



ISSN 1105-4999

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

JANUARY
JUNE 2012

ΤΟΜΟΣ
VOLUME 24

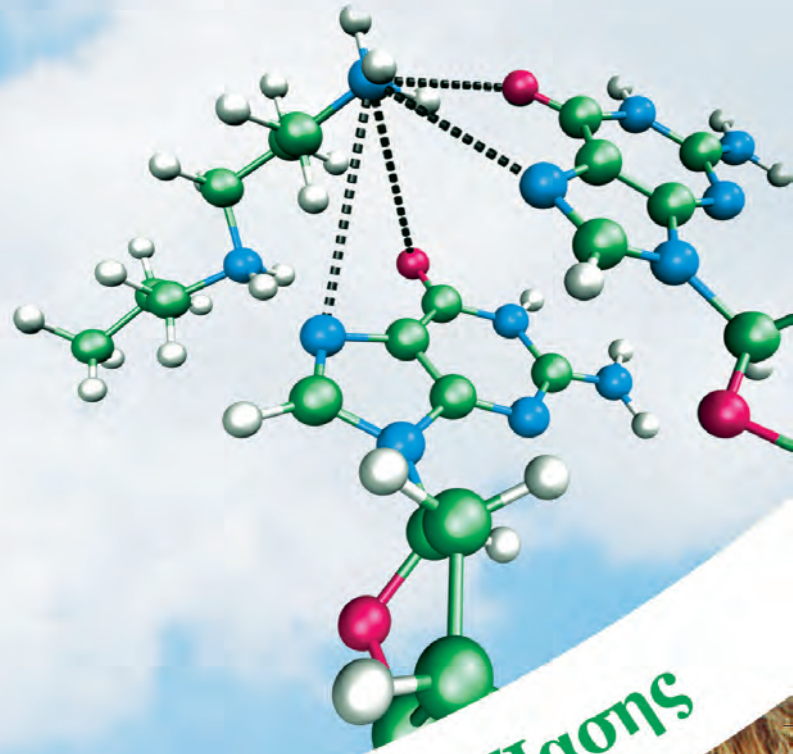
ΤΕΥΧΟΣ
NUMBER I-II

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES TOPICS





Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ύασης



 Galenica α.ε.

ΑΘΗΝΑ: Ελευθερίας 4, 145 64 Κηφισιά • Τηλ.: 210 5281700, Fax: 210 5245939 • ΘΕΣ/ΚΗ: Κουντουριώτου & Φασιανού 2 • Τηλ.: 2310 542685 • <http://www.galenica.gr>

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Τριμηνιαία έκδοση με θέματα
Φαρμακευτικών Επιστημών

Τόμος 24, Τεύχος I-II, Ιανουάριος - Ιούνιος 2012

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

A. Τσαντίλη

Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ:

Γ. Α. Καρίκας

Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών
karikasg@teiath.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Β. Δημόπουλος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

N. Κόλμαν, Galenica SA

X. Κοντογιώργης,

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης,

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαρόπουλος,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας,

Επίκ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή,

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

EMAIL ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

PHARMAKEFTIKI

A quarterly edition
on pharmaceutical sciences' topics

Volume 24, Issue I-II, January - June 2012

EDITOR:

A. Tsantili

Professor, University of Athens
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR:

G.A. Karikas

Professor, Technological Educational Institute of Athens
karikasg@teiath.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos,

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos,

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman, Galenica SA

Ch. Kontogiorgis,

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis,

Emeritus Professor, University of Thessaloniki

P. Macheras,

Professor, University of Athens

S. Nikolaropoulos,

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas,

Assistant Professor, University of Patras

I. Panderi,

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas,

Associate Professor, University of Athens

EMAIL FOR ABSTRACT SUBMISSION:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς επισκεφτείτε την διεύθυνση
www.hsmc.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition
and instructions to authors please visit
www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται στην Φαρμακευτική
καταχωρούνται στα Chemical Abstracts.

Articles published in Pharmakeftiki
are abstracted in Chemical Abstracts.

ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΤΑΞΗ	1	EDITORIAL	1
ΑΡΘΡΑ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ		REVIEW ARTICLES	
Πρόσφατες Επιστημονικές Πρόοδοι της Θεωρίας Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Stress για την Γήρανση. Αντιοξειδωτικά Συμπληρώματα Διατροφής ή Θερμιδικός Περιορισμός για την Αντιστροφή της Γήρανσης; <i>Αθανάσιος Βαλαβανίδης</i> <i>Θώμη Βλαχογιάννη</i> <i>Κωνσταντίνος Φιωτάκης</i>	2-12	Recent Scientific Advances on the Free Radical and Oxidative Stress Theory of Ageing. Dietary Supplements of Antioxidants or Caloric Restriction for Reversing Ageing? <i>Athanasios Valavanidis</i> <i>Thomie Vlachogianni</i> <i>Konstantinos Fiotakis</i>	2-12
Οξειδωτικό Stress και Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II <i>Ανδρέου Ε. Δήμητρα</i> <i>Ανδρέαδου Ιωάννα</i>	13-33	Oxidative Stress and type II Diabetes Mellitus <i>Dimitra Andreou</i> <i>Ioanna Andreadou</i>	13-33
Σύντομη Ανασκόπηση του Βιολογικού Ρόλου και των Φαρμακευτικών Ιδιοτήτων της Ταυρίνης. Χρήσεις, εφαρμογές και προοπτικές. <i>Σ. Κέλλα</i> <i>Π. Πλαγεράς</i> <i>Α. Παπαϊωάννου</i> <i>Ι. Αναστασοπούλου</i> <i>Θ. Θεοφανίδης</i>	34-39	Brief Overview of the Biological Role and Pharmaceutical Properties of Taurine. Uses, applications and perspectives. <i>S. Kella</i> <i>P. Plageras</i> <i>A. Papaioannou</i> <i>I. Anastassopoulou</i> <i>Th.Theofanidis</i>	34-39
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ		RESEARCH ARTICLES	
Επίδραση του υπερικού του διάτρητου (<i>Hypericum perforatum</i> L) στην επούλωση τραύματος δέρματος επιμύων. <i>Σαπουνάκης Κ.</i> <i>Χατζηγιάνη Ε.</i> <i>Κώτσιου Α.</i> <i>Τεσσερομιάτη Χ.</i>	40-41	<i>Hypericum perforatum</i> L Induced Acceleration on Wound Healing Process in Rats. <i>Sapounakis Constantin</i> <i>Chatzigianni Emmy</i> <i>Kotsiou Antonia</i> <i>Tesseromatis Christine</i>	40-41

Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοχημείας

ZITA ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΕΣ
ΚΑΙ ΤΟΥΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΑΕ
1ο χλμ Παιανίας - Μαρκοπούλου
19002, Παιανία, Ελλάδα
Τηλ: +30 211 100 1770-71
E-mail: info@zita-congress.gr

Hellenic Society of Medicinal Chemistry Management Office

ZITA CONGRESS SA
1st klm Peanias-Markopoulou
19002, Peania, Greece
Tel: +30 211 100 1770-71
Email: info@zita-congress.gr

**Αγαπητοί συνάδελφοι,
Αγαπητοί αναγνώστες**

Μετά απο δυο περίπου χρόνια σιωπής λόγω οικονομικών προβλημάτων του εκδότη, η “Φαρμακευτική” είναι και παλι στα χέρια σας. Το νέο ξεκίνημα του περιοδικού, το οποίο ανέλαβε να εκδίδει η Εταιρεία Zita-Congress, αποτελεί μεγάλη χαρά για μας. Με νέους, άξιους συναδέλφους να πλαισιώνουν τη Συντακτική Επιτροπή η “Φαρμακευτική” θα διατηρήσει τη φυσιογνωμία της ως τριμηνιαίο περιοδικό με θέματα Φαρμακευτικών Επιστημών, ενώ παράλληλα ευελπιστούμε ότι θα βελτιωθεί και θα εκσυγχρονιστεί η έκδοσή της, αξιοποιώντας αποτελεσματικότερα τις δυνατότητες της τεχνολογίας. Τα άρθρα που δημοσιεύονται στη “Φαρμακευτική” – στην αγγλική ή ελληνική γλώσσα με αγγλική περίληψη- καταχωρούνται στα Chemical Abstracts ενώ γίνονται ενέργειες για να ενεργοποιηθούν εκ νέου οι καταχωρήσεις στις βάσεις δεδομένων EMBASE και Scopus.

Ελπίζουμε η “Φαρμακευτική” ως το μόνο αμιγώς επιστημονικό περιοδικό στο χώρο των Φαρμακευτικών Επιστημών στην Ελλάδα, να αποτελέσει και πάλι ένα βήμα ενημέρωσης και προβολής σύγχρονων επιστημονικών εξελίξεων, καλύπτοντας το κενό που είχε δημιουργηθεί με την αναστολή της έκδοσής της και παρακαλούμε για την ενεργή υποστήριξή σας.

Η Συντακτική Επιτροπή

Recent Scientific Advances on the Free Radical and Oxidative Stress Theory of Ageing.

Dietary Supplements of Antioxidants or Caloric Restriction for Reversing Ageing?

Athanasios Valavanidis, Thomie Vlachogianni and Konstantinos Fiotakis

Department of Chemistry, University of Athens,
University Campus Zografou, 15784 Athens, Greece

Summary

Theories were proposed through the years for the reasons of ageing in aerobic biological systems. Some of these theories lost favor because of lack of scientific support but other remained as potential avenues of biogerontological research. In the 1950s Denham Harman announced his seminal proposal that reactive oxygen species (ROS) are an important cause of ageing. He proposed that free radicals formed endogenously as by-products from normal metabolism played an important role in ageing, as well as the mitochondria because these organelles proved to be a major site of ROS production. Aerobic organisms under normal conditions accumulate oxidative damage to cellular macromolecules (imbalance of pro-oxidants and antioxidants agents) that increases during ageing, contributing progressively to increased oxidative stress and to the decline of cellular processes. In the last decades new clues have been discovered about the role of oxidative stress in the mammalian ageing and a deeper understanding has been developed of age-related diseases in humans. The current research tested the direct involvement of oxidative stress in ageing in mice and other organisms and the data support the oxidative theory of ageing. Supplements with antioxidant vitamins/minerals during randomized clinical trials showed conflicting efficacy data on improving various oxidative stress diseases. Caloric (or calorie) restriction (CR) in the other hand proved to be beneficial in metabolic, hormonal and functional changes in adult men and women. This review presents the most important advances in scientific research and experiments *in vivo* for the oxidative theory of ageing.

Introduction

The origins of the free radical theory of ageing (or aging) go back to the 1950s when it was discovered that oxygen free radicals formed *in situ* in the cellular compartments of the aerobic organisms in response to radiation and oxygen metabolism are responsible for various oxidative damage.^{1,2}

Denham Harman, noting that radiation and oxygen poisoning “induces mutations, cancer and ageing”, proposed that oxygen free radicals that are formed endogenously from normal oxygen-utilizing metabolic processes (specifically hydroxyl, HO[•], and hydroperoxyl radicals,

HO₂) play an essential role in the ageing process.³ Traditionally, chemists thought that free radicals are very limited in biological systems, because of their reactivity and short half-life, despite the reports to the contrary and their detection by various scientists in biological materials.^{4,5}

Then, a very important discovery of superoxide dismutase (SOD) by McCord and Fridovich in 1969 and the demonstration of the existence of hydrogen peroxide (H₂O₂) *in vivo* in 1979, gave credibility to the theory of free radicals.^{6,7} In 1972, Harman added a modification to his theory, giving a central role to the mitochondria of the aerobic organisms, because these organelles generate a large amount of reactive oxygen species (ROS, the term has been established as meaning oxygen free radicals and highly oxidant oxygen chemicals, such as H₂O₂) in cells.⁸ In the following years, the theory was supported by new experimental evidence, namely that oxidative cellular damage, through oxidative stress in aerobic organisms, increases during ageing and that mitochondria are central to ageing. Studies showed that mitochondria DNA deletions and point mutations (mtDNA) are induced by oxidative stress and accumulate with age in aerobic organisms from worms to humans.⁹⁻¹²

The hypothesis of free radicals of ageing has been refined in the last decades encompassing also other forms of reactive oxygen substances, such as peroxides, aldehydes, nitrogen oxides and other compounds which contribute to oxidative damage in cells. A chronic state of oxidative stress exists in cells of aerobic organisms even under normal physiological conditions because of an imbalance of prooxidant and antioxidant substances and enzymes.¹³ This imbalance leads to a steady-state accumulation of oxidative damage for a variety of important macromolecules (proteins, enzymes, lipids, DNA, etc) that increases during ageing. Progressively, these damages lead to loss of functional efficiency of cellular metabolic processes. A “strong” version of oxidative stress determines life span, while a “weaker” version of oxidative stress is associated mainly with age-related diseases.¹⁴

Reactive oxygen species (ROS) are from one hand very important for the physiological metabolic processes of aerobic organisms, including humans, but at the same time generate oxidative stress which changes dramatically with age. Also, there is mounting genetic evidence that links oxidants and oxidative stress responsiveness to ageing. In

this respect, there are great challenges but also numerous difficulties for the development of anti-ageing therapies (antioxidant supplements, calorie restriction, special diet techniques, etc) or changes to life style in order to reverse the ageing process and increase longevity.

Oxidant productions and antioxidant defences in aerobic organisms

The various reactive oxygen species (ROS), that can be free radicals ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}) or oxidative species (H_2O_2) are produced under physiological conditions in all aerobic organisms and play a very important part in energy productions, various metabolic mechanisms and other cellular functions. Most estimates suggest that the majority of intracellular ROS production is derived from mitochondria.^{15,16}

The evolutionary process of aerobic organisms for millions of years in an oxygenic air environment on Earth was successful because of the development at the same time of effective antioxidant mechanisms. The burden of ROS production is largely counteracted by an intricate antioxidant defence system that includes enzymatic and non-enzymatic substances. The most important antioxidant

enzymatic scavengers are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidases (GPx). In addition to these well characterized antioxidant enzymes, at least five members of a new family of peroxide scavengers termed peroxiredoxins have recently isolated.¹⁷

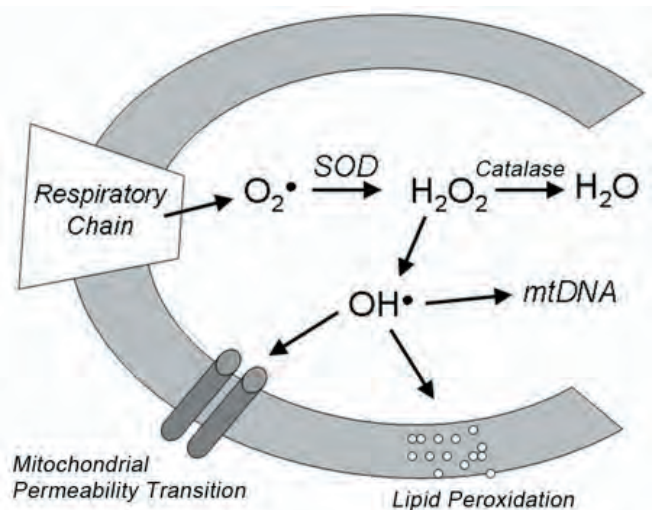


Figure 2. Reactive oxygen species (ROS) are produced by mitochondria respiratory chain reactions (and by some other cellular metabolic functions). The antioxidant enzymes Superoxide dismutase (SOD) can dismutate $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 and Catalase (CAT) can transform it into water (H_2O). But the antioxidant reactions are not 100% effective and some hydroxyl radicals (HO^{\cdot}) can be generated (through the reaction of H_2O_2 with metals, such as Fe^{2+} , Fenton reaction). Hydroxyl radicals are highly reactive and can damage proteins, lipids and DNA (including mitochondrial DNA, mtDNA).

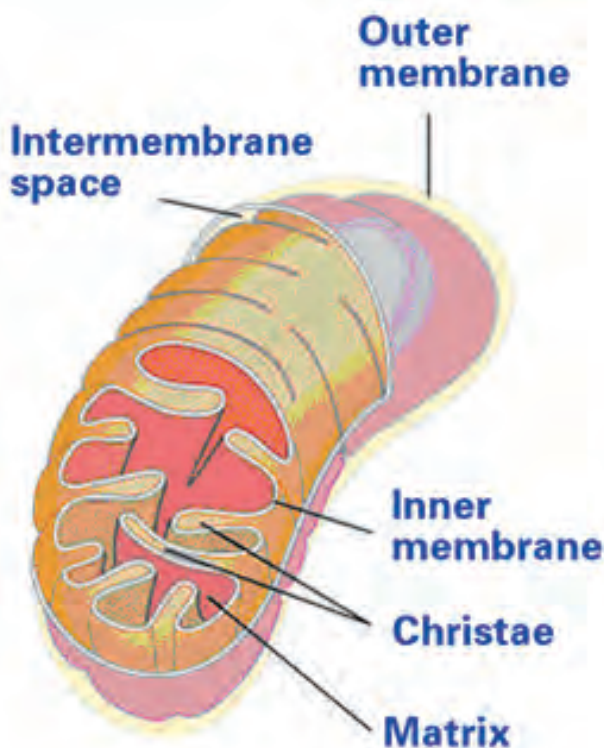


Figure 1. Mitochondria are microscopic bodies in the cytoplasm of every cell. Mitochondria contain many oxidative enzyme systems, producing energy (in the form of ATP) for many cell functions. They are the most important locus for the production of reactive oxygen species (ROS), like superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and other oxygen species capable of generating the oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2).

A variety of other non-enzymatic, low molecular mass molecules, such as ascorbic acid, uric acid, flavonoids, carotenoids, glutathione, pyruvate, are present in millimolar concentrations within cells and are effective scavengers of ROS.¹⁸

The balance between ROS production and antioxidant defences determines the degree of oxidative stress in biological systems. As a consequence of the oxidative stress the “escaped” ROS cause oxidative damage to proteins, enzymes, membrane lipids and nuclear DNA. The most widely studied oxidative stress-induced modifications are to proteins.¹⁹

Several studies have shown that ageing cells and organisms accumulate increased levels of oxidant-damaged nuclear DNA.²⁰ Also, mitochondrial DNA (mtDNA) because of the proximity to the main source of oxidant generation, or because of a limited DNA repair system, mtDNA is generally considered to be even more sensitive than nuclear DNA to oxidative damage.²¹

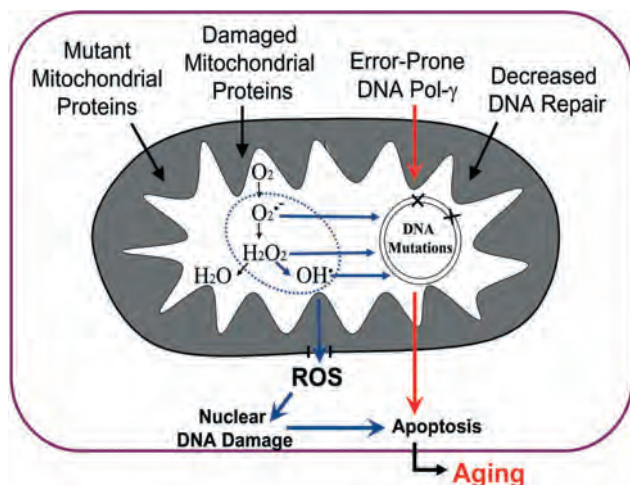


Figure 3. ROS and free radicals such as HO^{\bullet} can cause oxidative damage to mitochondrial proteins, mutations in mtDNA or decrease the DNA repair mechanisms. Also, ROS can escape the mitochondrial membrane causing nuclear DNA damage in cells, or apoptosis because of DNA mutations. These oxidative damages advance ageing of organisms.

Oxidative stress, biology of ageing, diseases and cancer

Although maximum life span (longevity) is the most relevant and defined endpoint of with regard to ageing, in large multicellular organisms ageing does not proceed uniformly. This concept of focal ageing or segmented progeria, is particularly important in a variety of age-related human diseases. The two most important age-related diseases are cardiovascular and neurodegenerative disorders that increase exponentially with age. Also, in the last decades there is a growing convergence between the our understanding of the biology of ageing and the basic mechanisms that underlie cancer.²²

The maintenance of DNA represents a fundamental and continuous problem to every cell. DNA repair and genomic stability in aerobic organisms have been explained in recent years and there are multiple pathways to sense and repair damaged DNA in cells, depending on the nature of damage and on the phase of the cell cycle. Genomic instability is a hallmark of most cancers but also the hallmark of ageing. Age-dependent increase in chromosomal instability has been known for some time to occur in simple organisms (such as yeast) but also in mammals.^{23,24}

Increasing evidence from laboratory, animal and clinical studies indicate that ROS may participate in the pathogenesis of these diseases. Experiments showed that the vessel wall of patients with atherosclerotic risk factors, but no overt disease, is characterized by significant increase in vascular ROS production.²⁵ Mutations in genes that regulate antioxidant enzymes (such as SOD, glutathione, etc) and deficiencies in antioxidant vitamins E or A have been found by *in vivo* experiments to increase the risk for

atherosclerosis, retinal degeneration and familial amyloidotic lateral sclerosis.²⁶⁻²⁸

The common feature to many of these diseases of ageing is the recruitment of inflammatory cells. These cells contribute to oxidative stress in large part because they contain the potent NADPH oxidase system. The NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) is a membrane-bound enzyme complex which is present in neutrophils, macrophages, microglia and vascular cells. Once activated, the NADPH oxidase produces large amounts of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$). Although superoxide can be reduced to H_2O_2 by SOD, small amounts escape the enzymatic dismutation and react with nitric oxide (NO^{\bullet}) producing endogenously the oxidant peroxynitrite ($NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^{\bullet -}$) and other highly damaging radical species. The link between inflammation and ROS seems to provide a useful framework for understanding oxidative stress and disease progression.²⁹⁻³¹

The role of micronutrients (vitamins, minerals, biochemicals), oxidative stress and longevity

For most of human evolution, caloric shortage probably limited population growth. The advent of agriculture made diets rich in calories and nutrients. The introduction of potato in Europe and rice varieties in Asia were major factors enabling high population growth and density. Although caloric shortage is a thing of the past for most of the countries on the global scale, the abundance of carbohydrates, meat, fat-rich foods, inexpensive processed foods and sugary drinks generated a new epidemic of obesity associated with micronutrient malnutrition.^{32,33}

Numerous epidemiological and clinical studies in the past decades have demonstrated that regular fruit and vegetable consumption (rich in polyphenols, flavonoids and other antioxidants) reduces cellular oxidative damage, increases plasma antioxidants and reduces the risk for various age-related diseases and mortality.³⁴⁻³⁷

Dietary research and nutritional supplementation with antioxidants advanced in response to these studies. The clinical use of antioxidant vitamins, minerals and biochemicals has gained considerable interest during the last decade.³⁹⁻⁴¹

Based on these promising data, supplements of vitamins (E, C, A, D, B₆, B₁₂), minerals (Zn, Ca, Mg, etc) and biochemicals (α -lipoic acid, curcumin, melatonin, resveratrol, isoflavones, etc) were applied through protocols aimed to prevent age-related diseases. Prevention of cardiovascular diseases was an obvious subject (atherosclerosis, hypertension, coronary vasculature, etc) with antioxidants, but the results were conflicting for the efficacy of antioxidants.⁴²⁻⁴⁶

Chronic Obstructive Pulmonary Diseases (COPD) is connected with oxidative stress. Targeting oxidative stress with antioxidants is obviously a likely goal for beneficial treatment of COPD, but results were very limited.⁴⁷ Treat-

ment of amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis with antioxidants showed conflicting evidence for the efficacy of antioxidants.^{48,49} The majority of clinical trials identified positive effects for supplementation with antioxidants for the type 2 diabetes.⁵⁰ Ambiguous clinical results have been found in the treatment of cognitive impairment and neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease) with antioxidants.^{51,52} Oxidative DNA damage (as measured with the biomarker of the mutagenic adduct 8-OHdG) decreases substantially with supplementation of vitamin D and calcium.⁵³

Are concentrations of plasma antioxidants and longevity in centenarians connected? The question was answered by scientists with the measurements of plasma levels of vitamin C, uric acid, vitamin E and A, carotenoids, activity of SOD and GPx in healthy centenarians, elderly aged 80-99 years and over 60 years of age. From the results it is evident that healthy centenarians show a particular profile in which high levels of vitamins seem to be important in guaranteeing their extreme longevity.⁵⁴ Antioxidant status in elderly persons is a predictor for health and longevity.^{55,56}

Daily human diet intake needs around 40 essential micronutrients. The optimum amount of micronutrients is essential to maximize the protection of important biological macromolecules from oxidative damage and keep the metabolic network. Dietary intake of micronutrients changes with age⁵⁷ (Table 1).

Table 1: RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCE OF MICRONUTRIENTS

Micronutrient	RDA (recommended dietary allowance)
<i>Minerals</i>	
Iron (Fe)	18,000 (women 20-30 years) µg 8,000 (women 50+ years) µg
Zinc (Zn)	8,000-11,000 (women/men 50+ years) µg
Selenium (Se)	20-65 µg
<i>Vitamins</i>	
Vitamin E (a-tocopherol)	6-10 mg
Vitamin C (ascorbic acid)	40-60 mg
Folic acid	150-200, 400 (pregnant women) µg
B ₆	0,3-2,0 mg
B ₁₂	0,3-2,0 µg
<i>Biochemicals</i>	Flavonoids, polyphenols, α-lopic acid, isoflavones, caretonoids, glutathione, niacin,

Caloric restriction can be beneficial for chronic diseases, cancer and ageing

The first research on caloric (or calorie) restriction in experimental animals was contacted in 1935. Caloric restriction in rats (implemented after puberty), extended median and maximum life span and prevented the severity of chronic diseases.⁵⁸ Subsequent experiments in different species (rodents, flies, fish, yeast) have shown that caloric restriction, defined as a reduction of food (diet, calories) without malnutrition, slows ageing, increase maximum life span and reduces the extend of diseases and cancer.^{59,60}

The age when caloric restriction is started, the severity of diet restriction and the genetic background of the animal determine the extend of life extension. In rodents (rats or mice) a 30% to 60% reduction in caloric intake below the usual *ad libitum* intake of food (in accordance with desire) caused a proportionate 30% to 60% increase in maximum life span. The experiments showed slow primary ageing and extend of maximum life span for rats and mice.^{61,62} Also, experiments with rodents with intermittent fasting (or alternate-day feeding) increases resistance to stress and prolongs maximum life span.⁶³

Studies of caloric restriction with rodents found that delayed the occurrence of chronic diseases, including diabetes, atherosclerosis, cardiomyopathy, autoimmune diseases, kidney and respiratory diseases and various cancers.⁶⁴⁻⁶⁶ In addition, caloric restriction has been proved to decrease neurodegeneration in the brain and enhance neurogenesis in animal models of Alzheimer's and Parkinson diseases, Huntington disease and stroke.⁶⁷⁻⁶⁹

Scientists suggest that the mechanisms responsible for caloric restriction-mediated beneficial effects on primary ageing (in rodents) probably involve the metabolic adaptation to restriction itself, including:

(a) caloric restriction (CR) decreased production of reactive oxygen species (ROS) and modulation of the endogenous antioxidant systems, which decrease oxidative stress that induce damages to tissues.^{70,71}

(b) decreased circulating triiodothyronine (T₃) (serum thyroid hormone) levels and sympathetic nervous system activity, which cause a decrease in body temperature and whole-body resting energy expenditure from baseline.⁷²⁻⁷⁴

(c) decrease plasma concentrations of inflammatory cytokines and a mild increase of cortisol, which reduces systemic inflammation.^{75,76}

(d) protection of the immune system, which with ageing is becoming weaker.⁷⁷

(e) increased expression of protein chaperons, such as heat shock protein 70, and neurotrophic factors.⁷⁸

(e) CR decreased plasma concentrations of anabolic hormones and growth factors, which are involved in ageing and tumorigenesis.^{79,80}

(f) CR enhanced DNA repair processes,⁸¹ increased removal of damaged cellular proteins and oxidized lipids, and decreased glycation end products.⁸²

Experimental data suggest that many of the cellular effects of CR are mediated by regulating gene expression, through up-regulation of genes involved in repair and survival mechanism (by protecting against oxidative damage), down-regulation of genes involved in mediating inflammation and prevention of changes in gene expression that occur with ageing.^{83,84}

Caloric restriction and ageing in experimental animals

Animal models for studies of caloric restriction for many years included yeast, worms, flies and laboratory rodents (mice and rats) and in the last decade nonhuman primates.^{85,86}

Experiments of dietary restriction (caloric restriction), i.e. a reduction of food intake by 40-60% without malnutrition, has been proved to have remarkable benefits for health and lifespan in diverse species, as yeast, roundworms, flies and rodents. The roundworm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) has been used in a great variety of caloric restriction experiments.^{87,88} As in yeast and flies, over-expression of the *Caenorhabditis elegans* sirtuin gene *sir-2.1* leads to extension of lifespan and deletion of the gene shortens lifespan.⁸⁹

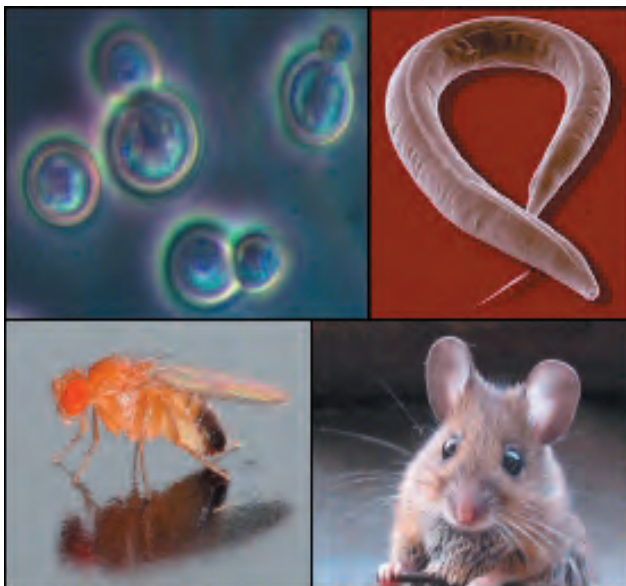


Figure 4. Model organisms of ageing studies: yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), roundworms (*Caenorhabditis elegans*), fruit flies (*Drosophila melanogaster*) and mice. Caloric restriction studies with these model organisms decreased oxidative stress biomarkers and increased substantially their life span.

