωτική/αντιπαρασιτική δράση της κουρκουμίνης σε παράσιτα *Plasmodium falciparum* εντός ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (Cui και συν., 2007). Επειδή κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήσαμε καταλάση βοώς που εντοπίζεται μόνο εξωκυτταρικά, υποθέτουμε ότι ένα μεγάλο ποσοστό του παραγόμενου μέσω της κουρκουμίνης H_2O_2 , θα εντοπίζεται επίσης εξωκυτταρικά.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση της ορμόνης μελατονίνη έναντι της κουρκουμίνης, πρέπει να τονίσουμε ότι δεν υπάρχει έως τώρα καμία σχετική βιβλιογραφική αναφορά. Παρ'όλα αυτά, η ικανότητά της να απενεργοποιεί τις παραγόμενες μέσω της κουρκουμίνης ROS είναι μάλλον αναμενόμενη, καθώς η μελατονίνη αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό μόριο ευρέως φάσματος που απενεργοποιεί ποικιλία ROS όπως ρίζες υδροξυλίου (OH), μοριακό οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης/singlet oxygen (1O_2) και H_2O_2 (Rosen και συν., 2012, Galano και συν., 2002).

Επιπρόσθετα, θεωρούμε εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι το ασκορβικό οξύ καθώς και η βενζοξοαζίνη AK-AM1, αλλά όχι η βενζοθειαζίνη AK-AM2, παρουσίασαν προοξειδωτική και συνεργιστική με την κουρκουμίνη δράση ενώ κάτι τέτοιο δεν συνέβη στο αντίστοιχο πείραμα με το H_2O_2 . Με βάση αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι και στο δικό μας πειραματικό μοντέλο η κουρκουμίνη δημιουργεί και άλλους τύπους ROS, πέραν του H_2O_2 , και αυτές είναι που πιθανά ευθύνονται για την αλλαγή της δράσης αυτών των δύο μορίων. Αναφορικά με το ασκορβικό οξύ, πρέπει να επισημανθεί ότι υπάρχουν κάποια βιβλιογραφικά δεδομένα που αποδεικνύουν τη μετατροπή του σε προοξειδωτικό μόριο παρουσία της κουρκουμίνης, αλλά όλα αφορούν είτε καθαρά *in vivo* μελέτες είτε καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι φυσιολογικά όπως αυτά που χρησιμοποιήσαμε. Ο Sahu και συν., 1992 έδειξε για πρώτη φορά ότι τόσο η κουρκουμίνη όσο και το ασκορβικό οξύ μπορούν να παρουσιάσουν συνεργιστική προοξειδωτική δράση παρουσία και άλλων χημειοθεραπευτικών/οξειδωτικών παραγόντων σε καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, ο

συγκεκριμένος ερευνητής εξέτασε αυτά τα δύο μόρια μεμονωμένα και όχι συνδυαστικά. Η πρώτη συνδυαστική μελέτη της δράσης του ασκορβικού οξέος και της κουρκουμίνης έγινε από τους Galati και συν., 2002 σε *in vitro* επίπεδο. Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι η κουρκουμίνη οξειδώνεται η ίδια σε μία φαινόξυλ-ρίζα και στη συνέχεια οξειδώνει το ασκορβικό οξύ το οποίο μετατρέπεται σε μία πολύ δραστικότερη ελεύθερη ρίζα. Αυτή η οξείδωση της κουρκουμίνης γίνεται κατά πάσα πιθανότητα ενζυμικά με τη μεσολάβηση κάποιας υπεροξειδάσης. Επίσης, υπάρχει πιθανότητα να συμβεί και αυτοοξείδωση της κουρκουμίνης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μεταβατικών μετάλλων (Fe, Cu κ.α), πράγμα που ωστόσο δεν είναι πολύ σύνηθες στο πλάσμα του αίματος. Επίσης, μία μετέπειτα μελέτη των Fujisawa και συν., 2006 ενίσχυσε τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς έδειξε ότι η κουρκουμίνη οξειδώνει το ασκορβικό οξύ πολύ πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες και αυξάνει το βαθμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, σε μία σημαντική εργασία τους οι Zheng και συν., 2012 έδειξαν ότι η κυτταροτοξική δράση της κουρκουμίνης ενισχύεται δραματικά σε καρκινικά κύτταρα παρουσία του ασκορβικού οξέος, της βιταμίνης-ε και του Trolox (το υδατοδιαλυτό παράγωγο της βιταμίνης-ε). Η αυξημένη αυτή κυτταροτοξικότητα αποδόθηκε στην ενισχυμένη και αποκλειστικά ενδοκυτταρική αύξηση διάφορων τύπων ROS, όπως το H_2O_2 και το $O_2^{\cdot-}$ (υπεροξειδικό ανιόν). Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνητών μπορούν να συσχετισθούν και με την, παρατηρηθήσα στην παρούσα εργασία, προοξειδωτική δράση της βενζοξαζίνης AK-AM1 καθώς η ένωση αυτή σχεδιάστηκε έτσι ώστε να παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με το Trolox (Matralis και συν., 2011). Το ότι η προοξειδωτική αυτή δράση εκδηλώνεται ειδικά για τη βενζοξαζίνη AK-AM1, αλλά όχι για τη βενζοθειαζίνη AK-AM2, υποδεικνύει την τεράστια επίπτωση της αντικατάστασης του ατόμου του οξυγόνου από το άτομο του θείου, στη δραστικότητα των δύο νεοσυντιθέμενων μορίων.

4.5. Επίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων μελατονίνη (15μM), καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη & το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής επιβίωσης.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε το κατά πόσον κάποιος από τους παράγοντες καταλάση (50U/ml), ασκορβικό οξύ (50μM), ουρικό οξύ (10μM), μελατονίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), AK-AM1 (15μM) & AK-AM2 (30μM) μπορεί να παρουσιάσει αντιοξειδωτική δράση έναντι πολύ ισχυρού οξειδωτικού στρες επαγόμενου από τη συνδυαστική παρουσία κουρκουμίνης 50μM & H₂O₂ 1mM. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, διαπιστώσαμε ότι κανένας από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν μπορεί να βελτιώσει στατιστικά σημαντικά την κυτταρική επιβίωση σε σχέση με την κουρκουμίνη 50μM & H₂O₂ 1mM. Συνεπώς, παρατηρήσαμε ότι όταν οι συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι πολύ έντονες είναι αδύνατον να αποτραπεί ο κυτταρικός θάνατος. Κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο, καθώς πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ROS, τόσο οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που διαθέτουν όσο και οι εξωγενώς χορηγούμενοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες καθίστανται τελικά ανεπαρκείς (Elahi και συν., 2009).

4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ

4.6.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των κινασών ERKs & JNKs.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο η κουρκουμίνη επηρεάζει τη μεταγωγή του σήματος στους C2 σκελετικούς μυοβλάστες, πραγματοποιήσαμε αρχικά επίδραση με κουρκουμίνη 50μM από 15 έως 240 λεπτά και στη συνέχεια ανιχνεύσαμε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των κινασών ERKs & JNKs. Διαπιστώσαμε ότι το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης διέφερε μεταξύ των δύο υποοικογενειών των MAPKs, ενώ αντίθετα παρουσία H₂O₂ 1mM το πρότυπο αυτό ήταν ίδιο, με μέγιστη ενεργοποίηση και των δύο κινασών στα 15 λεπτά χρόνου επόδρασης. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της κουρκουμίνης παρατηρήσαμε μία μέγιστη ενεργοποίηση για τις κινάσες ERKs στα 15 λεπτά χρόνου επίδρασης, η οποία σταδιακά μειώνεται και τελικά στα 120 και 240 λεπτά έχει επανέλθει στα επίπεδα του μάρτυρα. Αντίθετα, οι JNKs ενεργοποιούνται

στατιστικά σημαντικά από τα 60 λεπτά χρόνου επίδρασης παρουσιάζοντας ένα μέγιστο μεταξύ 120 και 240 λεπτών (2-4 ώρες).

Γενικά, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η μέγιστη ενεργοποίηση κάποιας κομβικής για τη μεταγωγή του σήματος κινάσης έπειτα από λίγα λεπτά του χρόνου εφαρμογής του στρεσογόνου ερεθίσματος συσχετίζεται πιθανά με μία προσπάθεια επαγωγής κυτταροπροστατευτικών μονοπατιών. Αντίθετα, η παρατεταμένη και σε μεγάλους χρόνους (της τάξεως των ωρών) ενεργοποίηση συσχετίζεται συχνά με την επαγωγή προαποπτωτικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, οι Kim και συν., 2008, έδειξαν ότι η παρουσία κουρκουμίνης 0,5μM πράγει μία παροδική ενεργοποίηση των κινασών ERKs σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα η οποία συσχετίζεται με επαγωγή κυτταροπροστασίας και αύξησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, άλλες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έχουν δείξει ότι η παρουσία της κουρκουμίνης προάγει ενεργοποίηση των κινασών ERKs, η οποία όταν ανασταλεί οδηγεί σε αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Aoki και συν., 2007). Ακόμη, παρουσία έντονων συνθηκών οξειδωτικού στρες επαγόμενου από το t-BOOH (τερτβουτυλοϋδροϋπεροξειδίο) στα HepG2 ηπατικά κύτταρα, έχει διαπιστωθεί ότι οι κινάσες ERKs ενεργοποιούνται παροδικά (μεταξύ 30-60 λεπτών) και το γεγονός αυτό συνεισφέρει στην εκδήλωση κυτταρικής προστασίας. Αντίθετα, οι κινάσες JNKs ενεργοποιούνται χρονικά αργότερα (μέγιστα στις 2 ώρες) και προάγουν αποπτωτικά κυτταρικά γεγονότα (Martin και συν., 2010). Επιπλέον, υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα που δείχνουν ότι η επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των κινασών JNKs οδηγεί σε απόπτωση. Σύμφωνα με τους Moussavi και συν., 2006 η παρουσία κουρκουμίνης 100μM, σε καρκινικά κύτταρα προέρχόμενα από το κώλον, προάγει μέγιστη ενεργοποίηση των κινασών JNKs στις 8 ώρες, η οποία οδηγεί τελικά σε απόπτωση. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Yang και συν., 2012 καθώς παρατήρησαν ότι η κουρκουμίνη 50μM προάγει απόπτωση ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης των κινασών JNKs. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Han και συν., 2012 η κουρκουμίνη σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές προάγει σταδιακή ενεργοποίηση των κινασών JNKs με ένα δοσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο πρότυπο οι οποίες και τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι, αλλά και άλλοι ερευνητές, παρατήρησαν ότι όταν οι κινάσες ERKs ενεργοποιούνται και αυτές παρατεταμένα και σε μεγάλους χρόνους,

συνεισφέρουν, όμοια με τις JNKs, στην επαγωγή απόπτωσης και όχι κυτταρικής επιβίωσης (Han και συν., 2012, Yang και συν., 2012).

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι, στην παρούσα εργασία, οι κινάσες ERKs & JNKs έχουν πιθανόν κάποιο διαφορετικό κυτταροβιολογικό ρόλο παρουσία της κουρκουμίνης 50μM, καθώς παρουσιάζουν ένα πολύ διαφορετικό χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης. Συγκεκριμένα, η παροδική ενεργοποίηση των κινασών ERKs θα μπορούσε να οδηγεί σε κυτταρική προστασία, ενώ αντίθετα, η παρατεταμένη και σε μεγάλους χρόνους ενεργοποίηση των κινασών JNKs πιθανόν ευνοεί γεγονότα κυτταρικού θανάτου.

