

**‘Λειτουργικές Δοκιμασίες σε Ανθρώπινα Κύτταρα από Ουσίες
που Απομονώνονται από Φυσικά Προϊόντα’**



Πτυχιακή Μελέτη
Πατέρας Ιωάννης

Επιβλέπων Καθηγητής:
Δρ. Δεδούσης Γ.

Τριμελής Επιτροπή:
Δρ. Ανδρικόπουλος Ν.
Δρ. Αντωνοπούλου Σ.
Δρ. Δεδούσης Γ.

Στους υπέροχους ανθρώπους που γνώρισα

στους χορούς, τα τραγούδια τις χαρές και τις λύπες

Σας αγαπώ ακόμη περισσότερο τώρα!

“Ala recherché de la quatrième dimension, 1979”

(‘Η αναζήτηση της τέταρτης διάστασης’)

Πρόλογος

Για την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου υπάρχουν κάποια άτομα που συνέβαλλαν καθοριστικά, η βοήθειά τους μου ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμη.

Πρώτα από όλα θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Δεδούση Γ., ο οποίος πάντα με το ψύχραιμο και ήρεμο τρόπο του με ενθάρρυνε σε όλη την πορεία της πτυχιακής μου. Σας ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου δείξατε! Θέλω να ευχαριστήσω τον πρόεδρο του εργαστηρίου Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας τροφίμων, Δρ. Ανδρικόπουλο Ν., καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους. Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω την Δρ. Κυριακού Μ. καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, Μικροβιολογίας και Φυσιολογίας για τη στήριξή τους ειδικά τον πρώτο διάστημα στις εργαστηριακές ασκήσεις.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου τους εθελοντές αιμοδότες, Καμηλαράκη Γ., Καλιώρα Α. καθώς και Δρ. Δεδούση Γ και Δρ. Ανδρικόπουλο Ν (για μία ακόμη φορά), οι οποίοι με τίμησαν δεόντως!

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας του Ευαγγελισμού για τη βοήθεια τους στην ανάλυση των δειγμάτων μου.

Και βέβαια ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους μου, για το χαμόγελό τους όταν το είχα ανάγκη.

Σας ευχαριστώ όλους!

Ευχαριστώ πολύ τον
Παναγιώτη Σακελλαρίου και
τη Χρυσιάνη Μαργαρίτα
για την πολύτιμη βοήθειά τους
σε εφ' όλην διάρκεια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ελληνικά)	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (αγγλικά)	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ	5
1.1 Γενικά	6
1.2 Ανατομία	6
1.3 Φυσιολογία	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ	14
2.1 Γενικά	15
2.2 Μορφολογικές και Μοριακές Αλλαγές κατά την Απόπτωση	15
2.3 Απόπτωση& Κυτταρικός Κύκλος	17
2.4 Λειτουργικές Ομάδες Μορίων που Εμπλέκονται στην Απόπτωση	19
2.5 Μηχανισμοί Απόπτωσης	21
2.6 Η Απόπτωση στη Φυσιολογία& Παθοφυσιολογία	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ& ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL	29
3.1 Γενικά	30
3.2 Δομή& Μεταβολισμός LDL	30
3.3 Οξειδωμένη LDL& Αθηρογένεση	32
3.4 Οξειδωμένη LDL, Απόπτωση Μονοπύρηνων Λευκοκυττάρων& Αθηρογένεση	35
3.5 Οξειδωμένη LDL& Αντιοξειδωτικά	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ& ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	38
4.1 Γενικά	39
4.2 Πολυφαινόλες, Δομή, Είδη, Διαιτητικές Πηγές και Βιοδιαθεσιμότητα	39
4.3 Πολυφαινόλες& Απόπτωση Καρκινικών Κυττάρων	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ& ΜΕΘΟΔΟΙ	45
5.1 Πλαστικά-Γυαλικά	46
5.2 Διαλύματα κυτταρικών Καλλιιεργειών	46
5.3 Ουσίες που Χρησιμοποιήθηκαν στις Κυτταρικές Καλλιιεργειες	46
5.4 Συνθήκες Κυτταρικών Καλλιιεργειών	47

5.5 Απομόνωση Μονοπύρηνων	47
5.6 Μέτρηση της Βιωσιμότητας των Κυττάρων	48
5.7 Επιδράσεις Ουσιών-Χρόνοι Επώασης	48
5.8 Κυτταρομετρία Ροής (FACS, Flowcytometry), DNA Ανάλυση με τη Χρήση Κυτταρομετρίας Ροής με τη Τεχνική Ιωδιούχου Προπιδίου (PI, Propidium Iodide), Μέθοδος Ανεξίνης-V (Annexin-V), Χρήση AntiCD95-FITC και AntiHLA-DR-PE	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
6.1 Επώαση Μονοπύρηνων με LDL Οξειδωμένη σε Διαφορετικούς Χρόνους (1,2,3 ώρες) επί 72 ώρες	54
6.2 Επώαση Μονοπύρηνων με LDL Οξειδωμένη σε Διαφορετικούς Χρόνους (0,6,22 ώρες) επί 72 ώρες	55
6.3 Επώαση Μονοπύρηνων παρουσία LDL Οξειδωμένης σε Διαφορετικούς Χρόνους (0,3,6 ώρες) και Παραπροϊόντος Τηγανισμένου Λαδιού Διαφορετικών Ποσοτήτων 500μl και 50μl, επί 24 ώρες, Εξέταση του Βαθμού Έκφρασης του Αντιγόνου Επιφανείας CD95	56
6.4 Επίδραση Διαφορετικών Ποσοτήτων, (20 μl και 200μl) Παραπροϊόντος Τηγανισμένου Λαδιού (ΠΤΛ) στην Έκφραση των Αντιγόνων Επιφανείας CD95 και HLA-DR σε Μονοπύρηνα (Χρόνος Επώασης 48 ώρες)	57
6.5 Επώαση Μονοπύρηνων Παρουσία Φυτοαιμαγλουτίνης (PHA, 5μg/ml) και Παραπροϊόντος Τηγανισμένου Λαδιού (ΠΤΛ, 500μg/ml) επί 72 ώρες και DNA Ανάλυση με τη Τεχνική Ιωδιούχου Προπιδίου (PI)	59
6.6 Επώαση K562 Παρουσία Πολυφαινολικών Ουσιών Διαφορετικών Συγκεντρώσεων, επί 24 ώρες	61
6.7 Επώαση K562 και Μονοπύρηνων Κυττάρων Περιφερικού Αίματος Παρουσία Πολυφαινολικών Ουσιών Διαφορετικών Συγκεντρώσεων επί 15 ώρες και Μελέτη Βαθμού Απόπτωσης με τη Μέθοδο Ανεξίνης-V	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
7.1 Ερμηνεία Πειραματικών Δεδομένων	64
7.2 Προτάσεις	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήσαμε την επίδραση διαφόρων ουσιών στη βιωσιμότητα και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών και σε νεοπλασματικά κύτταρα της ερυθρολευχαιμικής σειράς K562. Πριν προχωρήσουμε στο σχολιασμό του πειραματικού μέρους, στεκόμαστε στην ανάλυση κάποιων εννοιών που θα μας απασχολήσουν εκτενώς σε όλη την μελέτη μας. Συγκεκριμένα, αναφερόμαστε σε βασικές έννοιες της ανοσολογίας, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην περιγραφή των βασικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ερμηνεύουμε το φαινόμενο της απόπτωσης και αναλύουμε τους μηχανισμούς της. Τονίζουμε την σπουδαιότητα τους για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού, και συσχετίζουμε την μη φυσιολογική τους λειτουργία με την παθοφυσιολογία των νεοπλασιών και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Εξετάζουμε την αθηρογένεση, δείχνοντας το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η οξειδωτικά τροποποιημένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (oxLDL) στην παθογένειά της. Αναφερόμαστε σε μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τις επιπτώσεις της οξειδωμένης LDL στην επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης σε μονοπύρηννα λευκοκύτταρα. Ολοκληρώνουμε τη θεωρητική μας προσέγγιση με την μελέτη των επιδράσεων των πολυφαινολών στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στη συνέχεια, ασχολούμαστε με το εργαστηριακό μέρος της μελέτης μας. Ειδικότερα, εξετάσαμε την επίπτωση της LDL, οξειδωμένης με ιόντα χαλκού, σε διαφορετικούς χρόνους και ενός παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) σε διαφορετικές ποσότητες, στη βιωσιμότητα και στο βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηννων, μελετώντας το αντιγόνο επιφανείας CD95. Παρατηρήσαμε, μείωση της βιωσιμότητας και αύξηση της έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας CD95 των μονοπύρηννων. Διαπιστώσαμε, ότι ο αυξανόμενος χρόνος οξείδωσης της LDL επιδράει θετικά στον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηννων. Επιπλέον, η παρουσία ΠΤΛ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μείωσε τη βιωσιμότητα και αύξησε την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας CD95 των μονοπύρηννων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Μελετήσαμε την επίδραση του ΠΤΛ, σε μικρότερες ποσότητες, στην έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD95 και HLA-DR, όπου δεν διαπιστώσαμε επαγωγή της απόπτωσης και ενεργοποίηση των μονοπύρηννων. Εξετάσαμε την επίπτωση του ΠΤΛ στη βιωσιμότητα και στο βαθμό απόπτωσης, με τη τεχνική ιωδιούχου προπιδίου (PI) σε ενεργοποιημένα μονοπύρηννα

με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA). Παρατηρήσαμε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας και αύξηση του ποσοστού της απόπτωσης των κυττάρων. Μελετήσαμε την επίδραση διαφόρων πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των K562, στα οποία φάνηκε ότι η πολυφαινολική ουσία γαλλικό οξύ προκαλεί σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των K562. Κλείνοντας, εξετάσαμε την επίδραση των ανωτέρω πολυφαινολών στο βαθμό απόπτωσης, με την μέθοδο ανεξίνη-V, σε K562 παρουσία μονοπύρηνων λευκοκυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι το γαλλικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό η ρουτίνη προκαλούν σημαντικού βαθμού απόπτωση στα K562. Ο μηχανισμός της απόπτωσης αποτελεί μία καθοριστική λειτουργία για την ομοιόσταση του οργανισμού, και πιθανόν ουσίες που προσλαμβάνονται μέσω της καθημερινής διατροφής να επηρεάζουν σε κάποιες περιπτώσεις την επαγωγή της απόπτωσης. Χρειάζονται πολλές μελέτες προκειμένου να διευκρινιστεί αυτό το θέμα, άλλωστε η φύση βρίσκει τον τρόπο να μας προκαλεί συνέχεια νέα ερωτήματα.

ABSTRACT

We examined the effects of several substances on the survival and the induction of programmed cell death (apoptosis) in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers and in the erythroleukemic cancer cell line K562. Before proceeding in the experimental part, we analyse some basic concepts that we are going to come up to through out our study. Specifically, we refer to basic concepts on immunology, featuring in the discription of the basic cells of the immune system. We interpret the phenomenon of apoptosis and we analyse its mechanisms. We point out to the importance of apoptosis for the physiology of the organism and we correlate the abnormal fuction of its mechanisms with the pathophysiology of neoplasia and autoimmune diseases. We examine atherogenesis and we highlight the important role of oxidized modification of low density lipoprotein (LDL) in the pathogenesis of atherogenesis. We refer to studies related to the effects of oxidized LDL on the induction of apoptosis in mononuclear leucocytes. We end up our theoretical approach by mentioning the effects of several polyphenols on the activation of the mechanisms of apoptosis. We continue with the analysis of the experimental part of our study. In specific, we examined the effect of LDL, oxidized by copper ions, in different times and of a non frying byproduct (nFB) in different quantities, on the survival and the degree of apoptosis of mononuclear cells, by examining the expression of the surface antigen CD95. We observed a decrease in the survival and an increase in the expression of the surface antigen CD95 in the mononuclear cells.. We detected that the increased time of oxidation of LDL has positive effects on the proliferation of mononuclear cells. Moreover, the presence of nFB inhibited the cellular proliferation, decreased the survival and increased the expression of the surface antigen CD95 in a dose-dependent manner. We tested the effect of nFB, in smaller quantities, in the expression of the surface antigens CD95 and HLA-DR, where we did not observe an induction of apoptosis and an activation of mononuclear cells. We examined the effect of nFB in the survival and the degree of apoptosis, using the propidium iodide (PI) staining, on phytohemagglutinin-activated mononuclear cells. There was an important decrease in survival and an increase in the degree of apoptosis of the mononuclear cells. We tested the effect of several polyphenolic substances on the survival of K562, where it appeared that only the polyphenol gallic acid significantly decreased the survival of K562. Ending up, we

measured the effect of the polyphenols, used earlier, on the degree of apoptosis, using annexin-V method, in K562 in the presence of mononuclear cells. The results showed, that gallic acid and in a lesser degree rutin caused a significant induction of apoptosis in K562. The mechanism of apoptosis is crucial for the homeostasis of the organism, and it is possible that dietary substances may affect in some cases the induction of apoptosis. Many studies should be carried out in order to clarify this subject, besides nature finds many ways to challenge us.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

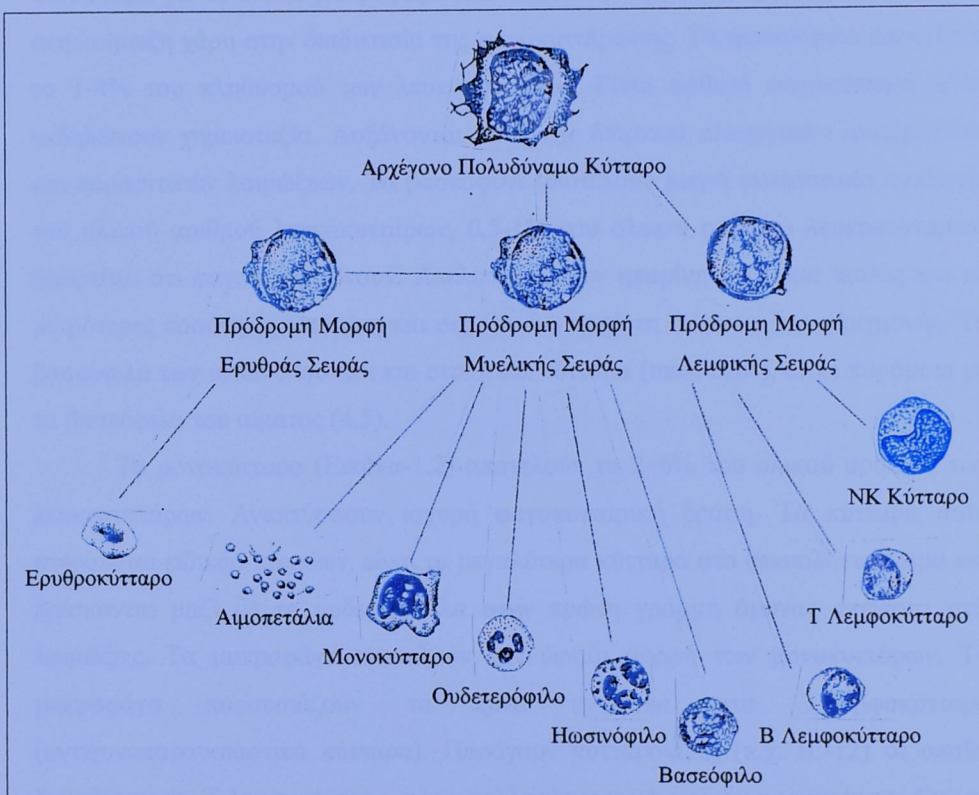
Το ανοσολογικό σύστημα είναι ένα σύνολο κυττάρων και οργάνων που σκοπό έχουν την προστασία του οργανισμού έναντι βλαπτικών παραγόντων του εξωτερικού ή του εσωτερικού περιβάλλοντος που διαταράσσουν την ομοιοστασία του οργανισμού. Η λειτουργία αυτή ονομάζεται ανοσία (1,2). Κύριοι στόχοι του ανοσοποιητικού είναι η προστασία έναντι λοιμογόνων παραγόντων όπως παθογόνων μικροοργανισμών και η αντίδραση έναντι ενδογενών παραγόντων όπως οι κακώσεις ιστών και νεοπλασίες.

1.2 ANATOMIA

Το ανοσολογικό σύστημα αποτελείται από κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα και τη λέμφο αλλά σχηματίζουν και καλά συγκροτημένους ιστούς. Μέσω υποδοχέων τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος διακρίνουν τα διάφορα αντιγόνα και αποκρίνονται κατάλληλα. Με τον όρο αντιγόνα εννοούμε μικρά πεπτίδια, ή τμήματα πολυσακχαριτών τα οποία είναι ακριβώς αυτά που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς αντιγόνων (1).

Τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος προέρχονται από το αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο του μυελού των οστών (stem cell) από το οποίο προκύπτουν τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς, της μυελικής και της λεμφικής σειράς για να καταλήξουν σε ώριμα κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση διαφόρων παραγόντων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον «προγραμματισμένο» θάνατο, για το οποίο θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω, των αιμοποιητικών κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ερυθροποιητίνη (δρα στην ερυθρά σειρά), οι διεγερτικοί παράγοντες των αποικιών ή αυξητικοί παράγοντες, οι ιντερλευκίνες και διάφορες άλλες κυτταροκίνες (δρουν κυρίως στη λεμφική και μυελική σειρά). Οι κυτταροκίνες είναι πεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες με πολλαπλή δράση (πλειοτροπία) και σημαντικού βαθμού αλληλεπίδραση στην λειτουργία μεταξύ τους. Οι κυτταροκίνες που παράγονται από μονοκύτταρα μακροφάγα καλούνται μονοκίνες ενώ όσες παράγονται από λεμφοκύτταρα ονομάζονται λεμφοκίνες. Δρουν ως μεσολαβητές της ανοσολογικής απάντησης. Αποτελούνται από τις ιντερφερόνες (IFNs), τις ιντερλευκίνες (IL) και τις χυμοκίνες. Από τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς παράγονται τα ερυθροκύτταρα. Από τα πρόδρομα κύτταρα της μυελικής σειράς παράγονται τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, καθώς και τα

αιμοπετάλια (1). Από τα κύτταρα της λεμφικής σειράς παράγονται τα T-λεμφοκύτταρα, τα B-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK, Natural Killer cells) (3). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι τα λευκοκύτταρα, τα οποία αποτελούνται από τα κύτταρα της μυελικής σειράς, εκτός των αιμοπεταλίων, και από τα κύτταρα της λεμφικής σειράς, αν και όλα τα κύτταρα του οργανισμού συνεργάζονται προκειμένου να επιτευχθεί η ανοσολογική απόκριση απέναντι στον βλαπτικό παράγοντα. (Εικόνα-1.1)



ΕΙΚΟΝΑ-1.1 Το αιμοποιητικό δέντρο όπου φαίνονται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα B λεμφοκύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK). Τροποποιημένο σχήμα (1).

Μορφολογικά τα λευκοκύτταρα διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: κοκκιοκύτταρα και μη κοκκιοκύτταρα. Τα κοκκιοκύτταρα παίρνουν το όνομά τους από τα ειδικά κοκκία που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτά ανήκουν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα βασεόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα εωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα. Κάθε ένα από αυτά τα κύτταρα περιέχει ένα πολύλοβο πυρήνα που δικαιολογεί και τον επιπλέον χαρακτηρισμό τους ως

«πολυμορφοπύρρηνα». Τα μη κοκκιοκύτταρα, διαχωρίζονται με φυγοκέντρωση από τα κοκκιοκύτταρα, δεν περιέχουν κοκκία και έχουν μη λοβωτό πυρήνα. Δεν είναι απαραίτητα σφαιρικά. Σε αυτά ανήκουν τα ^{μονοκύτταρα} μονοπύρρηνα, τα T,B λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς. Συχνά χρησιμοποιείται γι' αυτά ο όρος μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα ή απλά μονοπύρρηνα (4).

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα (Εικόνα-1.2) συνιστούν το πολυπληθέστερο τύπο λευκοκυττάρων, 50-60% του συνόλου των λευκοκυττάρων. Σε συνδυασμό με τα ιστικά μακροφάγα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στη λοίμωξη χάρη στην διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Τα ηωσινόφιλα αποτελούν το 1-4% του πληθυσμού των λευκοκυττάρων. Είναι ασθενή φαγοκύτταρα αλλά εκδηλώνουν χημειοταξία. Αυξάνονται κατά την διάρκεια αλλεργικών αντιδράσεων και παρασιτικών λοιμώξεων. Τα βασεόφιλα αποτελούν μικρή εκατοστιαία αναλογία του ολικού αριθμού λευκοκυττάρων, 0,5-1% του ολικού αριθμού λευκοκυττάρων, θεωρείται ότι φαγοκυτταρώνουν. Απελευθερώνουν ηπαρίνη στο αίμα καθώς και σε μικρότερες ποσότητες ισταμίνη και σεροτονίνη κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Τα βασεόφιλα των ιστών λέγονται και σιτεντικά κύτταρα (mast cells), είναι παρόμοια με τα βασεόφιλα του αίματος (4,5).

Τα μονοκύτταρα (Εικόνα-1.2) αποτελούν το 2-6% του ολικού αριθμού των λευκοκυττάρων. Αναπτύσσουν ισχυρή φαγοκυτταρική δράση. Τα κύτταρα αυτά στερούνται ειδικών κοκκίων, είναι τα μεγαλύτερα κύτταρα στο φυσιολογικό αίμα και βρίσκονται μαζί με τα ουδετερόφιλα στην πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στις λοιμώξεις. Τα μακροφάγα αποτελούν την ώριμη μορφή των μονοκυττάρων. Τα μακροφάγα παρουσιάζουν τα ξένα αντιγόνα στα T-λεμφοκύτταρα (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα). Παράγουν κυτταροκίνες (π.χ. IL-12) οι οποίες διεγείρουν τα T-λεμφοκύτταρα προς πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται και ως βοηθητικά κύτταρα για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, απομακρύνουν τραυματισμένα και νεκρά κύτταρα, μικροοργανισμούς και αδιάλυτα σωματίδια Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση. Εκφράζουν υποδοχείς για τη βακτηριακή λιποπολυσακχαρίδη (LPS), οι οποίοι ονομάζονται CD14, υποδοχείς μαννόζης, το μόριο CD11b/CD18 που είναι ένα συνδετικό μόριο γνωστό ως CR3 και Mac1 καθώς και υποδοχείς για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών (το Fc τμήμα αποτελεί τη σταθερή περιοχή των ανοσοσφαιρινών). Τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα Fcγ μπορούν να προσβάλλουν καρκινικά κύτταρα που είναι επικαλυμμένα με αντισώματα. Επίσης, τα μακροφάγα μέσω της παραγωγής

του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF) ασκούν τοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών ή της ενεργοποίησης μηχανισμών που οδηγούν σε απόπτωση (3). Τα ιστιοκύτταρα ή ιστικά μακροφάγα είναι μεγάλα φαγοκύτταρα που καταχωρούνται ως μονοκύτταρα. Η εμφάνιση των ιστικών μακροφάγων ποικίλει στους διάφορους ιστούς εξαιτίας διαφορών του περιβάλλοντος και γι' αυτό είναι γνωστά με διαφορετικά ονόματα όπως ως κύτταρα του Kupffer στο ήπαρ, ως δικτυοκύτταρα στους λεμφαδένες, στο σπλήνα και στο μυελό των οστών, ως κυψελιδικά μακροφάγα στις πνευμονικές κυψελίδες και ως μικρογλοία στον εγκέφαλο (5).