Scientists were studying for years the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its replicative ageing. A screen for genes that determine yeast replicative lifespan identified the SIR complex (including the Sir2 histone deacetylase). Yeast Sir2 is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) –dependent histone (protein) deacetylase that has been proposed to mediate effects of life extension under caloric restriction.^{90,91} Sir proteins were already known to be involved in gene silencing (SIR stands for Silent Information Regulator). Sir2 is one of several enzymes that remove acetyl tags from the histones, but requires the small molecule of NAD (known as a conduit of many metabolic reactions in cells). This association between Sir2 and NAD is very important because it links Sir2 activity to metabolism and thus potentially to the relation between diet and ageing observed in caloric restriction.⁹²⁻⁹⁴

Another experimental animal for studying mechanisms of ageing is the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The life span of *Drosophila melanogaster*, under experimental conditions of caloric or dietary restriction, was extended.⁹⁵⁻⁹⁸

Rodents (mice and rats) and primates were used in experiments for the study of caloric restriction on ageing and longevity. It is not yet known whether caloric restriction affects primary ageing and extends maximum life span on long lived mammals. There are ongoing studies that evaluating the effect of such restriction on ageing in mice and rats with positive outcome.⁹⁹⁻¹⁰¹ Experiments with **rhesus monkeys** will probably take another 10 to 15 years before adequate data are available for reliable results. Nonetheless, the data currently available from these studies have shown that many of the metabolic, hormonal, anti-inflammatory, and body compositional changes that occur in caloric-restricted rodents also occur under similar conditions in caloric-restricted monkeys.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Experiments of caloric restriction and ageing in humans

Studies of caloric restriction and the effects on longevity in humans are very difficult to come to a definite conclusion because there are no validated biomarkers that can serve as surrogate markers of ageing. Also, there are practical difficulties to conduct randomized, diet-controlled, long-term survival studies in humans.^{106,107}

There are data from epidemiological studies which suggest that diet restriction can have beneficial effects on the factors involved in the pathogenesis of primary and secondary ageing and life expectancy in humans. During the World War I and II there were food shortages in many European countries that were associated with sharp decrease in coronary heart disease mortality. After the end of the war the cardiovascular diseases increased again.^{108,109} In another study it was found that the Japanese in the Okinawa island are consuming 30% less calories than the average Japanese population and had 35% lower rates of cardiovascular disease and

lower cancer mortality than the average Japanese. Also, they had one of the highest number of centenarians in the world.¹¹⁰

However, these associations are not enough indicators that can prove a relationship between decreased caloric restriction and improved effects in longevity and decrease in ageing diseases.

There are more than ten recent human studies with voluntary self imposed caloric restriction or accidental induced caloric restriction for short-term randomized controlled trials (6-12 months). These studies examined the connection between caloric restriction and biological adaptations that might be responsible for the slowed ageing process. Findings from these studies were very promising. The caloric restriction group of men and women, compared to the control group, showed decreased body fat and body mass index (BMI), blood pressure, marked reduction in metabolic risk factors for coronary heart disease, decrease levels of insulin, decreased T_3 levels, improved lipid profile, decreased TNF- α /adiponectin ratio and levels of insulin and glucose, lower plasma concentrations of inflammatory markers, and other beneficial markers of reduced oxidative stress and ageing.¹¹¹⁻¹²⁰

Some studies found also that CR decreased bone mass as well lower extremity muscle mass and strength. Despite many similarities in the metabolic adaptation to CR observed in rodents and humans, it is not known if such restriction affects maximum lifespan in humans. Obesity is associated with serious medical diseases and premature mortality. Weight loss induced by CR (negative energy balance) simultaneously improves multiple metabolic risk factors for cardiovascular disease and other medical abnormalities associated with obesity. In the other hand, it must be emphasized that excessive caloric restriction (defined as a decrease in calorie intake that is more than 45% of the energy requirements can cause anemia, muscle wasting, neurologic deficits, lower extremity edema, weakness, dizziness, lethargy and depression.^{66,68}

Genetics, dietary restriction and mechanisms of ageing in small organisms

Molecular biologists discovered in recent years that the ageing process is subject to regulation by classical signaling pathways and transcription factors in biological systems. Many of these pathways were discovered for the first time in small, short-lived organisms such as yeast, worms, flies and rodents. It was found that many mutations that extend lifespan affect stress-response genes or nutrient sensors. When food is plentiful and stress levels are low, these genes support growth and reproduction, but under harsh conditions their activities change (some up and others are turned down) and as consequence the animal undergoes a global physiological shift towards

cell protection and maintenance. These shifts protect the animal from environmental stresses and it also extends lifespan.¹²¹

Nutrient and stress sensors mediate lifespan extensions that occur in response to many different environmental and physiological signals. The best known of these signals is dietary (or caloric) restriction, which extends lifespan in many species, from yeast to primates.¹²²

In worms, flies and mice (as well as yeast), genetic and/or phenotypic analysis suggests that chronic dietary restriction increases lifespan by downregulating TOR activity. The TOR pathway (kinase Target Of Rapamycin, a protein) is known to regulate autophagy and translation (see Figure 5). The small arrows indicate upregulation or downregulation. In worms and flies, lifespan extension by means of TOR inhibition has been shown to require autophagy, and in all three species, inhibiting translation by inactivating the TOR target ribosomal S6 kinase increases lifespan. PHA-4 is required for autophagy in *Caenorhabditis elegans* TOR mutants. PHA-4 also affects expression of stress-response genes in response to dietary restriction; its effect on translation has not been examined. In flies, components of the respiratory electron transport chain escape translational inhibition when TOR activity is reduced, resulting in increased respiration.¹²¹

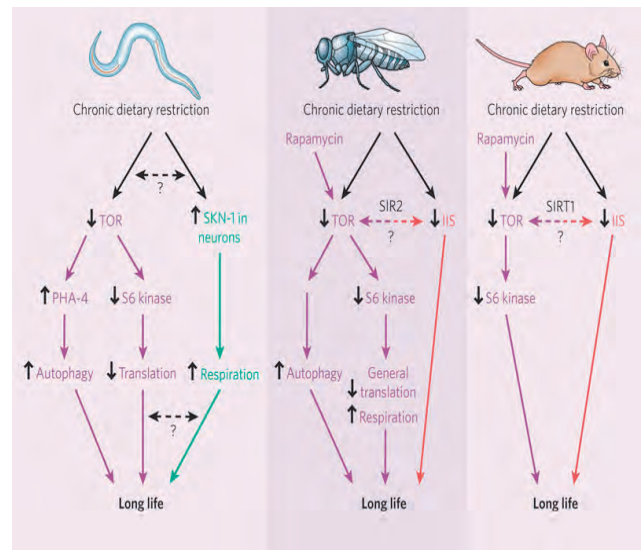


Figure 5. Mechanisms of chronic dietary restriction in experimental animals such as *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* and mouse, with beneficial effects on oxidative stress and prolonged lifespan.¹²¹

Chronic dietary restriction also increases respiration in worms, in response to activity of the SKN-1 transcription factor in neurons (green). In worms and flies, this increase in respiration has been shown to contribute to lifespan extension. Whether TOR affects respiration in worms, or SKN-1 affects respiration in flies, is not known. In flies and mice, chronic dietary restriction may increase lifespan, at

least in part, by downregulating insulin/IGF-1 signaling (IIS, red). Sirtuins are required for chronic dietary restriction to extend lifespan in flies and mice, but whether they act in the insulin/IGF-1 and/or TOR pathways is not known.¹²³⁻¹²⁶

Conclusions

One of the most widely accepted theories of ageing is the free radical or oxidative stress theory. Reactive oxygen species (ROS) are byproducts of energy metabolism and oxygen consumption in aerobic organisms, resulting in the slow but steady damage, which accelerates with ageing, of membrane lipids, proteins-enzymes and DNA. These damages progressively lead to degenerative diseases, organ dysfunction, cancer and death. Caloric intake is an important determinant of health. Inadequate or excessive energy intake can have detrimental effects in the body composition, organ functions and ageing. Experiments with animal models showed that caloric restriction (CR) decreased ageing processes, restricted degenerative diseases and prolong maximum lifespan. Experiment with humans showed that caloric restriction although does not prolong lifespan, decreases degenerative diseases, and has a beneficial effect on the quality of late life by reducing the burden of chronic diseases. Additional studies are needed to identify the molecular and cellular mechanisms responsible for the CR effects and to discover reliable and sensitive biomarkers of ageing.

References

1. Gilbert DL, Colton CA. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Kluwer Academic, New York, 1999.
2. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Fenn WO. Influence of x-irradiation on oxygen poisoning in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 86:27-29, 1954.
3. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300, 1956.
4. Gerschman R, Gilbert DL, Nye, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation; a mechanism in common. *Science* 119:623-626, 1954.
5. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 174:689-691, 1954.
6. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969.
7. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605, 1979.
8. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145-147, 1972.
9. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4533-4537, 1990.

Πρόσφατες Επιστημονικές Προόδους της Θεωρίας Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Stress για την Γήρανση.

Αντιοξειδωτικά Συμπληρώματα Διατροφής ή Θερμιδικός Περιορισμός για την Αντιστροφή της Γήρανσης;

Αθανάσιος Βαλαβανίδης, Θώμη Βλαχογιάννη και Κωνσταντίνος Φιωτάκης

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Αθήνα

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν προταθεί αρκετές επιστημονικές θεωρίες για την γήρανση των αερόβιων βιολογικών συστημάτων. Μερικές από τις θεωρίες δεν επιβεβαιώθηκαν από τις επιστημονικές έρευνες ενώ άλλες παρέμειναν γιατί αποτέλεσαν πρόσφορες διόδους για την γεροντολογική έρευνα. Στη δεκαετία του 1950 ο αμερικανός επιστήμονας Denham Harman ανακοίνωσε την δημιουργική πρόταση ότι δραστηρές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) παίζουν σημαντικό ρόλο στη γήρανση. Πρότεινε ότι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται ενδογενώς ως παραπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού παίζουν σημαντικό ρόλο στη γήρανση, καθώς και τα μιτοχόνδρια που είναι τα κυτταρικά οργανίδια όπου παράγονται τα ROS. Οι αερόβιοι οργανισμοί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες συσσωρεύουν διάφορες οξειδωτικές βλάβες σε κυτταρικά μακρομόρια (λόγω ανισορροπίας οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων) που αυξάνεται με τη γήρανση, συμβάλλοντας προοδευτικά σε αυξημένο οξειδωτικό stress και μείωση των κυτταρικών λειτουργιών. Τις τελευταίες δεκαετίες νέες ανακαλύψεις και επιστημονικά δεδομένα επιβεβαιώνουν το ρόλο του οξειδωτικού stress στην γήρανση των θηλαστικών, ενώ έχει επιτευχθεί βαθύτερη κατανόηση των εκφυλιστικών ασθενειών της γήρανσης στους ανθρώπους. Οι πρόσφατες έρευνες έχουν μελετήσει την άμεση συμμετοχή του οξειδωτικού stress στη γήρανση των μυών (ποντικών) και άλλων πειραματοζώων και οι πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν τη θεωρία του οξειδωτικού stress για τη γήρανση. Πειράματα με αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής, βιταμίνες/μεταλλικά ιχνοστοιχεία, έχουν δείξει αμφισβητούμενα και συγκρουόμενα αποτελέσματα σε τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες σε ότι αφορά στη βελτίωση ασθενειών που οφείλονται στο οξειδωτικό stress. Αντίθετα, πειράματα θερμιδικού περιορισμού έδειξαν ότι δίνουν θετικές αποδείξεις για ευεργετικά αποτελέσματα σε μεταβολικές, ορμονικές και λειτουργικές αλλαγές σε ηλικιωμένους άνδρες και γυναίκες. Η ανασκόπηση αυτή παρουσιάζει τις πλέον πρόσφατες και σημαντικές έρευνες και πειράματα *in vivo* για το ρόλο του οξειδωτικού stress στη γήρανση.

Αλληλογραφία: Αθ. Βαλαβανίδης,

E-mail : valavanidis@chem.uoa.gr

10. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10469-10474, 2001.
11. Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 36:957-968, 2001.
12. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. Review. *Free Radic Biol Med* 43:477-503, 2007.
13. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247, 2000.
14. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581, 1998.
15. Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T. A role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20:7311-7318, 2000.
16. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8, 1997.
17. Cahe HZ, Kang SW, Rhee SG. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300:219-226, 1999.
18. Βαλαβανίδης Α. *Ελεύθερες Ρίζες και ο Ρόλος τους στα Βιολογικά Συστήματα*. Εκδ. BHTA ιατρικές εκδόσεις, Αθήνα, 2006.
19. Stadman FR. Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224, 1992.
20. Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Rad Res* 7:121-128, 1989.
21. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BAA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4820-4825, 1999.
22. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. Review. *Nature* 448:767-773, 2007.
23. Curtis HJ. Biological mechanisms underlying the aging process. *Science* 141:686-694, 1963.
24. Lombart DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt F. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120:497-512, 2005.
25. Abe J, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc* 8:59-64, 1998.
26. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel J, Cartwright J, Dionne L, Lu N, et al.. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9782-9787, 1996.
27. Hayes KC. Retinal degeneration in monkeys induced by deficiencies of vitamin E or A. *Invest Ophthalmol* 13:499-510, 1974.
28. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz P, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62, 1993.
29. McCord JM. Free radicals and inflammation : protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185:529-530, 1974.
30. Βαλαβανίδης Α. Οι οξειγονούχες ελεύθερες ρίζες και ο ρόλος τους στη γήρανση και στα νοσήματα φθοράς. *Αρχεία Ελλην Ιατρικής* 15(4):340-349, 1998.
31. Bunker VW. Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci* 49:299-312, 1992.
32. Ames BN. Increasing longevity by tuning up metabolism. *EMBO reports* 6:520-524, 2005.
33. Kant AK. Consumption of energy-dense, nutrient-poor foods by adults Americans: nutritional and health implications. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 72:929-936, 2000.
34. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 78 (Suppl. 3): 570S-578S, 2003.
35. Agudo A, Cabreara L, Amiano P, Ardanaz E, Barriarte A, et al. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr* 85:1634-1642, 2007.
36. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Cassadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 81(Suppl. 1):313S-316S, 2005.
37. Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 41:1727-1746, 2006.
38. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 475:7-20, 2001.
39. Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *J Am Med Assoc* 287:3116-3126, 2002.
40. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol* 21:111-127, 2007.
41. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1135-1146, 2004.
42. Gaziano JM. Vitamin E and cardiovascular disease: observational studies. *Ann N Y Acad Sci* 1031:280-291, 2004.
43. Clarke R, Armitage J. Antioxidant vitamins and risk of cardiovascular disease: review of large-scale of randomized trials. *Cardiovasc Drugs* 16:411-415, 2002.
44. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. Review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45:417-450, 2008.

45. Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiological studies. *Am J Cardiol* 101:75D-86D, 2008.
46. Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadis C. The oxidative stress menace to coronary vasculature: any place for antioxidants? *Curr Pharm Des* 15:3078-3090, 2009.
47. Rahman I. Antioxidat therapies in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 1:15-29, 2006.
48. Orrell RW, Lane RJ, Ross M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. Review. *Cochrane Databases Syst Rev* 24:CD002829, 2007.
49. Carlson NG, Rose JW. Antioxidants in multiple sclerosis: do they have a role in therapy? Review. *CNS Drugs* 20:433-441, 2006.
50. Bartlett HE, Eperjesi F. Nutritional supplementation for type 2 diabetes: a systematic review. *Ophthalmic Physiol Opt* 28:503-523, 2008.
51. Frank B, Gupta S. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann Clin Psychiatry* 17:269-286, 2005.
52. Ancelin ML, Christen Y, Ritchie K. Is antioxidant therapy a viable alternative for mild cognitive impairment? Examination of the evidence. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24:1-19, 2007.
53. Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomised clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:280-291, 2010.
54. Mecocci P, Polidori MC, Toiano L, Cherubini A, Cecchetti R, et al. Plasma antioxidants and longevity: A study on health centenarians. *Free Radic Biol Med* 28:1243-1248, 2000.
55. Buijsse B, Feskens EJ, Moschandreas J, Jansen EH, Jacobs DR, Kafatos A, Kok FJ, Kromhout D. Oxidative stress, and iron and antioxidant status in elderly men: differences between the Mediterranean south (Crete) and northern Europe (Zutphen). *Eur J Cardiovasc Preve Rehabil* 14:495-500, 2007.
56. Lauretani F, Semba RD, Dayhoff-Brannigan M, Corsi AM, et al. Low total plasma carotenoids are independent predictions of mortality among elderly person: the InCHANTI study. *Eur J Nutr* 47:335-340, 2008.
57. Wakimoto P, Block G. Dietary intake, dietary patterns, and changes with age: an epidemiological perspective. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(S2):65-80, 2001.
58. McCay CM, Crowel MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10:63-79, 1935.
59. Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215: 1415-1418, 1992.
60. Weindruch R, Sohal RS. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 337:986-994, 1997.
61. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126:913-922, 2005.
62. Harper JM, Leathers CW, Austad SN. Does caloric restriction extend life in wild mice? *Ageing Cell* 5:441-449, 2006.
63. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurological perspective. *Annu Rev Nutr* 25:237-260, 2005.
64. Guo Z, Mitchell-Raymundo F, Yang H, et al. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mech Ageing Dev* 123:1121-1131, 2002.
65. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC. Caloric restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu Rev Med* 54:131-152, 2005.
66. Fontana L, Klein S. Aging, adiposity, and caloric restriction. Clinical Review. *JAMA* 297:986-994, 2007.
67. Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* 5:332-353, 2006.
68. Hailbronn LK, Ravussin E. Caloric restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78:361-369, 2003.
69. Contestabile A. Benefits of caloric restriction on brain aging and related pathological states: understanding mechanisms to devise novel therapies. Review. *Curr Med Chem* 16:350-361, 2009.
70. Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* 76:215-224, 1994.
71. Forster MJ, Sohal BH, Sohal RS. Reversible effects of long-term caloric restriction on protein oxidative damage. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55:B522-B529, 2000.
72. Herlihy JT, Stacy C, Bertrand HA. Long-term food restriction depresses serum thyroid hormone concentrations in the rat. *Mech Ageing Dev* 53:9-16, 1990.
73. Landsberg L, Young JB. Diet-induced changes in sympathetic nervous system activity. In: Bassett ED (Editor). *Nutritional Factors: Modulating Effects on Metabolic Process*. Raven Press, New York, 198, pp. 155-174.
74. Lane MA, Baer DJ, Rumbler WV, et al. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *J Clin Endocrinol Metab* 88:16-23, 2003.
75. Ershler WB, Sun WH, Binkley N, et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro produc-

- tion is modified by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res* 12:225-230, 1993.
76. Spaulding CC, Walford RL, Effros RB. Caloric restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF mice. *Mech Ageing Dev* 93:87-94, 1997.
 77. Jolly CA. Dietary restriction and immune function. *J Nutr* 134:1853-1856, 2004.
 78. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr* 25:237-260, 2005.
 79. Straus DS. Nutritional regulation of hormones and growth factors that mammalian growth. *FASEB J* 8:6-12, 1994.
 80. Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6736-6741, 2001.
 81. Sell DR, Lane MA, Obrenovich ME, et al. The effect of caloric restriction on glycation and glycooxidation in skin collagen of nonhuman primates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:508-516, 2003.
 82. Davis LJ, Hakim G, Masiello P, Novelli M, Bergamini E, Licastro F. Plasma protein's glycation is decreased in Sprague Dawley rats under caloric restriction. *Arch Gerontol Geriatr* 19:295-301, 1994.
 83. Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, Weindruch R. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J* 18:415-417, 2004.
 84. Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, et al. Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E38-E43, 2002.
 85. Anderson RM, Shanmuganayagam D, Weindruch R. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicol Pathol* 37:47-51, 2009.
 86. Antebi A. Ageing: When less is more. *Nature* 447:536-537, 2007.
 87. Greer EL, Brunet A. Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell* 8:113-127, 2009.
 88. Mair W, Dillin A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* 77:727-754, 2008.
 89. Bamps S, Witz J, Savory FR, Lake D, Hope IA. The *Caenorhabditis elegans* sirtuin gene, sir-2.1, is widely expressed and induced upon caloric restriction. *Mech Ageing Dev* 130:762-770, 2009.
 90. Lin S-J, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128, 2000.
 91. Lamming DW, Latorre-Esteves, Medvedik O, Wong SN, Tsang FA, Wang C, Lin S-J, Sinclair DA. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by caloric restriction. *Science* 309:1861-1864, 2005.
 92. Sinclair DA, Guarente L. Unlocking the secrets of longevity genes. *Scientific American* 294:30-37, 2006.
 93. Sinclair DA. Towards a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Develop* 126:987-1002, 2005.
 94. Kennedy BK, Smith ED, Kaeberlein M. The enigmatic role of Sir2 in aging. *Cell* 123:548-550, 2005.
 95. Partridge L, Piper MD, Mair W. Dietary restriction in *Drosophila*. Review. *Mech Ageing Dev* 126:938-950, 2005.
 96. Soh JW, Hotic S, Arking R. Dietary restriction in *Drosophila* is dependent on mitochondrial efficiency and constrained by pre-existing extended longevity. *Mech Ageing Dev* 128:581-593, 2007.
 97. Min KJ, Yamamoto R, Buch S, Pankratz M, Tatar M. *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signalling. *Aging Cell* 7:199-206, 2008.
 98. Ja WW, Carvalho GB, Zid BM, Brummel T, Benzer S. Water- and nutrient-dependent effects of dietary restriction on *Drosophila* lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18633-18637, 2009.
 99. Masoro EJ. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1790:1040-1048, 2009.
 100. Nikolich-Zugich J, Messaoudi I. Mice and flies and monkeys too: caloric restriction rejuvenates the aging immune system of non-human primates. *Exp Gerontol* 40:884-893, 2005.
 101. Higami Y, Yamaza H, Shimokawa I. Laboratory findings of caloric restriction in rodents and primates. Review. *Adv Clin Chem* 39:211-237, 2005.
 102. Ingram DK, Cutler RG, Weindruch R, et al. Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. *J Gerontol* 45:B148-B163, 1990.
 103. Ramsey JJ, Colman RJ, Binkley NC, et al. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. *Exp Gerontol* 35:1131-1149, 2000.
 104. Colman RJ, Ramsey JJ, Roecker EB, Havighurst T, Hudson JC, Kemnitz JW. Body fat distribution with long-term dietary restriction in adult male rhesus macaques. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:B283-B290, 1999.
 105. Roth GS, Handy AM, Mattison JA, Tilmont EM, Ingram DK, Lane MA. Effects of dietary caloric restriction and aging on thyroid hormones of rhesus monkeys. *Horm Metab Res* 34:378-382, 2002.
 106. Johnson TE. Recent results: biomarkers of aging. *Exp Gerontol* 41:1243-1246, 2006.
 107. Heilbronn LK, Ravussin E. Caloric restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 78:361-369, 2003.

108. Strom A, Jensen RA. Mortality from circulatory diseases in Norway 1940-1945. *Lancet* 258:126-129, 1951.
109. Hindhede M. The effects of food restriction during war on mortality in Copenhagen *JAMA* 74:381-382, 1920.
110. Kagawa Y. Impact of Westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Prev Med* 7:205-217, 1978.
111. Keys A, Brozek J, Henschels A, Mickelsen O, Taylor H. *The Biology of Human Starvation*, Vol. 2. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1950.
112. Walford RL, Mock D, Verdery R, MacCallum T. Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in human restricted for a 2-year period. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:B211-B224, 2002.
113. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JP. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6659-6663, 2004.
114. Fontana L, Klein S, Holloszy JO, Premachandra BN. Effect of long-term calorie restriction with adequate protein and micronutrients on thyroid hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3232-3235, 2006.
115. Mayer TE, Kovacs SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L. Long-term calorie restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol* 47:398-402, 2006.
116. Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larso-Meyer DE, et al. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. Pennington CALERIE Team. *JAMA* 295:1539-1548, 2006.
117. Larson-Meyer DE, Hellbronn LK, Redman LM, et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid overweight subjects. *Diabetes Care* 29:1337-1344, 2006
118. Racette SB, Weiss EP, Villareal DT, et al. One year of calorie restriction in humans: feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:943-950, 2006
119. Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, et al. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 84:1033-1042, 2006
120. Villareal DT, Fontana L, Weiss EP, et al. Bone mineral density response to calorie restriction-induced weight loss or exercise-induced weight-loss: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 166:2502-2510, 2006.
121. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* 464:504-512, 2010.
122. Colman RJ, et al. Dietary restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204, 2009.
123. Kapahi EL, et al. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Curr Biol* 14:885-890, 2004.
124. Rogina B, Helfand SL. Sir2 extends longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15998-16003, 2004.
125. Honjoh S, Yamamoto T, Uno M, Nishida E. Signaling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 457:726-730, 2009.
126. Greer EL, Brunet A. Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell* 8:113-127, 2009.

Οξειδωτικό stress και σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ανδρέου Ε. Δήμητρα, Ανδρεάδου Ιωάννα

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 157 71 Ζωγράφου, Αθήνα

Περίληψη

Η διαβητική αγγειοπάθεια και νεφροπάθεια είναι οι κύριες αιτίες θνησιμότητας και θνητότητας στους ασθενείς με διαβήτη τύπου I και II. Σημαντικές κλινικές μελέτες όπως οι Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) και United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) αποδεικνύουν τη συσχέτιση αυτών των επιπλοκών με την υπεργλυκαιμία και τα υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων στη γενική κυκλοφορία (ανεξάρτητα από την διαφορά στην παθοφυσιολογία του διαβήτη τύπου I και II)¹.

Η υπεργλυκαιμία και τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα ευθύνονται για τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με συνέπεια την εμφάνιση οξειδωτικού stress σε μια ποικιλία ιστών. Απουσία αντιοξειδωτικών αποκρίσεων από τον ενδογενή αντιοξειδωτικό μηχανισμό, το ισοζύγιο ανάμεσα στη δημιουργία και αποδόμηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) διαταράσσεται, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση επαγόμενων-από το οξειδωτικό-stress διακυτταρικών σηματοδοτικών οδών. Η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών αυτών οδών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης των ιστών-στόχων στη δράση της ινσουλίνης, στη μείωση της έκκρισής της (μέσω δυσλειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος) και στην ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών. Η ιδιότητα των αντιοξειδωτικών να προστατεύουν από τις επιπλοκές της υπεργλυκαιμίας και των αυξημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων in vitro, σε συνδυασμό με τα κλινικώς αποδεδειγμένα οφέλη της θεραπείας με αντιοξειδωτικά επιβεβαιώνουν τον αιτιολογικό ρόλο του οξειδωτικού stress στην εκκίνηση ή/και την επιδείνωση αυτών των ανωμαλιών. Στην παρούσα επισκόπηση παρατίθενται οι βιοχημικές διαδικασίες βάσει των οποίων το επαγόμενο από την υπεργλυκαιμία και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα οξειδωτικό stress, προκαλεί ινσουλινοαντίσταση, δυσλειτουργία β-κυττάρων του παγκρέατος (αδυναμία έκκρισης ινσουλίνης) και διαβητικές επιπλοκές.