4.6.2. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs.

Θέλοντας αφενός να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα της δράσης των παραγόντων ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2(30μM) στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη κυτταρικό θάνατο και αφετέρου να διερευνήσουμε περαιτέρω τον κυτταροβιολογικό ρόλο των ERKs, πραγματοποιήσαμε στη συνέχεια ανάλυση κατά Western. Συγκεκριμένα, έγινε μισάωρη προεπάση με όλους τους παράγοντες και κατόπιν επίδραση με κουρκουμίνη (50μM) για 15 λεπτά. Διαπιστώθηκε ότι τα προοξειδωτικά μόρια AK-AM1 (15μM) καθώς και το ασκορβικό οξύ (50μM) αναστέλλουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των ERKs. Επίσης, μία μερική αλλά στατιστικά σημαντική αναστολή διαπιστώνεται και παρουσία της βενζοθειαζίνης AK-AM2 (30μM) καθώς και της μελατονίνης (15μM). Αξίζει να επισημανθεί ότι για την μελατονίνη η αναστολή αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο για την p42-ERK αλλά όχι για την p44-ERK. Τέλος, ήταν αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η καταλάση δεν είχε καμία ανασταλτική δράση.

Γενικά, είναι βιβλιογραφικό γνωστό ότι η μελατονίνη συνήθως ενισχύει την επαγόμενη από τις συνθήκες οξειδωτικού στρες ενεργοποίηση των κινασών ERKs επειδή κατά κανόνα οι κινάσες αυτές οδηγούν σε αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης (Luchetti και συν., 2010, Bondi και συν., 2008). Από τη άλλη πλευρά οι Esposito και συν., 2009, αναφέρουν ότι σε *in vivo* ζωικά μοντέλα η μελατονίνη αναστέλει, μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης, την επαγόμενη από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού ενεργοποίηση των ERKs. Στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε ότι η προεπάση με μελατονίνη 15μM οδηγεί αφενός σε μία πολύ ήπια αναστολή της p42-ERK και αφετέρου σε αποτροπή του επαγόμενου από την

κουρκουμίνη κυτταρικού θανάτου. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η μελατονίνη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM έως και μM προάγει συνήθως άμεση απενεργοποίηση των ROS λόγω της προσφοράς ηλεκτρονίων (Luchetti και συν., 2010). Συνεπώς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε, βάσει της συγκέντρωσης που χρησιμοποιήσαμε, ότι και στη δικιά μας περίπτωση η μελατονίνη πιθανόν να δρα σε ένα άμεσο επίπεδο απενεργοποιώντας κάποιες από τις παραγόμενες μέσω της κουρκουμίνης ROS και οδηγώντας έτσι σε ένα μικρότερο βαθμό ενεργοποίησης της p42-ERK.

Αναφορικά με τη δράση της καταλάσης, είναι αξιοσημείωτο το ότι δεν μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη μέσω της κουρκουμίνης ενεργοποίηση των κινασών ERKs, ενώ αντίθετα μπορούσε να παρουσιάσει αυτή την ανασταλτική δράση παρουσία του H_2O_2 (Kefaloyianni και συν., 2006). Εφόσον η καταλάση που χορηγήσαμε εντοπίζεται και απενεργοποιεί το H_2O_2 μόνο εξωκυτταρικά, τα αποτελέσματά μας αυτά δείχνουν ότι στην περίπτωση της κουρκουμίνης πιθανόν έχουμε ένα διαφορετικό μηχανισμό ενεργοποίησης των κινασών ERKs. Δηλαδή, οι ERKs ενδέχεται να ενεργοποιούνται από ενδοκυτταρικά παραγόμενο μέσω της κουρκουμίνης H_2O_2 ή και από κάποιο άλλο τύπο ROS και γι' αυτό το λόγο η καταλάση δεν μπορεί να δράσει ανασταλτικά. Σε ένα αντίστοιχο συμπέρασμα είχαν καταλήξει και οι Osada και συν., 2008, καθώς παρατήρησαν σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα ότι η εξωγενώς χορηγούμενη καταλάση μπορεί και αναστέλει την επαγόμενη από το H_2O_2 ενεργοποίηση των ERKs, ενώ αδυνατεί να το κάνει όταν χορηγηθεί σε προοξειδωτικές συγκεντρώσεις η πολύ διαφορετική από δομικής άποψης βιταμίνη-κ3 (VK3).

Η νεοσυντιθέμενη βενζοθειαζίνη AK-AM2 παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της επαγόμενης από την κουρκουμίνη ενεργοποίησης των ERKs ενώ παράλληλα διατήρησε τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης σε επίπεδα παρεμφερή με του μάρτυρα. Το μόριο αυτό γνωρίζουμε ότι παρουσιάζει πολύ καλή λιποφιλικότητα (Matralis και συν., 2011) και συνεπώς πιθανότατα διαπερνά με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες και δρώντας ενδοκυτταρικά απενεργοποιεί κάποιες παραγόμενες από την κουρκουμίνη ROS, οδηγώντας έτσι και σε μικρότερο βαθμό ενεργοποίησης των ERKs.

Όπως προαναφέραμε και στη συζήτηση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, υπάρχουν κάποιες λίγες βιβλιογραφικές αναφορές που δείχνουν ότι η κουρκουμίνη και το ασκορβικό οξύ μπορούν να παρουσιάσουν μαζί ισχυρή

συνεργιστική προοξειδωτική δράση (Zheng και συν., 2012, Fujisawa και συν., 2006, Galati και συν., 2002). Επίσης, η προοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος και η ενίσχυση των φαινομένων κυτταρικού θανάτου έχει δειχθεί και παρουσία και άλλων εν δυνάμει προοξειδωτικών μορίων όπως η αργινίνη (Hsi και συν., 2011) και το As_2O_3 (Ong και συν., 2011). Πρέπει να επισημανθεί ότι μέχρι τώρα δεν υπάρχει κάποιο βιβλιογραφικό δεδομένο που να αναφέρεται στα επίπεδα ενεργοποίησης των κινασών ERKs όταν η κουρκουμίνη και το ασκορβικό οξύ παρουσιάζουν μαζί συνεργιστική προοξειδωτική δράση. Οι Varadharaj και συν., 2006 έδειξαν ότι η παρουσία του ασκορβικού οξέος αυξάνει τα επίπεδα των ROS και μέσω αυτών αυξάνει και η ενεργοποίηση των κινασών ERKs. Από την άλλη πλευρά, ο Meves και συν., 2002 έδειξαν ότι η χορήγηση ενός λιποδιαλυτού παραγώγου του ασκορβικού οξέος ενισχύει την επαγόμενη μέσω της UVB ακτινοβολίας κυτταροτοξικότητα ενώ παράλληλα αναστέλλει την επαγόμενη μέσω αυτής ενεργοποίηση των ERKs που είχαν κυτταροπροστατευτικό ρόλο.

Συμπερασματικά, εάν συνδυάσουμε το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης των κινασών ERKs με το γεγονός ότι αυτές αναστέλονται σε πολύ βαθμό παρουσία των προοξειδωτικών μορίων ασκορβικό οξύ και της νεοσυντιθέμενης βενζοξαζίνης AK-AM1, θα μπορούσε να ενισχυθεί η άποψη ότι οι επαγόμενες μέσω της κουρκουμίνης ERKs έχουν πιθανόν κυτταροπροστατευτικό ρόλο.

4.6.3. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των JNKs.

Οι παράγοντες ασκορβικό οξύ (50 μ M), AK-AM1 (15 μ M), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) & AK-AM2 (30 μ M) φάνηκε ότι επηρεάζουν με πολύ διαφορετικό τρόπο την επαγόμενη από την κουρκουμίνη (50 μ M για 2 ώρες) ενεργοποίηση των JNKs, σε σχέση με τις κινάσες ERKs. Συγκεκριμένα, η προεπάση για 30 λεπτά με τους προοξειδωτικούς παράγοντες ασκορβικό οξύ (50 μ M) & AK-AM1 (15 μ M) αυξάνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από την κουρκουμίνη % ενεργοποίηση των JNKs. Αντίθετα, η προεπάση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) & AK-AM2 (30 μ M) μειώνει με ένα στατιστικά σημαντικό πρότυπο αυτή την ενεργοποίηση.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης πρέπει να αναφέρουμε ότι γενικά είναι γνωστό ότι μπορεί να αποτρέψει την ενεργοποίηση των κινασών JNKs όταν αυτές προάγουν γεγονότα κυτταρικού θανάτου. Για παράδειγμα σε μία in vivo μελέτη των

Esposito και συν., 2009 δείχθηκε ότι η μελατονίνη αποτρέπει την ενεργοποίηση των κινασών JNKs και μέσω αυτής της αναστολής μειώνεται και ο βαθμός των ιστολογικών βλαβών στον τραυματισμένο νωτιαίο μυελό των ποντικών. Επίσης, οι Bas και συν., 2012 απέδειξαν ότι τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* η μελατονίνη μπορεί και αποτρέπει την επαγόμενη από την προοξειδωτική δράση της γενταμυκίνης (GM) ενεργοποίηση των JNKs που κανονικά οδηγούσαν σε κυτταρικό θάνατο και κώφωση. Ωστόσο, πρέπει να επισημάνουμε ότι δεν υπάρχουν προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αναφέρονται στην ικανότητα της μελατονίνης να αναστέλει την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των κινασών JNKs.

Παρόλο που η αντιοξειδωτική δράση του ενζύμου καταλάση έναντι της κουρκουμίνης είναι ήδη γνωστή (Lu και συν., 2012, Atsumi και συν., 2005α), εν τούτοις μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που να αποδεικνύουν την ικανότητα αυτού του ενζύμου να αναστέλει την επαγόμενη μέσω της κουρκουμίνης ενεργοποίηση των κινασών JNKs. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η καταλάση μπορεί και αποτρέπει την ενεργοποίηση των κινασών JNKs όταν αυτή επάγεται από δραστικά προοξειδωτικά μόρια όπως η δοξορουβικίνη (Chosh και συν., 2011). Επιπλέον, η εξωκυτταρικά εντοπιζόμενη καταλάση μπορεί και αναστέλει την επαγόμενη από προοξειδωτικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης-κ3 (VK3) ενεργοποίηση των JNKs, ενώ δεν μπορεί να κάνει το ίδιο και με τις κινάσες ERKs (Osada και συν., 2008). Η εργασία αυτή προσομοιάζει πολύ με τα δικά μας αποτελέσματα καθώς διαπιστώσαμε ότι η καταλάση μπορεί και αναστέλει την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των κινασών JNKs ενώ δεν έχει ανασταλτική δράση έναντι των κινασών ERKs. Συνεπώς, φαίνεται ότι η παρουσία της κουρκουμίνης 50μM στις 2 ώρες έχει οδηγήσει και στην παραγωγή εξωκυτταρικά εντοπιζόμενου H₂O₂ το οποίο ευθύνεται εν μέρει για την ενεργοποίηση των κινασών JNKs. Αντίθετα, οι κινάσες ERKs φαίνεται ότι ενεργοποιούνται μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού στα 15 λεπτά χρόνου επίδρασης με κουρκουμίνη 50μM.