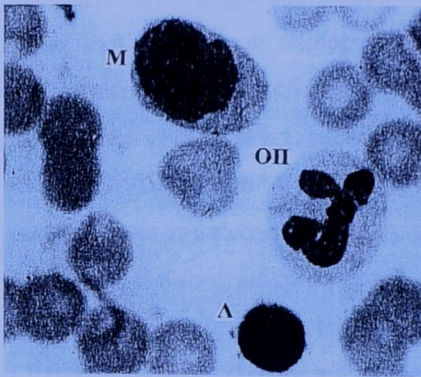
Τα λεμφοκύτταρα (Εικόνα-1.2) συνιστούν το 20-40% του ολικού αριθμού των λευκοκυττάρων, είναι οι φορείς της ειδικής ανοσίας. Είναι τα μόνα κύτταρα στον οργανισμό που έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν ειδικά διαφορετικά αντιγόνα (3). Τόσο για την αναγνώριση των αντιγόνων όσο και για ενεργοποίησή τους, τα λεμφοκύτταρα βασίζονται σε κύτταρα που έχουν βοηθητικό ρόλο όπως στα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα. Είναι μικρά κινητά κύτταρα, έχουν μεγάλο πυρήνα με πυκνή ετεροχρωματίνη και μεταναστεύουν σε περιοχές φλεγμονής τόσο σε πρόωμη όσο και σε όψιμη φάση της φλεγμονώδους διαδικασίας. Αποτελούνται από διαφορετικά είδη κυττάρων με διακριτές λειτουργίες, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς, όπως ήδη αναφέραμε. Όλα σχηματίζονται στον μυελό των οστών με τη διαφορά ότι τα Β-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον μυελό των οστών ενώ τα Τ-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στον θύμο αδένα. Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής (FACS, Flowcytometry) αναγνωρίζουμε το τύπο των διαφόρων λεμφοκυττάρων δια μέσου των χαρακτηριστικών μορίων επιφανείας που εκφράζουν.

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα που εμπλέκονται στην χυμική ανοσία, με την παραγωγή αντισωμάτων (ανοσοσφαιρινών, Ig, Immunoglobulins). Έχουν δύο φάσεις ωρίμανσης τη μία ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνου και την άλλη αντιγονοεξαρτώμενη. Τα Β-λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν αντιγόνα στα Τ-λεμφοκύτταρα Εκφράζουν χαρακτηριστικά μόρια επιφανείας όπως ο Β-κυτταρικός υποδοχέας των αντιγόνων που αποτελεί κατά κάποιο τρόπο την μεμβρανική μορφή των εκκρινόμενων ανοσοσφαιρινών, το CD19 (Cluster of Differentiation), το CD20, το Μέγιστο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC II, Major Histocompatibility Complex).

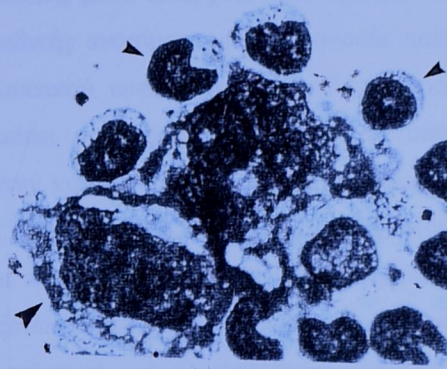
Τα Τ-λεμφοκύτταρα εμπλέκονται στη κυτταρική ανοσία, δεν παράγουν αντισώματα. Η κυριότερη δράση των Τ-λεμφοκυττάρων είναι η ρύθμιση της λειτουργίας τόσο των ιδίων όσο και των Β-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων διά μέσω κυτταροκινών που δρουν αυτοκρινικά, παρακρινικά και ενδοκρινικά. Τα Τ-λεμφοκύτταρα διακρίνονται επιμέρους σε Τ-κυτταροτοξικά (T-cytotoxic, $CD4^-$, $CD8^+$) τα οποία είναι υπεύθυνα για το θάνατο κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το κατάλληλο αντιγόνο, σε Τ-κατασταλτικά κύτταρα (T-suppressor cells) τα οποία καταστέλλουν την κυτταρική και χημική ανοσία, αν και υπάρχουν αμφιβολίες, για το αν αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία Τ-λεμφοκυττάρων, ή αν οι λειτουργίες τους πραγματοποιούνται από άλλους πληθυσμούς Τ-λεμφοκυττάρων που υπό κάποιες καταστάσεις λειτουργούν ως κυτταροτοξικά (Τ-κυτταροτοξικά) ή βοηθητικά (Τ-βοηθητικά) και Τ-βοηθητικά (T-helper, $CD4^+$, $CD8^-$) τα οποία ενορχηστρώνουν την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού. Τα Τ-βοηθητικά διακρίνονται επιμέρους σε Τ-βοηθητικά-1 (T_H1), «Τ-λεμφοκύτταρα φλεγμονής» τα οποία ενεργοποιούν τα μακροφάγα και τα Τ-βοηθητικά-2 (T_H2), «Τ-λεμφοκύτταρα βοηθούς» τα οποία βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να αναπτύξουν αντισώματα κατά πρωτεϊνικών αντιγόνων (1,3,6). Χαρακτηριστικά μόρια επιφανείας των Τ-λεμφοκυττάρων είναι ο Τ-κυτταρικός υποδοχέας (TCR, T-Cellular Receptor) συνδεδεμένος με το μόριο CD3, καθώς και τα CD4 και CD8.

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) είναι μεγάλα λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικά κυτταροπλασματικά κοκκία, αποικίζουν τον σπλήνα και τους λεμφαδένες ενώ βρίσκονται και στο αίμα, λέγονται και μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα. Φυλογενετικά θεωρούνται αρχέγονα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, αν και δεν έχουν Τ-κυτταρικό υποδοχέα για την αναγνώριση αντιγόνου. Συνθέτουν τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-Tumor Necrosis Factor), και την ιντερφερόνη-γ (IFN-γ, Interferon-γ). Ενεργοποιούνται από την INF-α, την INF-γ, τον TNF και την IL-2. Αν και τα NK κύτταρα θεωρήθηκαν τα κύρια κύτταρα της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης ενάντια στις λοιμώξεις και στους όγκους, δεν φάνηκε κάτι τέτοιο ιστολογικά. Αντίθετα, βρέθηκαν στις καταστροφικές επιθηλιακές βλάβες που σχετίζονται με την αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή (1). Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στο ρόλο των ενεργοποιημένων NK κυττάρων από την IL-2. Σε αυτή την περίπτωση τα NK κύτταρα ονομάζονται ως ενεργοποιημένα από λεμφοκίνες φονείς κύτταρα (LAK, lymphokine-activated killer cells). Τα LAK κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη ικανότητα να λύουν άλλα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου και των

καρκινικών (3). Χαρακτηριστικά μόρια επιφανείας των NK κυττάρων είναι το CD16 και CD56. Εκφράζουν επίσης το μόριο CD2 και έναν υποδοχέα χαμηλής συγγένειας για το Fc τμήμα των IgG ανοσοσφαιρινών που ονομάζεται και FCRIII ή CD16 καθώς και την υπομονάδα $\rho 70$, αλλά όχι την $\rho 55$ του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (IL-2). (Εικόνα-1.3)



ΕΙΚΟΝΑ-1.2 Μονοκύτταρο (Μ), λεμφοκύτταρο (Λ) και ουδετερόφιλο πολυμορφοπύρρηνο (ΟΠ) σε περιφερικό αίμα. Απόδοση στα ελληνικά (6).



ΕΙΚΟΝΑ-1.3 NK κύτταρα συνδεδεμένα με κύτταρο στόχο, K562 καρκινικό κύτταρο της ερυθρολευχαιμικής σειράς. Απόδοση στα ελληνικά (6).

1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ανοσολογική απάντηση διακρίνεται στην μη ειδική (ή φυσική) και στην ειδική. Η φυσική και η ειδική ανοσία σε συνεργασία με όλες τις δομές και λειτουργίες του οργανισμού εξασφαλίζουν στον οργανισμό τη βιωσιμότητα απέναντι σε εσωτερικά και εξωτερικά βλαπτικά ερεθίσματα

Η φυσική ανοσία υπάρχει εκ γενετής και αναπτύσσεται αμέσως μετά το αρχικό ερέθισμα. Οι φορείς της φυσικής ανοσίας δεν διακρίνουν το ξένο από το ίδιο αλλά αντιλαμβάνονται τις διαφορές που επιφέρει η παρουσία του ξένου αντιγόνου στον οργανισμό (1). Ακριβώς για το λόγο αυτό αντιδρούν με τρόπο άμεσο και μη ειδικό. Φορείς της φυσικής ανοσίας αποτελούν τα φυσικά και χημικά φράγματα του οργανισμού όπως το δέρμα, το βλεννώδες επιθήλιο και οι αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται όπως η λυσοζύμη, πρωτεΐνες του αίματος στις οποίες

συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος καθώς και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής, τα φαγοκύτταρα (όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα) και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK).

Η ειδική ανοσία αποτελεί πολύ πιο εξελιγμένο μηχανισμό άμυνας του οργανισμού σε σχέση με την φυσική ανοσία. Η ειδική ανοσία «ωριμάζει» μετά την επαφή με το αντιγόνο και συνεπώς εξελίσσεται μετά την γέννηση (1). Αναπτύσσεται βραδέως (διαφορά φάσης ημερών ή εβδομάδων), μετά το αρχικό ερέθισμα (1). Στο διάστημα αυτό, μέχρι την εκδήλωση της ειδικής ανοσίας, η φυσική ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό του βλαπτικού ερεθίσματος. Η ειδική ανοσία διακρίνεται στην χυμική η οποία επιτελείται από τα αντισώματα, τα οποία παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα, και στην κυτταρική η οποία πραγματοποιείται με την μεσολάβηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ειδικής ανοσίας είναι η ικανότητα να αναγνωρίζεται το «ξένο» από το «ίδιο» (ανεκτικότητα, tolerance), η σαφής διάκριση μεταξύ δύο «ξένων» ερεθισμάτων με τρόπο ακριβή και ειδικό, η ικανότητα ανάπτυξης μνήμης (ανοσολογική μνήμη) μέσω κυττάρων μνήμης (Τ,Β-λεμφοκύτταρα μνήμης) τα οποία όταν έρθουν ξανά σε επαφή με το ίδιο αντιγόνο ανταποκρίνονται πολύ πιο γρήγορα και αποτελεσματικά, η ικανότητα περιορισμού της ανοσολογικής απάντησης καθώς η ειδική ανοσία δρα προκειμένου να εξαλειφθεί το αρχικό ερέθισμα, δηλαδή το αντιγόνο, και μετά φθίνει. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι στην ειδική ανοσία, η ανοσολογική απάντηση είναι ειδική για διαφορετικά αντιγόνα, και στην πραγματικότητα, ειδική για συγκεκριμένα δομικά συνθετικά (π.χ. μία σύνθετη πρωτεΐνη ή ένας πολυσακχαρίτης) του μορίου του αντιγόνου. Αυτά τα δομικά συνθετικά ονομάζονται αντιγονικοί καθοριστές ή επίτοποι και είναι υπεύθυνα για την ειδική αλληλεπίδραση του αντιγόνου με τους υποδοχείς των αντιγόνων. Υπολογίζεται ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών μπορεί να διακρίνει τουλάχιστον 10^9 διαφορετικούς αντιγονικούς καθοριστές (3). Η ειδική ανοσία μπορεί να είναι με την μορφή της ενεργούς ανοσίας, η οποία δημιουργείται με την φυσιολογική απόκριση του οργανισμού όταν εκτεθεί σε ξένα αντιγόνα και με την μορφή της παθητικής ανοσίας, κατά την οποία το άτομο ανοσοποιείται κατά ενός αντιγόνου χωρίς να έχει προηγουμένως εκτεθεί σε αυτό (π.χ. μέσω εμβολιασμού).

Τα δύο είδη ανοσίας, φυσική και ειδική, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Συνήθως οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας προετοιμάζουν τις συνθήκες για την ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας όταν παραμένει το αίτιο που προκαλεί την

ανοσολογική απόκριση, ενώ με τη σειρά της η ειδική ανοσία διευκολύνει τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας απέναντι στο βλαπτικό ερέθισμα (1).

Το ανοσολογικό σύστημα είναι αυστηρά εξατομικευμένο για κάθε άτομο και αυτό πετυχαίνεται μέσω της γενετικής ποικιλομορφίας ορισμένων μορίων, τα οποία εκφράζονται στις επιφάνειες των εμπύρηνων κυττάρων του οργανισμού (1). Τα μόρια αυτά αναγνωρίζουν το «ίδιο» από το «ξένο» αντιγόνο. Χαρακτηριστικό είναι στις περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων όπου η αναγνώριση των «ξένων» αντιγόνων από τα λεμφοκύτταρα του λήπτη συχνά πυροδοτεί ανοσολογικές αποκρίσεις κατά του μοσχεύματος που έχει ως αποτέλεσμα την απόρριψη του μοσχεύματος (1). Τα υπεύθυνα αντιγόνα του μοσχεύματος που αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα του λήπτη, ονομάστηκαν αντιγόνα ιστοσυμβατότητας γιατί έδιναν το μέτρο της συμβατότητας μεταξύ του δότη και του λήπτη (1). Τα αντιγόνα αυτά καλούνται σήμερα «αντιγόνα των ανθρώπινων λευκοκυττάρων» (HLA, Human Leukocyte Antigens). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα HLA και των δύο ομάδων εντοπίζονται στον άνθρωπο στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και συνιστούν το Μέγιστο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας ή Μείζονα Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC, Major Histocompatibility Complex). Το ανθρώπινο MHC είναι πολύ μεγάλο, αποτελείται από 3500 kb περίπου, και οργανώνεται ως εξής: (I) τάξεως I γονίδια (HLA-I ή MHC-I) με τρεις καλύτερα κατανοητές περιοχές A, B, C οι οποίες κωδικοποιούν τα HLA-A, HLA-B, HLA-C αντίστοιχα, (II) τάξεως II γονίδια (HLA-II ή MHC-II) με τρεις περιοχές DP, DQ, DR κωδικοποιώντας αντίστοιχα τα μόρια HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, (III) γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του συμπληρώματος (C2, C4a, C4b) καθώς και το ένζυμο 21-υδροξυλάση των στεροϊδών και (IV) γονίδια που κωδικοποιούν τις θερμοεπαγώμενες πρωτεΐνες (heat shock proteins), και τις κυτταροκίνες, παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF, Tumor Necrosis Factor), λυμφοτοξίνη (LT, Lymphotoxin) και β-λυμφοτοξίνη (LT-β) (3). Τα μόρια HLA είναι εξαιρετικά πολυμορφικά, υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 150 αλληλόμορφα για κάθε γονίδιο (3).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο αριθμός των κυττάρων σε ένα όργανο καθορίζεται από το ρυθμό κυτταρικής μετανάστευσης, κυτταρικής διαίρεσης και κυτταρικού θανάτου (7). Το φαινόμενο του φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου έχει ανακαλυφθεί εδώ και 150 χρόνια (8,9,10). Εντούτοις, η σπουδαιότητά του επισημάνθηκε κυρίως όταν έγινε φανερό ότι ο φυσιολογικός κυτταρικός θάνατος στους πολκύτταρους οργανισμούς υπόκειται σε γενετικό έλεγχο. Με τον όρο απόπτωση εννοούμε τον προγραμματισμένο κυτταρικό ή φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο που ελέγχεται γονιδιακά και ο οποίος αποτελεί εξελεκτικά συντηρημένη ιδιότητα όλων των μετázων (11). Ο μηχανισμός της απόπτωσης συμβάλλει στην ομοιοστασία του οργανισμού, μέσω της καταστροφής υπεράριθμων κυττάρων, της απομάκρυνσης κυττάρων που δεν χρειάζονται λόγω προγραμματισμένης αναδόμησης των ιστών όπως κατά την εμβρυογέννεση και της εξουδετέρωσης κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες όπως από ιοντίζουσες ακτινοβολίες και χημειοθεραπεία. Μη φυσιολογική λειτουργία του μηχανισμού της απόπτωσης έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε ανωμαλίες κατά την εμβρυογέννεση και στη εμφάνιση χρονίων εκφυλιστικών νοσημάτων. Αυξημένη απόπτωση συνδέεται με τον εκφυλισμό των νευρικών κυττάρων και την εμφάνιση της νόσου Alzheimer, καθώς και με την ανάπτυξη αρτηριοσκλήρυνσης ενώ μειωμένη απόπτωση συνδέεται με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων και την ανάπτυξη καρκίνου (12,13,14). Η νέκρωση, αποτελεί μορφή κυτταρικού θανάτου με τη διαφορά ότι δεν είναι φυσιολογικός κυτταρικός θάνατος. Οφείλεται σε καταστάσεις που αντιτίθενται στην ύπαρξη ζωής, όπως στην υποξεία, στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών και γενικά σε μη ανεκτές για τον οργανισμό συνθήκες π.χ. θερμοκρασία και pH μη φυσιολογικά (14).

2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Μέσω αναλύσεων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν αναγνωριστεί οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά την απόπτωση. Η μείωση του κυτταρικού όγκου, συνέπεια της συρρίκνωσης του κυτταροπλάσματος λόγω της απώλειας κυτταροσκελετικών στοιχείων όπως των μικροϊνιδίων που περιέχουν ακτίνη, η συμπύκνωση της χρωματίνης που οφείλεται στην απώλεια της λαμίνης (ένα συστατικό που αποτελεί δομικό σκελετό για την χρωματίνη), το θρυμματισμα του πυρήνα, τα άθικτα λυσοσώματα, και η δημιουργία των αποπτωτικών σωμάτων,

τα οποία αποτελούνται από κυτταρική μεμβράνη και αντιπροσωπεύουν κυτταρικά κατάλοιπα που απομακρύνονται με τη φαγοκυττάρωση έτσι ώστε να μην προκαλείται στον οργανισμό φλεγμονώδη αντίδραση, συνιστούν κύρια χαρακτηριστικά του μηχανισμού της απόπτωσης (9,14,15). Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει, ότι κατά την πρόωμη φάση έναρξης της απόπτωσης δεν παρατηρούνται ορατές αλλαγές στο μιτοχόνδριο, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi (16). Εντούτοις, πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρουν διόγκωση της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του παράγοντα που επάγει την απόπτωση (AIF, apoptosis inducing factor), μία φλαβοπρωτεΐνη που σχετίζεται με τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στο μιτοχόνδριο, από το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό διάστημα (17,18,19,20). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα που εξηγούν τις παραπάνω μορφολογικές αλλαγές, για τα οποία θα αναφερθούμε αργότερα. Μοριακά κατά την απόπτωση παρατηρείται, ενεργοποίηση γονιδίων, συγκεκριμένος τεμαχισμός του DNA που προκαλείται από ενδονουκλεάσες με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλαπλών τμημάτων DNA (πολλαπλά σπασίματα στο DNA) που αποτελούνται από 200 ζευγάρια βάσεων (και τα οποία φαίνονται με την μέθοδο DNA laddering), αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} (οφείλεται σε έναν βαθμό και στην απελευθέρωσή του από το μιτοχόνδριο), αύξηση της συγκέντρωσης της φωσφατιδυλοσερίνης (η οποία σημαίνει τα αποπτωτικά κυστίδια έτσι ώστε να είναι επιδεκτικά στην φαγοκυττάρωση) στην κυτταρική μεμβράνη και διατήρηση των αντλιών ιόντων (11,21,22). Αντίθετα, κατά την νέκρωση των κυττάρων, ο κυτταρικός όγκος αυξάνεται, η χρωματίνη θρυμματίζεται, τα λυσοσώματα όπως και τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν μορφολογικές αλλαγές, δεν έχουμε αποπτωτικά σωμάτια αλλά συμβαίνει λύση του κυττάρου και φλεγμονώδη απάντηση. Επιπλέον, δεν απαιτείται ενεργοποίηση γονιδίων, τα σπασίματα του DNA είναι τυχαία, τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{2+} δεν μεταβάλλονται και οι αντλίες ιόντων χάνονται (11).

Οι τεχνικές που συνήθως χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται στις παραπάνω παρατηρήσεις και είναι οι ακόλουθες:

- Η ενσωμάτωση τελικών μαρκαρισμένων νουκλεοτιδίων στα σημεία όπου υπάρχουν τα σπασίματα του DNA μέσω τρανσφεράσης των δεοξυνουκλεοτιδίων (TUNEL, terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling) (23).

- Η χρώση των αποπτωτικών κυττάρων με ανεξίνη-V λόγω της έκθεσης της φωσφατιδυλσερίνης στην κυτταρική μεμβράνη (Μέθοδος ανεξίνης-V) (24).
- Η χρώση με ειδικές (intercalating) χρωστικές του DNA για την ανίχνευση υποδιπλοειδούς DNA. Συχνά εφαρμόζεται χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και ανίχνευση με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, FACS, του υποδιπλοειδούς DNA (DNA ανάλυση με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής με τη τεχνική ιωδιούχου προπιδίου) (25).

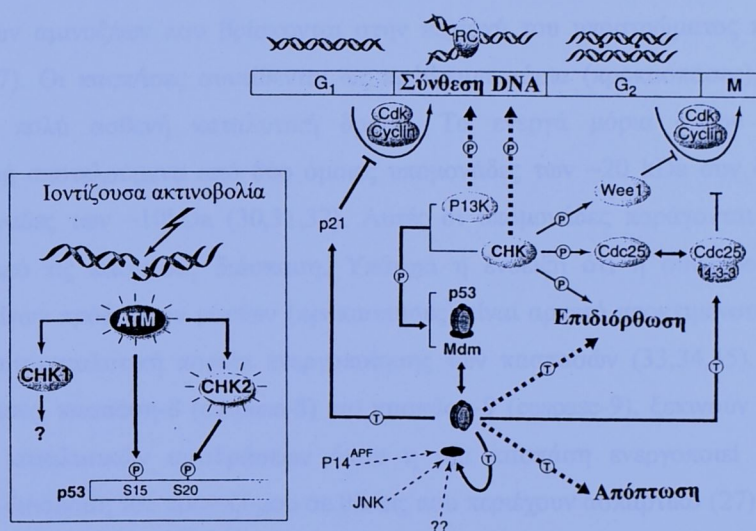
2.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ & ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Προκειμένου να αναπαραχθεί ένα κύτταρο, χρειάζεται να διπλασιαστεί το περιεχόμενό του και εν συνεχεία να χωριστεί σε δύο μέρη. Αυτή η διαδικασία, συνίσταται από μία ακολουθία γεγονότων την οποία διέρχεται ένα κύτταρο και καλείται κυτταρικός κύκλος. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει την μίτωση (M, Mitosis), το στάδιο όπου λαμβάνει χώρα η κυτταρική διαίρεση και στα περισσότερα κύτταρα διαρκεί συνήθως μία ώρα, την φάση G1 (first Gap), που μεσολαβεί μεταξύ της M και S φάσης, την φάση S (Synthesis), κατά την οποία συντίθενται το DNA και διάφορα μακρομόρια και την φάση G2 (second Gap), που μεσολαβεί μεταξύ της S και M φάσης. Στις φάσεις G1 και G2 συμβαίνει η ανάπτυξη και η οργάνωση του κυττάρου και ο έλεγχος του για ενδεχόμενες βλάβες, οι οποίες δυνητικά μπορεί να οδηγήσουν σε μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου. Η φάση G1 χαρακτηρίζεται χρονικά ως η πιο μεταβαλλόμενη, καθόσον η διάρκειά της αποτελεί το καθοριστικό παράγοντα στο υπολογισμό του χρόνου του κυτταρικού κύκλου. Σε κάποιες περιπτώσεις η φάση G1 συμπεριλαμβάνει και την φάση G₀ η οποία χαρακτηρίζει κύτταρα τα οποία έχουν εισέλθει σε κατάσταση ηρεμίας.

Στον κυτταρικό κύκλο υπάρχουν τρία κύρια σημεία ελέγχου όπου εντοπίζονται οι κυτταρικές βλάβες, στις φάσεις G1, G2 και S και εκδηλώνονται με δύο διαφορετικούς τρόπους (26). Στην πρώτη περίπτωση, μπλοκάρεται παροδικά ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G1 ή G2 ή S, έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη στο DNA πριν το κύτταρο προχωρήσει στην κυτταρική διαίρεση. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 δεν συμμετέχει στην πρώτη περίπτωση ενώ είναι απαραίτητη στη δεύτερη περίπτωση κατά την οποία το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση ή μπλοκάρεται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, πιθανόν και μόνιμα, στη φάση G1 όπου και απομακρύνεται (14). Αποτυχία του κυττάρου να μπλοκάρει τον κυτταρικό κύκλο ενώ υπάρχουν βλάβες στο DNA, οδηγεί σε αστάθεια του γενετικού υλικού

αυξάνοντας την πιθανότητα μετατροπής του σε καρκινικό (26). Στη φάση M ελέγχεται ο ορθός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων στα δύο θυγατρικά κύτταρα (14).