1. Εισαγωγή

Ο διαβήτης τύπου II (ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, NIDDM) είναι μία χρόνια μεταβολική διαταραχή και ορθότερα μία ετερογενής ομάδα συνδρόμων που χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στη δράση της ινσουλίνης (φαινόμενο που ονομάζεται ινσουλινοαντοχή ή ινσουλινοαντίσταση), αυξημένη ηπατική παραγωγή γλυκόζης και ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης^{2,3,4,5,6}. Η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, η οποία εντοπίζεται συνήθως στα πρώτα στάδια του μεταβολικού αυτού συνδρόμου, οδηγεί σε αύξηση της

παραγόμενης ινσουλίνης και τελικά σε εξάντληση και δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος.

Ο διαβήτης τύπου II είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικής προδιάθεσης^{7,8,9,10}, περιβαλλοντικών και συμπεριφοριστικών παραγόντων κινδύνου. Εκτός από τη γενετική βάση του διαβήτη τύπου II, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η υψηλή πρόσληψη θερμίδων και η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας αποτελούν βασικούς μη-γενετικούς, τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Παρόμοια υπάρχουν και μη τροποποιήσιμοι παράγοντες όπως η κληρονομικότητα, η εθνικότητα, η ηλικία και το χαμηλό σωματικό βάρος κατά τη γέννηση οι οποίοι επίσης συμβάλλουν στην παθογένεια του διαβήτη τύπου II.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μέχρι το 2030 περισσότερα από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Στη χώρα μας, το 6% του γενικού πληθυσμού πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Η νόσος έχει υψηλότερο επιπολασμό (συχνότητα εμφάνισης) στο δυτικό κόσμο (ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου II) και αυτό αποτελεί μια ακόμη σαφή ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως καθώς αποτελεί παράγοντα κινδύνου στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων.

2. Επιπλοκές του διαβήτη τύπου II

Οι επιπλοκές του διαβήτη μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: μυοκαρδιοπάθειες, μακρο-αγγειακές και μικρο-αγγειακές επιπλοκές¹.

Η **διαβητική μυοκαρδιοπάθεια** επιφέρει παθολογικές και λειτουργικές αλλαγές στα καρδιομυοκύτταρα προκαλώντας διαστολική δυσλειτουργία των κοιλιών, ενδιάμεση ίνωση, διαδοχική ελάττωση του πληθυσμού των καρδιομυοκυττάρων και μείωση της συσταλτικότητας.

Οι **μακροαγγειακές** επιπλοκές του διαβήτη περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, την αθηρωμάτωση και την περιφερική αγγειοπάθεια.

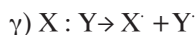
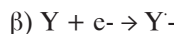
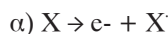
Στις **μικροαγγειακές** επιπλοκές, οι παθολογικές μεταβολές των μικροαγγείων επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα (διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια) των νεφρών (διαβητική νεφροπάθεια) και των νεύρων (διαβητική νευροπάθεια). Επίσης, περιορίζουν την αγγείωση του μυοκαρδίου και την ικανότητα επούλωσης των ελκών. Η εξέλιξη αυτών των καρδιαγγειακών επιπλοκών σχετίζεται άμεσα με την υπεργλυκαιμία και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Συνεπώς, ο αυστηρός και μακροχρόνιος γλυκαιμικός έλεγχος είναι η πιο αποτελεσματική προσέγγιση στην πρόληψη των διαβητικών επιπλοκών.

3. Οξειδωτικό stress

Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή δραστηκών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών¹¹. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ROS παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις συμμετέχοντας σε διαδικασίες όπως η κυτταρική απόκριση στο stress, η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μεταγραφή των γονιδίων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η φλεγμονή και η απόπτωση^{12,13,14}. Αντίθετα, περίσσεια ROS προκαλεί βλάβες στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA αναστέλλοντας τη λειτουργία τους. Κατά συνέπεια το οξειδωτικό stress ενοχοποιείται για την παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων (π.χ. επιπλοκές και νισουλιναντίσταση στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II) καθώς και για τη διαδικασία της γήρανσης. Η ισορροπία ανάμεσα στις ευεργετικές και επιβλαβείς δράσεις των ριζών είναι ζωτικής σημασίας για τους οργανισμούς και διαφυλάσσεται με ένα σύνολο μηχανισμών γνωστό ως «οξειδοαναγωγική ρύθμιση» (redox regulation). Η οξειδοαναγωγική ρύθμιση διατηρεί την οξειδοαναγωγική ομοιότητα και προστατεύει τους ζώντες οργανισμούς από το οξειδωτικό stress¹⁵. Συμπερασματικά, το οξειδωτικό stress μπορεί να χαρακτηριστεί ως διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης¹⁶.

4. Δραστηκές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS)

Σήμερα είναι γνωστό ότι όλες σχεδόν οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξυγόνου οφείλονται στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών (free radicals) και άλλων δραστηκών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στα οποία περιλαμβάνονται τα πρωτογενή δραστηκά παράγωγα του οξυγόνου αλλά και όλα εκείνα (ριζες ή μη), τα οποία προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αλληλεπιδράσεις με τα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. ελεύθερες υπεροξυλ-ριζες R-C-O-O[•] και αλκοξυλ-ριζες R-C-O[•], ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων)¹⁷. Οι ROS σχηματίζονται αναπόφευκτα στον αερόβιο μεταβολισμό και είναι η κύρια αιτία εκδήλωσης του φαινομένου του οξειδωτικού stress στα κύτταρα. Μια ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται από μία μη-ρίζα η οποία (α) χάνει ένα ηλεκτρόνιο, (β) δέχεται ένα ηλεκτρόνιο ή (γ) υφίσταται ομολυτική διάσπαση (homolytic fission) ενός ομοιοπολικού δεσμού:



Αντίστροφα από την ομολυτική διάσπαση, δύο ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους και να συνδεθούν ομοιοπολικά, οπότε προκύπτει μια μη-ρίζα ($X^\cdot + Y^\cdot \rightarrow Y-X$), γεγονός που είναι πολύ σπάνιο, αφού η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ακόμη και σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού stress. Αντίθετα, μια ελεύθερη ρίζα συνήθως

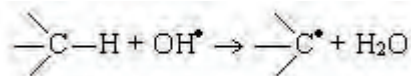
αντιδρά με μια μη-ρίζα (τα περισσότερα βιολογικά μόρια δεν είναι ελεύθερες ρίζες) με τους εξής τρόπους:

α) προσθετικά, όταν η ελεύθερη ρίζα συνδέεται με τη μη-ρίζα (π.χ. προσθήκη του OH[•] στην γουανίνη του DNA: $X + Y \rightarrow [X-Y]$)

β) αναγωγικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτο της ηλεκτρόνιο στη μη-ρίζα: $X + Y \rightarrow X^\cdot + Y^-$

γ) οξειδωτικά, όταν η ελεύθερη ρίζα δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από τη μη-ρίζα: $X + Y \rightarrow X^- + Y^\cdot$

δ) αφαιρετικά, όταν η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης είναι η προσβολή των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων από την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, με την οποία αρχίζουν οι αλυσωτές αντιδράσεις της υπεροξειδωσης των λιπιδίων:

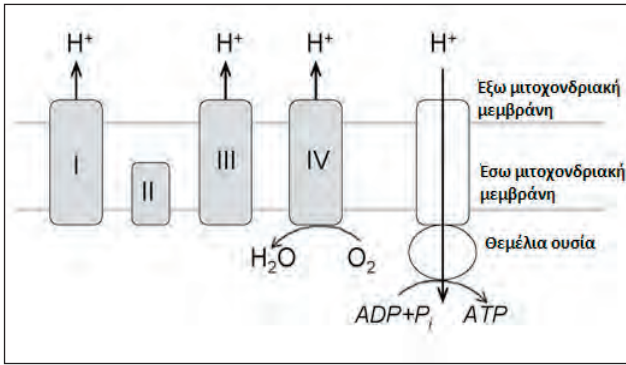


Έτσι σχηματίζεται μια νέα ελεύθερη ρίζα, η οποία αν είναι επίσης δραστηκή μπορεί να αντιδράσει εκ νέου με ένα άλλο μόριο κ.ο.κ. Παράδειγμα τέτοιων αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων που αποτελεί τον κύριο μηχανισμό πρόκλησης οξειδωτικής βλάβης σε βιολογικές μεμβράνες. Εκτός από τις ROS πολύ σημαντικές στο οξειδωτικό stress είναι και οι δραστηκές μορφές (ριζες ή μη) άλλων χημικών στοιχείων και μορίων, που διακρίνονται ανάλογα με την προέλευσή τους σε εκείνες που υπάρχουν στο περιβάλλον των κυττάρων και σε εκείνες που σχηματίζονται από τη δράση των ROS επί των διαφόρων κυτταρικών συστατικών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ιόντα σιδήρου, χαλκού και άλλων μετάλλων μετάπτωσης (που καταλύουν αντιδράσεις του οξειδωτικού stress και προάγουν οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο), τα ιόντα χλωρίου και το NO[•] (που παράγεται από την L-αργινίνη με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του NO (NOS) και έχει οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερες ρίζες θείου RS[•] (προϊόντα της οξειδωτικής βλάβης ή αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρωνθειολών), ελεύθερες ρίζες άνθρακα R-C[•] (ενδιάμεσα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ONOO⁻ (προϊόν της αντίδρασης O₂^{•-} και NO[•]), το υποχλωριώδες οξύ HOCl (προϊόν της αντίδρασης H₂O₂ και Cl⁻) κ.α.

5. Δημιουργία δραστηκών μορφών οξυγόνου (ROS)

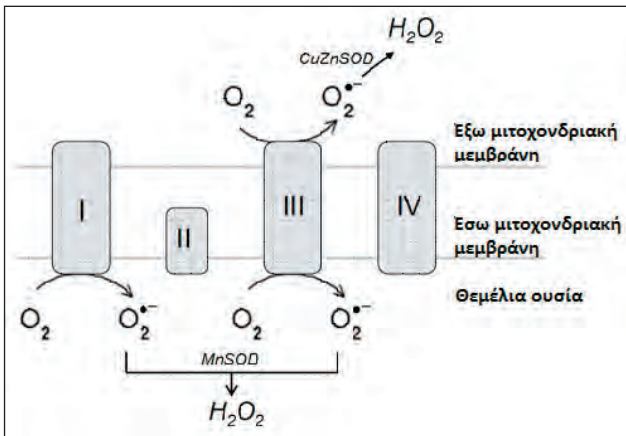
5.1 Μιτοχονδριακή παραγωγή ROS

Κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνοής (κύκλος του Krebs, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) το μοριακό οξυγόνο είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό της γλυκόζης και άλλων υποστρωμάτων. Στον κύκλο του Krebs η χημική ενέργεια από διαφορετικά υποστρώματα χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του ADP σε ATP (φωσφορύλωση επιπέδου υποστρώματος) (Σχήμα 1)¹⁸.



Σχήμα 1: Φωσφορυλίωση επιπέδου υποστρώματος

Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ενέργεια για τη φωσφορυλίωση του ADP προέρχεται από μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (οξειδωτική φωσφορυλίωση). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένα ποσοστό μεταξύ 0,4 και 4% του καταναλισκόμενου από την οξειδωτική φωσφορυλίωση οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζες υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-)^{19,20,21,22,23,24}. Στη συνέχεια, το O_2^- μπορεί να μετατραπεί σε άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Οι ελεύθερες ρίζες συνήθως εξουδετερώνονται από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που θα αναφερθούν στη συνέχεια. Χαρακτηριστικά το O_2^- εξουδετερώνεται προς H_2O_2 από την υπεροξειδική διασμουτάση 2 (SOD2)^{19,20} (Σχήμα 2)¹⁸. Το H_2O_2 ανάγεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης προς O_2 και H_2O στα μιτοχόνδρια ή διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και ανάγεται από το ένζυμο καταλάση στα υπεροξυσώματα. Παρούσα μετάλλων μετάπτωσης όπως ο Fe και ο Cu το H_2O_2 μετατρέπεται στην ισχυρά δραστική υδροξυλική ρίζα OH \cdot .



Σχήμα 2: Οξειδωτική φωσφορυλίωση

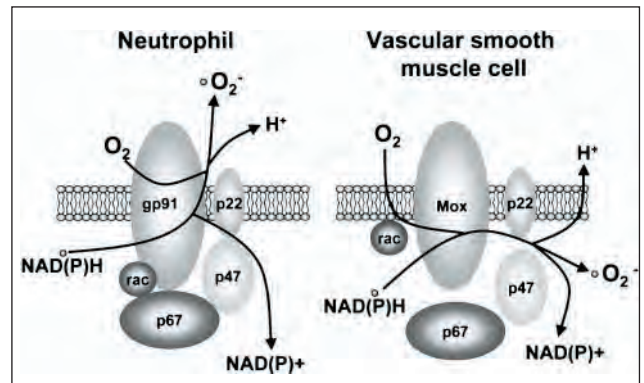
5.2 Νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτιδικές (φωσφορικές) οξειδάσες (NAD(P)H οξειδάση)

Τα ένζυμα NAD(P)H οξειδάσες αποτελούνται από υπομονάδες που εντοπίζονται τόσο στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στο κυτταρόπλασμα αγγειακών λειομυοκυττάρων, ουδετερόφιλων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών και μεσαγγειακών κυττάρων. Η ενεργοποίηση των κυτ-

τάρων αυτών προκαλεί μετακίνηση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα το σχηματισμού πολυμερικών συμπλόκων με δράση οξειδάσης. Οι NAD(P)H οξειδάσες καταλύουν την αναγωγή του O_2 χρησιμοποιώντας το NADH (νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτιδίο) ή το NADPH (φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτιδίο) σαν δότη ηλεκτρονίων.



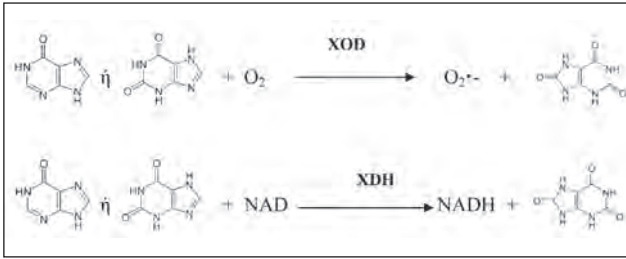
Η NAD(P)H οξειδάση είναι η κύρια πηγή υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) στον αγγειακό ιστό και τα κύτταρα του μυοκαρδίου (Σχήμα 3)²⁵. Οι περισσότερες κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το NADH είναι καταλληλότερο υπόστρωμα^{26,27,28,29,30} ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου το NADPH υπερισχύει^{31,32}. Η NAD(P)H οξειδάση επάγεται από ορμόνες, μεταβολές των αιμοδυναμικών συνθηκών και μεταβολικές αλλαγές. Η αγγειοτενσίνη II²⁵, η θρομβίνη³³, ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων³⁴ (PDGF: platelet-derived growth factor), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου- α ³⁵ (TNF- α : tumor necrosis factor- α), το LacCer (β -D-galactosyl-(1-4)- β -D-glucosyl-(1-1')-ceramide), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο ενεργοποιητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PAF: platelet-activating factor) διεγείρουν την καταλυόμενη από το NADH ή/και το NADPH παραγωγή O_2^- . Στα ουδετερόφιλα η δράση της οξειδάσης ρυθμίζεται και από την πρωτεϊνική κινάση C^{36} (PKC) και στα ίδια κύτταρα, η υπεργλυκαιμία, μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF- κ B, αυξάνει την έκφραση της υπομονάδας gp91^{phox} της NADPH οξειδάσης.



Σχήμα 3: Δομή και δράση NAD(P)H οξειδάσης των ουδετερόφιλων (αριστερά) και των λείων μυϊκών ινών (δεξιά)

5.3 Αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) και Οξειδάση της ξανθίνης (XOD)

Η αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) χρησιμοποιεί την υποξανθίνη ή την ξανθίνη ως υπόστρωμα και το NAD ως συμπαράγοντα-δέκτη ηλεκτρονίων προς σχηματισμό NADH και ουρικού οξέος. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε τελικά στάδια καρδιακής ανεπάρκειας^{37,38} η αφυδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (οξειδάση της ξανθίνης, XOD) η οποία δρα στα ίδια ακριβώς υποστρώματα (ξανθίνη, υποξανθίνη) αλλά χρησιμοποιεί το O_2 ως συμπαράγοντα-δέκτη ηλεκτρονίων προς σχηματισμό ουρικού οξέος και υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-).



Σχήμα 4. Η μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης προς οξειδάση της ξανθίνης πιθανώς πραγματοποιείται σε συνθήκες stress, διαταραχών του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και οξείδωσης θειολικών ομάδων³⁹. Η οξειδάση της ξανθίνης (XOD) είναι μία σημαντική πηγή ενεργών μορφών οξυγόνου στα πολυμορφώδη, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα καθώς και στα κύτταρα του συνδετικού ιστού.

5.4. Παραγωγή ελεύθερων ριζών στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των ενζυματικών οδών του αραχιδονικού οξέος

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (AA: Arachidonic Acid) της οξείδωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών και της αυτοοξειδωσης των συνδεδεμένων με τη μεμβράνη κυτοχρωμάτων.

Η υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων -αποτέλεσμα της οποίας αποτελεί και το αραχιδονικό οξύ - συντελείται ενζυματικά από ένζυμα όπως οι φωσφολιπάσες A2 (PLA2) και μη ενζυματικά από ενεργές μορφές οξυγόνου ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) και αζώτου ($\text{NO}\cdot$). Η φωσφολιπάση A2 είναι το κύριο ένζυμο για την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος.

Η δραστηκή υδροξυλική ρίζα $\text{OH}\cdot$ δεν αποτελεί προϊόν ενζυματικής δράσης αλλά προκύπτει από H_2O_2 παρουσία μεταλλικών ιόντων και κυρίως Fe^{2+} και Cu^{2+} , με την αντίδραση Fenton. Μετά το σχηματισμό της, η ρίζα $\text{OH}\cdot$ επιδρά σε κυτταρικά στοιχεία όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και μεμβρανικά λιπίδια. Κατά την αντίδραση της $\text{OH}\cdot$ με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προκύπτουν αλκυλο-ριζές που αλληλεπιδρώντας με μοριακό οξυγόνο δίνουν ριζές $\text{ROO}\cdot$. Οι ριζές $\text{ROO}\cdot$ αποσπούν υδρογόνα από τα παρακείμενα λιπαρά οξέα προς σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων (ROOH) νέων αλκυλο-ριζών ξεκινώντας έτσι μια αλυσωτή αντίδραση οξείδωσης των λιπιδίων.

Το $\text{NO}\cdot$ προκύπτει κατά την ενζυματική οξείδωση της L-αργίννης προς κιτρουλίνη από τις NO συνθετάσες και αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή αγγειακής απόκρισης και νευροτικής διαβίβασης.

Το υπεροξειδικό ανιόν $\text{O}_2^{\cdot-}$ δεν προκαλεί άμεσα λιπιδική υπεροξειδωση αλλά αλληλεπιδρώντας με το NO σχηματίζει υπεροξνιτροδες ανιόν ($\text{ONOO}\cdot$) ένα ισχυρό οξειδωτικό που επάγει την υπεροξειδωση των λιπιδίων.

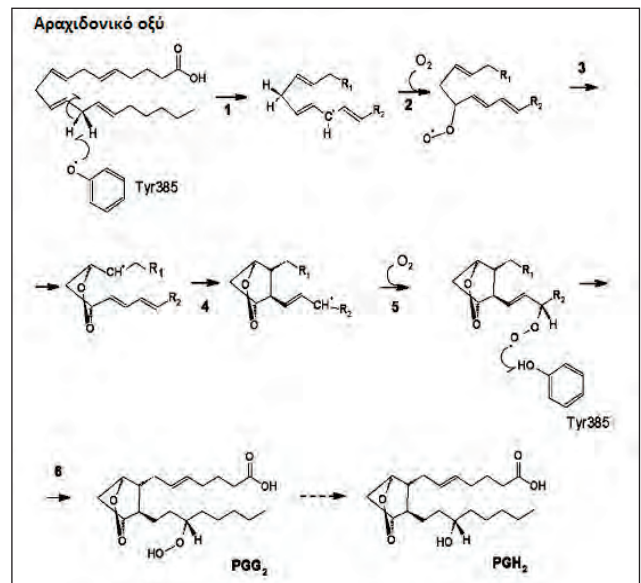
Οι φωσφολιπάσες A2 (PLA2) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων, τα οποία υδρολύουν τον εστερικό δεσμό στην sn-2 θέση των γλυκεροφωσφο-λιπιδίων και παράγουν 2-λυσοφωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα⁴⁰. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν το ελεύθερο λιπαρό οξύ που απομακρύνεται από την sn-2 θέση είναι το αραχιδονικό οξύ. Το παραγόμε

μενο αραχιδονικό οξύ επανενσωματώνεται στα μεμβρανικά φωσφολιπίδια ή μεταβολίζεται από μία σειρά ενζύμων προς σχηματισμό μιας οικογένειας βιολογικώς ενεργών μεταβολιτών, των εικοσανοειδών. Τρεις σημαντικές οδοί μπορούν να μετατρέψουν το AA σε εικοσανοειδή⁴¹. Στην πρώτη μεταβολική οδό το ένζυμο **κυκλοξυγονάση (COX)** παράγει θρομβοξάνες, προσταγλανδίνες και προστακυλίνες. Στη δεύτερη οδό, το ένζυμο **5-λιποξυγονάση** παράγει λευκοτριένια και ενώσεις υδροξυ-εικοσιτετρανοϊκού οξέος (HETE). Στην τρίτη οδό, το ένζυμο εποξυγονάση, που είναι μέλος του κυτοχρώματος P450 παράγει ενώσεις cis-επόξυ-εικοσιτετρανοϊκού οξέος (EET) και άλλες ενώσεις HETE. Οι COXs, λιποξυγονάσες και εποξυγονάσες καταλύουν την στεροειδική εισαγωγή του οξυγόνου σε διάφορες θέσεις στο AA και κατανέμονται εκλεκτικά στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, αυξάνοντας περαιτέρω την πολυπλοκότητα της βιολογίας των εικοσανοειδών. Εκτός από το αραχιδονικό οξύ βιολογικώς δραστηκά μόρια είναι και τα λυσοφωσφολιπίδια που προκύπτουν από τη δράση της PLA2⁴². Όταν δε το λυσοφωσφολιπιδικό προϊόν περιέχει μία κεφαλή χολίνης και έναν αλκυλικό δεσμό στη θέση sn-1 αποτελεί πρόδρομο μόριο για τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF: Platelet Activating Factor)⁴³.

Κατά το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω της οδού της κυκλοξυγονάσης παράγεται υπεροξειδικό ανιόν στο στάδιο της μετατροπής της προσταγλανδίνης G2 στην προσταγλανδίνη H2. Το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται επίσης και κατά το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος στην οδό λιποξυγονάσης. Και στις δύο περιπτώσεις απαιτείται η παρουσία της NADH ή και της NADPH οξειδάσης.

5.4.1. Η μεταβολική οδός της κυκλοξυγονάσης (COX)

Στην πρώτη οδό μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, η κυκλοξυγονάση καταλύει τη σταδιακή μετατροπή του AA σε ενδιάμεση προσταγλανδίνη G2 (PGG2) και H2 (PGH2) (Σχήμα 5)⁴⁴.

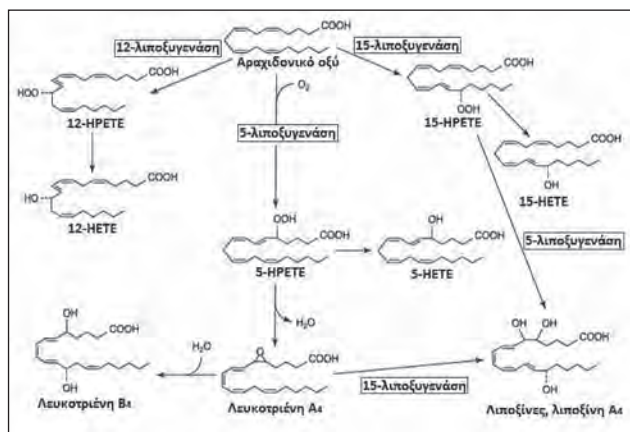


Σχήμα 5: Διαδοχικά στάδια σχηματισμού PGH2 από αραχιδονικό οξύ

Στο στάδιο της μετατροπής της προσταγλανδίνης G2 στην προσταγλανδίνη H2, παράγεται υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-). Στη συνέχεια η προσταγλανδίνη H2 (PGH2) μεταβολίζεται προς θρομβοξανίνη A2 (TXA2), προστακυκλίνη (PGI2) και άλλες προσταγλανδίνες (PGD2, PGE2, PGF2a) από τα ένζυμα συνθέτωση θρομβοξανίνης, συνθέτωση προστακυκλίνης και ισομεράση προσταγλανδίνης αντίστοιχα³⁹. Οι δραστικές ρίζες O_2^- που προκύπτουν κατά τη μετατροπή της PGG2 σε PGH2 αδρανοποιούν τα μετέχοντα στη μεταβολική οδό της κυκλοξυγονάσης ένζυμα και προκαλούν βλάβες στα κύτταρα (λόγω οξειδωσης λιπιδίων των κυτταροπλασματικών μεμβρανών). Με τον τρόπο αυτό η μεταβολική οδός της κυκλοξυγονάσης αυτοαναπέλλεται με σύγχρονη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου⁴⁵. Παράλληλα αναπέλλεται και η παραγωγή των προστατευτικών PGE2 και PGI αλλά και της TXA2 που προκαλεί αγγειοσύσπαση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων⁴⁶.

5.4.2. Η μεταβολική οδός της λιποξυγονάσης

Η μεταβολική οδός της 5-λιποξυγονάσης ενεργοποιείται στα λευκοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των μαστοκυττάρων, των ηωσινοφίλων, των ουδετερόφιλων, των βασεόφιλων και των μονοκυττάρων. Στα κύτταρα αυτά, η 5-λιποξυγονάση μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε 5-υδροϋπεροξυ-εικοσατετρα-ενοϊκό οξύ (5-HPETE) το οποίο έχει βραχεία ζωή και αποδομείται ταχέως από μια υπεροξειδάση προς 5-υδροξυ-εικοσατετρα-ενοϊκό οξύ (5-HETE). Εναλλακτικά, μια αφυδρογονάση μπορεί να μετατρέψει το 5-HETE σε ένα ασταθές εποξειδίου, την λευκοτριένη A4 (LTA4). Αυτός ο μεταβολίτης μπορεί να υδρολυθεί σε 5,12-διυδροξυ-εικοσατετραενοϊκά οξέα (5,12-DiHETE) ένα από τα οποία είναι και το λευκοτριένιο LTB4 ή να συζευχθεί ενζυματικά με το τριπεπτιδίο της γλουταθειόνης. Αυτή η σύζευξη -μέσω του μορίου της κυστεΐνης της γλουταθειόνης- παράγει LTC4. (Σχήμα 6)⁴⁷.



Σχήμα 6: Οδοί των 5-, 12-, 15-λιποξυγονασών

Το λευκοτριένιο LTB4 που συντίθεται από κύτταρα που διαθέτουν LTA4 υδρολάση (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα), είναι ισχυρός χημειοτακτικός παράγον δρώντας στους BLT1 και BLT2 υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των ουδετερόφιλων. Αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από το χημειοτακτικό του ρόλο το λευκοτριένιο LTB4 διεγείρει την είσοδο ιόντων Ca^{2+} , την κινητοποίηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} ^{48,49} και την πρόσληψη εξωζών (πχ.

D-γλυκόζης) από τα πολυμορφοπύρινα. Έτσι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα μεταφέρουν στους ιστούς στόχους αυξημένες ποσότητες ιόντων Ca^{2+} και D-γλυκόζης.