Όσον αφορά την συνεργιστική προοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος μαζί με την κουρκουμίνη πρέπει να τονίσουμε ότι επίσης δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να συσχετίζει αυτή τη δράση με την ενεργοποίηση των κινασών JNKs. Ωστόσο, υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες που έχουν γίνει με κάποια μόρια-παράγωγα του ασκορβικού οξέος. Για παράδειγμα, οι Kaar και συν., 2004 έδειξαν ότι το 6-ο-παλμιτοϋλοασκορβικό οξύ (PAA) προάγει μέσω συνθηκών οξειδωτικού στρες έντονη ενεργοποίηση των κινασών JNKs η οποία

με τη σειρά της οδηγεί σε απόπτωση. Επίσης, οι Meves και συν., 2002 έδειξαν η παρουσία ενός λιποδιαλυτού παραγώγου του ασκορβικού οξέος ενισχύει την επαγόμενη από τη UVB ακτινοβολία λιπιδική υπεροξειδωση και κυτταροτοξικότητα. Η λιπιδική αυτή υπεροξειδωση φαίνεται ότι προάγει την ενεργοποίηση των κινασών JNKs, η οποία παρουσία ασκορβικού οξέος αυξάνει σε πολύ μεγάλο βαθμό και εντείνει τα γεγονότα κυτταρικού θανάτου.

Συμπερασματικά, το γεγονός ότι οι JNKs παρουσιάζουν ένα παρατεταμένο χρονικό πρότυπο ενεργοποίησης καθώς και το ότι η ενεργοποίηση αυτή ενισχύεται σε πολύ μεγάλο βαθμό παρουσία του ασκορβικού οξέος και της νεοσυντιθέμενης βενζοξαζίνης AK-AM1, που έχουν συνεργιστική και προοξειδωτική δράση μαζί με την κουρκουμίνη, ενισχύει την άποψη ότι οι κινάσες JNKs ευνοούν περισσότερο την επαγωγή κυτταρικού θανάτου. Συνεπώς, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τόσο το ασκορβικό οξύ όσο και η νεοσυντιθέμενη βενζοξαζίνη AK-AM1 πιθανόν να ενισχύουν τον επαγόμενο από την κουρκουμίνη κυτταρικό θάνατο λόγω αυτής της εντονότερης ενεργοποίησης των κινασών JNKs. Αντίθετα, η κυτταροπροστατευτική δράση της καταλάσης, της μελατονίνης και της νεοσυντιθέμενης βενζοθειαζίνης AK-AM2 ενδέχεται να οφείλεται στο ότι αυτοί οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες αναστέλουν αποτελεσματικά την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των κινασών JNKs.

4.6.4. Επίδραση των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση του c-Jun.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν οι παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2 (30μM) επηρεάζουν το πρότυπο ενεργοποίησης/φωσφορυλίωσης του c-Jun. Το πείραμα αυτό ήταν παρεμφερές με αυτό που αφορούσε το ρόλο των αντιοξειδωτικών παραγόντων στην επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των κινασών JNKs, με τη μόνη διαφορά ότι η επίδραση με την κουρκουμίνη 50μM έγινε για 3 ώρες, και στη συνέχεια ανιχνεύσαμε τα επίπεδα ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun. Παρατηρήσαμε ότι το πρότυπο ενεργοποίησης του c-Jun ήταν ακριβώς αντίστοιχο με των κινασών JNKs. Δηλαδή, ο % βαθμός ενεργοποίησής του αυξανόταν πολύ παρουσία των προοξειδωτικών μορίων ασκορβικό οξύ (50μM) και AK-AM1 (15μM), ενώ αναστελόταν παρουσία των προοξειδωτικών παραγόντων καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15μM) και AK-AM2 (30μM).

Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς είναι γνωστό ότι ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας αποτελεί το χαρακτηριστικότερο υπόστρωμά των κινασών JNKs (Hibi και συν., 1993). Βάσει αυτού του αποτελέσματος ενισχύεται ακόμη περισσότερο η άποψη ότι το επαγόμενο από την κουρκουμίνη σηματοδοτικό μονοπάτι pJNKs→p-cJun πιθανότατα σχετίζεται με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου και όχι κυτταρικής προστασίας. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι σε αρκετές μελέτες που έχουν γίνει σε καρκινικά κύτταρα έχει δειχθεί ότι η κουρκουμίνη αναστέλει το μονοπάτι pJNKs→p-cJun όταν αυτό προάγει την εξέλιξη της καρκινογένεσης (Han και συν., 2002., Huang και συν., 1991). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες όπως αυτής των Yang και συν., 2012 φαίνεται ότι η κουρκουμίνη αυξάνει το βαθμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου ανθρώπινων λευχαιμικών μονοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κινασών JNKs και ακολούθως του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun.

4.7 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΚΑΘΩΣ & ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΡΟΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

4.7.1 Επίδραση της κουρκουμίνης στο βαθμό πρωτεόλυσης του PARP-1.

Προκειμένου να έχουμε μία πιο ολοκληρωμένη άποψη για τον τρόπο με τον οποίο η κουρκουμίνη επηρεάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια, ήταν αναγκαίο να διαλευκάνουμε το είδος του κυτταρικού θανάτου που αυτή προάγει. Για το σκοπό αυτό έγινε επίδραση με κουρκουμίνη 50μM για αυξανόμενους χρόνους και ανίχνευση του βαθμού πρωτεόλυσης του PARP-1 που είναι το πλέον χαρακτηριστικό υπόστρωμα της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (Chaitanya και συν., 2010).

Με ανάλυση κατά Western διαπιστώσαμε ότι ήδη από τα 120 λεπτά χρόνου επίδρασης τα επίπεδα του θραύσματος (89KDa) του PARP-1 εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά αυξημένα και μεγιστοποιούνται στα 240 λεπτά (4 ώρες) Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αφορούν κυρίως καρκινικά κύτταρα και δείχνει ότι η κουρκουμίνη προάγει στους C2 σκελετικούς μυοβλάστες αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Για παράδειγμα, οι Lee και συν., 2010 έδειξαν ότι η κουρκουμίνη προάγει καθήλωση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση στα ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος που χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και πρωτεόλυση του υποστρώματός της του PARP-1. Επιπλέον, οι Anto και συν., 2002 έδειξαν ότι η κουρκουμίνη προάγει το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης και έντονη χρονοεξαρτώμενη πρωτεόλυση του

PARP-1 σε ανθρώπινα κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Τέλος, έχουν γίνει και λιγότερες μελέτες σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές όπως αυτή των Cucuzza και συν., 2008, στην οποία δείχθηκε ότι η κουρκουμίνη προάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο φυσιολογικών επιθηλιακών μαστικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3.

4.7.2. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων ασκορβικό οξύ, AK-AM1, καταλάση, μελατονίνη & AK-AM2 στον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι η κουρκουμίνη προάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στους C2 σκελετικούς μυοβλάστες πραγματοποιήσαμε επίδραση με κουρκουμίνη 50μM για 24 ώρες και ανίχνευση της μορφολογίας των πυρήνων ύστερα από χρώση Hoechst και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Επιπλέον, έγινε προεπώαση για 30 λεπτά με τους παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM), καταλάση (50 U/ml), μελατονίνη (15μM) & AK-AM2 (30μM). Τέλος έγινε και συνδυαστική επίδραση με H₂O₂ 1 mM & κουρκουμίνη σε μία προοξειδωτική (50μM) και μία αντιοξειδωτική (15μM) συγκέντρωση.

Παρουσία κουρκουμίνης 50μM διαπιστώσαμε χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου όπως αύξηση του βαθμού φθορισμού των πυρήνων, συμπύκνωση της χρωματίνης και αλλαγή της μορφολογίας των πυρηνικών μεμβρανών. Όταν έγινε προεπώαση με τους προοξειδωτικούς παράγοντες ασκορβικό οξύ (50μM), AK-AM1 (15μM) & H₂O₂ 1mM και εν συνεχεία επίδραση με κουρκουμίνη 50μM διαπιστώσαμε αφενός πολύ πιο έντονα μορφολογικά γνωρίσματα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και αφετέρου πολύ μικρότερο αριθμό κυττάρων στο οπτικό πεδίο, σε σχέση με την κουρκουμίνη 50 μM. Αντίθετα, είναι αξιοσημείωτο ότι όταν γίνει προεπώαση με την αντιοξειδωτική συγκέντρωση της κουρκουμίνης 15μM και στη συνέχεια επίδραση με H₂O₂ 1mM, τα μορφολογικά γνωρίσματα των πυρήνων προσομοιάζουν με αυτά του μάρτυρα. Ακόμη, όταν γίνει προεπώαση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες καταλάση (50 U/ml), μελατονίνη (15μM) και AK-AM2 (30μM) και στη συνέχεια επίδραση με κουρκουμίνη (50μM), παρατηρούμε μεγάλο περιορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των αποπτωτικών πυρήνων, σε σχέση με την κουρκουμίνη (50μM). Δηλαδή, διαπιστώσαμε μικρότερο βαθμό φθορισμού των πυρήνων αλλά και μικρότερο βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης.

Το γεγονός ότι το ασκορβικό οξύ ενισχύει τον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αφορούν κυρίως καρκινικά κύτταρα. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν την ύπαρξη μίας συνεργιστικής προοξειδωτικής δράση μεταξύ του ασκορβικού οξέος και άλλων προοξειδωτικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, αυξάνοντας έτσι το βαθμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Σύμφωνα με τους His και συν., 2011, το ασκορβικό οξύ ενισχύει την προοξειδωτική δράση της αργινίνης στα καρκινικά κύτταρα HA22T/VGH προάγοντας το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Επιπλέον, οι Li και συν., 2006 έδειξαν ότι το ασκορβικό οξύ αυξάνει την επαγόμενη από το As_2O_3 απόπτωση λόγω αύξησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS. Τέλος, μία μελέτη των Fujisawa και συν., 2006 έδειξε ότι η κουρκουμίνη οξειδώνει το ασκορβικό οξύ πολύ πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες και αυξάνει το βαθμό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της χρώσης Hoechst όσον αφορά τη νεοσυντιθέμενη βενζοξαζίνη AK-AM1 (15 μ M) έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT. Συγκεκριμένα, επιβεβαιώνεται από δύο διαφορετικές τεχνικές ότι όντως αυτό το νέο μόριο παρουσία της κουρκουμίνης (50 μ M) αυξάνει το βαθμό του κυτταρικού θανάτου ο οποίος μάλιστα είναι και αποπτωτικός.

Από την άλλη πλευρά η ικανότητα της καταλάσης να αποτρέπει τον επαγόμενο από την κουρκουμίνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο έχει προηγουμένως δειχθεί σε καρκινικά κύτταρα (Lu και συν., 2012, Atsumi και συν., 2005α). Επίσης, έχει δειχθεί στις κυτταρικές σειρές των C2C12 και L6 σκελετικών μυοβλαστών ότι η εξωγενής προσθήκη καταλάσης αποτρέπει τον επαγόμενο από τη δεξαμεθαζόνη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Orzechowski και συν., 2002).

Ακόμη, η ικανότητα της μελατονίνης να αποτρέπει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο έχει δειχθεί τόσο σε *in vivo* μελέτες όσο και σε *in vitro* που αφορούν φυσιολογικά αλλά και καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η μελατονίνη αποτρέπει τον επαγόμενο από συνθήκες οξειδωτικού στρες αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο κινητικών νευρώνων μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τους δύο μεμβρανικούς υποδοχείς της (Das και συν., 2010). Επιπλέον, η μελατονίνη αποτρέπει τον αποπτωτικό και αυτοφαγικό θάνατο των C2C12

σκελετικών μυοβλαστών παρουσία ενεργών ριζών αζώτου (Kim και συν., 2010). Ακόμη, η μελατονίνη σε καρκινικά κύτταρα ηπατώματος αναστέλει την επαγόμενη από τη στέρηση ορού απόπτωση που οφείλεται στην παραγωγή ROS και στην ενεργοποίηση του πρωτεασώματος (Pandey και συν., 2003).