Η ικανοποιητική ανίχνευση βλαβών στο DNA, όπως σπασίματα στη διπλή αλυσίδα του DNA από ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή χημειοθεραπεία, χρειάζεται την πρωτεΐνη ATM (ataxia telangiectasia mutated gene). Η πρωτεΐνη ATM οφείλει το όνομά της σε μία σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια, την αταξία τελαγγιεκτασία, η οποία προκαλείται λόγω μετάλλαξης του γονιδίου που κωδικοποιεί την ATM. Η ATM δυνητικά μπορεί να ενεργοποιήσει σε περίπτωση βλάβης του DNA την p53 (2). Απώλεια της p53 δημιουργεί ένα περιβάλλον που είναι επιδεκτικό σε γενετική αστάθεια, δηλαδή ολόένα και περισσότερα κύτταρα με βλάβες στο DNA συσσωρεύονται στον οργανισμό με αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης νεοπλασιών (26). (Εικόνα-3.1)



ΕΙΚΟΝΑ-2.1 Σημεία ελέγχου του κυττάρου. Το σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA π.χ. από ιοντίζουσα ακτινοβολία ενεργοποιεί την κινάση CHK2, η οποία ενεργοποιεί το μόριο p53 και αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί διάφορα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Το παροδικό μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τα μόρια ATM και CHK2, ενώ είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητο από το p53. Η ενεργοποίηση του p53 από τα μόρια ATM και CHK2 οδηγεί σε παρατεταμένη και πιθανόν μόνιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου (μπλοκάρισμα στη φάση G1 ή απόπτωση). Επιπλέον, το μόριο p53 ενεργοποιεί γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA ή το παρατεταμένο μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 (όπως οι 14-3-3 πρωτεΐνες). Απόδοση στα ελληνικά (26).

2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Πρόσφατες έρευνες έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση τεσσάρων βασικών λειτουργικών ομάδων μορίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της απόπτωσης (16). Αυτές είναι, οι κασπάσες (caspases, cytosolic aspartate-specific cysteine proteases), οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες (adaptor proteins), η οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-R, Tumor Necrosis Factor- Receptor) και η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (16).

Οι κασπάσες αποτελούν μία ομάδα πρωτεασών, οι οποίες οφείλουν το όνομά τους στο γεγονός ότι χρειάζονται το αμινοξύ κυστεΐνη στη καταλυτική τους περιοχή. Αναγνωρίζουν μοτίβα τετραπεπτιδίων και διασπούν το υπόστρωμά τους στο καρβοξυτελικό άκρο του ασπαρτικού (16). Έχουν βρεθεί 14 κασπάσες στα θηλαστικά (27,28,29). Κάθε μία έχει διαφορετικό υπόστρωμα το οποίο καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων που βρίσκονται στην περιοχή του υποστρώματος που καταλύεται (27). Οι κασπάσες συντίθενται ως πρόδρομα μόρια (προκασπάσες), οι οποίες έχουν πολύ ασθενή καταλυτική δράση. Τα ενεργά μόρια δρουν ως ετεροτετραμερή αποτελούμενα από δύο όμοιες υπομονάδες των ~20 kDa συν δύο όμοιες υπομονάδες των ~10kDa (30,31,32). Αυτές οι υπομονάδες παράγονται με εξαρτώμενη από τις κασπάσες διάσπαση. Υπάρχει η ένδειξη ότι η συνάθροιση τουλάχιστον λίγων πρόδρομων μορίων (προκασπάσες) είναι αρκετό προκειμένου να αρχίσει μία αυτοκαταλυτική πορεία ενεργοποίησης των κασπασών (33,34,35). Οι αρχικές κασπάσες, κασπάση-8 (caspase-8) και κασπάση-9 (caspase-9), ξεκινούν μία χιονοστιβάδα καταλυτικών αντιδράσεων όπου η μία κασπάση ενεργοποιεί την επόμενη με τη διάσπαση του προενζύμου σε θέσεις που περιέχουν ασπαρτικό (27). Οι κασπάσες διασπούν και απενεργοποιούν ζωτικής σημασίας για το κύτταρο πρωτεΐνες, όπως ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, την πρωτεΐνη MDM2 η οποία αναστέλλει τη δράση της p53. Ειδικότερα, η κασπάση 1 διασπά την ακτίνη, η κασπάση 3 ενεργοποιεί την ενεργοποιούμενη από την p21 κινάση πρωτεϊνική κινάση 2 (kinase p21-activated protein kinase 2) η οποία δίνει το έναυσμα για την δημιουργία των αποπτωτικών σωμάτων (plasma membrane blebbing), η κασπάση 3 ενεργοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της κινητοποιεί την ενδονουκλεάση (DNAase), η κασπάση 6 διασπά την λαμινίνη στο πυρήνα (14,27,36).

Οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ των κασπασών, της οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-R)

και της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2 (16). Οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες συνδέονται με τις κασπάσες και την οικογένεια των TNF-R μέσω της αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων περιοχών που βρίσκονται στα μόρια τους. Οι περιοχές αυτές είναι τριών ειδών και καλούνται περιοχές θανάτου (DD, death domain), περιοχή εκτέλεσης θανάτου (DED, death effector domain) και περιοχή στρατολόγησης των κασπάσων (CARD, caspase recruitment domain) (37,38). Η περιοχή DD εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του μορίου CD95 που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και ανήκει στην οικογένεια των TNF-R, όπως επίσης βρίσκεται στα μόρια FADD/MORT1 (Fas-associating death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity), TRADD (TNF-R1-associated death domain protein) και RIP (receptor-interacting protein) που ανήκουν στις προσαρμοστικές πρωτεΐνες (16). Ομοτυπική σύνδεση μέσω των περιοχών DD μεταξύ μορίων που ανήκουν στις προσαρμοστικές πρωτεΐνες και μορίων που ανήκουν στην οικογένεια TNF-R πυροδοτεί την συνάθροιση και την ενεργοποίηση των κασπάσων, όπως της κασπάσης-8 (39,40,41,42). Δεν έχουν όμως όλα τα προσαρμοστικά μόρια τις περιοχές DED και DD. Το προσαρμοστικό μόριο Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1) περιέχει την περιοχή CARD. Με έναν όχι τόσο καλά διεκρινισμένο μηχανισμό τα αποπτωτικά ερεθίσματα που ελέγχονται από τα προαποπτωτικά μόρια της οικογένειας Bcl-2 οδηγούν στην κινητοποίηση της κασπάσης-9 μέσω του Apaf-1 (61).

Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-R) έχουν πλειοτροπική δράση (16). Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και τα μηνύματα που δέχεται το κύτταρο, οι υποδοχείς TNF-R μπορούν να πυροδοτήσουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την διαφοροποίηση ή των θάνατο του κυττάρου (37,43,44). Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται από μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των συνδετικών TNF μορίων (TNF ligand family). Τα περισσότερα από τα συνδετικά μόρια της TNF οικογένειας συντίθενται ως τριμερή συνδεδεμένα σε μεμβράνες και όπως προκύπτει απαιτείται ισχυρή σύνδεση μεταξύ αυτών των μορίων και των υποδοχέων TNF-R προκειμένου να μεταδοθεί το μήνυμα στο κύτταρο (45,46,47). Τα μόρια CD95 (Fas ή APO-1) και TNF-R1 όπως και κάποια άλλα μέλη αυτής της οικογένειας, περιέχουν την περιοχή θανάτου (DD) η οποία είναι απαραίτητη για την επαγωγή της απόπτωσης (48,49). Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας καλούνται συχνά και ως «υποδοχείς θανάτου».

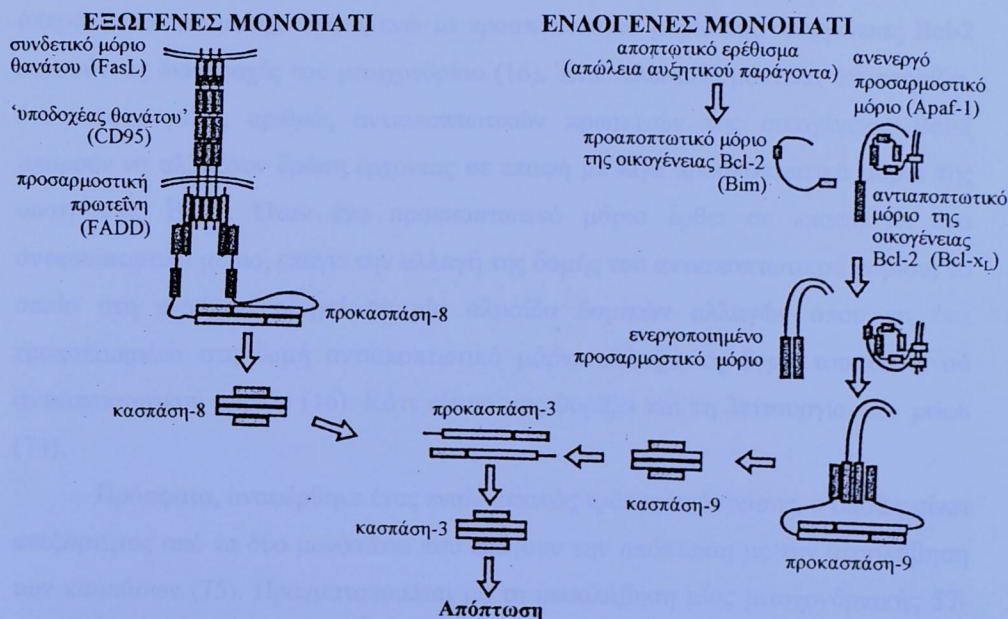
Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών αποτελείται από δομικά συσχετιζόμενες πρωτεΐνες οι οποίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις προαποπτωτικές και τις αντιαποπτωτικές. Οφείλουν το όνομά τους στην αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 η οποία ανακαλύφθηκε ως χρωμοσωμική μετάθεση στο θυλακοειδές B κυτταρικό λέμφωμα και η οποία βρέθηκε ότι συνέβαλλε στην ανάπτυξη του νεοπλασματος αναστέλλοντας την απόπτωση των B λεμφοκυττάρων (2,61). Μελέτες σε κυτταρικές σειρές και σε τρανσγονιδιακούς επιμύες έχουν δείξει ότι τα μονοπάτια της απόπτωσης που μπορεί να αναστέλλει η Bcl-2 μπορούν επίσης να αναστέλλουν οι Bcl-x_L, Bcl-w και η Mcl-1. Ομοίως, ερεθίσματα που οδηγούν σε απόπτωση και τα οποία δεν ενεργοποιούν την Bcl-2, δεν κινητοποιούν ούτε τα άλλα ομόλογα (αντιαποπτωτικά) μόρια (50-54). Στα προαποπτωτικά μόρια περιλαμβάνονται το Bad (55), Bax (56), Bcl-x_S (57), Bak (58-60), Bik/Nbk (62,63), Bid (64), Hrk/DP5 (65), Bim/Bod (66,67), Bok/Mtd (68) και το Blk (69). Τα προαποπτωτικά και τα αντιαποπτωτικά μόρια μπορούν φυσιολογικά να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (70), αλλά παραμένει προς το παρόν αδιευκρίνιστο εάν αυτές οι αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται με την μορφή διμερών ή είναι πιο πολύπλοκες.

2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι εντονότατο για το θέμα της απόπτωσης και μολοντί έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες γύρω από το θέμα αυτό, υπάρχουν πολλά που πρέπει να διευκρινιστούν, άλλωστε η βιολογία του κυττάρου κρύβει ακόμα καλά τα μυστικά της και μας επιφυλάσσει πολλές εκπλήξεις. Στην ανάλυσή μας θα δούμε ότι υπάρχουν αντίθετες απόψεις σε καίρια σημεία του μηχανισμού της απόπτωσης, εμείς οφείλουμε να αναφέρουμε όλες τις προτεινόμενες μέχρι σήμερα απόψεις και αφήνουμε την φύση να μας ξεναγήσει στα μονοπάτια της.

Μελέτες, έχουν δείξει ότι διαφορετικά ερεθίσματα που επάγουν την απόπτωση, ενεργοποιούν αντίστοιχα διαφορετικά μόρια κασπάσεων και ειδικά προσαρμοστικά μόρια. Στα θηλαστικά, έχουν παρατηρηθεί δύο ξεχωριστοί μηχανισμοί που επάγουν την απόπτωση. Ο πρώτος μηχανισμός, χαρακτηρίζεται ως ενδογενές μονοπάτι, έχει ως αφετηρία μηνύματα που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου, χρειάζεται το προσαρμοστικό μόριο Araf-1 και την κασπάση-9, ενώ ρυθμίζεται από την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (16). Στο ενδογενές μονοπάτι, το αρχικό ερέθισμα, όπως η βλάβη του DNA, προκαλεί την έξοδο του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο, το οποίο με τη σειρά του με συνδυασμό μορίων

(δεοξυ)τριφωσφορικής αδενοσίνης (dATP) ενώνεται με το μόριο Araf-1 τροποποιώντας τη δομή του (16). Το τροποποιημένο μόριο Araf-1 ενεργοποιεί την κασπάση-9 (16). Το σύμπλοκο κυτόχρωμα c, Araf-1, προκασπάση-9 καλείται αποπτόσωμα. Ο δεύτερος μηχανισμός, χαρακτηρίζεται ως εξωγενές μονοπάτι, ενεργοποιείται από μηνύματα που προέρχονται από το εξωτερικό του κυττάρου, κινητοποιείται μέσω του μορίου CD95 της οικογένειας TNF-R, χρειάζεται το προσαρμοστικό μόριο FADD και την κασπάση-8 και δεν μπορεί να μπλοκαριστεί από το μόριο Bcl-2 ή τα ομόλογά του (16). Εντούτοις, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο μονοπάτια που κινητοποιούνται από το μόριο CD95 και μπορεί να μπλοκάρονται ή όχι από το Bcl-2 (72). Μετά την ενεργοποίηση των αρχικών κασπάσεων, κασπάση-8 και κασπάση-9, η πορεία και για τα δύο μονοπάτια συνεχίζεται από κοινού με την κινητοποίηση της κασπάσης-3 και στη συνέχεια της κασπάσης-7 οδηγώντας το κύτταρο προς την απόπτωση (73). Η ενεργοποίηση των κασπάσεων μπορεί να μπλοκαριστεί από τα μόρια της οικογένειας IAP. Ειδικότερα, ένα από αυτά, το χιαρ, μπλοκάρει την ενεργοποίηση των κασπάσεων-9 και κασπάσεων-3. Τη δράση του ανταγωνίζεται ένα προαποτωτικό μιτοχondριακό μόριο το Smac/Diablo (72). (Εικόνα-2.2)



ΕΙΚΟΝΑ-2.2 Το εξωγενές μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω των υποδοχέων TNF-R, τα οποία έχουν στο μόριο τους την περιοχή θανάτου (DD), όπως το μόριο CD95. Το Ενδογενές μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί από απώλεια αυξητικών παραγόντων. Τα δύο μονοπάτια τελικά συγκλίνουν, με την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Απόδοση στα ελληνικά (16).

Παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστο πώς οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 μπλοκάρουν την ενεργοποίηση των κασπάσων μέσω των προσαρμοστικών μορίων όπως το Araf-1. Επιπλέον, χρειάζεται να διευκρινιστεί περαιτέρω πώς οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 ρυθμίζονται από τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (16). Προκειμένου να εξηγηθούν τα παραπάνω αναπτύχθηκαν κάποια μοντέλα τα οποία και τα παρουσιάζουμε. Υποστηρίζεται, ότι τα προαποπτωτικά μόρια της οικογένειας Bcl-2 μπλοκάρουν την ένωση των αντιαποπτωτικών Bcl-2 με τα προσαρμοστικά μόρια (όπως το Araf-1). Με αυτό τον τρόπο, επάγεται η απόπτωση μπλοκάροντας την δράση πρωτεϊνών που εμποδίζουν την ενεργοποίηση των κασπάσων (73). Ένα άλλο μοντέλο υποστηρίζει ότι οι προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 λειτουργούν ως διαμεμβρανικά κανάλια που επάγουν ή εμποδίζουν την δίοδο μορίων που ενεργοποιούν τις κασπάσες (16). Ένα τρίτο μοντέλο, προτείνει ότι όταν δράσει ένα αποπτωτικό ερέθισμα προκαλεί διαταραχές στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, οι οποίες οδηγούν σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπάσων. Ο λειτουργικός ρόλος των αντιαποπτωτικών μορίων της οικογένειας Bcl-2 είναι να διατηρούν την ακεραιότητα του μιτοχονδρίου, ενώ τα προαποπτωτικά μόρια της οικογένειας Bcl-2 ευνοούν τις διαταραχές του μιτοχονδρίου (16). Ένα τελευταίο μοντέλο υποστηρίζει, ότι ένας μεγάλος αριθμός αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να αλλάξουν δράση έρχοντας σε επαφή με λίγα προαποπτωτικά μόρια της οικογένειας Bcl-2. Όταν ένα προαποπτωτικό μόριο έρθει σε επαφή με ένα αντιαποπτωτικό μόριο, επάγει την αλλαγή της δομής του αντιαποπτωτικού μορίου, το οποίο στη συνέχεια οδηγεί σε μία αλυσίδα δομικών αλλαγών όπου το ένα τροποποιημένο στη δομή αντιαποπτωτικό μόριο αλλάζει τη δομή του διπλανού αντιαποπτωτικού μορίου (16). Κάτι τέτοιο μας θυμίζει και τη λειτουργία των prion (74).

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ένας εναλλακτικός τρόπος απόπτωσης, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τα δύο μονοπάτια που επάγουν την απόπτωση με την μεσολάβηση των κασπάσων (75). Πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μίας μιτοχονδριακής 57-kD φλαβοπρωτεΐνης, τον επαγόμενο την απόπτωση παράγοντα (AIF, apoptosis inducing factor), ο οποίος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των επιμύων (12). Γνωρίζοντας ότι η απόπτωση είναι απαραίτητος μηχανισμός για την εμβρυογένεση (14,76), πειράματα που έγιναν σε επιμύες με έλλειψη κασπάσων, έδειξαν ότι οι

παρατηρούμενες αναπτυξιακές δυσμορφίες περιορίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς, πιθανόν λόγω της ύπαρξης ανεξάρτητης των κασπάσεων απόπτωσης (77). Το μόριο AIF φυσιολογικά εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο (ενδιάμεσο χώρο). Σε αποπτωτικό ερέθισμα η απελευθέρωση του μορίου AIF από το μιτοχόνδριο οδηγεί είτε στην μετατόπισή του στον πυρήνα όπου επάγει την κλασμάτωση της χρωματίνης (σπάσιμο του DNA) με έναν αδιευκρίνιστο μέχρι τώρα μηχανισμό (12), είτε σε συγκεκριμένες περιπτώσεις συμβάλλει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω ενός άγνωστου κυτταροπλασματικού παράγοντα, μεσολαβώντας με αυτό τον τρόπο στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω του ενδογενούς μονοπατιού (78). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται περιφερικού τύπου συμπίκνωση της χρωματίνης (peripheral-type condensed chromatin) και εκτεταμένη αποδόμηση του DNA (large scale DNA degradation), ενώ στη δεύτερη περίπτωση υπάρχει προχωρημένου τύπου συμπίκνωση της χρωματίνης (advanced chromatin condensation) και αποδόμηση DNA σε ολιγονουκλεοτίδια (oligonucleosomal DNA degradation) (78). In vitro μελέτες έδειξαν ότι το μόριο AIF επάγει πολλά από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (78). Αν και υπάρχουν βιοχημικές ενδείξεις ότι το AIF μπορεί να πυροδοτήσει από μόνο του την απόπτωση, εντούτοις, δεν έχει ξεκαθαριστεί εάν αποτελεί ένα ξεχωριστό μονοπάτι της απόπτωσης in vivo, ή είναι ένας συμπληρωματικός παράγοντας στα εξαρτώμενα από τις κασπάσες μονοπάτια (12). Πάντως σε αντίθεση με τις κασπάσες, ομόλογα του μορίου AIF εντοπίζονται και στα τρία βασίλεια των μετώων (ζώα, φυτά, μύκητες), προτείνοντας ότι πιθανόν να αποτελεί έναν από τους πιο παλιούς παράγοντες που επάγουν την απόπτωση (79).

Από την έως τώρα ανάλυση των μηχανισμών της απόπτωσης, φαίνεται ότι το μιτοχόνδριο διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί δύο «σχολές» σχετικά με το ρόλο του μιτοχονδρίου στον μηχανισμό της απόπτωσης (13). Η πρώτη «σχολή», υποστηρίζει ότι στο μιτοχόνδριο λαμβάνεται η τελική απόφαση για το αν το κύτταρο θα προχωρήσει ή όχι στην απόπτωση αναγνωρίζοντας στο μιτοχόνδριο τον πρωταρχικό ρόλο, ενώ η δεύτερη «σχολή», πιστεύει ότι τα πρωταρχικά σήματα της απόπτωσης κατευθύνονται πρώτα στις κασπάσες και στη συνέχεια στοχεύουν στο μιτοχόνδριο, προσδίδοντας στο μιτοχόνδριο έναν δευτερόντα ρόλο (13). Η πρώτη «σχολή», υποστηρίζει ότι από το μιτοχόνδριο απελευθερώνονται προαποπτωτικά μόρια, όπως το κυτόχρωμα c, το μόριο AIF, το μόριο Smac/Diablo τα οποία ενεργοποιούν τις κασπάσες. Επιπλέον,

ακόμα και το εξωγενές μονοπάτι μέσω του υποδοχέα CD95, το οποίο θεωρούνταν ότι χρειάζονταν μόνο την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, έχει φανεί ότι χρειάζεται και τη βοήθεια του μιτοχονδρίου (13). Ακόμα, και το μόριο p53 πιστεύεται ότι κατευθύνεται στο μιτοχόνδριο όπου μπορεί να πυροδοτήσει πιο άμεσα την απόπτωση (13). Η δεύτερη «σχολή», υποστηρίζει ότι η απόπτωση μπορεί να πυροδοτηθεί χωρίς την ανάμειξη του μιτοχονδρίου. Ερευνητές από την ιατρική σχολή του Harvard στη Βοστώνη έδειξαν ότι όταν το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου είναι σε κατάσταση stress, ενεργοποιεί την κασπάση-12 η οποία πυροδοτεί την απόπτωση χωρίς εμπλοκή του μιτοχονδρίου (13). Υπάρχουν πάντως ακόμα πολλά που πρέπει να διασαφηνιστούν αφήνοντας και στις δύο ομάδες περιθώρια αισιοδοξίας.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης και της νέκρωσης δεν περιγράφουν πλήρως όλα τα είδη κυτταρικών θανάτων που παρατηρούμε (80). Παραδείγματα που δεν καλύπτονται από τα «κριτήρια» της απόπτωσης και της νέκρωσης είναι: (i) συγκεκριμένα είδη κυτταρικών θανάτων όπως η αυτοφαγία (81-85) και ο κυτταροπλασματικός κυτταρικός θάνατος (82,84,86-89), (ii) μερικά είδη νευροεκφυλιστικών κυτταρικών θανάτων, όπως στην αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (amyotrophical lateral sclerosis) που παρατηρείται σε τρανσγονιδιακά μοντέλα επιμύων (90) και (iii) σε κάποιες ισχαμικά συσχετιζόμενους θανάτους όπου παρατηρείται διόγκωση του κυττάρου, η επονομαζόμενη ως όγκωση (oncosis) (91). Η βιοχημική βάση των παραπάνω εναλλακτικών μορφών κυτταρικού θανάτου είναι άγνωστη (80). Εδώ θα περιγράψουμε ένα είδος μη αποπτωτικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που καλείται παράπτωση και ο οποίος δεν καλύπτει τα «κριτήρια» του αποπτωτικού θανάτου. Το είδος αυτό θανάτου είναι προγραμματισμένο επειδή απαιτεί γονιδιακή έκφραση (80). Η παράπτωση δεν μπλοκάρει από το αντιαποπτωτικό μόριο Bcl-x_L, ούτε από αναστολείς κασπάσεων, είναι ανεξάρτητη από το μόριο Araf-1, όμως καταστέλλεται όταν το ζυμογόνο της κασπάσης-9 (προκασπάση) έχει υποστεί σημαντική μετάλλαξη (80). Φαίνεται λοιπόν ότι η κασπάση-9 μπορεί να έχει δύο τουλάχιστον δράσεις, μία προαποπτωτική επάγοντας το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης και μία μη αποπτωτική επάγοντας την παράπτωση (80). (Πίνακας-2.1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 Σύγκριση χαρακτηριστικών σημείων απόπτωσης, νέκρωσης και παράπτωσης. p35: αναστέλλει τη δράση των κασπάσων, χiap: μπλοκάρει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και κασπάσης-3, Bcl-x_L: αντιαποπτωτικό μόριο της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2.(8)

	Απόπτωση	Νέκρωση	Παράπτωση
Μορφολογικά			
Κλασμάτωση του πυρήνα	+	-	-
Συμπύκνωση χρωματίνης	+	-	+/-
Αποπτωτικά σωμάτια	+	-	-
Σχηματισμός κυτταροπλασματικών κενοτοπίων	-	+	+
Διόγκωση μιτοχονδρίου	μερικές φορές	+	όψιμα
Ενεργοποίηση κασπάσων			
Κασπάση-3	+	-	-
Αναστολή από:			
p35	+	-	-
χiap	+	-	-
Bcl-x _L	+	συνήθως/-	-

2.6 Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ& ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι απαραίτητος για την φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού. Παρακάτω αναφέρουμε κάποιες ενδεικτικές περιπτώσεις (σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο) όπου φαίνεται η σπουδαιότητα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στην ομοιοστασία ενός πολυκύτταρου οργανισμού.

