

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ. ΕΧ VIVO ΚΑΙ IN VITRO
ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
της

Όλγας Τσαβέ
Βιολόγου ΑΠΘ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

Επιβλέπων Καθηγητής

Θεοφιλίδης Γεώργιος, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών ΑΠΘ

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Θεοφιλίδης Γεώργιος, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών ΑΠΘ

Σαλίφογλου Αθανάσιος, Καθηγητής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών της Πολυτεχνικής Σχολής του ΑΠΘ

Καλογιάννη-Δημητριάδη Μάρθα, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών ΑΠΘ

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Γεώργιο Θεοφιλίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος, την συνεχή την υποστήριξη και παρουσία του καθόλη την διάρκεια του χρόνου αυτού.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής Αθανάσιο Σαλίφογλου και Μαρθα Καλογιάννη-Δημητριάδη για την βοήθεια που παρείχαν κατά την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιολογίας καθώς και του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών για την υποδειγματική συνεργασία αλλά και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθημερινά στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Εμμανουήλ Νικόλαο Παντερή για την βοήθεια στο ιστολογικό κομμάτι αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άτομα που βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, γονείς και φίλους για την ψυχολογική ενίσχυση αλλά και κατανόηση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	2
1.1.1 Δομή Περιφερικού Νευρικού Συστήματος.....	2
1.1.2 Δομή των περιφερικών νεύρων.....	4
1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....	13
1.2.1 ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΑ - ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	13
1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	46
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	51
1.3.1 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	53
1.3.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΣΗ.....	56
1.3.3 ΧΗΛΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	56
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
2.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ.....	60
2.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΧΙΑΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ.....	60
2.1.2 ΛΗΨΗ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	61
2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ (exvivo).....	62
2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (invitro).....	68
2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	68
2.3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	70
2.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	70
2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	73
2.5.1 ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	73
2.5.2 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	75
2.5.2.1 Cis-platin.....	75
2.5.2.2 Οξαλιπλατίνα.....	75
2.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΝΕΥΡΙΟΥ.....	75
2.5.4 ΣΗΜΑΝΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΧΛΩΡΟΦΛΟΥΡΟΣΚΕΪΝΗ (DCFDA).....	76
2.5.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ – ΕΦΑΡΜΟΓΗ 2 ^{0Y} ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ ΣΤΗΝ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΡΕΘΙΣΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ.....	76
2.5.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ invitro.....	78
2.5.6.1 Αξιολόγηση βιωσιμότητας-Προσδιορισμός ζωντανών / νεκρών κυττάρων.....	78
2.5.6.2 ΛΗΨΗ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	80
2.5.6.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ Cu(II)-glycinate (invitro).....	80
2.5.6.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ EDTA και QA.....	81
2.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	81

2.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΛΙΚΟ.....	83
2.8. ΧΗΜΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	83
2.8.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΟΝΟΥΔΡΙΚΟΣ <i>cis</i> ΔΙΣ(ΓΛΥΚΙΝΙΚΟΣ)ΧΑΛΚΟΣ(II) <i>cis</i> -Cu(gly) ₂ H ₂ O.....	83
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
3.2 Βιωσιμότητα των περιφερικών ινών του ισχιακού νεύρου του επίμοσ υπό την επίδραση μεταλλοτοξινών.....	94
3.2.1 Σίδηρος.....	94
3.2.2 Κοβάλτιο.....	95
3.2.3 Δημήτριο.....	97
3.2.4 Αργίλιο.....	98
3.2.5 Χρώμιο.....	99
3.2.6 Χαλκός.....	102
3.2.6.1 Συντελεστής διαπερατότητας επινευρίου.....	103
3.2.6.2 Γλυκίνη.....	104
3.2.6.3 N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC).....	105
3.2.6.4 Κινικόοξύ (quinic acid- QA).....	107
3.2.6.5 EDTA.....	108
3.3 Ιστολογική διερεύνηση της σχέσης της δράσης του Cu(II) με τον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου.....	111
3.4 Βιωσιμότητα πρωτογενούς καλλιέργειας ιπποκαμπιαίου ιστού υπό βραχυπρόθεσμες συνθήκες (<i>in vitro</i>).....	113
3.4.1 Εκτίμηση της νευροτοξικής δράσης του <i>cis</i> -[Cu(II)-glycinate].....	113
3.4.2 Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA.....	116
3.5 Ανάπτυξη μοντέλου εκτίμησης περιφερικής νευροπάθειας.....	123
3.5.1 Συχνότητα διέγερσης-εφαρμογή 2 ⁰⁰ ηλεκτρικού παλμού στην σχετική ανερέθιστη περίοδο.....	123
3.5.2 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες συνθήκες σε συχνότητα διέγερσης 100 Hz (<i>ex vivo</i>).....	129
3.6 Αντικαρκινικά φάρμακα.....	131
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	140
4.1 Νευροτοξική δράση μεταλλοϊόντων και τη νευροπροστατευτική δράση χημικών παραγόντων (<i>ex vivo</i>).....	140
4.2 Νευροτοξική δράση του <i>cis</i> -[Cu(II)-glycinate] (<i>in vitro</i>).....	148
4.3 Αξιολόγηση της δράσης αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων.....	150
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	153

Περίληψη

Το κεντρικό νευρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό (ΠΝΣ) σύστημα είναι ιδιαίτερα εύάλωτοι ιστοί καθώς είναι εύκολα προσβάσιμοι σε μια πληθώρα καταπονητικών παραγόντων. Τα διάφορα μεταλλοϊόντα, ενδογενή ή μη, μπορεί να είναι τοξικά για το νευρικό σύστημα όταν αυξάνει η συγκέντρωσή τους ή διαταράσσεται η ομοιόστασή τους. Για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων μεταλλοϊόντων (κοβάλτιο, δημήτριο, αργίλιο, χρώμιο, χαλκός καθώς και αντικαρκινικά φάρμακα με βάση την πλατίνα) χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του απομονωμένου ισχιακού νεύρου των θηλαστικών. Το μοντέλο βασίζεται στον συσχετισμό της βιωσιμότητας με την γένεση δυναμικών δράσης από της διεγερμένες νευρικές ίνες. Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας πραγματοποιείται μέσω της παραγωγής του Σύνθετου Δυναμικού Ενέργειας (ΣΔΕ). Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μακροχρόνια καταγραφή σταθερού ΣΔΕ για περισσότερο από 20 ώρες. Προκειμένου οι ίνες να έρθουν σε άμεση επαφή με τις υπο μελέτη ενώσεις, το επινεύριο αφαιρείται. Η καταγραφή του βιοηλεκτρικού σήματος πραγματοποιείται με χρήση κατάλληλα διαμορφωμένου τρίχωρου θαλάμου (καταγραφή, επώαση, διέγερση). Η *in vitro* αξιολόγηση της δράσης των μεταλλοϊόντων, πραγματοποιείται σε πρωτογενείς καλλιέργειες ιπποκαμπιαίου ιστού. Η αρχική αξιολόγηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων έγινε σε υψηλές συγκεντρώσεις (500μM). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο Fe(III) και το Al(III) δεν είναι τοξικά καθώς το ΣΔΕ ενέργειας δεν επηρεάζεται καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, το Co(II) και το Ce(III) φαίνεται να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα την βιωσιμότητα των νευρικών ιών. Αντίθετα, ο Cu(II) και το Cr(VI) μειώνουν σημαντικά την βιωσιμότητα των νευρικών ιών με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στη παραγωγή ROS καθώς και τα δύο αυτά μέταλλα είναι οξειδωαναγωγικά ενεργά. Η παραγωγή ROS επιβεβαιώθηκε και με χρήση του φθοριοχρώματος DCFDA και χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Επιπρόσθετα αξιολογήθηκε η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση των ενώσεων N-ακετυλ-κυστεΐνη και του χηλικποιητικού μορίου EDTA. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή νευροπροστατευτική δράση του EDTA ενώ η NAC δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από τον χαλκό τοξικότητα. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την *in vitro* αξιολόγηση. Τέλος, τα αντικαρκινικά οξαλιπλατίνα και *cis*-πλατίνη

φαίνεται να επηράζουν τα τασεοελεγχόμενα κανάλια καλίου καθώς εμφανίζονται δευτερογενείς επαναπολωτικές φάσεις.

Abstract

It is generally accepted that both the central (CNS) and peripheral nervous systems (PNS) are vulnerable and easily accessible to numerous stress factors. Metal ions, whether essential or non-essential, may display toxic effects when emerging in excess or their homeostasis is disturbed. In an attempt to examine the neurotoxic effect(s) of several metal ion compounds (cobalt, cerium, aluminum, chromium, copper and platinum-based anticancer drugs), the rat-isolated sciatic nerve preparation was employed in the framework of a systematic *ex vivo* study. The methodology used in the investigation targeted potential correlations between viability and action potential generation of excitable nerve fibers. The viability of the employed nerve fibers in the recording chamber was monitored through the evoked compound action potential (CAP) using standard electrophysiological methods. The main advantage of the method is that under normal recording conditions CAP remains constant for more than 20 hours. To achieve immediate contact of the fibers with the specific form of soluble metal compounds, the epineurium was removed. Recording bioelectric response signals were effected through employment of a three chamber fully compartmentalized (stimulation, incubation, recording) bath. For *in vitro* assessment of the effect(s) of several selected compounds, primary hippocampal cell cultures were employed. In order to assess potential neurotoxic effects of the metal compounds tested, both the nerve fibers and hippocampal cells were incubated with each compound at several concentrations. Initially, potential neurotoxic effects were screened at a final concentration of 500 μM . The employed Fe(III) and Al(III) complex forms were found to be non-toxic since the CAP amplitude was not affected through the entire experimental period. In addition, Co(II) and Ce(III) species exhibited no remarkable toxicity. In contrast, Cu(II) and Cr(VI) species showed significant reduction in the CAP amplitude. Consequently, Cu(II) and Cr(VI) species were investigated at lower concentrations, thus projecting a concentration-dependent neurotoxic effect. The latter effect of Cu(II) and Cr(VI) is due to emerging ROS in view of the fact that both metals are redox active. ROS generation was also confirmed through DCFDA staining using fluorescence microscopy. Moreover, a second set of experiments was conducted in an effort to assess the neuroprotective

effect against copper-induced neurotoxicity of known antioxidant and chelating agents. To this end, N-acetyl-cysteine (NAC) is linked to ROS reduction. EDTA, on the other hand, has a high affinity for metal ion binding. The collective results indicate no effect and in certain cases an additive effect for NAC in copper-induced toxicity, given that Cu(II) reactivity with thiols is associated with hydrogen peroxide production which in turn affects cell viability. The same set of experiments was also run with primary hippocampal cultures, projecting similar results. Finally, both oxaliplatin and cis-platin compounds, both widely used anticancer drugs, affected voltage gated potassium channels (VGKCs), exhibiting significant action in the CAP waveform, with the appearance of secondary depolarizations.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το νευρικό σύστημα αποτελεί ένα καλά δομημένο σύστημα επικοινωνίας το οποίο επιτρέπει στους οργανισμούς να αλληλεπιδρούν κατάλληλα με το εξωτερικό περιβάλλον και παράλληλα είναι υπεύθυνα για την επικοινωνία και τον συντονισμό των ιστών και των οργάνων μεταξύ τους. Το νευρικό σύστημα μπορεί να διαιρεθεί σε κεντρικό (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) και περιφερικό (σωματικό και αυτόνομο σύστημα) σύστημα το οποίο και μελετάται στην παρούσα εργασία. Οι νευρικές ίνες του περιφερικού νευρικού συστήματος μπορεί να εκτίθενται σε μία πληθώρα παραγόντων, χημικών ή μη, οι οποίοι μπορεί να είναι εν δυνάμει τοξικοί. Η έκθεση των ιών του περιφερικού νευρικού συστήματος μπορεί να είναι άμεση, δηλαδή μετά από επαφή, ή έμμεση, κυρίως μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ανεξάρτητα της οδού έκθεσης των ιών σε τοξικούς παράγοντες οι συνέπειες που υπεισέρχονται αφορούν τόσο σε λειτουργικές όσο και σε δομικές μεταβολές. Κύρια ομάδα καταπονητικών παραγόντων των ιών του περιφερικού νευρικού συστήματος αποτελούν οι μεταλλοτοξίνες. Η έκθεση σε αυτές μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση και οι μηχανισμοί πρόκλησης τοξικότητας περιλαμβάνουν ποικίλες και ετερογενείς οδούς. Τα μεταλλικά αυτά ιόντα μπορεί να είναι εξωγενή ή και ενδογενή και η διαταραχή της ομοιοστασίας τους οδηγεί σε πρόκληση τοξικότητας. Η επαφή των μεταλλοτοξινών με τις ίνες του ΠΝΣ μπορεί να γίνει άμεσα μέσω της τροφικής αλυσίδας και του πόσιμου νερού, έμμεσα μέσω της διαταραχής των φυσιολογικών επιπέδων ενδογενών μετάλλων, όπως είναι χαλκός, ή ακόμα και μέσω φαρμακευτικών θεραπειών που στηρίζονται σε μεταλλοφάρμακα όπως είναι τα αντικαρκινικά οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη. Οποιοσδήποτε και να είναι ο τύπος της καταπόνησης, η επίδραση που μπορεί να έχει αφορά σε μία πληθώρα φυσιολογικών μηχανισμών των νευρικών ιών. Στους φυσιολογικούς αυτούς μηχανισμούς εμπλέκονται τα τασεοελεγχόμενα κανάλια ιόντων νατρίου και καλίου που απαντώνται στην κυτταρική μεμβράνη της νευρικής ίνας, σε αντλίες ιόντων, σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυτταροπλάσματος όπως είναι τα μιτοχόνδρια καθώς και στη μυελίνη η οποία είναι υπεύθυνη για την δομική και ενεργειακή στήριξη των νευρικών ιών καθώς και την μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων. Βασικός μηχανισμός επίδρασης των διαφόρων μεταλλοτοξινών στις νευρικές ίνες του ΠΝΣ αποτελεί το μεταλλοεπαγόμενο οξειδωτικό stress. Το νευρικό σύστημα είναι

ιδιαίτερα ευάλωτο σε οξειδωτική καταπόνηση. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόλις το 1% της μιτοχονδριακής ροής των ηλεκτρονίων αρκεί να οδηγήσει στον σχηματισμό O_2^- .

Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια καθορισμού του βαθμού επιρροής των μεταλλοτοξινών στον νευρικό ιστό καθώς και αποσαφήνισης των μηχανισμών καταπόνησης. Επιπλέον μελετάται η πιθανή νευροπροστατευτική δράση, γνωστών χηλικοποιητικών και αντιοξειδωτικών μορίων έναντι των μεταλλοϊόντων. Ενώ επιπρόσθετα, γίνεται συσχετισμός με την επίδραση των μεταλλοτοξινών αυτών στο κεντρικό νευρικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στον ιπποκαμπιαίο ιστό.

1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1.1 Δομή Περιφερικού Νευρικού Συστήματος

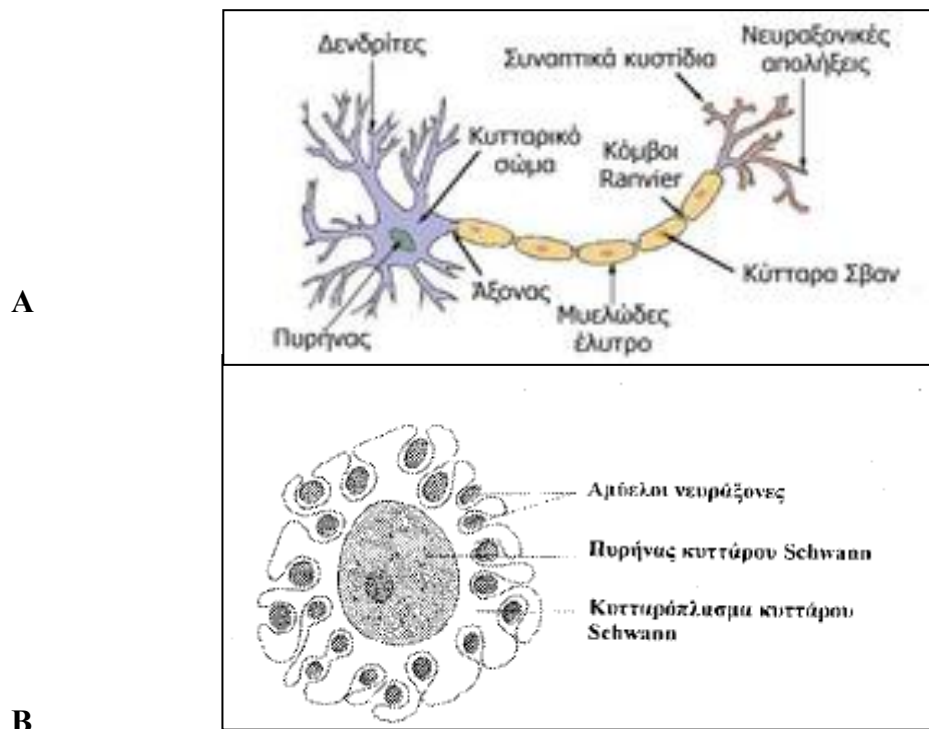
Το περιφερικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τις ρίζες, τις διακλαδώσεις και τις τελικές απολήξεις των κρανιακών και νωτιαίων νεύρων, καθώς και τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Δομικό στοιχείο του περιφερικού όπως και του κεντρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από το σώμα τους δενδρίτες και μία μεγάλη αποφυάδα τον νευρίτη ή νευράξονα ή νευρική ίνα. Το σώμα και οι αποφυάδες αποτελούνται από κυτταρόπλασμα (αξόπλασμα), που περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη (αξονική μεμβράνη)

Τα είδη των νευρώνων είναι:

1. Αισθητικοί ή κεντρομόλοι. Βρίσκονται στα γάγγλια των νωτιαίων ριζών και διαθέτουν ειδικές αισθητικές απολήξεις, τους υποδοχείς, στους οποίους εκκινούν τα ερεθίσματα και κατόπιν με τους νευράξονες μεταδίδονται στον νωτιαίο μυελό.
2. Συμπαθητικοί. Βρίσκονται στον νωτιαίο μυελό ή στην συμπαθητική αλυσίδα.
3. Κινητικοί. Είναι ειδικά ανεπτυγμένοι ώστε να μεταδίδουν τα ερεθίσματα στα όργανα κίνησης (μύες).

4. Διάμεσοι. Αποτελούν ένα ενδιάμεσο δίκτυο συνάψεων μεταξύ των κεντρομόλων ή αισθητικών και φυγόκεντρων (κινητικών και συμπαθητικών) νευρώνων.

Οι λειτουργικές μονάδες των περιφερικών νευρών είναι οι νευράξονες ή νευρικές ίνες οι οποίες διακρίνονται σε εμύελες και αμύελες (**Εικόνα 1**).



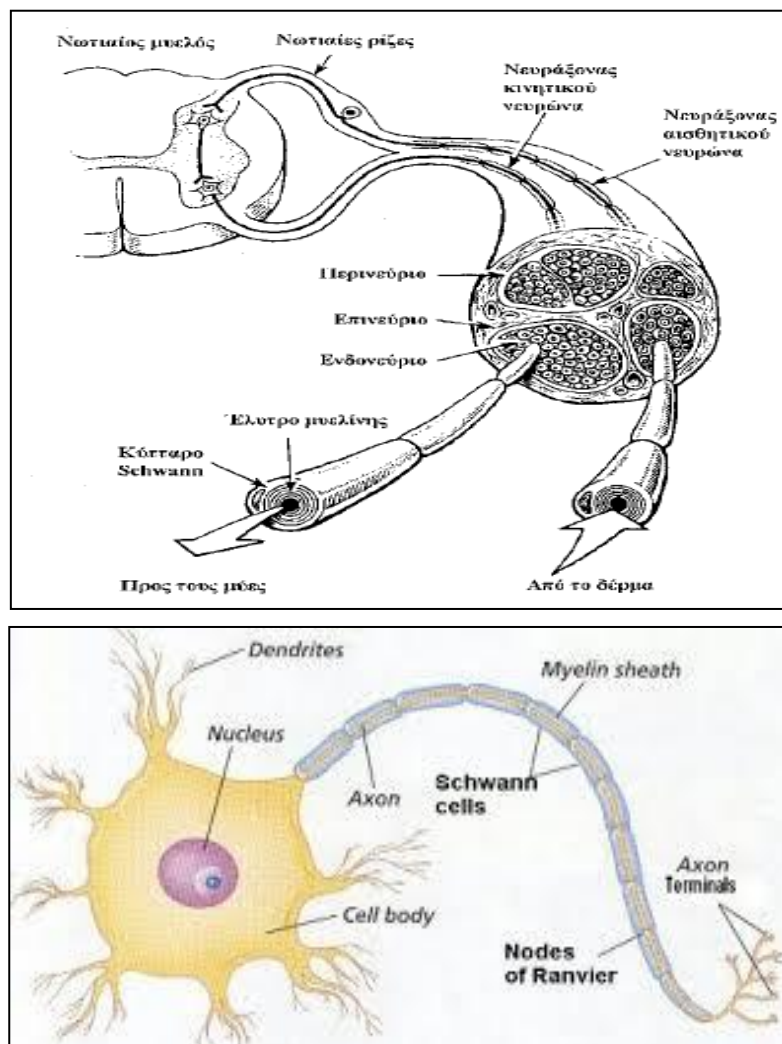
Εικόνα 1: A) Δομή εμύελης νευρικής ίνας. B) τομή αμύελων νευρικών ινών.

Οι εμύελες νευρικές ίνες περιβάλλονται από ένα μεμβρανώδες περίβλημα το οποίο σχηματίζεται από ένα κύτταρο Schwann περιελιγμένο γύρω από τον νευράξονα ώστε να δημιουργεί ένα σωλήνα από πολλαπλές στοιβάδες φωσφολιπιδίων, το λεγόμενο έλυτρο μυελίνης. Κάθε κύτταρο του Schwann εκτείνεται συνήθως για 1 mm (στις βραχείες νευρικές ίνες για 50 μm) (Wildsmith, 1986; Strichartz & Berde, 1994). Στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων Schwann, τις λεγόμενες περισφίξεις του Ranvier, απουσιάζει η μυελίνη. Μεγάλος αριθμός διαύλων Na^+ , οι οποίοι διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του ερεθίσματος, απαντάται στις συγκεκριμένες περισφίξεις. Οι αμύελες ίνες περιβάλλονται από μια αλυσίδα κυττάρων του Schwann και επομένως έλυτρου μυελίνης (Wildsmith, 1986; Strichartz,

1988). Τα περιφερικά νεύρα περιλαμβάνουν τόσο κεντρομόλες όσο και φυγόκεντρες νευρικές ίνες.

1.1.2 Δομή των περιφερικών νεύρων

Κάθε τυπικό περιφερικό νεύρο, αποτελείται από δεσμίδες νευραξόνων. Κάθε νευράξονας περιβάλλεται από το ενδονεύριο, από ίνες κολλαγόνου, ενώ κάθε δεσμίδα νευραξόνων περιβάλλεται από στρώματα λείων συμπλεκόμενων κυττάρων που αποτελούν το περινεύριο. Τέλος μια μάζα σπογγώδους συνδετικού ιστού περιβάλλει το περινεύριο και ονομάζεται επινεύριο. Αγγεία σχηματίζουν πλέγματα στο περινεύριο ενώ στο ενδονεύριο βρίσκονται μόνο τριχοειδή αγγεία (Wildsmith, 1986; Strichartz & Berde, 1994) (Εικόνα 2).

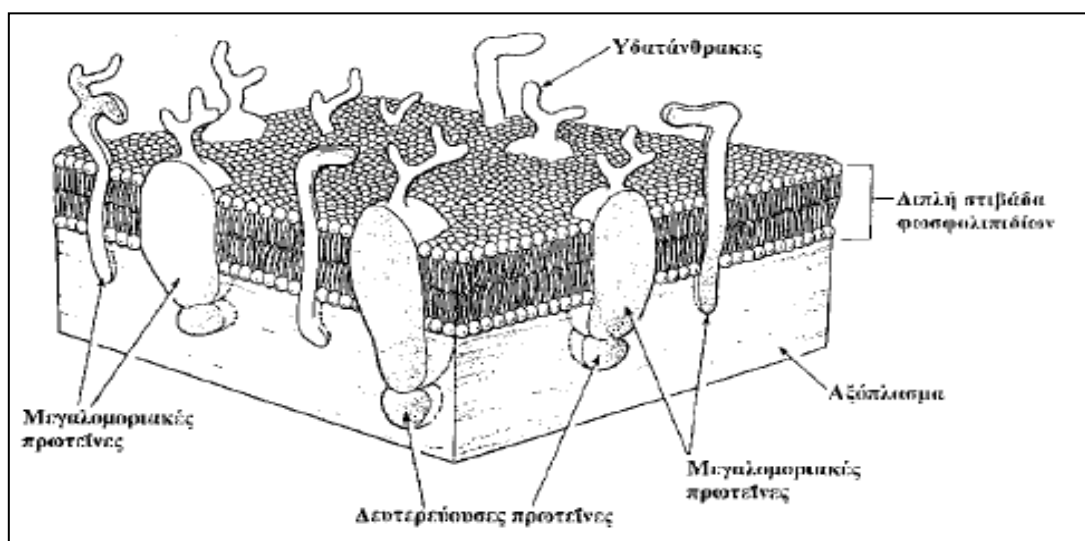


Εικόνα 2: Δομή περιφερικού νεύρου.

Τα παραπάνω δομικά στοιχεία συμβάλλουν αφενός μεν στην σύνδεση των ιών μεταξύ τους, αφετέρου δε στην προστασία τους. Παράγοντες μεγάλης σημασίας για την διάχυση των διαφόρων χημικών παραγόντων είναι το επινεύριο, η παρουσία ή μη ελύτρου μυελίνης καθώς και το μέγεθος και η θέση των νευραξόνων στο κέντρο ή στην περιφέρεια της δεσμίδας (Wildsmith, 1986).

Αξονική Μembrάνη

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σχετικά με την μετάδοση του νευρικού ερεθίσματος διαδραματίζει η αξονική μεμβράνη η οποία περιβάλλει το σώμα και τις αποφυάδες του νευρικού κυττάρου. Η αξονική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από μια διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων διατεταγμένων έτσι ώστε προς τα έξω να βρίσκονται τα υδρόφιλα φωσφολιπίδια ενώ προς τα μέσα τα υδρόφοβα. Εσωτερικά της μεμβράνης υπάρχουν επίσης πρωτεϊνικά μόρια πολλά από τα οποία δρουν ως ένζυμα, ως υποδοχείς ορμονών και φαρμάκων και ως διάλυτοι για την μετακίνηση ιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο (Wildsmith, 1986; Strichartz & Berde, 1994; Strichartz, 1988) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αξονική μεμβράνη. Στο σχήμα διακρίνονται οι ένθετες πρωτεΐνες που αποτελούν τους διαύλους ιόντων.

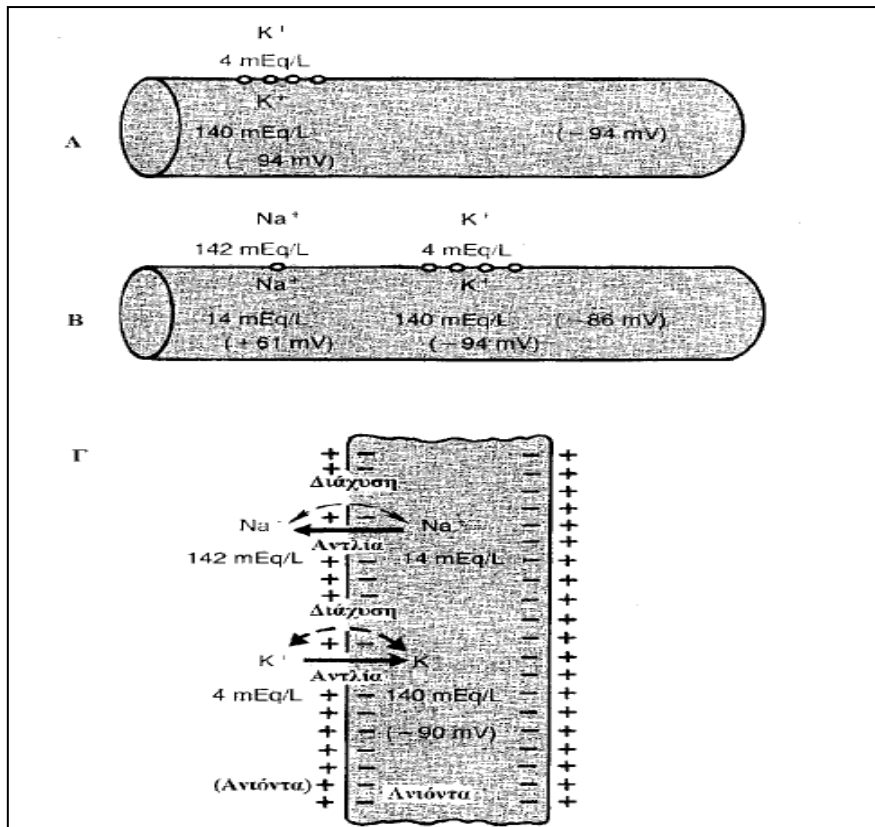
1.1.3 Φυσιολογία της Αγωγής του Νευρικού Ερεθίσματος

Η γένεση και η αγωγή του ερεθίσματος στα νευρικά όπως και στα μυϊκά κύτταρα εξαρτάται από την ροή ειδικών ιόντων διαμέσου των πρωτεϊνικών διαύλων που βρίσκονται στην αξονική μεμβράνη. Η κατανόηση του ρόλου των διαύλων ιόντων στην παραγωγή και μετάδοση των ερεθισμάτων συμβάλει στην ερμηνεία του τρόπου δράσης πολλών χημικών ουσιών και των ανεπιθύμητων ενεργειών τους στο ΚΝΣ και ΠΝΣ.

Δυναμικό Ηρεμίας

Η αξονική μεμβράνη διατηρεί μια διαφορά δυναμικού μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού του νευρώνα της τάξης των -60 mV ως -90 mV που είναι γνωστή ως δυναμικό ηρεμίας (Strichartz & Berde, 1994). Το δυναμικό ηρεμίας είναι το πολύπλοκο αποτέλεσμα πολλών παραγόντων οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η αξιοσημείωτη διαφορά στην συγκέντρωση ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης καθώς και οι δυνάμεις που τείνουν να διατηρήσουν αυτή την διαφορά και ιδιαίτερα η εκλεκτική διαπερατότητα στα ιόντα. Η διαφορά συγκέντρωσης σε συνδυασμό με τα ήδη υπάρχοντα ηλεκτρικά δυναμικά παράγουν δυνάμεις που τείνουν να μετακινήσουν τα ιόντα αυτά. Παράλληλα οι εκλεκτικές μεταβολές στην διαπερατότητα επιτρέπουν την μετακίνηση ιόντων στοιχείων από τα οποία την μεγαλύτερη σημασία για την γένεση και μετάδοση του ερεθίσματος κατέχουν τα ιόντα νατρίου (Na^+) και καλίου (K^+) (Wildsmith, 1986).

Η συγκέντρωση των ιόντων καλίου μέσα στο κύτταρο είναι 30 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στον εξωκυττάριο χώρο (Strichartz & Berde, 1994), ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα ιόντα νατρίου. Μια ειδική πρωτεΐνη της μεμβράνης γνωστή ως αντλία νατρίου – καλίου μεταφέρει ενεργά ιόντα K^+ ενδοκυτταρικά και ιόντα Na^+ έξω από το κύτταρο χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας το ATP που παράγεται από τον μεταβολισμό του νευρικού κυττάρου. Σε κατάσταση ηρεμίας η μεμβράνη εμφανίζει μια εκλεκτική διαπερατότητα στα K^+ με συνέπεια το αξόπλασμα να είναι ηλεκτρικά αρνητικό ενώ το εξωτερικό της μεμβράνης ηλεκτρικά θετικό. Τότε λαμβάνει χώρα το προαναφερθέν διαμεμβρανικό δυναμικό ηρεμίας των -60 mV έως -90 mV (Strichartz & Berde, 1994) (**Εικόνα 4**)



Εικόνα 4: Εγκαθίδρυση και διατήρηση δυναμικού ηρεμίας σε νευρικές ίνες. Α) με διάχυση μόνο ιόντων K⁺. Β) Διάχυση ιόντων K⁺ και Na⁺. Γ) Διάχυση ιόντων K⁺, Na⁺ και δράση αντλίας K⁺- Na⁺.