Το λευκοτριένιο LTC4 παράγεται σε κύτταρα που εκφράζουν την LTC4 συνθέτωση όπως είναι τα μαστοκύτταρα και τα ηωσινοφιλα. Το LTC4 αποτελεί υπόστρωμα διαφορετικών πρωτεασών, οι οποίες παράγουν τα βιολογικά ενεργά λευκοτριένια LTD4 και LTE4. Τα κυστεϊνικά λευκοτριένια (LTC4, LTD4, LTE4) δρουν στους μεμβρανικούς υποδοχείς CysLT1 και CysLT2 των κυττάρων στόχων προκαλώντας σύσπαση των βρογχολίων και των αγγειακών λείων μυϊκών ινών, αύξηση της τριχοειδικής διαπερατότητας, έκκριση βλέννης στις αεραγωγές οδούς και το έντερο και χημειοταξία λευκοκυττάρων.

Τα λευκοκύτταρα και κυρίως τα αιμοπετάλια διαθέτουν επίσης μια 12-λιποξυγονάση η οποία ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτοκίνες και υπεργλυκαιμία⁵⁰, και μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε 12-υδροϋπεροξυ-εικοσατετρα-ενοϊκό οξύ (12-HPETE). Αρκετά οξυγονωμένα προϊόντα αυτού του ενζύμου είναι ικανά να ενεργοποιήσουν κινάσες ευαίσθητες στο stress και οδούς που ενέχονται για την αγγειακή και νεφρική νόσο, περιλαμβάνοντας και την οδό της PKC, με αποτέλεσμα την υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων. Το 12-υδροξυ-εικοσατετραενοϊκό οξύ, (12-HETE) είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας ικανός να ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB και να αυξάνει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF).

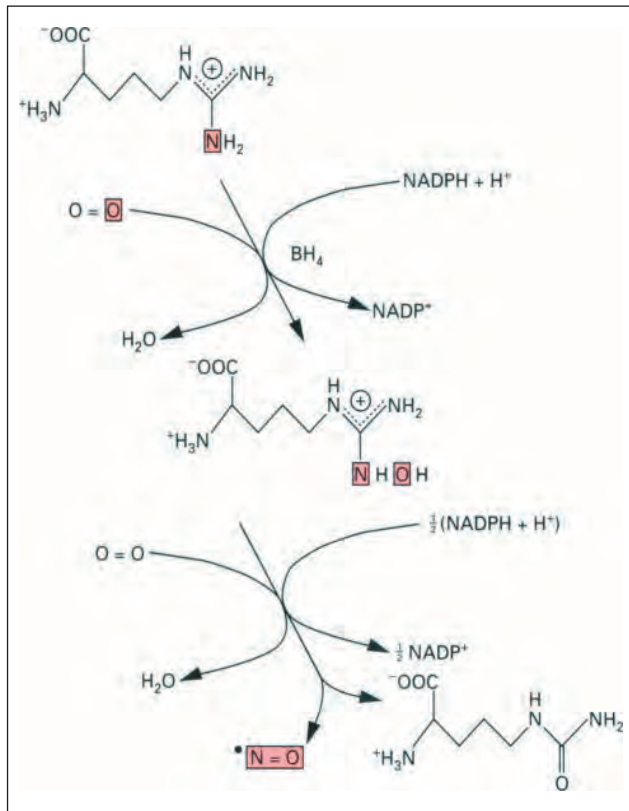
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μια 15-λιποξυγονάση η οποία μετατρέπει σταδιακά το αραχιδονικό οξύ σε 15-υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (15-HETE). Στα αθηρωματικά αγγεία φαίνεται να υπάρχει αυξημένη σύνθεση 15-HETE το οποίο μετατρέπεται από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα σε λιποξίνες. Οι κυριότερες λιποξίνες είναι η λιποξίνη A και η λιποξίνη B. Η λιποξίνη A4 (LXA4), διεγείρει την παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου (O_2^-) από τα ουδετερόφιλα.

5.5. Μονοξειδίου του αζώτου

Η αύξηση των επιπέδων υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) από την υπεργλυκαιμία σηματοδοτεί την ενεργοποίηση οδών εμπλεκόμενων στην παθογένεση διαβητικών επιπλοκών όπως είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία^{51,52}. Η παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, προκαλώντας αγγειοδιαστολή, αναστέλλοντας την προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο και πιθανώς εξουδετερώνοντας το υπεροξειδικό ανιόν⁴⁸.

Το NO είναι προϊόν οξειδωσης της L-αργινίνης προς L-κυτρουλίνη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο συνθέτωση του NO (NOS) και απαιτεί την παρουσία NADPH, μοριακού οξυγόνου, καλμοδουλίνης και άλλων συμπαραγόντων/ συνενζύμων όπως η τετραϋδροβοιπτερίνη (BH4), η πρωτοπορφυρίνη IX, το φλαβινο-αδενινιδινουκλεοτίδιο (FAD) και το φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN). Η σύνθεση NO από L-αργινίνη γίνεται σε δύο στάδια οξειδωσης. Αρχικά η L-αργινίνη οξειδώνεται προς N^ω-υδροξυαργινίνη παρουσία NADPH και τετραϋδροβοιπτερίνης (BH4). Στη συνέχεια η N^ω-υδροξυαργι-

νίνη οξειδώνεται προς σχηματισμό κιτροουλίνης και NO (Σχήμα 7)⁵³ Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η nNOS, απουσία L-αργινίνης, μπορεί να συνθέσει υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-) και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) με κατανάλωση NADPH γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο των φλαβινο-συννεζύμων στη μεταφορά ηλεκτρονίων.



Σχήμα 7: Στάδια σχηματισμού NO

Υπάρχουν 3 διαφορετικές ισομορφές της NOS: η ενδοθηλιακή συνθετάση (endothelial-eNOS), η νευρωνική συνθετάση (neuronal-nNOS) και η επαγώγιμη συνθετάση (inducible -iNOS). Οι eNOS και nNOS, βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται από το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} παρουσία καλμοδουλίνης. Η είσοδος Ca^{2+} μέσα σε αυτά τα κύτταρα, οδηγούν σε άμεση παραγωγή NO. Η υπερπαραγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου, μειώνει την δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης (eNOS), αλλά δια μέσου της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF- κ B, δραστηριοποιεί την NAD(P)H αυξάνοντας την έκφραση του iNOS, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του NO.

Υψηλά επίπεδα NO ευνοούν το σχηματισμό του ισχυρού οξειδωτικού υπεροξυνιτρώδους ανιόντος⁴⁸ ($ONOO^-$). Το κυτταροτοξικό υπεροξυνιτρώδες ανιόν, οξειδώνει τις σουλφυδρλικές ομάδες των πρωτεϊνών, συμβάλλοντας έτσι στην υπεροξείδωση λιπιδίων και αζωτούχων αμινοξέων. Η επίδραση του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος στην τυροσίνη ευνοεί την παραγωγή μιας ισχυρότατης οξειδωτικής ουσίας, της νιτροτυροσίνης που εμφανίζει άμεσα

τοξική δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων⁵⁴ (ενδοθηλιακή δυσλειτουργία). Αυξημένα επίπεδα νιτροτυροσίνης στο πλάσμα διαβητικών ασθενών υποδεικνύουν τη συσχέτιση της οξειδωτικής αυτής ουσίας με την παθοφυσιολογία του διαβήτη⁵⁵.

Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν, είναι ένας ισχυρός παράγοντας καταστροφής του DNA. Η καταστροφή του DNA διαφαίνεται από την αυξημένη παραγωγή 8-υδροξυγουανίνης και 8-υδροξυδεοξυγουανουσίνης (δείκτες καταστροφής του DNA)⁵⁶ και επάγει την ενεργοποίηση του πυρηνικού ενζύμου πολυ-(ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP). Η ενεργοποίηση του PARP οδηγεί σε μείωση του ενδοκυττάρου NAD⁺ και προάγει την ADP-ριβοζυλίωση του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH)⁵⁷. Η ελάττωση του NAD⁺ έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού γλυκόλυσης, της μεταφοράς ηλεκτρονίων και του σχηματισμού του ATP. Η γλυκεριναλδεϋδη είναι από τα βασικά μεταβολικά προϊόντα του καταρράκτη της γλυκόλυσης. Η ριβοζυλίωση του ενζύμου αυτού, και συνεπώς η αναστολή του μεταβολισμού του, έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση των προηγούμενων από τη GAPDH μεταβολικών προϊόντων της γλυκόλυσης και εκτροπή του μεταβολισμού από τη σειρά της γλυκόλυσης σε άλλες παθοφυσιολογικές οδούς (εξοζαμίνης, PKC, πολυολών).

6. Ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II εκτός επαγωγή του οξειδωτικού stress παρατηρείται σύγχρονη **ανεπάρκεια ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών**. Τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, τα ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης, η αναγωγία της γλουταθειονής (GPxs), η υπεροξειδάση και η αναγωγία της θειορεδοξίνης και ο συνένζυμο Q. Άλλες μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η γλουταθειονή οι θειοαναγωγάσες TRX και οι μεταλλοθειόνες.

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD): η υπεροξειδική δισμουτάση καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπαραγόντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZn-SOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Η SOD καταστρέφει τις O_2^- με τη διαδοχική οξείδωση και την αναγωγή του μετάλλου του ενεργού κέντρου.

Καταλάση: η καταλάση εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων της καρδιάς. Δεν ανευρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο σε δύο στάδια.

Ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης: τα ένζυμα αυτά καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια πηγή NADPH.

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR): Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδραναιοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθεία γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH.

Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs): Οι GPxs καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη. Αν και η αναγωγή του H_2O_2 γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων.

Υπεροξειδάση και αναγωγή της θειορεδοξίνης: η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης, τη θειορεδοξίνη και τη NADPH^{58,59,60}.

Συνένζυμο Q: το CoQ αποτελεί πηγή O_2^- όταν είναι μερικώς αναχθέν, ενώ έχει αντιοξειδωτική δράση όταν είναι πλήρως ανηγμένο.

Γλουταθειόνη: η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτιδίο με αναγωγικές και πυρηνόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης⁶¹. Απαντά είτε ως αναχθεία (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της (Σχήμα 7)⁶². Ο λόγος GSH/ GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού^{63,64}.

Οι κύριες προστατευτικές δράσεις της γλουταθειόνης στο οξειδωτικό stress είναι οι εξής⁵⁶:

- Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεϋδης, γλυοξαλάση I⁶⁵
- Συμμετέχει στη μεταφορά αμινοξέων μέσω της κυταροπλασματικής μεμβράνης.
- Δεσμεύει άμεσα τη ρίζα υδροξυλίου και το υπεροξειδικό ανιόν και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.
- Έχει την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό μορφή τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες, βιταμίνη C και βιταμίνη E, άμεσα ή έμμεσα. Η ικανότητα αυτή της γλουταθειόνης καθορίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ζεύγους GSH/2GSSG⁶⁶.

Θειοαναγωγάσες TRX: Οι θειοαναγωγάσες είναι μικρές, πλειοτρόπες σουλφυδρυλικές πρωτεΐνες με δραστηριότητα οξειδοαναγωγάσης. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί τρία γονίδια θειορεδοξίνης (TRX1, TRX2 και sp TRX, η οποία παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα σπερματοζωάρια). Οι TRX όλων των οργανισμών διαθέτουν ένα εξελικτικά συντηρητικό ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Cys-Gly-Pro-Cys. Ειδικοί πρωτεϊνοδισουλφιδικοί στόχοι αναγωγής από την ομάδα των TRX είναι πρωτεΐνες όπως η ριβονουκλεοτιδική αναγωγάση, η δισουλφιδική ισομεράση και αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των p53, NF-κB και AP-1. Επιπλέον, οι TRX αποτελούν δότες ηλεκτρονίων για πολλές υπεροξειδοαναγωγάσες, ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγωγή των υπεροξειδίων. Επιπλέον, αυτή η πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να ανάγει μερικές δραστικές ρίζες οξυγόνου καθώς και να αναδιπλώσει οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίσης, επάγει αυτοκρινείς δράσεις ανάλογες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων και των κυτοκινών.

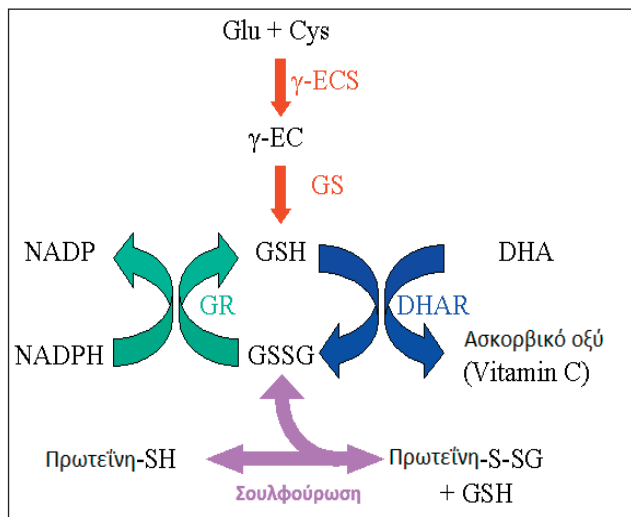
Μεταλλοθειονίνες: οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως ο Cu.

7. Υπεργλυκαιμία και οδοί που ενεργοποιούνται από το stress

Ιn vivo μελέτες αποκαλύπτουν αφενός ότι το επαγόμενο από την υπεργλυκαιμία οξειδωτικό stress ευθύνεται για τις επιπλοκές του διαβήτη πριν αυτές γίνουν κλινικά εμφανείς και αφετέρου υποδεικνύουν τη συσχέτιση του οξειδωτικού stress με την παθοφυσιολογία των όψιμων διαβητικών βλαβών. Το επαγόμενο από την υπεργλυκαιμία οξειδωτικό stress ενεργοποιεί τις οδούς του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF-κB, της p38 MAP κινάσης, των κινασών JNK/SAPK, των AGE/RAGE, της πρωτεϊνικής κινάσης PKC, της πολυόλης και της εξοζαμίνης.

7.1. Η οδός του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα (NF-κB: Nuclear factor-κB)

Μια από τις σημαντικότερες οδούς που ενεργοποιούνται από τη υπεργλυκαιμία και το οξειδωτικό stress είναι η οδός του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κB (NF-



Σχήμα 8: Δράσεις της γλουταθειόνης

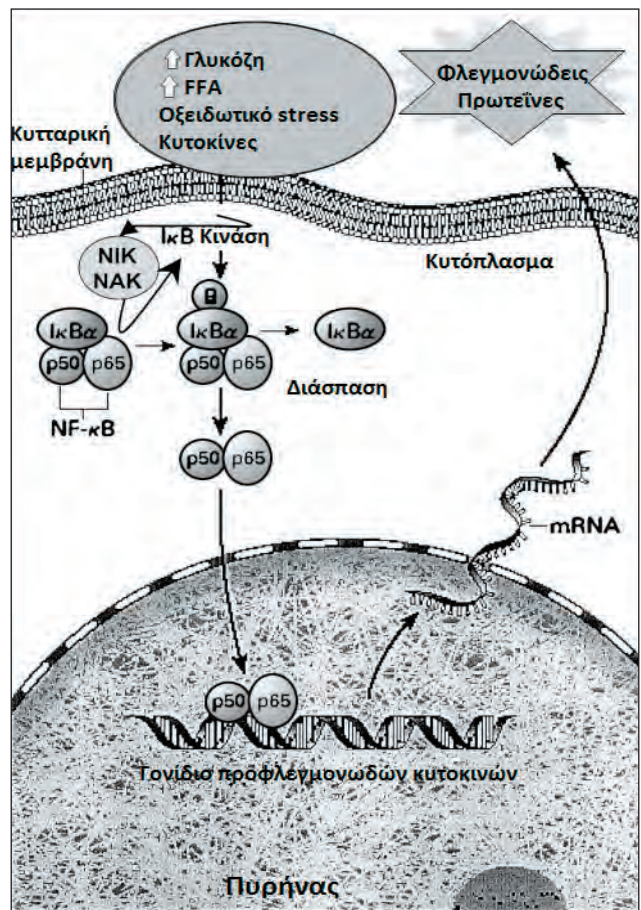
κΒ)^{67,68}. Ο NF-κΒ ενεργοποιείται από ένα μεγάλο εύρος ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων επαγωγών όπως η υπεργλυκαιμία, τα υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων, οι ενεργές μορφές οξυγόνου, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, τα συνδεδεμένα στον υποδοχέα τους (RAGE) προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης (AGE), η p38 MAP κινάση, η καταστροφή του DNA, η προσβολή από ιό και η υπεριώδης ακτινοβολία UV⁶⁹. Ο παράγοντας NF-κΒ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η ανώμαλη ρύθμιση του NF-κΒ σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό χρόνιων νοσημάτων όπως ο διαβήτης και η αθηρωμάτωση.

Απουσία ερεθισμάτων, ο NF-κΒ παραμένει στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργό ετεροδιμερές αποτελούμενο από τις υπομονάδες p50 και p65 συμπλεγμένες με την ανασταλτική πρωτεΐνη IκΒ. Η IκΒ πρωτεΐνη παρεμποδίζει μια NLS περιοχή πάνω στον NF-κΒ (Nuclear Localization Sequence, αλληλουχία εντοπισμού στον πυρήνα) που ρυθμίζει τη μετάβασή του NF-κΒ στον πυρήνα⁷⁰. Παρουσία ερεθισμάτων, ενεργοποιείται ένας καταρράκτης κινάσης σερίνης που οδηγεί σε φωσφορύλιωση της IκΒ πρωτεΐνης⁷¹. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του NF-κΒ ετεροδιμερούς και τη μετάβασή του στον πυρήνα (Σχήμα 9)⁷². Ο NF-κΒ ρυθμίζει την έκφραση πληθώρας γονιδίων συμπεριλαμβανομένων γονιδίων αυξητικών παραγόντων (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF), προφλεγμονωδών κυτοκινών (TNF-α, IL-1β), RAGE (υποδοχέων προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης), μορίων προσκόλλησης (αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1, VCAM-1) και άλλα. Προϊόντα γονιδίων που επάγονται από τον NF-κΒ όπως τα VEGF, TNF-α, IL-1β και RAGE μπορούν να ενεργοποιήσουν εκ νέου τον NF-κΒ.

Το πρωταρχικό στάδιο ενεργοποίησης του NF-κΒ είναι η φωσφορύλιωση της IκΒ πρωτεΐνης. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη φωσφορύλιωση αυτή είναι η IκΒ-Κινάση (IKK)^{64,65}, ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από δυο καταλυτικές υπομονάδες IKKα (ή IKK1) και IKKβ (ή IKK2) και μία ρυθμιστική υπομονάδα την IKKγ^{73,74}. Η IKK ενεργοποιείται μετά από φωσφορύλιωση επαγόμενη από τις κινάσες σερίνης NIK⁷⁵ (NF-κΒ-inducing kinase) και NAK⁷⁶ (NF-κΒ-activating kinase).

7.2. Η οδός των Jun αμινοτελικών/επαγόμενων από το οξειδωτικό stress κινασών (JNK/SAPK: c-Jun N-terminal kinase /stress-activated protein kinase)

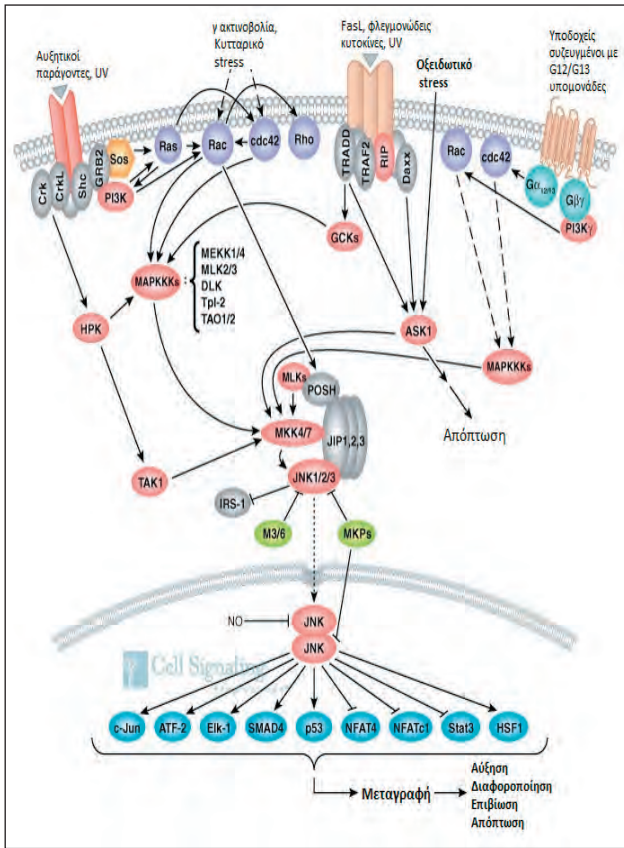
Οι JNK (ή αλλιώς SAPK) και οι p38 MAPKs κινάσες είναι μέλη της οικογένειας των MAP πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/ θρεονίνης. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και οι ERKs κινάσες⁷⁷. Σε αντίθεση με τις ERKs, οι οποίες ενεργοποιούνται από μυτογόνα, οι JNK/SAPK και p38MAPK ενεργοποιούνται από ενδογενείς και εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες όπως η υπεργλυκαιμία οι ενεργές μορφές οξυγόνου, το οξειδωτικό stress, το ψωμωτικό stress, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, το θερμικό σοκ και η υπεριώδης ακτινοβολία UV⁷⁸ (για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως κινάσες που ενεργοποιούνται από το stress : stress-activated kinases ή stress-kinases).



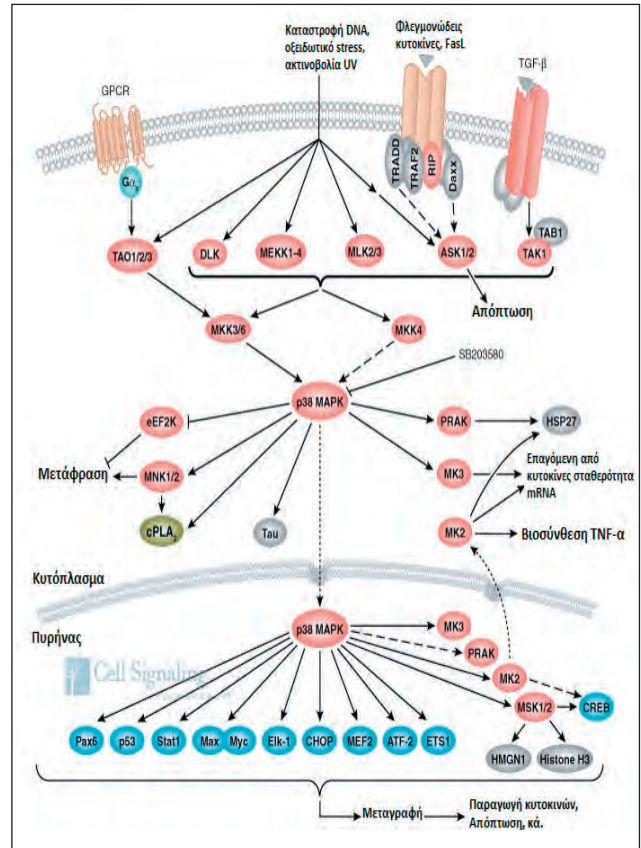
Σχήμα 9: Μηχανισμός ενεργοποίησης NF-κΒ

Οι ενεργοποιημένες κινάσες JNK/SAPKs προσδένονται και φωσφορυλιώνουν τον παράγοντα cJun (Σχήμα 10)⁷⁹, που είναι τμήμα του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1, activator protein -1, είναι ένα ετεροδιμερές ή ομοδιμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από μέλη των Jun, Fos και ATF, DNA-προσδεδόμενων πρωτεϊνών). Η επίδραση των JNK/SAPKs στον cJun αυξάνει την έκφραση γονιδίων με περιοχές αναγνωρίσιμες από το μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Επειδή το γονίδιο του cJun φέρει και αυτό περιοχές που αναγνωρίζονται από την AP-1 δημιουργείται ένας βρόγχος θετικής ανατροφοδότησης⁸⁰. Η οξειδοαναγωγική ρύθμιση (redox regulation) του AP-1 μελετάται εντατικά καθώς αποτελεί πρότυπο οξειδοαναγωγικής ρύθμισης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κΒ και ο ATF-2 (activating transcription factor-2). Στην ίδια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων ανήκει και ο μεταγραφικός παράγοντας AP-2 (activator protein -2). Ο AP-2 ενεργοποιείται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες και προσταγλανδίνες σε καλλιέργειες μεσαγγειακών κυττάρων⁸¹ και η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA ρυθμίζεται επίσης από οξειδωτικές διαδικασίες⁸². Η ενεργοποίηση του AP-2 σχετίζεται με ελαττωμένη έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδική διασποράση 2 (SOD2)⁸³.

Η σημαντικότερη λειτουργία που αποδίδεται στην οδό των JNK/SAPK κινασών είναι η επαγωγή της απόπτωσης⁸⁴. Η αναστολή της οδού των JNK/SAPK ευνοεί την επιβίω-



Σχήμα 10: Η οδός των JNK/SAPK κινασών



Σχήμα 11: Η οδός της p38 MAP κινάσης

ση των κυττάρων. Η οδός των JNK/SAPK κινασών ενεργοποιείται από το (επαγόμενο από τη υπεργλυκαιμία) οξειδωτικό stress και εμπλέκεται (στην επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία) απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή H_2O_2 , η δράση των JNK/SAPK κινασών και η επακόλουθη απόπτωση που επάγεται από την υπεργλυκαιμία, καταστέλλεται από την αντιοξειδωτική βιταμίνη C⁸⁵. Επιπρόσθετα, η αγγειοτενσίνη II⁸⁶ και τα προϊόντα της οδού της λιποξυγονάσης στα κύτταρα α RIN m5F αναστέλλουν την ενεργοποίηση των JNK/SAPK κινασών από την υπεργλυκαιμία⁸⁷.

7.3. Η οδός της μιτοχόνου πρωτεϊνικής κινάσης (p38 MAPK)

Η ενεργοποίηση της p38 MAP κινάσης επηρεάζει μία πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών όπως η φλεγμονή και η ανοσία, η κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση, οι αποκρίσεις των διαφόρων ιστών στο stress μέσω ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, η ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών (NF- κ B, αραχιδονικό οξύ, κυτταροκίνες κ.ά.) και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Σχήμα 11)⁸⁸. Επιπρόσθετα, η p38 MAP κινάση ρυθμίζει τη δράση άλλων κινασών σερίνης⁷⁰. Χρόνια ενεργοποίηση της οδού της p38 MAPK σχετίζεται με τη φυσιολογία παθολογικών καταστάσεων όπως η φλεγμονή, οι νευρολογικές ασθένειες, οι μολύνσεις και οι βλάβες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης⁸⁹.

Για το λόγο αυτό η χρήση εκλεκτικών αναστολέων της p38 MAPK ως αντιφλεγμονωδών παραγόντων αποτελεί αντικείμενο κλινικών ερευνών^{90,91,92}.

Η p38 MAPK ενεργοποιείται ως απόκριση στην υπεργλυκαιμία και το διαβήτη. Σε αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα επιμύων η αγωγή με γλυκόζη τετραπλασίασε τα επίπεδα της p38 MAP κινάσης⁹³. Σε σπειράματα επιμύων που καταστήθηκαν διαβητικοί με στρεπτοζοτοκίνη, αυξήθηκε τόσο η δραστηριότητα της p38 MAPK όσο και η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης θερμοικού σοκ 24 (Hsp-25) η οποία αποτελεί υπόστρωμα για την p38 MAPK⁹⁴. Τα γεγονότα αυτά φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου. Επιπρόσθετα, στο νευρικό ιστό ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη έχουν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα JNK/SAPK και p38 MAPK κινασών.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως οι οδοί του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B και των κινασών JNK/SAPK και p38 MAP είναι ευαίσθητα-στο-stress σηματοδοτικά συστήματα και η χρόνια ενεργοποίησή τους μπορεί να οδηγήσει στις όψιμες επιπλοκές του διαβήτη.