Έλλειψη αυξητικών παραγόντων ή κυτταρικής προσκόλλησης επάγει φυσιολογικά τον κυτταρικό θάνατο (92). Αυτό το είδος κυτταρικού θανάτου συχνά καλείται θάνατος από «παραμερισμό» (death by neglect) και μπορεί, σε κάποιες περιπτώσεις, να μπλοκαριστεί από τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (93). Επιμύες που έχουν έλλειψη στο μόριο Bcl-2 ή Bcl-x_L εκδηλώνουν συγκεκριμένες δυσμορφίες κατά την οργανογένεση (94,95). Ο θάνατος από «παραμερισμό» μας παραπέμπει στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Στον νευρικό ιστό, ο θάνατος από «παραμερισμό» ρυθμίζεται από την οικογένεια των μορίων Bcl-2, και χρειάζεται τον παράγοντα Araf-1, την κασπάση-9 και την κασπάση-3 (96-99,100,101). Η μετάδοση αποπτωτικών σημάτων προάγει στο κύτταρο τον θάνατο από «σχεδιασμό» (death by design), ο οποίος υποστηρίζεται ότι επάγεται με τη μεσολάβηση των «υποδοχέων θανάτου» (102). Ο θάνατος από «σχεδιασμό» μας παραπέμπει στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης. Ανωμαλίες στο

προσαρμοστικό μόριο FADD ή στην κασπάση-8 οδηγούν σε καρδιακές ανωμαλίες και πρόωρο εμβρυικό θάνατο σε επιμύες (103,104).

Μειωμένη λειτουργία του μηχανισμού της απόπτωσης συνδέεται με καρκινογέννεση. Οι βλάβες σε ένα κύτταρο συνεχώς συσσωρεύονται, επάγεται γενετική αστάθεια και το κύτταρο γίνεται νεοπλασματικό (13). Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς που μπλοκάρουν την απόπτωση. Παραδείγματα τέτοιων μηχανισμών είναι η υπερέκφραση της Bcl-2 και των προαποπτωτικών ομολόγων της, η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού μορίου p53 και η αυξημένη έκφραση των μορίων IAP (όπως της survivin) (105-107). Οι αντικαρκινικές θεραπείες (χημειοθεραπεία, ακτινοβολία-γ) στοχεύουν στην επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία ρυθμίζουν την απόπτωση, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας. Υπερέκφραση της Bcl-2 και άλλων αντιαποπτωτικών ομολόγων, ή καταστολή της δράσης της Bax και άλλων προαποπτωτικών ομολόγων προσδίδει αυξημένη ικανότητα επιβίωσης στα καρκινικά κύτταρα (108,109). Συνεπώς, η απάντηση ενός καρκινικού κυττάρου στην θεραπεία εξαρτάται από την «ροπή» που έχει το καρκινικό κύτταρο να προχωρήσει σε αποπτωτικό θάνατο και την ευαισθησία του στο αποπτωτικό ερέθισμα (16).

Μειωμένη λειτουργία του μηχανισμού της απόπτωσης δεν σχετίζεται μόνο με την καρκινογέννεση αλλά και με αυτοάνοσα νοσήματα (16). Το ανοσοποιητικό σύστημα χαρακτηρίζεται από όσο το δυνατόν πιο γρήγορο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων σε απάντηση στο λοιμογόνο ερέθισμα και άμεσο αποπτωτικό θάνατο των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων όταν έχει εξουδετερωθεί το παθογόνο ερέθισμα (93, 110,111). Παρατεταμένη επιβίωση ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων, εκθέτουν τον οργανισμό σε μόρια που είναι δυνητικά τοξικά (16). Υπερέκφραση του Bcl-2 ή έλλειψη του προαποπτωτικού μορίου Bim σε B-λεμφοκύτταρα σε τρανσγονοδιακούς επιμύες, οδηγεί σε παρατεταμένη χυμική ανοσολογική απάντηση και παθολογική αύξηση πλασματοκυττάρων τα οποία μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε συστηματικό ερυθριματώδη λύκο (112-115). Η ανακάλυψη ότι μεταλλάξεις στο μόριο CD95 μπορεί να προκαλέσει λεμφαδενοπάθεια και αυτοανοσία σε επιμύες (116-119) και στον άνθρωπο (120, 121) παρέχουν επιπλέον στοιχεία ότι η φυσιολογική διάρκεια ζωής των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων παρέχει προστασία απέναντι σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Η απόπτωση αποτελεί επιπλέον ένα αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού απέναντι σε ιούς και παθογόνα που ενδοκυτταρώνονται (16). Τα κύτταρα μπορούν να πυροδοτήσουν τον μηχανισμό της απόπτωσης όταν αντιληφθούν μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από προσβολή από ιούς (16). Εντούτοις, υπάρχουν παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης στο κύτταρο ξενιστή μέσω αντιαποπτωτικών μορίων, όπως του μορίου p35 το οποίο αναστέλλει τη δράση των κασπάσων (122, 123,124).

Ο μηχανισμός της απόπτωσης φαίνεται να εμπλέκεται και στην αθηρογένεση. Θα αναφερθούμε αναλυτικά στην αμέσως επόμενη ενότητα για αυτό το θέμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ & ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

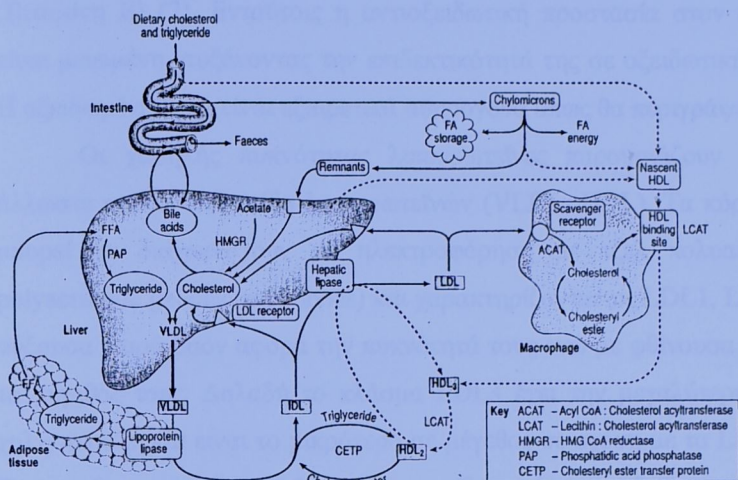
Ολοένα και περισσότερα δεδομένα υπάρχουν στην βιβλιογραφία, τα οποία δείχνουν ότι η οξειδωτικά τροποποιημένες χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (ox-LDL) μπορεί να μεταβάλλουν τις κυτταρικές λειτουργίες επάγωντας την κυτταροτοξικότητα (125,126). Αναγνωρισμένοι στόχοι της οξειδωμένης LDL είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα μονοπύρηνια λευκοκύτταρα (127-129). Το οξειδωτικό stress και η επαγόμενη μεταβολή της κυτταρικής ομοιόστασης είναι δυνατόν να οδηγήσουν αυτά τα κύτταρα σε απόπτωση (126,130). Μελέτες δείχνουν ότι η ικανότητα της ox-LDL να τροποποιεί την λειτουργία κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την παθολογία της αθηροσκλήρυνσης και του συνδρόμου της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας στον άνθρωπο (AIDS) (131-133).

3.2 ΔΟΜΗ & ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ LDL

Η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL, low density lipoprotein) συνίσταται από ένα σφαιρικό σωματίδιο το οποίο έχει διάμετρο περίπου 22 nm (134). Το μέσο LDL σωματίδιο αποτελείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα περίπου 1500 μορίων εστεροποιημένης χοληστερόλης περιβαλλόμενο από φωσφολιπίδια και μία πρωτεΐνη 513-kDa αποκαλούμενη ως απολιποπρωτεΐνη apoB-100 (135). Το μόριο της apo-B100 είναι ενωμένο μέσω δισουλφιδικού δεσμού με την γλυκοπρωτεΐνη apo (a).

Οι LDL προκύπτουν από την προοδευτική «αποδόμηση» των μεγαλύτερων σωματιδίων VLDL (very low density lipoprotein, μέση περίμετρο 55 nm). Τα VLDL εκκρίνονται από το ήπαρ και ο υδρόφοβος πυρήνας τους είναι πλούσιος σε τριγλυκερίδια. Κατά την διαδρομή τους στο αίμα οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια VLDL ανταλλάσσουν τριγλυκερίδια με εστεροποιημένη χοληστερόλη από τις HDL (high density lipoprotein), μέσω του ενζύμου CETP (cholesterol ester transfer protein). Παράλληλα, μεταφέρουν τριγλυκερίδια στον μυϊκό και στο λιπώδη ιστό με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL, lipoprotein lipase), μετατρέπόμενα με αυτό τον τρόπο σε κατάλοιπα VLDL. Τα κατάλοιπα VLDL είναι μικρότερα, περιέχουν περισσότερη χοληστερόλη από τις VLDL και έχουν την apoE. Ένα μέρος των καταλοίπων VLDL απομακρύνονται από την κυκλοφορία με τη σύνδεση του apoE με τον υποδοχέα apoB100/E της LDL (LDLR, LDL receptor) στα ηπατικά κύτταρα. Το υπόλοιπο μέρος υδρολύεται από την ηπατική λιπάση (HL, hepatic lipase) και μετατρέπεται σε IDL (intermediate density lipoprotein). Στις IDL υδρολύονται

περαιτέρω τα τριγλυκερίδια. Το αποτέλεσμα είναι να μειωθούν σε μέγεθος, ο υδρόφοβος πυρήνας τους να αποτελείται κυρίως από εστεροποιημένη χοληστερόλη και να αποδεσμεύσουν όλες τις απολιποπρωτεΐνες εκτός από την apoB-100, παράγοντας πλέον την λιποπρωτεΐνη LDL (135). (Εικόνα-3.1)



ΕΙΚΟΝΑ-3.1 Μεταβολισμός λιποπρωτεϊνών. Κατά την απορρόφηση της τροφής, το διαιτητικό λίπος σχηματίζει στο εντεροκύτταρο τα μεγάλα και πλούσια σε τριγλυκερίδια χυλομικρά (Chylomicrons). Η λιπόλυση, μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (Lipoprotein lipase) μειώνει το μέγεθος του πλούσιου σε τριγλυκερίδια πυρήνα, αφήνοντας πλεονάζων 'υλικό' στην επιφάνεια, το οποίο μεταφέρεται στην υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL), με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε κατάλοιπα (Remnants) τα οποία δεσμεύονται από το ήπαρ. Σε κατάσταση νηστείας, εκκρίνονται οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) (αντικαθιστώντας τα χυλομικρά) οι οποίες αποτελούν τους κύριους μεταφορείς τριγλυκεριδίων στους ιστούς. Η αποικοδόμησή τους, μέσω της λιπόλυσης οδηγεί σταδιακά στην μετατροπή τους σε ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL) και τελικά σε χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL). Οι LDL απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω υποδοχέων στο ήπαρ (LDL receptor) και σε περιφερικούς ιστούς. Μεγάλη συκέντρωση της LDL στο πλάσμα οδηγεί στην απομάκρυνσή της από τους καθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων (Scavenger receptor) Οι HDL απομακρύνουν τη χοληστερόλη από την περιφέρεια και την μεταφέρουν στο ήπαρ. (2)

Οι LDL κυκλοφορούν στο ανθρώπινο πλάσμα με μέσο όρο ζωής 2,5 ημέρες (134). Απομακρύνονται από την κυκλοφορία με τη σύνδεση των apoB-100/E με τον υποδοχέα της LDL στα ηπατικά κύτταρα (134). Όταν η πρόσληψη χοληστερόλης με την τροφή είναι αυξημένη ή όταν υπάρχει κάποιο γενετικής αιτιολογίας πρόβλημα στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης όπως στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH, familiar hypercholesterolemia) όπου ο υποδοχέας της LDL δυσλειτουργεί (136), τότε η κάθαρση της LDL καθυστερεί και αυξάνεται η

πιθανότητα η LDL να διαπεράσει το ενδοθήλιο. Στο πλάσμα η LDL προστατεύεται σχετικά από την οξείδωση μέσω των αντιοξειδωτικών του πλάσματος όπως της βιταμίνης C, της βιταμίνης E και του β-καροτένιου καθώς και από τα αντιοξειδωτικά μόρια που είναι ενσωματωμένα στο σωματίδιό της όπως είναι η α-τοκοφερόλη (Βιταμίνη E) (2). Εντούτοις η αντιοξειδωτική προστασία στον εξωκυττάριο χώρο είναι μειωμένη, αυξάνοντας την επιδεκτικότητά της σε οξειδωτική τροποποίηση (2). Η οξειδωμένη LDL είναι εξαιρετικά αθηρογόνα όπως θα περιγράψουμε παρακάτω.

Οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες παρουσιάζουν ετερογένεια όπως άλλωστε και τα άλλα είδη λιποπρωτεϊνών (VLDL, HDL). Τα κύρια κλάσματα LDL μπορεί να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση με τζελ πολυακριμιδίου (PAGE, polyacrimide gel electrophoresis) και χαρακτηρίζονται ως LDL1, LDL2 και LDL3, με αύξουσα σειρά όσον αφορά την πυκνότητά τους ενώ με φθίνουσα σειρά όσον αφορά το μέγεθός τους. Δηλαδή το κλάσμα LDL3 έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε χοληστερόλη και είναι το μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με τα LDL1 και LDL2 (2). Τα μικρά και πυκνά LDL3 είναι πιο επιδεκτικά στην οξείδωση, έχουν χαμηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα LDL (LDLR, LDL receptor) και διαπερνούν πιο εύκολα το ενδοθήλιο σε σχέση με τα μεγαλύτερα LDL (2).

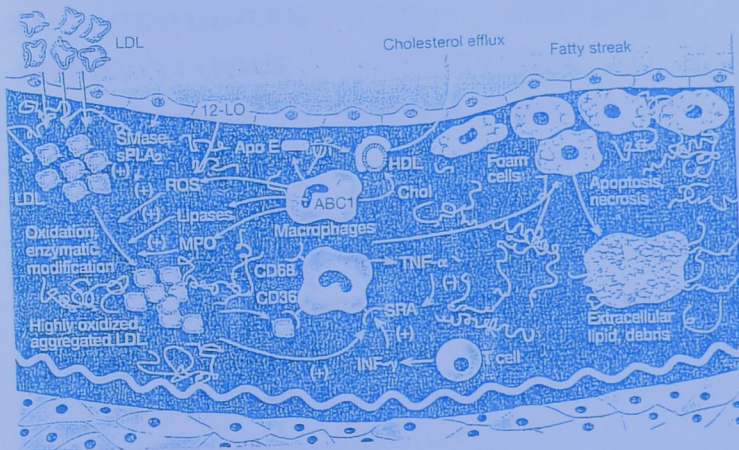
3.3 ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL & ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

Η αθηρογένεση αποτελεί μία ασθένεια των μεγάλων αρτηριών και είναι η κύρια υπεύθυνη για νοσήματα της καρδιάς και για το έμφραγμα (137). Αποτελεί την υποκείμενη αιτία για το 50% περίπου των θανάτων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει αρκετούς παράγοντες που προδιαθέτουν στην αθηρογένεση. Είναι πλέον φανερό, ότι η αθηρογένεση δεν είναι απλά μία αναπόφευκτη εκφυλιστική νόσος ως αποτέλεσμα της γήρανσης, αλλά κυρίως μία χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε οξύ κλινικό επεισόδιο με τη ρήξη πλάκας και την θρόμβωση (137). Η παρουσία ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στην αθηρωματική πλάκα, δείχνουν εμπλοκή του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης (138). Η φύση του αντιγόνου που προκαλεί αυτή την ενεργοποίηση δεν έχει διελευκανθεί, αν και πολλά στοιχεία ενοχοποιούν την oxLDL (138). Η διαδικασία της αθηρογένεσης είναι σύνθετη και όχι καλά διεκρινισμένη. Εμείς, θα σταθούμε στην επισήμανση χαρακτηριστικών σημείων που σχετίζονται με την οξειδωμένη LDL και την σημασία της όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου.

Ένα από τα αρχικά γεγονότα που παρατηρούνται στην αθηρογένεση είναι η συσσώρευση LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο (ενδιάμεσος χώρος μεταξύ του ενδοθηλίου και των λείων μυϊκών κυττάρων). Η συσσώρευση της LDL είναι μεγαλύτερη όταν τα επίπεδα της κυκλοφορούσας LDL είναι αυξημένα (137). Η γηγενής (native) LDL δεν προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα τόσο γρήγορα έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα αφρώδη κύτταρα, και για αυτό το λόγο έχει προταθεί ότι η LDL τροποποιείται (139). Φάνηκε, ότι η «παγιδευμένη» LDL όντως υπόκεινται σε τροποποίηση, και ειδικότερα σε οξειδωση, λιπόλυση, πρωτεόλυση και συνάθροιση και ότι αυτή η τροποποίηση συμβάλλει στην ανάπτυξη της φλεγμονής και στη δημιουργία των αφρώδη κυττάρων (139). Μία από τις πιο σημαντικές τροποποιήσεις της LDL στο αρχικό στάδιο, είναι η οξειδωση των λιπιδίων ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε οξειδωτικά απόβλητα των αγγειακών κυττάρων (139). Τέτοιες τροποποιήσεις οδηγούν στη δημιουργία της ελαφρά οξειδωμένης LDL (minimally ox-LDL), η οποία έχει προφλεγμονώδη δράση αλλά δεν είναι αρκετά τροποποιημένη ώστε να αναγνωρίζεται από τους καθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων (139).

Η αθηροσκληρήνωση χαρακτηρίζεται από την στρατολόγηση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, αλλά όχι ουδετερόφιλων στο αρτηριακό τοίχωμα (139). Ένα από τα γεγονότα που πυροδοτούν αυτή τη διαδικασία, είναι η συσσώρευση ελαφρά οξειδωμένης LDL, η οποία διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν προφλεγμονώδη μόρια, όπως μόρια προσκόλλησης και αυξητικοί παράγοντες (139). Τα μόρια προσκόλλησης όπως οι σελεκτίνες (P- και E-selectins), το ενδαγγειακό μόριο προσκόλλησης (ICAM, intracellular adhesion molecule), οι ιντεγκρίνες (integrin VLA-4) και το μόριο MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) συμβάλλουν στην προσέλκυση και είσοδο των λεμφοκυττάρων και των μονοπύρηνων στον ενδιάμεσο χώρο (μεταξύ ενδοθηλίου και λείων μυϊκών κυττάρων). Ο αυξητικός παράγοντας M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των μακροφάγων, ενώ επιπλέον επηρεάζει διάφορες λειτουργίες των μακροφάγων όπως την έκφραση του καθαριστή υποδοχέα (139). Η ελαφρά οξειδωμένη LDL εμποδίζει την παραγωγή του οξειδίου του αζώτου (NO, nitric oxide), το οποίο έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες προκαλώντας χάλαση στο αγγειακό ενδοθήλιο (140). Το NO φαίνεται ότι εμποδίζει την απόπτωση. Η παραγωγή NO έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα (151).

Η LDL πρέπει να τροποποιηθεί σε μεγάλο βαθμό ('highly oxidised') πριν προσληφθεί σε ικανοποιητικό βαθμό από τα μακροφάγα προκειμένου να μετατραπούν σε αφρώδη κύτταρα. Αυτή η τροποποίηση πιθανότατα εμπλέκει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species) που παράγονται από το ενδοθήλιο και τα μακροφάγα και επιπλέον αρκετά ένζυμα όπως η μυελοπεροξειδάση, η σφινγκομυελινάση και μία εκκρινόμενη φωσφολιπάση, τα οποία όλα υπάρχουν στην περιοχή της αθηρογένεσης (137). Η οξείδωση των LDL in vitro ακολουθεί τρεις φάσεις: την αρχική λανθάνουσα φάση (initial lag phase), κατά την οποία τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στις LDL καταναλώνονται, τη φάση της διάδοσης (propagation phase), η οποία χαρακτηρίζεται από γρήγορη οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων προς υδροϋπεροξείδια και τη τρίτη φάση κατά την οποία οι LDL μετατρέπονται σε ενεργές αλδεϋδες (146). Η γρήγορη πρόσληψη της υψηλού βαθμού τροποποιημένης LDL από τα μακροφάγα πραγματοποιείται με την μεσολάβηση μίας ομάδας υποδοχέων, όπως οι SR-A και CD36 (140). (Εικόνα-3.2)



ΕΙΚΟΝΑ-3.3 Σχηματισμός αφρώδων κυττάρων (Foam cells). Η υψηλού βαθμού οξειδωμένη και αθροισμένη LDL (Highly oxidized, aggregated LDL) παράγεται στον υποενδοθηλιακό χώρο ως αποτέλεσμα της δράσης ενώσεων ενεργού οξυγόνου (ROS) και των ενζύμων σφινγκομυελινάση (Smase), εκκρινόμενη φωσφολιπάση 2 (sPLA₂), άλλων λιπάσεων (Lipases) και της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO). Η οξειδωμένη και αθροισμένη LDL αναγνωρίζεται από τους καθαριστές υποδοχείς των μακροφάγων, όπως SR-A, CD36 και CD68. Η έκφραση των καθαριστών υποδοχέων επάγεται από τις κυτταροκίνες, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και την ιντερφερόνη-γ (INF-γ). Τα αφρώδη κύτταρα εκκρίνουν απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), η οποία μπορεί να απομακρύνει την περίσσεια της χοληστερόλης. Ο θάνατος των αφρώδων κυττάρων, μέσω νέκρωσης (Necrosis) ή απόπτωσης (Apoptosis), οδηγεί στη συσσώρευση εξωκυττάρων λιπιδίων και νεκρωμένων ιστών (Extracellular lipid, debris), τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία του νεκρωτικού πυρήνα. (137)

Η δημιουργία αθηρωματικής πλάκας χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη λιπιδίων, κυρίως χοληστερόλης και των εστέρων της, τη συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (παραγόμενης από τα λεία μυϊκά κύτταρα) στον υποενδοθηλιακό χώρο (139). Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητοι για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι σε αυτή τη διεργασία συμβάλλει η αλληλεπίδραση του CD40 με το συνδετικό του μόριο CD154 (CD40L), το οποίο διεγείρει τα T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα στην παραγωγή κυτταροκινών, όπως η IFN- γ . Ο θάνατος των αφρωδών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων, οδηγεί στη συσσώρευση εξωκυττάριας λιπιδίων και νεκρωμένων ιστών, τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία του νεκρωτικού πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας (137). Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί σε θρόμβο.