Δυναμικό Ενέργειας

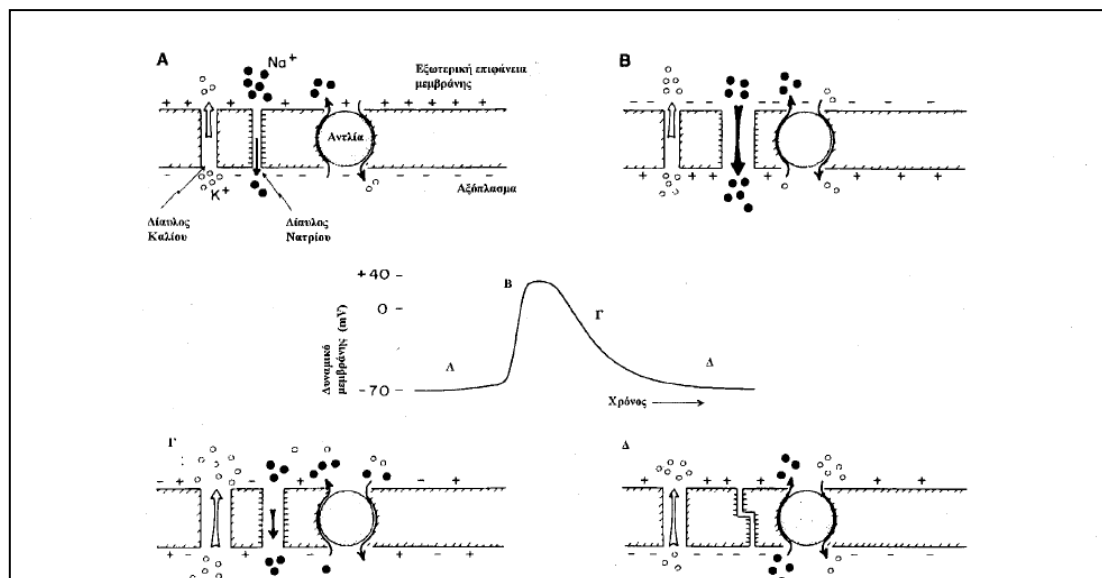
Τα ιόντα Na⁺ τείνουν να εισέλθουν στον νευράξονα εξαιτίας της μεγαλύτερης εξωκυττάριας συγκέντρωσης τους και του ηλεκτρικά αρνητικού εσωτερικού του κυττάρου. Μια λειτουργία θετικής παλίνδρομης ρύθμισης αποτελεί την βάση της εμφάνισης των δυναμικών δράσης στα νευρικά κύτταρα. Έναυσμα για την έναρξη αυτού του κύκλου αποτελεί η επίδραση εξωτερικού ερεθίσματος σε κάποια περιοχή της αξονική μεμβράνης. Η μεμβράνη αρχίζει να εκπολώνεται και το δυναμικό της γίνεται λιγότερο αρνητικό. Τότε ανοίγουν οι ειδικοί διάυλοι που επιτρέπουν την είσοδο Na⁺ στο κύτταρο. Το άνοιγμα των διαύλων οφείλεται σε ενδογενή συμπεριφορά του πρωτεϊνικού τους μορίου. Όσο λιγότερο αρνητικό καθίσταται το δυναμικό της μεμβράνης τόσο περισσότεροι διάυλοι Na⁺ ανοίγουν. Παράλληλα αυξάνεται το ρεύμα των ιόντων Na⁺ προς τα έσω το οποίο αρχικά ευθύνεται για την έναρξη του ερεθίσματος και τελικά οδηγεί το κύτταρο σε εκπόλωση, δηλαδή σε δυναμικό +20 mV (Strichartz, 1988; Guyton, 1991).

Επαναπόλωση, επάνοδος στο δυναμικό ηρεμίας συμβαίνει διότι:

1. Όσο θετικοποιείται το εσωτερικό του κυττάρου δηλαδή όσο το δυναμικό γίνεται λιγότερο αρνητικό, τόσο ελαττώνεται η μετακίνηση Na^+ προς τα μέσα.
2. Κατά την διάρκεια της εκπόλωσης οι διάλυτοι Na^+ τελικά κλείνουν, ακολούθως ανοίγουν οι διάλυτοι K^+ οι οποίοι επιτρέπουν την προς τα έξω είσοδο ενός μεγάλου ρεύματος K^+ , ώστε το δυναμικό του κυττάρου να επιστρέψει στην αρχική τιμή ηρεμίας (Guyton, 1991)

Έτσι λοιπόν, τα ερεθίσματα ακολουθούνται από μια φάση εκπόλωσης και μια φάση επαναπόλωσης της μεμβράνης. Προς τα έξω ρεύματα μεταφερόμενα με ιόντα Na^+ εκπολώνουν το κύτταρο, ενώ προς τα έξω ρεύματα μεταφερόμενα με ιόντα K^+ επαναπολώνουν το κύτταρο. Η διαδικασία εκπόλωσης – επαναπόλωσης είναι γνωστή ως δυναμικό δράσης ή ενέργειας (Strichartz, 1988; Guyton, 1991).

Αξίζει να τονιστεί ότι ο συνολικός αριθμός των ιόντων που μετακινούνται εκατέρωθεν της μεμβράνης είναι μικρός, η δε αρχική διαφορά συγκεντρώσεων επανέρχεται σε λίγα δευτερόλεπτα λόγω διέγερσης της αντλίας $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ από τις παραπάνω μεταβολές (Strichartz, 1988) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των φάσεων της αζονικής μεμβράνης στις διάφορες φάσεις του δυναμικού δράσης. Διακρίνονται οι μετακινήσεις των ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης και η δραστηριότητα της αντλίας $\text{K}^+ - \text{Na}^+$. Α)

Εν ηρεμία μεμβράνη. Μικρή είσοδος K^+ και έξοδος Na^+ ισορροπείται με την δράση της αντλίας K^+-Na^+ (ανενεργού). Δ) Αμέσως μετά το ερέθισμα πολλοί διάλυτοι Na^+ κλείνουν και δεν μπορούν να ανταποκριθούν σε νέο ερέθισμα.

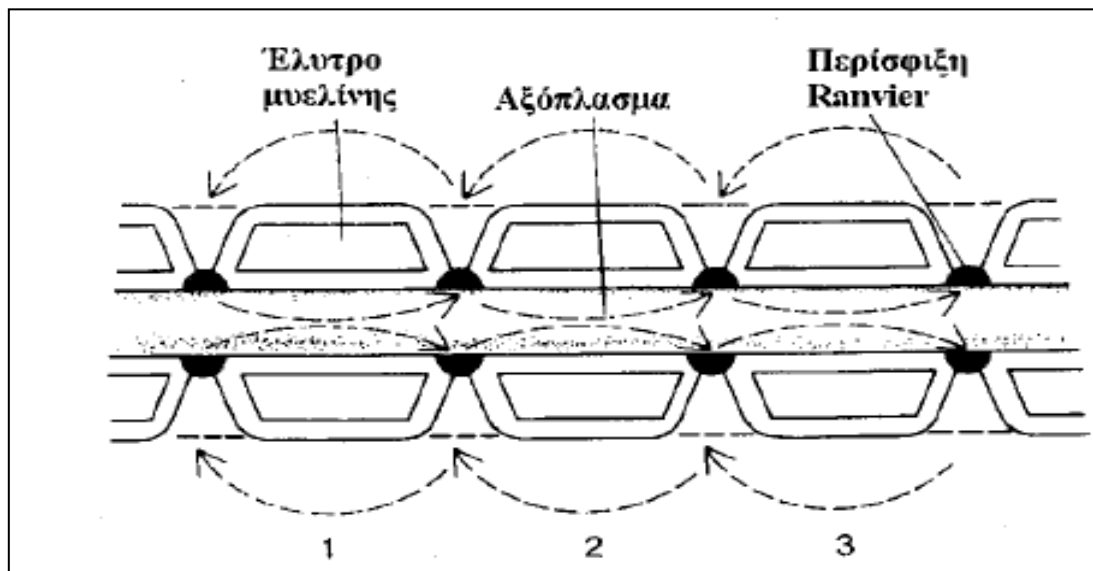
Αγωγή του ερεθίσματος

Είναι γνωστό ότι στις νευρικές απολήξεις υπάρχουν υποδοχείς για την ανίχνευση των διαφόρων ερεθισμάτων όπως είναι η μηχανική παραμόρφωση, η μεταβολή της θερμοκρασίας, ο πόνος, η παρουσία χημικών νευροδιαβιβαστών κ.α. Τα δυναμικά δράσης εμφανίζονται στα άκρα των νευρών μετά από επίδραση στους υποδοχείς καταλλήλου ερεθίσματος το οποίο προκαλεί το αρχικό άνοιγμα κάποιων διαύλων Na^+ . Έτσι αρχίζει η εκπόλωση της μεμβράνης (Covino, 1986). Η μετάδοση της διέγερσης ακολουθεί τον νόμο «όλα ή τίποτα», δηλαδή δεν πραγματοποιείται αν δεν φθάσει η μεμβράνη τον κρίσιμο ουδικό σημείο (Strichartz, 1988). Με ένα ανεπαρκές ερέθισμα λαμβάνει χώρα μία μικρή τοπική εκπόλωση της μεμβράνης. Με ένα επαρκές ερέθισμα η εκπόλωση της μεμβράνης φτάνει από τα $-90mV$ στα $-45mV$, δηλαδή φτάνει τον λεγόμενο κρίσιμο ουδικό δυναμικό. Τότε αρχίζει το άνοιγμα άλλων διαύλων Na^+ που διαθέτουν υποδοχείς ευαίσθητους στην διαφορά δυναμικού (voltage dependent), με αποτέλεσμα την γένεση ενός πλήρους δυναμικού δράσης και την επακόλουθη μετάδοσή του (Wildsmith, 1986; Guyton, 1991b).

Το ερέθισμα άγεται με μια συνεχή σύζευξη μεταξύ διεγερμένων και μη περιοχών της μεμβράνης. Ρεύματα ιόντων που εισέρχονται στον νευράξονα από την διεγερμένη – εκπολωμένη περιοχή, εξέρχονται από την αξονική μεμβράνη και εκπολώνουν την παρακείμενη περιοχή. Μολονότι το τοπικό ρεύμα τρέχει από την διεγερμένη περιοχή και προς τις δύο κατευθύνσεις, η περιοχή πίσω από το ερέθισμα έχοντας μόλις υποστεί εκπόλωση είναι ανερέθιστη και η μετάδοση γίνεται προς μια κατεύθυνση (Wildsmith, 1986; Guyton, 1991).

Το τοπικό ρεύμα έχει μόνο προς τα πίσω πορεία, διότι η μετακίνηση των K^+ προς τα έξω για την εξισορρόπηση της αύξησης του δυναμικού της μεμβράνης είναι παρατεταμένη και καθυστερεί το κλείσιμο των διαύλων K^+ . Επίσης οι διάλυτοι Na^+ έχουν την ιδιότητα μετά την εκπόλωση της μεμβράνης να αδρανοποιούνται προσωρινά, οπότε και η νευρική ίνα δεν διεγείρεται υπό την επίδραση ερεθισμάτων. Το χρονικό διάστημα το οποίο δεν μπορεί να εκλυθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενεργείας, ονομάζεται απόλυτη ανερέθιστη περίοδος. Στις νευρικές ίνες ταχείας

αγωγής έχει υπολογιστεί ότι διαρκεί από 0,4 ως 0,5 msec και το νευρικό κύτταρο επανέρχεται σε φάση ηρεμία μέσα σε 2-3msec. Οι δίαυλοι Na^+ ανοίγουν διότι αρχίζουν και πάλι να επανέρχονται σε ενεργό κατάσταση. Η περίοδος αυτή της αποκατάστασης της λειτουργίας των διαύλων καλείται και σχετική ανερέθιστη περίοδος. Κατά την διάρκεια της περιόδου αυτής η νευρική ίνα είναι δυνατόν να διεγερθεί μόνο με πολύ ισχυρά ερεθίσματα (Guyton, 1991). Στις αμύελες ίνες το ερέθισμα μεταδίδεται σχεδόν σαν κύμα κατά μήκος του νευράξονα, ενώ στις εμμύελες όπου οι δίαυλοι Na^+ εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή των περισφιξεων Ranvier, τα τοπικά ρεύματα μεταπηδούν από την μία περίσφιξη στην επόμενη. Τότε η ενδιάμεση περιοχή μεταξύ δύο περισφιξεων εκπολώνεται ταχέως. Αυτή η αγωγιμότητα «με άλματα» ερμηνεύει τον ταχύτερο ρυθμό μετάδοσης του ερεθίσματος στις εμμύελες ίνες (Wildsmith, 1986; Guyton, 1991) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Αγωγή με «άλματα» κατά μήκος εμμύελου νευράξονα.

1.1.4 Δομή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

Το κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τον νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος διαιρείται περαιτέρω σε πέντε κύριες περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν στον έσχατο, τον πρόσθιο, τον μέσο, τον διάμεσο και τον τελικό εγκέφαλο.

Κυτταρική σύσταση

Ο νευρικός ιστός αποτελείται κυρίως από νευρώνες και νευρογλοία. Οι νευρώνες διαδραματίζουν ρόλο επικοινωνίας με την περιφέρεια. Στους νευρώνες που επικοινωνούν με την περιφέρεια περιλαμβάνονται τα αισθητικά υποδεκτικά κύτταρα και οι σωματικοί και αυτόνομοι κινητικοί νευρώνες. Γενικά, συναντάται μεγάλη ποικιλία σχημάτων και μεγεθών καθώς υπάρχει πλήθος δραστηριοτήτων που διεκπεραιώνονται από τους νευρώνες.

Στήριξη στους νευρώνες παρέχουν τα νευρογλοιακά κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα. Επιπλέον, στη κατηγορία αυτή ανήκουν η μικρογλοία και τα επενδυματικά κύτταρα. Η μυελίνη εμφανίζεται και στο ΚΝΣ και πιο συγκεκριμένα στα ολιγοδενδροκύτταρα. Τα αστροκύτταρα αν και έχουν επαφή με τμήμα μόνο της επιφάνειας των κεντρικών νευρώνων, οι αποφυάδες τους εφάπτονται των τριχοειδών και του συνδετικού ιστού στην επιφάνεια του ΚΝΣ συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της ελεύθερης διάχυσης ουσιών στο ΚΝΣ. Η μικρογλοία αποτελείται από φαγοκύτταρα τα οποία απομακρύνουν τα προϊόντα κυτταρικής βλάβης. Τα επενδυματικά κύτταρα σχηματίζουν ένα επιθήλιο το οποίο διαχωρίζει το ΚΝΣ από τις κοιλίες του εγκεφάλου οι οποίες περιέχουν εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Berne & Levy, 2000).

Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Η μεταφορά μεγάλων μορίων και ιδιαίτερα φορτισμένων ιόντων από το αίμα προς τον εγκέφαλο αλλά και τον νωτιαίο μυελό ελέγχεται και περιορίζεται αυστηρά από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η περιορισμένη αυτή διαλογή επιτυγχάνεται εν μέρει στην παρουσία στενών συνδέσεων ανάμεσα στα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα και το ΚΝΣ. Περιορισμός της κίνησης ορισμένων ουσιών μπορεί να οφείλεται και στην

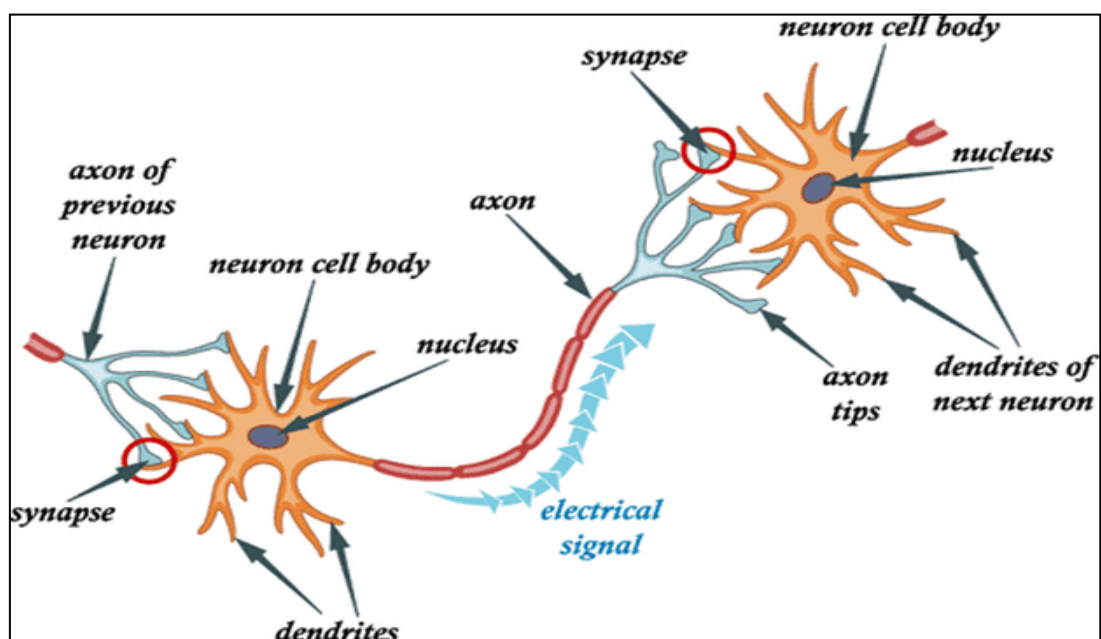
παρουσία αστροκυττάρων ενώ η ρύθμιση και η απομάκρυνση μπορεί να γίνεται και με μηχανισμούς μεταφοράς ((Berne & Levy, 2000).

Δομή του νευρώνα

Η πλειοψηφία των νευρώνων αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, ένα ή περισσότερους δενδρίτες και έναν νευράξονα. Το κυτταρικό σώμα περιέχει τον πυρήνα και τον πυρινίσκο ενώ ακόμα, περιέχει ιδιαίτερα ανεπτυγμένο βιοσυνθετικό σύστημα προκειμένου να καλύψει τις απαιτητικές και εξειδικευμένες λειτουργίες του νευρικού ιστού. Δεσπόζουσα θέση κατέχει και το σύστημα Golgi. Οι δενδρίτες είναι προεκτάσεις του κυτταρικού σώματος και σε ορισμένους νευρώνες κατέχουν περισσότερο από το 90% της συνολικής έκτασης των νευρώνων. Ο νευράξονας εκφύεται από το κυτταρικό σώμα και σε σπάνιες περιπτώσεις από το δενδρίτη. Οι νευράξονες μπορεί να περιβάλλονται από έλυτρο ή να είναι γυμνοί. Στο ΚΝΣ, οι εμμύελοι νευράξονες περιβάλλονται από έλυτρο ολιγοδενροκυττάρων ενώ οι υπόλοιποι είναι αμύελοι.

Συναπτική διαβίβαση

Οι νευρώνες επικοινωνούν μεταξύ τους με εξειδικευμένες συνδέσεις, τις συνάψεις. Οι συνάψεις σχηματίζονται ανάμεσα στις απολήξεις του νευράξονα ενός νευρώνα και τους δενδρίτες ενός άλλου. Οι συνάψεις αυτές καλούνται νευραξονοδενδριτικές συνάψεις.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού συνάψεων μεταξύ δύο νευρώνων.

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

1.2.1 ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΑ - ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ

Μια πληθώρα μεταλλοϊόντων είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών όπως και άλλα δομικά στοιχεία (λίπη, υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες). Σήμερα, η έρευνα γύρω από τα μεταλλοϊόντα συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη ενός σημαντικού συνόλου δυσλειτουργιών οι οποίες σχετίζονται με την διαταραχή της ομοιοστασίας των μετάλλων αυτών. Διάφορα μεταλλοϊόντα θεωρούνται απαραίτητα για την διατήρηση της φυσιολογίας του κυττάρου όπως είναι τα Na, K, Ca, Mg, Fe, Co, Mn, Cu, και Zn. Ο τομέας της τοξικολογίας έχει προσφέρει αρκετά δεδομένα τα οποία αφορούν στην επίδραση των μετάλλων αυτών ως τοξικοί παράγοντες τόσο για τους έμβιους οργανισμούς όσο και για το περιβάλλον. Ωστόσο, μέχρι και πρόσφατα λίγα είναι τα δεδομένα τα οποία ανάγουν τα μεταλλοϊόντα αυτά σε παράγοντες αιτιοπαθογένειας πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος ή νευροπάθειας του περιφερικού νευρικού συστήματος. Σήμερα, ολοένα και κερδίζει έδαφος ο τομέας της *μεταλλονευροχημείας* όπου αξιολογείται η δράση διαφόρων μετάλλων ως παράγοντες ή συμπαράγοντες στην αιτιοπαθογένεια διαφόρων ασθενειών του νευρικού συστήματος.

Η πλειοψηφία των μεταλλοϊόντων που βρίσκονται στο έμβιο ή μη περιβάλλον, απαντώνται σε ποικίλες μορφές οι οποίες συνήθως είναι ανάλογες με το ρόλο που διαδραματίζουν σε αυτό. Κάθε μεταλλοϊόν είναι δυνατό να διαδραματίσει διαφορετικούς και ποικίλους ρόλους με θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον όπου βρίσκεται. Οι ιδιότητες των μετάλλων και άρα η συγκεκριμένη βιολογική δράση που αυτά παρουσιάζουν ποικίλει ανάλογα με το ίδιο το μέταλλο, την φύση των ενώσεων που σχηματίζει, το σύστημα στο οποίο εμπλέκεται, την συγκέντρωση του μετάλλου, το pH του περιβάλλοντος καθώς και άλλους παράγοντες. Μέταλλα όπως το νάτριο, το κάλιο, το ασβέστιο χαρακτηρίζονται συνήθως ως μακροστοιχεία (Καράταγλης, 1999) και εμπλέκονται σε λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τους οργανισμούς όπως είναι η αναπνοή, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή και άλλες βιοχημικές διεργασίες. Ως μακροστοιχεία βέβαια δεν εννοούνται μόνο τα μέταλλα αλλά και άλλα αμέταλλα όπως είναι το άζωτο, ο φώσφορος, το οξυγόνο και το θείο. Μεταβατικά μέταλλα όπως είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, το νικέλιο και ο χαλκός συνήθως αναφέρονται ως ιχνοστοιχεία και εμπλέκονται και

αυτά σε φυσικές και βιολογικές διεργασίες. Τα στοιχεία αυτά χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα ή χρήσιμα στοιχεία καθώς ο ρόλος τους είναι συνήθως πολύ συγκεκριμένος και τις περισσότερες φορές αναντικατάστατος. Τα δυσθενή ή τρισθενή κυρίως μέταλλα με υψηλή βιολογική δράση δε βρίσκονται σε στοιχειακή ή ελεύθερη μορφή καθώς θα ήταν ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον όπου βρίσκονται. Τα διάφορα μεταλλοϊόντα είναι δυνατό να ανταγωνίζονται το ένα με το άλλο για την συμμετοχή τους σε χημικές και βιολογικές διεργασίες με αποτέλεσμα την εμφάνιση πιθανών τοξικών συνεπειών. Διάφοροι παράγοντες όπως η συγκέντρωση του μεταλλοϊόντος ή το pH ενδέχεται να ενεργοποιήσουν την τοξική δράση ενός μεταλλοϊόντος στον οργανισμό. Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλους τους οργανισμούς. Το μέταλλο αυτό βρίσκεται στο ενεργό κέντρο πολλών πρωτεϊνών και ενζύμων όπως είναι η σερουλοπλασμίνη, η αλβουμίνη, η οξειδάση του κυτοχρώματος c και η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Σε πολλά μαλάκια και αρθρόποδα περιέχεται στην χρωστική ανθοκυανίνη με βασικό ρόλο την μεταφορά του οξυγόνου. Αποτέλεσμα της παρουσίας του χαλκού στην αιμοκυανίνη είναι το μπλε χρώμα του αίματος, όταν οξυγονώνεται κατά αντιστοιχία με το κόκκινο χρώμα στους ανθρώπους λόγω της παρουσίας του σιδήρου. Επίσης, ο χαλκός βρίσκεται στο έδαφος με τη μορφή των κατιόντων του Cu(II) και απορροφάται από τα φυτά (Καράταγλης, 1999). Χαλκός, επίσης, εντοπίζεται στα φύλλα και ειδικά στους χλωροπλάστες όπου συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Η έλλειψη χαλκού προκαλεί ελάττωση της φωτοσυνθετικής δράσης. Επίσης απαραίτητο μεταλλοϊόν για όλους του οργανισμούς είναι ο ψευδάργυρος (Jaccard et al., 2008). Όμοια με τον χαλκό, ο ψευδάργυρος απαντάται στο ενεργό κέντρο πολλών μεταλλοενζύμων, όπως είναι η καρβονική ανυδράση που δρα ως λειτουργικός, δομικός ή ρυθμιστικός συμπαράγοντας σε πολλά ένζυμα. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος είναι παράγοντας κλειδί για την καλή λειτουργία των αδένων και την ανάπτυξη των οργάνων. Στα φυτά, ο ψευδάργυρος εμπλέκεται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του RNA. Άλλα απαραίτητα ιχνοστοιχεία όπως είναι το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, ο σίδηρος και το νικέλιο συμμετέχουν και αυτά σε μια πληθώρα βιοχημικών διεργασιών (Καράταγλης, 1999). Επιπλέον, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία βρίσκονται στην φύση και δρουν εξ' αρχής ως τοξικά με διάφορες ανεπιθύμητες συνέπειες με τελικούς αποδέκτες τους έμβιους οργανισμούς.

Με τον όρο τοξικότητα εννοείται κάθε αρνητική δράση μιας ουσίας στο περιβάλλον όπου βρίσκεται και ουσιαστικά αποτελεί τη διαβάθμιση της δυνατότητας μια ουσίας να προκαλέσει βλάβη σε έναν οργανισμό. Σημαντικό ποσοστό στην λίστα με τους τοξικούς παράγοντες κατέχουν τα βαρέα μέταλλα (Xue, et al., 1988). Παραδείγματα τοξικών μετάλλων αποτελούν το νικέλιο, ο χαλκός, το κοβάλτιο, ο σίδηρος καθώς και άλλα. Τα βαρέα μέταλλα περιλαμβάνουν μέταλλα με σχετικά υψηλή πυκνότητα. Παραδείγματα βαρέων μετάλλων αποτελούν ο υδράργυρος, το κάδμιο, το αρσενικό, το χρώμιο, το θάλλιο, και ο μόλυβδος. Τα τοξικά μέταλλα είναι χημικά στοιχεία που υπάρχουν στη φύση είτε ως ιχνοστοιχεία είτε σε μεγάλες ποσότητες. Ορισμένα από αυτά δρουν ως απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τους έμβιους οργανισμούς όπως ενδεικτικά αναφέρθηκε παραπάνω για την περίπτωση του χαλκού και του ψευδαργύρου, αλλά ωστόσο είναι δυνατό τα ίδια απαραίτητα μεταλλοϊόντα σε μεγάλες συγκεντρώσεις να δράσουν ως τοξικά. Αντίθετα, τα βαρέα τοξικά μέταλλα υπάρχουν και αυτά στη φύση, αλλά έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την βιοσυσσωρευση.

Τα μεταλλοϊόντα που χαρακτηρίζονται ως τοξικά, είναι δυνατό να επιφέρουν αρνητικές συνέπειες τους έμβιους οργανισμούς μέσω της μόλυνσης του πόσιμου νερού (π.χ. σωλήνες μολύβδου), από τις υψηλές περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις τους στον αέρα κοντά στις πηγές εκπομπής ή μέσω της εισαγωγής τους στην τροφική αλυσίδα (Chang, 1996). Η βιοσυσσωρευση είναι στην πραγματικότητα η αύξηση της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας και αναφέρεται ως αύξηση της συγκέντρωσης κάποιου τοξικού μεταλλοϊόντος σε έναν οργανισμό ή στο περιβάλλον με το πέρασ του χρόνου. Οι τοξικές ενώσεις συσσωρεύονται στον περιβάλλοντα χώρο, λαμβάνονται και αποθηκεύονται ή εκκρίνονται. Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να εισαχθούν στην παροχή του νερού από τα βιομηχανικά και καταναλωτικά απόβλητα ή ακόμα και από την όξινη βροχή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους στα ρεύματα, στις λίμνες, στους ποταμούς, και στα υπόγεια νερά. Τα πιο επικίνδυνα βαρέα μέταλλα είναι ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο (Pacyna et al., 2009). Οι μεταλλοτοξίνες αυτές καθώς και άλλα μέταλλα που μπορούν να δράσουν ως τοξικά, έχουν συνδεθεί με πολλές αρνητικές συνέπειες. Στους ανθρώπους, η έκθεση στο μόλυβδο για παράδειγμα μπορεί να οδηγήσει σε ευρύ φάσμα αρνητικών βιολογικών αποτελεσμάτων ανάλογα με το επίπεδο και τη διάρκεια της έκθεσής τους. Ο υδράργυρος είναι επίσης μια πολύ τοξική ουσία που δεν έχει καμία ακόμη γνωστή

λειτουργία στην ανθρώπινη βιοχημεία ή τη φυσιολογία και δεν εμφανίζεται στα βιολογικά συστήματα (Pourreza et al.,2009). Ο υδράργυρος είναι το μόνο υγρό μέταλλο και παρουσιάζει σύνθετες και ασυνήθιστες φυσικοχημικές ιδιότητες. Το κάδμιο είναι επίσης μια ιδιαίτερα επικίνδυνη μεταλλοτοξίνη για τα φυτά, τα ζώα αλλά και τους ανθρώπους. Αξίζει να αναφερθεί ότι το κάδμιο παρουσιάζει χημική ομοιότητα με τον ψευδάργυρο (Pourreza et al.,2009). Το κάδμιο κατά τη βιοσυσώρευσή του μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια στον ανθρώπινο οργανισμό. Η υψηλή έκθεση σε κάδμιο μπορεί να οδηγήσει επίσης σε πνευμονικές ασθένειες και έχει συνδεθεί άμεσα με το καρκίνο των πνευμόνων. Επιπλέον, η έκθεση των ανθρώπων και των ζώων σε κάδμιο, έχει συνδεθεί με ατέλειες των οστών, όπως η οστεομαλάκυνση και οστεοπόρωση. Η ασθένεια Itai-Itai (πόνος-πόνος) οφείλεται σε δηλητηρίαση από κάδμιο (Sun et al., 2009). Η μέση καθημερινή έκθεση καδμίου για τους ανθρώπους υπολογίζεται σε 0.15 μg από τον αέρα και 1 μg από το νερό. Άλλο τοξικό μέταλλο είναι το χρώμιο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στα κράματα και σε χρωστικές ουσίες (Dakiky et al., 2009). Ωστόσο, η μακροπρόθεσμη έκθεση σε χρώμιο, μπορεί να προκαλέσει ζημιά στα νεφρά και στο συκώτι, ενώ έχει συνδεθεί και με καρκινογένεση.

ΣΙΔΗΡΟΣ

Ο σίδηρος αποτελεί το έκτο πιο άφθονο στοιχείο στον πλανήτη. Ο σίδηρος συμβολίζεται ως Fe και έχει ατομικό αριθμό 26. Ανήκει στην όγδοη ομάδα και τέταρτη περίοδο του περιοδικού πίνακα. Στις χημικές ενώσεις, ο Fe εμφανίζεται σε ποικίλες οξειδωτικές καταστάσεις (Fe(II), Fe(III), Fe(IV), κ.ά.), αλλά οι πιο συνηθισμένες είναι οι Fe(II) και Fe(III). Η ηλεκτρονική διαμόρφωση του σιδήρου στη στοιχειακή κατάσταση είναι [Ar]3d⁶4s². Ο μεταλλικός σίδηρος είναι λαμπερός, έχει ασημένιο χρώμα, είναι μαλακός, και χαρακτηρίζεται ως σιδηρομαγνητικό στοιχείο. Οξειδώνεται εύκολα στον αέρα και στο νερό με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδίων, ενώ πολύ σπάνια βρίσκεται στην ατομική του μορφή.