Κλείνοντας, πρέπει να επισημάνουμε ότι το σημαντικότερο ίσως συμπέρασμα αυτής της εργασίας ήταν η πολύ καλή αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση που παρουσίασε η νεοσυντιθέμενη βενζοθειαζίνη AK-AM2. Το νέο αυτό μόριο φάνηκε, τόσο από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT όσο και από τη χρώση των πυρήνων με Hoechst, ότι αποτρέπει τον επαγόμενο από την κουρκουμίνη κυτταρικό θάνατο ο οποίος είναι μάλιστα αποπτωτικός. Η κυτταροπροστατευτική δράση αυτού του μορίου είναι τελικά αντίστοιχη με δύο πολύ σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων όπως αυτού της μελατονίνης και της καταλάσης. Τα αποτελέσματά μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με την ήδη αποδεδειγμένη πολύ καλή αντιοξειδωτική, αντιυπεριλιπιδαιμική και αντιφλεγμονώδη δράση (Matralis και συν., 2011) αυτής της νέας ένωσης και ανοίγουν νέες προοπτικές στη χρήση των βενζοθειαζινών, οι οποίες δεν είχαν εξετασθεί ποτέ στο παρελθόν για την αντιοξειδωτική τους δράση.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΥΣ C2
ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ**

Πελέλη Μ. & Γαϊτανάκη Κ*.,

** Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας,*

Η παρατεταμένη έκθεση του σκελετικού μυός σε συνθήκες οξειδωτικού στρες συνεισφέρει στην εκδήλωση μυοπάθειων όπως δυστροφίες και ατροφίες. Το H₂O₂ αποτελεί μία από τις βασικότερες ενδογενώς παραγόμενες ROS και ένα πολύ σημαντικό δεύτερο μήνυμα. Η κουρκουμίνη είναι μία χημική ένωση παραγόμενη στο ρίζωμα του φυτού *Curcuma longa* που παρουσιάζει πλειοτροπική δράση. Η νεοσυντιθέμενη βενζοξαζίνη AK-AM1 καθώς και η βενζοθειαζίνη AK-AM2 σχεδιάσθηκαν προκειμένου να παρουσιάζουν ταυτόχρονα χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικών, αντιυπερλιπιδαιμικών και αντιφλεγμονωδών μορίων. Καταρχάς, θελήσαμε να συγκρίνουμε την δράση της κουρκουμίνης με αυτήν του H₂O₂. Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT διαπιστώσαμε ότι η κουρκουμίνη (50μM) και το H₂O₂ (1mM) προκαλούν παρόμοια πτώση της κυτταρικής επιβίωσης. Επιπλέον, η παρουσία της κουρκουμίνης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (100μM) ή η ταυτόχρονη παρουσία κουρκουμίνης (50μM) & H₂O₂ (1mM) προκαλούν ακόμη μεγαλύτερη πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Συνεπώς, η κουρκουμίνη αφενός αποτελεί ένα πολύ πιο δραστικό προοξειδωτικό μόριο σε σχέση με το H₂O₂ και αφετέρου παρουσιάζει συνεργιστική προοξειδωτική δράση μαζί με αυτό. Αντίθετα, η χορήγηση κουρκουμίνης σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (30-15μM) φαίνεται να δρα αντιοξειδωτικά αποτρέποντας τον επαγόμενο από το H₂O₂ (1mM) κυτταρικό θάνατο. Στη συνέχεια, εξετάσαμε την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των AK-AM1 (15-5μM) & AK-AM2 (100-10μM) έναντι του H₂O₂ (1mM) και διαπιστώσαμε ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική αντίστοιχη της μελατονίνης (15μM) και της καταλάσης (50U/ml). Αντίθετα, γνωστοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες όπως το ουρικό οξύ (10μM), η ρεσβερατρόλη (50-1μM) και το ασκορβικό οξύ (50μM) αδυνατούσαν να βελτίωσουν την κυτταρική επιβίωση. Επιπρόσθετα, με ανάλυση κατά Western δείχθηκε ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες κουρκουμίνη (15μM), ρεσβερατρόλη (30μM), ουρικό οξύ (10μM), μελατονίνη (15μM) AK-AM1(15 & 5μM) & AK-AM2 (30 & 15μM) μπορούν και αναστέλλουν την επαγόμενη από το H₂O₂ (1mM) ενεργοποίηση/φωσφορυλίωση των κινασών ERKs και JNKs. Βασισμένοι στα παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια ως

προοξειδωτικό μόριο την κουρκουμίνη (50 μ M) που είναι πιο δραστική και παράγει περισσότερες μορφές ROS σε σχέση με το H₂O₂ (1mM). Με δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT δείχθηκε ότι αντιοξειδωτική δράση εξακολουθούν να παρουσιάζουν η καταλάση (50U/ml), η μελατονίνη (15 μ M) και το AK-AM2 (30 μ M), ενώ αντίθετα το AK-AM1 (15 μ M) και το ασκορβικό οξύ (50 μ M) μετατρέπονται σε προοξειδωτικά μόρια. Τέλος, κανένας παράγοντας δεν φαίνεται να παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση παρουσία πολύ ισχυρού οξειδωτικού στρες επαγόμενου από την ταυτόχρονη παρουσία κουρκουμίνης (50 μ M) & H₂O₂ (1mM). Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε τα επαγόμενα από την κουρκουμίνη (50 μ M) σηματοδοτικά μονοπάτια. Με ανάλυση κατά Western διαπιστώσαμε ότι οι κινάσες ERKs παρουσιάζουν ένα διαφορετικό χρονοεξαρτώμενο πρότυπο ενεργοποίησης σε σχέση με τις κινάσες JNKs, με τις πρώτες να ενεργοποιούνται μέγιστα στα 15 λεπτά και τις δεύτερες στις 2-4 ώρες. Ακόμη, από τις 2 ώρες επίδρασης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της πρωτεόλυσης του αποπτωτικού δείκτη PARP-1, η οποία μεγιστοποιείται στις 4 ώρες. Επίσης, δείχθηκε ότι η προεπώαση με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα AK-AM2 (30 μ M) αλλά και πολύ περισσότερο με τα προοξειδωτικά μόρια ασκορβικό οξύ (50 μ M) και AK-AM1 (15 μ M) οδηγεί σε μία στατιστικά σημαντική αναστολή της επαγόμενης από την κουρκουμίνη ενεργοποίησης των ERKs. Ακόμη, η προεπώαση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες καταλάση (50U/ml), μελατονίνη (15 μ M) και AK-AM2 (30 μ M) αναστέλει την επαγόμενη από την κουρκουμίνη ενεργοποίηση των JNKs. Αντίθετα, η παρουσία του ασκορβικού οξέος (50 μ M) και του AK-AM1 (15 μ M) ενισχύουν πολύ αυτή την ενεργοποίηση. Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας c-Jun παρουσιάζει παρουσία των διάφορων αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών μορίων ακριβώς ίδιο πρότυπο ενεργοποίησης με τις κινάσες JNKs. Συμπερασματικά, επειδή το AK-AM2 δρα αποτελεσματικά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (30 μ M) φαίνεται ότι είναι ένα λιγότερο δραστικό μόριο σε σχέση με το AK-AM1 (15 & 5 μ M). Ωστόσο, το ότι δρα σε πολύ μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων (100-10 μ M) έναντι του H₂O₂ (1mM), καθώς και το ότι είναι αποτελεσματικό έναντι και της κουρκουμίνης, το καθιστούν περισσότερο ασφαλές και αποτελεσματικό ως αντιοξειδωτικό παράγοντα.

STUDY OF THE ROLE OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN MOUSE SKELETAL MYOBLASTS C2.

Peleli M.* & Gaitanaki C*

Dept. of Animal and Human Physiology, School of Biology,.

Excessive exposure of skeletal muscle to oxidative stress conditions contributes to muscle degeneration disorders such as dystrophies and atrophies. H_2O_2 is a major endogenously produced type of ROS and a very significant second messenger. Curcumin is a chemical compound produced in the plant *Curcuma longa* and can exhibit either prooxidant or antioxidant action. The novel molecules benzoxazine AK-AM1 & benzothiazine AK-AM2 were designed in order to combine antioxidant, antihyperlipidemic and anti-inflammatory actions. Firstly, we wanted to compare the prooxidant action of H_2O_2 1mM with that of curcumin. MTT cytotoxicity assay unveiled that specific concentrations of curcumin (50 & 100 μ M) and H_2O_2 1mM decreased significantly the cellular viability. As for curcumin, that decline presented a dose-dependent pattern and was also enhanced by the concomitant presence of H_2O_2 1mM. We next focused on the possible antioxidant action of AK-AM1, AK-AM2 and other compounds against H_2O_2 . Lower concentrations of curcumin (30-15 μ M) presented a very effective antioxidant action. Moreover, AK-AM1 (15-5 μ M) and AK-AM2 (100-10 μ M) showed an excellent antioxidant action, comparable with that of melatonin (15 μ M) and catalase (50U/ml). However, well-known antioxidant molecules such as resveratrol (50-1 μ M), ascorbic acid (50 μ M) and uric acid (10 μ M) failed to improve the cell viability levels. Furthermore, Western Blot analysis revealed that the antioxidants melatonin, curcumin, resveratrol, uric acid, AK-AM1 & AK-AM2 were able to inhibit the H_2O_2 induced activation of ERKs and JNKs kinases. Wanting to clarify the way of action of the above mentioned compounds, we next decided to use prooxidant concentrations of curcumin (50 μ M), as it produces more types of ROS than H_2O_2 . MTT assay revealed that only catalase (50U/ml), melatonin (15 μ M) and AK-AM2 (30 μ M) had antioxidant action. On the contrary, ascorbic acid (50 μ M) and AK-AM1 (15 μ M) caused a significant fall at the cellular viability by becoming prooxidant molecules. Finally, none of these compounds was able to reverse the extremely severe conditions of oxidative stress, induced by the simultaneous presence of H_2O_2

1mM and curcumin (50 μ M). We next focused on the signaling pathways that are induced by curcumin (50 μ M). Western blot analysis revealed that curcumin (50 μ M) promotes maximum activation of kinases ERKs at 15 minutes, while the kinases JNKs started to be activated 1 hour after the treatment, reaching maximum levels between 2-4 hours. Moreover, curcumin (50 μ M) induces apoptotic cell death as a significant proteolysis of PARP-1 was observed even at 2 hours and was highly elevated 4 hours after treatment. In addition to that, we noticed that pretreatment with the antioxidant molecule AK-AM2 (30 μ M) and the prooxidant factors ascorbic acid (50 μ M) and AK-AM1 (15 μ M) partially inhibited the curcumin induced activation of ERKs. However, pretreatment with those prooxidant factors enhanced remarkably the activation level of kinases JNKs and their substrate c-Jun. On the contrary, the presence of the antioxidant factors catalase (50U/ml), melatonin (15 μ M) and AK-AM2 (30 μ M) inhibited significantly the activation of both JNKs and c-Jun. In conclusion, we believe that the novel benzothiazine derivative AK-AM2 it is safer and more effective, as it presents antioxidant/cytoprotective action against H₂O₂ in a wide concentration range (100-10 μ M) and it also exhibits an excellent antioxidant action against curcumin (50 μ M).

ΚΕΦ 5 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aebi H, Suter H. *Adv Hum Genet.* 1971;2:143-99. Acatlasemia.

Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. *Mol Pharmacol.* 2006 Jan;69(1):195-206. Epub 2005 Oct 11. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation.

Aggeli IK, Gaitanaki C, Lazou A, Beis I. *Mol Cell Biochem.* 2001 May;221(1-2):63-9. Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart.