7.4. Η οδός των προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης (AGEs: Advanced Glycation End product)

Η γλυκόζη και ορισμένα παράγωγα της αντιδρούν με πρωτεΐνες, πυρινηκά οξέα και λιπίδια προκαλώντας τη γλυκοζυλίωσή τους. Οι αρχικές αντιδράσεις της γλυκοζυλίωσης είναι αντιστρεπτές, τα τελικά προϊόντα όμως έχουν σταθερή δομή και δεν διασπώνται εύκολα. Οι τελικές αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης είναι επομένως μη αντιστρεπτές.

Προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης βρίσκονται

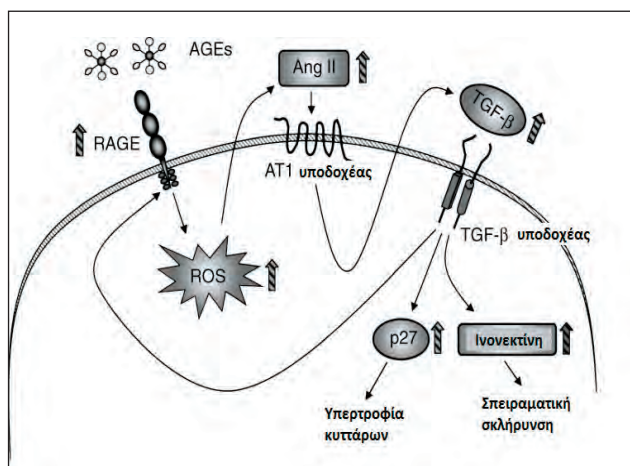
σε αυξημένο ποσοστό σε εξωκυττάρια δομές των αγγείων του αμφιβληστροειδούς⁹⁵ και του σπειράματος⁹⁶ διαβητικών ατόμων. Αρχικά, διατυπώθηκε η άποψη ότι τα προϊόντα αυτά προέρχονται από τη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση εξωκυττάρια πρωτεϊνών. Τελικά, έχει διαπιστωθεί ότι τα ενδοκυττάρια παραγόμενα προϊόντα αυτοοξειδωσίας της γλυκόζης έχουν την ικανότητα να γλυκοζυλιώνουν πρωτεΐνες με ταχύτητα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη⁸⁷. Σήμερα, κυριαρχεί η άποψη ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα ευθύνεται για την παραγωγή των AGEs τόσο ενδοκυττάρια όσο και έξω από τα κύτταρα⁹⁷.

Η αύξηση του σχηματισμού των AGEs μπορεί να προξενήσει βλάβες στα κύτταρα με τρεις κυρίως μηχανισμούς.

- Οι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, όταν γλυκοζυλιώνονται, δυσλειτουργούν
- Οι αλληλεπιδράσεις των γλυκοζυλιωμένων συστατικών με τα λοιπά συστατικά της διάμεσης εξωκυττάρια ουσίας αλλά και με υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων (ιντεγκρίνες) διαταράσσονται
- Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με AGE-υποδοχείς, που βρίσκονται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων, όπως είναι τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να πυροδοτούνται διάφοροι βλαπτικοί μηχανισμοί, που με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα την μιτοχονδριακή παραγωγή H_2O_2 και την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων⁹⁸ (Σχήμα 12)⁹⁹.

Μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο σχηματισμός των AGEs γίνεται ταχύτατα.¹⁵ Ένας από τους κύριους στόχους της γλυκοζυλίωσης είναι ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (b-FGF: basic fibroblast growth factor)¹⁰⁰. Η γλυκοζυλίωση του b-FGF αναστέλλει τις μωτωτικές διαιρέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Μια από τις πρωτεΐνες της εξωκυττάρια ουσίας που γλυκοζυλιώνονται είναι το κολλαγόνο, κυρίως οι τύποι I και IV, με συνέπεια την αλλοίωση των λειτουργικών του ιδιοτήτων¹⁰¹. Σε πειραματόζωα, η γλυκοζυλίωση του κολλαγόνου του τοιχώματος των μεγάλων αγγείων καθιστά τα αγγεία αυτά ανελαστικά¹⁰².



Σχήμα 12: Πιθανός μηχανισμός δράσης AGEs στα μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος

Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με AGE-υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων¹⁰³. Σε κυτταροκαλλιέργειες, τα μακροφάγα και τα κύτταρα του μεσαγγείου του σπειράματος, όταν ορισμένοι υποδοχείς στην επιφάνεια τους συνδεθούν με AGEs, παράγουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (IL-1:ιντερλευκίνη 1, IGF-I: insulin-like growth factor-I, TNFα : tumor necrosis factor-α, TGFβ: transforming growth factor-β, MCSF : macrophage colony stimulating factor, MGCSF : macrophage granulocyte colony stimulating factor και PDGF: platelet derived growth factor)^{104,105,106}, ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια που αυξάνουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του αγγείου και επάγουν τη φλεγμονή [VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, thrombomodulin, ιστικός παράγοντας]¹⁰⁷.

Ένας ειδικός τύπος υποδοχέα για τα AGEs, ο RAGE¹⁰⁸ (receptor for AGEs), του οποίου η δομή μοιάζει με εκείνη των ανοσοσφαιρινών, όταν συνδεθεί με AGEs προκαλεί την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου και ενεργοποιεί το μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα NF-κB, που με τη σειρά του προκαλεί την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων.

7.5. Η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) αποτελεί μια ομάδα ενζύμων (υπάρχουν ισόμορφες από α έως ε) που παρεμβαίνουν στη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε ειδική θέση σε μια πρωτεΐνη-στόχο. Δρουν, δηλαδή, **φωσφορυλιώνοντας** το υπόστρωμα της. Για την ενεργοποίηση της κινάσης απαιτείται φωσφατιδυλική σερίνη, ιόντα Ca^{++} και διακυλογλυκερόλη (DAG).

Η υπερβολική και συνεχής ενεργοποίηση της PKC είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στους ιστούς. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί *de novo* σύνθεση DAG μέσω των φωσφορικών τριοζών, οι συγκεντρώσεις των οποίων αυξάνουν λόγω της αυξημένης γλυκόλυσης¹⁰⁹. Επιπλέον, η αύξηση του λόγου NADH/NAD⁺, που οφείλεται στη μετατροπή της σορβιτόλης σε φρουκτόζη, και η αναστολή του ενζύμου GADPH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται στα μιτοχόνδρια, εκπνέουν την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη από την οδό της γλυκόλυσης προς την παραγωγή φωσφορικής διυδροξυ-ακετόνης και DAG. Ενεργοποίηση της PKC επίσης προκαλείται από τη σύνδεση των AGEs με τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των κυττάρων¹¹⁰. Η υπεργλυκαιμία ενεργοποιεί κυρίως τις β και δ ισόμορφες της PKC, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στον αμφιβληστροειδή και στο σπείραμα. Επιπλέον, ενεργοποίηση και των άλλων ισόμορφων της PKC έχει διαπιστωθεί σε διαβητικούς επίμους, όπως της PKC-α και της PKC-ε στον αμφιβληστροειδή και της PKC-α και PKC-δ στο σπείραμα^{111,112}.

Η ενεργοποίηση της PKC-β μειώνει τη ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή και το νεφρό¹¹³, πιθανόν μέσω μειωμένης παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο, ως γνωστό, είναι αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, ή και αύξησης της απελευθέρωσης της ενδοθηλίνης-1

(ET-1), ουσίας με αγγειοσυσπαστική δράση. Σε πειραματόζωα, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση της PKC μειώνει την παραγωγή NO στο σπείραμα¹¹⁴ και τα λεία μυϊκά κύτταρα¹¹⁵, ενώ σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων εμποδίζει την εξαρτώμενη από την ινσουλίνη ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (endothelial nitric oxide synthase, e-NOS)¹¹⁶. Η υπεργλυκαιμία αυξάνει την ικανότητα της ET-1 να διεγείρει τη MAPK (mitogen activated protein kinase) στα κύτταρα του μεσαγγείου, μέσω ενεργοποίησης ισομορφών της PKC¹¹⁷. Η ενεργοποίηση της PKC από την υπεργλυκαιμία **αυξάνει** επίσης τη **διαπερατότητα** του ενδοθηλίου¹¹⁸. Η PKC αυξάνει την έκλυση του παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) από τα λεία μυϊκά κύτταρα¹¹⁹. Ο VEGF είναι παράγοντας που αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων. Η PKC πιθανόν ευθύνεται, τουλάχιστον εν μέρει, για την αύξηση της εναπόθεσης της ινωδονεκτίνης και του κολλαγόνου τύπου IV στην εξωκυττάρια ουσία του μεσαγγείου χώρου του σπείραματος^{120,121}. Η υπεργλυκαιμία, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης, έχει ενοχοποιηθεί για την αύξηση της δραστηριότητας του αναστολέα της ινωδολύσης και του PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)¹²², καθώς και για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B¹²³. Η ενεργοποίηση, επομένως, της πρωτεϊνικής κινάσης από την υπεργλυκαιμία προκαλεί διαταραχές της ροής και της ηχητικότητας του αίματος, αύξηση του πάχους της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου και της διαπερατότητας των αγγείων και την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων (Σχήμα 13)¹²⁴.

7.6. Η οδός των πολυολών

Το κυριότερο ένζυμο της οδού των πολυολών είναι η αναγωγή της αλδόξης. Στην οδό αυτή χρησιμοποιείται ως συνένζυμο NADPH (αναχθέν φωσφορικό νικοτιν-ναμι-

δο-αδενο-δινουκλεοτίδιο) και ως υπόστρωμα γλυκόζη. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιούνται επίσης διάφορα σάκχαρα και παράγωγα τους, που μετατρέπονται στις αντίστοιχες αλκοόλες (πολυόλες). Η γλυκόζη μετατρέπεται σε σορβιτόλη και η γαλακτόζη σε γαλακτιτόλη.

Η σορβιτόλη οξειδώνεται, στη συνέχεια, σε φρουκτόζη από το ένζυμο αφυδρογονάση της σορβιτόλης. Στη δεύτερη αυτή αντίδραση χρησιμοποιείται NAD⁺ (οξειδωθέν νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο), το οποίο ανάγεται σε NADH (αναχθέν νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο).

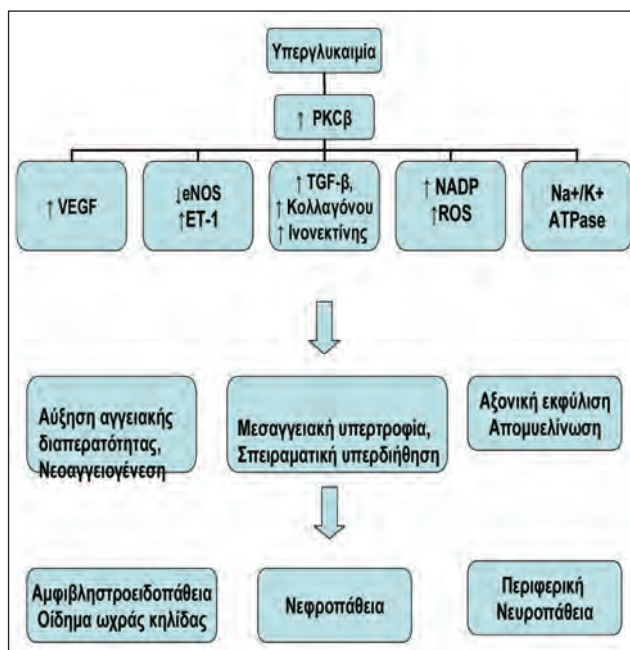
Το ρυθμιστικό ένζυμο της οδού των πολυολών είναι η αναγωγή της αλδόξης. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στα νεύρα, στον αμφιβληστροειδή, στους φακούς του οφθαλμού, στο σπείραμα και στο τοίχωμα των αγγείων. Στους ιστούς αυτούς, η πρόσληψη γλυκόζης γίνεται με μεταφορείς γλυκόζης άλλους πλην του GLUT 4 και για την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα αυτών των ιστών δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ινσουλίνης. Η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσα στα συγκεκριμένα κύτταρα βαίνει παράλληλα με τη συγκέντρωση της στο αίμα. Η χημική συγγένεια της αναγωγής της αλδόξης για τη γλυκόζη είναι μικρή (υψηλή K_m) και, επομένως, η οδός των πολυολών είναι φυσιολογικά ανενεργή. Όταν όμως, λόγω υπεργλυκαιμίας, η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα αυτά αυξηθεί, αυξάνει και ο μεταβολισμός μέσω της οδού των πολυολών. Μια από τις φυσιολογικές λειτουργίες της αναγωγής της αλδόξης είναι η αδρανοποίηση των γλυκοτοξινών, όπως π.χ. της μεθυλογλυοξάλης, ουσιών που έχουν τη δυνατότητα να γλυκοζυλιώνουν πρωτεΐνες και άλλα μόρια με ταχύτητα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη¹²⁵. Πράγματι, η μεθυλογλυοξάλη αποτελεί το καταλληλότερο υπόστρωμα για την αναγωγή της αλδόξης (έχει τη χαμηλότερη K_m).

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σημασία της ενεργοποίησης της οδού των πολυολών και της πρόκλησης, τελικά, βλαβών στα κύτταρα. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- Η προκαλούμενη από τη σορβιτόλη οσμωτική λύση των κυττάρων
- Η αδρανοποίηση των διαύλων Na⁺-K⁺ που εξαρτώνται από το ATP
- Η αύξηση του λόγου NADH/NAD⁺ στο κυτταρόπλασμα
- Η μείωση της συγκέντρωσης του NADPH στο κυτταρόπλασμα.

Η σορβιτόλη δεν διαχέεται ελεύθερα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν η οδός της πολυόλης ενεργοποιείται, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σορβιτόλης αυξάνει. Αρχικά, είχε υποθεθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της σορβιτόλης στα ενδοθηλιακά και τα νευρικά κύτταρα προκαλεί την είσοδο ύδατος και την οσμωτική λύση των κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις όμως της σορβιτόλης στα αγγεία και τα νεύρα των διαβητικών ασθενών έχουν μετρηθεί και βρέθηκαν να είναι χαμηλές.

Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, η ενεργοποίηση της οδού των πολυολών προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου Na⁺-K⁺-ATPάση, αδρανοποίηση δηλαδή των εξαρτώμενων από το ATP διαύλων Na⁺-K⁺, λόγω μειωμένης σύνθεσης της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης. Η αδρα-



Σχήμα 13: Πιθανοί μηχανισμοί δημιουργίας μικρο-αγγειακών επιπλοκών από την ενεργοποίηση της PKC

νοποίηση των εξαρτώμενων από το ATP διαύλων $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ παρατηρείται πράγματι στο διαβήτη, φαίνεται όμως ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), που, με τη σειρά της, αυξάνει την παραγωγή δύο αναστολέων της $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPάσης}$, του αραχιδονικού οξέος και της προσταγλανδίνης E_2 (PGE_2)¹²⁶.

Σύμφωνα με μια πιο πρόσφατη υπόθεση, η οξείδωση της σορβιτόλης από το NAD^+ αυξάνει το λόγο του NADH/NAD^+ στο κυτταρόπλασμα, με συνέπεια την αδρανοποίηση του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GADPH). Η αδρανοποίηση αυτού του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των φωσφορικών τριοξών, που με τη σειρά τους, αυξάνουν το σχηματισμό μεθυλογλυοξάλης και διακυλογλυκερόλης (DAG). Η μεθυλογλυοξάλη γλυκοζυλιώνει ταχέως πρωτεΐνες και οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζύλιωσης (AGEs), ενώ η DAG ενεργοποιεί την PKC.

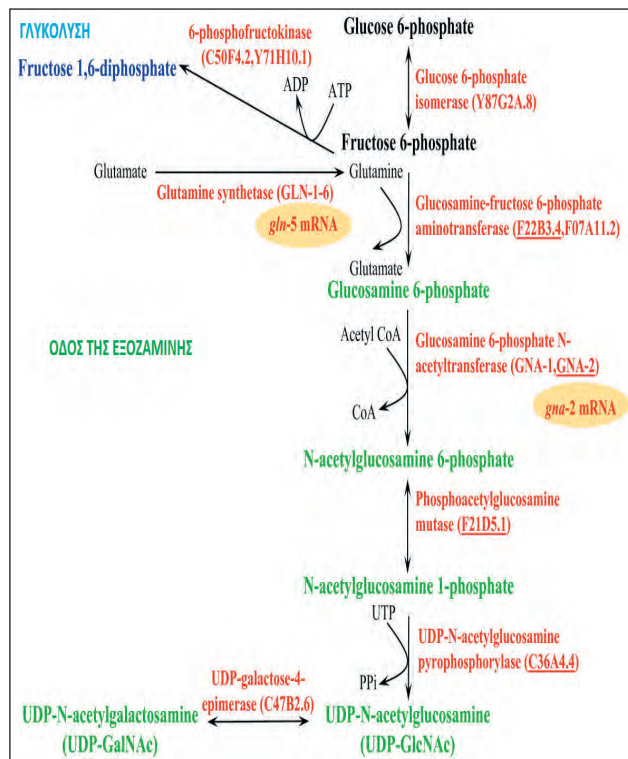
Σύμφωνα με την τέταρτη υπόθεση, η αναγωγή της γλυκόζης σε σορβιτόλη προκαλεί κατανάλωση του NADPH . Το NADPH είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της αναχθείσας γλουταθειόνης, η οποία είναι σημαντικός αδρανοποιητής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, και η έλλειψη της οποίας προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων¹²⁷. Επιπλέον, η υπεργλυκαιμία αδρανοποιεί την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή του NADPH , με αποτέλεσμα περαιτέρω τις συγκεντρώσεις του NADPH σε ορισμένα αγγειακά και νευρικά κύτταρα¹²⁸.

7.7. Η οδός της εξοξαμίνης

Πρόσφατα, παρουσιάστηκε η υπόθεση ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες μέσω εκτροπής του μεταβολισμού της γλυκόζης διά της οδού της εξοξαμίνης^{129,130,131}. (Σχήμα 14)¹³². Η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη, η οποία ακολουθώντας αντιδρά με γλουταμίνη. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αμιδοτρανσφεράση της γλουταμίνης-6-φωσφορικής φρουκτόζης (glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, GFAD), που αποτελεί το ρυθμιστικό ένζυμο της οδού της εξοξαμίνης. Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από την αζασερίνη. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι γλουταμικό οξύ και 6-φωσφορική γλυκοξαμίνη, η οποία μετατρέπεται στη συνέχεια σε ουριδυλ-διφωσφορική-N-ακετυλο-γλυκοξαμίνη (UDP-GluNac). Η ενεργοποίηση της οδού της εξοξαμίνης αυξάνει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, όπως του TGF α , του TGF β και του PAI-1^{118,119,133} με τρόπο που δεν είναι απόλυτα γνωστός.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών οφείλεται στη γλυκοζύλιωση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (ο Sp1 μετατρέπεται σε Sp1-O-GlcNAc και αυτή η μετατροπή τον ενεργοποιεί)¹³⁴. Ένδεχομένως, με την ενεργοποίηση της οδού της εξοξαμίνης γλυκοζυλιώνονται και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που δεν έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα.

Συνολικά, η ενεργοποίηση της οδού της εξοξαμίνης από την υπεργλυκαιμία φαίνεται να προκαλεί την παθολογική έκφραση ορισμένων γονιδίων και τη δυσλειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών και να συμμετέχει στην παθογένεια των επιπλοκών του διαβήτη.



Σχήμα 14: Οδός της εξοξαμίνης

8. Οξειδωτικό stress και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης

Το οξειδωτικό stress δεν εμπλέκεται μόνο στην παθοφυσιολογία των διαβητικών επιπλοκών αλλά σχετίζεται και με την αντοχή στη δράση της ινσουλίνης^{135,136,137,138} (το φαινόμενο αυτό καλείται ινσουλινοαντοχή ή ινσουλινοαντίσταση). In vivo δοκιμές σε διαβητικά πειραματόζωα υποδεικνύουν ότι τα αντιοξειδωτικά ενισχύουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Περαιτέρω κλινικές μελέτες σε διαβητικούς ασθενείς με αντοχή στην ινσουλίνη απέδειξαν ότι η θεραπεία με αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E, το λινολεϊκό οξύ (LA) και η γλουταθειόνη βελτίωσαν την ανταπόκριση των κυττάρων στην ινσουλίνη^{139,140,141,142}.

8.1. Ενεργοποίηση ευαίσθητων στο stress κινασών, φωσφορύλιωση IRS και αντοχή στην ινσουλίνη

Το οξειδωτικό stress ενεργοποιεί μία πληθώρα κινασών σερίνης^{143,144,145}. Στόχοι των κινασών είναι ο υποδοχέας ινσουλίνης (IR) και οι πρωτεΐνες του υποστρώματος του ινσουλινοκτικού υποδοχέα (IRS: Insuline Receptor Substrate). Η αυξημένη φωσφορύλιωση καταλοιπών σερίνης και θρεονίνης στα IRS και IR περιορίζει τη φωσφορύλιωση των υπολειμμάτων τυροσίνης τους και συνεπώς τη δράση της ινσουλίνης^{146,147,148,149,150,151}. Τα μόρια των IRS που διαθέτουν φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης παρουσιάζουν μικρότερη συγγένεια με τον ινσουλινοκτικό υποδοχέα και την 3-Κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη^{134,152} (PI3K). Το γεγονός αυτό περιορίζει τη δράση της ινσουλίνης, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης και τη μεταφορά της γλυκόζης στα κύτταρα^{153,154,155}.

Στα 3T3-L1 λιποκύτταρα η επαγωγή του οξει-

δωτικού stress με H_2O_2 παρεμποδίζει την μεταφορά γλυκόζης^{156,157,158}. Όπως στα λιποκύτταρα έτσι και στα Lδμυϊκά κύτταρα η ενεργοποίηση των p38 MAP κινασών από το οξειδωτικό stress (H_2O_2) ανατέλλει τη μεταφορά γλυκόζης¹⁵⁹. Επιπρόσθετα, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) διεγείρει τις JNK/SAPK κινάσες αυξάνοντας έτσι τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης του υποστρώματος του ινσουλινικού υποδοχέα IRS-1^{139,160}. Έτσι, η (επαγόμενη από την ινσουλίνη) φωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης του IRS-1 ελαττώνεται και η δράση της ινσουλίνης περιορίζεται σημαντικά.

8.2. IKKβ υπομονάδα, IRS πρωτεΐνες (πρωτεΐνες υποστρώματος ινσουλινικού υποδοχέα) και ανοχή στην ινσουλίνη

Σε μυϊκά κύτταρα με ανοχή στην ινσουλίνη, έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα IKKβ υπομονάδας του IKK συμπλέγματος το οποίο ενεργοποιεί το μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα NF-κB¹⁶¹. Η ενεργοποίηση της IKKβ υπομονάδας παρεμποδίζει τη δράση της ινσουλίνης. Αντίστροφα, η αναστολή της IKKβ από σαλικυλικά και PPARγ αγωνιστές^{162,163} αποκαθιστά την ανταπόκριση στην ινσουλίνη τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*^{164,165}. Η θεραπεία με ασπιρίνη και σαλικυλικά ελαττώνει τη φωσφορυλίωση των μορίων σερίνης και αυξάνει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης στις πρωτεΐνες του IRS^{152,153}. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη που προκαλεί η αδιπνεκτίνη, οφείλεται σε αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB^{166,167,168}.

Περαιτέρω μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα και ανθρώπους, αποδεικνύουν τη σπουδαιότητα IRS-πρωτεϊνών στη ρύθμιση της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος^{169,170,171}. Η φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης του ινσουλινικού υποδοχέα (IR) και του υποστρώματός του (IRS) από κινάσες ευαίσθητες στο stress (NAK, p38 MAPK, JNK/SAPK και άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης) αποτελεί ένα μηχανισμό που επιτρέπει τη συσχέτιση των οδών που ενεργοποιούνται από το stress με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις των κυττάρων.

8.3. Οξειδωτικό stress, τυροσινική φωσφατάση και ανοχή στην ινσουλίνη

Η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση και απενεργοποίηση της τυροσινικής φωσφατάσης (PTP)^{172,173,174}. Είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης είναι απαραίτητη για την (ινσουλινο-επαγόμενη) μεταφορά γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα και τα λιποκύτταρα^{175,176}. Παρόλο που η εκλεκτική και αντισρεπτική αναστολή συγκεκριμένων PTPασών όπως της PTP-1B αυξάνει τη δράση της ινσουλίνης^{177,178}, η οξείδωση κυστεϊνικών καταλοίπων στα ενεργά κέντρα των PTPασων, τις απενεργοποιεί και οδηγεί σε ινσουλινοανοχή *in vitro*^{163,164}.

Το οξειδωτικό stress ενεργοποιεί τις οδούς του NF-κB, των p38 MAP και JNK/SAPK κινασών. Η ενεργοποίηση αυτών των οδών ελαττώνει την ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης. Εκτός από την ινσουλινοαντίσταση, το επαγόμενο από την υπεργλυκαιμία οξειδωτικό stress ευθύνεται και για τις όψιμες διαβητικές επιπλοκές.

9. Οξειδωτικό stress και δυσλειτουργία β-κυττάρων του παγκρέατος

Η ινσουλίνη παράγεται αποκλειστικά από τα β-κύτταρα των νησίδων του Langerhans του παγκρέατος. Τα β-κύτταρα του παγκρέατος είναι επιρρεπή στις βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό stress. Οι GLUT-2 μεταφορείς γλυκόζης^{179,180}, η γλυκοκινάση^{181,182,183} και κυρίως ο μεταβολισμός της γλυκόζης από τα μιτοχόνδρια των β-κυττάρων, ευνοούν την έκκριση ινσουλίνης σε ποσότητα ανάλογη του ερεθίσματος. Παρόλο που οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταβολίτες της γλυκόζης ρυθμίζουν τη σύνθεση ινσουλίνης δεν είναι γνωστοί, είναι βέβαιο ότι ο μεταβολισμός τους στο επίπεδο των μιτοχονδρίων καίριας σημασίας^{184,185}. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τόπο παραγωγής αλλά και στόχο ελευθέρων ριζών. Έτσι η καταστροφή των μιτοχονδρίων από δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου είναι αναμενόμενο να περιορίζει την έκκριση ινσουλίνης.

Η επαγόμενη από τη χρόνια υπεργλυκαιμία εξάντληση των β-κυττάρων μελετήθηκε *in vivo* σε γενετικά προδιαθεμιμένα διαβητικά πειραματόζωα¹⁸⁶ και σε φυσιολογικά πειραματόζωα που έχουν υποστεί μερική παγκρεατεκτομή¹⁷⁴ ή που έχουν λάβει αγωγή με streptozotocin¹⁷⁴ (ουσία τοξική για τα β-κύτταρα). Στις *in vivo* αυτές μελέτες ο διαχωρισμός των επιπτώσεων που προκλήθηκαν λόγω υπεργλυκαιμίας από αυτές που προκλήθηκαν λόγω άλλων νευρολογικών, ενδοκρινικών και διατροφικών παραγόντων ήταν ιδιαίτερα πολύπλοκος. Επιπλέον η υπεργλυκαιμία ελαττώνει την ηπατική κάθαρση της ινσουλίνης *in vivo*, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της ινσουλίνης στη γενική κυκλοφορία να παραμένουν αμετάβλητα ακόμα και όταν μειώνεται η έκκρισή της από τα β-κύτταρα¹⁸⁷.

In vitro, η ανίχνευση των επιπλοκών που προκαλούνται από χρόνια έκθεση σε γλυκόζη, είναι ιδιαίτερα δύσκολη σε κύτταρα πειραματόζωων χωρίς γενετική προδιάθεση στο διαβήτη. Εξάμηνη επώαση (σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης) κυτταροκαλλιεργειών από β-κύτταρα τρωκτικών, ελάττωσε την έκκριση ινσουλίνης, το mRNA της ινσουλίνης και την πρόδεση των μεταγραφικών παραγόντων του mRNA της ινσουλίνης^{188,189}. Ωστόσο, παρόμοιες μελέτες δε διαπίστωσαν μείωση στην έκκριση ινσουλίνης κατά την έκθεση σε γλυκόζη. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην έκκριση των ενδοκυττάρων αποθεμάτων ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η τα αποθέματα ινσουλίνης ποικίλουν στα διάφορα τμήματα των β-κυττάρων. Τα παρακείμενα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κυστίδια παρουσιάζουν μεγάλη διαθεσιμότητα ινσουλίνης που μπορεί να εκκριθεί. Αντιθέτως, τόσο ινσουλίνη που προορίζεται για αποσύνθεση όσο και η ινσουλίνη και προ-ινσουλίνη του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi δεν διατίθενται για έκκριση. Επιπρόσθετα, τυχόν μείωση του mRNA της ινσουλίνης δεν είναι γνωστό αν θα ελαττώσει απαραίτητα και τη σύνθεση ινσουλίνης λόγω εμπλοκής μηχανισμών της μετάφρασης.