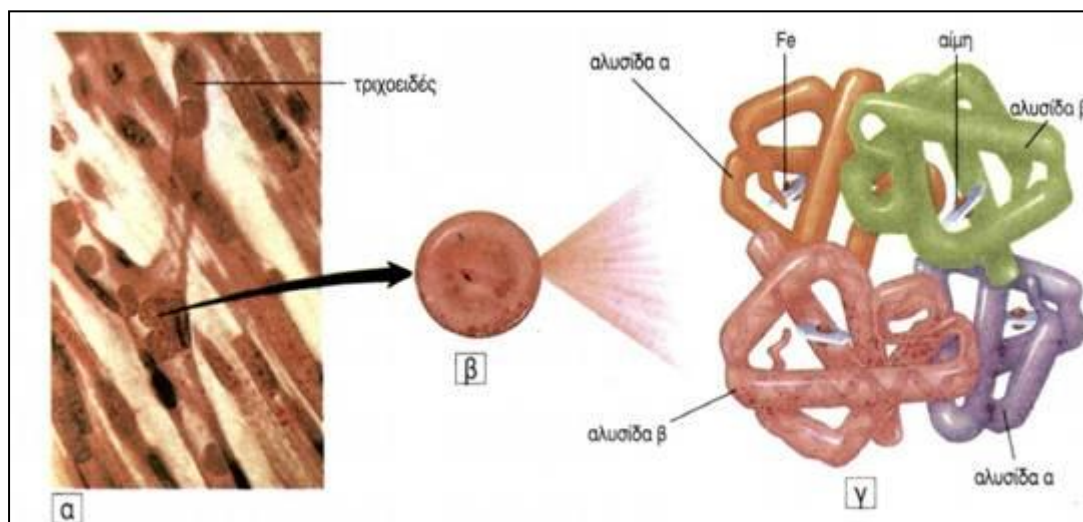
Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του σιδήρου

Χημικό σύμβολο	Fe
Ατομικός αριθμός	26
Ατομικό βάρος	55.85 g/mol
Χημική ομάδα	8η ομάδα
Πυκνότητα	7.87 g/cm ³ στους 20 0C
Σημείο τήξης	1538 °C
Σημείο βρασμού	2862 °C
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	(25 °C) 25.10 J· mol ⁻¹ ·K ⁻¹

Ο σίδηρος ανήκει στα μεταβατικά μέταλλα και έχει πάρα πολλές εφαρμογές στον τομέα των υλικών και τη βιομηχανία, αλλά και πολλές εφαρμογές στον τομέα της βιολογίας, της ιατρικής, της φαρμακευτικής και αλλού. Οι τόσες πολλές εφαρμογές είναι αποτέλεσμα των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του, που μελετώνται εδώ και πολλά χρόνια. Ο σίδηρος μπορεί να βρεθεί σε απλές ανόργανες ενώσεις (άλατα, οξείδια), αλλά και σε περίπλοκες οργανικές ενώσεις (πρωτεΐνες) παρουσιάζοντας μοναδικούς και αναντικατάστατους ρόλους.

Ο σίδηρος είναι απαραίτητο χημικό στοιχείο για όλους τους έμβιους οργανισμούς (βακτήρια, ζώα, φυτά, ανθρώπους) (Braun et al., 1998; Sigel, 1998; Mori, 1998; Jonew et al., 1996; Guerinot, 1994; Stojiljkovic & Hantke, 1992). Αποθηκεύεται στα κέντρα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών με βιοδιαθέσιμες μορφές και όχι σε ελεύθερη μορφή, καθώς έτσι θα λειτουργούσε καταλυτικά για τον σχηματισμό ελεύθερων δραστικών ριζών που μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτική καταστροφή και συνεπώς σε κάποια μορφή τοξικότητας (Springer et al., 1994; Gerber et al., 1992). Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, ο σίδηρος συνδέεται στην αίμη. Το μόριο αυτό περιλαμβάνει ένα χαρακτηριστικό ετεροκυκλικό οργανικό δακτύλιο που ονομάζεται πορφυρίνη. Η αίμη είναι σημαντικό συστατικό των κυτοχρωμάτων (πρωτεΐνες), τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, καθώς και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά οξυγόνου, δηλαδή της αιμογλοβίνης και της μυογλοβίνης.

Η αιμογλοβίνη είναι μεταλλοπρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια των σπονδυλωτών και είναι εύκολα αναγνωρίσιμη λόγω του χαρακτηριστικού κόκκινου χρώματος της (Yoteni & Laberge, 2008). Αλλαγή του χρώματός της παρατηρείται σε περιπτώσεις αναιμίας, υποξίας, κ.ά.. Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί περίπου το 97% του ξηρού βάρους των ερυθρών αιμοσφαιρίων, και περίπου το 35% του συνολικού ποσοστού συμπεριλαμβανομένου και του νερού. Η αιμογλοβίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες ή τα βράγχια στα υπόλοιπα μέρη του σώματος, όπως στους μυς, και απελευθερώνει το οξυγόνο στα μέρη αυτά για να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα. Τέλος, έχει ποικίλους άλλους ρόλους στη μεταφορά και στη μετατροπή του οξυγόνου που α) ποικίλλουν από είδος σε είδος, και β) μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικοί σε κάποια ασπόνδυλα.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της θέσης σύνδεσης του σιδήρου με την αίμη

Αξίζει να αναφερθεί ότι, η κατανομή του σιδήρου πρέπει να είναι ελεγχόμενη στα θηλαστικά, κυρίως γιατί ο σίδηρος συνδέεται με πιθανή βιοτοξικότητα. Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (glycoprotein) του πλάσματος στο αίμα. Αν και ο σίδηρος που δεσμεύεται από την τρανσφερίνη είναι λιγότερος από 0.1% (4 mg) του συνολικού σιδήρου, εντούτοις χαρακτηρίζεται ως η σημαντικότερη θέση σιδήρου. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος περίπου 80 kDa (περίπου 700 αμινοξέα) και στη δομή της περιέχονται δυο ενεργά κέντρα Fe(III). Αποτελείται από α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες (β sheets). Τα ιόντα σιδήρου είναι ενωμένα με δυο μόρια τυροσίνης, ένα μόριο ασπαρτικού οξέος, ένα μόριο ιστιδίνης και ένα ανθρακικό ανιόν. Σε όξινα περιβάλλοντα μειώνεται η δράση της τρανσφερίνης, ενώ

σε pH 7.4 υπάρχει η μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδήρου στην τρανσφερρίνη. Τέλος, η τρανσφερρίνη, σε αντίθεση με τη αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη, δεν περιέχει στο μόριο της το μόριο της αίμης. Πρόκειται, συνεπώς, για μια μη αιμική πρωτεΐνη δέσμευσης σιδήρου. Στο ανθρώπινο σώμα, ο σίδηρος συμμετέχει σε πολλές διεργασίες και ο ρόλος του χαρακτηρίζεται αναντικατάστατος. Γι' αυτό και η πιθανή ανεπάρκεια σιδήρου ή η πιθανή υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα για την ανθρώπινη φυσιολογία.

Η ανεπάρκεια σιδήρου (ή σιδηροπενία) είναι η πιο συνηθισμένη θρεπτική ανεπάρκεια που συναντάται στις σύγχρονες κοινωνίες. Η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να γίνει τόσο σοβαρή ώστε να α) παρεμποδίζονται λειτουργίες ζωτικής σημασίας και β) οδηγήσει σε νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η άμεση συνέπεια της ανεπάρκειας σιδήρου είναι η αναιμία ανεπάρκειας σιδήρου (Iron Deficiency Anemia, IDA) (Paesano et al., 2008). Οι ομάδες που είναι περισσότερο επιρρεπείς είναι τα παιδιά και οι γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση. Η ανεπάρκεια αναπτύσσεται όταν η απώλεια σιδήρου δεν αντισταθμίζεται αρκετά μέσω της διατροφής. Τροφές πλούσιες σε σίδηρο είναι το συκώτι, το σπανάκι, οι φακές, κ.ά.. Τις περισσότερες φορές, όμως, η διατροφή δεν είναι αρκετή για να λυθεί το πρόβλημα, οπότε οι ασθενείς λαμβάνουν σίδηρο (γλουταμικός σίδηρος) σε μορφή χαπιών $[Fe(C_6H_{11}O_7)_2]$. Η υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου στους ιστούς οδηγεί σε βιοτοξικότητα, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται ζωτικά όργανα, όπως το συκώτι, η καρδιά και το πάγκρεας. Η βιοτοξικότητα του σιδήρου είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού ελευθέρων ριζών (ROS) είτε με τη μορφή υπεροξειδίου (O_2^-) είτε με τη μορφή υδροξειδίου (OH^\cdot). Άρα, η υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα παρόμοια με την ανεπάρκεια. Η σιδηροφιλία (siderophilia) είναι μια κληρονομική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπερβολική απορρόφηση του σιδήρου άρα και μη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού που την εμφανίζει. Επίσης, ασθενείς που κάνουν συχνά μεταγγίσεις αίματος, κινδυνεύουν να παρουσιάσουν αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου με ανεπιθύμητες συνέπειες. Γι' αυτό το λόγο κρίνεται πολύ σημαντικό οι ασθενείς αυτοί να διατηρούν τα ποσοστά του σιδήρου ελεγχόμενα.

ΚΟΒΑΛΤΙΟ

Το κοβάλτιο είναι σιδηρομαγνητικό μέταλλο. Η λέξη κοβάλτιο προέρχεται από τη γερμανική λέξη *kobalt*, από το *kobald* ή *goblin*, που ερμηνεύεται ως κακό πνεύμα. Ο όρος αυτός αποδόθηκε από τους ανθρακωρύχους για τα μεταλλεύματα του κοβαλτίου, (Cotton et al., 1999) γιατί είχαν την εντύπωση ότι δεν είχε καμιά αξία ενώ αντίθετα κατανοούσαν ότι ήταν δηλητηριώδες, καθόσον μόλυνε τα άλλα ορυκτά εξαιτίας της περιεκτικότητας του σε αρσενικό και θείο (Dillard et al., 1983). Δεν απαντάται ελεύθερο στη φύση, αλλά ενώσεις του κοβαλτίου είναι συνήθεις υπό μορφή ορυκτών. Μικρές ποσότητες κοβαλτίου μπορούν να βρεθούν στις πέτρες, το χώμα, τα φυτά και τα ζώα. Στη φύση συχνά σχετίζεται με το νικέλιο ενώ και τα δύο αυτά είναι χαρακτηριστικά συστατικά του μετεωρικού σιδήρου. Το κοβάλτιο έχει μαγνητική διαπερατότητα περίπου στα δύο τρίτα της διαπερατότητας του σιδήρου, καθώς οι φυσικές του ιδιότητες είναι παρόμοιες με εκείνες του σιδήρου και του νικελίου. Το κοβάλτιο είναι χημικά ενεργό στοιχείο και απαντάται με ποικίλες μορφές αλάτων όπως νιτρικό, χλωρίδιο, οξικό κλπ. Συνήθως συναντάται ως μεταλλικό ιόν με φορτίο +2 και +3, μολονότι σπανιότερα συναντάται και με φορτίο +1.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κοβαλτίου

Χημικό σύμβολο	Co
Ατομικός αριθμός	27
Ατομικό βάρος	58.933195(5) g/mol
Χημική ομάδα	Μεταβατικό μέταλλο
Πυκνότητα	8.90 g·cm ⁻³
Σημείο τήξης	1768 K
Σημείο βρασμού	3200 K
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	(25 °C) 24.81 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹

Οι ενώσεις κοβαλτίου χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια κυρίως λόγω του χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που μπορούν να αποδώσουν σε γυάλινα σκεύη, σε κεραμικά και σε βερνίκια. Επιπλέον, οι ενώσεις του κοβαλτίου χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μελανιών, χρωμάτων και βερνικιών. Ακόμη, το κοβάλτιο

χρησιμοποιείται στην παρασκευή κραμάτων υψηλών θερμοκρασιών γνωστών ως υπεραγωγία κράματα (περιέχουν κοβάλτιο σε αναλογία 60 %). Το κοβάλτιο, που εμφανίζεται σε ποικίλες μορφές [CoCl_2 , $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$] έχει συσχετιστεί με ευεργετικές δράσεις στην υγεία των ζώων. Το έδαφος για να θεωρείται κατάλληλο για ζωική διατροφή πρέπει να περιέχει από 0.13 ως 0.30 ppm κοβάλτιο. Αυτός είναι και ο λόγος που αν δεν επαρκεί, τότε προστίθεται εξωγενώς στις ζωοτροφές και στα λιπάσματα. Το ισότοπο ^{60}Co έχει πολλαπλές χρήσεις ως πηγή εκπομπής γ-ακτινοβολίας (Bate & Leddicotte, 1961). Χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική και στη βιοϊατρική τεχνολογία, στις βιομηχανικές ακτινογραφίες για την ανίχνευση των δομικών ρωγμών στα μέταλλα, στην παστερίωση ή αποστείρωση τροφίμων καθώς και σε θεραπείες για διάφορες μορφές καρκίνου. Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό για τον άνθρωπο και μπορεί να προσληφθεί μέσω της τροφής κυρίως από το κόκκινο κρέας, τα στρείδια, τα μύδια, τα πουλερικά, το πλήρες γάλα καθώς και από διάφορα πράσινα λαχανικά και φρούτα (Hamilton, 1987). Το κοβάλτιο εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, του νερού ακόμη και της επαφής με το δέρμα.

Το κοβάλτιο σε όξινο κυρίως περιβάλλον, βρίσκεται στην ένυδρη ιοντική μορφή $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]_2^+$ (hexa-aqua $\text{Co}(\text{II})$). Το ένυδρο ιόν κοβαλτίου μπορεί έτσι να αλληλεπιδράσει με συστατικά του αίματος υψηλής μοριακής μάζας, δηλαδή πρωτεΐνες και μόρια χαμηλής μοριακής μάζας, όπως διάφορα οργανικά οξέα όπως μηλικό, κιτρικό, γαλακτικό, αμινοξέα κ.ά.

(Singel A & Singel H, 1995). Καθώς πραγματοποιούνται ποικίλες αντιδράσεις, αναπτύσσονται διαδοχικά δυαδικά και τριαδικά συστήματα, χαμηλής και υψηλής μοριακής μάζας, προς σχηματισμό υδατοδιαλυτών και βιοδιαθέσιμων μορφών του κοβαλτίου (Dickinson & Chien, 1973). Μια σημαντική βιολογική εφαρμογή του κοβαλτίου είναι η παρουσία του στη βιταμίνη B12 (Chandra & Brown, 2008). Η βιταμίνη B12 είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου, του νευρικού συστήματος και στο σχηματισμό του αίματος (Santander et al., 2006). Στην πραγματικότητα, ο όρος βιταμίνη B12 α) αναφέρεται σε μια κατηγορία ενώσεων με παρόμοια χημική δομή, και β) συνδέεται με τη χαρακτηριστική δράση των βιταμινών. Η βιταμίνη B12 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μεγαλοβλαστικής αναιμίας στις εγκύους, καθώς και επιταχύνει την παραγωγή ερυθροκυττάρων (Hamilton & Gopper, 1987). Τέτοιες ενώσεις του κοβαλτίου είναι η υδροξυκοβαλαμίνη και η κυανοκοβαλαμίνη.

Η υδροξυκοβαλαμίνη αποτελεί σήμερα το φάρμακο για τη θεραπεία της μεγαλοβλαστικής αναιμίας που παρουσιάζεται μετά από έλλειψη βιταμίνης B12 (Andrès, 2007). Σε αυτή την περίπτωση, η βιταμίνη B12 λόγω του ότι μπορεί να δεσμεύεται σε μεγάλο ποσοστό από τις πρωτεΐνες του πλάσματος, παραμένει περισσότερο χρόνο στο αίμα. Η κυανοκοβαλαμίνη από την άλλη, έχει σχετικά μικρότερο χρόνο δράσης. Σε κλινικό επίπεδο, όμως, είναι εξίσου αποτελεσματική με την υδροξυκοβαλαμίνη. Ενώ, η παρουσία κοβαλτίου για τον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται να είναι σημαντική και απαραίτητη, εντούτοις η υπερβολική συγκέντρωση κοβαλτίου στα βιολογικά υγρά (παρόμοια δηλαδή με άλλα μεταλλοϊόντα όπως Mn(II), Fe(III), Cu(II), κ.ά.) μπορεί να επιφέρει αντίθετες συνέπειες και να προκαλέσει προβλήματα όπως άσθμα και πνευμονία, ειδικότερα σε ανθρώπους που έρχονται συχνά σε επαφή με αυτό.

Τέλος, το ισότοπο ^{60}Co είναι ένα ραδιενεργό μέταλλο που χρησιμοποιείται συχνά στην ακτινοθεραπεία. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο λόγος της χρήσης του ισότοπου αυτού είναι η ικανότητά του να παράγει ακτίνες γ με ενέργειες των 1.17 MeV και 1.33 MeV. Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό και σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του μπορούν επιφέρουν τα αντίθετα αποτελέσματα (Beyersmann & Hartwig, 1992). Καθώς τα φυτά αναπτύσσονται σε ρυπασμένο έδαφος, είναι πολύ πιθανό να συσσωρεύονται πολλές και ανεπιθύμητες ουσίες, ή να γίνονται αντιδράσεις και να παράγονται ανεπιθύμητες ουσίες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το κοβάλτιο σε διάφορες μορφές, είναι δυνατό να συσσωρευτεί στα φυτά και ειδικά στα μέρη των φυτών που τρώγονται, όπως τα φρούτα και οι σπόροι. Στα εδάφη κοντά σε ορυχεία, είναι πολύ πιθανό να περιέχονται μεγάλες συγκεντρώσεις κοβαλτίου, με αποτέλεσμα η πρόσληψή του από ανθρώπους, φυτά και ζώα να μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην υγεία (Collery et al., 1998). Τα προβλήματα που παρουσιάζονται από τη μεγάλη συγκέντρωση κοβαλτίου είναι τα εξής: έμετος και ναυτία, προβλήματα όρασης, καρδιακά προβλήματα, βλάβη του θυρεοειδούς και αναπνευστικά προβλήματα.

Πέρα από την άμεση ή έμμεση πρόσληψη του κοβαλτίου από τις τροφές, αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία μπορούν να προκληθούν και από την ακτινοβολία των ραδιενεργών ισωτόπων κοβαλτίου. Η έκθεση στην ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει στειρότητα, τριχόπτωση, εμετό, αιμορραγία, διάρροια, κόμα, ακόμη και θάνατο.

Η σκόνη κοβαλτίου μπορεί επίσης να προκαλέσει άσθμα (ασθένεια με συμπτώματα που κυμαίνονται από βήχα, συντομία της αναπνοής και δύσπνοια που οφείλονται στη μειωμένη πνευμονική λειτουργία, κονδυλώδεις ινώσεις, μόνιμη ανικανότητα) και θάνατο (Helis et al., 1976). Η έκθεση στο κοβάλτιο μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους, δερματίτιδα και αναπνευστική υπερευαισθησία. Η θανάσιμη δόση του σε ποντίκια, δηλαδή η ποσότητα που λαμβάνεται από το στόμα και προκαλεί θάνατο στο 50% του πληθυσμού τους, είναι $LD50 = 6171 \text{ mg/kg}$.

ΧΡΩΜΙΟ

Το χρώμιο (Chromium) είναι χημικό στοιχείο με σύμβολο Cr και ατομικό αριθμό 24. Είναι αργυρόλευκο, σκληρό μέταλλο με υψηλό σημείο τήξης. Το όνομά του προέρχεται από την ελληνική λέξη «χρώμα», καθώς έχει πολλές έγχρωμες ενώσεις. Εξαιτίας του έντονου λαμπερού μεταλλικού του χρώματος χρησιμοποιείται στην βιομηχανία για την παρασκευή εντυπωσιακών μεταλλικών αντικειμένων. Ανήκει στην ομάδα της 1ης κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης και οι ενώσεις του είναι συνήθως τοξικές.

Πίνακας 3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χρωμίου

Χημικό σύμβολο	Cr
Ατομικός αριθμός	24
Χημική ομάδα	Στοιχείο μετάπτωσης
Πυκνότητα	$7.19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Χρώμα	Αργυρόλευκο
Σημείο τήξης	$1907 \text{ }^\circ\text{C}$
Σημείο βρασμού	$2671 \text{ }^\circ\text{C}$
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	$23.35 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	($20 \text{ }^\circ\text{C}$) $125 \text{ n}\Omega\cdot\text{m}$

Το χρώμιο έχει αξιοσημείωτες μαγνητικές ιδιότητες (Fawcett, 1988). Είναι το μόνο στερεό στοιχείο που μπορεί, όταν βρίσκεται στη φύση σε στοιχειακή μορφή και όχι σε ενώσεις, να μην έλκεται μαγνητικά σε θερμοκρασία δωματίου (ή χαμηλότερη). Ωστόσο, πάνω από τους $38 \text{ }^\circ\text{C}$ έρχεται σε παραμαγνητική κατάσταση. Η μεγαλύτερη

ποσότητα χρωμίου χρησιμοποιείται στην παραγωγή ανοξειδωτου χάλυβα. Τα χρωμικά σύμπλοκα συχνά χρησιμοποιούνται ως χρωστικές στη φωτογραφία. Ο χρωμικός μόλυβδος ($PbCrO_4$), γνωστός ως κίτρινο του χρωμίου (Chrome Yellow) είναι μια εξαιρετικής ποιότητας κίτρινη χρωστική που χρησιμοποιείται στο χρωματισμό του βινυλίου, του ελαστικού (rubber) και του χαρτιού, αλλά λόγω της μεγάλης τοξικότητάς του η χρήση του πλέον μειώνεται. Επίσης οι ενώσεις του Cr(VI) χρησιμοποιούνται σε βαφές υφασμάτων και δέρματος, χρώματα και μελάνια. Εκτεταμένη χρήση των αλάτων του Cr(VI) (κυρίως του χρωμικού νατρίου και αμμωνίου) γίνεται στη βυρσοδεψία για την κατεργασία δερμάτων (δέψη, leather tanning). Το χρώμιο συναντιέται επίσης στα οδοντοτεχνικά κράματα όπως είναι το CoCr και το NiCr. Το χρώμιο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής και της κατανάλωσης τροφής και ποτών που το περιέχουν. Το τρισθενές χρώμιο, Cr(III), θεωρείται απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον οργανισμό, αφού φαίνεται να συμμετέχει στον παράγοντα ανοχής της γλυκόζης (Glucose Tolerance Factor, GTF). Γενικά, ενδείκνυται η πρόσληψη 30 έως 50 μg Cr(III) ημερησίως, ενώ για ποσότητες μέχρι 200 μg δεν έχει αναφερθεί ότι προκαλούν προβλήματα. Το Cr(III) δεν είναι τόσο επικίνδυνο γιατί οι ενώσεις του λόγω του μεγάλου όγκου τους και της δυσδιαλυτότητας τους διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη αργά ή και καθόλου. Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) έχει χαρακτηριστεί ως αποδεδειγμένο καρκινογόνο. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα ότι ενώσεις του Cr(VI) καταστρέφουν το DNA και προκαλούν μεταλλάξεις. Επιδημιολογικές μελέτες σε εργάτες παραγωγής χρωμικών και μεταλλικών επιστρώσεων χρωμίου έδειξαν ότι εισπνοή σκόνης που περιέχει Cr(VI) προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα και της ρινικής κοιλότητας (sinonasal cavity). Επίσης, εισπνοή σωματιδίων που περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI) μπορεί να προκαλέσει έλκος, αιμορραγία, κνησμό και φτέρνισμα. Η κατάποση υψηλών ποσοτήτων Cr(VI) μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των νεφρών και του ήπατος, έλκος στομάχου και γαστρεντερικό ερεθισμό, ακόμα και θάνατο. Τέλος, ακόμη και η δερματική έκθεση σε ενώσεις του Cr(VI) προκαλεί δερματικά έλκη και δριμείες αλλεργικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα από ενδύματα και υποδήματα από δέρμα που έχει κατεργαστεί με Cr(VI) (Θωμαΐδης, Βαλαβανίδης & Ευσταθίου 2007).

Εξασθενές χρώμιο

Το Cr(VI) έχει πολλές βιομηχανικές χρήσεις (INCHEM, 1988). Οι μεταλλοβιομηχανίες χρησιμοποιούν πολλές ενώσεις του Cr(VI) ως επιστρώσεις προστασίας μεταλλικών επιφανειών από τη διάβρωση (anti-corrosion and conversion coatings) (Xia et al., 2000; Xia et al., 1998).

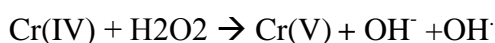
Πολλά χρωμικά και διχρωμικά άλατα χρησιμοποιούνται ως παρεμποδιστές διάβρωσης (corrosion inhibitors), αλλά η υψηλή τους τοξικότητα έχει οδηγήσει τη βιομηχανία στην σταδιακή αντικατάστασή τους (Kendig & Buchheit, 2003).

Η διεργασία επίστρωσης με χρωμικά (chromate conversion coating, CCC) εφαρμόζεται για την παθητικοποίηση (passivation) μεταλλικών επιφανειών αλουμινίου, ψευδαργύρου, καδμίου, χαλκού, άργυρου, μαγνησίου, κασσιτέρου και κραμάτων τους. Τα κυριότερα χρωμικά άλατα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διεργασία είναι το χρωμικό ασβέστιο, το χρωμικό στρόντιο και ο χρωμικός ψευδάργυρος. Για την ίδια διεργασία χρησιμοποιείται και το τριοξείδιο του χρωμίου

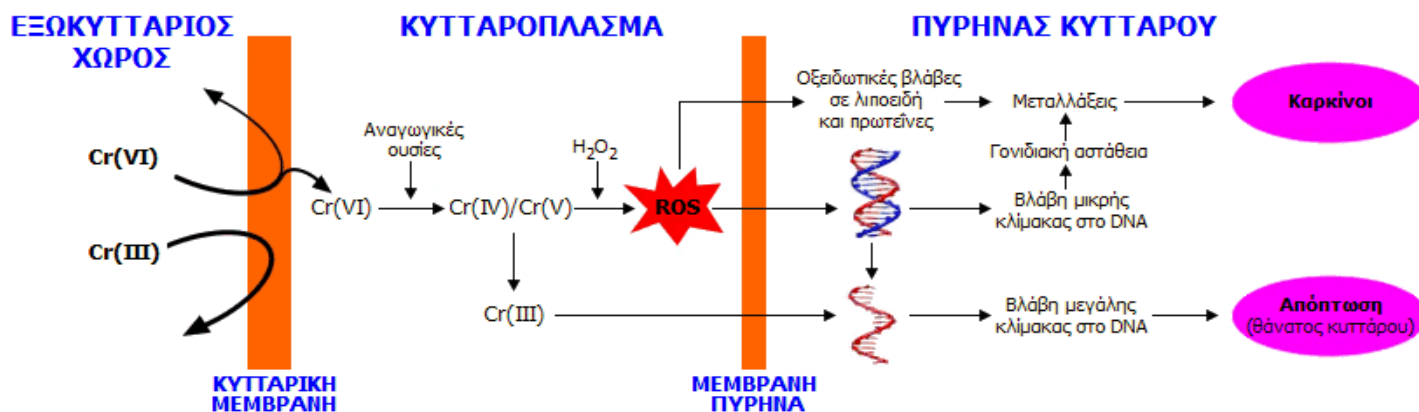
Το Cr(VI), ως χρωμικά ιόντα, λόγω δομικής ομοιότητας με τα θειικά και τα φωσφορικά ιόντα, εισέρχεται σαν "Δούρειος Ίππος" στα κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας το φυσιολογικό σύστημα διακίνησης αυτών των ιόντων. Στο εσωτερικό των κυττάρων αντιδρά με τις αναγωγικές ουσίες που θα βρει εκεί και ανάγεται σε Cr(III) το οποίο φαίνεται ότι είναι και ο "πραγματικός κίνδυνος (Environmental Health Perspectives, 2000). Αντίθετα, οι οκταεδρικής σύνταξης ενώσεις του Cr(III), λόγω του όγκου και της δυσδιαλυτότητας πολλών από αυτές, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη αργά ή και καθόλου (Fan & Harding-Barlow, 1987; Wetterhahn & Hamilton, 1989). Για τον λόγο αυτό το Cr(VI) είναι η επικίνδυνη μορφή του χρωμίου και όχι το Cr(III). Υπάρχουν πολλές δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τους μηχανισμούς δράσης του Cr(VI), όταν εισέρχεται στο κύτταρο και του Cr(III), που παράγεται μέσα στο κύτταρο με αναγωγή του Cr(VI) (Bringewater et al., 1994; Xu et al., 1996; de Flora et al., 1997; Voitkun et al., 1998).

Η πορεία αναγωγής Cr(VI) σε Cr(III) εντός του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει καταστροφή του DNA, όπως οξειδωτικές βλάβες, θραύση των κλώνων του, σχηματισμό ενώσεων προσθήκης Cr(III)-DNA, διακλωνικές συνδέσεις και συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA.

Έρευνες έδειξαν ότι με την είσοδο του Cr(VI) στο κύτταρο, αυτό ανάγεται από το πλήθος των αναγωγικών ουσιών και ενζύμων (όπως η γλουταθειόνη) κατά στάδια σε χαμηλότερο επίπεδο σθένους. Τα ενδιάμεσα προϊόντα αναγωγής του χρωμίου με το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), ενός φυσικού συστατικού του κυτταροπλάσματος (σε πολύ μικρές βέβαια συγκεντρώσεις), παράγουν δραστικές οξυγονούχες ρίζες (ιδιαίτερα τη ρίζα υδροξυλίου, OH·), (ROS). Έρευνες έδειξαν ότι το Cr(V), Cr(IV) και Cr(III) με το H₂O₂ μπορούν να δημιουργήσουν τις ρίζες OH· με αντιδράσεις Fenton. όπως:



Οι ρίζες OH· είναι σε θέση να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα παρέχουν την οξειδωμένη μορφή της γουανοσίνης, την 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) (Molyneux & Davies, 1995; Shi et al., 1994; Tsou et al., 1996; Qi et al., 200; Wang et al., 2006; Bagchi et al., 2002).



Εικόνα 9: Συνοπτικός πιθανός μηχανισμός δράσης βιοχημικής δράσης του Cr(VI): Το Cr(VI) μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη σε αντίθεση με το Cr(III), του οποίου η ισχυρή εφυδάτωση δεν επιτρέπει τη διέλευση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στο κυτταρόπλασμα, διάφορες αναγωγικές οργανικές ουσίες προκαλούν τη σταδιακή αναγωγή του Cr(VI) προς Cr(III). Οι ενδιάμεσες οξειδωτικές καταστάσεις Cr(V) και Cr(IV) αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι προϊόν άλλων βιοχημικών διεργασιών δημιουργώντας δραστικές οξυγονούχες ουσίες, ROS, (κυρίως ρίζες OH·) οι οποίες επιφέρουν οξειδωτικές βλάβες σε λιποειδή και πρωτεΐνες και βλάβες μικρής κλίμακας στο DNA, οι οποίες οδηγούν σε γονιδιακή αστάθεια, μεταλλάξεις και τελικά στον καρκίνο. Ανάλογη δράση έχει το τελικό προϊόν αναγωγής, το Cr(III), το οποίο μπορεί να συνδεθεί με το DNA προκαλώντας διάνοιξη και θραύση των κλώνων του.

ΑΡΓΙΛΙΟ

Το αργίλιο είναι χημικό στοιχείο με σύμβολο Al και ατομικό αριθμό 13. Το αργίλιο αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μέταλλα στην φύση. Το στοιχείο αυτό δεν απαντάται ελεύθερο αλλά βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με κάποιο υποκαταστάτη. Το αργίλιο έχει χρώμα αργυρόλευκο και θεωρείται ελαφρύ μέταλλο. Είναι περίπου τρεις φορές ελαφρύτερο από τον σίδηρο και είναι κακός αγωγός θερμότητας και ηλεκτρισμού. Το αργίλιο έχει την ιδιότητα να σχηματίζει οξειδία του αργιλίου εάν θερμανθεί μαζί με κάποιο οξείδιο άλλου μετάλλου και για τον λόγο αυτό θεωρείται άριστο αναγωγικό μέσο. Επιπλέον, το αργίλιο χαρακτηρίζεται ως επαμφοτερίζον στοιχείο καθώς έχει την ικανότητα να αντιδρά με πολλά αμέταλλα όπως είναι το υδροχλωρικό οξύ αλλά και με ισχυρές βάσεις. Ιδιαίτερα χρήσιμη ένωση του αργιλίου είναι η κοινή στυπτηρία η οποία χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες βαφής, βυρσοδεψίας και χαρτοποιίας ενώ ακόμη το αργίλιο χρησιμοποιείται και ως αιμοστατικό. Την δεκαετία του 1980, η ευρωπαϊκή κοινοτική οδηγία (European Community Directive) και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, (The World Health Organization, WHO) καθόρισαν τα 200μg/l ως το ανώτατο αποδεκτό όριο συγκέντρωσης του Al(III) στο πόσιμο νερό. Ωστόσο, η αναγνώριση του αργιλίου ως νευροτοξικού παράγοντα έγινε το 1988 και προστέθηκε στην λίστα υποψηφίων παραγόντων μόλυνσης από την υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των ΗΠΑ.