3.4 ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL, ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ & ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

Η δημιουργία του νεκρωτικού πυρήνα από νεκρά μακροφάγα και λεία ενδοθηλιακά κύτταρα οφείλεται τόσο σε νέκρωση όσο και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης (142). Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε αθηρωματικές πλάκες, αποκάλυψαν χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία της απόπτωσης, όπως συμπύκνωση της χρωματίνης και σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων (143,144). Ολοένα και αυξανόμενα στοιχεία υπάρχουν, που δείχνουν ότι η οξειδωμένη LDL πιθανόν να ευθύνεται για την επαγόμενη απόπτωση στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα μακροφάγα (145).

Οι επιδράσεις της οξειδωμένης LDL στην λειτουργία των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων από περιφερικό αίμα (ΜΛΠΑ, τα οποία είναι τα μονοκύτταρα, τα T-κα Β-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς) αποτελούν πρόσφατο αντικείμενο μελέτης. Παρακάτω παραθέτουμε στοιχεία από κάποιες έρευνες που μελετούν την επίδραση της oxLDL στα ΜΛΠΑ.

Σε μία μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της ox-LDL in vitro σε ερεθίσματα που προκαλούν πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικά μονοπύρηνια λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη ικανότητα απόκρισης των ΜΛΠΑ σε διαφορετικά μιτογόνα ερεθίσματα, όπως της IL-2, μετά από την έκθεση σε oxLDL (146). Δηλαδή, η παρουσία οξειδωμένης LDL μείωσε την ικανότητα

πολλαπλασιασμού των ΜΑΠΑ ενώ ήταν εκτεθειμένα σε μιτογόνα ερεθίσματα (146). Τα επίπεδα της παραγόμενης από τα ΜΑΠΑ IL-12 μειώθηκαν αισθητά. Η IL-12 επάγει την παραγωγή του TNFα και της INFγ (147), οπότε πιθανόν έτσι εξηγούνται τα μειωμένα επίπεδα TNFα και INFγ που ανιχνεύτηκαν (146). Η INFγ επάγει την αύξηση της IL-1β και της IL-6 (148), συνεπώς, τα χαμηλά επίπεδα IL-1β και IL-6 που παρατηρήθηκαν πιθανόν να οφείλονται σε αυτό το λόγο (146). Τέλος, η παρουσία oxLDL στα ΜΑΠΑ οδήγησε στην μείωση των επιπέδων της IL-2 στο υπερκείμενο υγρό, που συλλέχθηκε από τα δείγματα (146).

Σε μία άλλη μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση της oxLDL στα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK). Άλλωστε έχει φανεί, ότι η oxLDL μπορεί να προσληφθεί από τα λεμφοκύτταρα συμπεριλαμβανομένου και των CD56⁺ NK (149). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της oxLDL στα NK οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα IL-12, καθώς και TNFα και INFγ (150). Συνεπώς, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η oxLDL επιδράει αρνητικά στη λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό των NK (150).

Σε μία έρευνα μελετήθηκε η δυνατότητα ενεργοποίησης του μηχανισμού της απόπτωσης σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία oxLDL μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση σε ενεργοποιημένα με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA) T-λεμφοκύτταρα (151). Η απόπτωση υπερίσχυε από την νέκρωση, ο μηχανισμός όμως παραμένει άγνωστος (151).

Σε ενεργοποιημένα ΜΑΠΑ, η απόπτωση φαίνεται ότι δεν αποτελεί ένα μαζικό αλλά ούτε και ένα γρήγορο φαινόμενο (151). Πιθανόν, η oxLDL να ενισχύει μία φυσιολογική πορεία, η οποία παρατηρείται στα ενεργοποιημένα και πολλαπλασιαζόμενα λεμφοκύτταρα και σχετίζεται με την ρύθμιση της επιβίωσης των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων (152). Έχει βρεθεί ότι η oxLDL αυξάνει την έκφραση του αντιγόνου HLA-DR (138). Η αυξημένη έκφραση του αντιγόνου HLA-DR παρατηρείται σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (138). Το μόριο Bcl-2 συνεχώς εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα εν ηρεμία, ενώ υπερεκφράζεται στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων επάγει την απόπτωση ώστε να διατηρείται η ομοιότητα στον λεμφοειδή πληθυσμό (152,153). Πολλοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν σε αυτή τη διεργασία, όπως η πτώση των επιπέδων IL-2, η οποία μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση σε ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα έστω και αν τα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 παραμένουν υψηλά (148). Μία άλλη πιθανή εξήγηση, είναι ότι παρουσία oxLDL μεταβάλλεται η

οξειδοαναγωγική κατάσταση στο κύτταρο, παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οδηγούν σε οξειδωτικό stress, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό της απόπτωσης (149).

3.5 ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες προκειμένου να βγουν συμπεράσματα για την επίπτωση των διαφόρων αντιοξειδωτικών, στην οξείδωση της LDL, δεδομένου ότι η oxLDL συμβάλλει καταλυτικά στη αθηρογένεση. Τα αποτελέσματα σε κάποιες περιπτώσεις είναι αντικρουόμενα. Στις περισσότερες πάντως μελέτες διαφαίνεται ο θετικός ρόλος από τα αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, όπως οι βιταμίνες C και E που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής, στο πλάσμα σε σχέση με την αθηρογένεση. Το ελαιόλαδο, χαρακτηριστικό στοιχείο της Μεσογειακής διαίτας, μέσω των υψηλών επιπέδων αντιοξειδωτικών (πολυφαινολών και βιταμίνης E) σύμφωνα με μελέτες έχει ανασταλτικό ρόλο στην οξείδωση της LDL (154). Δεν πρόκειται να σταθούμε σε αυτό το θέμα, εφόσον κάτι τέτοιο ξεφεύγει από το αντικείμενο της μελέτης μας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν συστατικά που απαντούν κυρίως σε φρούτα και λαχανικά και εμφανίζουν ισχυρές επιθυμητές βιολογικές δράσεις. Η πιο γνωστή και μελετημένη λειτουργία τους είναι η αντιοξειδωτική τους δράση, η οποία εκδηλώνεται με την ικανότητά τους να παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες, να εμποδίζουν την ενζυματική παραγωγή τους και να μπλοκάρουν την οξείδωση κυτταρικών και εξωκυτταρικών συστατικών όπως της οξειδωμένης LDL (155). Ως αντιοξειδωτικά πιστεύεται ότι προστατεύουν από διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το αυξημένο οξειδωτικό stress όπως οι διάφοροι τύποι καρκίνου, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η έκπτωση της λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος, νευροεκφυλιστικές καταστάσεις και πιθανόν ασθένειες του γαστρεντερικού όπως η νόσος του Crohn και η ελκώδη κολίτιδα (156,157). Τα τελευταία χρόνια μελετάται η δράση των πολυφαινολών στην επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

4.2 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ: ΔΟΜΗ, ΕΙΔΗ, ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν την μεγαλύτερη πηγή αντιοξειδωτικών από τη διαίτα (158). Διαφέρουν από τα άλλα αντιοξειδωτικά από την μεγάλη ποικιλία των δομών. Οι πολυφαινόλες είναι χαρακτηριστικές για ένα είδος φυτού, ή ακόμα και για ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό του συγκεκριμένου φυτού (158). Έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός πολυφαινολών σε φυτά, αν και περιορίζεται σημαντικά ο αριθμός τους στις τροφές που καταναλώνονται στην καθημερινή διατροφή (158). Χημικά οι πολυφαινόλες είναι κυκλικοί ή πολυκυκλικοί αρωματικοί δακτύλιοι που περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου οι οποίες ενώνονται απευθείας στον αρωματικό δακτύλιο (155). Ο όρος πολυφαινόλες είναι συμβατικός εφόσον δεν είναι όλες πολυ-υδροξυ-παράγωγα. Ορθότερος είναι ο όρος φαινόλες (160). Οι κύριες ομάδες πολυφαινολών διακρίνονται ανάλογα με τη φύση του σκελετού αποτελούμενου από άνθρακες σε: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τα λιγότερα γνωστά στυλβένια και λιγνίνες (158).

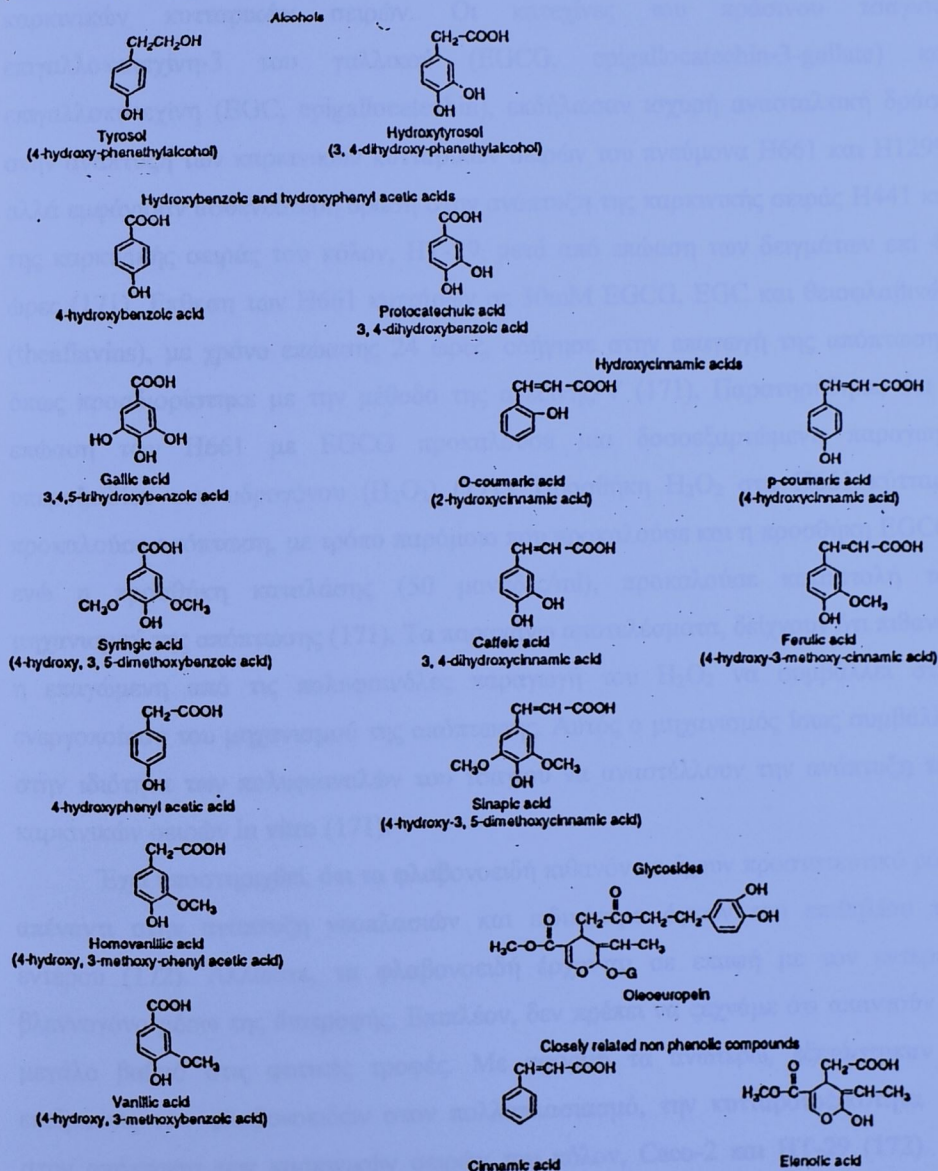
Τα φαινολικά οξέα είναι διαδεδομένα στα τρόφιμα και βρίσκονται συχνά με την μορφή εστέρων. Τα πιο συχνά ευρισκόμενα είναι το καφεϊκό οξύ το οποίο απαντά σε πολλά φρούτα και λαχανικά και στον καφέ (ένα ποτήρι στιγμιαίου καφέ, 200ml, περιέχει 50-150mg χλωρογονικού οξέος, εστεροποιημένη μορφή του καφεϊκού) και

λιγότερο συχνά το φερουλικό οξύ το οποίο βρίσκεται στις διαιτητικές ίνες (156). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι υδρολυμένες τανίνες οι οποίες βρίσκονται σε φρούτα καθώς και σε σιτηρά και το γαλλικό οξύ το οποίο απαντά σε φρούτα. Τα φλαβονοειδή ανήκουν στις πιο διαδεδομένες πολυφαινόλες στη δίαιτα. Διακρίνονται ανάλογα με τον βαθμό οξειδωσης του δακτυλίου με το μόριο οξυγόνου (oxygen heterocycle) σε: φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες, φλαβανόλες, προανθοκυανιδίνες και φλαβανόνες (158). Η κύρια πηγή ισοφλαβονών είναι η σόγια η οποία περιέχει γενιστεΐνη (genistein) και daidzein (δαϊτζεΐνη), και οι οποίες θεωρούνται ότι έχουν δράση φυτοοιστρογόνων (161). Το εσπεριοειδή αποτελούν καλή πηγή φλαβανόνων (162). Η κερκετίνη, η κυριότερη φλαβονόλη στη δίαιτά μας, βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά και ποτά. Το κρεμμύδι και το τσάι αποτελούν πολύ καλές πηγές κερκετίνης (163,164). Οι κύριες φλαβανόλες είναι οι κατεχίνες οι οποίες απαντούν στο τσάι (165), στο κόκκινο κρασί (166) και στη σοκολάτα (167). Τα στιλβένια δεν είναι διαδεδομένα στα τρόφιμα. Ένα από αυτά, η ρεσβερατρώλη υπάρχει στο κόκκινο κρασί αν και σε μικρές συγκεντρώσεις (158). Έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον λόγω των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της (168). Οι λιγνίνες απαντούν στο λιναρόσπορο (flaxseed) (169). Οι λιγνίνες χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα (156).

Η ημερήσια προσλαμβανόμενη ποσότητα πολυφαινολών σύμφωνα με μία τυπική Δυτικού τύπου δίαιτα υπολογίζεται σε περίπου 1gr, όπως είχε υπολογιστεί πριν 25 χρόνια (170). Εντούτοις, υπάρχουν αρκετές διακυμάνσεις γύρω από αυτή τη τιμή (158). Η επεξεργασία των φυτικής προέλευσης τροφίμων μειώνει τη συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες (158). Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από τη χημική τους δομή και άλλους διατροφικούς παράγοντες που συνυπάρχουν κατά την απορρόφηση (158). Η εντερική απορρόφηση των πολυφαινολών μπορεί να υψηλή (158). Παρόλο αυτά, η συγκέντρωση στο πλάσμα σπάνια περνάει το 1μM μετά την κατανάλωση 10-100mg ενός μόνο είδους πολυφαινόλης (158). Μετρήσεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος δείχνει ότι οι περισσότερες φαινολικές ουσίες είναι παρόν, κυρίως με την μορφή άγνωστων μεταβολιτών που παράγονται είτε στους ιστούς είτε από την εντερική χλωρίδα (158).

Ένα χαρακτηριστικό τρόφιμο της Μεσογειακής διαίτας είναι το ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες οι οποίες συμβάλλουν στη σταθερότητα του και τη γεύση του (160). Οι κύριες πολυφαινόλες που απαντούν στο παρθένο ελαιόλαδο είναι οι ακόλουθες: τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, ολευροπένιο, καφεϊκό

οξύ, συρινγικό οξύ, p-κουμαρικό, ο-κουμαρικό, πρωτοκατεχικό οξύ, σιναπικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ, ομοβανιλικό, βανιλικό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, κινναμικό οξύ και ελενολικό οξύ (160). Οι πολυφαινόλες που απαντούν στο παρθένο ελαιόλαδο και στις μαργαρίνες από παρθένο ελαιόλαδο διαφέρουν από αυτές που βρίσκονται στις ελιές (160). Στις ελιές απαντούν κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών όπως το ολευροπένιο, η βερμπασκοσίδη, η λουτεολίνη-7-γλυκοσίδη και η ρουτίνη (160). (Εικόνα-4.1)



ΕΙΚΟΝΑ-4.1 Χημική δομή των κυριότερων πολυφαινόλων στο παρθένο ελαιόλαδο (160).

4.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ & ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έχει φανεί από μελέτες, ότι κάποιες πολυφαινόλες μπορούν και επάγουν τον μηχανισμό της απόπτωσης σε συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Παρακάτω, παραθέτουμε τα συμπεράσματα ερευνών από την μελέτη της βιολογικής δράσης πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα.

Σε μία μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση των πολυφαινολών του πράσινου τσαγιού στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και στην επαγωγή της απόπτωσης καρκινικών κυτταρικών σειρών. Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού, επιγαλλοκατεχίνη-3 του γαλλικού (EGCG, epigallocatechin-3-gallate) και επιγαλλοκατεχίνη (EGC, epigallocatechin), εκδήλωσαν ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα H661 και H1299, αλλά εμφάνισαν ασθενέστερη δράση στην ανάπτυξη της καρκινικής σειράς H441 και της καρκινικής σειράς του κόλον, HT-29, μετά από επώαση των δειγμάτων επί 48 ώρες (171). Έκθεση των H661 κυττάρων σε 30mM EGCG, EGC και θειοφλαβινών (theaflavins), με χρόνο επώασης 24 ώρες, οδήγησε στην επαγωγή της απόπτωσης, όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο της ανεξίνης-V (171). Παρατηρήθηκε, ότι η επώαση των H661 με EGCG προκαλούσε μία δοσοεξαρτώμενη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (171). Προσθήκη H_2O_2 στα H661 κύτταρα προκαλούσε απόπτωση, με τρόπο παρόμοιο που προκαλούσε και η προσθήκη EGCG, ενώ η προσθήκη καταλάσης (50 μονάδες/ml), προκαλούσε καταστολή του μηχανισμού της απόπτωσης (171). Τα παραπάνω αποτελέσματα, δείχνουν ότι πιθανόν η επαγόμενη από τις πολυφαινόλες παραγωγή του H_2O_2 να συμβάλλει στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης. Αυτός ο μηχανισμός ίσως συμβάλλει στην ιδιότητα των πολυφαινολών του τσαγιού να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών σειρών *in vitro* (171).

Έχει υποστηριχθεί, ότι τα φλαβονοειδή πιθανόν να έχουν προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ανάπτυξη νεοπλασιών και ειδικότερα όγκων του επιθηλίου του εντέρου (172). Άλλωστε, τα φλαβονοειδή έρχονται σε επαφή με τον εντερικό βλεννογόνο μέσω της διατροφής. Επιπλέον, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι απαντούν σε μεγάλο βαθμό στις φυτικές τροφές. Με αφορμή τα ανωτέρω, εξετάστηκαν οι επιδράσεις των φλαβονοειδών στον πολλαπλασιασμό, την κυτταροτοξικότητα και στην απόπτωση των καρκινικών σειρών του κόλον, Caco-2 και HT-29 (172). Τα φλαβονοειδή, βακαϊλεΐνη (baicalein) και μυρικετίνη (myricetin) φάνηκαν ότι επάγουν την απόπτωση στα κύτταρα Caco-2 και HT-29. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις

παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού, χωρίς την ύπαρξη κυτταροτοξικότητας. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη εξετάστηκαν, η καρκινική σειρά του νεφρικού σωλήνα LLC-PK1 και η καρκινική σειρά του μαστού MCF-7, στις οποίες παρουσία φλαβονοειδών παρατηρήθηκε ποικίλου βαθμού αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν διαπιστώθηκε επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης παρουσία των φλαβονοειδών (172). Συμπερασματικά, φάνηκε ότι οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών κυτταρικών καρκινικών σειρών (172). Η ικανότητα των φλαβονοειδών για αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικές σειρές δεν μπορεί να προβλεφθεί βασιζόμενοι στην χημική τους δομή (172).

Η ρεσβερατρόλη (resveratrol, 3,5,4'-τριυδροξυ-trans-στιλβένιο) έχει την ικανότητα να επάγει την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, σε μία μελέτη φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να προκαλέσει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη(173). Αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη μπλοκάρει εν μέρει τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο G1/S σε τρεις μη ανδρογόνο-εξαρτώμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, τις DU-145, PC3, JCA-1 ενώ δεν έχει κάποια επίδραση στην ανδρογόνο-εξαρτώμενη καρκινική σειρά LNCaP (173). Επιπλέον, σε αντίθεση με της μη ανδρογόνο-εξαρτώμενες καρκινικές σειρές, η ρεσβερατρόλη προκαλεί σε σημαντικό βαθμό απόπτωση στα κύτταρα της σειράς LNCaP και ακόμα μειώνει σημαντικά τα επίπεδα τόσο του ενδοκυττάριου όσο και του εκκρινόμενου ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) χωρίς να επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (173).

Σε μία άλλη μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση των πολυφαινολών και των ταννινών από το κρασί στην εμφάνιση καρκινογένεσης στο κόλον σε επιμύες, μελετώντας διάφορες παραμέτρους όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων του βλεννογόνου πριν και μετά την χορήγηση του καρκινογόνου azoxymethane (174). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση των πολυφαινολών και ταννινών δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση στην επαγωγή των σταδίων της καρκινογένεσης (174). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη απόπτωση σε κύτταρα του βλεννογόνου κατά την χορήγηση των καρκινογόνων ουσιών (174), το οποίο πιστεύεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο εφόσον απομακρύνονται τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες (175).

Η ικανότητα επαγωγής της απόπτωσης του γαλλικού οξέως και της κουρκουμίνης φάνηκε σε μία μελέτη κατά την οποία η αποπτωτική δράση της κουρκουμίνης ήταν ισχυρότερη από του γαλλικού σε ανθρώπινα προμυελοτικά λευχαιμικά κύτταρα HL-60 και σε ανθρώπινα πλακώδη καρκινικά κύτταρα HSC-4 που προκαλούν καρκίνωμα στη στοματική κοιλότητα (176). Η αντιαποπτωτική τους δράση φάνηκε ότι επιτυγχάνεται με διαφορετικό μηχανισμό (176).

Η καψαϊσίνη (capsaicin, 8-μεθυλ-N-βανίλ-6-νονεναμίδη), φάνηκε ότι επάγει σε σημαντικό βαθμό την απόπτωση στην ηπατοκυτταρική καρκινική σειρά SK-Hep-1 (177). Παρατηρήθηκε, ότι μειώνει την αναλογία των αντιαποπτωτικών μορίων Bcl-2 προς τα προαποπτωτικά μόρια Bax, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (177). Επιπλέον, η καψαϊσίνη φάνηκε ότι επάγει την απόπτωση στις καρκινικές σειρές από μελάνωμα, A-375 και SK-MEL-28 (178).

Το BHT (Butylated Hydroxytoluene, βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), συνθετικό φαινολικό αντιοξειδωτικό, φάνηκε ότι επάγει την απόπτωση με έναν εξαρτώμενο από το χρόνο και τη δοσολογία τρόπο σε καρκινικά κύτταρα της σειράς U937 (179). Εντούτοις, ο αποπτωτικός της ρόλος πιθανό να μη σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της δράση εφόσον άλλα αντιοξειδωτικά όπως το DPPD, το Τρολόξ και η α-τοκοφερόλη δεν επάγουν την απόπτωση σε U237 κύτταρα (179). Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι η επαγόμενη από την BHT απόπτωση δεν προκαλείται από μεταβολίτες που προκύπτουν από το σύστημα P450 των κυτοχρωμάτων. Ο αποπτωτικός της ρόλος, φαίνεται να οφείλεται μέσω του υπεροξειδίου του υδρογόνου και μίας τροποποιημένης οξειδοαναγωγικής κατάστασης, καθόσον η έλλειψη καταλάσης ενίσχυε τον αποπτωτικό της ρόλο (179).