9.1. Ο ρόλος των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην ινσουλινοανοχή και τη δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος

Έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες σχετικά με την επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA: Free Fatty

Acids) στην ανάπτυξη αντοχής στην ινσουλίνη. Σύμφωνα με τη θεωρία του P.J. Randle^{190,191} υψηλή διαθεσιμότητα FFA αυξάνει τους λόγους acetyl-CoA/CoA και NADH/NAD⁺ με αποτέλεσμα:

- (α) την απενεργοποίηση του συμπλόκου πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης
- (β) την ελάττωση οξειδωσης της γλυκόζης και την αύξηση του ενδοκυττάρου κυτταρικού οξέος
- (γ) την αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης
- (δ) τη συσσώρευση της φωσφατάσης της 6-φωσφο-γλυκόζης και
- (ε) την αναστολή της δράσης της εξοκινάσης II. Κατά τον Randle, τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε ενδοκυττάρια συσσώρευση γλυκόζης και ελαττωμένη μεταφορά γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα.

Σε αντίθεση με τη θεωρία του P.J. Randle, νεώτερες έρευνες έδειξαν ότι η ελάττωση σύνθεσης μυϊκού γλυκόγνου μετά από επώαση με ελεύθερα λιπαρά οξέα έγινε μέσω μείωσης -και όχι αύξησης- των επιπέδων της φωσφατάσης της 6-φωσφο-γλυκόζης¹⁹². Δηλαδή, τα νεώτερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ελαττώνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης. Σε κάθε περίπτωση, το σύστημα μεταφοράς της γλυκόζης στα κύτταρα είναι το ρυθμιστικό στάδιο για την επαγόμενη από τα FFA ινσουλινοαντοχή¹⁹³.

Σε μοριακό επίπεδο, παρατηρήθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων παρεμποδίζουν την (επαγόμενη από την ινσουλίνη) φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης στο IRS-1 και αναστέλλουν τη δράση της PI3K (3-Κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη)¹⁸⁰.

Η όπως συμβαίνει με την υπεργλυκαιμία, η επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Αυξημένα επίπεδα FFA παρεμποδίζουν την έκκριση ινσουλίνης τόσο in vivo όσο και in vitro¹⁹⁴ γεγονός που αποδίδεται στη συσσώρευση εστέρων ακετυλο-συνενζύμου Α στο κυτταρόπλασμα^{182,195}. In vitro, μακροχρόνια έκθεση σε FFA φαίνεται να αναστέλλει τη σύνθεση του ινσουλινικού mRNA^{196,197} και την επαγόμενη από τη γλυκόζη-έκκριση ινσουλίνης^{184,198}.

Βιβλιογραφία

1. De Fronzo R.A., Ferrannini E., Keen H., Zimmet P., (2004) *International Textbook of Diabetes Mellitus (third edition)*. ed. John Wiley, vol. II, 1135
2. De Fronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5, 177–269, 1997
3. Reaven G.M. (2000) Insulin resistance and its consequences: type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. In: LeRoith D., Taylor S.I., Olefsky J.M., eds. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 604–615
4. Porte Jr.D. Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17, 181–188, 2001
5. Kahn C.R., *Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes*. *Diabetes* 43, 1066–1084, 1994
6. Grodsky G.M. (2000) Kinetics of insulin secretion: Underlying metabolic events in diabetes mellitus. In: Le Roith D., Taylor S.I., Olefsky J.M., eds. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2–11
7. Froguel P., Velho G. Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Prog. Horm. Res.* 56, 91–105, 2001
8. Kahn C.R., Vicent D., Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 47, 509–531, 1996
9. Almind K., Doria A., Kahn C.R. Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat. Med.* 7, 277–279, 2001

Oxidative Stress and type II Diabetes Mellitus

Dimitra Andreou, Ioanna Andreadou

Department of Pharmaceutical Chemistry, Scholl of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, Athens 157 71

Summary

Vascular and neuropathic complications are the major cause of mortality and morbidity of diabetes. Several clinical studies including the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) have shown that the severity of these complications are directly associated with hyperglycemia regardless of the difference in pathogenesis of type I or II diabetes 1.

Hyperglycemia and free fatty acids (FFA) are responsible for reactive oxygen species (ROS) generation and as a consequence, oxidative stress in a variety of tissues may occur. When compensatory response from the endogenous antioxidant network is absent or deficient, imbalance between ROS synthesis and damage leads to the activation of stress-sensitive intracellular signaling pathways. Activation of signaling pathways is connected with insulin resistance, impaired insulin secretion (through β-cell dysfunction) and diabetic complications. The present review attempts to present the biochemical pathways by which hyperglycemia- and FFA-induced oxidative stress causes insulin resistance, β-cell dysfunction and complications of diabetes.

The ability of antioxidants to protect against in vitro, along with the clinical benefits often reported following Clinical trials antioxidant therapy, supports the causative role of oxidative stress in mediating and/or worsening these abnormalities. Protective role of antioxidants against the effects of hyperglycemia and free fatty acids (FFA) in vitro and clinical effectiveness of antioxidant supplements indicate that oxidative stress may be the reason of these

10. Taylor S.I., Accili D., 2000 Mutations in the genes encoding the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. In: LeRoith D., Taylor S.I., Olefsky J.M., eds. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 681–691
11. Klatt P., Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eu. J. Biochem.* 267,4928–4944,2000
12. Kirilin W.G., Cai J., Thompson S.A., Diaz D., Kavanagh T.J., Jones D.P. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic. Biol. Med.* 27,1208–1218,1999
13. Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274,16040–16046,1999
14. Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu J., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature (London)*, 401,79–82,1999
15. Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82,47–95, 2002
16. Johns D.P., Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal* 8,1865–1879,2006,
17. Κοροπούλη Μ., Μυοκάρδιο και οξειδωτικό stress, http://www.biomedresearch.gr/index.php?option=com_content&task=view&id=156&Itemid=55
18. Szeto H.H. Mitochondria-Targeted Peptide Antioxidants: Novel Neuroprotective Agents. *AAPS Journal* 8, E521-E531, 2006
19. Boveris A., Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* 105,429–435,1984
20. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59,527–605,1979
21. Hansford R.G., Hogue B.A., Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29,89–95,1997
22. Turrens J.F., Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191,421–427,1980
23. Shigenaga M.K., Hagen T.M., Ames B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,10771–10778, 1994
24. Cadenas E., Davies K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29,222–230,2000
25. Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res.* 86,494-501,2000
26. Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W., Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74,1141–1148, 1994
27. Rajagopalan S., Kurz S., Munzel T., Tarpey M., Freeman B.A., Griendling K.K., Harrison D.G. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 97,1916–1923, 1996
28. Mohazzab-H K.M., Wolin M.S. Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO₂ sensor. *Am. J. Physiol.* 267, L823–L831, 1994
29. Mohazzab-H K.M., Kaminski P.M., Wolin M.S., NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* 266,H2568–H257, 1994
30. Jones S.A., O'Donnell V.B., Wood J.D., Broughton J.P., Hughes E.J., Jones O.T.G. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 271,H1626–H1634, 1996
31. Pagano P.J., Tornheim K., Cohen R.A. Superoxide anion production by rabbit thoracic aorta: effect of endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 265,H707–H712, 1993
32. Pagano P.J., Ito Y., Tornheim K., Gallop P.M., Tauber A.I., Cohen R.A. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 268,H2274–H2280,1995.
33. Patterson C., Ruef J., Madamanchi N.R., Barry-Lane P., Hu Z., Horaist C., Ballinger C.A., Brasier A.R., Bode C., Runge M.S. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 274,19814–19822, 1999
34. Sundaresan M., Zu-Xi Y., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 270,296–299, 1995
35. De Keulenaer G.W., Alexander R.W., Ushio-Fukai M., Ishizaka N., Griendling K.K. Tumor necrosis factor- α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle cells. *Biochem J.* 329,653–657, 1998
36. Dusi S., Della Bianca V., Grzeskowiak M., Rossi F. Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca²⁺-depleted neutrophils. *Biochem. J.* 290,173–178, 1993
37. Collin B., Busseuil, D., Zeller M., Perrin C., Barthez O., Duvillard L., Vergely C., Bardou M., Dumas M., Cottin Y., Rochette L. Increased superoxide anion production is associated with early dysfunctions in a rabbit model *Molecular Cell Biochemistry* 294:225-35, 2007.
38. Sawyer D.B., Sawyer D.B., Suter T.M., Apstein C.S; The sting of salt on an old, but open, wound - Is Na+

- the cause of mitochondrial and myocardial injury during ischemia/reperfusion? *J. Molecular Cell Cardiology* 34:379-88, 2002.
39. Parks D.A., Granger D.N. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 548,87-99, 1986
 40. Muralikrishna Adibhatla R., Hatcher J.F. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 376-87, 2006
 41. Boron W.F., Boulpaep E.L. (2006) *Ιατρική φυσιολογία – κυτταρική και μοριακή προσέγγιση, τόμος 3*
 42. Six D.A., Dennis E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488,1–19, 2000.
 43. Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531,2–6, 2002.
 44. McMurry J., Begley T.P. (2005) *The organic chemistry of biological pathways.* Roberts and Co. Publishers 366
 45. Kuel F.A.Jr., Egan R.W. Prostaglandines, arachidonic acid and inflammation, *Science* 210,978-981,1980
 46. Moncada S., Vane J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin, endoperoxides thromboxane A2 and prostaglandin. *Pharmacol. Rev.*30,293-331,1979
 47. Best B. Fats You Need – Essential Fatty Acids. <http://www.benbest.com/health/essfat.html>
 48. Bass D.A., O' Flaherty J.T., Goetzl E.J., DeChatelet L.R., McCall C.E. Arachidonic acid and hexose transport in human polymorphonuclear leukocytes, *Prog. Lipid Res.* 20,1982
 49. Naccache PH, Borgeat P, Goetzl EJ, et al., Mono and di-hydroxy eicosatetraenoic acids after calcium homeostasis in rabbit neutrophils, *J. Clin. Invest., in press*
 50. Halushka P. (2000) Prostaglandins and related compounds, in Goldman: Cecil Textbook of Medicine, 21sted., W. B. Saunders Company 1189-1194.
 51. Brownlee M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820,2001.
 52. Ceriello A. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy *Diabetes Care* 26,1589-1596,2003
 53. Knowles R.G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 250,1994
 54. Ceriello A., Quagliario L., D'Amico M., Di Filippo C., Martella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51,1076-1082, 2002
 55. Ceriello A., Mercuri F., Quagliario L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L., Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 44, 834-838, 2001
 56. Park K.S., Kim J.H., Kim M.S., Kim J.M., Kim S.K, Choi J.Y., Chung M.H., Han B., Kim S.Y., Lee H.K. Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 50, 2837-2841, 2001
 57. Kamoshima W., Kitamura Y., Nomura Y., Taniguchi T. Possible involvement of ADP-ribosylation of particulate enzymes in cell death induced by nitric oxide-donors in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 30, 305-311, 1997
 58. Chae H.Z., Chung S.J., Rhee S.G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269,27670–27678,1994
 59. Kwon S.J., Park J.W., Choi W.K., Kim I.H., Kim K. Inhibition of metalcatalysed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201,8–15,1994
 60. Netto L.E.S, Chae H.Z., Kang S.W., Stadtman E.R. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J. Biol. Chem.* 271,15315–15321,1996
 61. Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16,577–586, 2005
 62. Edwards R. <http://www.dur.ac.uk/d.p.dixon/group.php>
 63. Nogueira C.W., Zeni G., Rocha J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104,6255–6285,2004
 64. Dickinson D., Forman H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64,1019–1026, 2002,
 65. Arrigo A.P. *Gene expression and the thiol redox state.* *Free Radic. Biol. Med.* 27,936–944,1999
 66. Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333,19–39, 2003
 67. Mohamed A.K., Bierhaus A., Schiekofer S., Tritschler H., Ziegler R., Nawroth P.P. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10,157–167,1999
 68. Mercurio F., Manning A.M. NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 18,6163–6171,1999
 69. Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336,1066–1071,1997
 70. Karin M., Ben Neria Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18,621–663,2000
 71. Karin M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18,6867–6874,1999
 72. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling

- Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 23(5),603, 2002
73. DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388,548–554,1997
 74. Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J., Young D.B., Barbosa M., Mann M., Manning A.M., Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278,860–866,1997
 75. Ling L., Cao Z., Goeddel D.V. NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,3792–3797,1998
 76. Tojima Y., Fujimoto A., Delhase M., Chen Y., Hatakeyama S., Nakayama K., Kaneko Y., Nimura Y., Motoyama N., Ikeda K., Karin M., Nakanishi M. NAK is an I κ B kinase-activating kinase. *Nature* 404,778–782,2000
 77. Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. In: Woude G.F.V., Klein G., eds. *Advances in cancer research*. San Diego: Academic Press Inc. 74,49–139,1998
 78. Tibbles L.A., Woodgett J.R. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol. Life Sci.* 55,1230–1254,1999
 79. *Cell Signaling Technology, Inc.* http://images.google.gr/imgres?imgurl=http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/SAPK_JNK.jpg&imgrefurl=http://www.cellsignal.com/reference/pathway/SAPK_JNK.html&usq=__hTtJhJJ-zg5oRb-iep9P18DNKsU=&h=668&w=700&sz=117&hl=el&start=34&um=1&itbs=1&tbnid=iiHetEMTv8GpRM:&tbnh=134&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3DJNK%2Bpathway%2Bcell%2Bsignaling%26ndsp%3D20%26hl%3Del%26safe%3Doff%26sa%3DN%26start%3D20%26um%3D1
 80. Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39,67–101,1999
 81. Suyama K., Kabuyama Y., Suzuki S., Kawasaki Y., Suzuki J., Suzuki H., Homma Y. Induction of transcription factor AP-2 by cytokines and prostaglandins in cultured mesangial cells. *Am. J. Nephrol.* 21:307–314, 2001
 82. Huang Y., Domann F.E. Redox modulation of AP-2 DNA binding activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249,307–312,1998
 83. Zhu C.H., Huang Y., Oberley L.W., Domann F.E. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J. Biol. Chem.* 276,14407–14413,2001
 84. Basu S., Kolesnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 17,3277–3285,1998
 85. Ho F.M., Liu S.H., Liau C.S., Huang P.J., Lin-Shiau S.Y. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 101,2618–2624,2000
 86. Natarajan R., Scott S., Bai W., Yerneni K.K.V., Nardler J. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension* 33,378–384,1999
 87. Bleich D., Chen S.Y., Wen Y.S., Nadler J.L., 1997, The stress-activated c-Jun protein kinase (JNK) is stimulated by lipoxygenase pathway product 12-HETE in RIN m5F cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:448–451
 88. *Cell Signaling Technology, Inc.* http://images.google.gr/imgres?imgurl=http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/MAPK_p38.jpg&imgrefurl=http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_p38.html&usq=__eiZFTdqJrfFTl2q2C0xiqYm7MK8=&h=671&w=700&sz=117&hl=el&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=TrA82a9Q4y8_FM:&tbnh=134&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dp38%2Bmapk%2Bpathway%26hl%3Del%26safe%3Doff%26sa%3DN%26um%3D1
 89. Obata T., Brown G.E., Yaffe M.B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit. Care Med.* 28:N67–N77,2000
 90. Salituro F.G., Germann U.A., Wilson K.P., Bemis G.W., Fox T., Su M.S. Inhibitors of p38 MAP kinase: therapeutic intervention in cytokine-mediated diseases. *Curr. Med. Chem.* 6,807–823,1999
 91. Lee J.C., Kumar S., Griswold D.E., Underwood D.C., Votta B.J., Adams J.L. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 47,185–201, 2000
 92. Barone F.C., Parsons A.A. Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke. *Expert Opin. Invest. Drugs* 9,2281–2306,2000
 93. Igarashi M., Wakasaki H., Takahara N., Ishii H., Jiang Z.Y., Yamauchi T., Kuboki K., Meier M., Rhodes C.J., King G.L. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J. Clin. Invest.* 103,185–195,1999
 94. Dunlop M.E., Muggli E.E. Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney. Int.* 57,464–475,2000
 95. Stitt A.W., Li Y.M., Gardiner T.A., Bucala R., Archer D.B., Vlas-Sara H. Advanced glycation end-products (AGEs) co-localize with AGE-receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am. J. Pathol.* 1, 50,523–531,1997
 96. Nishino T., Horii Y., Shiiki H., Yakamoto H., Makita Z., Bucala R., Dohi K. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end-products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum. Pathol.* 26,308–313,1995
 97. Wells-Knecht K.J., Zyzak D.V., Litchfield J.E., Thorpe S.R., Baynes J.W. Mechanism of autoxidative

- glycosylation: Identification of glyoxale and arabinose intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 34,3702-3709,1995
98. Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol.* 44,1139-1145,1998
 99. Fukami K., Ueda S., Yamagishi S., Kato S., Inagaki Y., Takeuchi M., Motomiya Y., Bucala R., Iida S., Tamaki K., Imaizumi T., Cooper M., Okuda S. AGEs activate mesangial TGF- β Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction, *Kidney International* 66, 2137-2147,2004
 100. Chang E.Y., Szallasi Z., Acs P., Raizada V., Wolfe P.C., Fewtrell C., Blumberg P.M., Rivera J. Functional effects of overexpression of protein kinase C- α - β - δ - ϵ , and - ζ in mast cell line RBL-2H3. *J. Immunol.* 1, 59,2624-2632,1997
 101. Giardino I., Edelstein D., Brownlee M. Non enzymatic glyco-sylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J. Clin. Invest.* 94,110-117,1994
 102. Tanaka S., Avigad G., Brodsky B., Eikenberry E.F., Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J. Mol. Biol.* 263,4392-4398,1988
 103. Huijiberts M.S., Wolffenbuttel B.H., Boudier H.A. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 92,1407-1411,1993
 104. Li Y.M., Mitsuhashi T., Wojciechowicz D., Shimizu N., Li J., Stitt A., He C., Banerjee D., Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation end-product receptors, Relationship of p60 to OST-48 and p90-80K-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,11047-11052,1996
 105. Vlassara H., Brownlee M., Manogue K.R., Dinarello C.A., Pasa-Gian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins, Role in normal tissue remodelling. *Science* 240,1546-1548,1988
 106. Kirstein M., Aston C., Hintz R., Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor ϵ in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J. Clin. Invest.* 90,439-446,1992
 107. Abordo E.A., Westwood M.E., Thornalley P.J. Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation end-products. *Immunol. Lett.* 53,7-13,1996
 108. Schmidt A.M., Hori O., Chen J.X., Li J.F., Crandall J., Zhang J., Cao R., Yan S.D., Brett J., Stern D. Advanced glycation end-products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J. Clin. Invest.* 96,1395-1403,1995
 109. Li J., Schmidt A.M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end-products. *J. Biol. Chem.* 272,16498-16506,1997
 110. Koya D., King G.L., Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47,859-866,1998
 111. Scivittaro V., Ganz M.B., Weiss M.F. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β (II) in neonatal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 278,F676-F683,2000
 112. Shiba T., Inoguchi T., Sportsman J.R., Heath W.F., Bursell S., King G.L. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am. J. Physiol.* 265,E783-E793,1993
 113. Derubertis F.R., Craven P.A., Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes, Mechanism and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 43,1-8,1994
 114. Ishii H., Jirousek M.R., Koya D., Takagi C., Xia P., Clermont A., Bursell S.E., Kern T. S., Ballas L. M., Heath W.F., Stramm L.E., Feener E.P., King G.L. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science* 272,728-73,1996
 115. Craven P.A., Studer R.K., Derubertis F.R. Impaired nitric oxide dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats, Evidence for protein kinase C mediated suppression of the cholinergic response. *J. Clin. Invest.* 93,311-320,1994
 116. Ganz M.B., Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am. J. Physiol.* 278,E146-E152,2000
 117. Kuboki K., Jiang Z.Y., Takahara N., Ha S.W., Igarashi M., Yamauchi T., Feener E.P., Herbert T.P., Rhodes C.J., King G.L. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo. A specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000,101,676-681
 118. Glogowski E.A., Tsiani E., Zhou X., Fantus I.G., Whiteside C. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int.* 55,486-499,1999
 119. Hempel A., Maasch C., Heintze U., Lindschau C., Dietz R., Luft E.C., Haller H. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C α , *Circ. Res.* 81,363-371,1997
 120. Williams B., Gallacher B., Patel H., Orme C., Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46,1497-1503,1997
 121. Studer R.K., Craven P.A., Derubertis F.R. Role for protein kinase C in the mediation of increased fi-

- bronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes* 42,118-126,1993
122. Pugliese G., Pricci F., Pugliese F., Mene P., Lenti L., Andreani D., Galli G., Casini A., Bianchi S., Rotella C.M. Mechanisms of glucose enhanced extracellular matrixaccumulation in rat glomerular mesangial cells. *Diabetes* 43,478-490,1994
 123. Feener E.P., Xia P., Inoguchi T.A., Shida T., Kunisaki M., King G.L. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II- induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib. Nephrol.*, 118,180-187,1996
 124. Sasase T. PKC-a target for treating diabetic complications. *Drugs Future*, 2006 http://journals.prous.com/journals/dof/20063106/html/df310503/images/pkc_f2.gif
 125. Vander Jagt D.L., Robinson B., Taylor K.K., Hunsaker L.A. Reduction of trioses by NAD H-dependent aldo-keto reductases, Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J. Biol. Chem.* 267,4364-4369,1992
 126. Xia P., Kramer R.M., King G.L. Identification of the mechanism for the inhibition of Na, K-adenosine triphosphatase by hyperglycaemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J. Clin. Invest.* 96,733,1995
 127. Lee A.Y., Chung S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13,23-30,1999
 128. Zhang Z., Apse K., Pang J., Stanton R.C. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275,40042-40047,2000
 129. Yerneni K.K.V., Bai W., Khan B.V., Medford R.M., Natarajan R. Hyperglycemia- induced activation of nuclear transcription factor κ - B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48,855-864,1999
 130. Sayeski P.P., Kudlow J.E. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J. Biol. Chem.* 271,15237- 15243,1996
 131. Kolm-Litty V., Sauer U., Nerlich A., Lehmann R., Schleicher E.D. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 101,160-169,1998
 132. Johnston et al, *Hexosamine pathway for biosynthesis of UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc BMC Biology* 4, 35, 2006 http://images.google.gr/imgres?imgurl=http://www.biomedcentral.com/content/figures/1741-7007-4-35-1.jpg&imgrefurl=http://www.biomedcentral.com/1741-7007/4/35/figure/F1&usq=__-l0zgt_NoNoiQWwHxAkeRfBESvg=&h=503&w=600&sz=93&hl=el&start=1&um=1&itbs=1&tbnid=_xLvFHbBVu4xKM:&tbnh=113&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3DHexosamine%2Bpathway%2Bfor%2Bbiosynthesis%2Bof%2BUDP-GlcNAc%2Band%2BUDP-GalNAc%26um%3D1%26hl%3Del%26safe%3Doff%26sa%3DN%26tbs%3Disch:1
 133. Daniels M.C., Kansal P., Smith T.M., Paterson A.J., Kudlow J.E., McClain D.A. Glucose regulation of transforming growth factor-alpha expression is mediated by products of the hexosamine biosynthesis pathway. *Mol. Endocrinol.* 7,1041-1048,1993
 134. Chen Y.A., Su M., Walia R.R., Hao Q., Covington J.W., Vaughan D.E. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273,822-831,1998
 135. Paolisso G., D'Amore A., Volpe C., Balbi V., Saccomanno F., Galzerano D., Giugliano D., Varricchio M., D'Onofrio F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* 43,1426-1429,1994
 136. Paolisso G., Giugliano D., Oxidative stress and insulin action, is there a relationship? *Diabetologia* 39,357-363,1996
 137. Ceriello A., Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49,27-29,2000
 138. Wittmann I., Nagy J., Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress? *Diabetologia* 39,1002-1003,1996
 139. Hirai N., Kawano H., Hirashima O., Motoyama T., Moriyama Y., Sakamoto T., Kugiyama K., Ogawa H., Nakao K., Yasue H. Insulin resistance and endothelial dysfunction in smokers, effects of vitamin C. *Am. J. Physiol.* 279,H1172-H1178,2000
 140. Hirashima O., Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Improvement of endothelial function and insulin sensitivity with vitamin C in patients with coronary spastic angina, possible role of reactive oxygen species. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35,1860-1866,2000
 141. Caballero B. *Vitamin E improves the action of insulin.* *Nutr. Rev.* 51,339-340,1993
 142. Paolisso G., Di Maro G., Pizza G., D'Amore A., Sgambato S., Tesauro P., VarricchioM.,D'Onofrio F. PlasmaGSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am. J. Physiol.* 263,E435-E440,1992
 143. Cohen P. Dissection of protein kinase cascades that mediate cellular response to cytokines and cellular stress. *Adv. Pharmacol.* 36,15-27,1996
 144. Kyriakis J.M., Avruch J. Sounding the alarm, protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271, 24313-24316,1996
 145. Adler V., Yin Z., Tew K.D., Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18,6104-6111,1999
 146. Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the jux-

- tamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272,29911–29918,1997
147. Kellerer M., Mushack J., Seffer E., Mischak H., Ulrich A., Haring H.U. Protein kinase C isoforms α , δ and θ require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41,833–838,1998
 148. Li J., DeFea K., Roth R.A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 274,9351–9356,1999
 149. Qiao L.Y., Goldberg J.L., Russell J., Sun X.J. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 274,10625–10632,1999
 150. Griffin M.E., Marcucci M.J., Cline G.W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L.J., Kraegen E.W., White M.F., Shulman G.I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48,1270–1274,1999
 151. Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M.F. The c-jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 275,9047–9054,2000
 152. Paz K., Voliovitich H., Hadari Y.R., Roberts C.T., LeRoith D., Zick Y. Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. Use of individually expressed receptor domains for structure function analysis. *J. Biol. Chem.* 271,6998–7003,1996
 153. Birnbaum M.J. Turning down insulin signaling. *J. Clin. Invest.* 108,655–659,2001
 154. Zick Y. Insulin resistance, a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends. Cell Biol.* 11,437–441,2001
 155. Sykiotis G.P., Papavassiliou A.G. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol. Endocrinol.* 15,1864–1869,2001
 156. Rudich A., Kozlovsky N., Potashnik R., Bashan N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3–L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* 35,E935–E940,1997
 157. Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., Khamaisi M., Bashan N. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3–L1 adipocytes. *Diabetologia* 42,949–957,1999
 158. Tirosh A., Potashnik R., Bashan N., Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3–L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 274,10595–10602,1999
 159. Blair A.S., Hajdуч E., Litherland G.J., Hundal H.S., Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274,36293–36299,1999
 160. Aguirre V., Werner E.D., Giraud J., Lee Y.H., Shoelson S.E., White M.F. Phosphorylation of ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.* 277,1531–1537,2002
 161. Yuan M., Lee J., Konstantopoulos N., Hansen L., Shoelson S.E., 2000 Salicylate inhibition of IKK β reverses insulin resistance in Zucker (fa/fa) rats. *Diabetes* 49(Suppl 1),A292
 162. Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403,103–108,2000
 163. Straus D.S., Pascual G., Li M., Welch J.S., Ricote M., Hsiang C.H., Sengchanthalangsy L.L., Ghosh G., Glass C.K. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,4844–4849,2000
 164. Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J., Hansen L., Li Z.W., Karin M., Shoelson S.E. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK β . *Science* 293,1673–1677, 2001
 165. Kim J.K., Kim Y.J., Fillmore J.J., Chen Y., Moore I., Lee J., Yuan M., Li Z.W., Karin M., Perret P., Shoelson S.E., Shulman G.I. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest.* 108,437–446, 2001
 166. Berg A.H., Combs T.P., Du X., Brownlee M., Scherer P.E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7,947–953,2001
 167. Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Terauchi Y., Kubota N., Hara K., Mori Y., Ide T., Murakami K., Tsuboyama-Kasaoka N., Ezaki O., Akanuma Y., Gavrilova O., Vinson C., Reitman M.L., Kagechika H., Shudo K., Yoda M., Nakano Y., Tobe K., Nagai R., Kimura S., Tomita M., Froguel P., Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* 7,941–946,2001
 168. Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Okamoto Y., Maeda K., Kuriyama H., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y. Adiponectin, NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102,1296–1301, 2000
 169. Burks D.J., White M.F. IRS proteins and β -cell function *Diabetes* 50(Suppl. 1),S140–S145,2001
 170. Withers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., Zhang Y.T., Bernal D., Pons S., Shulman G.I., Bonnerweir S., White M.F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*