Το αργίλιο εμφανίζει μια πολύπλοκη χημεία σε υδατικά διαλύματα και η διαλυτότητα του αργιλίου είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενη από το pH. Σε διαλύματα με pH μικρότερο από 5,5 τα ελεύθερα ιόντα του Al(III) με οκταεδρική μορφή του $[Al(H_2O)_6]^{+3}$ εμφανίζεται ως η κυρίαρχη μορφή. Σε pH 7.4 συμπλοκοποιητικών μορίων το σύμπλοκο ιόν $[Al(OH)_4]^{-}$ είναι η κυρίαρχη μορφή του διαλυτού μονοπυρηνικού Al (Heinemann et al., 2000; Dupont, 2003). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν το είδος και η ποσότητα των υποκαταστατών που βρίσκονται στο ίδιο διάλυμα με τους οποίους το Al(III) μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα. Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι ένδο- και έξω-κυτταρικές συγκεντρώσεις των φωσφορικών έχουν βρεθεί από 2 έως 10 mM, συγκεντρώσεις οι οποίες σε συνδυασμό με το Al(III) σχηματίζουν το αδιάλυτο άλας $AlPO_4 \cdot 2H_2O$ που αντιστοιχεί στον ορυκτό βαρισκίτη. Έχει υπολογιστεί ότι μόνο το ελεύθερο Al(III) μπορεί να υπάρχει σε τέτοιου είδους διαλύματα, αλλά με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Matsuda, 2007). Πρέπει να αναφερθεί ότι αυτή η ισχυρή συγγένεια του αργιλίου με τα φωσφορικά άλατα εξηγεί εν μέρει την υψηλή

συγγένεια του αργιλίου με τον πυρήνα του κυττάρου όπου η συγκέντρωση των φωσφορικών φτάνει τα 60mM.

Δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένο ποιες είναι εκείνες οι ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Θεωρείται ότι τα ιδιαίτερα δραστικά ιόντα του Al(III) είναι υπεύθυνα για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου καθώς τα ιζήματα δεν εμφανίζουν καμία ουσιαστικά βιοδιαθεσιμότητα. Σε βιολογικά συστήματα, το ποσό των ελεύθερων ιόντων Al(III) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό των δεσμευμένων ιόντων σε σύμπλοκα με υποκαταστάτες. Όσον αφορά στην τοξικότητα, ο σχηματισμός συμπλόκων καθίσταται απαραίτητος καθώς η συμπλοκοποίηση είναι αυτή που προωθεί ή μειώνει αντίστοιχα την βιοδιαθεσιμότητα των ιόντων Al(III) και καθορίζει επίσης το σημείο σχηματισμού του συμπλόκου. Έχει υπολογιστεί ότι το 90% των ειδών του Al(III) στο εγκεφαλικό εξωκυττάριο υγρό είναι το σύμπλοκο Al-citrate. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το αργίλιο που παραμένει για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 24 ώρες ενσωματώνεται σε μία ομάδα ή σε περιοχή με αργίλιο στον ιστό όπου οι ρυθμοί εισροής-εκροής είναι πολύ χαμηλοί (Eggers, 2007). Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την μεταφορά του Fe(III) ωστόσο, μπορεί επίσης μεταφέρει και άλλα μεταλλικά ιόντα, συμπεριλαμβανομένου και του Al(III). Η τρανσφερίνη είναι ο βασικός μεταφορέας του αργιλίου στο πλάσμα. Κάθε μόριο της τρανσφερίνης διαθέτει δύο περιοχές δέσμευσης μεταλλοϊόντων με πάνω από το 30% να μην καλύπτεται από τον σίδηρο οπότε το αργίλιο δεν χρειάζεται να ανταγωνίζεται με τον σίδηρο για την περιοχής σύνδεσης. Η τρανσφερίνη είναι παρούσα στον εγκέφαλο και το αίμα. Έχει δειχθεί ότι η πρόσληψη του αργιλίου στον εγκέφαλο επιτυγχάνεται μέσω του τρανσφερινικού υποδοχέα με ενδοκύτωση (Brouwers et al., 2008).

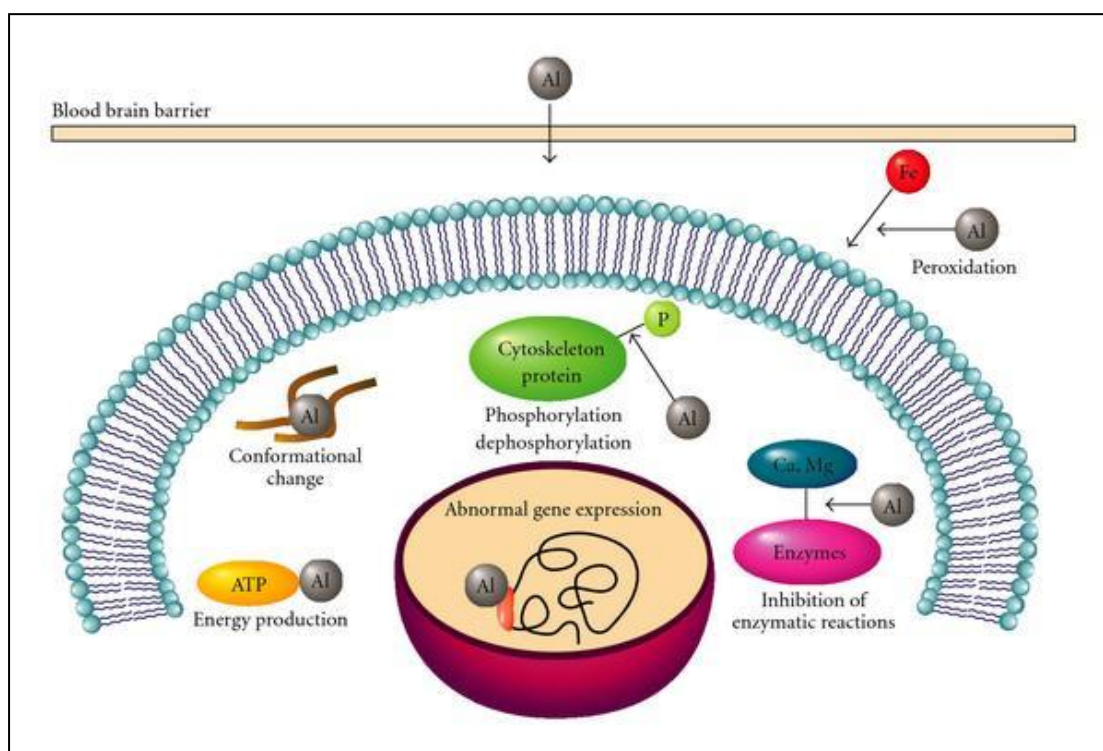
Το αργίλιο δεν μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδωαναγωγής λόγω του σταθερού αριθμού οξείδωσης (+3) που διαθέτει. Επιπλέον, τα ιόντα του Al(III) παρουσιάζουν πολύ αργό ρυθμό αντίδρασης και συνήθως καταβυθίζονται με οξείδια σε pH 7. Ενδέχεται αυτός να είναι και ο πιθανός λόγος για τον οποίο στην εξέλιξη δεν βρέθηκε χρήση για το μέταλλο αυτό σε βιολογικά συστήματα. Παρά το γεγονός ότι το αργίλιο δεν είναι ουσιώδες στοιχείο, είναι παρόν σε μικρές ποσότητες σε όλα σχεδόν τα μέρη του οργανισμού (Lott & Head, 2005). Στον άνθρωπο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συνολική ποσότητα του αργιλίου είναι 35-40 mg, υπάρχει

σε ποικίλες μορφές και δεν αυξάνεται με την ηλικία παρά μόνο στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Οι περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται κύρια κατά την παθολογία της νόσου Alzheimer είναι παρεγκεφαλίδα και ο ιππόκαμπος. Στα τελικά στάδια της νόσου η εκφύλιση των κυττάρων επεκτείνεται και όλα σχεδόν τα τμήματα του εγκεφάλου.

Η καθημερινή έκθεση του ανθρώπου στο αργίλιο εκτιμάται ότι είναι 5-10 mg. Κατά μέσο όρο το πόσιμο νερό περιέχει 70mg/ml, αν και μπορεί να φτάσει και ως 4 mg/ml σε ορισμένες περιοχές (Urakami et al., 2001). Το δέρμα, οι πνεύμονες και ο γαστρεντερικός σωλήνας παρεμποδίζουν την απορρόφηση του αργιλίου από το σώμα. Μόλις το 0,1-0,4% της δόσης του μετάλλου απορροφάται κατά την κατάποση και η μεγαλύτερη ποσότητα απεκκρίνεται σχεδόν άμεσα με τα ούρα (Candore et al., 2006). Το αργίλιο δεν κατανέμεται εξίσου στους διάφορους ιστούς. Το υψηλότερο ποσοστό απαντάται στους πνεύμονες κυρίως λόγω απόθεσης των σωματιδίων που δεσμεύονται από τον βλεννογόνο (Barranco-Quintana, 2005). Μόλις το 1% του καθαρού βάρους του αργιλίου βρίσκεται στον εγκέφαλο και η συγκεκριμένη ποσότητα είναι πολύ μικρή σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς του σώματος (Su et al., 2008). Μετρήσεις σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών με την νόσο Alzheimer έδειξαν ότι η περιεκτικότητα του αργιλίου στον εγκεφαλικό ιστό είναι 970μM σε αντίθεση με τα 25μM που υπάρχουν σε φυσιολογικές συνθήκες (Nunomura et al., 2007). Το συνολικό καθαρό βάρος του αργιλίου και η συγκέντρωσή του στους διάφορους ιστούς δεν έχουν καμία ιδιαίτερη σημασία για την τοξικότητά του καθώς οι διάφοροι τύποι κυττάρων παρουσιάζουν πολύ διαφορετική ευαισθησία στην συγκεκριμένη μεταλλοτοξίνη. Τα εγκεφαλικά κύτταρα φαίνεται πως είναι τα πιο ευαίσθητα (Sayre et al., 2008). Οι νευροτοξικές και νευροεκφυλιστικές ιδιότητες του αργιλίου είναι γνωστές (Bezprozvanny & Mattson, 2008). Ωστόσο, οι πιθανές αρνητικές επιδράσεις της περιβαλλοντικής έκθεσης σε αργίλιο κατά την διάρκεια ζωής του γενικού πληθυσμού δεν έχουν τεκμηριωθεί ακόμα.

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ του αργιλίου και της νόσου Alzheimer σε περιοχές όπου υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις αργιλίου στο πόσιμο νερό (Bojarski et al., 2008). Επιπλέον, σημαντικά αυξημένα επίπεδα αργιλίου παρατηρούνται στους ιστούς, το αίμα και τον εγκέφαλο μετά από ορισμένες θεραπείες όπως είναι η αιμοκάθαρση ή η θεραπεία αντιόξινων και ενδέχεται να προκαλέσουν το Σύνδρομο Εγκεφαλοπάθειας ή δηλητηριάσεις από

αργίλιο (Brzyska & Elbaum, 2003). Η σκλήρυνση κατά πλάκας και η νόσος του Parkinson έχουν επίσης περιγραφεί σε άτομα που ζουν σε περιοχές όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αργιλίου στο πόσιμο νερό (O'Neill et al., 2001). Είναι λοιπόν σαφές ότι το αργίλιο έχει νευροτοξικές ιδιότητες στον άνθρωπο οι οποίες σχετίζονται με τον σχηματισμό νευροϊνδιακές μεταβολές οι οποίες με την σειρά τους οδηγούν σε νευροεκφύλιση των κυττάρων. Τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα της σκλήρυνσης κατά πλάκας και της νόσου Parkinson είναι πανομοιότυπα από δομικής, ιστολογικής και βιοχημικής άποψης με τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα της νόσου Alzheimer (Caban-Holt et al., 2005; Platt, 2006; Emard et al., 1995; Wiley, 2001; Bird, 2008). Ωστόσο, ο σχηματισμός της β-αμυλοειδούς πλάκας είναι παρόν μόνο στην νόσο Alzheimer (Xia et al., 1997).



Εικόνα 10: Πιθανές επιδράσεις του αργιλίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

ΔΗΜΗΤΡΙΟ

Το δημήτριο είναι εξίσου κοινό στη φύση όσο ο χαλκός, με αποτέλεσμα να είναι μια από τις πιο άφθονες σπάνιες γαίες. Το χημικό στοιχείο δημήτριο είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 58 και ατομικό βάρος 140,12 . Έχει θερμοκρασία τήξης 795 C° και θερμοκρασία βρασμού 3257 C°. Το χημικό σύμβολο του είναι Ce. Το Δημήτριο ανήκει στις σπάνιες γαίες ή «λανθανίδες» και στον περιοδικό πίνακα κατατάσσεται στη πρώτη ομάδα αυτών.

Συχνά μετατρέπεται σε οξείδιο του δημητρίου, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ικανότητας του να στυλβώνει το γυαλί και στους ημιαγωγούς. Το οξείδιο του δημητρίου (CeO₂) είναι επίσης απαραίτητο στους καταλυτικούς μετατροπείς καυσαερίων, όπου βοηθά στη μετατροπή των μορίων της αιθαλομίχλης σε διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και στα τεράστια φωτιστικά τόξου άνθρακα που χρησιμοποιούνται στα κινηματογραφικά πλάτο. Οξείδια του δημητρίου έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικά μέσα σε in vitro μοντέλα της νόσου Alzheimer. Τα οξείδια του δημητρίου δεν δρουν άμεσα ως αντιοξειδωτικά μόρια ωστόσο έμμεσα επιδρούν σε κυτταρικούς μηχανισμούς που αφορούν στον κυτταρικό θάνατο και την προστασία από το οξειδωτικό stress (D'Angelo et al., 2009).

ΧΑΛΚΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Ο χαλκός είναι χημικό στοιχείο που ανήκει στα μέταλλα και ειδικότερα στα στοιχεία μετάπτωσης. Ο ατομικός αριθμός του χαλκού είναι 29 και το ατομικό του βάρος είναι 63,546. Ο χαλκός συμβολίζεται με Cu από την λατινική λέξη και ανήκει στην ομάδα της 1^{ης} κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης του περιοδικού πίνακα. Ως μέταλλο έχει χαρακτηριστικό χρώμα – ερυθρό του χαλκού - και χαρακτηριστική μεταλλική λάμψη. Επιπλέον, ο χαλκός είναι μαλακός, δύστηκτος, ιδιαίτερα ελατός και όλκιμος καθώς και καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και της θερμότητας ενώ επίσης δεν εμφανίζει μαγνητικές ιδιότητες.

Ο χαλκός εμφανίζει δύο αριθμούς οξείδωσης, +1 και +2. Ως μέταλλο δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό και για τον λόγο αυτό δεν αντιδρά εύκολα με άλλα στοιχεία και

σπάνια χρησιμοποιείται ως αναγωγικό. Γενικά, αντιδρά με το οξυγόνο και το θείο ενώ δεν προσβάλλεται από αραιά οξέα και πυκνό θειικό οξύ, ωστόσο προσβάλλεται από το νιτρικό οξύ (HNO_3).

Στους έμβιους οργανισμούς, ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά. Απαντάται σε μεγάλο αριθμό ενζύμων όπως είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C και η υπεροξειδική δισμουτάση. Έχει παρατηρηθεί ότι στα ανώτερα ζώα η παρουσία του χαλκού διευκολύνει την απορρόφηση του σιδήρου. Στον ανθρώπινο οργανισμό, ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο. Στους ζωικούς οργανισμούς, ο χαλκός μεταπίπτει μεταξύ των μορφών του μονοσθενούς (Cu^{+1}) και δισθενούς χαλκού (Cu^{+2}) αντίστοιχα. Εξαιτίας της ευκολίας του να παίρνει και να δίνει ηλεκτρόνια, μετέχει σε αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής καθώς και σε αντιδράσεις δέσμευσης ελεύθερων ριζών.

Ο χαλκός χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία (ηλεκτρικά και ηλεκτρονικά είδη, αγωγοί, πηνία, γεννήτριες κ.α.), τη χημεία (καταλύτες), σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις καθώς αποτελεί βιοστατικό στοιχείο παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνειά του, ενώ ακόμα χρησιμοποιείται ευρέως σε κράματα (ορείχαλκος, μπρούντζος) και δεν αλλοιώνεται από οργανικούς διαλύτες.

Η μετατροπή του στοιχειακού χαλκού στο νερό είναι περίπλοκη και επηρεάζεται από το pH, την διαλυμένη σε αυτό ποσότητα οξυγόνου καθώς και την παρουσία οξυγόνου, οξειδωτικών παραγόντων, χηλικοποιητικών μορίων και ιόντων. Ο χαλκός παρουσιάζει επιφανειακή οξείδωση και μπορεί να μετασχηματιστεί σε οξείδιο (CuO) ή σε υδροξείδιο [$\text{Cu}(\text{OH})_2$] του χαλκού. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο μονοσθενής χαλκός (Cu^{+1}) μετατρέπεται σε δισθενή (Cu^{+2}). Τα σύμπλοκα του χαλκού σε υδατικά διαλύματα με αμμώνιο ή χλώριο είναι ιδιαίτερα σταθερά. Στο καθαρό νερό ο δισθενής χαλκός (Cu^{+2}) δημιουργεί ενώσεις με ανθρακικά ανιόντα (CO_3)⁻² ή με υδροξύλια (OH)⁻. Σε όξινο νερό ($\text{pH} \leq 6$) ο χαλκός απαντάται ως δισθενής, σε τιμές $6 \leq \text{pH} \leq 9,3$ απαντάται με την μορφή ανθρακικού χαλκού (CuCO_3) ενώ σε τιμές $9,3 \leq \text{pH} \leq 10,7$ υπερσχύουν τα ανιόντα [$\text{Cu}(\text{CO}_3)_2$]⁻¹ (Karlin & Zubieta, 1983).

Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο συστατικό πολλών ενζύμων του ανθρώπινου οργανισμού. Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστά ως χαλκοένζυμα (cuproenzymes). Η

λειτουργία των ενζύμων αυτών εξαρτάται από τον χαλκό. Μερικά από τα ένζυμα αυτά καθώς και οι λειτουργίες τους αναφέρονται παρακάτω.

- Η οξειδάση c διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή της κυτταρικής ενέργειας. Ο καταλυτικός ρόλος της οξειδάσης έγκειται στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (O_2) σε H_2O παράγοντας έτσι ηλεκτρική τάση απαραίτητη για την αποθήκευση του ATP από τα μιτοχόνδρια.
- Η λυσική οξειδάση απαιτείται για την διασύνδεση του κολλαγόνου και της ελαστίνης, συστατικά απαραίτητα για τον σχηματισμό του ισχυρού συνδετικού ιστού. η λυσική οξειδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του συνδετικού ιστού στην καρδιά καθώς και στα αιμοσφαίρια του αίματος.
- Οι σιδηροοξειδάσες I και II έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τον σίδηρο από Fe^{+2} σε Fe^{+3} , την μορφή δηλαδή εκείνη του σιδήρου η οποία μπορεί να συνδεθεί στην τρασφερίνη για την μεταφορά του στην περιοχή σχηματισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος.
- Πολλά ένζυμα του χαλκού καταλύουν μια ποικιλία ουσιαστικών αντιδράσεων προκειμένου να διατηρηθεί η κανονική και φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος.
- Η ντοπαμίνη – β μονοοξυγενάση καταλύει την μετατροπή της ντοπαμίνης σε νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) η οποία έχει ρόλο νευροδιαβιβαστή.
- Η μονοαμινική οξειδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό διαφόρων νευροδιαβιβαστών (νορεπινεφρίνη, επινεφρίνη, ντοπαμίνη).
- Η τυροσινάση απαιτείται για τον σχηματισμό της χρωστικής ουσίας μελανίνης. Η μελανίνη σχηματίζεται στα μελανοκύτταρα και είναι υπεύθυνη για το χρώμα των τριχών του δέρματος και των ματιών.
- Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό καταλύοντας την μετατροπή των υπεροξειδίων των ριζών (ελεύθερες ρίζες, ROS) σε υπεροξειδικό υδρογόνο το οποίο με την σειρά του μπορεί να αναχθεί σε νερό από άλλα ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Υπάρχουν δύο

μορφές της πρωτεΐνης αυτής, η SOD χαλκού/ψευδαργύρου η οποία βρίσκεται στα περισσότερα κύτταρα του σώματος και η εξωκυττάρια SOD η οποία περιέχει χαλκό και απαντάται κυρίως στους πνεύμονες (Gonzalez-Vilchez & Vilaplana,2005; Tisato et al., 2010).

Ο χαλκός που περιέχεται στο πρωτεολυτικό ένζυμο του ορού λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό του ορού του αίματος απομακρύνοντας ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, ο χαλκός ρυθμίζει την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων με αποτέλεσμα τα κυτταρικά επίπεδα του χαλκού να έχουν άμεση επίπτωση στη σύνθεση των πρωτεϊνών με την ενίσχυση ή την καταστολή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η αύξηση της πρόσληψης ψευδαργύρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια χαλκού στον οργανισμό. Τα υψηλά επίπεδα ψευδαργύρου οδηγούν στη σύνθεση της μεταλλοθειονίνης η οποία σχετίζεται με την δέσμευση ορισμένων μετάλλων μεταξύ των οποίων και του χαλκού και παράλληλα αποτρέπει την απορρόφησή τους από τον εντερικό ιστό. Αντίστροφα, η υψηλή πρόσληψη χαλκού δεν έχει δειχθεί να έχει επιπτώσεις στα επίπεδα του ψευδαργύρου.

Πίνακας 4: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χαλκού

Χημικό σύμβολο	Cu
Ατομικός αριθμός	29
Μοριακό βάρος	63.546
Χημική ομάδα	Στοιχείο μετάπτωσης
Πυκνότητα	8,96 g*cm ³
Χρώμα	Ερυθρό
Σημείο τήξης	1084,62 °C
Σημείο βρασμού	2562 °C
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	24.440 Jmol ⁻¹ K ⁻¹
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	20 °C) 16.78 nΩ *m
Θερμική αγωγιμότητα	401 W*m ⁻¹ *K ⁻¹

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Η πλειοψηφία των ενώσεων του χαλκού αντιμετωπίζονται ως τοξικές. Έχει δειχθεί ότι στο πόσιμο νερό το προτεινόμενο ασφαλές επίπεδο χαλκού κυμαίνεται από 1,5 έως 2 mg/ml ενώ το ανώτερο αποδεκτό όριο πρόσληψης σε ενήλικα οργανισμό αντιστοιχεί σε 10 mg/ml ημερησίως. Για τον άνθρωπο η κύρια πηγή πρόσληψης του χαλκού είναι η τροφή και το πόσιμο νερό. Η διαιτητική πρόσληψη του χαλκού για τους ενήλικες κυμαίνεται από 1–3mg Cu/24h. Η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής μπορεί να αυξήσει την πρόσληψη του χαλκού κατά 2 mg επιπλέον. Το πόσιμο νερό συμβάλλει στην πρόσληψη χαλκού 0,1–1mg Cu/24h. Έτσι, η ημερησία πρόσληψη χαλκού για ενήλικες υπολογίζεται από 1-5mg/24h. Η απορρόφηση του χαλκού πραγματοποιείται κυρίως από το στομάχι και το λεπτό έντερο και εξαρτάται από την ποσότητα που προσλαμβάνεται. Έτσι σε λήψη 7,5mg Cu απορροφάται το 12% ενώ σε λήψη 0,8mg Cu απορροφάται το 56%. Η απορρόφησή του μπορεί να φτάσει και το 71% αν η λήψη του είναι μεταξύ 0,96–1,2mg/24h. Το πόσιμο νερό επιτρέπεται να έχει χαλκό, ενώ η περιεκτικότητα του χαλκού στα συντηρημένα τρόφιμα είναι 50-100mg Cu/kg. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (RDA) για ενήλικες και εφήβους υπολογίζεται στα 1,5–3mg Cu/24h. Για τα παιδιά κυμαίνεται μεταξύ 0,7–2mg Cu/24h. Για τα νεογέννητα μέχρι 6 μηνών η πρόσληψη είναι 0,4–0,6mg Cu/24h και από 6 – 12 μηνών 0,6 – 0,7mg Cu/24h. Το RDA της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το γενικό πληθυσμό υπολογίζεται στα 1.15mg Cu/24h.

Η ανεπάρκεια του χαλκού είναι σχετικά σπάνια. Ένα από τα πιο κοινά κλινικά σημάδια της ανεπάρκειας του χαλκού είναι η μικροκυτταρική αναιμία. Η ανεπάρκεια χαλκού μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλά μη φυσιολογικά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων (φαγοκυτταρική πενία) μια πάθηση η οποία μπορεί να συνοδεύεται από αυξανόμενη ευαισθησία στη μόλυνση και άρα σε αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις. Η οστεοπόρωση καθώς και άλλες ανωμαλίες στην ανάπτυξη των οστών οι οποίες σχετίζονται με την ανεπάρκεια του χαλκού απαντώνται κυρίως στη νηπιακή ηλικία. Επιπλέον, ανεπάρκεια χαλκού μπορεί να επιφέρει διαταραχές στο χρώμα του δέρματος.

Γενικά η τοξικότητα από χαλκό είναι σπάνια στο γενικό πληθυσμό. Η οξεία και άμεση δηλητηρίαση από χαλκό γίνεται έκδηλη με κοιλιακούς πόνους, ναυτία, εμετό, ίλιγγο και διάρροια. Σοβαρότερες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν ηπατική και

νεφρική ανεπάρκεια, κώμα ακόμα και θάνατο. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι άτομα με κληρονομικές παθήσεις όπως είναι η ασθένεια Wilson, η ινδική κίρρωση παιδικής ηλικίας και η ιδιοπαθής τοξίνωση χαλκού) οι οποίες σχετίζονται με τον μεταβολισμό του χαλκού, ενδέχεται να διατρέξουν μεγαλύτερο κίνδυνο από τα δυσμενή αποτελέσματα της χρόνιας τοξικότητας του.

Για τον άνθρωπο οι κύριες οδοί έκθεσης στον χαλκό αποτελούν η τροφή, το πόσιμο νερό ο αναπνεόμενος αέρας καθώς και το δέρμα. Στον οργανισμό, οι διάφορες ενώσεις του χαλκού εισέρχονται κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ειδικότερα μέσω του δωδεκαδάκτυλου με ενεργό μεταφορά και σπανιότερα μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου. Μετά την απορρόφησή του ο χαλκός οδηγείται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά και τον μυελό των οστών όπου και απαντάται συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη μεταλλοθειονίνη. Ο χαλκός μπορεί επίσης να βρεθεί στους μύες, την καρδιά, τον εγκέφαλο και τα οστά. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι στο ήπαρ η συγκέντρωση του χαλκού είναι 0,7 mg Cu/100g ιστού σε φυσιολογικές συνθήκες ενώ στην νόσο Wilson τα επίπεδα αυτά μπορεί να φτάσουν έως και 15-60. Κύρια οδός αποβολής του Cu θεωρούνται τα κόπρανα μετά την απέκκριση του μετάλλου από την χολή η οποία θεωρείται και η βασική απεκκριτική οδός. Επίσης πολύ σημαντική απεκκριτική οδός είναι αυτή μέσω των ούρων. Σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αιμοχρωμάτωση, διάφορες λοιμώξεις, κίρρωση του ήπατος και νόσο του Wilson οι συγκεντρώσεις του απεκκρινόμενου χαλκού είναι σαφώς υψηλότερες.

Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικής δράσης του χαλκού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Είναι γνωστό ότι ο χαλκός καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα χαλκού (Cu^{+2}) ανάγονται από τις θειολικές ομάδες της κυτταρικής μεμβράνης προς Cu^{+1} . Ο Cu^{+1} στη συνέχεια οξειδώνεται προς Cu^{+2} από το οξυγόνο ενώ το οξυγόνο μετατρέπεται από σε $\text{ROO}\cdot$. Βασική κληρονομική διαταραχή η οποία σχετίζεται με τον μεταβολισμό του χαλκού είναι η νόσος Wilson και που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, τα νεφρά και τον κερατοειδή. Η συσσώρευση χαλκού στο ΚΝΣ προκαλεί καταστροφή των νευρικών κυττάρων του κελύφους, του φακοειδούς και του εγκεφαλικού φλοιού. Η σημαντική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ προκαλεί κίρρωση και η διάγνωση βασίζεται στην παρατήρηση αλάτων του χαλκού στον κερατοειδή. Άλλη γενετική διαταραχή που σχετίζεται με την απορρόφηση του χαλκού είναι η νόσος Menke η οποία χαρακτηρίζεται από βοστρύχωση των τριχών,

σοβαρή διανοητική καθυστέρηση, εκτεταμένες εκφυλιστικές αλλοιώσεις του εγκεφαλικού φλοιού και της λευκής ουσίας καθώς επίσης και νευρολογικές διαταραχές. Ασθενείς με την νόσο αυτή συνήθως πεθαίνουν πριν το 30 έτος της ηλικία τους.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Αντικείμενο βιολογικών μελετών αποτελούν εδώ και πολλά χρόνια ο χαλκός και οι ενώσεις του για την αντιρρευματική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση. Ωστόσο, υπήρχε η πεποίθηση ότι οι ενώσεις του χαλκού ήταν καρκινογόνες και έτσι άργησαν να μελετηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα. Αναφορικά με τα σύμπλοκα χαλκού, αποδείχθηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά. Έχουν παρασκευασθεί σύμπλοκα δισθενούς χαλκού με αμινικά, πυριδινικά υποστρώματα (ligands) τα οποία μπορούν και δρουν ως εξειδικευμένες νουκλεάσες προκαλώντας ρήξη σε συγκεκριμένες βάσεις του DNA. Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση του ίδιου του μετάλλου, έχει αποδειχθεί ότι τα σύμπλοκα του χαλκού έχουν την δική τους αντιμικροβιακή δράση όπως για παράδειγμα αυτά με υδροξινιτροκουμαρίνες, με πυριδοκαρβοξυλικά κ.ά. Τέλος, οι σύμπλοκες ενώσεις του χαλκού φημίζονται και για αντιφλεγμονώδη και αντι-ελκική δράση με διάφορα υποστρώματα. Σύμφωνα με έρευνες η αύξηση των επιπέδων του χαλκού στον ορό οφείλεται στη μειωμένη δραστηριότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), οπότε τα σύμπλοκα του χαλκού θα μπορούσαν να αντικαθιστούν τη δράση αυτού του ενζύμου. Γενικά η βιολογική δράση των συμπλόκων του Cu(II) οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά διευκολύνουν ή προάγουν τις διαδικασίες επιδιόρθωσης των ιστών όπου απαιτούνται ένζυμα εξαρτώμενα από τον χαλκό.

ΠΕΨΗ - ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Το μεγαλύτερο ποσοστό του χαλκού στα τρόφιμα βρίσκεται προσδεμένο σε οργανικές ενώσεις και κυρίως στα αμινοξέα των διαιτητικών πρωτεϊνών με την μορφή Cu^{2+} αλλά και Cu^{1+} . Συνεπώς, για την απορρόφηση του χαλκού είναι αναγκαία η πέψη για την απελευθέρωση του. Παράγοντες που διευκολύνουν την απελευθέρωση του χαλκού στο στομάχι είναι η πεψίνη και το γαστρικό υδροχλωρικό οξύ. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο για την περαιτέρω απελευθέρωση του χαλκού παίζουν τα πρωτεολυτικά ένζυμα στο λεπτό έντερο που υδρολύουν τις πρωτεΐνες. (Linder, 1996). Ο χαλκός απορροφάται σε όλο το μήκος του λεπτού εντέρου και

ιδίως στο δωδεκαδάχτυλο και στο στομάχι. Όσον αφορά το βαθμό απορρόφησης του χαλκού στο γαστρεντερικό σωλήνα εξαρτάται από την χημική κατάσταση που επικρατεί καθώς και από την παρουσία άλλων ενώσεων ή στοιχείων όπως ο σίδηρος, το μολυβδαίνιο και ο ψευδάργυρος. Το 30-50 % του χαλκού που προσλαμβάνεται απορροφάται στην δισθενή μορφή του (Cu^{2+}) παρά στην μονοσθενή (Cu^{1+}). (Turnlund et al., 1998; Linder, 1996; Johnson et al., 1992). Ο χαλκός που απορροφάται μεταφέρεται δια μέσου της πυλαίας κυκλοφορίας στο ήπαρ, το οποίο και αποτελεί το κεντρικό όργανο της ομοιόστασης του χαλκού και παράλληλα ρυθμίζει τόσο την αποθήκευση όσο και την απέκκριση του (Danks, 1995).

Η ικανότητα απορρόφησης στο στομάχι φαίνεται να οφείλεται στην αύξηση της διαλυτότητας που ασκεί το όξινο περιβάλλον του στο χαλκό διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά του διαμέσου του γαστρικού βλεννογόνου. Ωστόσο, η συμμετοχή του στομάχου στη συνολική απορρόφηση του χαλκού είναι σχετικά μικρή. Ο χαλκός θα πρέπει να προσδεθεί στο εντερικό αυλό σε υποκαταστάτες οι οποίοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα για απορρόφηση από τον ίδιο το χαλκό κάτι το οποίο κάνει τη απορρόφηση περισσότερο αποτελεσματική. Η παρουσία των παραπάνω υποκαταστατών μπορεί να είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση του χαλκού σε υποδοχείς της ψηκτροειδούς παρυφής ώστε να αυξάνεται η απορρόφηση του ακόμα και αν ο χαλκός μεταφέρεται στην ελεύθερη μορφή του ως ιόν (Danks, 1995).