Aggeli IK, Kefaloyianni E, Beis I, Gaitanaki C. *Free Radic Res.* 2010 Jun;44(6):679-93. HOX-1 and COX-2: Two differentially regulated key mediators of skeletal myoblast tolerance under oxidative stress..

Aggeli IK, Theofilatos D, Beis I, Gaitanaki C. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1274-83. Epub 2011 Feb 16. Insulin-induced oxidative stress up-regulates heme oxygenase-1 via diverse signaling cascades in the C2 skeletal myoblast cell line.

Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. *Toxicol Lett.* 2005 Oct 15;159(1):1-12. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA.

Allen RG, Tresini M. *Free Radic Biol Med.* 2000 Feb 1;28(3):463-99. Oxidative stress and gene regulation.

Alonso M, Collado PS, González-Gallego J.J. *Pineal Res.* 2006 Aug;41(1):8-14. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle.

Alvarez-Gonzalez R, Spring H, Müller M, Bürkle A. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32122-6. Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells.

Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. *Bioessays.* 2004 Aug;26(8):882-93. The PARP superfamily.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Nov;78(11):6858-62. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):875-85. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1.

Angel P, Karin M. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.

Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. *Carcinogenesis*. 2002 Jan;23(1):143-50. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl.

Antunes LM, Araújo MC, Darin JD, Bianchi ML. *Mutat Res*. 2000 Feb 16;465(1-2):131-7. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells.

Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. *Mol Pharmacol*. 2007 Jul;72(1):29-39. Epub 2007 Mar 29. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways.

Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. *Oral Dis*. 2005 Jul;11(4):236-42. Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-treated human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells.

Atsumi T, Murakami Y, Shibuya K, Tonosaki K, Fujisawa S. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6B):4029-36. Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression, by curcumin and its analog, alpha-diisoeugenol.

Avci G, Kadioglu H, Sehirli AO, Bozkurt S, Guclu O, Arslan E, Muratli SK. *J Surg Res*. 2012 Jan;172(1):e39-46. Epub 2011 Sep 13. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle.

Bae UJ, Lee da Y, Song MY, Lee SM, Park JW, Ryu JH, Park BH. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(7):1026-31. A prenylated flavan from *Broussonetia kazinoki* prevents cytokine-induced β -cell death through suppression of nuclear factor- κ B activity.

Baum L, Ng A.J *Alzheimers Dis.* 2004 Aug;6(4):367-77; discussion 443-9. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models.

Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G. *Biochem J.* 1999 May 15;340 (Pt 1):143-52. When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid.

Bánhegyi G, Csala M, Braun L, Garzó T, Mandl J. *FEBS Lett.* 1996 Feb 26;381(1-2):39-41. Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver.

Barbieri E, Sestili P. *J Signal Transduct.* 2012;2012:982794. Epub 2011 Dec 5. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling.

Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R. *Amino Acids.* 2007;32(4):501-15. Epub 2006 Nov 2. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments.

Bas E, Van De Water TR, Gupta C, Dinh J, Vu L, Martínez-Soriano F, Láinez JM, Marco J. *Br J Pharmacol.* 2012 Jul;166(6):1888-904. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01890.x. Efficacy of three drugs for protecting against gentamicin-induced hair cell and hearing losses.

Basnet P, Skalko-Basnet N. *Molecules.* 2011 Jun 3;16(6):4567-98. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment.

J Beavers KM, Beavers DP, Serra MC, Bowden RG, Wilson RL. *Nutr Health Aging.* 2009 Mar;13(3):177-82. Low relative skeletal muscle mass indicative of sarcopenia is associated with elevations in serum uric acid levels: findings from NHANES III.

Becker BF. *Free Radic Biol Med.* 1993 Jun;14(6):615-31. Towards the physiological function of uric acid.

Began G, Sudharshan E, Udaya Sankar K, Appu Rao AG. *J Agric Food Chem.* 1999 Dec;47(12):4992-7. Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: A spectrofluorometric study.

Berger F, Lau C, Ziegler M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 6;104(10):3765-70. Epub 2007 Feb 22. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1..

Berry CE, Hare JM. *J Physiol.* 2004 Mar 16;555(Pt 3):589-606. Epub 2003 Dec 23. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications.

Bettters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, Deering M, Yimlamai T, Powers SK. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Dec 1;170(11):1179-84. Epub 2004 Sep 16. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis.

J Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. *Biol Chem.* 2007 Jan 12;282(2):1183-92. Epub 2006 Nov 14. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes.

Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. 2008 Nov;57(11):1509-17. Epub 2008 Jul 2. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition.

Blattes E, Lockhart B, Lestage P, Schwendimann L, Gressens P, Fleury MB, Largeron M.J Med Chem. 2005 Feb 24;48(4):1282-6. Novel 2-alkylamino-1,4-benzoxazine derivatives as potent neuroprotective agents: structure-activity relationship studies.

Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Science. 1987 Dec 4;238(4832):1386-92. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1.

Bohmann D. Cancer Cells. 1990 Nov;2(11):337-44. Transcription factor phosphorylation: a link between signal transduction and the regulation of gene expression.

Bondi CD, McKeon RM, Bennett JM, Ignatius PF, Brydon L, Jockers R, Melan MA, Witt-Enderby PA. J Pineal Res. 2008 Apr;44(3):288-98. MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation.

Booth FW, Seider MJ. J Appl Physiol. 1979 Aug;47(2):435-9. Recovery of skeletal muscle after 3 mo of hindlimb immobilization in rats.

Bos TJ, Bohmann D, Tsuchie H, Tjian R, Vogt PK. Cell. 1988 Mar 11;52(5):705-12. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1.

Bouayed J, Bohn T. Oxid Med Cell Longev. 2010 Jul 1;3(4):228-237. [Epub ahead of print]. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses:

Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. Cell. 1991 Feb 8;64(3):573-84. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity.

Brown DI, Griendling KK. Free Radic Biol Med. 2009 Nov 1;47(9):1239-53. Epub 2009 Jul 21. Nox proteins in signal transduction.

Cai Q, Shu XO, Wen W, Cheng JR, Dai Q, Gao YT, Zheng W. Breast Cancer Res. 2004;6(6):R647-55. Epub 2004 Sep 22. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study.

Carter Y, Liu G, Yang J, Fier A, Mendez C. Surg Infect (Larchmt). 2003 Spring;4(1):17-27. Sublethal hemorrhage induces tolerance in animals exposed to cecal ligation and puncture by altering p38, p44/42, and SAPK/JNK MAP kinase activation.

Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto S, Livrea MA, Turco Liveri V. J Pineal Res. 1999 Mar;26(2):108-12. Interactions of melatonin with membrane models: portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles.

Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. Cell Commun Signal. 2010 Dec 22;8:31. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Cell Signal. 2002 Mar;14(3):249-57. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins.

Chang L, Karin M. Nature. 2001 Mar 1;410(6824):37-40. Mammalian MAP kinase signalling cascades.

Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):9142-7. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy.

Charlton-Menys V, Durrington PN. *Drugs*. 2007;67(1):11-6. Squalene synthase inhibitors : clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential.

Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K, Maity P, Banerjee RK. *Free Radic Biol Med*. 2006 Apr 15;40(8):1397-408. Epub 2006 Jan 17. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen.

Chauhan SM, Kandadai AS, Jain N, Kumar A. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003 Nov;51(11):1345-7. Biomimetic oxidation of curcumin with hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetraarylporphyrinatoiron(III) chlorides in dichloromethane.

Chen X, Nishida H, Konishi T. *Biol Pharm Bull*. 2003 Feb;26(2):282-4. Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H₂O₂ in cultured NIH3T3 fibroblasts.

Chen WH, Chen Y, Cui GH. *Chin Med J (Engl)*. 2005 Dec 20;118(24):2052-7. Effects of TNF-alpha and curcumin on the expression of VEGF in Raji and U937 cells and on angiogenesis in ECV304 cells.

Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. *Pharmacol Rep*. 2011;63(3):724-32. No protective effect of curcumin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells.

Chen YC, Chow JM, Lin CW, Wu CY, Shen SC. *Appl Pharmacol*. 2006 Oct 15;216(2):263-73. Epub 2006 May 19. Baicalein inhibition of oxidative-stress-induced apoptosis via modulation of ERKs activation and induction of HO-1 gene expression in rat glioma cells C6.

Choi S, Yeum CH, Kim YD, Park CG, Kim MY, Park JS, Jeong HS, Kim BJ, So I, Kim KW. *J Cell Mol Med*. 2010 Jan;14(1-2):257-66. Receptor tyrosine and MAP kinase are involved in effects of H₂O₂ on interstitial cells of Cajal in murine intestine.

Choi SI, Joo SS, Yoo YM. *J Pineal Res*. 2008 Jan;44(1):95-100. Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3beta and p-Bad in SK-N-MC cells.

Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. *Int J Oncol*. 2003 Mar;22(3):469-80. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review).

Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1511-20. Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins.

Coffer PJ, Burgering BM, Peppelenbosch MP, Bos JL, Kruijer W. *Oncogene*. 1995 Aug 3;11(3):561-9. UV activation of receptor tyrosine kinase activity.

Conte A, Pellegrini S, Tagliazucchi D. *Brain Res Bull*. 2003 Nov 15;62(1):29-38. Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin.

Cowan and Storey, 2003 (mapks) : *J Exp Biol*. 2003 Apr;206(Pt 7):1107-15. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. Cowan KJ, Storey KB.

Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Aug;1171:472-8. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation.

Csiszar A. Ann N Y Acad Sci. 2011 Jan;1215:117-22. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05848.x. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease.

Cuadrado A, Nebreda AR. Biochem J. 2010 Aug 1;429(3):403-17. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling.

Cucuzza LS, Motta M, Miretti S, Accornero P, Baratta M. Exp Mol Med. 2008 Dec 31;40(6):647-57. Curcuminoid-phospholipid complex induces apoptosis in mammary epithelial cells by STAT-3 signaling.

Cui L, Miao J, Cui L. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):488-94. Epub 2006 Dec 4. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Biochem J. 1999 Sep 1;342 (Pt 2):249-68. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions.

Daosukho C, Chen Y, Noel T, Sompol P, Nithipongvanitch R, Velez JM, Oberley TD, St Clair DK. Free Radic Biol Med. 2007 Jun 15;42(12):1818-25. Epub 2007 Mar 12. Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against Adriamycin-induced cardiac injury.

Das S, Khan N, Mukherjee S, Bagchi D, Gurusamy N, Swartz H, Das DK. Free Radic Biol Med. 2008 Jan 1;44(1):82-90. Epub 2007 Sep 21. Redox regulation of resveratrol-mediated switching of death signal into survival signal.

Das A, McDowell M, Pava MJ, Smith JA, Reiter RJ, Woodward JJ, Varma AK, Ray SK, Banik NL. [J Pineal Res.](#) 2010 Mar;48(2):157-69. Epub 2010 Jan 17. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Biochem Biophys Res Commun. 1982 Aug 31;107(4):1198-205. Free radicals and tissue damage produced by exercise.

Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Biochem J. 1986 May 1;235(3):747-54. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid.

Davis RJ. Trends Biochem Sci. 1994 Nov;19(11):470-3. MAPKs: new JNK expands the group.

de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Battu C, Nardin P, Tortorelli LS, Zanotto C, Posser T, Wofchuk ST, Leal RB, Gonçaves CA, Gottfried C. Arch Biochem Biophys. 2008 Dec 1;480(1):27-32. Epub 2008 Sep 22. Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats.

de Almeida LM, Pipeiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Gonçaves CA. Neurochem Res. 2008 Jan;33(1):8-15. Epub 2007 Jun 27.

Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures.

de Groot H, Auferkamp O, Bramey T, de Groot K, Kirsch M, Korth HG, Petrat F, Sustmann R. *Free Radic Res.* 2006 Jan;40(1):67-74. Non-oxygen-forming pathways of hydrogen peroxide degradation by bovine liver catalase at low hydrogen peroxide fluxes.

Denu JM, Dixon JE. *Curr Opin Chem Biol.* 1998 Oct;2(5):633-41. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation.

Durijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):1025-37. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.

Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M. *Mol Cell Biol.* 1991 May;11(5):2804-11. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response.

Dhar-Mascarepo M, Corcamo JM, Golde DW. *Free Radic Biol Med.* 2005 May 15;38(10):1311-22. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C.

Dikshit P, Goswami A, Mishra A, Chatterjee M, Jana NR. *Neurotox Res.* 2006 Jan;9(1):29-37. Curcumin induces stress response, neurite outgrowth and prevent NF-kappaB activation by inhibiting the proteasome function.

Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3404-9. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups.

Dubocovich ML, Markowska M. *Endocrine.* 2005 Jul;27(2):101-10. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals.

Elahi MM, Kong YX, Matata BM. *oxid Med Cell Longev.* 2009 Nov-Dec;2(5):259-69. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease.

Elmali N, Esenkaya I, Karadağ N, TaI F, Elmali N. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2007 Oct;13(4):274-80. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury.

Emery AH. *Lancet* 2002; 359: 687–95 The muscular dystrophies.seminar.

Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. *J Pineal Res.* 2006 Jan;40(1):71-8. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice.

Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. *J Pineal Res.* 2009 Jan;46(1):79-86. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury.

Fan X, Hussien R, Brooks GA. *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1646-54. Epub 2010 Aug 27. H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes.

- Farhangkhoe H**, Khan ZA, Chen S, Chakrabarti S. *Nutr Metab (Lond)*. 2006 Jul 18;3:27. Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart.
- Forman HJ**, Torres M, Fukuto J. *Mol Cell Biochem*. 2002 May-Jun;234-235(1-2):49-62. Redox signaling.
- Frombaum M**, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. *Biochimie*. 2012 Feb;94(2):269-76. Epub 2011 Nov 22. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases.
- Fukunaga K**, Horikawa K, Shibata S, Takeuchi Y, Miyamoto EJ. *Neurosci Res*. 2002 Dec 15;70(6):799-807. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin.
- Fujisawa S**, Kadoma Y. *In Vivo*. 2006 Jan-Feb;20(1):39-44. Anti- and pro-oxidant effects of oxidized quercetin, curcumin or curcumin-related compounds with thiols or ascorbate as measured by the induction period method.
- Fujita T**, *Yakugaku Zasshi*. 2002 Mar;122(3):203-18. [Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects].
- Gaetani GF**, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1595-9. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes.
- Gao και συν., 2011 (antioxidant resveratrol)** *Mol Med Report*. 2011 Jan-Feb;4(1):151-5. doi: 10.3892/mmr.2010.390. Epub 2010 Oct 27. Resveratrol attenuates azidothymidine-induced cardiotoxicity by decreasing mitochondrial reactive oxygen species generation in human cardiomyocytes. Gao RY, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Wang H, Horvath B, Yin S, Pacher P.
- Galano A**, Tan DX, Reiter RJ. *J Pineal Res*. 2011 Aug;51(1):1-16. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination.
- Galati G**, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. *Toxicology*. 2002 Aug 1;177(1):91-104. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics.
- Galcheva-Gargova Z**, Durijard B, Wu IH, Davis RJ. *Science*. 1994 Aug 5;265(5173):806-8. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells.
- Ghosh J**, Das J, Manna P, Sil PC. *Biomaterials*. 2011 Jul;32(21):4857-66. Epub 2011 Apr 12. The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis.
- Giannoni E**, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, Taddei ML, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. *Cell Death Differ*. 2008 May;15(5):867-78. Epub 2008 Feb 8. Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival.
- Gorsky LD**, Koop DR, Coon MJ. *J Biol Chem*. 1984 Jun 10;259(11):6812-7. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction.
- Gough DR**, Cotter TG. *Cell Death Dis*. 2011 Oct 6;2:e213. doi: 10.1038/cddis.2011.96. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule.

Gozzo A, Lesieur D, Duriez P, Fruchart JC, Teissier E. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jun;26(11-12):1538-43. Structure-activity relationships in a series of melatonin analogues with the low-density lipoprotein oxidation model.

Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G, Carnevale R, Mezzasoma AM, Ghiselli A, Momi S, Violi F.J. *Nutr*. 2008 Sep;138(9):1602-8. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production.

Groeger G, Quiney C, Cotter TG. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2655-71. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule.

Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. *Cell*. 2003 May 2;113(3):343-55. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase.

Gutteridge JM, Hou YY. *Free Radic Res Commun*. 1986;2(3):143-51. Iron complexes and their reactivity in the bleomycin assay for radical-promoting loosely-bound iron.

Hai TW, Liu F, Allegretto EA, Karin M, Green MR. *Genes Dev*. 1988 Oct;2(10):1216-26. A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1.

Hall ED, Bosken JM. *Curr Protoc Neurosci*. 2009 Jul;Chapter 7:Unit 7.17.1-51. Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues.

Halliwell B. *Br J Exp Pathol*. 1989 Dec;70(6):737-57. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis.

Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R. *Br J Pharmacol*. 2004 Mar;141(6):997-1005. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C.

Han X, Xu B, Beevers CS, Odaka Y, Chen L, Liu L, Luo Y, Zhou H, Chen W, Shen T, Huang S. *Carcinogenesis*. 2012 Apr;33(4):868-75. Epub 2012 Jan 31. Curcumin inhibits protein phosphatases 2A and 5, leading to activation of mitogen-activated protein kinases and death in tumor cells.

Han SS, Keum YS, Seo HJ, Surh YJ. *J Biochem Mol Biol*. 2002 May 31;35(3):337-42. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. *Biofactors*. 2001;15(2-4):99-109. Hydrogen peroxide and nitric oxide in plant defence: revealing potential targets for oxidative stress tolerance?

Hanks SK, Hunter T. *FASEB J*. 1995 May;9(8):576-96. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.

Hanukoglu I. *Drug Metab Rev*. 2006;38(1-2):171-96. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells.

Hardaway CM, Badisa RB, Soliman KF. *Mol Med Report*. 2012 Jun;5(6):1449-52. doi: 10.3892/mmr.2012.857. Epub 2012 Apr 2. Effect of ascorbic acid and hydrogen peroxide on mouse neuroblastoma cells.

Harshman KD, Moye-Rowley WS, Parker CS. *Cell*. 1988 Apr 22;53(2):321-30. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4.

Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Sep;70(3):789-829. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?

Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):22432-6. Epub 2003 May 1. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase.

Heeres JT, Hergenrother PJ. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Dec;11(6):644-53. Epub 2007 Oct 23. Poly(ADP-ribose) makes a date with death.

Hernández-Pacheco A, Araiza-Saldaña CI, Granados-Soto V, Mixcoatl-Zecuatl T. *Eur J Pharmacol.* 2008 Oct 31;596(1-3):70-6. Epub 2008 Aug 13. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin.

Hewitson KS, McNeill LA, Elkins JM, Schofield CJ. *Biochem Soc Trans.* 2003 Jun;31(Pt 3):510-5. The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signalling.

Hibaoui Y, Roulet E, Ruegg UT. *J Pineal Res.* 2009 Oct;47(3):238-52. Epub 2009 Aug 3. Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. *Genes Dev.* 1993 Nov;7(11):2135-48. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain.

Hille R, Massey V. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4568-75. *J Biol Chem.* 1981 Sep 10;256(17):9090-5. Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase.

Hirsch DD, Stork PJ. Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathways in vivo.

Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32804-12. Epub 2004 Jun 3. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury.

Holt A, Palcic MM. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2498-505. A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes.

Huang TS, Lin JK. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Nov 15;1317(2):95-100. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Kuo ML, **Ikizler M**, Ovali C, Dernek S, Erkasap N, Sevin B, Kaygisiz Z, Kural T. *Chin J Physiol.* 2006 Aug 31;49(4):204-9. Protective effects of resveratrol in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle: A clinically relevant animal model for lower extremity ischemia.

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Jan;92(1):33-8. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity.

Isabelle M, Moreel X, Gagné JP, Rouleau M, Ethier C, Gagné P, Hendzel MJ, Poirier GG. *Proteome Sci.* 2010 Apr 13;8:22. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry.

Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH. *J Inherit Metab Dis.* 1985;8 Suppl 1:84-7. Vitamin E and muscle diseases.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. *Infect Disord Drug Targets.* 2009 Aug;9(4):428-44. Role of free radicals and antioxidant signaling in skeletal muscle health and pathology.

Ji LL, Dillon D, Wu E. *Am J Physiol.* 1990 Apr;258(4 Pt 2):R918-23. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver.

Ji LL. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):142-52. Epub 2007 Mar 12. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling.

Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB. *J Immunol*. 1999 Sep 15;163(6):3474-83. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity.

Johnson RJ, Segal MS, Srinivas T, Ejaz A, Mu W, Roncal C, Sánchez-Lozada LG, Gersch M, Rodriguez-Iturbe B, Kang DH, Acosta JH. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):1909-19. Epub 2005 Apr 20. Essential hypertension, progressive renal disease, and uric acid: a pathogenetic link?

Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M. *Hypertension*. 2003 Jun;41(6):1183-90. Epub 2003 Apr 21. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?

Joost HG, Thorens B. *Mol Membr Biol*. 2001 Oct-Dec;18(4):247-56. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review).

Jung EM, Lim JH, Lee TJ, Park JW, Choi KS, Kwon TK. *Carcinogenesis*. 2005 Nov;26(11):1905-13. Epub 2005 Jun 29. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated upregulation of death receptor 5 (DR5).

Jung KK, Lee HS, Cho JY, Shin WC, Rhee MH, Kim TG, Kang JH, Kim SH, Hong S, Kang SY. *Life Sci*. 2006 Oct 19;79(21):2022-31. Epub 2006 Aug 24. Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia.

Kaap S, Brechlin P, Quentin I, Eger K, Steinfelder HJ. *Biochem Pharmacol*. 2004 Mar 1;67(5):919-26. Apoptosis by 6-O-palmitoyl-L-ascorbic acid coincides with JNK-phosphorylation and inhibition of Mg²⁺-dependent phosphatase activity.

Kabbarah O, Chin L. *Front Biosci*. 2006 Jan 1;11:928-42. Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man.

Kabe Y, Yamada J, Uga H, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H. *Mol Cell Biol*. 2005 Jan;25(1):512-22. NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes.

Kaminski J, Lançon A, Aires V, Limagne E, Tili E, Michaille JJ, Latruffe N. *Biochem Pharmacol*. 2012 Sep 5. pii: S0006-2952(12)00579-5. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.023. [Epub ahead of print] Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts.

Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. *Cell Signal*. 2006 Dec;18(12):2238-51. Epub 2006 Jun 30. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts.

Keller T, Plesková M, McDonald MC, Thiemermann C, Pfeilschifter J, Beck KF. *Nitric Oxide*. 2003 Dec;9(4):183-93. Identification of manganese superoxide dismutase as a NO-regulated gene in rat glomerular mesangial cells by 2D gel electrophoresis.

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. *Cell*. 1998 May 15;93(4):605-15. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation.

Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, Kim MS, Kim HS, Chung HY, Mattson MP, Lee J. *J Biol Chem*. 2008 May 23;283(21):14497-505. Epub 2008 Mar 24. Curcumin stimulates

proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus.