- 391,900–904, 1998
171. Aspinwall C.A., Qian W.J., Roper M.G., Kulkarni R.N., Kahn C.R., Kennedy R.T. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in β -cells. *J. Biol. Chem.* 275,22331–22338, 2000
 172. Heffetz D., Bushkin I., Dror R., Zick Y. The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.* 265,2896–2902, 1990
 173. Denu J.M., Tanner K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide, evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37,5633–5642, 1998
 174. Krejca C.M., Schieven G.L. Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Environ. Health Perspect.* 106,1179–1184, 1998
 175. Frost S.C., Lane M.D. Evidence for the involvement of vicinal sulfhydryl groups in insulin-activated hexose transport by 3T3–L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 260,2646–2652, 1985
 176. Henriksen E.J., Holloszy J.O. Effects of phenylarsine oxide on stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 258,C648–C653, 1990
 177. Evans J.L., Jallal B., 1999 Protein tyrosine phosphatases, their role in insulin action and potential as drug targets. *Expert Opin. Investig. Drugs* 8,139–160
 178. Goldstein B.J. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity, and related states of insulin resistance. *Curr. Drug Targets* 1,265–275, 2001
 179. Guillam M.T., Dupraz P., Thorens B. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49,1485–1491, 2000
 180. Arbuckle M.I., Kane S., Porter L.M., Seatter M.J., Gould G.W. Structure-function analysis of liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters, Expression of chimeric transporters in *Xenopus* oocytes suggests an important role for putative transmembrane helix 7 in determining substrate selectivity. *Biochemistry* 35,16519–16527, 1996
 181. Bedoya F.J., Wilson J.M., Ghosh A.K., Finegold D., Matschinsky F.M. The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35,61–67, 1986
 182. Matschinsky F.M. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39,647–652, 1990
 183. Matschinsky F.M., Glaser B., Magnuson M.A. Pancreatic β -cell glucokinase, closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 47,307–315, 1998
 184. Macchler P., Kennedy E.D., Pozzan T., Wollheim C.B. Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic β -cells. *EMBO J.* 16,3833–3841, 1997
 185. Wollheim C.B. β -Cell mitochondria in the regulation of insulin secretion, a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia* 43,265–277, 2000
 186. Robertson R.P., Harmon J.S., Tanaka Y., Sacchi G., Tran P.O., Gleason C.E., Poutout V., 2000 Glucose toxicity of the β -cell, cellular and molecular mechanisms. In, Le Roith D., Taylor S.I., Olefsky J.M., eds. *Diabetes mellitus, a fundamental and clinical text.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 125–132
 187. Boden G., Ruiz J., Kim C.J., Chen X. Effects of prolonged glucose infusion on insulin secretion, clearance, and action in normal subjects. *Am. J. Physiol.* 270,E251–E258, 1996
 188. Robertson R.P., Zhang H.J., Pyzdrowski K.L., Walseth T.F. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J. Clin. Invest.* 90,320–325, 1992
 189. Poutout V., Olson L.K., Robertson R.P. Chronic exposure of β TC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J. Clin. Invest.* 97,1041–1046, 1996
 190. Randle P.J. Carbohydrate metabolism and lipid storage and breakdown in diabetes. *Diabetologia* 2,237–247, 1966
 191. Randle P.J., Priestman D.A., Mistry S., Halsall A. Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37(Suppl 2),S155–S161, 1994
 192. Roden M., Price T.B., Perseghin G., Petersen K.F., Rothman D.L., Cline G.W., Shulman G.I. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 97,2859–2865, 1996
 193. Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106,171–176, 2000
 194. McGarry J.D., Dobbins R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42,128–138, 1999
 195. Zhou Y.P., Ling Z.C., Grill V.E. Inhibitory effects of fatty acids on glucose-regulated β -cell function, association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism. *Metabolism* 45,981–986, 1996
 196. Zhou Y.P., Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits β -cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol. Metab.* 80,1584–1590, 1995
 197. Briaud I., Rouault C., Reach G., Poutout V. Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism* 48, 319–323, 1999
 198. Maedler K., Spinas G.A., Dytar D., Moritz W., Kaiser N., Donath M.Y. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 50,69–76, 2001.

Σύντομη Ανασκόπηση του Βιολογικού Ρόλου και των Φαρμακευτικών Ιδιοτήτων της Ταυρίνης.

Χρήσεις, εφαρμογές και προοπτικές.

Σ. Κέλλα¹, Π. Πλαγεράς², Α. Παπαϊωάννου², Ι. Αναστασοπούλου¹, Θ. Θεοφανίδης¹

1. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ακτινοχημεία & Βιοφασματοσκοπία, Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, 15780 Ζωγράφου, Αθήνα

2. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Λάρισας, Τμήμα Ιατρικών εργασιών, Τομέας Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας

Περίληψη

Η ταυρίνη (2-αμινο-αιθανο-σουλφονικό οξύ) είναι ένα “κατά συνθήκη απαραίτητο” αμινοξύ με πολυάριθμες φαρμακευτικές της ιδιότητες. Αποτελεί το “σουλφονικό” ανάλογο της β-αλανίνης, εφόσον στην θέση της καρβοξυλικής ομάδας περιέχει σουλφονική ομάδα και επομένως μπορεί να αποκαλείται σουλφονικό αμινοξύ.

Η ταυρίνη ανακαλύφθηκε στην χολή ταύρου το 1827 και μόλις το 1975 άρχισε να γίνεται αντιληπτή η σπουδαιότητά της στη διατροφή.

Χαρακτηριστικές φαρμακευτικές δράσεις της ταυρίνης είναι η αντιοξειδωτική, καρδιαγγειακή, μεταβολική, και αποτοξινωτική της δράση. Η ταυρίνη επιπλέον χρησιμοποιείται για την πέψη των λιπών, την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών και για τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα. Συμμετέχει στην διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, στην προφύλαξη των σπερματοζωαρίων και στην ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης. Παίζει επίσης ουσιώδη ρόλο στην λειτουργία των νευρώνων, στην αναπαραγωγή των κυττάρων και στην προώθηση της γλυκόλυσης.

Η ταυρίνη δρα σε πάρα πολλά βιολογικά συστήματα, όπως στο καρδιαγγειακό σύστημα, στο ήπαρ, στα μάτια, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο αναπαραγωγικό σύστημα, στους μύες. Επιπλέον ο ρόλος της ταυρίνης στην ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων είναι υψίστης σημασίας. Η παρουσία της φαίνεται να είναι καθοριστική στην αναπαραγωγή και την βιωσιμότητα των κυττάρων.

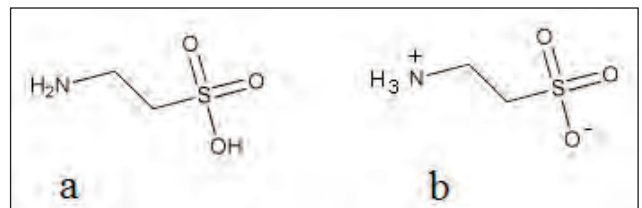
Η χρήση της ταυρίνης για θεραπευτικούς σκοπούς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, πριν γίνει ξεκάθαρος ο ρόλος της σε κάποιες παθήσεις, ιδιαίτερα στην επιληψία και τον αλκοολισμό. Επίσης πρέπει να μελετηθεί περισσότερο η αλληλεπίδρασή της με άλλα διατροφικά στοιχεία, όπως οι βιταμίνες και τα μέταλλα και να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη σημασία που μπορεί να έχει η χαμηλή συγκέντρωσή της στο αίμα ασθενών με καρκίνο. Η χρησιμότητά της στην διατροφή και στην προληπτική ιατρική είναι σαφώς καταδεδειγμένη και δικαίως χαρακτηρίστηκε ως “κατά συνθήκη” απαραίτητο αμινοξύ.

Η ταυρίνη, εκτός των θεραπευτικών της δράσεων και ιδιοτήτων, είναι και ένας δυναμικός υποκαταστάτης (ligand) σε ενώσεις συναρμογής με μεταλλικά ιόντα, λόγω της δομής της. Η σουλφονική ομάδα και η αμινομάδα που διαθέτει το μόριο είναι δυνατόν να συνδεθούν με μεταλλικά ιόντα, μέσω των ατόμων Ο και Ν αντίστοιχα.

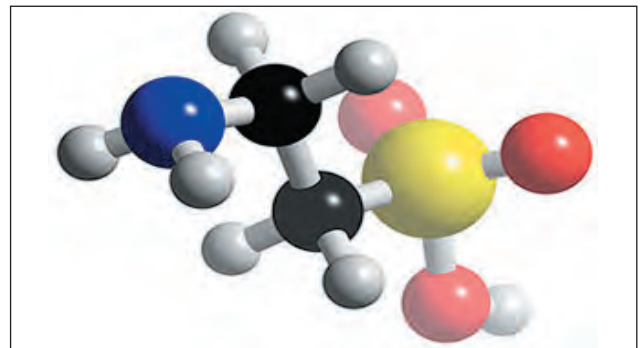
Εισαγωγή

Η ταυρίνη (2-αμινο-αιθανο-σουλφονικό οξύ) έχει απασχολήσει τις τελευταίες δεκαετίες το επιστημονικό ενδιαφέρον ώστε να καθοριστεί ο βιολογικός ρόλος της και οι πολυάριθμες φαρμακευτικές της ιδιότητες, εφόσον ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει απολύτως διευκρινισθεί, όπως φαίνεται από την Διεθνή Βιβλιογραφία. Η ταυρίνη έγινε γνωστή στο ευρύ κοινό και σαν συστατικό των αναψυκτικών ενέργειας, όπως είναι το Red Bull.

Η ταυρίνη είναι ένα κατά συνθήκη απαραίτητο αμινοξύ, το οποίο δεν λαμβάνει μέρος στην πρωτεϊνική σύνθεση, αλλά συναντάται ελεύθερο ή σε απλά πεπτίδια¹. Η ταυρίνη μπορεί να θεωρηθεί το “σουλφονικό” ανάλογο της β-αλανίνης, γιατί στην θέση της καρβοξυλικής ομάδας περιέχει σουλφονική ομάδα και επομένως μπορεί να αποκαλείται σουλφονικό αμινοξύ. Στο Σχήμα 1a φαίνεται ο χημικός τύπος της ταυρίνης, ενώ στο Σχήμα 1b δίνεται η διοντική (zwitterionic) μορφή της, η οποία αποκτάται αμέσως με την διάλυση στο νερό, ακόμα και σε φυσιολογικό pH. Το Σχήμα 2 είναι η τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου της ταυρίνης.



Σχήμα 1. a Χημικός τύπος της ταυρίνης
b Διόν (zwitterion) ταυρίνης



Σχήμα 2. Μοριακή απεικόνιση της ταυρίνης

Χημική Δομή-Προέλευση

Η ταυρίνη ανακαλύφθηκε στην χολή ταύρου το 1827, από τον αυστριακό επιστήμονα Friedrich Tiedemann και τον Γερμανό Leopold Gmellin². Για μεγάλο διάστημα εθεωρείτο ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού των θειούχων αμινοξέων και μόλις το 1975 άρχισε να γίνεται αντιληπτή η σπουδαιότητά της στη διατροφή^{3,4}. Σήμερα έχει πλέον αποδειχτεί ότι η ταυρίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των θηλαστικών⁵ και έρευνες έχουν δείξει ότι χαμηλά επίπεδα ταυρίνης στον οργανισμό συνδέονται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως καρδιομυοπάθεια, εκφυλισμό του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού⁶, καθυστέρηση της ανάπτυξης⁷, αδυναμία των κυττάρων να επιβιώσουν, μειωμένη εγκεφαλική λειτουργία, σακχαρώδη διαβήτη, ακόμα και επιληψία.

Στις πολυάριθμες βιολογικές και φαρμακευτικές δράσεις της ταυρίνης συγκαταλέγονται η αντιοξειδωτική, καρδιαγγειακή, μεταβολική, και αποτοξινωτική της δράση⁸. Η ταυρίνη χρησιμεύει για την πέψη των λιπών, την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών και για τον έλεγχο των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα. Συμμετέχει στην διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, στην προφύλαξη των σπερματοζωαρίων και στην ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης⁹. Παίζει επίσης ουσιώδη ρόλο στην λειτουργία των νευρώνων, στην αναπαραγωγή των κυττάρων και στην προώθηση της γλυκόλυσης¹⁰.

Η ταυρίνη βρίσκεται σε αφθονία στο ζωικό βασίλειο¹⁰, ενώ απουσιάζει πλήρως από το φυτικό βασίλειο. Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους σκελετικούς μυς, στην καρδιά, στους νευρώνες, στα φαγοκύτταρα, στον εγκέφαλο, στο εντερικό σύστημα και σε πολλούς άλλους ιστούς. Οι ενήλικες, αλλά όχι τα παιδιά, έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ταυρίνη σε μικρές ποσότητες, γι αυτό θεωρείται ότι η ταυρίνη πρέπει να λαμβάνεται μέσω της διατροφής.

Βιολογική Δράση

Η ταυρίνη δρα σε πάρα πολλά βιολογικά συστήματα¹¹.

• Καρδιαγγειακό σύστημα

Στην καρδιά απαντάται περισσότερο από το μισό του συνολικού αποθέματος ταυρίνης στον οργανισμό. Η ταυρίνη επηρεάζει θετικά την ικανότητα σύσπασης του καρδιακού μυός (ινοτροπική δράση)^{13,14} και μειώνει την πίεση του αίματος^{15,16}. Η προστασία που παρέχει στον καρδιακό ιστό, πολύ πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητά της να ρυθμίζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} , μεταβάλλοντας την ιοντική ενεργότητα των καναλιών μετακίνησής τους διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης^{17,18}. Η ενδοκυττάρια συσσώρευση μεγάλης ποσότητας ιόντων ασβεστίου οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η παρουσία της ταυρίνης αποτρέπει το φαινόμενο αυτό και κατά συνέπεια την μυοκαρδιακή βλάβη¹⁹. Η ταυρίνη, λόγω του ευκίνητου υδρογόνου που περιέχει παρεμβαίνει προστατευτικά στον καρδιακό ιστό και μέσω των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων²⁰. Δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες

που παράγονται από την αναπνευστική δραστηριότητα των ουδετερόφιλων, κατά την φλεγμονώδη αντίδραση στην αποκατάσταση της αιμάτωσης του ιστού, μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, προλαμβάνοντας με την δράση της αυτή, την πρόκληση βλάβης.

• Ήπαρ

Το ήπαρ αποτελεί δεξαμενή χολικών οξέων, τα οποία έχουν απορρυπαντική δράση στην γαλακτωματοποίηση και απορρόφηση των λιπιδίων και των λιποδιαλυτών βιταμινών. Την δράση αυτή την ασκούν μέσω των χολικών αλάτων, τα οποία εξαιτίας των λιπόφιλων και υδρόφιλων τμημάτων του μορίου τους, ελαττώνουν την επιφανειακή τάση, σχηματίζοντας μικκύλια. Από τον ηπατικό μεταβολισμό της χοληστερόλης παράγονται χολικά οξέα². Η διάλυση των οξέων αυτών, γίνεται με την συναρμογή τους με την γλυκίνη και την ταυρίνη, μέσω πεπτιδικού δεσμού, οπότε προκύπτουν χολικά άλατα, που είναι πλήρως ιονισμένα σε φυσιολογικό pH και επομένως πλήρως διαλυτά, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ελεύθερα χολικά οξέα. Τα χολικά άλατα της ταυρίνης είναι πιο υδατοδιαλυτά απ' αυτά της γλυκίνης και παραμένουν ιονισμένα ακόμα και σε πιο όξινες συνθήκες²¹. Ο ιονισμός είναι απαραίτητος γιατί εμποδίζει την καταβύθιση των χολικών οξέων. Η συναρμογή της ταυρίνης στα χολικά άλατα έχει σημαντική επίδραση στην διαλυτότητα της χοληστερόλης, αυξάνοντας την αποβολή της από τον οργανισμό και μειώνοντας τα επίπεδά της στον ορό του αίματος²².

• Οφθαλμοί

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας είναι ο ιστός με την υψηλότερη συγκέντρωση ταυρίνης. Έρευνες (σε γάτες) έδειξαν ότι η έλλειψη ταυρίνης επιφέρει αλλαγές στους φωτοδέκτες έως και μόνιμο εκφυλισμό του αμφιβληστροειδούς²³. Πιστεύεται ότι η ταυρίνη προστατεύει και διατηρεί την δομή και την λειτουργία των κυττάρων αυτών, ρυθμίζοντας την οσμωτική πίεση, παρεμποδίζοντας την φωσφορυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών και αποτρέποντας οξειδωτικές δράσεις²⁴.

• Κεντρικό νευρικό σύστημα

Η ταυρίνη είναι το μοναδικό αμινοξύ του εγκεφάλου, του οποίου η συγκέντρωση μειώνεται κατά την ανάπτυξη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ταυρίνη πιθανόν να συνδέεται με την ανάπτυξη του εγκεφάλου. Χαρακτηριστικό επίσης είναι το ότι σε αντίθεση με την ποσότητα ταυρίνης των άλλων οργάνων, τα επίπεδα της στον εγκέφαλο διατηρούνται σε περιπτώσεις ανεπάρκειας²⁵. Πιθανές δράσεις της ταυρίνης στον εγκέφαλο είναι η ρύθμιση της διεγερτικότητας των νευρώνων, η διατήρηση της λειτουργίας της παρεγκεφαλίδας και η ρύθμιση της έκκρισης ορμονών. Δρα επίσης σαν ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής και σαν αντισυσταλτικό μέσο²⁶. Η ταυρίνη μειώνει την διέγερση των νευρώνων, πολώνοντας τις μεμβράνες, οπότε αυξάνουν την διαπερατότητα των ιόντων χλωρίου. Την δράση αυτή, να σταθεροποιεί τις μεμβράνες κατά την διέγερση, η ταυρίνη την ασκεί σε όλους τους ιστούς που δέχονται ερεθίσματα²⁷.

- **Αναπαραγωγικό σύστημα**

Η ταυρίνη διατηρεί την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ενισχύει την ικανότητά τους για γονιμοποίηση, βελτιώνοντας έτσι την γονιμότητα⁹.

- **Μυϊκό σύστημα**

Η ταυρίνη παίζει σταθεροποιητικό ρόλο για τις μεμβράνες των μυών. Αυξάνει και αναπαράγει την τονικότητα των μυών. Κατά την διάρκεια μυϊκής προσπάθειας, μπορεί να παρατηρηθεί έλλειψή της, γι αυτό η ταυρίνη μπορεί να χαρακτηριστεί ως ουσία της δύναμης

- **Υπογλυκαιμική δράση**

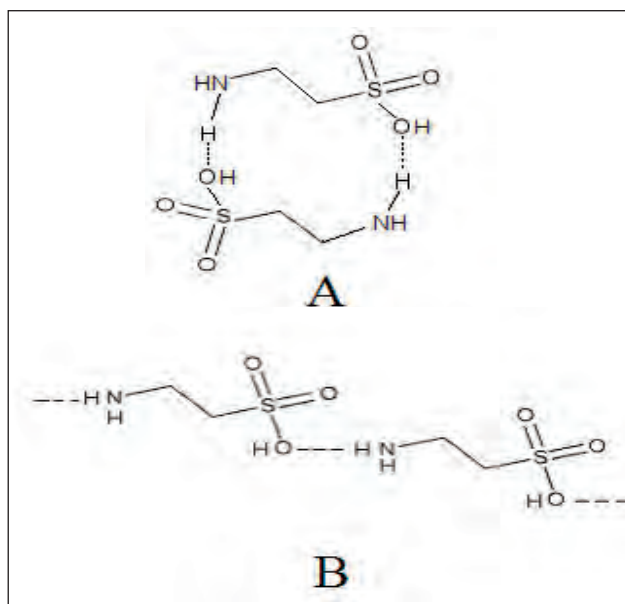
Σημαντική είναι η δράση της ταυρίνης ως υπογλυκαιμικός παράγοντας. Επιτυγχάνει μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, ισχυροποιώντας την δράση της ινσουλίνης μειώνοντας την έκκρισή της και κατ' επέκταση την συγκέντρωσή της στο αίμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της ταυρίνης με τους υποδοχείς της ινσουλίνης²⁸. Μια άλλη επίσης πολύ σημαντική δράση, είναι η αποτοξινωτική της δράση, που πηγάζει από την ικανότητά της να εξουδετερώνει τοξικές και μεταλλαξιογόνες ουσίες, που παράγονται στο ανθρώπινο σώμα ή που εισέρχονται στον οργανισμό από το εξωτερικό περιβάλλον²⁴. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι η συγκέντρωσή της είναι μεγάλη στους ιστούς, στους οποίους παράγονται υψηλά επίπεδα οξειδωτικών ουσιών. Το υποχλωρικό οξύ (HClO), που προέρχεται από την δράση των ουδετερόφιλων, είναι ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό, το οποίο αντιδρά με μια σειρά βιοχημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων, σχηματίζοντας εξαιρετικά τοξικές αλδεύδες, που προξενούν βλάβη στο DNA. Η μοναδική δομή της ταυρίνης, με την σουλφονική ομάδα στη θέση της καρβοξυλικής, της επιτρέπει, αντιδρώντας με το υποχλωρικό οξύ, να σχηματίζει αντί της τοξικής αλδεύδης μια σχετικά σταθερή χλωραμίνη²⁹, λειτουργώντας κυτταροπροστατευτικά. Υπάρχουν αναφορές και για την προστατευτική δράση της ταυρίνης κατά της τοξικότητας του τετραχλωράνθρακα (CCl₄) που ενέχει κινδύνους για τα ηπατοκύτταρα³⁰, όπως επίσης υπάρχουν αναφορές για την προστασία που παρέχει από βλάβες, που μπορεί να προκληθούν από βακτηριακές ενδοτοξίνες εντερικής προέλευσης³¹. Η χορήγησή της για αποτοξινωτικούς σκοπούς προέρχεται από την ικανότητά της να βιομετατρέπεται και να εξουδετερώνει τοξικές και επιβλαβείς ουσίες.

- **Ταυρίνη στο κυτταρικό επίπεδο**

Ο ρόλος της ταυρίνης στην ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων είναι υψίστης σημασίας. Η παρουσία της φαίνεται να είναι καθοριστική στην αναπαραγωγή και την βιωσιμότητα των κυττάρων. Σύμφωνα με μια υπόθεση¹², δύο είναι τα πεδία δράσης της. Το πρώτο είναι η κυτταρική μεμβράνη. Η ομοιότητα της δι-ιονικής (switterionic) δομής της με την δομή των ουδέτερων φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, επιφέρει αλλαγή σε κάποιες μεμβρανικές λειτουργίες, ειδικά σ' αυτές στις οποίες εμπλέκεται το ασβέστιο. Οι κύριες θέσεις σύνδεσης των κατιόντων ασβε-

στίου (Ca²⁺) στις κυτταρικές μεμβράνες, είναι οι όξινες ομάδες των φωσφολιπιδίων, με τις οποίες η ταυρίνη μπορεί να αλληλεπιδρά, σχηματίζοντας ζεύγη ιόντων, με συνέπεια την μεταβολή της διαμόρφωσης των μεμβρανών, αλλά και της χημικής συγγένειας και του αριθμού των θέσεων συναρμογής των κατιόντων³². Η επίδραση της ταυρίνης στις κυτταρικές μεμβράνες επηρεάζει και άλλα λιπιδιο-εξαρτώμενα φαινόμενα, όπως είναι η λειτουργία των καναλιών μεταφοράς ιόντων, η σύνδεση διαφόρων ενζύμων στις μεμβράνες και η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.

Επίσης, η αλληλεπίδραση της ταυρίνης με την μεμβράνη του κυττάρου ενδεχομένως να οφείλεται και στην δυνατότητά της να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3Α οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ ενός ατόμου υδρογόνου της αμινομάδας και ενός ατόμου οξυγόνου της σουλφονικής ομάδας ενός μορίου ταυρίνης και των ατόμων οξυγόνου και υδρογόνου των αντίστοιχων ομάδων ενός άλλου μορίου ταυρίνης. Η σύνδεση αυτή σχηματίζει δακτύλιο. Είναι όμως δυνατόν να αναπτυχθούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα σε δυο γειτονικά μόρια ταυρίνης σε γραμμική διάταξη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3Β.



Σχήμα 3. Σχηματική παράσταση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της ταυρίνης. Α: κυκλική διάταξη, Β: ευθύγραμμη διάταξη

Το δεύτερο πεδίο δράσης της ταυρίνης είναι το κυτταρόπλασμα. Η ταυρίνη θεωρείται ένας πολύ καλός ρυθμιστής της οσμωτικής πίεσης του κυττάρου. Προσαρμόζεται πολύ γρήγορα στις οσμωτικές μεταβολές επιτρέποντας την επιβίωση του κυττάρου σε οποιοδήποτε εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η ικανότητά της αυτή προέρχεται από την χημική και μεταβολική της αδράνεια, αλλά και από την μικρή λιποδιαλυτότητά της, που δεν της επιτρέπει να βγαίνει έξω από το κύτταρο, έτσι ώστε να διατηρείται ο κυτταρικός όγκος και τα υψηλά ενδοκυττάρια επίπεδά της^{2,32}.

Φαρμακευτικές εφαρμογές

Η ταυρίνη βρίσκει πολυάριθμες φαρμακευτικές εφαρμογές, λόγω των ευεργετικών της αποτελεσμάτων σε πολλά συστήματα του οργανισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του εμφράγματος του μυοκαρδίου, χωρίς παρενέργειες³³ και ως μέσο κατά των αρρυθμιών. Έρευνες έδειξαν ότι στην υπερχοληστεριναιμία η ταυρίνη αυξάνει την διαλυτότητα της χοληστερόλης και επομένως την απέκκρισή της από τον οργανισμό, μειώνοντας τα επίπεδά της στον ορό του αίματος²². Μπορεί να χορηγηθεί ταυρίνη στην κυστική ίνωση, στην οποία οι ασθενείς υποφέρουν από κακή απορρόφηση των τροφών, επειδή αποδείχτηκε ότι περιορίζει τα συμπτώματα της νόσου αυτής³⁴. Η θετική της επίδραση έχει αποδειχτεί και για την οξεία ηπατίτιδα³⁵ και τον σακχαρώδη διαβήτη. Η ταυρίνη δεν χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για την νόσο Alzheimer, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδά της βρέθηκαν χαμηλά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών σε προχωρημένα στάδια της νόσου και παρότι τα πολύ χαμηλά επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, που είναι το χαρακτηριστικό της νόσου, αυξήθηκαν μετά από χορήγηση ταυρίνης σε πειραματόζωα³⁶. Η χρήση της σε οφθαλμολογικές παθήσεις ενισχύεται από το γεγονός ότι η ταυρίνη είναι τροφικός παράγοντας του αμφιβληστροειδή³⁷ και τον προστατεύει από εκφυλισμό. Τα οφέλη από την χρήση της σε μυϊκές παθήσεις (μυοτονική δυστροφία) έχουν αποδειχτεί σε μελέτες³⁸. Αποτελεί τροφικό παράγοντα στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, αλλά και στους ενήλικες είναι γνωστή η χρήση της σαν αντισυσταλτικό και σταθεροποιητικό μέσο κατά την διέγερση των κυττάρων και τη νευροδιαβίβαση των ερεθισμάτων³⁹. Η χρήση της σαν αντιεπιληπτικό δεν είναι επιβεβαιωμένη για την αποτελεσματικότητά της. Η αντιεπιληπτική της δράση φάνηκε σε κάποια πειραματικά μοντέλα, αλλά ο ρόλος της στην συναπτική διαβίβαση παραμένει αβέβαιος. Προφανώς ο λιπόφοβος χαρακτήρας της και η μικρού βαθμού διείσδυση μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood-brain barrier), αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την αντιεπιληπτική δράση της ταυρίνης. Χρησιμοποιείται επίσης και για την αντιμετώπιση του αλκοολισμού. Η χορήγησή της σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία απεξάρτησης από το αλκοόλ, φάνηκε να έχει πλεονεκτήματα σχετικά με τον βαθμό και την διάρκεια αποχής από το αλκοόλ. Ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει αποσαφηνιστεί εντελώς, πιστεύεται όμως ότι επηρεάζει τα νευροδιαβιβαστικά συστήματα και την ροή των ιόντων ασβεστίου, με τρόπο διαφορετικό απ' αυτόν της αιθανόλης, η οποία μειώνει την ιονική μεταφορά μέσω των μεμβρανών⁴⁰.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από την χρήση της ταυρίνης ή από υπερδοσολογία δεν είναι συνήθεις, όμως δεν εκλείπουν εντελώς². Έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την αντιμετώπιση δερματολογικών παθήσεων (ψωρίαση), επιληπτικές καταστάσεις και ενδοκρινικές διαταραχές (επινεφριδική ανεπάρκεια), όπου μπορεί να

παρατηρηθεί υποθερμία και καρδιακή αρρυθμία. Μπορεί ακόμα να προκαλέσει απώλεια μνήμης και καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι επίσης δυνατόν να επηρεάσει την λειτουργία των νεφρών και του ήπατος.