Δύο είναι οι μηχανισμοί με τους οποίους απορροφάται ο χαλκός και αυτοί είναι: το ενεργητικό σύστημα μεταφοράς που υφίσταται κορεσμό και η παθητική διάχυση, διαδικασία η οποία δεν υφίσταται κορεσμό. Σύμφωνα και με άλλα συστήματα μεταφοράς, οι χαμηλές συγκεντρώσεις διαιτητικού χαλκού διακινούνται κυρίως μέσω του ενεργητικού συστήματος της διάχυσης. Κάποιοι μεταφορείς του χαλκού είναι οι hCtr1,2 και 3. Συγκεκριμένα ο μεταφορέας hCtr1 έχει βρεθεί σε αρκετούς ιστούς του σώματος με μεγαλύτερη έκφραση να εμφανίζεται στο ήπαρ, την καρδιά και το πάγκρεας και με μέτρια έκφραση στο έντερο (Huffman, 2001; Harrison et al., 1999; Cullota et al., 1999; Rosenzweig, 2001). Άλλα παραδείγματα μεταφορέων Cu^{2+} πιο περιορισμένης έκτασης είναι η πρωτεΐνη των μακροφάγων (nramp2) και ο μεταφορέας των δισθενών κατιόντων/μετάλλων 1 (DC/MT). Ο χαλκός μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει ενεργητικά συστήματα μεταφοράς αμινοξέων, όπως αυτό που χρησιμοποιείται για την απορρόφηση της ιστιδίνης. (Danks, 1995)

Η ημερήσια δίαιτα περιέχει 10 mg χαλκού, ωστόσο σχεδόν η μισή ποσότητα απορροφάται αλλά εκκρίνεται στα κόπρανα. Συνήθως πάνω από το 50% του χαλκού που προσλαμβάνεται απορροφάται από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Η διατροφική κατάσταση του χαλκού καθώς και η βιοδιαθεσιμότητα του διαιτητικού χαλκού φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό του χαλκού που απορροφάται. Σε περιόδους χαμηλής διαιτητικής πρόσληψης, η απορρόφηση του χαλκού είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε περιόδους υψηλής διαιτητικής πρόσληψης. Έχει βρεθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού της τάξης άνω των 5 mg/ημέρα η απορρόφηση του χαλκού κυμαίνεται μόνο στο 20% ενώ αυξάνεται πάνω από ο 50% με προσλήψεις κάτω του 1 mg/ημέρα (Turnlund, et al., 1998 ; Linder, 1996 ; Johnson et al., 1992). Ωστόσο έχει παρατηρηθεί απορρόφηση που φτάνει και το 75% σε προσλήψεις περίπου 350μg (Food and Nutrition Board, 2001; Johnson et al., 1992).

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Μελέτες έδειξαν ότι το ήπαρ έχει την ικανότητα να κατανέμει το χαλκό σε άλλους ιστούς αλλά άγνωστο παραμένει με ποιούς μηχανισμούς το καταφέρνει (Cullota et al., 2001). Τα ηπατοκύτταρα παίζουν σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό του χαλκού εξομαλύνοντας την ομοιόσταση του χαλκού σε άτομα με αυξημένο φορτίο χαλκού στη νόσο Wilson μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Ακόμη, είναι ικανά να καθορίζουν το ισοζύγιο του χαλκού και να ρυθμίζουν την έκκριση του χαλκού στη χολή ανάλογα με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του μετάλλου. Έτσι με αυτόν τον τρόπο τα ηπατοκύτταρα ως απάντηση στην αύξηση του φορτίου του χαλκού αυξάνουν με γρήγορη ταχύτητα την χολική απέκκριση του χαλκού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η αύξηση του φορτίου χαλκού να είναι ασυνήθιστη κάτω από κανονικές συνθήκες. Καθώς δεν υπάρχει εντερο-ηπατική κυκλοφορία του μετάλλου, έχει τη μορφή συμπλόκου μόλις απομακρυνθεί στη χολή που δεν απορροφάται αλλά απεκκρίνεται αμέσως στα κόπρανα (Lee et al., 2001).

Η μεταφορά του χαλκού διαμέσου της μεμβράνης της ψηκτροειδούς παρυφής επηρεάζεται από μία ποικιλία διαιτητικών συστατικών, εκ των οποίων κάποια ασκούν θετική και κάποια αρνητική επίδραση (Lee et al, 2001).

Τα αμινοξέα και κυρίως η ιστιδίνη είναι κάποιες από τις ουσίες που μπορούν να διευκολύνουν την απορρόφηση του χαλκού. Ειδικότερα, η ιστιδίνη συνδέεται με το χαλκό και επιτυγχάνεται έτσι η απορρόφηση του μέσω ενός συστήματος μεταφοράς αμινοξέων. Ακόμη, ο χαλκός σχηματίζει συνδέσεις με τις σουλφυδρικές ομάδες αμινοξέων σε ενώσεις όπως η γλουταθειόνη. Επίσης, οργανικά οξέα διαφορετικά από τη βιταμίνη C στα τρόφιμα μπορούν να βελτιώσουν την απορρόφηση του χαλκού. Συγκεκριμένα, το κιτρικό, το γλυκονικό, το γαλακτικό, το οξικό και το μηλικό οξύ βελτιώνουν την διαλυτότητα του χαλκού άρα και την απορρόφησή του. Το κιτρικό έχει βρεθεί ότι σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το χαλκό και βελτιώνει έτσι την απορρόφηση του (Disilvestro, 1983)

Ο ψευδάργυρος ακόμα και σε χαμηλές ποσότητες των 18 mg αλλά και κυρίως άνω των 40 mg φαίνεται ότι μειώνει την απορρόφηση του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό (Festa et al.,1985; Fisher et al., 1984; Fomire, 1990; Hoffman et al.,1998; Sandstead, 1995). Η υπερβολική πρόσληψη ψευδαργύρου έχει αρνητική επίδραση στο χαλκό καθώς έχει βρεθεί ότι είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της σύνθεσης θειονίνης από τον ψευδάργυρο. Η θειονίνη είναι μία πρωτεΐνη που περιέχει ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό ομάδων θειόλης με τη μορφή κυστεΐνης, η οποία δεσμεύει το χαλκό όπως και άλλα μέταλλα σχηματίζοντας έτσι τη μεταλλοθειόνη. Η μεταλλοθειόνη στο έντερο μπορεί να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της απορρόφησης του χαλκού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η μεταλλοθειόνη να λειτουργεί ως παράγοντας αποτοξίνωσης, καθώς δεσμεύει το χαλκό και μειώνει τη διέλευσή του στο πλάσμα, όταν η διαιτητική πρόσληψη του και συνεπώς η συγκέντρωσή του στον εντερικό αυλό είναι υψηλή (Cousins, 1985). Σε φυσιολογικά ωστόσο επίπεδα πρόσληψης, ο ρυθμιστικός ρόλος αυτής της πρωτεΐνης παραμένει ασαφής.

Η πρόσληψη σιδήρου σε σχετικά μεγάλες ποσότητες μειώνει την απορρόφηση χαλκού τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα (Yu, 1994; Haschke, 1986; Snedeker, 1982; Finley, 1983). Έχει βρεθεί ότι η απορρόφηση του χαλκού σε νεογνά που τρέφονταν με βρεφικό γάλα εμπλουτισμένο σε σίδηρο (10,8 mg σιδήρου/L) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε νεογνά στα οποία το βρεφικό γάλα παρείχε μόνο 1,8 mg σιδήρου/L (Hasche et al.,1986).

Το μολυβδαίνιο και το θείο ως τετραθειομολυβδαινικό (MoS_4)²⁻ σχηματίζει ένα αδιάλυτο σύμπλοκο με τον χαλκό αναστέλλοντας την απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα στους αρουραίους και στα μηρυκαστικά. Αν και τέτοια αποτελέσματα δεν έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους, η απέκκριση του χαλκού στους ανθρώπους έχει βρεθεί να αυξάνεται από τα 24 μg/ημερησίως στα 77 μg/ημερησίως, όσο αυξάνονταν η πρόσληψη του μολυβδαινίου από 160 μg σε 1540 μg/ημερησίως. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην απέκκριση χαλκού με τα κόπρανα, υποδηλώνοντας πιθανά ότι το μολυβδαίνιο αύξησε την κινητοποίηση χαλκού από τους ιστούς και προήγαγε την απέκκριση του (Turnlund, 1988).

Δύο κύρια ανόργανα συστατικά το ασβέστιο και ο φώσφορος μειώνουν την απορρόφηση του χαλκού. Έχει παρατηρηθεί ότι το ασβέστιο (2.382 mg ως γλυκονικό ασβέστιο) και ο φώσφορος (2.442 mg ως φωσφορική γλυκερόλη) αυξάνουν την απέκκριση του χαλκού στα κόπρανα σε σύγκριση με δίαιτες που περιέχουν μέτριες ποσότητες ασβεστίου (780 mg ως γλυκονικό ασβέστιο) και υψηλή ή μέτρια περιεκτικότητα σε φώσφορο (2442 και 843 mg ως φωσφορική γλυκερόλη). Οι απώλειες χαλκού με τα ούρα ήταν επίσης υψηλότερες με την δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ασβέστιο και φώσφορο από ότι με δίαιτα μέτριας περιεκτικότητας στα στοιχεία αυτά (Snedeker et al., 1982).

Η βιταμίνη C μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον χαλκό μειώνοντας την απορρόφηση του εξαιτίας της αναγωγής του χαλκού από τη δισθενή (Cu^{2+}) στη λιγότερο απορροφήσιμη μονοσθενή κατάσταση (Cu^{1+}) (Finley et al., 1983; Jacob et al., 1987). Έχει προταθεί επίσης ότι η βιταμίνη C μειώνει την κατακράτηση του χαλκού.

ΟΞΕΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ

Τα άλατα χαλκού και συγκεκριμένα τα ευδιάλυτα άλατα όπως ο θειικός χαλκός και ο νιτρικός χαλκός, έχουν έντονη ερεθιστική ενέργεια όταν έρθουν σε επαφή με το δέρμα καθώς και επί εσωτερικής λήψεως στο βλεννογόνο του στόματος και του εντέρου. Αυτή η ερεθιστική ενέργεια οφείλεται στη καθίζηση τοπικά των πρωτεϊνών των κυττάρων από την ηλεκτροαρνητική ρίζα του άλατος. Αναφορικά, ύστερα από τη λήψη διαλύματος CuSO_4 , προκαλείται βλάβη στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα όμοια με αυτό που προκαλούν τα διαβρωτικά οξέα.

ΧΡΟΝΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ

Η χρόνια έκθεση και δηλητηρίαση από το χαλκό δημιουργεί αρκετά προβλήματα στο ήπαρ καθώς εκεί κυρίως αποθηκεύεται αφού πρώτα απορροφηθεί και μπει στην κυκλοφορία του αίματος. Ύστερα από έρευνες βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της χρόνιας έκθεσης στο χαλκό και στα μειωμένα επίπεδα νοημοσύνης στους εφήβους.

Η χρόνια δηλητηρίαση μπορεί να οφείλεται είτε λόγω επαγγελματικών συνθηκών (με τη μορφή του πυρετού εκ μεταλλοχυσίας, με την εισπνοή αερολυμάτων που περιέχουν χαλκό κτλ.) είτε λόγω κληρονομικών διαταραχών του μεταβολισμού του χαλκού (νόσος Wilson, ιδιοπαθής τοξίνη χαλκού-ICT). Για την θεραπεία και την αντιμετώπιση των δηλητηριάσεων από το χαλκό χορηγούνται ειδικά μη τοξικά και την αποβολή του μέσω των ούρων.

ΧΑΛΚΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ – ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Έχει βρεθεί ότι ο χαλκός συμβάλλει θετικά στην φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και στην ανάπτυξη του ενώ η μείωση του μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην μνήμη και στην σκέψη. Εκτός από την οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας στον εγκέφαλο, ο χαλκός χρησιμοποιείται από την ντοπαμίνη β μονοξυγενάση και από την πεπτιδυλτρανσφεράση α μονοξυγενάση οι οποίες και οι δύο είναι απαραίτητες για την βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών. Η διανομή του χαλκού εντός του εγκεφάλου γίνεται από την πρωτεΐνη ATP7B η οποία σε περίπτωση μετάλλαξης οδηγεί σε σοβαρή ανεπάρκεια του χαλκού στον εγκέφαλο. Επίσης πολύ σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου είναι και η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού καθώς οι χρόνιες υψηλές ή χαμηλές τιμές του οδηγούν σε σημαντικές ανωμαλίες όπως η νόσος Menkes και η νόσος Wilson. Στοιχεία έδειξαν ότι ακόμα και κάποιες ανεπαίσθητες αλλαγές στην ομοιόσταση του χαλκού έχει σοβαρές συνέπειες στον εγκέφαλο. Ωστόσο απαιτείται περισσότερο έρευνα για να εξακριβωθούν οι ακριβείς μηχανισμοί αυτών των σχέσεων (Paik et al., 1999).

Οι έρευνες σχετικά με την ύπαρξη ή μη συσχέτισης του χαλκού με την νευροεκφυλιστική νόσο του Αλτσχάιμερ βρίσκονται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο. Αρκετές είναι οι πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης

του χαλκού. Η νόσος του Αλτσχάιμερ έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τη συσσώρευση μιας πρωτεΐνης, της β-αμυλοειδούς (β-APP) στον εγκέφαλο η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό του χαλκού. Στη νόσο του Αλτσχάιμερ τα επίπεδα ορού του χαλκού είναι αυξημένα αλλά δεν έχει προσδιοριστεί αν αυτή η αύξηση των επιπέδων οφείλεται στη παθογένεια της νόσου ή είναι αποτέλεσμα της. Είναι γνωστό ότι κατά τη γήρανση η λειτουργία του ήπατος είναι μειωμένη επομένως τα αυξημένα επίπεδα ορού του χαλκού ίσως προκύπτουν από την αδυναμία του ήπατος να απομακρύνει χαλκό (Bush & Strozzyk, 2004). Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο χαλκός βοηθάει στην προστασία του εγκεφάλου από την νόσο του Αλτσχάιμερ και συγκεκριμένα η Εταιρεία Νευροεκφυλιστικών Διαταραχών ανέπτυξε ένα πειραματικό φάρμακο (PBT2). Το φάρμακο αυτό βελτίωσε την αποκατάσταση της γνωστικής λειτουργίας (μνήμης και σκέψης) σε πάσχοντες από την νόσο Αλτσχάιμερ με τη δράση ενεργών μετάλλων συμπεριλαμβανομένου του χαλκού και του ψευδαργύρου σε νευρώνες του εγκεφάλου που έχουν πληγεί από την ασθένεια. Ακόμη βρέθηκε ότι οι μεταλλαγές της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) έχουν σημαντική επίδραση στον εκφυλισμό μηχανικών νευρώνων όπως αυτής στη νόσο του Αλτσχάιμερ.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Ακραία χαμηλές αλλά και υψηλές τιμές της συγκέντρωσης του χαλκού έχουν συνδεθεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων οι οποίες μπορεί να αποβούν ακόμα και θανάσιμες. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα, κανένας πλήρως πιστοποιημένος νευροτοξικός βιοδείκτης που να συνδέεται με την ανομοιοστασία του χαλκού δεν έχει οριστεί (Harvey and McArdle, 2008; Olivares et al.,2008). Η ακραία εκδήλωση τοξικότητας εξαιτίας του χαλκού είναι σχετικά εύκολο να εντοπιστεί λόγω των εμφανών κλινικών συμπτωμάτων που παρουσιάζει. Παρόλα αυτά είναι σχεδόν αδύνατο να αναγνωριστούν τα οριακά εκείνα πλεονασματικά επίπεδα συγκέντρωσης του χαλκού, καθώς και οι βιολογικές επιπτώσεις που πηγάζουν από την κατάσταση αυτή. Σύμφωνα με τους Brewer και Althaus (2008) δεν υπάρχει κάποιος τρόπος προς το παρόν να εκτιμηθεί αυτή η οριακή κατάσταση των συγκεντρώσεων του στοιχείου. Παρ' όλα αυτά, ο χαλκός που δεσμεύεται από τον ορό του αίματος, ανεξάρτητα από την σερουλοπλασμίνη, (που μπορεί να χαρακτηρίσει και ως «ελεύθερος» χαλκός) μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη εκτίμησης σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην ασθένεια Wilson, όπου χρησιμοποιείται η «ελεύθερη» ποσότητα του χαλκού ως

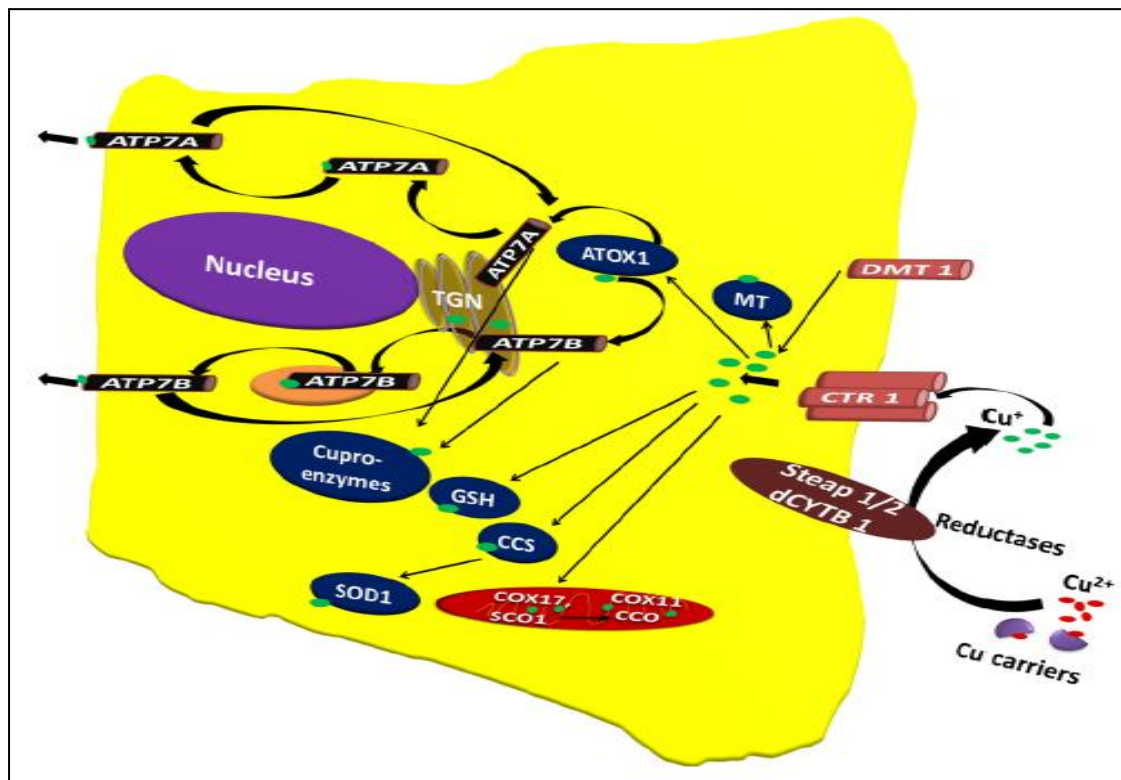
βιολογικός δείκτης, και ακολούθως για την νόσο του Alzheimer, όπου χρησιμοποιείται ο πλεονάζων «ελεύθερος» χαλκός (Brewer and Althaus, 2008; Squitti & Polimanti, 2012). Στα πλαίσια αυτά, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη βιοδεικτών υψηλής ευαισθησίας προκειμένου να πραγματοποιείτε έγκαιρη και ακριβής ανίχνευση των μη φυσιολογικών τιμών του χαλκού.

Η ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης του χαλκού στο ήπαρ, μέσα από βιοψία του ίδιου του ιστού, θεωρείται ως η πιο καθιερωμένη τακτική για την επιβεβαίωση της ασθένειας του Wilson. Ωστόσο, η βιοψία του ήπατος κρίνεται δικαιολογημένη μόνο όταν υπάρχουν στιβαρές ενδείξεις καταστροφής και υπολειτουργίας του οργάνου λόγω υπερβολικής συσσώρευσης του μέταλλου. Τα επίπεδα σερούλοπλασμίνης αποτελούν τους πιο κοινούς εργαστηριακούς δείκτες για την ανίχνευση και την επίβλεψη των ασθενών από την νόσο του Wilson. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη κατάλληλων και αποτελεσματικών βιοδεικτών εξαρτάται άμεσα από το φύλο, την ηλικία, το ορμονικό προφίλ του ατόμου, την ύπαρξη φλεγμονής καθώς και από άλλους ποικίλους και ετερογενείς παράγοντες, (European Association for Study of Liver,2012; Milne,1998). Υψηλά επίπεδα διαιτητικού χαλκού δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα της σερούλοπλασμίνης, τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής του mRNA όσο και στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης (Feillet-Coudray et al.,2000). Αντίθετα, πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν πως τα επίπεδα έκφρασης της σερούλοπλασμίνης αυξάνονται σε ποντικούς Wistar, στους οποίους προηγουμένως είχε χορηγηθεί χαλκός μέσω της τροφής (Ranganathan et al., 2011). Ωστόσο, καμιά άλλη σημαντική επίδραση πάνω στα επίπεδα mRNA της σερούλοπλασμίνης δεν παρατηρήθηκε στην εν λόγω μελέτη. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της σερούλοπλασμίνης είναι πως αν και περιέχει την επικρατέστερη μορφή του χαλκού στον ορό του αίματος, απουσία ή δυσλειτουργία του μορίου δεν οδηγεί σε μεταβολές της ομοιόστασης του στοιχείου, άλλα αντίθετα επιφέρει επιλεκτικά αποτελέσματα στην ομοιόσταση του σιδήρου. Οι δύο επικρατέστεροι τρόποι ανίχνευσης των επιπέδων της σερούλοπλασμίνης είναι α) ενζυματικά (με χρήση της π-φαινυλενοδιαμίνης (Ravin, 1961) ή της ο-διυδροχλωρικής διανισιδίνης (Schosinky et al.,1974) ως υπόστρωμα) και β) ανοσολογικά (με χρήση αντισωμάτων).

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων του χαλκού στον ορό του αίματος με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer . Έχει δειχθεί ότι τα ποσοστά

«ελεύθερου» χαλκού αυξάνεται σε ασθενείς με την νόσο αυτή (Squitti et al., 2005) καθώς και σε άτομα φορείς του γονιδίου e4 [απολιποπρωτεΐνη E (APOE4)].

Η ομοιόσταση του χαλκού ασφαλώς εξαρτάται από μεταβολές τόσο στην απορροφητική ικανότητα όσο και στην χολική απέκκριση του χαλκού. Επιπρόσθετα, η συνθέτη αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πρωτεΐνες συνόδους και άλλους μεταφορείς του χαλκού, και στις διαφορές πρωτεΐνες και ένζυμα που δεσμεύουν το στοιχείο αυτό, βοηθά στην διατήρηση της φυσιολογικής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του χαλκού (Kaler, 2011). Η ακραία πρόσληψη χαλκού αποσταθεροποιεί αυτό το σύστημα, οδηγώντας στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα την κυτταρική καταστροφή. Η ποσοτικοποίηση των διαφόρων επίπεδων των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον χαλκό σε επίπεδο πρωτεϊνών αλλά και mRNA, μαζί με την δραστηριότητα διαφόρων «χαλκοενζύμων», χρησιμοποιούνται σήμερα για την αξιολόγηση του πλεονάζοντα χαλκού στον άνθρωπο.



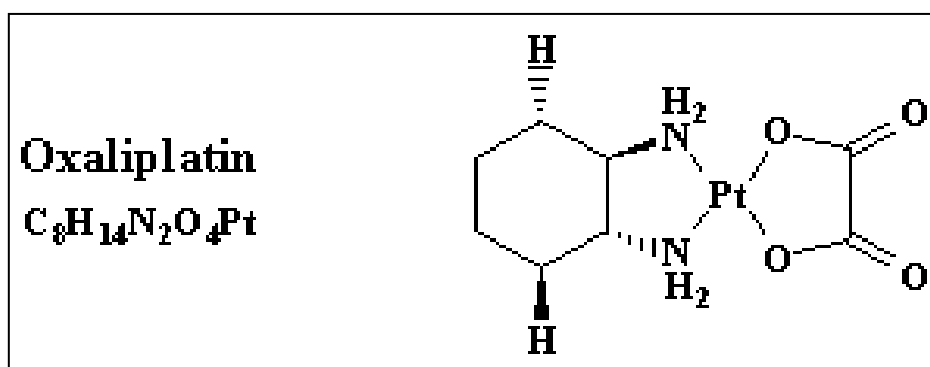
Εικόνα 11: Κατανομή και ομοιόσταση του χαλκού σε ένα γενικευμένο κύτταρο θηλαστικού. Στα εξωκυττάρια υγρά, ειδικοί μεταφορείς και ένζυμα ειδικά ως προς τον χαλκό συνδέονται με τον Cu(II) (κόκκινοι κύκλοι). Οι CTR1 και DMT1 είναι μεταφορείς του Cu(I) (πράσινοι κύκλοι) οι οποίοι εδράζονται στην

κυτταρική μεμβράνη και μετά την αναγωγή του χαλκού από ρεδουκτάσες (dCYTB και STEAP 1\2) τον μεταφέρουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες CCS, ATOX1, Cox17, Cox 11 και Sco1 αποτελούν παραδείγματα μοριακών νταντάδων του χαλκού και η λειτουργία τους είναι η μεταφορά του χαλκού σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες και οργανίδια. Η δέσμευση και η αποθήκευση του χαλκού εξαρτάται από την μεταλλοθειονίνη (MT). Οι πρωτεΐνες ATP7A και ATP7B απαιτούνται για την μεταφορά του χαλκού στον αυλό του TGN (trans Golgi δίκτυο) με στόχο την ωρίμανση των εκκρινόμενων χαλκοενζύμων όπως είναι η σερουλοπλασμίνη (Cp), η ντοπαμίνη-β-υδροξυλάση και η πεπτιδογλυκάνη α-αμιδο μονοοξυγενάση. Οι μεταφορείς ATP7A/B μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη από το TGN υπό συνθήκες ενδοκυτταρικής περίσσειας του χαλκού και συντελούν στην αποβολή του.

1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ

Η οξαλιπλατίνα ανήκει στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η ονομασία της κατά IUPAC είναι [(1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine](ethanedioato-*O,O'*)platinum(II) και το μοριακό της βάρος είναι 397,2858 gr/mol. Η ένωση αυτή διαθέτει ένα τετραγωνικό επίπεδο λευκόχρυσου (II) στο κέντρο. Σε αντίθεση με την *cis*-πλατίνη και την καρβοπλατίνη, η οξαλιπλατίνη διαθέτει το *trans*-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο στη θέση των δύο αμινικών μονοδοντικών υποκαταστατών. Διαθέτει επίσης μια ομάδα *trans*-οξαλικού.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της χημικής δομής του μορίου της οξαλιπλατίνας.

Η οξαλιπλατίνα αποτελεί φάρμακο (μεταλλοφάρμακο) τρίτης γενιάς το οποίο παράγεται με βάση την πλατίνα. Η χρήση της οξαλιπλατίνας στην αντιμετώπιση καρκινικών όγκων πραγματοποιείται τουλάχιστον τα τελευταία δέκα χρόνια. Παρόλα αυτά έχει σχετιστεί με διάφορες μορφές τοξικότητας. (Rabic & Dolan, 2007) και θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί έμμεσα ως πιθανή μεταλλοτοξίνη. Όπως και η cis-πλατίνη έτσι και η οξαλιπλατίνα συνδέθηκε με την πρόκληση μιας ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης περιφερικής νευροπάθειας. Όπως και η cis-πλατίνη έτσι και η οξαλιπλατίνα συνδέθηκε με την πρόκληση μιας ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης περιφερικής νευροπάθειας (Cassidy & Misset, 2002; Grothey, 2003; Park et al., 2009; Park et al., 2011; Wilson et al., 2002; Wolpin et al., 2007).

Ο χρόνος ημιζωής της κυμαίνεται από 10-25 λεπτά ενώ στο ανθρώπινο σώμα είναι περίπου 14 λεπτά (Ehrsson, 2002). Ο μικρός χρόνος ημιζωής σχετίζεται εν μέρη με την αλληλεπίδραση της με το χλώριο, την γλουταθειόνη, την μεθειονίνη, και την κυστεΐνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Στο αίμα η συγκέντρωση της οξαλιπλατίνας είναι 3,6 μM δυο ώρες μετά την χορήγηση της με δεδομένο ότι η αρχική ποσότητα είναι 85 mg/m^2 .

Η αλληλεπίδραση συμπλοκών που περιέχουν ως βάση την πλατίνα, με βιομόρια που περιέχουν θείο έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας του γαστρικού, των νεφρών, της καρδιάς, του ακουστικού και νευρικού συστήματος (Reedijk, 1999).

Η αντινεοπλασματική δράση της οξαλιπλατίνας οφείλεται στις κυτταροτοξικές της ιδιότητες. Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας δημιουργούν σύμπλοκα με το 1,2-διαμινοκυκλοεξανιο (DACH) και με μια οξαλική ομάδα. Τα ενυδατωμένα παράγωγα που προέρχονται από την βιομετατροπή της οξαλιπλατίνας αλληλεπιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ένδο- και διακλονικές διασταυρούμενες γέφυρες, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την σύνθεση του DNA που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταροτοξική και κατ' επέκταση την αντικαρκινική δράση. Η ανάπτυξη ωτοτοξικότητας έχει συνδεθεί με την χρήση άλλων συμπλόκων της πλατίνας όπως είναι η cis-πλατίνη και η οξαλιπλατίνα. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι ενώσεις αυτές ενεργοποιούν τις κασπάσες 3 και 7 καθώς και άλλες μη αναγνωρισμένες πρωτεάσες που είναι ειδικές για την ακολουθία Asp-Glu-Val-Asp (δηλαδή DEVD). Πιο ειδικά, ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να παρατηρηθούν σε

τελείως διαφοροποιημένα κύτταρα όπως είναι αυτά του οργάνου του Corti. Πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της ωτοτοξικότητας θεωρείται το οξειδωτικό στρες. Έχει δειχθεί ότι το σύστημα της θειορεδοξίνης (thioredoxin) που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση και στα συστήματα οξειδοαναγωγής του κυττάρου, μπορεί να δεχτεί ισχυρό πλήγμα εξαιτίας της ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι ρεδοκτάσες του συστήματος σε ενώσεις όπως η οξαλιπλατίνη ή η cis-πλατίνη. Η αναστολή αυτών των ενζύμων οδηγεί σε τοξικότητα του κυττάρου (Gromer et al., 2004; Brecker, 2006).

Η χρήση ωστόσο της οξαλιπλατίνης ενέχεται και για νευροτοξικότητα. Τα χαρακτηριστικά της νευροτοξικότητας περιλαμβάνουν σπασμούς, μυοτονία αλλά και δεσμίδωση των μυών του σαγονιού και των άκρων. Τα συμπτώματα κάνουν την εμφάνιση τους έως και μερικές ώρες από την έκθεση του οργανισμού στα συγκεκριμένα φάρμακα (Raymond et al, 1998). Οι εκδηλώσεις βέβαια αυτές δεν είναι τόσο συχνές. Έχουν όμως αναφερθεί και περιστατικά οξείας νευροτοξικότητας με συμπτώματα παραισθήσεων, αίσθησης κρύου καθώς και μη αίσθησης του λαρυγγοφαρυγγικού συστήματος (Wilson et al, 2002). Το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι σχετικά προστατευμένο από ενώσεις της πλατίνης καθώς υπάρχει χαμηλή διαπερατότητα εξαιτίας του αιματοεγκεγαλικού φραγμού. Παρόλα αυτά έχουν καταγραφεί και τέτοια περιστατικά (Extra et al 1998).

Η οξαλιπλατίνη είναι δυνατό να επηρεάσει τα κανάλια νατρίου και καλίου σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-500μM. Ενώ είναι ιδιαίτερα πιθανό οι αρνητικές της επιπτώσεις να οφείλονται σε προϊόντα της βιομετατροπής της.

Υπάρχουν διάφορες μελέτες που υποστηρίζουν την συμμετοχή των τασεοελεγχόμενων ιοντικών καναλιών στην εμφάνιση νευροτοξικότητας. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για την εξήγηση ορισμένων επιπτώσεων σχετικά με την χορήγηση της συγκεκριμένης ουσίας είναι η χηλίωση του εξωκυττάρου ασβεστίου καθώς και η δέσμευση των ιοντικών καναλιών από προϊόντα του μεταβολισμού της οξαλιπλατίνης (Jacobsen & McMartin 1986).