5.1 ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ

Τα πλαστικά και γυαλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα παρακάτω: πλαστικές σύριγγες μίας χρήσεως των 2,5 ml, 5 ml, 10 ml και 20 ml., πλαστικό σωληνάκι (Greiner) των 15 ml, πλαστικό σωληνάκι (Falcon) των 50 ml, ποτηράκια γυάλινα των 50 ml (Rasotherm), 100 ml (Boro 3.3) και 250 ml (Bomex), μικροί γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml, δοχεία γυάλινα των 100 ml (Boro 3.3, Pyrex) και των 500 ml (Pyrex), 1,5 ml (Eppendorf) και 1,5 ml (Greiner), ακροφύσια των 2 μ l, 100 μ l, 1000 μ l και 5000 μ l (Greiner), φιλτράκια 0.22 μ m/25mm (Millex-GS), φλάσκες καλλιέργειας των 50ml, 25 cm² (Greiner) και των 200ml, 75cm² (Orange Scientific).

5.2 ΔΙΑΛΥΜΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Καλλιεργητικό μέσο (CM, Complete Medium) που περιέχει: 45 ml RPMI 1640 Medium (Biochrom G), 5 ml βόειου εμβρυϊκού ορού (FCS, Fetal Calf Serum) (Gibco), 0,5 ml Πενικιλίνη(100 U/ml)/Στρεπτομυκίνη(100 μ g/ml) (P/S, Penicillin/Streptomycin) (Gibco) και 0,5 ml L-Γλουταμίνη 2mM (L-Glu, L-Glutamine) (Gibco). (συνολικός όγκος διαλύματος 50ml). Η συντήρηση του ανωτέρω διαλύματος γίνεται σε +2- +8 °C (παρασκευή νέου CM μηνιαία).

5.3 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επώαση των κυττάρων είναι:

- Οξειδωμένη LDL: Η οξείδωση της LDL γίνεται με $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Αναλυτικά, σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκε 1ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 μ M, 1 ml LDL διαλυμένη σε PBS (Phosphate Buffer Saline) (200 μ g πρωτεΐνης/ml διαλύματος LDL) και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 μ M (τελική συγκέντρωση). Η LDL επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C επί 0, 1, 2, 3, 6, 22 ώρες. Στο τέλος, η οξειδωμένη LDL εξατμίζεται με ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού..
- Παραπροϊόν τηγανισμένου λαδιού (non frying byproduct): Ανιχνεύθηκε και απομονώθηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), μετά από διαδοχικά τηγανίσματα δειγμάτων εδωδίων ελαίων [ενός παρθένου ελαιολάδου, ενός ηλιελαίου και εμπορικού μίγματος σπορελαίων τηγανίσματος (Friol), το οποίο αποτελείται από ηλιέλαιο, βαμβακέλαιο και φοινικέλαιο]. Η σύστασή του δεν έχει καθοριστεί προς το παρόν. Το παραπροϊόν τηγανισμένου

λαδιού που χρησιμοποιήσαμε προήλθε από 10 ml για κάθε ένα από τα παραπάνω έλαια.

- Φυτοαιμαγλουτίνη: Η φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA-L, Phytohemagglutinin) που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες των μονοπύρηνων αποκτήθηκε από την Biochrom KG (1,2 mg πρωτεΐνης/φλάσκα).
- Πολυφαινολικές ουσίες: Τα stock διαλύματα πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες των K562 είναι τα ακόλουθα: ρουτίνη (SIGMA) 50 mgr/ml, ταννικό οξύ (SIGMA) 200 mgr/ml, γαλλικό οξύ (SIGMA) 200 mgr/ml, p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (SIGMA) 200 mgr/ml, ο-κουμαρικό (FLUKA) 100 mgr/ml, φερουλικό οξύ (SIGMA) 100 mgr/ml, p-κουμαρικό οξύ (SIGMA) 100 mgr/ml και συρινγικό οξύ (SIGMA) 50 mgr/ml. Όλα έχουν διαλύτη MeOH (μεθανόλη), εκτός από το ταννικό οξύ το οποίο διαλύεται σε H₂O dd ('δix' απιονισμένο νερό). Για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας (GIBERTINI, 120g-0,1mg), αναδεύτηκαν σε Vortex (IKA Minishaker, MSI) και συντηρήθηκαν σε +2- +8 °C. Τα διαλύματα πολυφαινολών εργασίας αραιώθηκαν 1:1000 σε σχέση με τα stock. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών ουσιών προέκυψαν με βάση το μέγιστο βαθμό διαλυτοποίησής τους.

5.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Τα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο CM και επώασθηκαν σε θάλαμο επώασης (Mettler inco2) σε συνθήκες υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας, με 5% CO₂ σε 37 °C.

Τα K562 ερυθρολευχαιμικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο CM και επώασθηκαν στο θάλαμο επώασης.

5.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ

Η απομόνωση των μονοπύρηνων από περιφερικό αίμα γίνεται με φυκόλη. Αρχικά εκτελείται αιμοληψία από βραχιόνια φλέβα από υγιείς εθελοντές με σύριγγα των 20ml μιας χρήσεως. Χρησιμοποιούνται 2-3 σταγόνες ηπαρίνης (Leo, 5000 iu/ml, 5ml, 25000 iu). Σε Falcon των 50ml τοποθετούμε πρώτα φυκόλη (Ficoll Separating Solution, ισοτονικό, πυκνότητα 1,077, που έχει αποκτηθεί από την Biochrom KG) και στη συνέχεια με προσοχή ρίχνουμε στάγδην το αίμα που έχουμε λάβει, σε αναλογία

φυκόλη/αίμα 1/1 ή 2/1. Φυγοκεντρείται το ανωτέρω δείγμα σε 1800 r.p.m. επί 20 λεπτά (φυγόκεντρο HERMLE Z320). Λαμβάνουμε τη στοιβάδα των μονοπύρηνων, τα τοποθετούμε σε Falcon των 50 ml, προσθέτουμε RPMI μέχρι να γεμίσει το Falcon. Φυγοκεντρούμε το ανωτέρω δείγμα σε 1800 r.p.m. επί 5 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει κυρίως RPMI και φυκόλη. Σπάμε το ίζημα, τοποθετούμε RPMI μέχρι να γεμίσει το Falcon. Φυγοκεντρούμε, για δεύτερη φορά ώστε να απομακρυνθεί η φυκόλη η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα, σε 1800 r.p.m. επί 5 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό. Σπάμε το εναπομείνον ίζημα και τοποθετούμε καλλιεργητικό μέσο CM.

5.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ K562

Η βιωσιμότητα των μονοπύρηνων μελετάται μετά τον προκαθορισμένο χρόνο επώασης με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρώσης Trypan Blue (Biochrom KG, 0.5% w/v), με τη χρήση αιμοκυττόμετρου (PRECICOLOR HBG, depth 0.100mm, 0.0025mm²), καλυπτρίδων (22x22 mm) και με τη βοήθεια φωτονικού μικροσκοπίου (ZEISS, 3.2/0.07, 10/0.22, 40/0.65, 100/1.25 oil). Η χρωστική Trypan Blue (μπλε της τρυπάνης) χρωματίζει τα κύτταρα τα οποία είναι νεκρά, ανεξάρτητα από τον τρόπο με τον οποίο έχουν θανατωθεί (δε διακρίνουμε αποπτωτικά από νεκρωτικά κύτταρα). Με τον τρόπο αυτό καταμετράμε το συνολικό αριθμό των μονοπύρηνων, ενώ ταυτόχρονα μετράμε τον αριθμό των μονοπύρηνων που είναι χρωματισμένα 'μπλε' λόγω της χρωστικής μπλε της τρυπάνης και εξάγουμε αποτελέσματα για τη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Με τον ίδιο τρόπο μετράμε τη βιωσιμότητα των K562.

5.7 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΥΣΙΩΝ-ΧΡΟΝΟΙ ΕΠΩΑΣΗΣ

Πριν την καλλιέργεια των δειγμάτων καταμετρούμε τον αριθμό των μονοπύρηνων. Ανάλογα με το πείραμα προσθέτουμε στο δείγμα οξειδωμένη LDL, παραπροϊόν τηγανισμένου λαδιού, φυτοαιμαγλουτίνη ή κάποια πολυφαινολική ουσία.

Ελέγξαμε την επίδραση του βαθμού οξειδωσης της LDL σε διάφορους χρόνους (0, 1, 2, 3, 6, 22 ώρες) στη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων σε 72 ώρες επώασης.

Εξετάσαμε την επίδραση παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού σε διαφορετικές ποσότητες, 500 μl και 50 μl, συγκριτικά με την επίδραση οξειδωμένης LDL σε διαφορετικούς χρόνους (0, 3, 6 ώρες) στη βιωσιμότητα και στο βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηνων με χρόνο επώασης 24 ώρες.

Μελετήσαμε την επίδραση παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού σε διαφορετικές ποσότητες, 20 μ l και 200 μ l, στο βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηνων με χρόνο επώαση 48 ώρες.

Ελέγξαμε τη βιωσιμότητα και το βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηνων παρουσία παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (500 μ l) και φυτοαιμαγλουτίνης (5 μ g/ml) με χρόνο επώασης 72 ώρες. Η φυτοαιμαγλουτίνη αποτελεί αυξητικό παράγοντα για τα μονοπύρηννα.

Μελετήσαμε την επίδραση των πολυφαινολικών ουσιών συρινγικό οξύ, p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, ταννικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ και ρουτίνη στην επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης στα K562, με χρόνο επώασης 24 ώρες.

Εξετάσαμε το βαθμό απόπτωσης K562 παρουσία μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος υπό την επίδραση των ανωτέρω πολυφαινολών με χρόνο επώασης 15 ώρες.

Όλες οι διεργασίες γίνονται με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών χρησιμοποιώντας αυτόματο κλίβανο αποστείρωσης (Tuttnauer 3870 E). Οι καλλιέργειες γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής (Biohazard aura B4, laminar flow).

5.8 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS, FLOWCYTOMETRY), DNA ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΜΕ ΤΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΙΩΔΙΟΥΧΟΥ ΠΡΟΠΙΔΙΟΥ (PI, PROPIDIUM IODIDE), ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΕΞΙΝΗΣ-V (ANNEXIN-V), ΧΡΗΣΗ AntiCD95-FITC ΚΑΙ AntiHLA-DR-PE.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία καλά εδραιωμένη διαδικασία ανάλυσης των αντιγόνων επιφανείας. Χρησιμοποιώντας απλές και αξιόπιστες μεθόδους χρώσης του DNA, μπορούμε να μετρήσουμε την ενεργοποίηση και των πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, μπορεί να συνδυαστεί με την έκφραση αντιγόνων επιφανείας που χαρακτηρίζουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων. Με τη τεχνική ιωδιούχο προπίδιο, την μέθοδο ανεξίνη-V και τη χρήση αντισώματος antiCD95-FITC μελετήσαμε χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής το βαθμό απόπτωσης σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος και σε νεοπλασματικά κύτταρα της ερυθρολευχαιμικής σειράς K562. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με κυτταρόμετρο της Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA.

Με την τεχνική ιωδιούχου προπιδίου, το PI παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και μπορεί να διεγερθεί με laser που εκπέμπει σε μήκος κύματος 488 nm, το οποίο χρησιμοποιείται στα περισσότερα κυτταρόμετρα. Το ένζυμο RNAase A χρησιμοποιείται για να αποικοδομήσει τις διπλές έλικες RNA έτσι ώστε να μείνουν μόνο οι διπλές έλικες DNA. Κατά την σύνδεση του PI με το DNA, αυξάνεται ο φθορισμός του PI κατά 50 φορές. Η εκπομπή ερυθρού χρώματος του PI κυμαίνεται γύρω στα 600 nm και μπορεί εύκολα να επισημανθεί με τα συνήθη κυτταρόμετρα μέσω FITC (φθοροσεΐνη, φθορίζουσα ουσία) ανοσοφθορισμού με εκπομπή μήκος κύματος ~510 nm. Τη τεχνική PI χρησιμοποιήσαμε για να εξετάσουμε το βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηνων, εξετάζοντας την ένταση φθορισμού των κυττάρων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούμε είναι τα ακόλουθα:

- Stock διάλυμα, αποτελείται από: ιωδιούχο προπιδίο (PI) 1 mg/ml. Ο διαλύτης είναι 'δισ' απιονισμένο νερό (H_2O dd). Φιλτράρισμα του ανωτέρω διαλύματος με φιλτράκι και αποθήκευση σε πλαστικό σωληνάκι των 15 ml με αλουμινόχαρτο σε 4 °C.
- Διάλυμα χρώσης, αποτελείται από: 0,5 ml stock διάλυμα, 1000 μονάδες RNAase A και 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα χρώσης πρέπει να είναι φρέσκο! Φυλάσσεται σε αλουμινόχαρτο.
- Ρυθμιστικό διάλυμα, αποτελείται από: 400mg γλυκόζης και 0,4 lt PBS. Φιλτράρισμα του ανωτέρου διαλύματος και συντήρηση σε 4 °C.
- Παγωμένη 70% αιθανόλη (EtOH).

Η τεχνική της μεθόδου βασίζεται στα ακόλουθα βήματα:

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων επί 10 λεπτά σε 1000 r.p.m.
- Μονιμοποίηση των κυττάρων: Επαναδιάλυση ιζήματος και τοποθέτηση 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Αποθήκευση των δειγμάτων για όλη τη νύχτα σε 4 °C.
- Χρώση PI: Ανάδευση με Vortex των δειγμάτων, φυγοκέντρηση επί 5 λεπτά σε 3000 r.p.m., απομάκρυνση του υπερκείμενου, ήπια ανάδευση με Vortex (προκειμένου να σπάσουν τα κύτταρα), προσθήκη 1 ml PI σε κάθε δείγμα, ανάδευση σε Vortex και επώαση επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ώστε να γίνει η χρώση με το PI και να δράσει η RNAase A).
- Ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής εντός 24 ωρών.

Με την μέθοδο ανεξίνης-V, μέσω της κυτταρομετρίας ροής, ανιχνεύουμε τα αποπτωτικά κύτταρα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι η ανεξίνη-V

(μία πρωτεΐνη 35-36 kDa των φωσφολιπιδίων, εξαρτώμενη από το ασβέστιο με υψηλή συγγένεια για τη φωσφατιδυλσερίνη, $K_d \sim 5 \times 10^{-10}$ M) συνδέεται γρήγορα και επιλεκτικά με την φωσφατιδυλσερίνη η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη κατά την έναρξη της απόπτωσης. Κατά την αρχική φάση της απόπτωσης, οι αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη οδηγούν σε ανακατανομή της φωσφατιδυλσερίνης από την κυτταροπλασματική πλευρά, της κυτταρικής μεμβράνης στην οποία εντοπίζεται, προς την εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης καθιστώντας την επιδεκτική στην ανεξίνη-V.

Το kit που χρησιμοποιήσαμε (ApoTarget™ Annexin-V FITC Apoptosis Kit) περιλαμβάνει φθορίζουσα-σημασμένη ανεξίνη-V (fluorescein-labeled Annexin-V FITC) σε συνδυασμό με ιωδιούχο προπίδιο (PI, propidium iodide) προκειμένου να ανιχνευτούν τα κύτταρα στα οποία έχει ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της απόπτωσης. Το ιωδιούχο προπίδιο μπορεί να διαπερνάει την κυτταρική μεμβράνη και να ενώνεται με το DNA, καθώς η κυτταρική μεμβράνη γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή στα τελευταία στάδια της απόπτωσης. Συνεπώς, ο συνδυασμός ανεξίνης-V και ιωδιούχου προπίδιου με την χρήση κυτταρομετρίας ροής δύο χρωμάτων (two-colour flow cytometry) μας επιτρέπει την ανίχνευση τριών πληθυσμών κυττάρων:

- (1) μη-αποπτωτικά κύτταρα (αρνητικά στην ανεξίνη-V και αρνητικά στο ιωδιούχο προπίδιο)
- (2) κύτταρα στην αρχή της απόπτωσης (θετικά στην ανεξίνη-V και αρνητικά στο ιωδιούχο προπίδιο)
- (3) κύτταρα σε νέκρωση και σε προχωρημένη φάση απόπτωσης (θετικά στην ανεξίνη-V και θετικά στο ιωδιούχο προπίδιο).

Τη μέθοδο ανεξίνης-V χρησιμοποιήσαμε για την μελέτη του βαθμού απόπτωσης των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος και των νεοπλασματικών κυττάρων της ερυθρολευχαιμικής σειράς K562.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι:

- Ανεξίνη-V FITC (0,1 ml): Ανασυνδυασμένη ανεξίνη-V συζευγμένη με FITC σε Tris αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει 1% BSA και 0,02% αζιδικό νάτριο, pH 7,4.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ιωδιούχου προπίδιου (0,5 ml): 50μg/ml σε PBS.
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (binding buffer) ανεξίνης-V (20 ml 1x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης ανεξίνης-V ή 50 ml 10x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης ανεξίνης-V): 1x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης

ανεξίνης-V ή μετά από διάλυση 10x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης ανεξίνης-V περιέχει 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 .

Η διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου είναι η ακόλουθη:

- Καλλιέργεια των κυττάρων με τις υπό εξέταση ουσίες που πιθανόν ενεργοποιούν τον αποπτωτικό μηχανισμό. Ταυτόχρονα επώαση καλλιέργειας μάρτυρα (χωρίς την παρουσία των υπό μελέτη ουσιών).
- Διάλυση 10x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης ανεξίνης-V 1:10 σε απιονισμένο νερό.
- Πλύσιμο κυττάρων με PBS δύο φορές και τοποθέτηση κυττάρων σε $2-3 \times 10^6$ κύτταρα/ml σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης ανεξίνης-V (περιέχει 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2).
- Τοποθέτηση κυττάρων 100 μL /δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη 5 μL ανεξίνης-V FITC και 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος ιωδιούχου προπιδίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Επώαση επί 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 400 μL 1x ρυθμιστικού διαλύματος ανεξίνης-V σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Ανάλυση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής εντός μίας ώρας από την χρώση.

Χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD95 συνδεδεμένο με φθοροσεΐνη (FITC) για τον προσδιορισμό του βαθμού απόπτωσης των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος. Επιπλέον, εξετάσαμε το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-DR, χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-HLA-DR-PE (σημασμένο με φυκοερυθρίνη, φθορίζουσα ουσία), το οποίο μας δείχνει την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων.

4.1 Έκθεση προέβλεπε ότι η ΔΕ θα είναι η πιο σημαντική ομάδα, με 11,3% των 72 άσπρων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Έκθεση σχετικά με την ΔΕ. Συγκρίσεις γύρω από την ΔΕ με τις ομάδες με ΔΕ, σύμφωνα με ΔΕ.

Αριθμός Άσπρων Χρόνια ΔΕ	Αριθμός Μετακινήσεων (x10 ³ μετακινήσεις)	Χρόνια ΔΕ
Μετακινήσεις	1,3	100
1 έως 10 ΔΕ	1,12	86
2 έως 10 ΔΕ	1,58	121,67
3 έως 10 ΔΕ	1,58	121,67

Παρατηρείται ότι η ομάδα σχετικά με την ΔΕ είναι η πιο σημαντική ομάδα των μετακινήσεων. Ο αριθμός των μετακινήσεων της ΔΕ είναι ο μεγαλύτερος, με 100% των μετακινήσεων. Η ομάδα με 11,3% των 72 άσπρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, η ομάδα σχετικά με την ΔΕ είναι η πιο σημαντική ομάδα των μετακινήσεων. Η ομάδα με 11,3% των 72 άσπρων.

6.1 Επώαση μονοπύρηνων με LDL οξειδωμένη σε διαφορετικούς χρόνους (1, 2, 3 ώρες) επί 72 ώρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Επίδραση οξειδωμένης LDL διαφορετικών χρόνων στη βιωσιμότητα μονοπύρηνων, oxLDL: οξειδωμένη LDL.

Δείγματα-Χρόνος Οξείδωσης LDL	Αριθμός Μονοπύρηνων ($\times 10^6$ κύτταρα/ml)	%Βιωσιμότητα
Μάρτυρας	1,3	100
1 ώρα oxLDL	1,12	100
2 ώρες oxLDL	1,68	97,67
3 ώρες oxLDL	1,88	90,38

Παρατηρούμε, ότι η παρουσία οξειδωμένης LDL επιδράει αρνητικά στη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Ο αυξανόμενος χρόνος οξείδωσης της LDL φαίνεται να έχει ασθενή αρνητική επίδραση στην βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Επιπλέον, όπως προκύπτει από τον αριθμό των μονοπύρηνων, η παρουσία οξειδωμένης LDL επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ειδικότερα, ο αυξανόμενος χρόνος οξείδωσης της LDL επιδράει θετικά στον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων.

6.2 Επώαση μονοπύρηνων με LDL οξειδωμένη σε διαφορετικούς χρόνους (0, 6, 22 ώρες) επί 72 ώρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Επίδραση οξειδωμένης LDL (oxLDL) διαφορετικών χρόνων στη βιωσιμότητα μονοπύρηνων.

Δείγματα-Χρόνος Οξείδωσης LDL	Αριθμός Μονοπύρηνων (x10 ⁶ κύτταρα/ml)	% Βιωσιμότητα
Μάρτυρας	1,72	100
0 ώρες oxLDL	2,34	83,57
6 ώρες oxLDL	4,64	83,15
22 ώρες oxLDL	4,68	90,35

Η παρουσία οξειδωμένης LDL έχει αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Οι διαφορετικοί χρόνοι οξείδωσης της LDL δεν φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στην βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Επιπλέον, όπως προκύπτει από τον αριθμό των μονοπύρηνων, η παρουσία οξειδωμένης LDL επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αυτό το πείραμα (διαφορετικός δότης από το πείραμα 6.1) έχουμε ισχυρότερη επίδραση του χρόνου οξείδωσης της LDL στον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων, συγκριτικά με το πείραμα 6.1.

6.3 Επώαση μονοπύρηνων παρουσία LDL οξειδωμένης σε διαφορετικούς χρόνους (0, 3, 6 ώρες) και παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού διαφορετικών ποσοτήτων (500μl και 50μl) επί 24 ώρες. Εξέταση του βαθμού έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας CD95.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Επίδραση LDL οξειδωμένης σε διαφορετικούς χρόνους και παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) διαφορετικών συγκεντρώσεων στη βιωσιμότητα μονοπύρηνων, oxLDL: οξειδωμένη LDL.

Δείγμα	Αριθμός Μονοπύρηνων (x10 ⁶ κύτταρα/ml)	%Βιωσιμότητα
Μάρτυρας	1,3	100
0 ώρες oxLDL	1,32	98,5
3 ώρες oxLDL	1,6	98,8
6 ώρες oxLDL	2,26	95,45
ΠΤΛ1, 500μl	0,66	64,4
ΠΤΛ2, 50μl	1,0	84,3

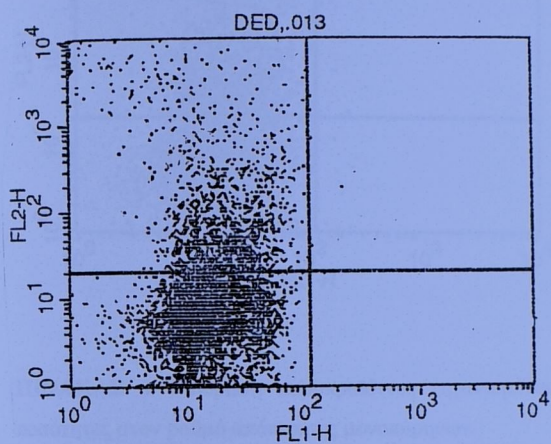
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επίδρασης LDL οξειδωμένης σε διαφορετικούς χρόνους και παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) σε διαφορετικές ποσότητες στην έκφραση του αντιγόνου CD95, oxLDL: οξειδωμένη LDL.