Η χρήση της ταυρίνης για θεραπευτικούς σκοπούς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης², πριν γίνει ξεκάθαρος ο ρόλος της σε κάποιες παθήσεις, ιδιαίτερα στην επιληψία και τον αλκοολισμό. Επίσης πρέπει να μελετηθεί περισσότερο η αλληλεπίδρασή της με άλλα διατροφικά στοιχεία, όπως οι βιταμίνες και τα μέταλλα και να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη σημασία που μπορεί να έχει η χαμηλή συγκέντρωσή της στο αίμα ασθενών με καρκίνο. Παρά τα ερωτηματικά που πρέπει να ακόμα να απαντηθούν, η χρησιμότητά της στην διατροφή και στην προληπτική ιατρική είναι σαφώς καταδεδειγμένη και δικαίως χαρακτηρίστηκε ως “κατά συνθήκη” απαραίτητο αμινοξύ (“conventional” essential amino acid)

Η ταυρίνη, εκτός των θεραπευτικών της δράσεων και ιδιοτήτων, είναι και ένας δυναμικός υποκαταστάτης (ligand) σε ενώσεις συναρμογής με μεταλλικά ιόντα, λόγω της δομής της. Η σουλφονική ομάδα και η αμινομάδα που διαθέτει το μόριο είναι δυνατόν να συνδεθούν με μεταλλικά ιόντα, μέσω των ατόμων Ο και Ν αντίστοιχα. Πολλοί ερευνητές θέλησαν να εκμεταλλευτούν την συναρμοστική ικανότητα της ταυρίνης με μέταλλα, εξαιτίας των πολύ σημαντικών φυσιολογικών λειτουργιών και βιολογικών ρόλων που επιτελεί. Στο πλαίσιο του ολοένα αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την ταυρίνη, άρχισαν να γίνονται προσπάθειες για την σύνθεση συμπλόκων με μέταλλα, με στόχο, τουλάχιστον τα τελευταία χρόνια, να ενισχυθούν οι ιδιότητές της, συνδυαζόμενες μ' αυτές των μετάλλων, ώστε να αποτελεί ένα ισχυρότερο διατροφικό και φαρμακευτικό μέσο για τα βιολογικά συστήματα.

Βιβλιογραφία

1. Birdsall T.C. Therapeutic Applications of Taurine. *Alternative Medicine Review*, 3, 128-136, 1998.
2. Kendler B.S. Taurine: An Overview of its role in Preventive Medicine. *Preventive Medicine*, 18, 79-100, 1989.
3. Raiha N., Rassin D., Heinonen K., Gaull G.E. Milk protein quality and quantity: Biochemical and growth effects in low birth weight infants. *Pediatr. Res.*, 9, 370, 1975.
4. Geggel H.S., Ament M.E., Heckenlively J.R., et al. Nutritional requirement for taurine in patients receiving long-term parenteral nutrition. *N. Engl. J. Med.*, 312, 142-146, 1985.
5. Sturman J.A. Taurine in development. *Physiol. Rev.*, 73, 119-147, 1993.
6. Hayes K.C., Carey R.E., Schmidt S.Y. *Science*, 188, 949-991, 1975.
7. Sheik K., Toskes P., Dawson W. Taurine deficiency and retinal defects associated with small intestinal bacterial overgrowth. *Gastroenterology*, 80, 1363, 1981.

Brief overview of the biological role and pharmaceutical properties of taurine.

Uses, applications and perspectives.

S. Kella¹, P. Plageras², A. Papaioannou²,
I. Anastassopoulou¹, Th.Theofanidis¹

1. Section of Materials Science and Engineering,
School of Chemical Engineering, National and Techni-
cal University of Athens, Zografou Camppus, 9 Iroon
Polytechniou str., Athens, Greece

2. Clinical Chemistry–Biochemistry Section, Depart-
ment of Medical Laboratories,
Education & Technological Institute of Larissa,
41110, Larissa, Greece

Summary

Taurine (2-amino-ethan-sulfonic acid) is a “conventional” essential amino acid with numerous medicinal properties. It is a substance similar to beta-alanine, with the difference that it contains a sulfonate group in the position of the carboxyl group and may therefore be called sulfonic amino acid.

Taurine was found in the bile of the bull in 1827 and its importance in nutrition began to be appreciated only in 1975. It became widely known as an ingredient of energy drinks such as Red Bull.

This paper presents a short overview of the pharmacological properties of taurine, its biological role as well as its uses and perspectives existing in the field of its coordination with metal ions in order to extend its use as therapeutic agent.

At present it has been proven that taurine is essential for the development of mammals and that low taurine levels in the body are associated with various pathological conditions such as cardiomyopathy, degeneration of the retina, growth retardation, failure of cells to survive,

decreased brain function, diabetes and even epilepsy.

Typical pharmaceutical actions of taurine are the antioxidant, cardiovascular, metabolic and detoxifying action. Taurine also serves the digestion of fats, the absorption of fat-soluble vitamins and the control of blood cholesterol levels. It participates in maintaining the integrity of the cell membrane, in the prevention of spermatoblasts and in the regulation of the osmotic pressure. It plays an essential role in the neuronal function, the reproduction of cells and the promotion of glycolysis.

Taurine acts in many biological systems such as the cardiovascular system, liver, eyes, central nervous system, reproductive system and the muscular system. Moreover, the role of taurine on growth and survival of cells is of paramount importance. Its presence seems to be crucial to the reproduction and the viability of cells.

The use of taurine for therapeutic reasons requires further investigation to clarify its role in some diseases, especially in epilepsy and alcoholism. Also, its interaction with other nutrients such as vitamins and minerals has to be studied further. Special attention has to be given to the importance that low concentrations of taurine in the blood of patients with cancer may have. Its usefulness in nutrition and preventive medicine is however clearly demonstrated and thus taurine is rightly characterized as “conventional” essential amino acid.

Because of its structure, taurine is a potential ligand in coordination compounds with metal ions, in addition to its therapeutic actions and properties. The sulpho- nate group and the aminogroup in the molecule may be coordinated with metal ions through the O and N atoms, respectively. In this scope, many attempts have been made to bind taurine with metal ions in order to create more effective drugs combining properties of both taurine and metal ions.

- Mozaffari M.S., Tan B.H., Lucia M.A., Schaffer S.W. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 985-990, 1986.
- Birdi M., Choay P. Taurine: a particular amino acid with multiple functions. *Ann. Pharm. Fr.*, 61, 385-391, 2003.
- Huxtable R.J. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, 72, 101-163, 1992.
- Huxtable R.J., Sebring L.A. *Viewpoint Towards a unifying theory for the actions of taurine*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986.
- Jacobsen J.G., Smith L.H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.*, 48, 424-511, 1968.
- Huxtable R.J., Sebring L.A. Cardiovascular actions of taurine. In: *Sulfur Amino Acids: Biochemical and Clinical Aspects*, eds. Kuriyama K., Huxtable R., Iwata H., Alan R., Liss, New York, pp. 5-37, 1983.
- Nara Y., Yamori Y., Lovenberg W. Effects of dietary taurine on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2689-2692, 1978.
- Bousquet P., Feldman J., Bloch R., Schwartz J. Central cardiovascular effects of taurine: comparison with homotaurine and muscimol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219, 213-218, 1981.
- Satoh H. Cardioprotective actions of taurine against intracellular and extracellular Ca²⁺-induced effects. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 359, 181-196, 1994.
- Satoh H., Sperelakis N. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others. *Gen. Pharmac.*, 30, 451-463, 1998.
- Kramer J.H., Chovan J.P., Schaffer S.W. Effect of taurine in calcium paradox and ischemic heart failure. *Am. J. Physiol.*, 240, H238-H246, 1981.
- Raschke P., Massoudy P., Becker B.F. Taurine protects

- the heart from neutrophil-induced reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 461-471, 1995.
20. Hofmann A.F., Small D.M. Detergent properties of bile salts: Correlation with physiological function. *Annu. Rev. Med.*, 18, 333-376, 1967.
 21. Mizushima S., Nara Y., Sawamura M., Yamori Y. Effects of oral taurine supplementation on lipids and sympathetic nerve tone. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 403, 615-622, 1996.
 22. Sturman J.A. Nutritional taurine and central nervous system development. *Ann. NY Acad. Sci.*, 477, 196-213, 1986.
 23. Wright C.E., Tallan H.H., Lin Y.Y. Taurine : Biological update. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 427-453, 1985.
 24. Sturman J.A., Gaull G.E. Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J. Neurochem.*, 25, 813-835, 1975.
 25. Oja S.S., Kontro P. In: *Handbook of Neurochemistry*, 2nd edition, ed. Lajtha A., Plenum, New York, vol. 3, p. 501, 1983.
 26. Van Gelder N.M., Barbeau A. In: *Taurine: Biological actions and Clinical Perspectives*, eds. Oja S.S., Ahtee L., Kontro P., Paasonen M.K., A.R. Liss, New York, , p. 149, 1985.
 27. Kulakowski E.C., Maturo J. Hypoglycemic properties of taurine not mediated by enhanced insulin release. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 2835-2838, 1984.
 28. Kozumbo W.J., Agarwal S., Koren H.S. Breakage and binding of DNA by reaction products of hypochlorous acid with aniline, 1-naphthylamine or 1-naphthol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 107-115, 1992.
 29. Nakashima T., Taniko T., Kuriyama K. Therapeutic effects of taurine administration on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Jpn. J. Pharmacol.*, 32, 583-589, 1982.
 30. Roth R.A., Harkema J.R., Pestka J.P., Ganey P.E. Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 147, 300-311, 1997.
 31. Thurston J.H., Hauhart H.E., Dirgo J.A. *Life Sci.*, 26, 1961-1968, 1980.
 32. Azuma J., Takihara K., Awata N., et al. Taurine and failing heart: experimental and clinical aspects. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 179, 195-213, 1985.
 33. Carrasco S., Codoceo R., Prieto E., et al. Effect of taurine supplements on growth, fat absorption and bile acid on cystic fibrosis. *Acta Univ. Carol.*, 36, 152-156, 1990.
 34. Matsuyama Y., Morita T., Higuchi M., Tsujii T. The effect of taurine administration on patients with acute hepatitis. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 125, 461-468, 1983.
 35. Csernansky J.G., Bardgett M.E., Sheline Y.I., et al. CSF excitatory amino acids and severity of illness in Alzheimer's disease. *Neurology*, 46, 1715-1720, 1996.
 36. Lima L., Cubillos S. Taurine might be acting as a trophic factor in the retina by modulating phosphorylation of cellular proteins. *J. Neurosci. Res.*, 53, 377-384, 1998.
 37. Durelli L., Mutani R., Fassio F. The treatment of myotonia: Evaluation of chronic oral taurine therapy. *Neurology*, 33, 599-603, 1983.
 38. Wu H., Jin Y., Wei J., et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Research*, 1038, 123-131, 2005.
 39. Wilde M.I., Wagstaff A.J., Acamprosate. A Review of its pharmacology and clinical potential in the management of alcohol dependence after detoxification. *Drugs*, 53, 1038-1053, 1997.

Επίδραση του Υπερικού του Διάτρητου (*Hypericum perforatum* L) στην Επούλωση Τραύματος Δέρματος Επιμύων.

Σαπουνάκης Κωνσταντίνος, Χατζηγιάνη Εμμυ, Κώτσιου Αντωνία, Τεσσερομμάτη Χριστίνα.
Εργαστήριο Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Περίληψη

Η επουλωτική δράση του υπερικού του διάτρητου (H.p) στην επούλωση τραύματος ήταν ήδη γνωστή από την εποχή του Ιπποκράτη.

Σκοπός της εργασίας είναι διερεύνηση της ποιότητας επούλωσης τέμνοντος τραύματος μήκους 3 cm στη ράχη επιμύων Wistar (250 ±15 g) μετά από τοπική χορήγηση επί πενθήμερον ελαιώδους εκχυλίσματος υπερικού (Rotoel® {Jukunda} με 10% *Hypericum herba*). Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες πειραματοζώων (n=10 εκάστη, Α μάρτυρες, Β πειραματική). Τρεις τομές (5μ) δειγμάτων δέρματος εκτιμήθηκαν με φωτομικροσκόπιο (x20 σε χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης).

Τα πειραματοζώα υπό αγωγή με H.p. είχαν ταχύτερο σχηματισμό κοκκιωματώδους ιστού σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα εργαστηριακά ευρήματα υποδεικνύουν αύξηση των παραμέτρων φλεγμονής (CRP, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη) στους μάρτυρες σε σχέση με την πειραματική ομάδα. Ενδεχόμενα τα ευρήματα αυτά αποδίδονται στα φλαβονοειδή και τις φλαβόνες που περιέχονται στο υπερικό.

Εισαγωγή

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των τραυμάτων, ήταν το πρώτο μέλημα όλων λαών. Ήδη από την εποχή του Ομήρου ο άνθρωπος προσπάθησε να ανακουφιστεί από τον πόνο και να επιταχύνει την επούλωση των τραυμάτων του, με φυτικά μέσα.

Με την εξέλιξη του πολιτισμού, το τραύμα έχει πάψει, τουλάχιστον στις βιομηχανοποιημένες κοινωνίες, να αποτελεί συνέπειες πολεμικών συγκρούσεων από πυροβόλα όπλα, εκρηξίσεις κλπ.

Ωστόσο, η λύση της συνεχείας του δέρματος από εγκαύματα ή θλαστικά τραύματα διαφόρου σοβαρότητας και έκτασης, ανάλογα με τις συνθήκες πρόκλησης, υπόκειται σε διάφορα στάδια επούλωσης.

Πλήθος μελετών έχουν αφιερωθεί στην επούλωση – επανόρθωση (remodeling) όσον αφορά την ποιότητα του κοκκιώδους συνδετικού ιστού και την ταχύτητα της επουλωτικής διεργασίας. Εκτός των συνθετικών προϊόντων, πληθώρα φυτικών παρασκευασμάτων έχει προταθεί για την καλύτερη παρέμβαση στην επουλωτική διεργασία.

Ήδη ο Ιπποκράτης στο «περί γυναικείων» χρησιμοποίησε παρασκευάσματα από υπερικό της οικογενείας Υπερικοειδών για την επούλωση τραυμάτων, την επιλόχεια αποκατάσταση των γεννητικών οργάνων κλπ.⁽¹⁾

Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η ποιότητα της επουλωτικής διεργασίας σε τομή δέρματος 3cm μήκους και 0,5 cm βάθους στη ράχη επιμύων του γένους Wistar υπό την επίδραση ελαιώδους εκχυλίσματος υπερικού του διάτρητου (*Hypericum perforatum* L) περιεκτικότητας 10% (*Hypericum herba*).

Υλικό -Μέθοδος

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες αρσενικών λευκών επιμύων από 10 ζώα εκάστη (150g ±10) ηλικίας 5 – 6 εβδομάδων, ομάς Α μάρτυρες ομάς Β πειραματική.

Τα ζώα και των 2 ομάδων, υπέστησαν αποψίλωση των τριχών της ράχης και στη συνέχεια διενεργήθη πειραματικό τραύμα του δέρματος. Τα ζώα της ομάδας Β επαλείφονται επί πενθήμερο με το ελαιώδες εκχύλισμα του υπερικού του διάτρητου (Rotoel® Jukunda), ενώ τα ζώα της ομάδας Α επαλείφονται με ελαιόλαδο.

Την 5η ημέρα τα ζώα θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό και ελήφθη αίμα για βιοχημικό έλεγχο. Παράλληλα, απομονώθηκε το τμήμα του δέρματος που είχε υποστεί τομή τόσο στους μάρτυρες όσο και στην πειραματική ομάδα, τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% για περαιτέρω μικροιστολογική έρευνα. Ελήφθησαν 3 δείγματα τομών από κάθε παρασκευάσμα (20μ πάχους). Χρησιμοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης (HE). Η αξιολόγηση των παρασκευασμάτων έγινε με τη βοήθεια φωτομικροσκοπίου (x20).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

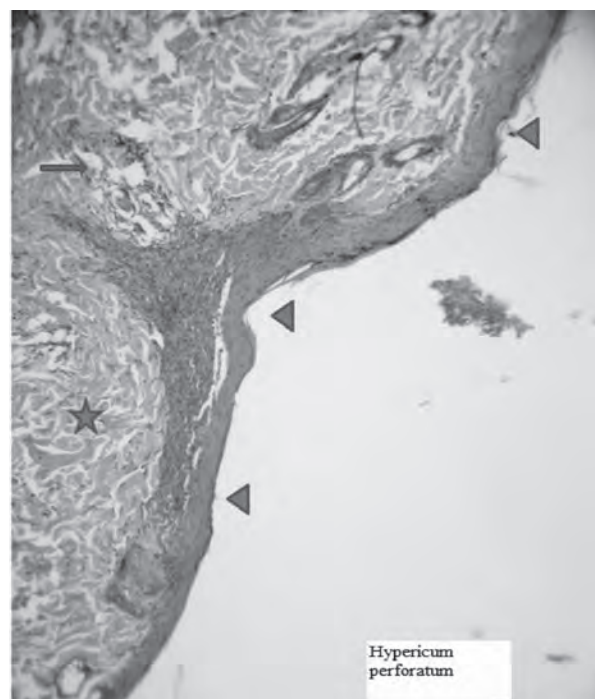
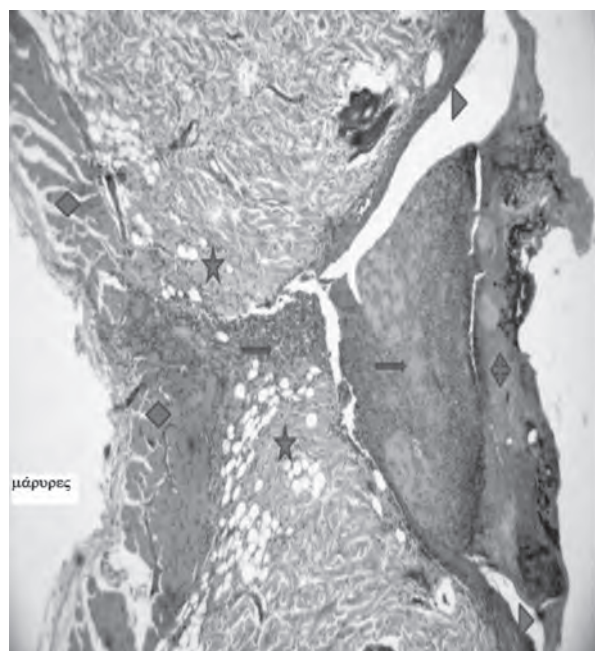
Τα βιοχημικά ευρήματα έδειξαν παρουσία φλεγμονής και καταβολικής διεργασίας με αύξηση της CRP, ελάττωση της αλβουμίνης, στατιστικά σημαντικά (p<0,05) και πτωτική τάση των ολικών λευκωμάτων (p<0,5) (πίνακας 1). Τα ιστολογικά ευρήματα από την εξέταση του δέρματος (HE) έδειξαν ότι τα ζώα της πειραματικής ομάδας είχαν ταχύ σχηματισμό κοκκιωματώδους ιστού και επιτάχυνση της επουλωτικής διεργασίας. Επί πλέον το εύρος της τομής παρουσίασε σμίκρυνση σε σχέση με τους μάρτυρες. Η επουλωτική δράση του εκχυλίσματος *Hypericum perforatum* L φαίνεται να οφείλεται κυρίως στην διήθηση και ενεργοποίηση των ινοβλαστών προς παραγωγή κολλαγόνου που ενδεχόμενα παίζει ρόλο στην επούλωση του τραύματος και στη συρρίκνωση του ουλώδους ιστού. (εικόνα 1)

Σύμφωνα με τους Süntar και συν.2009 στο υπερικό του διάτρητου περιέχονται φλαβονοειδή (υπεροσίδη, ισοκερκιτίνη, ρουτίνη και επικατεθίνη) καθώς και ναφθοκινόνες που ευθύνονται για την επουλωτική διεργασία.⁽²⁾

Ενδεχόμενα, η ταχύτερη επούλωση στην πειραματική ομάδα να αποδίδεται στα φλαβονοειδή και τις φλαβόνες που περιέχονται στο υπερικό, συμμετέχουν στην επουλωτική διαδικασία και τείνουν να ελαττώσουν τους παράγοντες φλεγμονής, γεγονός που υποδεικνύει το υπερικό, αξιόπιστο στην επεμβατική χειρουργική. Άλλωστε παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τη δράση άλλων υποειδών του υπερικού του *patulum* Thumb και του *hookerianum* Wight και Arnott με αναγέννηση ιστού στο σημείο του τραύματος, ταχύτερη σύγκλιση εικόνα όμοια με εκείνη που προκύπτει από την τοπική χορήγηση αλοιφής νιτροφουραζόνης^(3,4,5)

Ομάδες	CRP mg/L	Ολικές Πρωτεΐνες	Αλβουμίνη
Μάρτυρες (Α)	>35	6,9±0,1	4,1±0,01
Πειραματική Ομάς (Β)- Ηρ	45±0,2*	7,2±0,05**	3,5±0,01*

* $p < 0,05$ ** $p < 0,5$



Εικόνα 1: Ιστολογική εικόνα τομής δέρματος HE (H+EX20): Μάρτυρες: ▶ επιδερμίδας, →: λύση συνεχείας κοκκιδώδους ιστού, ◆: εσχάρα, ★: δερμίδας/υποδόριο λίπος με πρόσφατη ουλή. Μετά τη χορήγηση *Hypericum*: Πλήρης επούλωση ▶: επιδερμίδας, ★ ουλώδης ιστός, →: παραμένουν ελάχιστα στοιχεία φλεγμονής

Hypericum perforatum L Induced Acceleration on Wound Healing Process in Rats.

Sapounakis Constantin, Chatziagianni Emmy, Kotsiou Antonia, Tesseromatis Christine
Department of Pharmacology, Medical School, University of Athens

Summary

The ultimate properties of *Hypericum perforatum* (H.p.) for wound treatment are already known since of Hippocrates era.

The aim of the study was to investigate the restoration quality in a dorsal incision wound of 3cm length after the local application of oily H.p. preparation (Rotoel® {Jukunda} containing 10% *Hypericum herba*) in Wistar rats (250 ±15 g) for 5 days. 20 Wistar rats are divided into 2 groups (A control, B experimental)

Three section (5μ) of skin specimens (Haematoxylin-Eosin) were evaluated under light microscopy (x20).

Animals treated with H.p. had a much more rapid formation of granulosomatous tissue compared to controls. Laboratory findings indicating enhancement of inflammation parameters (CRP, total proteins, albumin) in control v. experimental group are restored after hypericum treatment *via* its constituents in flavinoids and flavanols, while amelioration of the wound process under H.p. was observed.

Βιβλιογραφία

1. Πουρναρόπουλος Γ. Ιπποκράτους Άπαντα Έργα Περί γυναικείων, Β §209. Τόμος Ε σελ 278 Εκδ. Μαρτίνοσ Α 1967
2. Süntar I.P., Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yeşilada E. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* 13, 2009
3. Lavagna S.M., Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B. Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmaco.* 56, 451-3, 2001
4. Mukherjee P.K., Verpoorte R, Suresh B. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *J. Ethnopharmacol.* 70, 315-21, 2000
5. Mukherjee P.K., Suresh B. The evaluation of wound-healing potential of *Hypericum hookerianum* leaf and stem extracts. *J. Altern. Complement. Med.* 6, 61-9, 2000.



19th EuroQSAR

Knowledge Enabled Ligand Design

Vienna, Austria
August 26-30, 2012

The EuroQSAR Symposia have been taking place since 1973 and constitute major scientific events in the field of computational drug design, with further applications in agricultural and environmental sciences. The 2012 symposium will not only follow the tradition of previous events in presenting latest trends in QSAR and molecular modeling, it will also explore new grounds, such as integrated approaches and open innovation strategies in drug discovery.

The 19th EuroQSAR 2012 symposium, entitled "Knowledge Enabled Ligand Design" will focus on:

- Integrative Approaches - Predicting in vivo Data
- Open Source, Open Access, Open Data
- Proteins - Structure, Function, Modulation, Interaction
- In silico Profiling - PhysChem Meets Biology
- Translational Informatics
- Probing Biological Systems

Austria's capital Vienna lies on the shore of the Danube River in a valley protected by the foothills of the Alps. Few cities in the world glide so easily between the present and the past like Vienna. Its splendid historical face is well recognized: grand imperial palaces and bombastic baroque interiors, museums flanking magnificent squares and, above all, the Hofburg – where the Habsburg dynasty reigned for several centuries over most of Europe.

The conference will take place right in the center of Vienna in the main building of the University of Vienna. Founded in 1365 by Duke Herzog Rudolf IV, the University of Vienna is the oldest in the German-speaking part of Europe and one of the biggest Universities in Central Europe.

We are looking forward to your active participation !
ONLINE REGISTRATION IS NOW OPEN



EFMC-ISMIC 2012

22nd International Symposium on Medicinal Chemistry

Berlin, Germany
September 2 - 6, 2012

EFMC-ISMIC 2012 is jointly organised by the German Chemical Society (GDCh) Division of Medicinal Chemistry and the German Pharmaceutical Society (DPhG) Section of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, on behalf of the European Federation for Medicinal Chemistry (EFMC).

This symposium is recognized worldwide as one of the leading Medicinal Chemistry meetings, as proven by its large international attendance, which varies between 1200 and 1500 participants from all over the world. It traditionally attracts experts in drug discovery and development, in particular medicinal and synthetic chemists, together with scientists active in the fields of computer assisted drug design, biology, DMPK, pharmacology, early toxicology, as well as chemical and pharmaceutical development.

The EFMC-ISMIC 2012 will continue its tradition and will cover drug discovery advances in all major therapeutic areas as well as the most recent advances in lead identification and optimization strategies, drug design and profiling technologies. Particular emphasis will be put on first time disclosures. ISMC 2012 will also illustrate the impact of the -omics and biomarker areas on the interfaces between chemistry, informatics, biology and experimental medicine.

Organised by :

DPhG

Deutsche
Pharmazeutische
Gesellschaft e.V.

GDCh

GESELLSCHAFT
DEUTSCHER CHEMIKER

On behalf of :



EFMC
European Federation
for Medicinal Chemistry

5th

BBBB International Conference

From Drug Discovery and Formulation Strategies

(design-synthesis and preclinical testing, delivery systems, nanotechnology, biopharmaceuticals, biosimilars, generics-bioequivalence)

To Pharmacokinetics-Pharmacodynamics

(metabolism, transporters, pharmacogenomics, biomarkers, drug therapy, individualized therapy, biotherapeutics, PK/PD modeling)

2
congresses
in 1

▶ **26-28 September 2013**
Athens-Greece

▶ Metropolitan Hotel



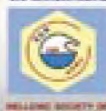
NATIONAL AND KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS



Hellenic
Pharmaceutical Society
H.P.S.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΙΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



HELLenic SOCIETY OF
MEDICAL ENGINEERS

Congress website:
www.bbbb-eufeps.org

1st Announcement



30 years of excellence in the organization
of congresses, meetings and events



We inspire results

1st klm Peanias-Markopoulou Avenue, 19002, Peania, T: +30 211 1001 771, F: +30 210 6642 116
info@zita-congress.gr, www.zita-congress.gr

ISO 9001 | ISO 14001