Η οξαλιπλατίνη λειτουργεί ως χηλική ένωση για το μαγνήσιο αλλά και το ασβέστιο. Σε γενικές γραμμές είναι αποδεκτό το γεγονός ότι η εξάρτηση των τασεοελεγχόμενων καναλιών από την συγκέντρωση των ιόντων μπορεί να μεταβάλλεται. Έχει προταθεί ότι η αίσθηση του διαμεμβρανικού ηλεκτρικού πεδίου πραγματοποιείται από τους

αισθητήρες των καναλιών. Οι αισθητήρες αυτοί είναι πρωτεΐνες με μορφή θετικά φορτισμένης α έλικας η οποία αποκρίνεται σε μεταβολές του ηλεκτρικού πεδίου ανοίγοντας τελικά ή κλείνοντας αντίστοιχα το σημείο εισόδου του καναλιού. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να μετατοπίσουν την τάση εξάρτησης των καναλιών. Μια αύξηση στη συγκέντρωση των θετικά φορτισμένων ιόντων έχει ως αποτέλεσμα την δυσχέρεια των θετικά φορτισμένων αισθητήρων των καναλιών να ανοίξουν εν τέλει τα κανάλια. Αντίστοιχα μείωση της συγκέντρωσης των θετικά φορτισμένων ιόντων διευκολύνει ουσιαστικά τον αισθητήρα των καναλιών να τα ανοίξει. Τέτοια μόρια με δυνατότητα μετατόπισης της τάσης είναι και τα πολυακόρεστα ελευθέρα λιπαρά οξέα. Επομένως τα αποτελέσματα που μπορεί να επιφέρει η οξαλιπλατίνη είναι δυνατό να αποδοθούν είτε έμμεσα μέσω χηλίωσης του εξωκυττάριου ασβεστίου είτε άμεσα μέσω πρόσδεσης των παραγώγων της βιομετατροπής της μετά από αλληλεπίδραση με το χλώριο στα ιοντικά κανάλια. Επιπλέον, η αλλαγή της αξονικής διεγερσιμότητας των νευρικών ινών οφείλεται σε μεταβολή των TEKNa (Krishnan et al., 2006; Park et al., 2009) με τη δράση της οξαλιπλατίνης να είναι δοσοεξαρτώμενη (Park et al., 2011). Οι Grolleau et al., (2001) συνέδεσαν τη μεταβολή στα TEKNa και τη μείωση του ύψους του ΣΔΕ που παρατηρήθηκε με το ασβέστιο το οποίο ενεργοποιείται από τον μεταβολίτη της οξαλιπλατίνης. Οι μεταβολές στο ύψος του ΣΔΕ στην εργασία των Adelsberger και συν. 2000 συνδυάστηκε και με την αύξηση της ανερέθιστης περιόδου επιβεβαιώνοντας την επίδραση της οξαλιπλατίνης στα TEKNa. Η οξαλιπλατίνη συγκρινόμενη με γνωστούς αναστολείς των TEKK είναι πιο δραστική προκαλώντας εμφάνιση δευτερευόντων εκπολώσεων και αύξηση της διάρκειας του ΣΔΕ κάτι που δεν παρατηρείται μετά από έκθεση του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε 4-αμινοπυριδίνη και τετρααιθυλαμμώνιο (Kagiava et al., 2008).

Cis-πλατίνη

Το σύμπλοκο *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος (II) είναι ευρύτερα γνωστό ως *cisplatin* ή *σισπλατίνη*. Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον M. Peyrone και είναι γνωστό ως άλας του Peyrone (Peyrone's salt) το 1845. Η δομή του μελετήθηκε και βρέθηκε ότι υπάρχει σε δύο δομές *cis*- και *trans*- από τον χημικό Alfred Werner το 1893. Η *σισπλατίνη* είναι από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα και αποτελεσματικότερα κυτταροστατικά φάρμακα για τη θεραπεία πρώτης και δεύτερης γραμμής νεοπλασιών όπως του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στομάχου και του λοιπού γαστρεντερικού συστήματος, του μαστού, του

μελανώματος, της κεφαλής και του τραχήλου, των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστεως και των όρχεων. Συνολικά, χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση πάνω από το 50% των περιστατικών νεοπλασίας στον άνθρωπο. Η έρευνα για τα σύμπλοκα λευκοχρύσου και άλλων ευγενών μετάλλων επικεντρώθηκε κατά τα τελευταία χρόνια κυρίως στο μηχανισμό με τον οποίο εισάγονται στο ζωντανό οργανισμό, διαχέονται στα διάφορα όργανα και δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις της δομής των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των κακοήθων κυττάρων. Συνήθως το ενέσιμο υλικό εισάγεται στην κοιλιακή χώρα και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος το φάρμακο κατευθύνεται στα διάφορα όργανα.

Πιστεύεται ότι η σισπλατίνη υδρολύεται σε δύο στάδια και μετά εισχωρεί σε προσιτές θέσεις του κυτταρικού DNA (υπάρχει και το μιτοχονδριακό DNA) και κυρίως σε θέσεις πλούσιες στις βάσεις γουανίνη (G) και αδενίνη (A), όπου πραγματοποιεί πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις. Ο τρόπος αυτός δράσης κατατάσσει τη σισπλατίνη στους δραστικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ουσίες με αυτές τις ιδιότητες είναι και καρκινογόνες ενώσεις.

Οι διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η κυτταροστατική δράση της *cis*-πλατίνης οφείλεται στη δομή της, γιατί η *trans*-μορφή του συμπλόκου δεν παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι προσπάθειες των επιστημόνων επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ειδικές κυτταρικές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τα σύμπλοκα *cis*-πλατίνης-DNA. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τα σύμπλοκα οδηγεί σε προγραμματισμένο θάνατο (απόπτωση) των κακοήθων κυττάρων. Η *cis*-πλατίνη, ωστόσο, παρουσιάζει διάφορες παρενέργειες, όπως νεφροτοξικότητα, περιφερική νεφροπάθεια, απώλεια ακοής, αλωπεκία (απώλεια των μαλλιών), εμετό και ναυτία και οστεομυελική αναστολή (καταστολή της ανάπτυξης του μυελού των οστών, λευκοπενία, θρομβοπενία). Για τον λόγο αυτό η *cis*-πλατίνη χορηγείται ταυτόχρονα με πολύ μεγάλη λήψη νερού από τον ασθενή και παράλληλα χορηγείται μαννιτόλη, που επιτείνει τη διέλευση υγρών από τα νεφρά βοηθώντας στην απαλλαγή του οργανισμού από αυτό το τοξικό φάρμακο.

Περιφερική νευροτοξικότητα και νευροπάθεια αποτελούν το πιο κοινό περιορισμό για την χορήγηση της *cis*-πλατίνης (Quasthoff & Hartung, 2002). Ένας αριθμός παθοφυσιολογικών μηχανισμών έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η *cis*-πλατίνη προσβάλλει τα κακοήθη

κύτταρα και τους περιφερικούς νευρώνες μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού απόπτωσης. Περιφερική νευροτοξικότητα αναπτύσσεται σε περίπου 50% των ασθενών που έλαβαν cis-πλατίνη, αλλά η εμφάνιση της τοξικότητας καθυστερήσει μέχρι μία αθροιστική δόση υψηλότερη από 300 mg / m². Τα συμπτώματα της περιφερικής νευροτοξικότητας περιλαμβάνουν την απώλεια της αισθητικότητας, απώλεια της αίσθησης θέσης, μυρμήγκιασμα παραισθησία, αδυναμία, τρόμο και την απώλεια της γεύσης, τόσο στα άνω όσο και στα κάτω άκρα. Έχουν επίσης περιγραφεί επιληπτικές κρίσεις και λευκοεγκεφαλοπάθεια. Μετά τη διακοπή της θεραπείας, η νευρολογική δυσλειτουργία μπορεί να βελτιώσει σταδιακά, να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα, ή μπορεί να είναι και μόνιμη (Milosavljevic et al., 2010).

1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Η αντιοξειδωτική κατάσταση στους έμβιους οργανισμούς χαρακτηρίζεται από την ισορροπία μεταξύ του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος και των προ-οξειδωτικών παραγόντων. Στον ανθρώπινο οργανισμό η ισορροπία αυτή συγκλίνει σε μικρό βαθμό προς οξειδωτικές διαδικασίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό, ο οργανισμός έχει αναπτύξει μηχανισμούς επιδιόρθωσης οι οποίοι περιλαμβάνουν διάφορα ένζυμα όπως οι λιγάσες, νουκλεάσες, πολυμεράσες, πρωτεϊνάσες και φωσφολιπάσες. Η μεγαλύτερη του φυσιολογικού προτίμηση ως προς τις οξειδωτικές διεργασίες στον οργανισμό, αναφέρεται ως οξειδωτικό stress (Paras A. M. 1999). Οι καταστροφικές συνέπειες της μη ελεγχόμενης οξείδωσης των βιομορίων προέρχεται κατά ένα μεγάλο μέρος από πού διεθνώς καλείται ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Αν και τα ROS από εξωγενείς πηγές, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία ή η περιβαλλοντική μόλυνση μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς τα βιομόρια, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η μεγαλύτερη απειλή προέρχεται από την ενδογενή παραγωγή ROS (Balaran et al., 2005). Ο όρος ROS χρησιμοποιείται για να καλύψει τα οξειδωτικά συμβάντα τα οποία οφείλονται τόσο σε ελεύθερες όσο και μη ελεύθερες ρίζες. Τα ROS των ελεύθερων ριζών είναι άτομα ή στοιχεία τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές τους τροχιές. Ανάμεσα στα πλέον ισχυρά και ιδιαίτερα διαδεδομένα περιλαμβάνεται το υπεροξείδιο και το οξείδιο του υδροξυλίου και του νιτρικού (Finkel et al., 2000).

Τα ελεύθερα αυτά οξειδωτικά προϊόντα όντας ασταθή διατηρούνται για εξαιρετικά μικρά χρονικά διαστήματα (μικρο- ή νάνο- δευτερόλεπτα) πριν από την πρόκληση αλυσιδωτών αντιδράσεων οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό ακόμη πιο καταστρεπτικών στοιχείων. Οι κύριες μη ελεύθερες οξειδωτικές ουσίες είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το υποχλωρικό οξύ και το ελεύθερο οξυγόνο. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διατηρηθούν περισσότερο χρονικά (μερικά λεπτά) όπως στην περίπτωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή σε βιομόρια (Surai, 2002).

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και τα reactive nitrogen species (RNS) τα οποία προκαλούν ανάλογες νιτρικές επιδράσεις (Surai, 2002).

Αν και τα RNS δεν έχουν μελετηθεί όσο τα ROS, φαίνεται να μην παρουσιάζουν την ίδια σημαντικότητα στην πρόκληση καταστροφής σε σχέση με τα ROS. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν έχει όλη η παραγωγή ROS αρνητικές συνέπειες.

Περίπου το 10% των ROS που παράγεται σε ζωικά κύτταρα εντοπίζεται σε περιορισμένο περιβάλλον συνήθως από εξειδικευμένα ένζυμα όπως είναι οι οξειδάσες του NADPH και συνθετάσες του NO. Τα παραγόμενα ROS διοχετεύονται με τέτοιο τρόπο ώστε να χρησιμοποιηθούν σε σημαντικές για το κύτταρο λειτουργίες όπως είναι η κυτταρική σηματοδότηση, η ρύθμιση της χαλάρωσης των λείων μυϊκών ινών, η ρύθμιση της αιματικής ροής καθώς και των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος (Droge, 2002).

Στα κύτταρα των ανώτερων οργανισμών η ενέργεια παράγεται υπό την μορφή ATP, το οποίο προέρχεται από τα μιτοχόνδρια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain, ETC). Ποσοστό μεγαλύτερο του 80% του συνολικού οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα καταναλώνεται από το ETC. Μια πληθώρα μελετών in vitro δείχνουν ότι το 1-2% των μορίων του οξυγόνου που χρησιμοποιείται μπορεί να μετατραπεί σε ανιόντα υπεροξειδίου. Αν και in vivo το ποσοστό αυτό είναι ακόμη μικρότερο (0,2%), τα ανιόντα αυτά συνιστούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό ποσοστό.

Το οξειδωτικό stress προκύπτει εξαιτίας ενζυμικών και μη ενζυμικών διεργασιών όταν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί αποτυγχάνουν να εξουδετερώσουν τα παραγόμενα ROS. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι η παραμονή αυτών των μορίων για χρονικό διάστημα τέτοιο που είναι ικανό να προκαλέσει περαιτέρω αντιδράσεις. Η έκταση αυτής της καταστροφής εξαρτάται από το πόσο επιρρεπή είναι

τα διάφορα βιομόρια να ενωθούν με τα υπάρχοντα ROS. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι υψηλά επίπεδα ROS δεν οδηγούν κατ' ανάγκη σε οξειδωτικό stress. Πρακτικά λοιπόν το οξειδωτικό stress μπορεί να αξιολογηθεί μετρώντας την απόσβεση ή την παρουσία αυξημένων επιπέδων ROS.

Πίνακας 5: Διάκριση ενεργών μορφών οξυγόνου

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	ΠΗΓΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ
$O_2^{\cdot -}$	$ONOO^-$
$\cdot HO_2$	H_2O_2
$OH\cdot$	$ROOH$
$ROO\cdot$	
$NO\cdot$	
R	
$O\cdot$	

1.3.1 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

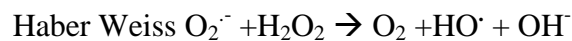
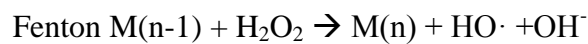
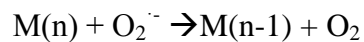
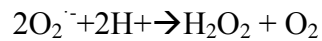
Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα και μη είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο λόγω της μεγάλης διεισδυτικότητας τους στο περιβάλλον. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα βαρέα μέταλλα προκαλούν τοξικότητα και ιδιαίτερα νευροτοξικότητα, γονιδιακή τοξικότητα και τοξικότητα που σχετίζεται με καρκίνο καθώς και πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης τοξικότητας για όλα αυτά τα μέταλλα είναι η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου. Οι τοξικές εκδηλώσεις αυτών των μετάλλων προκαλούνται κυρίως λόγω της ανισορροπίας μεταξύ της προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ομοιόστασης όπως ήδη έχει αναφερθεί. Τα μέταλλα αυτά έχουν μεγάλη τάση να προσδένονται σε θειολικές ομάδες που περιέχουν τα ένζυμα και οι πρωτεΐνες. Μεγάλη περίοδος έκθεσης σε αυτά τα μέταλλα μπορεί να προκαλέσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ενώ πολλά μόρια σηματοδότησης επηρεάζονται όπως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες όπως οι MAP κινάσες και G πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή θεραπεία ενάντια στην τοξικότητα αυτών

των μετάλλων θεωρείται η χηλικοποίηση καθώς και η χρήση αντιοξειδωτικών μορίων που αποσβένουν ROS.

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά συστατικά όλων των οικοσυστημάτων και η παρουσία τους στο περιβάλλον προκύπτει ως αποτέλεσμα φυσικών διεργασιών όπως είναι η διάβρωση και η βακτηριακή δραστηριότητα αλλά και της ανθρώπινης δραστηριότητας όπως είναι οι βιομηχανικές και γεωργικές εργασίες. Ως βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται όλα εκείνα τα μέταλλα με ατομικό αριθμό μεγαλύτερο του σιδήρου. Τις τελευταίες δεκαετίες ο όρος έχει συσχετισθεί με μια ομάδα μετάλλων τα οποία σχετίζονται με μόλυνση και δυνητική τοξικότητα. Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά παρόντα στα πετρώματα και τα μεταλλεύματα και γι' αυτό εμφανίζονται πάντα στο έδαφος, τα ιζήματα, τα προϊόντα και σε ζωντανούς οργανισμούς. Η υπερβολική, ασυνήθιστη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων σε ιδιαίτερα μέσα οδηγεί σε μόλυνση. Τα μέταλλα σε αντίθεση με τις περισσότερες τοξικές οργανικές ενώσεις δεν αποικοδομούνται, και γι' αυτό συσσωρεύονται στο περιβάλλον. Τελικά, ένα μέρος αυτών καταλήγει με τη βιολογική τροφική αλυσίδα στον άνθρωπο αλλά και άλλους έμβιους οργανισμούς προκαλώντας χρόνιες ή οξείες βλάβες.

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική απειλή για τον άνθρωπο κυρίως εξαιτίας της ικανότητας τους να βιοσυσσωρεύονται. Μέταλλα όπως ο χαλκός, ο σίδηρος, το νικέλιο και ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητα για την διεκπεραίωση φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών στον οργανισμό, τα μέταλλα αυτά καλούνται ενδογενή μέταλλα. Ωστόσο η παρουσία τους σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να θεωρηθεί τοξική. Μέταλλα όπως το αλουμίνιο, το κάδμιο και ο μόλυβδος θεωρούνται μη-απαραίτητα και είναι δυνατό να προκαλέσουν τοξικές αντιδράσεις ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Keunen et al., 2011). Τα όρια τοξικότητας των βαρέων μετάλλων διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών καθώς αναπτύσσουν διαφορετική ανοχή (Klerks & Weiss, 1987). Τα βαρέα μέταλλα έχουν χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα τοξικά μόρια κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν ή να συνεισφέρουν στην παραγωγή οξειδωτικού stress. Η πρόκληση οξειδωτικού stress έπειτα από έκθεση σε βαρέα μέταλλα έχει παρατηρηθεί εξίσου σε ζωικού και φυτικούς οργανισμούς (Keunen et al., 2011). Διακρίνονται δύο μηχανισμοί με τους οποίους τα βαρέα μέταλλα μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό stress και αυτοί είναι οι εξής:

- Άμεση εμπλοκή στην παραγωγή των ROS. Η διαδικασία αυτή αφορά σε μέταλλα τα οποία συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οδηγώντας άμεσα σε παραγωγή ROS μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss. Τέτοια μέταλλα είναι ο χαλκός και ο σίδηρος.



- Έμμεση εμπλοκή στην παραγωγή ROS. τα μη οξειδοαναγωγικά μέταλλα όπως είναι το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο ψευδάργυρος είναι δυνατό να προκαλέσουν την παραγωγή ROS έμμεσα κυρίως μέσω της αναστολής των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Τα μόρια που πλήττονται περισσότερο είναι αυτά που περιέχουν θείο (θειόλες) όπως η γλουταθειόνη η οποία αποτελεί και τον κύριο στόχο του Cd^{2+} (Lopez et al., 2006). Επιπλέον τα μέταλλα αυτά μπορούν να αντικαταστήσουν οξειδοαναγωγικώς ενεργά ιόντα μετάλλων σε πρωτεΐνες η άλλα μόρια οδηγώντας τελικά στη μη φυσιολογική αύξηση της συγκέντρωσης αυτών.

Και στις δύο περιπτώσεις τα βαρέα μέταλλα είναι δυνατό να επάγουν την αύξηση της παραγωγής των ROS όπως είναι η υδροξυλική ρίζα ($\text{HO}\cdot$) και το σουπεροξειδίο ($\text{O}_2\cdot^-$). Το σουπεροξειδίο με την σειρά του μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες όπως είναι το NO με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενεργών μορφών αζώτου ή να σχηματίσει εν τέλει H_2O_2 με την δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης.

1.3.2 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΣΗ

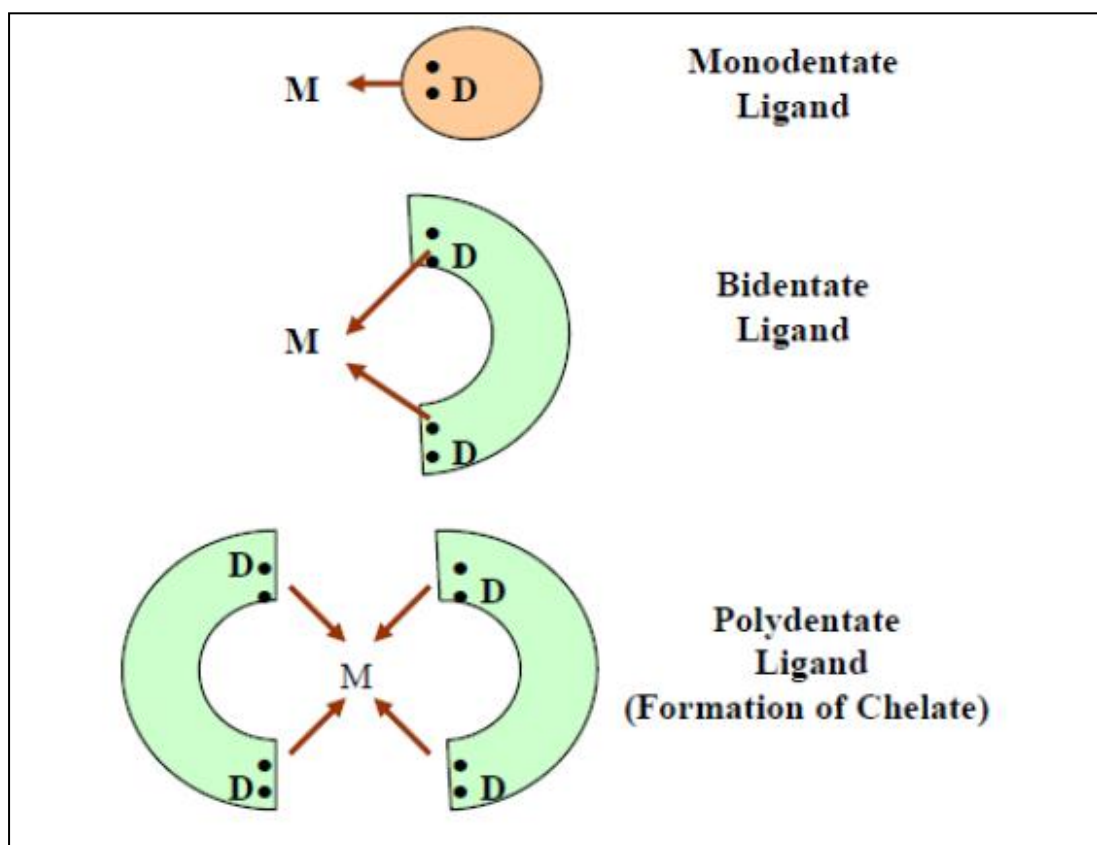
Ως αντιοξειδωτικό αναφέρεται κάθε ένωση η οποία εμποδίζει ή καθυστερεί μια διαδικασία οξείδωσης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η ένωση αυτή εμποδίζει το σχηματισμό των ROS ή απενεργοποιεί τις ήδη σχηματισμένες ελεύθερες ρίζες (Hall et al., 1997; Ternay et al., 1999). Τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευσή τους. Στα φυσικά και στα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι συχνά ενώσεις φαινολικής φύσης τα οποία περιέχουν στο μόριό τους διάφορους αλκυλο υποκαταστάτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι τα 2,6-δι-^lβουτυλ-4-μεθυλο-φαινόλη (BHT), 2- ή 3-^lβουτυλ-4-υδροξυ-ανισόλη (BHA), γαλλικός προπυλεστέρας (propyl gallate) και ^lβουτυλ-υδροξυ-κινόνη (TBHQ). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι συνήθως φαινολικές ενώσεις, κινόνες ή λακτόνες καθώς και πολυφαινόλες. Ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι γνωστός. Για τα φυσικά αντιοξειδωτικά ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης τους είναι γνωστός μόνο για ορισμένες τάξεις ενώσεων όπως οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή.

Οι κύριοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης είναι τρεις: α) η διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών μέσω απενεργοποίησης των σχηματιζόμενων ριζών, β) ο μηχανισμός αποτροπής της οξείδωσης μέσω χηλικοποίησης των μεταλλικών καταλυτών της αντίδρασης και γ) η καταστολή του οξυγόνου απλής κατάστασης. Ο μηχανισμός διακοπής της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά τα αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, ενώ ο δεύτερος αφορά τα αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων. Και οι δύο μηχανισμοί βρίσκουν άμεση εφαρμογή στην οξείδωση των λιπιδίων.

1.3.3 ΧΗΛΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Αν και η έννοια της χηλικοποίησης βασίζεται στην απλή χημική ιδιότητα της συναρμογής, η εύρεση ενός ιδανικού χηλικοποιητή και η ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας χηλικοποίησης για την απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από το επιθυμητό σημείο στον οργανισμό απαιτεί μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση σχεδιασμού φαρμάκων. Τα χηλικοποιητικά μόρια κατηγοριοποιούνται σε οργανικές και

ανόργανες ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα προς σχηματισμό συμπλόκων, συνήθως με μορφή δακτυλίου. Οι χηλιοποιητικοί παράγοντες στο σημείο του προσδέτη έχουν άτομα τα οποία σχηματίζουν δύο ή ένα ομοιοπολικό δεσμό και one co-ordinate or two co-ordinate linkages στην περίπτωση που αυτοί είναι δισχιδείς. Τα άτομα που λειτουργούν συνήθως ως ‘συνδετήρες’ είναι το S, N και O σχηματίζοντας χημικές ομάδες όπως είναι οι: $-SH$, $-S-S$, $-NH_2$, $=NH$, $-OH$, $-OPO_3H$, ή $>C=O$. Οι δισχιδείς ή πολυσχιδείς υποκαταστάτες σχηματίζουν δομές δακτυλίου οι οποίοι περιλαμβάνουν το μεταλλικό ιόν καθώς και τα δύο άτομα-συνδετήρες που συνδέονται στο ιόν. Πολλά μόρια δότες δρουν ως συνδέτες διπλή συναρμογής. Οι πενταμελείς χηλιοποιητικοί δακτύλιοι είναι ιδιαίτερα σταθεροί και συνήθως σχηματίζονται από προσδέτες των οποίων ο σκελετός είναι της μορφής $Y-CH_2-CH_2-Y$, $Y-CO-CH_2-Y$ (όπου Y υποδηλώνει OR, NR_2 , O, S, NR). Υπάρχουν επίσης παραδείγματα ανόργανων χηλιοποιητικών μορίων τα οποία σχηματίζουν πενταμελείς δακτυλίους με τα μεταλλικά ιόντα. Άλλοι τύποι υποκαταστατών όπως είναι το $EDTA^{4-}$ μπορεί να σχηματίζουν εξαμελείς δακτυλίους.



Εικόνα 13: Ενδεικτική σχηματική απεικόνιση μονο- δι- και πολυ-δοντικού υποκαταστάτη.

Η σταθερά συναρμογής ενός συμπλόκου μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά με τιμές εξισώσεων ισορροπίας οι οποίες εξαρτώνται από την ατομική δομή των μετάλλων που χηλικοποιούνται. Ως παράδειγμα στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι σταθερές συναρμογής που εμφανίζει το χηλικοποιητικό μόριο EDTA με τα διάφορα μέταλλα και που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

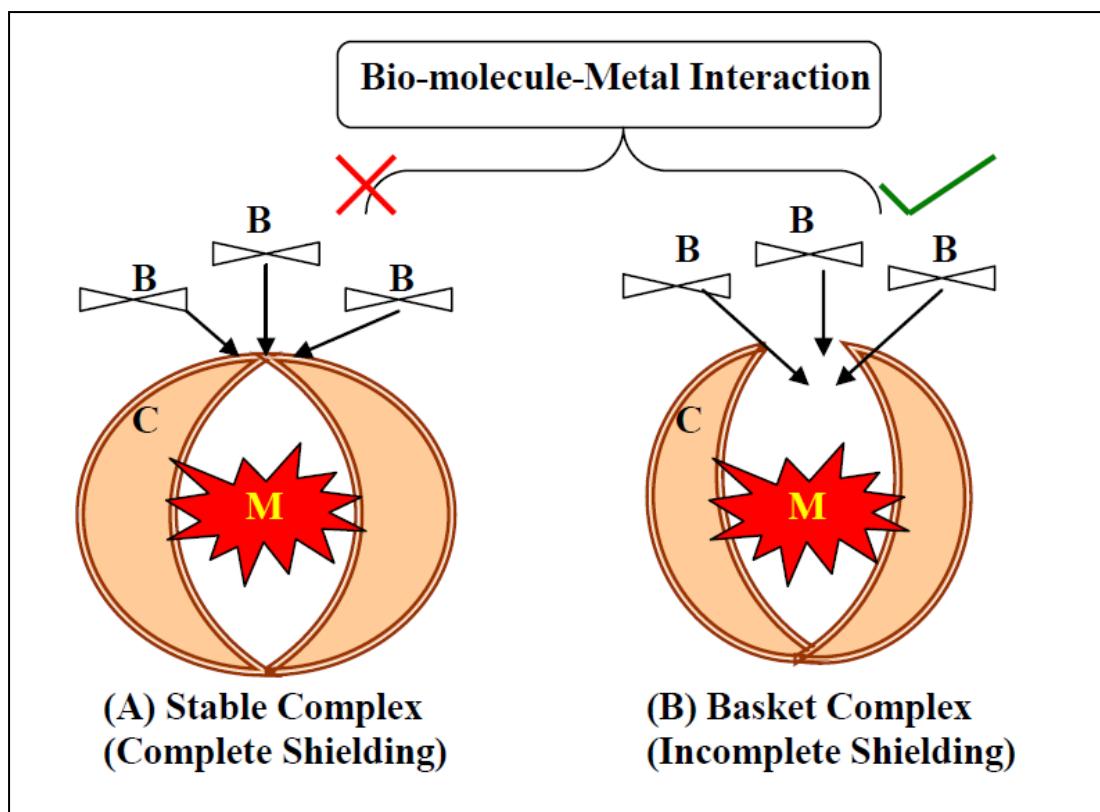
Metal	Na	Li	Ba	Sr	Mg	Ca	Mn	Fe	Co	Zn	Cd	Pb	Ni
K	1.7	2.8	7.8	8.6	8.7	10.6	13.4	14.4	16.1	16.1	16.4	18.3	18.4
(log)													

Πρέπει να αναφερθεί ότι ένα μέταλλο με μεγαλύτερη σταθερά συναρμογής ανταγωνίζεται, για την σύνδεση του με τον χηλικοποιητικό παράγοντα, με ένα μέταλλο μικρότερης σταθεράς συναρμογής απομακρύνοντας εν τέλει το τελευταίο. Ωστόσο και άλλες παράμετροι, όπως ο αριθμός των ετεροκυκλικών δακτυλίων που σχηματίζονται καθώς και η σχετική συγκέντρωση των μετάλλων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως προς την εκλεκτικότητα της σύνδεσης. Για τον λόγο αυτό το ιοντικό ασβέστιο το οποίο είναι ευκολότερα διαθέσιμο στον οργανισμό συνδέεται επιλεκτικά με το Na_2EDTA παρά την μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης που εμφανίζει ο Pb. Επιπλέον, η προβλεψιμότητα της έκβασης της χηλικοποίησης είναι περιορισμένη. Μια χημική ένωση η οποία πληροί της προϋποθέσεις ενός ιδανικού χηλικοποιητή *in vitro* δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί το ίδιο και *in vivo* καθώς η απαιτούμενη σχετική της συγκέντρωση μπορεί να αποβεί τοξική λόγω της παρουσίας ενδογενών ουσιών όπως είναι αιμοσφαιρίνη και το κυτόχρωμα τα οποία συμπεριφέρονται επίσης χηλικοποιητικά και έτσι να ανταγωνίζονται για της θέσεις σύνδεσης. Ένας άλλος παράγοντας, ο οποίος είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τον σχηματισμό του συμπλόκου αλλά και την σταθερότητα αυτού, είναι το pH. Οι περισσότεροι παράγοντες συμπλοκοποίησης είναι ασταθής σε χαμηλές τιμές pH ενώ σε υψηλό pH τα μέταλλα τείνουν να σχηματίζουν αδιάλυτα υδροξείδια τα οποία είναι λιγότερο 'προσιτά' στους χηλικοποιητικούς παράγοντες. Το χαρακτηριστικό αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες οδηγούν σε αλκάλωση ή οξέωση.

Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα σημαντικό ένας χηλικοποιητής να ικανοποιεί ορισμένα κριτήρια επιτρέποντάς του α) την μεταφορά του στα σημεία συσσώρευσης του

μετάλλου διαπερνώντας τα φυσιολογικά εμπόδια των βιολογικών συστημάτων, β) τον σχηματισμό σταθερού συμπλόκου με το μέταλλο και μάλιστα ισχυρότερο από τον προσδέτη του στο σημείο συσσώρευσης και γ) τον σχηματισμό μη τοξικού συμπλόκου του οποίου οι ιδιότητες διευκολύνουν την έκκρισή του όχι μόνο από το σημείο εναπόθεσης αλλά και από τον οργανισμό (Jones, 1994).