	Μάρτυρας	0 ώρες oxLDL	3 ώρες oxLDL	6 ώρες oxLDL	ΠΤΛ1 500μl	ΠΤΛ2 50μl
%Θετικά Κύτταρα anti-CD95 ⁺	27,3	4,1	13,08	24,72	32,42	3,5

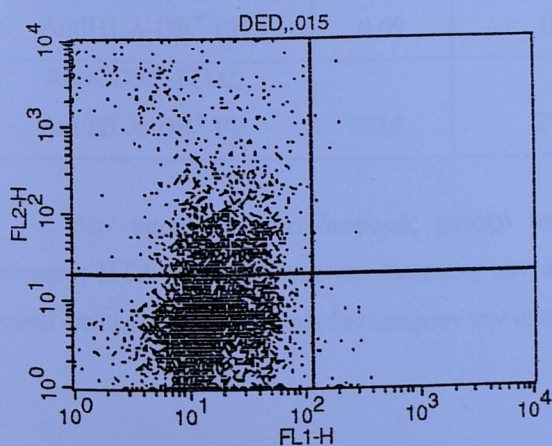
Ο αυξανόμενος χρόνος οξείδωσης της LDL φαίνεται να έχει ασθενή αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων. Επιπλέον, παρατηρούμε επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αύξηση του χρόνου οξείδωσης της LDL. Η ΠΤΛ μειώνει τη βιωσιμότητα των μονοπύρηνων και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η έκφραση του αντιγόνου επιφανείας CD95 αυξάνεται με το χρόνο οξείδωσης της LDL. Η προσθήκη 50 μL ΠΤΛ προκαλεί αύξηση του CD95, ενώ δεκαπλάσια ποσότητα (500 μl) προκαλεί σε μεγαλύτερο βαθμό έκφραση του CD95.

6.4 Επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων (20 μ l και 200 μ l) παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) στην έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD95 και HLA-DR σε μονοπύρηνια (Χρόνος επώασης 48 ώρες).

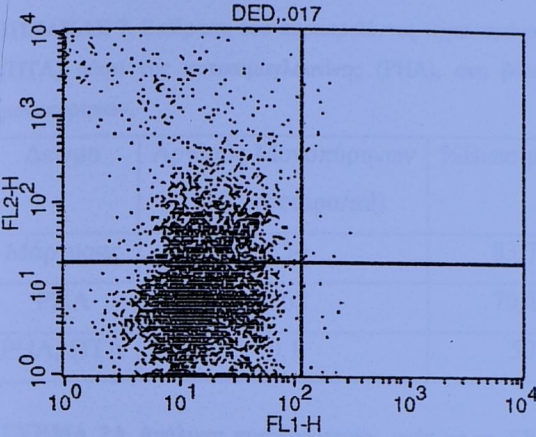
ΣΧΗΜΑ 1Α. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (μάρτυρας), FL1-H: antiCD95-FITC, FL2-H:antiHLA-DR-PE.



ΣΧΗΜΑ 1Β. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (ΠΤΛ1, 20 μ l), FL1-H: antiCD95-FITC, FL2-H: antiHLA-DR-PE.



ΣΧΗΜΑ 1Γ. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (ΠΤΛ2, 200μl), FL1-H: antiCD95-FITC, FL2-H: antiHLA-DR-PE.



ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Επίδραση παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) σε διαφορετικές ποσότητες στον βαθμό απόπτωσης μονοπύρηνων.

	%Θετικά Κύτταρα		
	Μάρτυρας	ΠΤΛ1 (20μl)	ΠΤΛ2 (200μl)
AntiCD95 ⁺ -FITC, AntiHLA-DR ⁻ -PE	0,02	0,38	0,21
AntiCD95 ⁺ -FITC, AntiHLA-DR ⁺ -PE	0,09	0,15	0,31
AntiCD95 ⁻ -FITC, AntiHLA-DR ⁺ -PE	27,2	27,45	28,68

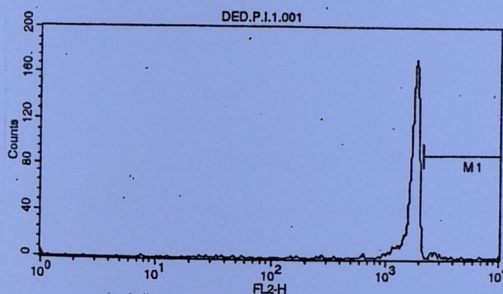
Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων ΠΤΛ. Τα δύο δείγματα ΠΤΛ δεν αυξάνουν την έκφραση των αντιγόνων CD95 και HLA-DR στο χρόνο επώασης (48 ώρες) και δεν επάγουν την απόπτωση στα μονοπύρηννα.

6.5 Επώαση μονοπύρηνων παρουσία φυτοαιμαγλουτίνης (PHA, 5μg/ml) και παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ, 500μg/ml) επί 72 ώρες και DNA ανάλυση με τη τεχνική ιωδιούχου προπιδίου (PI)

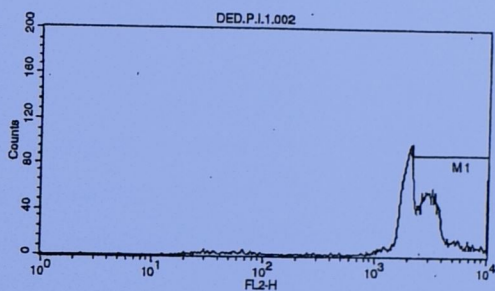
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Επίδραση του παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) ή/και της φυτοαιμαγλουτίνης (PHA), στη βιωσιμότητα μονοπύρηνων.

Δείγμα	Αριθμός Μονοπύρηνων ($\times 10^6$ κύτταρα/ml)	%Βιωσιμότητα
Μάρτυρας	0,34	83,78
PHA	0,62	70,83
PHA, ΠΤΛ	0,1	50

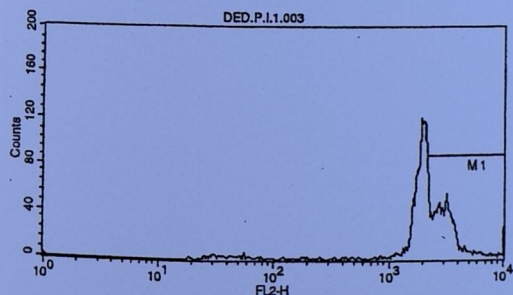
ΣΧΗΜΑ 2Α Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με τη μέθοδο ιωδιούχου προπιδίου σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (Μάρτυρας), FL2-H: ένταση φθορισμού, Counts: αριθμός κυττάρων.



ΣΧΗΜΑ 2Β Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με τη μέθοδο ιωδιούχου προπιδίου σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PHA), FL2-H: ένταση φθορισμού, Counts: αριθμός κυττάρων.



ΣΧΗΜΑ 2Γ Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με τη μέθοδο ιωδιούχου προπιδίου σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PHA, ΠΤΛ), FL2-H: ένταση φθορισμού, Counts: αριθμός κυττάρων



ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Επίδραση στον βαθμό απόπτωσης του παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού σε ενεργοποιημένα μονοπύρηνια με φυτοαιμαγλουτίνη.

Κυτταρομετρία Ροής	(-)	PHA	PHA, ΠΤΛ
Αριθμός Κυττάρων			
Σύνολο	3617	5864	6298
M1 θετικά	96	2526	3515

Η ενεργοποίηση των μονοπύρηνων με PHA προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων και επαγωγή της απόπτωσης ενώ προκαλεί μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των μονοπύρηνων. Η ταυτόχρονη προσθήκη και ΠΤΛ προκαλεί ισχυρή καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, περαιτέρω μείωση της βιωσιμότητας και επιπλέον αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων (αύξηση των M1 θετικών).

6.6 Επώαση K562 παρουσία πολυφαινολικών ουσιών διαφορετικών συγκεντρώσεων, επί 24 ώρες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Επίδραση των υπό μελέτη πολυφαινολών στη βιωσιμότητα των K562.

Δείγμα Πολυφαινολικών Ουσιών	Αριθμός K562 ($\times 10^6$ κύτταρα/ml)	%Βιωσιμότητα
p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (200 μ gr/ml)	1,6	100
Φερουλικό οξύ (100 μ gr/ml)	0,6	85,7
Ρουτίνη (50 μ gr/ml)	1,3	81,25
Συρινγικό οξύ (50 μ gr/ml)	0,7	100
p-Κουμαρικό οξύ (100 μ gr/ml)	0,2	100
Ο-Κουμαρικό οξύ (100 μ gr/ml)	0,7	87,5
Γαλλικό οξύ (200 μ gr/ml)	-	0
Ταννικό οξύ (200 μ gr/ml)	0,7	100
MeOH	0,4	100
H ₂ O	0,3	100

Η βιωσιμότητα των K562 φαίνεται ότι επηρεάζεται αρνητικά σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία του γαλλικού οξέος. Επιπλέον, το γαλλικό οξύ φαίνεται ότι επιδράει αποτελεσματικά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των K562.

6.7 Επώαση K562 και μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος παρουσία πολυφαινολικών ουσιών διαφορετικών συγκεντρώσεων επί 15 ώρες και μελέτη του βαθμού απόπτωσης με την μέθοδο ανεξίνης-V

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της επίπτωσης των υπό εξέταση πολυφαινολών στο βαθμό απόπτωσης K562 παρουσία μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος, PBMC: peripheral blood mononucleate cells (μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος) με τη μέθοδο ανεξίνης-V, p-OH-Bεν.: p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (200μgr/ml), ο-Κου.: ο-κουμαρικό οξύ (100μgr/ml), p-Κουμ: p-κουμαρικό οξύ (100μgr/ml), Γαλ: γαλλικό οξύ (200μgr/ml), Ρουτ.: ρουτίνη (50 μgr/ml), Συρ.: συρινγικό οξύ (50μgr/ml), Ταν.: ταννικό οξύ (200μgr/ml).

Ανεξίνη-V, %Αποπτωτικά (%Νεκρωτικά)	(-)	p-OH- Βεν.	ο- Κουμ.	p- Κουμ.	Γαλ.	Ρουτ.	Συρ.	Ταν.
PBMC	2,80 (0,06)	2,62 (0,30)	2,74 (0,12)	3,48 (0,04)	3,53 (0,00)	2,29 (0,02)	17,8 (0,92)	4,14 (0,04)
K562	27,1 (1,76)	22,0 (8,59)	35,1 (5,15)	32,8 (5,68)	18,8 (0,00)	33,1 (5,45)	36,5 (9,86)	41,6 (5,19)

Παρατηρείται αξιοσημείωτη επίδραση της πολυφαινόλης γαλλικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό της ρουτίνης στην επαγωγή απόπτωσης στα K562 παρουσία των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 Ερμηνεία πειραματικών δεδομένων

Η οξειδωμένη LDL επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων και μάλιστα όσο αυξάνεται ο χρόνος οξειδωσης της LDL, και επομένως και ο βαθμός οξειδωσης, τόσο αυξάνεται η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των μονοπύρηνων. Ομοίως, ο βαθμός απόπτωσης των μονοπύρηνων αυξάνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος οξειδωσης της LDL. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την αύξηση της έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας CD95 παράλληλα με την αύξηση του χρόνου οξειδωσης της LDL. Πιθανόν, όσο αυξάνεται η οξειδωτική τροποποίηση της LDL, να αυξάνεται η πρόσληψή της από υποδοχείς των μονοπύρηνων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μονοπύρηνων, την επαγωγή του πολλαπλασιασμού τους, τη μείωση της βιωσιμότητας και την αύξηση του βαθμού απόπτωσης. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την βιβλιογραφία., όπου η υψηλού βαθμού οξειδωση της LDL, προσλαμβάνεται πιο εύκολα από τους υποδοχείς των μακροφάγων (137). Επιπλέον, η δράση της οξειδωμένης LDL στα μονοπύρηννα πιθανόν να ενισχύει ένα ήδη φυσιολογικό μηχανισμό, κατά τον οποίο η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (ανήκουν στα μονοπύρηννα) επάγει την απόπτωση ώστε να διατηρείται η ομοιοστασία του λεμφοειδή πληθυσμού (152,153). Η απόπτωση των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων μπορεί να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων της IL-2 (148), όπου όπως έχει φανεί η παρουσία οξειδωμένης LDL σε μονοπύρηννα μειώνει τα επίπεδα IL-2 (146).

Η παρουσία παραπροϊόντος τηγανισμένου λαδιού (ΠΤΛ) σε διαφορετικές ποσότητες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιωσιμότητας, την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αύξηση της έκφρασης του αντιγόνου επιφανείας CD95 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το δείγμα ΠΤΛ που εξετάσαμε έχει κυτταροτοξική δράση στα μονοπύρηννα αυξάνοντας το βαθμό απόπτωσης όσο αυξάνεται η ποσότητα ΠΤΛ. Επιπλέον, φαίνεται ότι η παρουσία μικρότερων ποσοτήτων ΠΤΛ σε μονοπύρηννα δεν προκαλεί απόπτωση, ούτε επάγει την ενεργοποίηση τους. Πιθανόν, η μη ενεργοποίηση των μονοπύρηνων, να έχει ως αποτέλεσμα την μη ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης.

Η ενεργοποίηση των μονοπύρηνων με φυτοαιμαγλουτίνη (PHA) προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων και επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης. Η ταυτόχρονη προσθήκη και ΠΤΛ, σε μεγάλη ποσότητα, μειώνει τη συγκέντρωση των κυττάρων, και επιπλέον μειώνει περαιτέρω το ποσοστό βιωσιμότητας και το βαθμό απόπτωσης των μονοπύρηνων. Φαίνεται ότι το ΠΤΛ δρα

συνεργιστικά με τη ΡΗΑ ενεργοποιώντας ο συνδυασμός τους σε μεγαλύτερο βαθμό τα μονοπύρηνια και συνεπώς προκαλώντας μεγαλύτερου βαθμού απόπτωση.

Μελετώντας τη δράση διαφόρων πολυφαινολικών ουσιών στην επίδραση του βαθμού βιωσιμότητας των K562, διαπιστώσαμε ότι μόνο το γαλλικό οξύ επιδράει αρνητικά σε σημαντικό βαθμό στο ποσοστό βιωσιμότητας των K562, και μειώνει σημαντικά τη συγκέντρωση των K562. Μελετώντας το βαθμό απόπτωσης των K562 χρησιμοποιώντας τις παραπάνω πολυφαινολικές ουσίες βρίσκουμε ότι το γαλλικό οξύ και σε μικρότερο βαθμό η ρουτίνη προκαλούν σημαντικού βαθμού απόπτωση στα K562. Παρατηρούμε, ότι δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε την επίπτωση των πολυφαινολών στο βαθμό απόπτωσης των K562 ανάλογα με τη χημική ομάδα στην οποία ανήκουν, το οποίο συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (172). Το συρινγικό οξύ και το γαλλικό οξύ ανήκουν στην ομάδα των αλκοολών, εντούτοις, μόνο το γαλλικό οξύ εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια στα K562, ενώ αντίθετα το συρινγικό δεν επιδράει στη βιωσιμότητα των K562. Ομοίως, ενώ οι υπόλοιπες πολυφαινόλες ανήκουν στη ομάδα των υδροξυκινηματικών οξέων μόνο η ρουτίνη φαίνεται να επάγει την απόπτωση στα K562.

Από την παρούσα μελέτη, συμπεραίνουμε ότι: (1) ο βαθμός οξειδωσης της LDL καθορίζει το βαθμό απόπτωσης σε περιφερικά μονοπύρηνια σε υγιείς εθελοντές, (2) οι φαινολικές ουσίες επάγουν σε διαφορετικό βαθμό την απόπτωση σε νεοπλασματικά κύτταρα της ερυθρολευχαιμικής σειράς K562. Με δεδομένο, ότι οι περισσότερες από αυτές αναστέλλουν την οξειδωση της LDL, ενισχύεται η ευεργετική τους δράση αφού ταυτόχρονα προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα από την επαγωγή της απόπτωσης μέσω της oxLDL και από την άλλη ασκούν αντινεοπλασματική δράση σε καρκινικά κύτταρα.

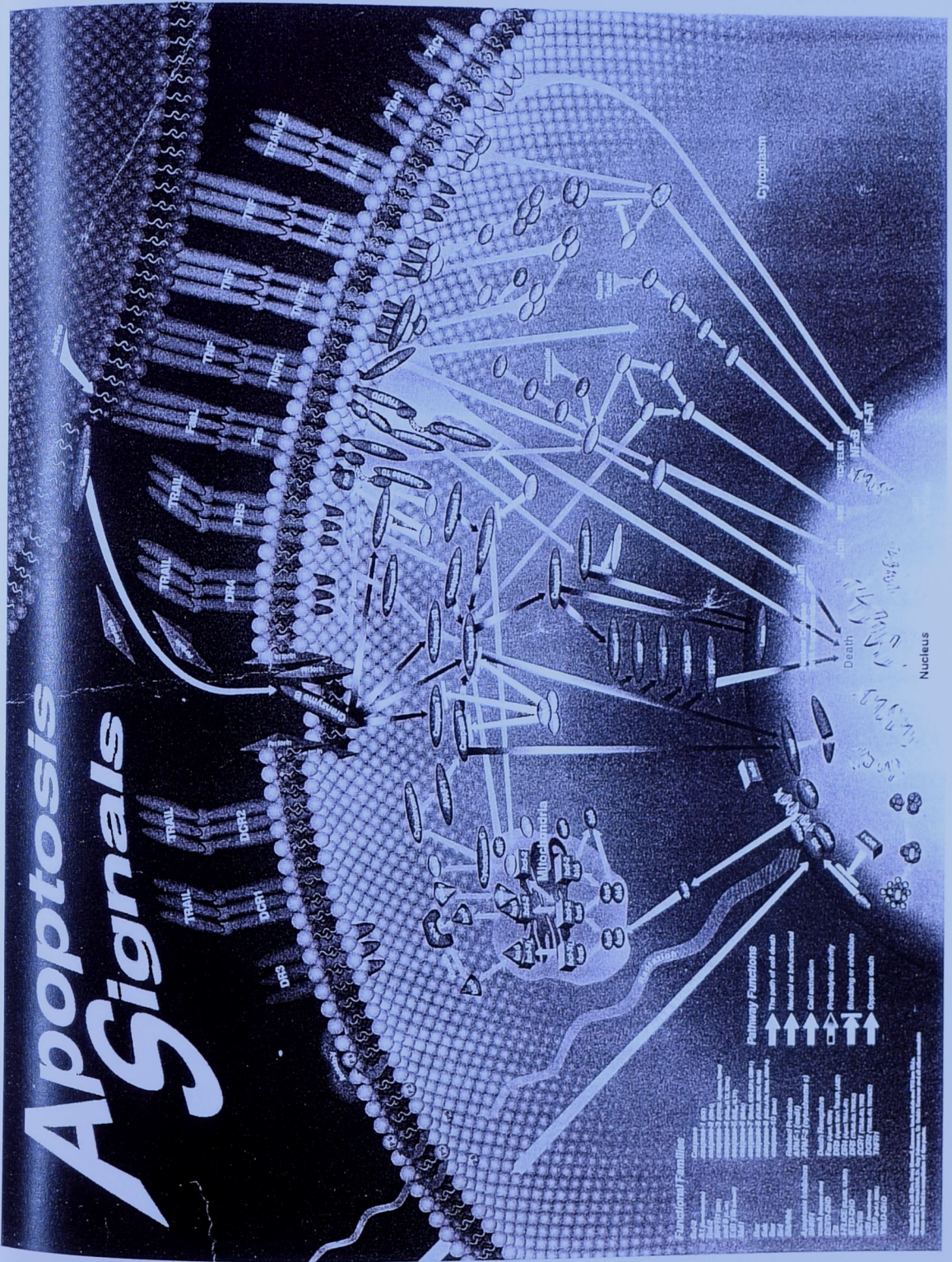
7.2 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Παρατηρούμε ότι ουσίες που ενεργοποιούν τα μονοπύρηνια επιδρούν αρνητικά στη βιωσιμότητά τους, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό, όχι σε όλες τις περιπτώσεις, και επάγουν την απόπτωση των μονοπύρηνων. Θα μπορούσαμε να εξετάσουμε την επίδραση αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως της βιταμίνης E, στο ποσοστό βιωσιμότητας, στη συγκέντρωση και στο βαθμό απόπτωσης σε ενεργοποιημένα μονοπύρηνια. Επιπλέον, θα μπορούσαμε να μελετήσουμε τα ανωτέρω σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον, να μελετήσουμε με ποιο τρόπο επάγεται η απόπτωση (π.χ. μέσω του ενδογενούς ή του εξωγενούς

μονοπατιού), στα μονοπύρηνα. Ακόμα, πιθανόν να ήταν χρήσιμο να μελετήσουμε τη συνεργιστική δράση πολυφαινολών σε συγκεντρώσεις που μπορεί να βρεθούν in vivo, στο ανθρώπινο πλάσμα, στη επίδραση του ποσοστού βιωσιμότητας και το βαθμό απόπτωσης των K562. Σίγουρα, είναι πολλά αυτά που πρέπει να εξεταστούν, και ακόμη περισσότερες οι προτεινόμενες ιδέες, άλλωστε αυτή είναι η ομορφιά της επιστήμης, η πρόκληση του άγνωστου!

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Μηχανισμοί Απόπτωσης. Μία εικόνα όσο χίλιες λέξεις! (6)



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stephen McPhee *Παθολογική Φυσιολογία*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα. 2000.
2. Baynes J., Dominiczak M. H. *Medical Biochemistry*, Mosby, New York. 1999.
3. Abbas Abul K., Lichtman Andrew H., Pober Jordan S. *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1997.
4. Fischbach Frances *Εγχειρίδιο Εργαστηριακών Εξετάσεων*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα. 1999.
5. Guyton A. *Φυσιολογία του Ανθρώπου*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα. 1990.
6. Cruse Julius M., Lewis Robert E. *Atlas of Immunology*, Springer CRC PRESS, New York. 2000.
7. Raff MC 1996 "Size Control: the Regulation of Cell Numbers in Animal Development", *Cell*, 86: 173-75.
8. Vogt C. *Untersuchung uber die Entwicklungs geschichte der Geburtshelferkrote (Alytes obstetricians)*, JU Gassman, Berlin. 1842.
9. Kerr JFR, et al. 1972 "Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics", *Br. J. Cancer*, 26: 239-57.
10. Ellis HM, et al. 1986 "Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. Elegans*", *Cell*, 44: 817-29.
11. Jacobson MD, et al. 1997 "Programmed Cell Death in Animal Development", *Cell*, 88:347.
12. Hunot S, et al. 2001 "Death of Monopoly?", *Science*, 292: 865-66.
13. Finkel E 2001 "The Mitochondrion: Is It Central to Apoptosis?", *Science*, 292: 624-625.
14. King Roger J.B., *Cancer Biology*, Prentice Hall, Harlow, England. 2000.
15. Kerr AHW, et al. 1980 "Cell Death: the Significance of Apoptosis", *Int. Rev. Cytol.*, 68:251-306.
16. Strasser A, et al. 2000 "Apoptosis Signaling", *Annu. Rev. Biochem.*, 69:217-45.
17. Vander Heiden MG, et al. 1997 "Bcl-X_L Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria", *Cell*, 91:627-37.

18. Kluck RM, et al. 1997 "The Release of Cytochrome c from Mitochondria: a Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis", *Science*, 275:1132-36.
19. Yang J, et al. 1997 "Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked", *Science*, 1129-32.
20. Susin SA, et al. 1999 "Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor", *Nature*, 397: 441-46.
21. Wyllie AH, et al. 1980 "Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis is Associated with Endogenous Endonuclease Activity", *Nature*, 284:555-56.
22. Fadok VA, et al. 1998 "Apoptosis: Getting Rid of the Bodies", *Curr. Biol.*, 8:R693-95.
23. Gavrieli Y, et al. 1992 "Identification of Programmed Cell Death in situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation", *J. Cell Biol.*, 119:493-501.
24. Koopman G, et al. 1994 "Annexin V for Flowcytometry Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis", *Blood*, 84:1415-20.
25. Nicoletti I, et al. 1991 "A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry", *J. Immunol. Methods*, 139:271-79.
26. Carr Antony M 2000 "Piecing Together the p53 Puzzle", *Science*, 287:1765-1766.
27. Nicholson DW, et al. 1997 "Caspases: Killer Proteases", *Trends Biochem. Sci.*, 22:299-306.
28. Alnemri ES, et al. 1996 "Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature", *Cell*, 87:171.
29. Kumar S, et al. 1996, *Cell Death Differ.*, 3:255-67.
30. Walker NPC, et al. 1994 "Crystal Structure of the Cysteine Protease Interleukin-1 Beta Converting Enzyme: a (P20/P10)₂ Homodimer", *Cell*, 78:343-52.
31. Wilson KP, et al. 1994 "Structure and Mechanism of Interleukin-1 Beta Converting Enzyme", *Nature*, 370:270-75.
32. Rotonda J, et al. 1996 "The Three-Dimensional Structure of Apopain/CPP32, a Key Mediator of Apoptosis", *Nat. Struct. Biol.*, 3:619-625.
33. Muzio M, et al. 1998 "An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation", *J. Biol. Chem.*, 273:2926-30.