Kim CH, Kim KH, Yoo YM. *J Pineal Res.* 2011 Apr;50(3):241-9. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00833.x. Epub 2010 Dec 8. Melatonin protects against apoptotic and autophagic cell death in C2C12 murine myoblast cells.

Kirkman HN, Gaetani GF. *Trends Biochem Sci.* 2007 Jan;32(1):44-50. Epub 2006 Dec 8. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries.

Kondo H, Miura M, Itokawa Y. *Acta Physiol Scand.* 1991 Aug;142(4):527-8. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization.

Koufaki M, Calogeropoulou T, Detsi A, Roditis A, Kourounakis AP, Papazafiri P, Tsiakitzis K, Gaitanaki C, Beis I, Kourounakis PN. *Kourounakis και συν.*, 2008, 2010 *J Med Chem.* 2001 Nov 22;44(24):4300-3. Novel potent inhibitors of lipid peroxidation with protective effects against reperfusion arrhythmias.

Kyriakis JM, Avruch J. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):807-69. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. *Nature.* 1994 May 12;369(6476):156-60. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. *Nature.* 1994 Sep 22;371(6495):346-7. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.

Largeron M, Mesples B, Gressens P, Cecchelli R, Spedding M, Le Ridant A, Fleury M. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jul 27;424(3):189-94. The neuroprotective activity of 8-alkylamino-1,4-benzoxazine antioxidants.

Lee CM, Onésime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14189-94. Epub 2002 Oct 21. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors.

Lee W, Mitchell P, Tjian R. *Cell.* 1987 Jun 19;49(6):741-52. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements.

Lee SH, Park DW, Park SC, Park YK, Hong SY, Kim JR, Lee CH, Baek SH. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7497-504. Epub 2009 Nov 16. Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation.

Lee YJ, Kim NY, Suh YA, Lee C. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2011 Feb;15(1):1-7. Epub 2011 Feb 28. Involvement of ROS in Curcumin-induced Autophagic Cell Death.

Lee DS, Lee MK, Kim JH. *Anticancer Res.* 2009 Dec;29(12):5039-44. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells.

Li RC, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Oct;279(4):H1679-89. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes.

Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):16939-46. Epub 2004 Feb 6. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation.

Li JM, Shah AM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Nov;287(5):R1014-30. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology.

Li X, Stark GR. *Exp Hematol*. 2002 Apr;30(4):285-96. NF-kappaB-dependent signaling pathways.

Li JJ, Tang Q, Li Y, Hu BR, Ming ZY, Fu Q, Qian JQ, Xiang JZ. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 Aug;27(8):1078-84. Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid.

Li F, Wang H, Huang C, Lin J, Zhu G, Hu R, Feng H. *Free Radic Res*. 2011 Oct;45(10):1154-61. Epub 2011 Aug 5. Hydrogen peroxide contributes to the manganese superoxide dismutase promotion of migration and invasion in glioma cells.

Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ Jr, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. *Circulation*. 2000 Oct 3;102(14):1690-6. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm.

Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB. *FASEB J*. 1998 Jul;12(10):871-80. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha.

Liu X, Piao J, Tian Y. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2009 May;38(3):280-3. [Research on the evaluation methods for antioxidant capacity of several bioactive substances in vitro].

Lu JJ, Cai YJ, Ding J. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jan;360(1-2):253-60. Epub 2011 Sep 22. The short-time treatment with curcumin sufficiently decreases cell viability, induces apoptosis and copper enhances these effects in multidrug-resistant K562/A02 cells.

Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. *FASEB J*. 2010 Oct;24(10):3603-24. Epub 2010 Jun 9. Melatonin signaling and cell protection function.

Luhtala TA, Roecker EB, Pugh T, Feuers RJ, Weindruch R. *J Gerontol*. 1994 Sep;49(5):B231-8. Dietary restriction attenuates age-related increases in rat skeletal muscle antioxidant enzyme activities.

Mahal HS, Sharma HS, Mukherjee T. *Free Radic Biol Med*. 1999 Mar;26(5-6):557-65. Antioxidant properties of melatonin: a pulse radiolysis study.

Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. *Br J Pharmacol*. 2009 Aug;157(7):1097-110. Epub 2009 Jun 5. Vitamin C: update on physiology and pharmacology.

Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2848-52. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene.

Marathe SA, Dasgupta I, Gnanadhas DP, Chakravorty D. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Nov;11(11):1485-99. Epub 2011 Sep 27. Multifaceted roles of curcumin: two sides of a coin!

Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):7223-8. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases.

Martín MA, Serrano AB, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. *J Nutr Biochem*. 2010 Mar;21(3):196-205. Epub 2009 Feb 5. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells.

Masters BA, Palmoski MJ, Flint OP, Gregg RE, Wang-Iverson D, Durham SK. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995 Mar;131(1):163-74. In vitro myotoxicity of the 3-hydroxy-3-

methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes.

Matralis AN, Katselou MG, Nikitakis A, Kourounakis AP. *J Med Chem*. 2011 Aug 11;54(15):5583-91. Epub 2011 Jul 7. Novel benzoxazine and benzothiazine derivatives as multifunctional antihyperlipidemic agents.

McArdle F, Pattwell DM, Vasilaki A, McArdle A, Jackson MJ. *Free Radic Biol Med*. 2005 Sep 1;39(5):651-7. Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells.

Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. *J Pineal Res*. 1993 Sep;15(2):59-69. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization.

Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, Peus DJ. *Invest Dermatol*. 2002 Nov;119(5):1103-8. Vitamin C derivative ascorbyl palmitate promotes ultraviolet-B-induced lipid peroxidation and cytotoxicity in keratinocytes.

Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. *Chem Biol Interact*. 1994 Jun;91(2-3):91-100. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes.

Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15681-6. Epub 2010 Aug 19. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling.

Minden A, Karin M. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):F85-104. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases.

Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. *Biochem Mol Biol Int*. 1995 Dec;37(6):1063-70. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B.

Morita K. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Sep;60(9):549-56. Epub 2012 Jul 11. Surgical reoxygenation injury of the myocardium in cyanotic patients: clinical relevance and therapeutic strategies by normoxic management during cardiopulmonary bypass.

Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. *J Biol Chem*. 2000 May 5;275(18):13613-20. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols.

Moussavi M, Assi K, Gómez-Muñoz A, Salh B. *Carcinogenesis*. 2006 Aug;27(8):1636-44. Epub 2006 Feb 25. Curcumin mediates ceramide generation via the de novo pathway in colon cancer cells.

Movahed A, Yu L, Thandapilly SJ, Louis XL, Netticadan T. *Arch Biochem Biophys*. 2012 Nov 15;527(2):74-80. doi: 10.1016/j.abb.2012.05.002. Epub 2012 May 23. Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury.

Muramoto K, Ohta K, Shinzawa-Itoh K, Kanda K, Taniguchi M, Nabekura H, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7740-5. Epub 2010 Apr 12. Bovine cytochrome c oxidase structures enable O₂ reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate.

Muraoka S, Miura T. *Pharmacol Toxicol*. 2003 Dec;93(6):284-9. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules.

Nagele A. *Radiat Environ Biophys*. 1995 Nov;34(4):251-4. Poly(ADP-ribosyl)ation as a fail-safe, transcription-independent, suicide mechanism in acutely DNA-damaged cells: a hypothesis.

Nair VD, Dairam A, Agbonon A, Arnason JT, Foster BC, Kanfer IJ *Agric Food Chem.* 2007 Mar 7;55(5):1707-11. Epub 2007 Feb 13. Investigation of the antioxidant activity of African potato (*Hypoxis hemerocallidea*).

Nguyen F. *Rev Prat.* 2002 May 1;52(9):937-40. Animal models of Duchenne muscular dystrophy.

Nicholls D, Bernardi P, Brand M, Halestrap A, Lemasters J, Reynolds I. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2(10):E172-3. Apoptosis and the laws of thermodynamics.

Nikolakaki E, Coffey PJ, Hemelsoet R, Woodgett JR, Defize LH. *Oncogene.* 1993 Apr;8(4):833-40. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells.

Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel DV, Ross FP, Teitelbaum SL. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):771-81. Epub 2003 Aug 25. The I κ B function of NF- κ B2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis.

Ogura T, Matsuura K, Matsumoto Y, Mimura Y, Kishida M, Otsuka F, Tobe K. *Metabolism.* 2004 Apr;53(4):448-53. Recent trends of hyperuricemia and obesity in Japanese male adolescents, 1991 through 2002.

Int J Oncol. 2011 Jun;38(6):1731-9. doi: 10.3892/ijo.2011.986. Epub 2011 Mar 23.

Differential augmentative effects of buthionine sulfoximine and ascorbic acid in As₂O₃-induced ovarian cancer cell death: oxidative stress-independent and -dependent cytotoxic potentiation.

Ong PS, Chan SY, Ho PC. *Int J Oncol.* 2011 Jun;38(6):1731-9. doi: 10.3892/ijo.2011.986. Epub 2011 Mar 23. Differential augmentative effects of buthionine sulfoximine and ascorbic acid in As₂O₃-induced ovarian cancer cell death: oxidative stress-independent and -dependent cytotoxic potentiation.

Orzechowski A, Grizard J, Jank M, Gajkowska B, Lokociejewska M, Zaron-Teperek M, Godlewski M. *Reprod Nutr Dev.* 2002 May-Jun;42(3):197-216. Dexamethasone-mediated regulation of death and differentiation of muscle cells. Is hydrogen peroxide involved in the process?

Osada S, Sakashita F, Hosono Y, Nonaka K, Tokuyama Y, Tanaka H, Sasaki Y, Tomita H, Komori S, Matsui S, Takahashi T. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Jul;62(2):315-20. Epub 2007 Oct 6. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation due to menadione-induced arylation mediates growth inhibition of pancreas cancer cells.

Ozkan F, Senayli Y, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Bostan B. *J Surg Res.* 2012 Aug;176(2):601-7. Epub 2011 Nov 19. Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study.

Pae HO, Jeong GS, Jeong SO, Kim HS, Kim SA, Kim YC, Yoo SJ, Kim HD, Chung HT. *Exp Mol Med.* 2007 Jun 30;39(3):267-77. Roles of heme oxygenase-1 in curcumin-induced growth inhibition in rat smooth muscle cells.

Palmer HJ, Paulson KE. *Nutr Rev.* 1997 Oct;55(10):353-61. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression.

Pandey S, Lopez C, Jammu A. *Apoptosis.* 2003 Oct;8(5):497-508. Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. *FEBS J.* 2006 Jul;273(13):2813-38. Melatonin: Nature's most versatile biological signal?

Pandit J, Danley DE, Schulte GK, Mazzalupo S, Pauly TA, Hayward CM, Hamanaka ES, Thompson JF, Harwood HJ Jr. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30610-7. Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis.

Parker A, Cuddihy SL, Son TG, Vissers MC, Winterbourn CC. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1;51(7):1399-405. Epub 2011 Jul 5. Roles of superoxide and myeloperoxidase in ascorbate oxidation in stimulated neutrophils and H₂O₂-treated HL60 cells.

Pearson LL, Castle BE, Kehry MR. *Int Immunol*. 2001 Mar;13(3):273-83. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.

Pechtelidou A, Beis I, Gaitanaki C. *Mol Cell Biochem*. 2008 Feb;309(1-2):177-89. Epub 2007 Dec 4. Transient and sustained oxidative stress differentially activate the JNK1/2 pathway and apoptotic phenotype in H9c2 cells.

Petropoulos I, Friguet B. *Free Radic Res*. 2006 Dec;40(12):1269-76. Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair.

Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. *Oncogene*. 1999 Oct 28;18(44):6013-20. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex.

Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Feb;288(2):R337-44. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress.

Powis G, Gasdaska JR, Baker A. *Adv Pharmacol*. 1997;38:329-59. Redox signaling and the control of cell growth and death.

Powis G, Mustacich D, Coon A. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):312-22. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer.

Poylin V, Fareed MU, O'Neal P, Alamdari N, Reilly N, Menconi M, Hasselgren PO. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:317851. The NF-kappaB inhibitor curcumin blocks sepsis-induced muscle proteolysis.

Poyton RO, Ball KA, Castello PR. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Sep;20(7):332-40. Epub 2009 Sep 3. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling.

Primeau AJ, Adhietty PJ, Hood DA. *Can J Appl Physiol*. 2002 Aug;27(4):349-95. Apoptosis in heart and skeletal muscle.

Quantin B, Breathnach R. *Nature*. 1988 Aug 11;334(6182):538-9. Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts.

Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, Garcia-Mauriño S, Guerrero JM. *J Neuroimmunol*. 1998 Jun 15;86(2):190-7. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat.

Rando TA. *Microsc Res Tech*. 2001 Nov 15;55(4):223-35. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis.

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. *J Hypertens Suppl*. 2009 Aug;27(6):S17-20. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension.

Rice-Evans καi συν., 1995 (oxid stress)

Rice-Evans C, Miller N. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997 Oct;57(4-5):499-505. Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma.

Rosen RB, Hu DN, Chen M, McCormick SA, Walsh J, Roberts JE. *Mol Vis.* 2012;18:1640-8. Epub 2012 Jun 20. Effects of melatonin and its receptor antagonist on retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide damage.

Roux PP, Blenis J. *Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):320-44. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.

Ryder K, Nathans D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov;85(22):8464-7. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors.

Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Müller A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. *Biochem Pharmacol.* 1994 Jan 13;47(1):129-36. Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors.

Sahin N, Onderci M, Sahin K, Smith MO. *Biol Trace Elem Res.* 2003 Winter;96(1-3):169-77. Melatonin supplementation can ameliorate the detrimental effects of heat stress on performance and carcass traits of Japanese quail.

Sahu SC, Washington MC. *Cancer Lett.* 1992 Apr 30;63(3):237-41. Effect of ascorbic acid and curcumin on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation.

Saini A, Al-Shanti N, Sharples AP, Stewart CE. *Exp Physiol.* 2012 Mar;97(3):400-18. Epub 2011 Nov 28. Sirtuin 1 regulates skeletal myoblast survival and enhances differentiation in the presence of resveratrol.

Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):15504-11. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks.

Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, Aggarwal BB. *Free Radic Biol Med.* 2007 Aug 15;43(4):568-80. Epub 2007 May 16. Role of prooxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane).

Santos CX, Anjos EI, Augusto O. *Arch Biochem Biophys.* 1999 Dec 15;372(2):285-94. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation.

Sautin YY, Johnson RJ. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008 Jun;27(6):608-19. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox.

Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Aug;293(2):C584-96. Epub 2007 Apr 11. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress.

Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Seifritz E, Wirz-Justice A, Müller-Spahn F. *Gerontology.* 2003 Nov-Dec;49(6):380-3. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity.

Schwartz JL. *J Nutr.* 1996 Apr;126(4 Suppl):1221S-7S. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth.

Sciancalepore M, Luin E, Parato G, Ren E, Giniatullin R, Fabbretti E, Lorenzon P. *Free Radic Biol Med.* 2012 Oct 1;53(7):1392-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.002. Epub 2012 Aug 10. Reactive oxygen species contribute to the promotion of the ATP-mediated proliferation of mouse skeletal myoblasts.

Seddon M, Looi YH, Shah AM. *Heart.* 2007 Aug;93(8):903-7. Epub 2006 May 2. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure.

Shaulian E, Karin M. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):E131-6. AP-1 as a regulator of cell life and death.

Shen J, Ma J, Lee C, Smith BP, Smith TL, Tan KH, Koman LA. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):1128-35. How muscles recover from paresis and atrophy after intramuscular injection of botulinum toxin A: Study in juvenile rats.

Shi Y, Gaestel M. *Biol Chem.* 2002 Oct;383(10):1519-36. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):86-102. Epub 2010 Nov 23. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling.

Siddiqui AM, Cui X, Wu R, Dong W, Zhou M, Hu M, Simms HH, Wang P. *Crit Care Med.* 2006 Jul;34(7):1874-82. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.

Sies H, Cadenas E. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31. Oxidative stress: damage to intact cells and organs.

Sies H, Krinsky NI. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec;62(6 Suppl):1299S-1300S. The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Sep 30;669:7-20. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids.

Sies H, Stahl W. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec;62(6 Suppl):1315S-1321S. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.

Siu PM, Wang Y, Alway SE. *Life Sci.* 2009 Mar 27;84(13-14):468-81. Epub 2009 Feb 3. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes.

So A, Thorens B. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1791-9. doi: 10.1172/JCI42344. Epub 2010 Jun 1. Uric acid transport and disease.

Soldani C, Scovassi AI. *Apoptosis.* 2002 Aug;7(4):321-8. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update.

Song JJ, Lee YJ. *J Cell Biochem.* 2003 Oct 1;90(2):304-14. Catalase, but not MnSOD, inhibits glucose deprivation-activated ASK1-MEK-MAPK signal transduction pathway and prevents relocalization of Daxx: hydrogen peroxide as a major second messenger of metabolic oxidative stress.

Studenik C, Lemmens-Gruber R, Heistracher P. *Pharmazie.* 1999 May;54(5):330-4. New benzoxazine and benzothiazine derivatives--structure-activity relations in guinea-pig heart and smooth muscle preparations.

Sundquist AR, Briviba K, Sies H. *Methods Enzymol.* 1994;234:384-8. Singlet oxygen quenching by carotenoids.

Suzuki K, Okada K, Kamiya Y, Zhu XF, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. *J Biochem.* 1997 Mar;121(3):496-505. Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (dps) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant.

Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3263-73. Interleukin-1 β elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2.

Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. *J Pineal Res.* 2003 Jan;34(1):75-8. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin.

Tanner JJ, Parsons ZD, Cummings AH, Zhou H, Gates KS. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Jul 1;15(1):77-97. Epub 2011 Apr 13. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: structural and chemical aspects.

Tanoue T, Nishida E. *Cell Signal.* 2003 May;15(5):455-62. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. *FASEB J.* 2001 Oct;15(12):2294-6. Epub 2001 Aug 17. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant.

Tapias V, Escames G, López LC, López A, Camacho E, Carrión MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice.

Thaloor D, Miller KJ, Gephart J, Mitchell PO, Pavlath GK. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 1):C320-9. Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury.

Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):15090-5. Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle.

Thomason DB, Biggs RB, Booth FW. *Am J Physiol.* 1989 Aug;257(2 Pt 2):R300-5. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle.

Tidball JG, Wehling-Henricks M. *J Appl Physiol.* 2007 Apr;102(4):1677-86. Epub 2006 Nov 9. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy.

Turjanski AG, Hummer G, Gutkind JS. *J Am Chem Soc.* 2007 May 6;131(17):6141-8. How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study.

Turner C, Hilton-Jones D. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Apr;81(4):358-67. Epub 2010 Feb 22. The myotonic dystrophies: diagnosis and management.

Uddin S, Hussain AR, Manogaran PS, Al-Hussein K, Platanias LC, Gutierrez MI, Bhatia KG. *Oncogene.* 2005 Oct 27;24(47):7022-30. Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. *Free Radic Biol Med.* 1999 Oct;27(7-8):838-47. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells.

Valko M, Morris H, Cronin MT. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208. Metals, toxicity and oxidative stress.

Varadharaj S, Steinhour E, Hunter MG, Watkins T, Baran CP, Magalang U, Kuppusamy P, Zweier JL, Marsh CB, Natarajan V, Parinandi NL. *Cell Signal.* 2006 Sep;18(9):1396-407. Epub 2006 Jan 11. Vitamin C-induced activation of phospholipase D in lung microvascular endothelial cells: regulation by MAP kinases.

Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA, Koomans HA, Fijnheer R, Rabelink TJ. *J Hypertens.* 1998 Jan;16(1):45-50. Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating P-selectin.

- Venkatesan N.** Br J Pharmacol. 1998 Jun;124(3):425-7. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats.
- Verstraeten SV,** Oteiza PI. Arch Biochem Biophys. 2002 Dec 15;408(2):263-71. Al(3+)-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis.
- Vetrano AM,** Heck DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. J Biol Chem. 2005 Oct 21;280(42):35372-81. Epub 2005 Aug 2. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase.
- Wallerath T,** Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Circulation. 2002 Sep 24;106(13):1652-8. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase.
- Walker και συν., 1993 (tran factors antioxidants)**
Wang και συν., 2004 (jnks cascade picture)
- Widmann C,** Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Physiol Rev. 1999 Jan;79(1):143-80. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.
- Wietek C,** Cleaver CS, Ludbrook V, Wilde J, White J, Bell DJ, Lee M, Dickson M, Ray KP, O'Neill LA. J Biol Chem. 2006 Nov 17;281(46):34973-81. Epub 2006 Sep 26. IκappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65.
- Winokur ST,** Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Hum Mol Genet. 2003 Nov 15;12(22):2895-907. Epub 2003 Sep 30. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation.
- Wu K,** Chen XP, Gao Y, Zhang X, Li LX, Wan LY. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2011 Nov;32(11):1153-7. [Predictive value of serum uric acid on type 2 diabetes mellitus].
- Wyke SM,** Tisdale MJ. Life Sci. 2006 May 15;78(25):2898-910. Epub 2005 Dec 15. Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.
- Xanthoudakis S,** Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. Science. 1996 May 10;272(5263):892-5. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1.
- Yang R,** Zhang S, Kong D, Gao X, Zhao Y, Wang Z. Pharm Res. 2012 Aug 15. [Epub ahead of print] Biodegradable Polymer-Curcumin Conjugate Micelles Enhance the Loading and Delivery of Low-Potency Curcumin.
- Yang K,** Liao E, Zhou H. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2010 Dec;35(12):1248-53. [Effect of nylestriol and levonorgestrel on the expression of estrogen receptor subtypes in human osteosarcoma MG-63 cell lines].
- Yeh CH,** Chen TP, Wu YC, Lin YM, Jing Lin P. J Surg Res. 2005 May 1;125(1):109-16. Inhibition of NFκappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion.
- Yoshino M,** Haneda M, Naruse M, Htay HH, Tsubouchi R, Qiao SL, Li WH, Murakami K, Yokochi T. [Toxicol In Vitro](#). 2004 Dec;18(6):783-9. Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death.
- Yu R,** Guo X, Huang L, Zeng Z, Zhang H. Peptides. 2012 Sep 11;38(1):142-149. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.005. [Epub ahead of print] The novel peptide PACAP-TAT

with enhanced traversing ability attenuates the severe lung injury induced by repeated smoke inhalation.

Zámocký M, Koller F. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;72(1):19-66. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Biochem Pharmacol.* 2004 Aug 1;68(3):503-12.

Zangar RC, Fan YY, Chapkin RS. Interactions of phospholipase D and cytochrome P450 protein stability.

Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. *Pharmacol Rep.* 2009 May-Jun;61(3):383-410. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms.

Zheng J, Payne K, Taggart JE, Jiang H, Lind SE, Ding WQ. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(3-4):353-60. Epub 2012 Apr 3. Trolox enhances curcumin's cytotoxicity through induction of oxidative stress..