Ένας ιδανικός χηλικοποιητής θα πρέπει να έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό, αντοχή σε οποιαδήποτε βιομετατροπή, την ικανότητα να φθάνει σε θέσεις αποθήκευσης του μετάλλου, να διατηρεί την ικανότητα συμπλοκοποίησης στο pH των υγρών του σώματος και τέλος την ικανότητα να σχηματίζει μεταλλικά σύμπλοκα τα οποία είναι λιγότερο τοξικά από την ελεύθερη μορφή του μεταλλικού ιόντος.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση δύο διαφορετικών συμπλόκων μετάλλων-χηλικοποιητικών παραγόντων. Στο σχήμα A το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι σταθερό αποτρέποντας έτσι το μέταλλο να αλληλεπιδράσει με βιομόρια, ενώ στο σχήμα B η αλληλεπίδραση επιτρέπεται λόγω ατελούς συμπλοκοποίησης. Με B συμβολίζεται το βιομόριο, με C το χηλικοποιητικό μόριο και με M το μέταλλο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ANATOMIA

Για την λήψη του βιολογικού ιστού χρησιμοποιήθηκαν επίμυες του γένους *Rattus norvegicus* (*Wistar*) αρσενικού και θηλυκού φύλου. Το βάρος των ζώων κυμαίνεται από 250-350 γραμμάρια. Επιπλέον, για την πραγματοποίηση των πρωτογενών κυτταρικών καλλιιεργειών ιπποκαμπιαίου ιστού χρησιμοποιήθηκαν νεογνά ζώα του ίδιου είδους ηλικίας 2-3 ημερών. Οι επίμυες διατηρούνται σε συνθήκες οι οποίες προβλέπονται από τους κανόνες της Κτηνιατρικής υπηρεσίας (No 13/4712-29.04.2010) Πριν από την έναρξη κάθε πειραματικής διαδικασίας οι επίμυες αρχικά αναισθητοποιούνται με χρήση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και στην συνέχεια πραγματοποιείται εξάρθρωση του αυχένα για την θανάτωσή τους. Η παραπάνω διαδικασία υπόκειται στους κανόνες της Κτηνιατρικής υπηρεσίας και είναι σύμφωνη με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής ένωσης.

2.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΧΙΑΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ

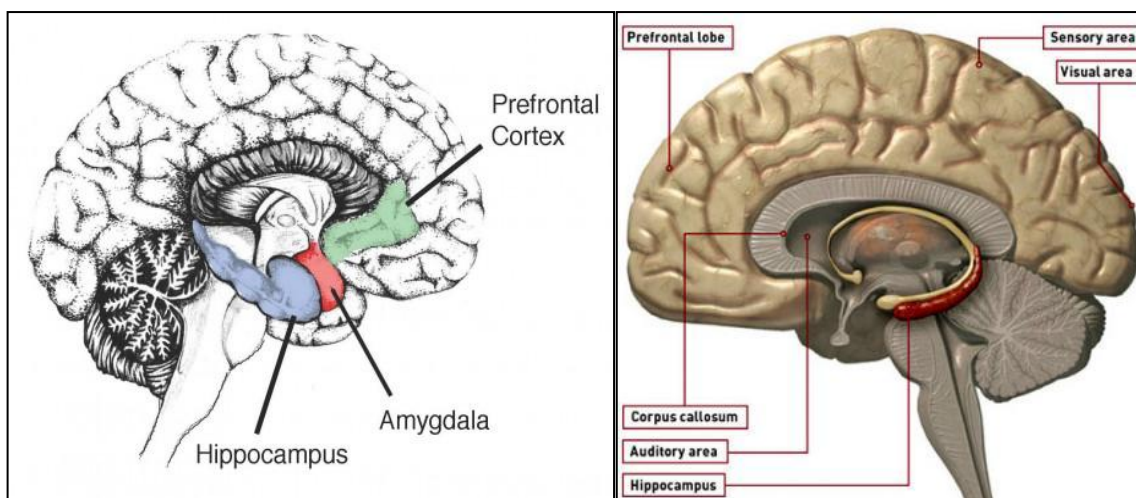
Αρχικά, αφαιρείται το τρίχωμα και το δέρμα του ζώου από την ραχιαία πλευρά έως και τα δύο κάτω άκρα προκειμένου να αποκαλυφθούν οι μύες των ποδιών οι οποίοι αντιστοιχούν στους: δικέφαλο και τετρακέφαλο μηριαίο και της ράχης, τον γλουτιαίο και τον πλατύ ραχιαίο. Ακολούθως, πραγματοποιείται αφαίρεση του συνδετικού ιστού στην μηριαία περιοχή ώστε να αποκαλυφθεί το ισχιακό νεύρο. Το ισχιακό νεύρο λαμβάνεται από την περιοχή έκφυσης στην σπονδυλική στήλη μέχρι και την άρθρωση του γονάτου όπου και διακλαδίζεται. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται και στα δύο άκρα και έτσι από κάθε ζώο απομονώνονται δύο ισχιακά νεύρα. Καθ' όλη την διάρκεια της ανατομίας αλλά και μετά την λήψη του ισχιακού νεύρου, ο ιστός βρίσκεται σε φυσιολογικό οξυγονωμένο ορό κατάλληλης σύστασης για τους επίμυες σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύσταση του ορού είναι η εξής: 136mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.4mM CaCl₂, 11.1mM γλυκόζης, 1mM NaHCO₃, 1.1mM MgCl₂ και 10mM HEPES. Το pH του ορού ρυθμίζεται με διαλύματα NaOH και HCl στην τιμή 7,3 ενώ η θερμοκρασία του είναι 25±1oC (θερμοκρασία δωματίου). Ο ορός που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα οξυγονώθηκε με 100% οξυγόνο για 20-25 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός από προσκείμενους ιστούς και αιμοφόρα

αγγεία που μπορεί να λαμβάνονται παράλληλα με την απομόνωση του ισχιακού νεύρου. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προϋποθέτουν την παρουσία ή απουσία του επινευρίου. Η αφαίρεση του επινευρίου από το ισχιακό νεύρο πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών μικροεργαλείων (λαβίδα, ψαλίδι) κάτω από στερεοσκόπιο εφαρμόζοντας την λιγότερο δυνατή τάση καθώς και επαφή με τις νευρικές ίνες προκειμένου να αποφευχθεί ο τραυματισμός του υπό μελέτη ιστού.

2.1.2 ΛΗΨΗ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

Για την λήψη του ιπποκαμπιαίου ιστού, χρησιμοποιήθηκαν νεογνά επίμυων ηλικίας 2-3 ημερών. Η διαδικασία απομόνωσης του ιστού πραγματοποιείται στο εσωτερικού UV απαγωγού στρωτής ροής αέρα για αποφυγή επιμόλυνσης του ιστού. Το κάθε ζώο τοποθετείται ξεχωριστά πάνω σε διηθητικό φίλτρο το οποίο προηγουμένως έχει αποστειρωθεί με 90% αιθανόλη. Αρχικά, αφαιρείται το τμήμα του κρανίου με νυστέρι ενώ στη συνέχεια αφαιρείται το δέρμα του κρανίου με επιμήκη τομή από την ρινική περιοχή μέχρι και την αυχενική αποκαλύπτοντας του υποκείμενο κρανίο. Ακολουθούν τομές κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα του κρανίου ώστε το κρανίο να διαιρεθεί σε δύο τμήματα. Επιπλέον, πραγματοποιείται μία τρίτη και μία τέταρτη τομή κατά μήκος της ραφής του κρανίου επιτρέποντας την αναδίπλωση των σκληρών ιστίων προς τα πίσω καθιστώντας δυνατή την πρόσβαση στον εγκέφαλο του ζώου. Ο ωτιαίος μυελός και ο οσφρητικός βολβός αποκόπτονται από την κοιλιακή πλευρά του εγκεφάλου με τέτοιο τρόπο ώστε ο εγκέφαλος να μπορεί να απομακρυνθεί με την βοήθεια μικρής σπάτουλας διατηρώντας παράλληλα την δομή του. Η ανατομία του εγκεφάλου πραγματοποιείται με διαίρεση της μέσης σχισμής διαχωρίζοντας έτσι πλήρως τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια ώστε να αποκαλυφθεί ο ιππόκαμπος σε κάθε ημισφαίριο αντίστοιχα. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τομές στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο κάθε ιπποκάμπου με την χρήση σπάτουλας και διατηρώντας ανέπαφο το σύνολο του επιθυμητού ιστού. Καθ' όλη την διάρκεια της ανατομίας οι ιστοί διαβρέχονται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Hepes Buffer Saline) η σύσταση του οποίου είναι 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES και 25mM γλυκόζης. Ο απομονωμένος πλέον ιπποκαμπιαίος ιστός μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (HBS) το οποίο βρίσκεται σε πάγο. Με την ολοκλήρωση της μακρο-ανατομίας ακολουθεί αφαίρεση τυχόν

πλεονάζοντος ιστού καθώς και των αιμοφόρων αγγείων κάτω από στερεοσκόπιο με την βοήθεια μικροεργαλείων (νυστέρι, λαβίδα) διασφαλίζοντας έτσι την λήψη μόνο ιπποκαμπιαίων κυττάρων προς ανάπτυξη πρωτογενούς καλλιέργειας.

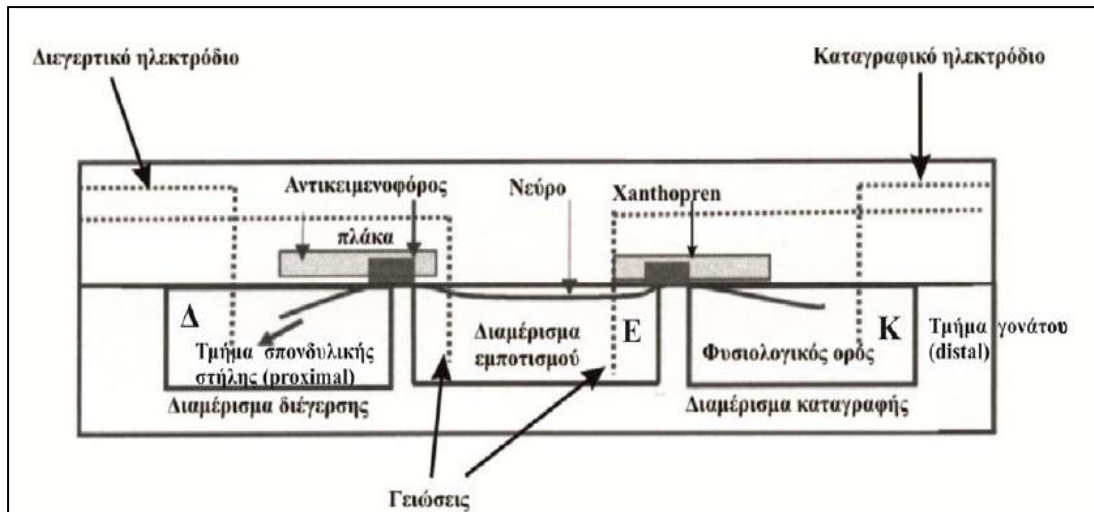


Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της θέσης του ιπποκάμπου στον εγκεφαλικό ιστό σε κάθε ένα από τα δύο ημισφαίρια.

2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ (*ex vivo*)

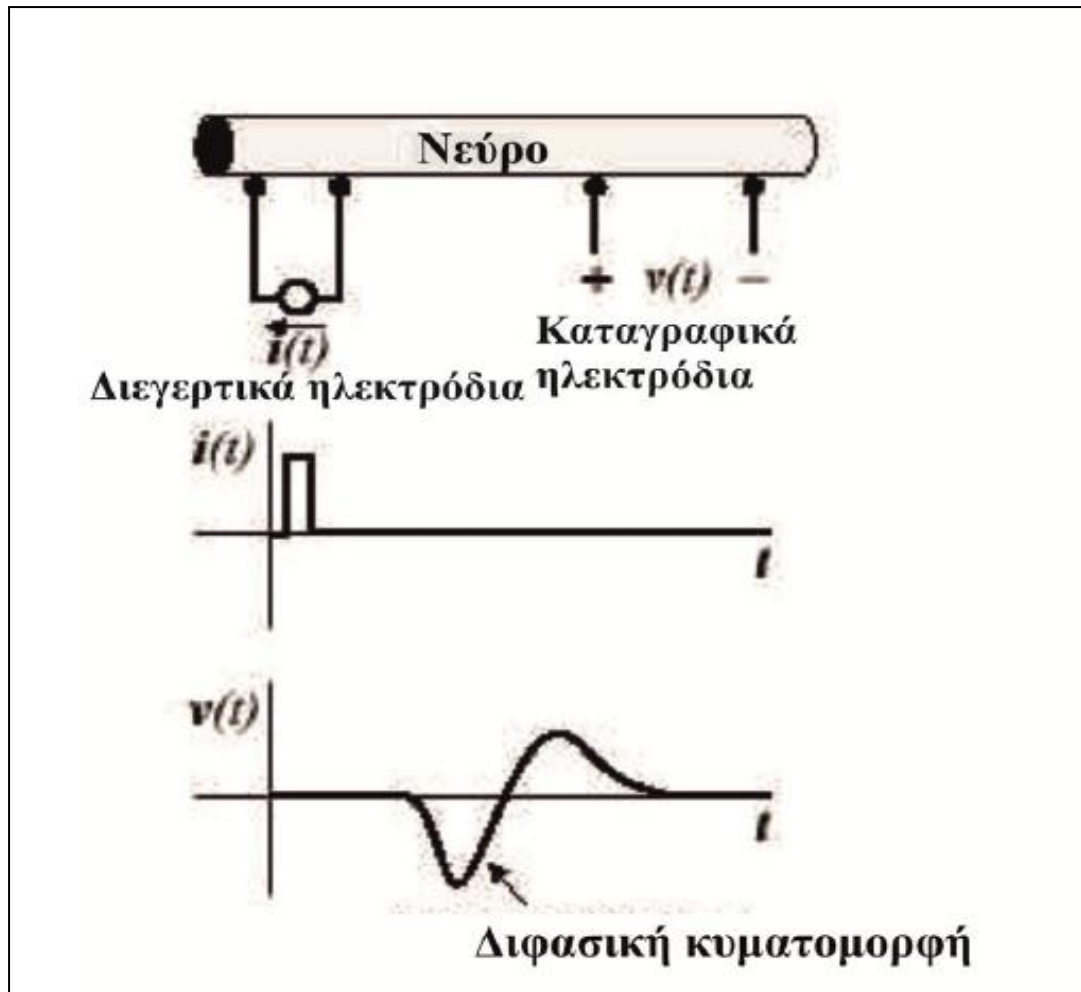
Τα απομονωμένα πλέον ισχιακά νεύρα τοποθετούνται σε κατάλληλα διαμορφωμένο τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Ο θάλαμος αυτός αποτελείται από Plexiglas και η χρήση του είναι γνωστή και από άλλες εργασίες με στόχο την *ex vivo* αξιολόγηση της νευροτοξικής δράσης διαφόρων ενώσεων στο απομονωμένο ισχιακό νεύρο των θηλαστικών και των αμφιβίων (Theophilidis et al., 1997; Kouri & Theophilidis 2002; Papaefthimiou, 2004; Kagiava et al., 2008). Ο τρίχωρος αυτός θάλαμος καταγραφής αποτελείται από τρία διαμερίσματα. Τα διαμερίσματα αυτά αντιστοιχούν στο διαμέρισμα διέγερσης (Δ), το κεντρικό διαμέρισμα (Ε) το οποίο είναι και το διαμέρισμα εμποτισμού καθώς και το διαμέρισμα καταγραφής (Κ). Στο διαμέρισμα διέγερσης τοποθετείται το άκρο του νεύρου το οποίο αντιστοιχεί το σημείο έκφυσης από την σπονδυλική στήλη (proximal) και εκεί επίσης τοποθετείται το ηλεκτρόδιο διέγερσης. Στο κεντρικό διαμέρισμα του θαλάμου τοποθετείται η μεγαλύτερη μάζα του ισχιακού νεύρου που αντιστοιχεί περίπου στο 80% του ιστού καθώς και οι γειώσεις του συστήματος. Στο κεντρικό διαμέρισμα προστίθεται και η υπό μελέτη ένωση ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται κάθε φορά. Στο

τρίτο διαμέρισμα, αυτό της καταγραφής, τοποθετείται το άκρο του ισχιακού που προέρχεται από την κλείδωση του γονάτου (distal) καθώς και το ηλεκτρόδιο καταγραφής. Το καταγραφικό ηλεκτρόδιο συνδέεται με τον ενισχυτή. Ο κάθε θάλαμος περιέχει τον συνδυασμό των τριών διαμερισμάτων σε δύο επαναλήψεις. Οι διαστάσεις του κάθε διαμερίσματος είναι 20 mm μήκος, 35 mm πλάτος και 8 mm ύψος με το κάθε διαμέρισμα να έχει χωρητικότητα περίπου 10-12 ml. Τα τοιχώματα που διαχωρίζουν τα διαμερίσματα του θαλάμου έχουν πάχος 4mm. Η τοποθέτηση του νεύρου γίνεται κατά μήκος των τριών διαμερισμάτων και στερεώνεται σε ειδικές εγχοπές στα διαχωριστικά τοιχώματα. Η πλήρης στερέωση του νεύρου στην συγκεκριμένη θέση γίνεται με την χρήση οδοντιατρικής πάστας που ονομάζεται Xanthopren (Heraeus Kulzer, Germany) και την επικάλυψη από αντικειμενοφόρο πλάκα. Συγκριτικά με άλλες πάστες, η πάστα Xanthopren έχει την ελάχιστη τοξική δράση στον νευρικό ιστό (Andreou et al., 2007). Επιπλέον, ο ρόλος της πάστας εκτός από την στερέωση του νεύρου είναι και μονωτικός καθώς με τον τρόπο αυτό αποκλείεται η οποιαδήποτε εισροή ή εκροή ορού από το ένα διαμέρισμα στο άλλο. Μετά την σταθεροποίηση της πάστας ακολουθεί τοποθέτηση των αντίστοιχων ηλεκτροδίων στις θέσεις που περιγράφηκαν και προηγουμένως. Τα ηλεκτρόδια στην παρούσα εργασία αρχικά ήταν φτιαγμένα από άργυρο. Ωστόσο στα πλαίσια βελτίωσης του συστήματος τα ηλεκτρόδια αντικαταστάθηκαν από ηλεκτρόδια χρυσού 24 καρατίων. Το σύνολο των πειραμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου 25 °C γεγονός που επιτυγχάνεται με χρήση κυκλοφορητή για την συνεχή ροή νερού διαμέσου του θαλάμου και κάτω από τα διαμερίσματα όπου βρίσκεται το νεύρο. Τέλος, και τα τρία διαμερίσματα πληρούνται με οξυγονωμένο φυσιολογικό ορό υπό συνεχή ανάδευση.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του κατάλληλα διαμορφωμένου τρίχωρου θαλάμου καταγραφής όπου υποδεικνύονται τα τρία διαμερίσματα: Το διαμέρισμα διέγερσης (Δ), το κεντρικό διαμέρισμα εμποτισμού (Ε) και το διαμέρισμα καταγραφής (Κ). Επιπλέον, στο σχήμα φαίνονται τα διεγερτικά και καταγραφικά ηλεκτρόδια, το απομονωμένο ισχιακό νεύρο και οι πλάκες κάλυψης με την οδοντιατρική πάστα.

Για την αξιολόγηση της φυσιολογικής δραστηριότητας των νευρικών αξόνων (ινών) του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε σαν μετρήσιμη ένδειξη το σύνθετο δυναμικό ενέργειας (ΣΔΕ). Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή της διαφοράς δυναμικού που δημιουργείται από την μετακίνηση των ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Η καταγραφή της διαφοράς δυναμικού επιτυγχάνεται από τα δύο ηλεκτρόδια κατά μήκος του ισχιακού νεύρου.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο μεταδίδεται το ηλεκτρικό σήμα κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης των νευρικών αξόνων (ινών) και η λήψη του σήματος από τα εξωκυτταρικά καταγραφικά ηλεκτρόδια.

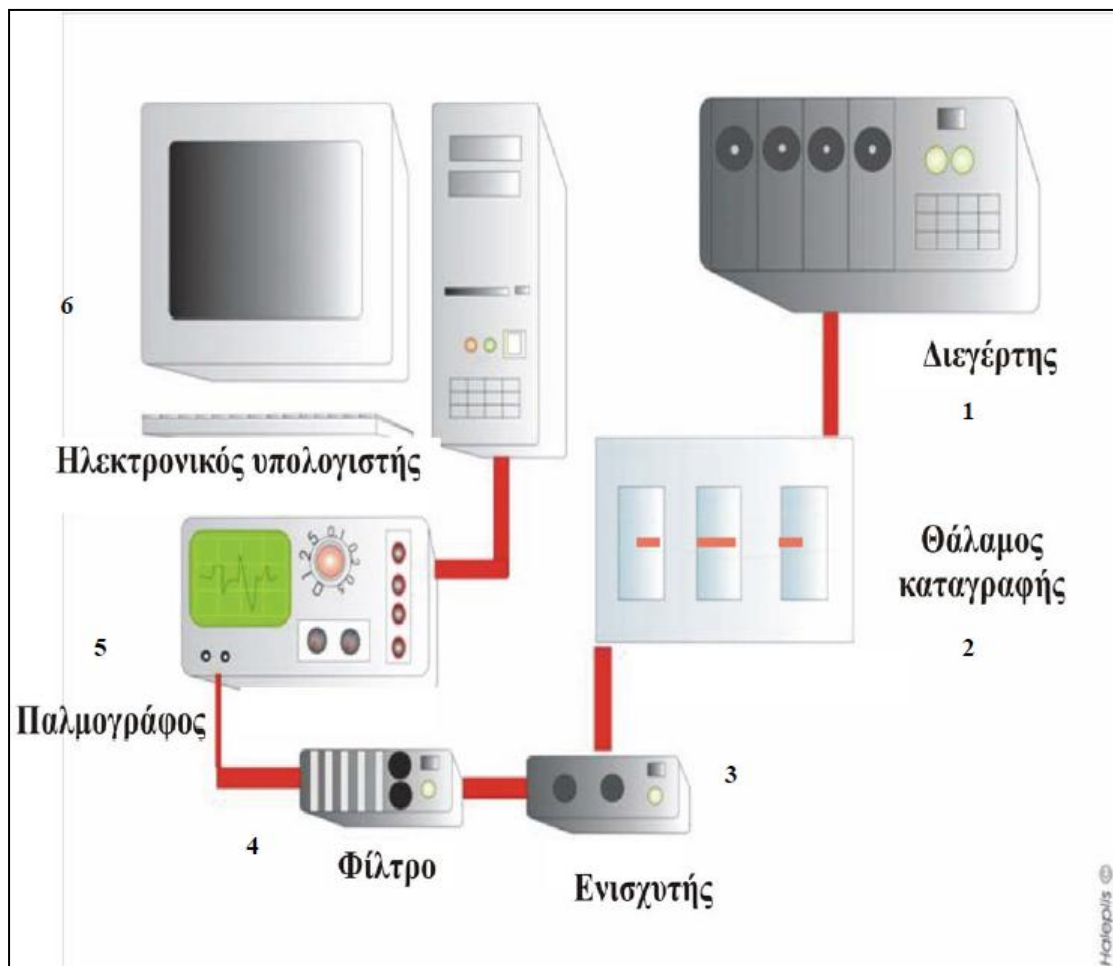
Με βάση τις ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους που εφαρμόζονται, το ΣΔΕ χρησιμοποιήθηκε ως ένδειξη της βιωσιμότητας καθώς και της φυσιολογικής λειτουργίας των περιφερικών νευρικών ινών. Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας αλλά και της λειτουργικότητας των νευρικών ινών, ο ιστός διεγείρεται συνεχώς σε όλη την πειραματική διαδικασία με την μέγιστη τάση διέγερσης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ειδική διάταξη διέγερσης. Ο διεγέρτης είναι συνεχούς και σταθερής τάσης (Digitimer DS9A, England, UK) και το ερέθισμα που προκαλεί αντιστοιχεί σε σταθερό δυναμικό ύψους 4-5V με διάρκεια 0,01ms ενώ η συχνότητα του ερεθίσματος μπορεί να μεταβάλλεται (1, 10, 100Hz) ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Το σήμα που λαμβάνεται από τα καταγραφικά ηλεκτρόδια, αρχικά περνά από τον

ενισχυτή της διάταξης (Neurolog NL822, Digitimer, England, UK) και στη συνέχεια εμφανίζεται σε παλμογράφο (Hameg 205). Το σήμα ψηφιοποιείται και καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με την χρήση δύο λογισμικών τα οποία είναι τα HAMEG και Labview 5.1.

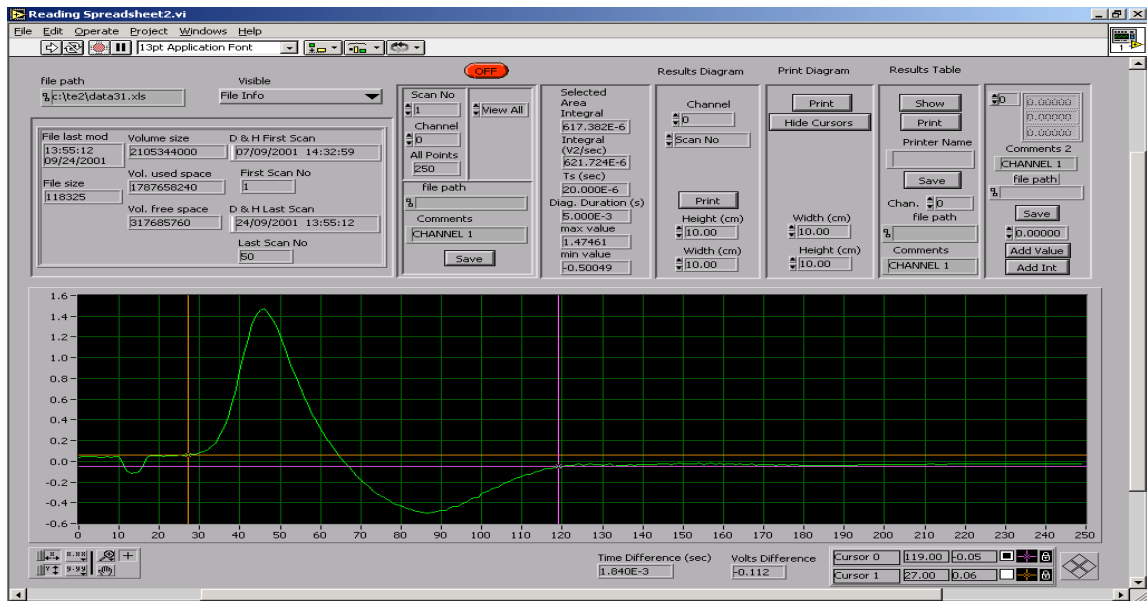
Για την αξιολόγηση της νευροτοξικής δράσης χημικών παραγόντων καθώς και της καταπόνησης από την εφαρμογή δεύτερου ερεθίσματος (ηλεκτρικού παλμού) στην σχετική περίοδο ανερεθιστότητας του δυναμικού ενέργειας στην βιωσιμότητα και την φυσιολογική λειτουργία (ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες) των περιφερικών νευρικών ινών έγινε χρήση τριών παραμέτρων του ΣΔΕ. Η πρώτη παράμετρος αντιστοιχεί στο ύψος του ΣΔΕ και είναι η παράμετρος εκείνη που καθορίζει και την βιωσιμότητα των νευρικών ινών που απαρτίζουν το νεύρο. Το ύψος του ΣΔΕ αποτελεί το μέγιστο ύψος που μπορεί φτάσει το δυναμικό μετά από διέγερση του συνόλου των νευρικών αξόνων τόσο της μικρής όσο και της μεγάλης διαμέτρου. Συνεπώς, διέγερση του απομονωμένου ισχιακού νεύρου οδηγεί σε πλήρη διέγερση των επιμέρους νευρικών ινών που απαρτίζουν το ισχιακό νεύρο. Το ΣΔΕ που καταγράφεται αντιστοιχεί στο άθροισμα του συνόλου των δυναμικών ενέργειας που παράγονται από τις επιμέρους νευρικές ίνες. Συνεπώς, όσοι περισσότεροι νευρικοί άξονες διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι και το ύψος του ΣΔΕ που καταγράφεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι όταν το νεύρο αρχικά διεγείρεται οι πρώτες ίνες που διεγείρονται είναι και αυτές που διαθέτουν την μεγαλύτερη διάμετρο. Η αύξηση του ύψους του ΣΔΕ γίνεται σταδιακά μέχρις ότου να διεγερθούν όλες οι νευρικές ίνες ακόμα και αυτές με την μικρότερη διάμετρο και το ΣΔΕ να φτάσει τελικά στην μέγιστη τιμή του. Το ύψος του ΣΔΕ εκφράζεται σε Volts. Παράλληλα με το ύψος μετράται και αξιολογείται ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ (rising time) που αντιστοιχεί στον χρόνο εκπόλωσης (είσοδος ιόντων Na^+ , έξοδος ιόντων K^+) καθώς και το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εκπολωτικής και επαναπολωτικής φάσης του ΣΔΕ. Ο υπολογισμός των παραμέτρων που αναφέρθηκαν στηρίζεται στην θεωρία της αναλογικής/ψηφιακής ανάλυσης και επεξεργασίας. Ο χρόνος ανόδου και η διάρκεια του ΣΔΕ εκφράζονται σε msec.

Η βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ινών καθορίζεται από την τιμή IT_{50} και αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται προκειμένου το ύψος του ΣΔΕ να ελαττωθεί στο 50% της αρχικής (μέγιστης) τιμής του. Στα πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων του ίδιου χημικού παράγοντα γίνεται επιπλέον

υπολογισμός της ελάχιστης εκείνης συγκέντρωσης όπου παρατηρείται τοξική δράση. Η τιμή αυτή αναφέρεται ως NOEC (no-observed-effect concentration) ενώ επιπρόσθετα υπολογίζεται και η συγκέντρωση στην οποία η τιμή του IT_{50} βρίσκεται στο 50% της τιμή του μάρτυρα και καλείται IC_{50} (inhibitory concentration to 50).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος λήψης βιοηλεκτρικών σημάτων. Στο σχήμα απεικονίζονται ο διεγέρτης (1), ο καταγραφικός θάλαμος (2), ο ενισχυτής (3), το φίλτρο (4), ο παλμογράφος (5) και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής (6) όπου γίνεται καταγραφή του σήματος.



Εικόνα 19: Ενδεικτική καταγραφή του σύνθετου δυναμικού δράσης των περιφερικών νευρικών ιών με χρήση του λογισμικού Labview 5.1.

2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (*in vitro*)

2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

Οι απομονωμένοι πλέον ιστοί επωάζονται σε διάλυμα πρωτεασών το οποίο αποτελείται από πρωτεάση X και XIV (Sigma) σε διάλυμα HBS και σε αναλογία 1/1 για 40 λεπτά. Οι ιστοί τεμαχίζονται προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής του ιστού με τα ένζυμα εξασφαλίζοντας την πλήρη αποδιοργάνωση του εξωκυτταρικού δικτύου που περιβάλλει τα ιπποκαμπιαία κύτταρα. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης το σύνολο του ιστού μεταφέρεται σε φιλτραρισμένο (25 mm syringe filter) διάλυμα HBS ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος των πρωτεασών. Ακολουθούν συνεχείς αναρροφήσεις με χρήση γυάλινης πιπέτας μεσαίας διαμέτρου προκειμένου ο ιστός να ομογενοποιηθεί μηχανικά. Τα τμήματα του ιστού που δεν ομογενοποιούνται μεταφέρονται σε δεύτερο σωλήνα για περαιτέρω ομογενοποίηση και ακολουθεί φυγοκέντρηση με 1600 στροφές / λεπτό για 3 λεπτά. Στην συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος σε ισοσταθμισμένο, αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό (*Dulbecco's Modified Eagle's*

medium-DMEM) κατάλληλο για την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών. Τα δύο εναιωρήματα ενώνονται και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση στις 1400 στροφές / λεπτό για 2 λεπτά. Στην συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται και πάλι σε θρεπτικό υλικό (DMEM). Με την βοήθεια πιπέτας το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται σε πιάτα καλλιέργειας (Petri dishes, 35mm). Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετούνται για 1 ώρα σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας, υγρασίας και επιπέδων CO₂ προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στο τριβλίο όπου προηγουμένως έχει προστεθεί διάλυμα πολυ-L-λυσίνης. Μετά την επώαση γίνεται προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού . Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος τύπος κυττάρων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε μηχανικές καταπονήσεις οπότε ο χρόνος και η ένταση των αναρροφήσεων με την πιπέτα περιορίζονται στο ελάχιστο δυνατό.