34. Martin DA, et al. 1998 "Membrane Oligomerization and Cleavage Activates the Caspase-8 (FLICE/MACH Alpha 1) Death Signal", *J. Biol. Chem.*, 273:4345-49.
35. Spirinvasula SM, et al. 1998 "Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-Mediated Oligomerization", *Mol. Cell*, 1:949-57.
36. Thornberry NA, et al. 1998 "Caspases: Enemies Within", *Science*, 281:1312-16.
37. Ashkenazi A, et al. 1998 "Death Receptors: Signaling and Modulation", *Science*, 281: 1305-8.
38. Hofmann K, et al. 1997 "The CARD Domain a New Apoptotic Signalling Motif", *Trends Biochem. Sci.*, 22:155-56.
39. Boldin MP, et al. 1995 "A Novel Protein that Interacts with the Death Domain of FAS/APO-1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain", *J. Biol. Chem.*, 270:7795-98.
40. Chinnaiyan AM, et al. 1995 "FADD, a Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis", *Cell*, 81:505-12.
41. Medema JP, et al. 1997 "FLICE is Activated by Association with the CD95, Death-Inducing Signaling Complex (DISC)", *EMBO J.*, 16:2794-804.
42. Kischkel FC, et al. 1995 "Cytotoxicity-Dependent APO-1 (FAS/CD95)-Associated Proteins Form a Death-Inducing Signaling Complex (DISC) with the Receptor", *EMBO J.*, 14:5579-88.
43. Nagata S 1997 "Apoptosis by Death Factor", *Cell*, 88:355-65.
44. Wallach D, et al. 1998 "Death Inducing Functions of Ligands of the Tumor Necrosis Factor Family: a Sanhedrin Verdict", *Curr. Opin. Immunol.*, 10:279-88.
45. Tanaka M, et al. 1998 "Downregulation of FAS Ligand by Shedding", *Nat. Med.*, 4:21-22.
46. Schneider P, et al. 1998 "Conversion of Membrane-Bound Fas (CD95) Ligand to its Soluble Form is Associated with Downregulation of its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity", *J. Exp. Med.*, 187:1205-13.
47. Strasser A, et al. 1998 "Fas Ligand Caught Between Scylla and Charybdis", *Nat. Med.*, 4:21-22.

48. Itoh N, et al. 1993 "A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Ligand", *J. Biol. Chem.*, 268:10932-37.
49. Tartaglia LA, et al. 1993 "A Novel Domain within the 55kD TNF Receptor Signals Cell Death". *Cell*, 74:845-53.
50. Gibson L, et al. 1996 "Bcl-W, a Novel Member of the Bcl-2 Family Promotes cell Survival", *Oncogene*, 13:655-75.
51. Lin EY, et al. 1996 "A1, a Bcl-2 Family Member, Promotes Cell Survival and Permits Myeloid Differentiation", *Blood*, 87:983-92.
52. Strasser A, et al. 1995 "Bcl-2 and FAS/APO-1 Regulate Distinct Pathways to Lymphocyte Apoptosis", *EMBO J.*, 14:6136-47.
53. Huang DC, et al. 1997 "Bcl-2, Bcl-X_L and Adenovirus Protein E1B19K are Functionally Equivalent in their Ability to Inhibit Cell Death", *Oncogene*, 14:405-14.
54. Zhou P, et al. 1998 "Mcl-1 in Transgenic Mice Promotes Survival in a Spectrum of Hematopoietic Cell Types and Immortalization in the Myeloid Lineage", *Blood*, 92:226-39.
55. Yang E, et al. 1995 "Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-X_L and Bcl-2, Displaces Bax and Promotes Cell Death", *Cell*, 80:285-91.
56. Oltvai ZN, et al. 1993 "Bcl-2 Heterodimerizes in vivo a Conserved Homolog, Bax, that Accelerates Programmed Cell Death", *Cell*, 74:609-19.
57. Boise LH, et al. 1993 "Bcl-X, a Bcl-2 Related Gene that Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death", *Cell*, 74:597-608.
58. Chittenden T, et al. 1995 "Induction of Apoptosis by the Bcl-2 Homologue Bax", *Nature*, 374:733-36.
59. Kiefer MC, et al. 1995 "Modulation of Apoptosis by the Widely Distributed Bcl-2 Homologue Bak", *Nature*, 374:736-39.
60. Farrow SN, et al. 1995 "Cloning of a Bcl-2 Homologue, by Interaction with Adenovirus E1B19kD", *Nature*, 374:731-33.
61. Adams JM, et al. 1998 "The Bcl-2 Protein Family Arbiters of Cell Survival", *Science*, 281:1322-26.
62. Boyd JM, et al. 1995 "Bik, a Novel Death-Inducing Protein Shares a Distinct Sequence Motif with Bcl-2 Family Protein and Interacts with Viral and Cellular Survival-Promoting Proteins", *Oncogene*, 11:1921-28.

63. Han J, et al. 1996 "Induction of Apoptosis by Human Nbk/Bik, a BH3-Containing Protein that Interacts with E1B19K", *Mol. Cell. Biol.*, 16:5857-64.
64. Wang K, et al. 1996 "BID: a Novel BH3 Domain only Death Agonist", *Genes Dev.*, 10:2859-69.
65. Inohara N, et al. 1997 "Harakiri, a Novel Regulator of Cell Death, Encodes a Protein that Activates Apoptosis and Interacts Selectively with Survival Promoting Proteins Bcl-2 and Bcl-X_L", *EMBO J.*, 16:1686-94.
66. O'Connor, et al. 1998 "Bim: a Novel Member of the Bcl-2 Family that Promotes Apoptosis", *EMBO J.*, 17:384-95.
67. Hsu SY, et al. 1998 "BOD (Bcl-2-Related Ovarian Death Gene) is an Ovarian BH3 Domain-Containing Proapoptotic Bcl-2 Protein Capable of Dimerization with Diverse Antiapoptotic Bcl-2 Members", *Mol. Endocrinol.*, 12:1432-40.
68. Hsu SY, et al. 1997 "Bak is a Pro-Apoptotic Bcl-2 Protein with Restricted Expression in Reproductive Tissues and Heterodimerizes with Selective Antiapoptotic Bcl-2 Family Members", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12401-6.
69. Hedge R, et al. 1998 "Blk, a BH3-Containing Mouse Protein that Interacts with Bcl-2 and Bcl-X_L, is a Potent Death Agonist", *J. Biol. Chem.*, 273:7783-86.
70. Oltvai ZN, et al. 1994 "Checkpoints of Dueling Dimmers Foil Death Wishes", *Cell*, 93:189-92.
71. Conradt B, et al. 1998 "The C. Elegans Protein EGL-1 is Required for Programmed Cell Death and Interacts with the Bcl-2 like Protein CED-9", *Cell*, 93:519-29.
72. Scaffidi C, et al. 1998 "Two CD95 (APO-1/Fas) Signaling Pathways", *EMBO J.*, 17:1675-87.
73. Chinnaiyan AM, et al. 1997 "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a Molecular Framework for Cell Death", *Science*, 275:1122-26.
74. Cohen F, et al. 1998 "Pathologic Conformations of Prion Proteins", *Ann. Rev. Biochem.*, 67:793-819.
75. Joza N, et al. 2001 "Essential Role of the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor in Programmed Cell Death", *Nature*, 410:549.
76. Zheng TS, et al. 1999 "Caspase Knockouts: Matters of Life and Death", *Cell Death Differ.*, 6:1043.

77. Zheng TS, et al. 2000 "Deficiency in Caspase-9 or Caspase-3 Induces Compensatory Caspase Activation", *Nat. Med.*, 6:1241-7.
78. Susin SA, et al. 1999 "Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor", *Nature*, 397:441.
79. Lorenzo HK, et al. 1999 "Apoptosis Inducing Factor (AIF): a Phylogenetically Old, Caspase-Independent Effector of Cell Death", *Cell Death Differ.*, 6:516.
80. Sperandio S, et al. 2000 "An Alternative, Nonapoptotic Form of Programmed Cell Death", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:14376-14381.
81. Schweichel JU, et al. 1972 "Electron Microscopic Studies on the Degradation of the Apical Ridge during the Development of Limbs in Rat Embryos", *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 136:192-203.
82. Schweichel JU, et al. 1973 "The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues", *Teratology*, 7:253-266.
83. Schwartz LM 1991 "The Role of Cell Death Genes during Development", *Bio Essays*, 13:389-395.
84. Clarke PG 1990 "Developmental Cell Death: Morphological Diversity and Multiple Mechanisms", *Anat. Embryol.*, 181:195-213.
85. Lockshin RA, et al. 1964, *J. Insect Physiol.*, 10:643-649.
86. Pilar G, et al. 1976 "Ultrastructural Differences during Embryonic Cell Death in Normal and Peripherally Derived Ciliary Ganglia", *J. Cell Biol.*, 68:339-356.
87. Oppenheim RW 1991 "Cell Death Development of the Nervous System", *Annu. Rev. Neurosci.*, 14:453-501.
88. Oppenheim RW 1985, *Trends Neurosci*, 17:487-493.
89. Cunningham TJ 1982 "Naturally Occuring Neuron Death and its Regulation by Developing Neural Pathways", *Int. Rev. Cytol.*, 74:163-186.
90. Dal Canto MC, et al. 1994 "Development of Central Nervous System Pathology in a Murine Transgenic Model of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis", *Am. J. Pathol.*, 145:1271-1279.
91. Majno G, et al. 1995 "Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death.", *Am. J. Pathol.*, 146:3-15
92. Raff MC, et al. 1992 "Social Controls on Cell Survival and Cell Death", *Nature*, 356:397-400.

93. Strasser A, et al. 1995 "Life and Death during Lymphocyte Development and Function: Evidence for two Distinct Killing Mechanisms", *Curr. Opin. Immunol.*, 7:228-34.
94. Veis DJ, et al. 1993 "Bcl-2-Deficient Mice Demonstrate Fulminant Lymphoid Apoptosis, Polycystic kidneys, and Hypopigmented Hair", *Cell*, 75:229-40
95. Motoyama N, et al. 1995 "Massive Cell Death of Immature Hematopoietic Cells and Neurons in Bcl-X-Deficient Mice", *Science*, 267:1506-10.
96. Kuida K, et al. 1996 "Decreased Apoptosis in the Brain and Premature Lethality in CPP32-Deficient Mice", *Nature*, 384:368-72.
97. Woo M, et al. 1998 "Essential Contribution of Caspase 3/CPP32 to Apoptosis and its Associated Nuclear Changes", *Genes Dev.*, 12:806-19.
98. Hakem R, et al. 1998 "Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathway in vivo", *Cell*, 94:339-52.
99. Kuida K, et al. 1998 "Reduced Apoptosis and Cytochrome C-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9", *Cell*, 94:325-37.
100. Yoshida H, et al. 1998 "Apaf-1 is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development", *Cell*, 94:325-37.
101. Cecconi F, et al. 1998 "Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development", *Cell*, 94:739-50.
102. Coucounanis E, et al. 1995 "Signals for Death and Survival: a two-step Mechanism for Cavitation in the Vertebrate Embryo", *Cell*, 83:279-87.
103. Varfolomeer EE, et al. 1998 "Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apaf1, and DR3 and is Lethal Eventually", *Immunity*, 9:267-76.
104. Yeh WC, et al. 1998 "FADD: Essential for Embryo Development and Signaling from some, but not all, Inducers of Apoptosis", *Science*, 279:1954-58.
105. Soenghas MS, et al. 1999 "Apaf-1 and Caspase-9 in p53-dependent Apoptosis and Tumor Inhibition", *Science*, 284:156-159.
106. Coffe FE, et al. 1999 "Antisense Therapy of Hematologic Malignancies", *Semin. Hematol.*, 36/4 Suppl.6:9-14.
107. Ambrosini G, et al. 1997 "A Novel Antiapoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma", *Nat. Med.*, 3:917-921.

108. Strasser A, et al. 1994 "DNA Damage can Induce Apoptosis in Proliferating Lymphoid Cells, via p53-independent Mechanisms Inhibitable by Bcl-2", *Cell*, 79:329-39.
109. McCurrach ME, et al. 1997 "Bax-deficient Promotes Drug Resistance and Oncogenic Transformation by Attenuating p53-dependent Apoptosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2345-49.
110. Strasser A 1995 "Apoptosis. Death of a T Cell", *Nature*, 373:385-86.
111. Golstein P, et al. 1991 "Cell Death Mechanisms and the Immune System", *Immunol. Rev.*, 121:29-65.
112. Strasser A, et al. 1991 "Enforced Bcl-2 Expression in B-lymphoid Cells Prolongs Antibody Response and Elicits Autoimmune Disease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8661-65.
113. Bouillet P, et al. 1999 "Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for certain Apoptotic Responses Leukocyte Hemostasis, and to Preclude Autoimmunity.", *Science*, 286:1735-38.
114. Stasser A, et al. 1992 "The Role of Bcl-2 in Lymphoid Differentiation and Neoplastic Transformation", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 182:299-302.
115. Smith KG, et al. 1994 "Bcl-2 Increases Memory B Cell Recruitment but does not Perturb Selection in Germinal Centers", *Immunity*, 1:808-13.
116. Watanabe-Fukunaga, et al. 1992 "Lymphoproliferation Disorder in Mice Explained by Defects in Fas Antigen that Mediates Apoptosis", *Nature*, 356:314-17.
117. Adachi M, et al. 1995 "Targeted Mutation in the Fas Gene Causes Hyperplasia in Peripheral Lymphoid Organs and Liver", *Nat. Genet.*,
118. Takahashi T, et al. 1994 "Generalised Lymphoproliferative Disease in Mice, Caused by a Point Mutation in the Fas ligand", *Cell*, 76:969-76.
119. Lynch DH, et al. 1994 "The Mouse Fas-ligand Gene is Mutated in gld Mice and is part of a TNF Family Gene Cluster", *Immunity*, 1:131-36.
120. Rieux-Laucat F, et al. 1995 "Mutations in Fas Associated with Human Lymphoproliferative Syndrome and Autoimmunity", *Science*, 268:1347-49.
121. Fisher GH, et al. 1995 "Dominant Interfering Fas Gene Mutations Impair Apoptosis in a Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome", *Cell*, 81:935-46.

122. Vaux DL, et al. 1994 "An Evolutionary Perspective on Apoptosis", *Cell*, 76:777-79.
123. Tschoopp J, et al. 1998 "The Fight of Viruses against Apoptosis", *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8:82-87.
124. Lowe SW, et al. 1993 "Stabilization of the p53 Tumor Suppressor is Induced by Adenovirus 5 E1A and Accompanies Apoptosis", *Genes Dev.*, 7:535-45
125. Negue-Salvayre, et al. 1990 "Ultraviolet-treated Lipoproteins as a Model System for the Study of the Lipid Peroxides on Cultures Cells. Uptake and Cytotoxicity of Ultraviolet -treated LDL on Lymphoid Cell Lines", *Biochim Biophys. Acta*, 1045:224-232.
126. Escargueil-Blanc, et al. 1994 "Necrosis and Apoptosis Induced by Oxidised Low Density Lipoproteins Occur Through Two Calcium-dependent Pathways in Lymphoblastic Cells", *FASEB J.*, 8:1075-1080.
127. Boissoneault GA, et al. 1991 "Oxysterols, Cholesterol Biosynthesis and Vascular Endothelial Cell Monolayer Barrier Function", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196:338-343.
128. Zhou Q, et al. 1993 "Cytotoxicity of Oxysterols on Cultured Smooth Muscle Cells from Human Umbilical Arteries", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 202:75-80.
129. Hughes H, et al. 1994 "Cytotoxicity of Oxidised LDL to Porcine Aortic Smooth Muscle Cells in Association with the Oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol", *Arterioscler. Thromb.*, 14:1177-1185.
130. Escargueil I, et al. 1992 "Oxidised Low Density Lipoproteins Elicit DNA Fragmentation of Cultured Lymphoblastoid Cells", *FEBS Lett.*, 305:155-159.
131. Pace GW, et al. 1995 "The Role of Oxidative Stress in HIV Disease", *Free Radical Biol. Med.*, 19:523-528.
132. Holvoet P, et al. 1994 "Oxidised Lipoproteins in Atherosclerosis and Thrombosis", *FASEB J.*, 1279-1294.
133. Grunfeld C, et al. 1992 "Lipids, Lipoproteins, Triglyceride Clearance, and Cytokines in Human Immunodeficiency Virus Infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74:1045-1052.
134. Goldstein JL, et al. 2001 "The Cholesterol Quartet", *Science*, 292:1310-12.
135. Kane J. P. and Huel R. J. *In the Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw Hill, New York. 2001.
136. Muller C, et al. 1938, *Acta Med. Scand.*, 89:75.

137. Lusis AJ, et al. 2000 "Atherosclerosis", *Nature*, 407:233-241.
138. Fortun A, et al 2001 "Monocytes Influence the Fate of T Cells Challenged with Oxidised Low Density Lipoproteins towards Apoptosis or MHC-restricted Proliferation", *Atherosclerosis*, 156:11-21.
139. Goldstein JL, et al. 1979 "Binding Site on Macrophages that Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:333-337.
140. Knowles JW, et al. 2000 "Enhanced Atherosclerosis and kidney Dysfunction in eNOS (-/-) Apoe (-/-) Mice are Ameliorated by Enalapril Treatment", *J. Clin. Invest.*, 105:451-458.
141. Suzuki H, et al. 1997 "A Role for Macrophage Scavenger Receptors in Atherosclerosis and Susceptibility to Infection", *Nature*, 386:292-296.
142. Kockx MM, et al. 2000 "Apoptosis in Atherosclerosis: Beneficial or Detrimental? ", *Cardiovas. Res.*, 45:736-746.
143. Geng YJ, et al. 1995 "Evidence for Apoptosis in Advanced Human Atheroma. Colocalization with Interleukine-1 beta-Converting Enzyme", *Am. J. Pathology*, 147:251-266.
144. Björkerud S, et al. 1995 "Apoptosis is Abundant in Human Atherosclerotic Lesions especially in Inflammatory Cells (Macrophages and T Cells) and may Contribute to the Accumulation of Debris and Plaque Instability", *Am. J. Pathology*, 147:267-277.
145. Napoli C, et al. 2000 "Mildly Oxidised Low Density Lipoprotein Activates Multiple Apoptotic Signaling Pathways in Human Coronary Cells", *FASEB J.*, 14:1996-2007.
146. Viora M, et al. 1997 "Oxidised Low Density Lipoproteins Impair Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and Cytokine Production", *Biochem. Biophysic. Res. Com.*, 232:359-363.
147. Chan SH, et al. 1991 "Induction of Interferon Gamma Production by Natural Killer Cell Stimulatory Factor: Characterization of the Responder Cells and Synergy with other Inducers", *J. Exp. Med.*, 173: 869-879.
148. Farrar MA, et al. 1993 "The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptors", *Ann. Rev. Immunology*, 11:571-580.

149. De Santis JB, et al. 1996 "Expression and Function of Low-Density Lipoprotein Receptors in CD3- CD16+ CD56+ Cells: Effect of Interleukin-2", *Cell Immunol.*, 167:18-29.
150. Malorni W, et al. 1997 "Oxidised Low-Density Lipoproteins Affect Natural Killer Cell Activity by Impairing Cytoskeleton Function and Altering the Cytokine Network", *Exper. Cell Res.*, 236:436-445.
151. Alcouffe J, et al. 1999 "Oxidized Low Density Lipoproteins Induce Apoptosis in PHA-activated Peripheral Blood Mononuclear Cells and the Jurkat T-Cell Line", *J. Lip. Res.*, 40:1200-1210.
152. Boise LH, et al. 1996 "Hierarchical Control of Lymphocyte Survival", *Science*, 274:67-68.
153. Broome HE, et al. 1995 "Expression of Bcl-2, Bcl-x and Bax after T Cell Activation and IL-2 Withdrawl", *J. Immunol.*, 155:2311-2317.
154. Visioli F, et al. 1995 "Low Density Lipoprotein Oxidation is Inhibited in vitro by Olive Oil Constituents", *Atherosclerosis*, 117:25-32.
155. Μπόσκου Δ. *Χημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη 1997.
156. Ames BN, et al. 1993 "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90:7915-7922.
157. Grishman MB, et al. 1994 "Oxidants and Free Radicals in Inflammatory Bowel Disease", *Lancet*, 344:859-861.
158. Scalbert A, et al. 2000 "Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols", *J. Nutr.*, 130:2073S-2085S.
159. Shahidi F. and Naczk M. *Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects, Applications*, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster. 1995.
160. Boskou D. *Olive Oil Chemistry and Technology*, AOCS Press, Champaign. 1996.
161. Reinli K, et al. 1996 "Phytoestrogen Content of Foods: a Compendium of Literature Values", *Nutr. Cancer*, 26:123-148.
162. Rousseff RC, et al. 1987 "Quantitative Survey of Narirutin, Naringin, Hesperidin, and Neohesperidin in Citrus", *J. Agric. Food Chem.*, 35:1027-1030.
163. Hertog MGL, et al. 1992 "Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits commonly Consumed in the Netherlands", *J. Agric. Food Chem.*, 40:2379-2383.

164. Hertog MGL, et al. 1993a "Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Tea Infusions, Wine and Fruit Juices", *J. Agric. Food Chem.*, 41:1242-1246.
165. Hara Y, et al. 1995 "Special Issue on Tea", *Food Rev. Int.*, 11:371-542.
166. Frankel EN, et al. 1995 "Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and their Antioxidants Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins", *J. Agric. Food Chem.* 43:890-894.
167. Arts IC, et al. 1999 "Chocolate as a Source of Tea Flavonoids", *Lancet*, 354:488.
168. Jang M, et al. 1997 "Cancer Chemoprevention Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes", *Science*, 275:218-220.
169. Axelsson M, et al. 1982 "Origin of Ligands in Mammals and Identification of a Precursor from Plants", *Nature*, 298:654-660.
170. Köhnau S, et al. 1976 "The Flavonoids: a Class of Semi-Essential Food Components: their Role in Human Nutrition", *World Rev. Nutr. Diet.*, 24:117-191.
171. Yang GY, et al. 1998 "Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Human Cancer Cell Lines by Ten Polyphenols", *Carcinogenesis*, 19:611-6.
172. Kuntz S., et al. 1999 "Comparative Analysis of the Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity, and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines", *Eur. J. Nutr.*, 38:133-42.
173. Hsieh TC, et al. 1999 "Differential Effects on Growth, Cell Cycle Arrest, and Induction of Apoptosis by Resveratrol in Human Prostate Cancer Cell Lines", *Exp. Cell Res.*, 249:109-15
174. Caderni G, et al. 1999 "Effect of Complex Polyphenols on Colon Carcinogenesis", *Eur. J. Nutr.*, 38:126-132.
175. Samaha HS, et al. 1997 "Modulation of Apoptosis by Sulnidas, Curcumin, Phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexisothiocyanate: Apoptotic Index as a Biomarker in Colon Cancer Chemoprevention and Promotion", *Cancer Res.*, 37:1301-1305.
176. Nogaki A, et al. 1998 "Radical Intensity and Cytotoxic Activity of Curcumin and Gallic Acid", *Anticancer Res.*, 18:3487-3492.

177. Jung MY, et al. 2001 "Capsaicin-induced Apoptosis in SK-Hep-1 Hepatocarcinoma Cells Involves Bcl-2 Downregulation and Caspase-3 Activation", *Cancer Lett.*, 26:139-45.
178. Morre DJ, et al. 1996 "Capsaicin Inhibits Plasma Membrane NADH Oxidase and Growth of Human and Mouse Melanoma Lines", *Eur. J. Cancer*, 32A:1995-2003.
179. Palombia L, et al. 1999 "The antioxidant Butylated Hydroxytoluene Induces Apoptosis in Human U937 Cells: The Role of Hydrogen Peroxide and Altered Redox State", *Free Rad. Res.*, 31:93-101.

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Υπερ.Βιβ/κης Χαροκόπειου Παν/μίου.954916

* 9 1 3 6 *



HU