2.3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Κατά τα πρώτα στάδια την κυτταρικής ωρίμανσης, οι νευρώνες παρουσία γλοιαδικών κυττάρων εκκινούν φυσιολογικές διαδικασίες όπως είναι ο σχηματισμός παραφυάδων, η κυτταρική προσκόλληση και η συναπτική διαμόρφωση. Ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις που χαρακτηρίζουν κάθε στάδιο ανάπτυξης, η κυτταρική καλλιέργεια αναπτύσσεται και σε διαφορετικό θρεπτικό υλικό. Συνεπώς, για τις δύο πρώτες ημέρες η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό ενώ στην συνέχεια αντικαθίσταται από θρεπτικό υλικό (Neurobasal medium) το οποίο καλύπτει τις μεταβολικές απαιτήσεις των νευρώνων και επιτρέπει την συνεχή ανάπτυξη και ωρίμανση. Πριν από οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία, οι καλλιέργειες πρέπει να επωαστούν σε θρεπτικό μέσο Neurobasal στον επωαστικό κλίβανο για τουλάχιστον 2-3 ημέρες επιπλέον. Στο χρονικό αυτό διάστημα η αναλογία των νευρώνων-γλοιαδικών κυττάρων σε κάθε πιάτο καλλιέργειας φτάνει στην επιθυμητή πυκνότητα για την εφαρμογή οποιασδήποτε πειραματικής συνθήκης και η ανάπτυξη των νευρώνων πλέον προσομοιάζει στο μέγιστο δυνατό τις *in vivo* συνθήκες.

2.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η μικροσκοπία φθορισμού αφορά στη μελέτη ουσιών που μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν. Βασική αρχή λειτουργίας είναι ο φθορισμός ο οποίος είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με τη παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Αν και μεσολάβησαν αρκετές δεκαετίες από τότε που χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τα μικροσκόπια αυτά, τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει δώσει μια νέα ώθηση στις επιστήμες που τα χρησιμοποιούν. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας (νόμος του Stokes). Επομένως μια φθορίζουσα ουσία μπορεί να διεγερθεί με μια ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους που είναι άορατη και να παραχθεί μια ακτινοβολία που να είναι ορατή να εκπέμπει δηλαδή στο ορατό. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για τη

παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, "χρωστικών", που φθορίζουν. Ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι συνηθισμένες ιστολογικές χρωστικές. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν υποστεί χρώση με φθοριοχρώματα αναφέρεται ως "δευτερογενής φθορισμός".

- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser. (Confocal Laser Scanning Microscope)

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης αν και βρίσκεται σε πολύ γρήγορη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια, η αρχή της λειτουργίας της πρωτοπεριγράφηκε από τον Minsky το 1961. Αντίθετα με το κλασσικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που λαμβάνει χώρα στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από 10 μm, στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδεις και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού (με πιο χρήσιμα peaks στα 488 και 514 nm που συμπίπτουν με το μήκος κύματος που διεγείρει στο μέγιστο τη φλουορεσκίνη και τη ροδαμίνη) ή ηλίου-νέου (με peak στα 633 nm για άλλα φθοριοχρώματα) ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (real time), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου και φυσικά μπορούν να ψηφιοποιηθούν για αποθήκευση ή εκτύπωση. Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να λαμβάνονται καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το

φθορισμό. Είναι γνωστό ότι είναι αδύνατον να παρατηρηθούν φθορίζοντα παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των 10 μm λόγω του σημαντικού θορύβου από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με τρισδιάστατες καλά εστιασμένες εικόνες που συγκρίνονται με εκείνες του ΗΜΣ αλλά που να μας δείχνουν συγχρόνως και τη κατανομή των φθοριοχρωμάτων.

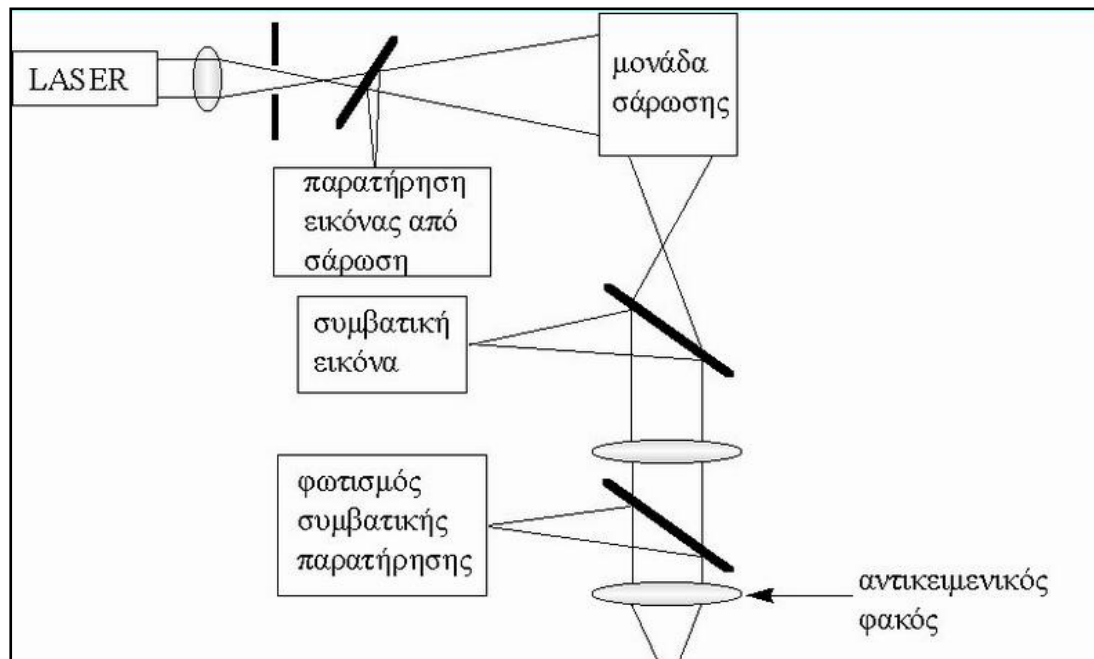
- Ιχνηθέτες φθορισμού (φθοριοχρώματα)

Ένα χρωμοφόρο ή ιχνηθέτης φθορισμού για ένα βιολογικό σύστημα, είναι ένα μικρό μόριο το οποίο παρέχει πληροφορίες για την περιορισμένη περιοχή στην οποία βρίσκεται (π.χ. θέση, ένταση). Οι μετρήσεις φθορισμού σχετίζονται είτε με την δομή του συστήματος το οποίο μετράται, είτε με την απόκριση του σε αλλαγές που οφείλονται στην αλληλεπίδραση του με το περιβάλλον. Τα χρωμοφόρα φθορισμού είναι οργανικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν είτε επιλεκτικότητα σε συστατικά του κυττάρου είτε είναι ευαίσθητα σε ενδοκυτταρικές αλλαγές. Οι ουσίες αυτές εισέρχονται στο κύτταρο είτε με μικροέγχυση, είτε με μια χημική μορφή η οποία μπορεί να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Η συνήθης μέθοδος είναι η εισαγωγή του χρωμοφόρου με την μορφή ακετοξυμεθυλεστέρα (AM), ο οποίος μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Όταν ο εστέρας βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, υδρολύεται από τις εστεράσες και το χρωμοφόρο μετατρέπεται στην ελεύθερη μορφή του η οποία είναι ικανή να δεσμευθεί από τις αντίστοιχες δομές ή τα ιόντα ανάλογα με την επιλεκτικότητα του. Τα χρωμοφόρα φθορισμού διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα σταθερού μήκους κύματος και τα μεταβλητού μήκους κύματος. Τα πρώτα κατά την δέσμευσή των ιόντων μεταβάλλουν την ένταση του φθορισμού τους ενώ τα δεύτερα μπορούν να μεταβάλλουν τόσο την ένταση του φθορισμού όσο και το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζουν τη μέγιστη εκπομπή ή απορρόφηση.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα φθοριοχρώματα

- Προπίδιο του ιωδίου (propidium iodide) (maximum excitation spectra of 493 nm and emission 636 nm).
- Καλσεΐνη (calcein AM) (maximum excitation spectra of 495 nm and emission 516 nm)

- Διχλωροφλουροσκεΐνη (DCFDA) (maximum excitation spectra of 495 nm - emission 529 nm).



Εικόνα: 20 Συνοπτική-σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου.

2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

2.5.1 ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ

Στα πειράματα όπου μελετήθηκε η δράση των διαφόρων μεταλλοϊόντων, το ισχιακό νεύρο του επίμοις τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής και παραμένει για μία ώρα χωρίς την προσθήκη της υπό μελέτης ουσίας (μόνο φυσιολογικός ορός) προκειμένου το ΣΔΕ να σταθεροποιηθεί. Ανάλογα με τις πειραματικές που εφαρμόζονται το νεύρο τοποθετείται παρουσία ή απουσία του επινευρίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη της υπό μελέτη χημικής ουσίας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Τα διαλύματα των ουσιών παρασκευάζονται πριν από την διεξαγωγή του κάθε πειράματος προκειμένου να διατηρήσουν άρτια την χημική τους σύσταση. Η προσθήκη γίνεται με αντικατάσταση του φυσιολογικού ορού που υπάρχει στο διαμέρισμα επώασης κατά την σταθεροποίηση, με νέο φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει διαλυθεί η χημική ένωση που εξετάζεται κάθε φορά στην επιθυμητή

συγκέντρωση. Όλες οι μεταλλοτοξίνες εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 500 μ M ενώ ειδικότερα ο Cu(II) ελέγχθηκε στις συγκεντρώσεις 1, 25, 75, 125, 250 και 500 μ M.

Στα πειράματα όπου ελέγχθηκε η επαναφορά του ΣΔΕ μετά από επίδραση με την εξεταζόμενη χημική ουσία, ο φυσιολογικός ορός με την διαλυμένη χημική ένωση αντικαθίσταται μετά το πέρας συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος και όταν το ΣΔΕ έχει ελαττωθεί τουλάχιστον κάτω από το 70% του αρχικού.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η δράση του Cu(II) αλλά παράλληλα να εκτιμηθεί και η δράση γνωστών αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών μορίων έναντι της τοξικής δράσης του Cu(II), πραγματοποιήθηκε προεπώαση του ισχιακού νεύρου του επίμυος για μια ώρα με διάφορες συγκεντρώσεις (125, 250, 500 μ M και 1mM) της N-ακετυλ-κυστεΐνης (NAC), του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), του κινικού οξέος (QA) καθώς και της N-τερτ-βουτυλ-α-φαινυλνιτρώνης (PBN). Αξίζει να αναφερθεί ότι το NAC δεν είναι τοξικό για το ισχιακό νεύρο του επίμυος σε συγκέντρωση μέχρι και 1 mM όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενη εργασία (Moschou et al., 2008). Το EDTA είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο χηλικοποιητικό μόριο, αποτελεί πολύτιμη θεραπεία έναντι στην δηλητηρίαση από μέταλλα με μεγαλύτερη σταθερά συναρμογής από ότι το ιοντικό ασβέστιο. Το κινικό οξύ αποτελεί πολυλειτουργικό συνδέτη, αλληλεπιδρώντας με μεταλλικά στοιχεία με ποικίλους τρόπους και είναι φυσικό αντιοξειδωτικό που απαντάται σε διάφορα φυτά όπως τα καρότα και τα φύλλα του καπνού σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις. Τέλος το PBN, είναι μια χημική ένωση η οποία δεσμεύει όλων των ειδών τις ελεύθερες ρίζες και όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως γίνεται με το NAC. Ειδικότερα για το EDTA και το QA πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητα πειράματα όπου προστίθεται μόνο η κάθε χημική ένωση αντίστοιχα προκειμένου να εκτιμηθεί η ενδεχόμενη τοξική δράση του αντιοξειδωτικού ή χηλικοποιητικού παράγοντα πριν εξετασθεί συνδυαστικά με τον Cu(II). Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν είναι 0,5 και 1 mM και προκύπτουν από την στοιχειομετρική αναλογία με την μεταλλοτοξίνη του Cu(II). Όλες οι χημικές ενώσεις που εξετάζονται είναι υδατοδιαλυτές και τα διαλύματα παρασκευάζονται πάντα πριν από την προσθήκη τους στο διαμέρισμα εμποτισμού.

2.5.2 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.5.2.1 Cis-platin

Στα πειράματα όπου έγινε έλεγχος της δράσης της αντικαρκινικής ουσίας cis-platin, μετά την τοποθέτηση του ισχιακού νεύρου του επίμυος (απαλλαγμένο από το επινεύριο) στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής το νεύρο παραμένει για μια ώρα στον τρίχωρο θάλαμο χωρίς την προσθήκη της υπό μελέτη χημικής ένωσης προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ύψος του ΣΔΕ. Οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε φυσιολογικοί είτε διαβητικοί (πρόκληση επίκτητου σακχαρώδη διαβήτη με εφαρμογή συγκεκριμένου πρωτοκόλλου). Στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη της cis-platin στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και οι οποίες ήταν 100 και 200 μM . Η cis-platin ήταν διαλυμένη σε διάλυμα NaCl 0.09% σε συμπυκνωμένο διάλυμα 1 mM και αποθηκευόταν στην κατάψυξη ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.5.2.2 Οξαλιπλατίνα

Η οξαλιπλατίνα αποτελεί και αυτή ένωση η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαρκινικό φάρμακο. Στόχος της εργασίας αποτέλεσε η σύγκριση του τρόπου δράσης των δύο αντικαρκινικών παραγόντων στο ισχιακό νεύρο του επίμυος τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και σε διαβητικά. Η οξαλιπλατίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100 μM η οποία εμπίπτει σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου (Kagiava et al., 2008). Η οξαλιπλατίνα προστίθεται στο διαμέρισμα εμποτισμού αφού πρώτα διαλυθεί σε φυσιολογικό ορό. Η οξαλιπλατίνα ήταν διαλυμένη σε γλυκόζη 5% σε συμπυκνωμένο διάλυμα 5 mg/ml και αποθηκευόταν στην κατάψυξη ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΝΕΥΡΙΟΥ

Είναι γνωστό ότι το επινεύριο διαδραματίζει ρόλο αιματο-νευρικού φραγμού για το ισχιακό νεύρο έχοντας ανάλογο ρόλο με τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη του ρόλου του επινευρίου στο ΠΝΣ παρουσία χημικών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα του Cu(II) στο ισχιακό νεύρο του επίμυος. Η μελέτη βασίζεται στην σύγκριση της απόκρισης του ισχιακού νεύρου κατά την παρουσία και απουσία αντίστοιχα του επινευρίου. Στα πειράματα όπου απαιτείται η απουσία του επινευρίου, γίνεται αφαίρεση αυτού κάτω από στερεοσκόπιο με χρήση μικροεργαλείων. Τα νεύρα τοποθετούνται και πάλι στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής και η υπό μελέτη ουσία προστίθεται στην επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μία ώρα σταθεροποίησης του ΣΔΕ. Η συγκέντρωση που

εξετάστηκε ήταν η μέγιστη που ελέγχθηκε στην παρούσα εργασία (500 μM). Η ίδια συγκέντρωση ελέγχθηκε και στην περίπτωση παρουσίας του επινευρίου. Ο υπολογισμός του συντελεστή του επινευρίου γίνεται λαμβάνοντας τον λόγο του IT_{50} του $\Sigma\Delta\text{E}$ απουσία του επινευρίου προς το IT_{50} του $\Sigma\Delta\text{E}$ παρουσία του επινευρίου.

2.5.4 ΣΗΜΑΝΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΧΛΩΡΟΦΛΟΥΡΟΣΚΕΪΝΗ (DCFDA)

Η χρωστική DCFDA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ελεύθερων ριζών μετά από την επίδραση με 500 μM Cu(II) . Στα πειράματα αυτά κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί απλός μάρτυρας αλλά και θετικός μάρτυρας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς αποτελεί γνωστό οξειδωτικό παράγοντα που οδηγεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Αρχικά, τα ισχιακά νεύρα εκτίθενται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και Cu(II) αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα ισχιακά νεύρα επωάζονται σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) στο οποίο είχε προστεθεί DCFDA σε τελική συγκέντρωση 5 και 10 μM για 45 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο. Το DCFDA ήταν διαλυμένο σε DMSO σε συμπυκνωμένο διάλυμα 100 μM στους -20°C . Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το διάλυμα του DCFDA και πλένονται με PBS. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Το κάθε παρασκεύασμα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με διάλυμα PBS και αφού τοποθετηθεί καλυπτρίδα γίνεται παρατήρηση και λήψη εικόνων σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης.

2.5.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ – ΕΦΑΡΜΟΓΗ 2^{ΟΥ} ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ ΣΤΗΝ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΡΕΘΙΣΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ

Ανερέθιστη περίοδος

Όταν ένα νευρικό κύτταρο διεγείρεται, η πλασματική του μεμβράνη μπορεί να παραμένει εντελώς ανεπηρέαστη σε μια περαιτέρω διέγερση κατά το μέγιστο της διάρκειας του δυναμικού ενέργειας.

Το χαρακτηριστικό αυτό υποδεικνύει ότι όσο έντονος και αν είναι ο ερεθισμός που μπορεί να δεχθεί, δεν είναι δυνατή η πυροδότηση ενός δεύτερου δυναμικού

ενέργειας. Η κατάσταση αυτή όπου δεν είναι δυνατό να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας αντιστοιχεί στην απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Κατά την διάρκεια της ανερέθιστης περιόδου παρατηρείται τασεοελεγχόμενη αδρανοποίηση των περισσοτέρων διαύλων Na^+ με αποτέλεσμα να μην ανοίγουν ξανά πριν η μεμβράνη επαναπολωθεί και πάλι. Προκειμένου να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας κατά το τελευταίο στάδιο της διάρκειας ενός δυναμικού απαιτείται ερέθισμα ισχυρότερο από το κανονικό. Το χρονικό αυτό διάστημα στο οποίο μπορεί να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας καλείται σχετική ανερέθιστη περίοδος. Στην αρχή της περιόδου αυτής όπου το δυναμικό ενέργειας δεν έχει επανέλθει πλήρως στα επίπεδα του δυναμικού ηρεμίας, ορισμένοι διάλυτοι Na^+ έχουν υποστεί τασεοελεγχόμενη αδρανοποίηση και για τον λόγο αυτό απαιτείται ισχυρότερο ερέθισμα ώστε να ανοίξει ο κρίσιμος εκείνος αριθμός διαύλων Na^+ που απαιτείται για να πυροδοτηθεί ένα δυναμικό ενέργειας. Επιπλέον, καθ όλη την διάρκεια της ανερέθιστης περιόδου παρατηρείται αυξημένη αγωγιμότητα ως προς τα ιόντα καλίου. Το γεγονός αυτό παρεμποδίζει την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης συμβάλλοντας έτσι στην ανερεθιστότητα (Berne & Levy, 2000).

Η εφαρμογή δεύτερου ερεθίσματος κατά το τελευταίο στάδιο της διάρκειας ενός δυναμικού ενέργειας, δηλαδή η εφαρμογή δεύτερου παλμού κατά την διάρκεια της σχετικής ανερέθιστης περιόδου, χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία α) για την ανάπτυξη μοντέλου αξιολόγησης και ανίχνευσης περιφερικής νευροπάθειας η οποία οφείλεται στον σακχαρώδη διαβήτη, β) για την αξιολόγηση και περαιτέρω εφαρμογή του μοντέλου στην ανίχνευση περιφερικής νευροπάθειας από καταπονητικούς παράγοντες και γ) για την αξιολόγηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης διαφόρων χημικών ενώσεων έναντι των καταπονητικών παραγόντων που μελετώνται. Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκε η νευροπροστατευτική δράση του χηλικοποιητικού μορίου EDTA έναντι στην τοξική δράση του μεταλλοϊόντος Cu(II) .

Αρχικά κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος της απόδοσης της μεθόδου. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ζώα φυσιολογικά, ενήλικα τα οποία ήταν ηλικιακά μεγαλύτερα των 3-4 μηνών καθώς και ζώα διαβητικά. Είναι γνωστό ότι ο σακχαρώδης διαβήτης είναι στενά συνδεδεμένος με πρόκληση νευροπάθειας.

Για την εκτέλεση των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν απαιτείται η αφαίρεση του επινευρίου. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής όπως

και στην περίπτωση των εξωκυττάρων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών η οποία περιγράφεται παραπάνω. Το ισχιακό νεύρο παραμένει στον τρίχωρο θάλαμο για μία ώρα προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ και στη συνέχεια διεγείρεται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1Hz (που εφαρμόζεται σε όλα τα άλλα πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν) ενώ παράλληλα με χρήση ειδικής διάταξης εφαρμόζεται δεύτερος ηλεκτρικός παλμός σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της σχετικής ανερέθιστης περιόδου. Για την αξιολόγηση του μοντέλου πέραν από τις δύο διακριτές ομάδες ζώων πραγματοποιήθηκε και παραμετροποίηση του συστήματος και έτσι τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Αρχικά εφαρμόστηκε υψηλή συχνότητα διέγερσης 90Hz και ο δεύτερος παλμός εφαρμόστηκε 2,2 msec ή 4,2 msec από την έναρξη της σχετικής περιόδου ανερεθιστότητας. Στην δεύτερη ομάδα πειραμάτων η συχνότητα μειώθηκε στα 50 Hz και η χρονική στιγμή εφαρμογής του δεύτερου παλμού ήταν 2,2 msec μετά την έναρξη της σχετικής περιόδου ανερεθιστότητας. Επιπλέον στα πλαίσια αξιολόγησης του μοντέλου ελέγχθηκε και η βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου του επίμους υπό την εφαρμογή απλού παλμού σε συνθήκες αυξημένης διέγερσης (100 Hz) τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε διαβητικά ζώα.

2.5.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ *in vitro*

2.5.6.1 Αξιολόγηση βιωσιμότητας-Προσδιορισμός ζωντανών / νεκρών κυττάρων

Προκειμένου να διερευνηθεί η νευροτοξική δράση διαφόρων ουσιών είναι απαραίτητη σε διακριτά και συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης της καλλιέργειας η χρήση συγκεκριμένων ουσιών για την ανίχνευση και μελέτη δυνητικά τοξικών παραγόντων. Για να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα των νευρωνικών και γλοιαδικών κυττάρων οι χρωστικές αυτές πρέπει να έχουν α) την ιδιότητα να ανιχνεύουν και προσδένονται μόνο σε ζωντανά κύτταρα, β) την ικανότητα ανίχνευσης και πρόσδεσης σε μη ζωντανά κύτταρα και γ) να μπορούν να αποδίδουν μια συνολική εικόνα όλων των κυττάρων σε ένα δείγμα της καλλιέργειας. Σημαντική προϋπόθεση στα πειράματα αυτά αποτέλεσε η ύπαρξη ανιχνευτών οι οποίοι φέρουν διαφορετικό χαρακτηριστικό χρώμα ο καθένας το οποίο εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χωρίς αλληλοεπικάλυψη με την απορρόφηση τους στο φως.

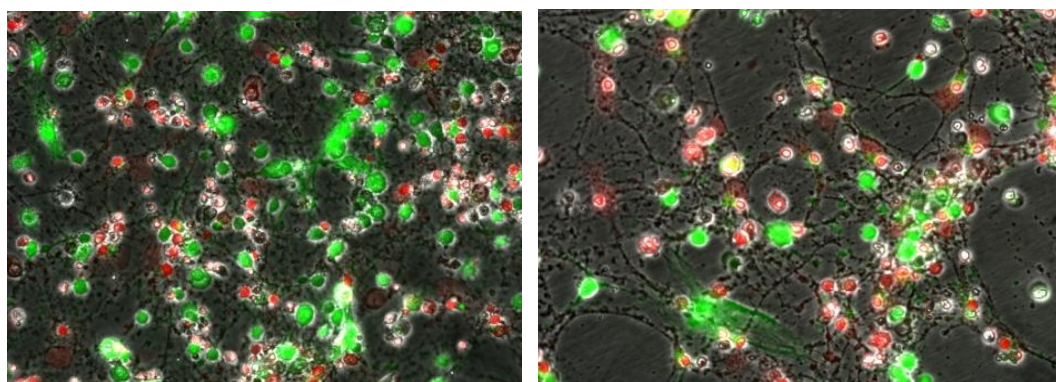
Για τον προσδιορισμό των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το kit: Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma) κατάλληλο για μέτρηση φθορισμού. Η καλσεΐνη (Calcein-AM) είναι λιπόφιλο μόριο το οποίο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Η ουσία αυτή είναι μη φθορίζουσα όταν βρίσκεται εντός των κυττάρων ωστόσο μετά από την ενζυματική της διάσπαση από μια εστεράση καθίσταται φθορίζουσα. Η καλσεΐνη διαθέτει μόρια τα οποία φθορίζουν σε πράσινο φάσμα φωτός. Πιο συγκεκριμένα, η ουσία αυτή διεγείρεται σε μήκος κύματος 495 nm και εκπέμπει στα 516nm. Όταν τα κύτταρα επωαστούν με καλσεΐνη και ακολουθήσει διέγερση στα 490 nm, αυτό υποδεικνύει ότι η ενζυματική δραστηριότητά τους δεν έχει διαταραχθεί και άρα η βιώσιμη κυτταρική δραστηριότητα είναι ανιχνεύσιμη. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα δεν φθορίζουν τότε είναι νεκρά.

Συνδυαστικά με την καλσεΐνη χρησιμοποιείται το ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το PI είναι μια χρωστική της πυρηνικής μεμβράνης η οποία εισέρχεται στα κύτταρα μόνο όταν χαθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης, υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την νέκρωση ή απόπτωσή τους. Η βέλτιστη διέγερση του PI είναι στα 535 nm και εκπέμπει στα 636 nm.

Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι 10 μ l καλσεΐνης μαζί με 2 μ l PI σε 5 ml διαλύματος HBS σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση των κυττάρων με τις υπό μελέτη τοξίνες ή νευροπροστατευτικούς παράγοντες και ανάλογα πάντα με το πρωτόκολλο του πειράματος που εφαρμόζεται, τα κύτταρα πλένονται με προθερμασμένο διάλυμα HBS και στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα μίγματος Calcein/PI. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάζονται σε σκοτεινό θάλαμο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πάλι ακολουθούν δύο πλύσεις με HBS. Η απεικόνιση και παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού διεγείροντας στα 490 και 535 nm. Τα εκπεμπόμενα μήκη κύματος λαμβάνονται με χρήση κατάλληλων φίλτρων FITC (πράσινο) για την καλσεΐνη και Rhod (κόκκινο) για το PI.

2.5.6.2 ΛΗΨΗ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κάθε επεξεργασμένο τριβλίο θεωρείται ανεξάρτητο δείγμα της καλλιέργειας. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, έξι περιοχές της καλλιέργειας σε κάθε τριβλίο επελέγησαν για λήψη των εικόνων με εναλλασσόμενη διέγερση (multichannel acquisition) στα 490 και 535 nm. Επιπλέον, σε κάθε λήψη περιλαμβάνεται και μια λήψη στο φως εκπομπής (transmitted) για την διευκόλυνση της διάκρισης και αναγνώρισης των νευρωνικών και γλοιαδικών κυττάρων.



Εικόνα 21: Μικροφωτογραφία δείγματος πρωτογενούς μονοστρωματικής κυτταρικής καλλιέργειας μετά από χρώση με calcein AM και PI για τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης.

2.5.6.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ Cu(II)-glycinate (*in vitro*)

Οι καλλιέργειες επιλέγονται για την διεξαγωγή των πειραμάτων συνήθως αφού συμπληρωθεί χρονικό διάστημα 5-10 ημερών *in vitro*. Τα δείγματα που επιλέγονται πρέπει να διατηρούν στο μέγιστο δυνατό ενιαία ποιότητα, σύνθεση και πυκνότητα των κυττάρων. Οι υπό μελέτη ουσίες όπως είναι ο γλυκινικός χαλκός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, διαλύεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (HBS) στην επιθυμητή συγκέντρωση και στην συνέχεια προστίθενται στην καλλιέργεια. Κάθε τριβλίο αντιστοιχεί σε μία συνθήκη. Η επώαση των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιείται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα (στην προκειμένη περίπτωση, 3 ώρες) σε επωαστικό κλίβανο σταθερών συνθηκών 5% CO₂, 37°C.

2.5.6.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ EDTA και QA

Για την μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA έναντι του Cu(II), οι καλλιέργειες επωάστηκαν για μία ώρα μετά την προσθήκη του EDTA σε HBS σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 200, 400 μM) και στη συνέχεια προστέθηκε Cu(II)-glycinate χωρίς να προηγηθεί αφαίρεση του διαλύματος που περιέχει το EDTA. Η επώαση με τον Cu(II)-glycinate διήρκεσε 3 ώρες. Οι συγκεντρώσεις του Cu(II) εξαρτώνται από την συγκέντρωση του χαλκού προκειμένου να ελεγχθεί η στοιχειομετρική αναλογία μεταλλοτοξίνης-νευροπροστατευτικού παράγοντα και διαμορφώνονται ως εξής [(10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II)]. Η επώαση των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιείται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα σε επωαστικό κλίβανο σταθερών συνθηκών 5% CO₂, 37 °C. Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιείται και στην περίπτωση του QA με αναλογίες συγκεντρώσεων : (10 μM QA – 10 μM Cu(II), (20 μM QA – 10 μM Cu(II), (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 200 μM Cu(II), (400 μM QA – 200 μM Cu(II).

2.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ - ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του ύψους αλλά και των άλλων παραμέτρων που υπολογίζονται από την πειραματική διαδικασία, λαμβάνονται οι πραγματικές τιμές. Η κάθε ομάδα πειραμάτων αντιπροσωπεύει μια συνθήκη και η ομάδα αυτή αποτελείται από ανεξάρτητα πειράματα των οποίων οι επαναλήψεις είναι τουλάχιστον τρεις. Η χρονική διάρκεια του πειράματος εξαρτάται από το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται κάθε φορά και μπορεί να κυμαίνεται από 20 λεπτά έως και 30 ώρες. Κάθε πείραμα ξεκινούσε την χρονική στιγμή $t=0$. Όλες οι τιμές των πειραμάτων που αποτελούν μια ομάδα διαιρούνται με το μέσο όρο και με τον τρόπο αυτό εκφράζονται σαν ποσοστό του μέσου όρου. Στη συνέχεια ακολούθησε εξαγωγή του μέσου όρου και του τυπικού σφάλματος από όλες τις τιμές των επιμέρους πειραμάτων και έκφρασή τους σε εκατοστιαίο ποσοστό. Τα

αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Επιπλέον, πέραν των διαγραμμάτων της μεταβολής του ύψους ΣΔΕ σε σχέση με το χρόνο έγιναν και τα διαγράμματα δοσο-εξάρτησης. Για την εξαγωγή των διαγραμμάτων αυτών οι τιμές του IT_{50} των διαφορετικών συγκεντρώσεων μιας χημικής ένωσης εκφράστηκε σαν εκατοστιαίο ποσοστό της τιμής του IT_{50} του μάρτυρα μέσω του προγράμματος Prism 5 της εταιρείας Graph Pad Software και ακολούθως δημιουργήθηκε το διάγραμμα της εκατοστιαίας μεταβολής του IT_{50} σε σχέση με τη συγκέντρωση. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίστηκε η τιμή του IC_{50} , της τιμής της συγκέντρωσης στην οποία η τιμή του IT_{50} βρίσκεται στο 50 % σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα. Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν το Microsoft Excel 2003, το Origin Lab 7.5 και το Origin Lab 8.0 ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα InStat της εταιρείας Graph Pad Software. Οι τιμές του IT_{50} και του IC_{50} υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος Prism 5 της εταιρείας Graph Pad Software. Ο υπολογισμός των τιμών αυτών έγινε με τη χρήση των εκατοστιαίων ποσοστών των επιμέρους διαγραμμάτων και χρησιμοποιώντας το κατάλληλο μοντέλο συνάρτησης για κάθε διάγραμμα έγινε εξαγωγή των τιμών αυτών.

Στην περίπτωση των *in vitro* πειραμάτων, τα κύτταρα τα οποία επισημαίνονται με πράσινο αντιστοιχούν στα ζωντανά κύτταρα ενώ αυτά που επισημαίνονται με κόκκινο αντιστοιχούν στα νεκρά. Από τις έξι συνολικά εικόνες που λαμβάνονται από το κάθε τριβλίο υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, ο αριθμός των ζωντανών καθώς και ο αριθμός των νεκρών από κάθε διαφορετική συνθήκη. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με χρήση του λογισμικού Graphpad Prism®, έκδοση 5 Graphpad software, San Diego, CA, USA. Η ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με One-way Analysis of Variance (ANOVA) και post test αναλύσεις (Tukey). Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία μεταβολή των μέσων όρων σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ επιπλέον υπολογίζεται το στατιστικό λάθος (standard error mean-SEM).

2.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Rattus norvegicus (Wistar)

Ταξινομική κατάταξη των επίμυων:

Βασίλειο:	Ζώα (Animalia)
Φύλο:	Χορδωτά (Chordata)
Κλάση:	Θηλαστικά (Mammalia)
Τάξη:	Τρωκτικά (Rodentia)
Υπεροικογένεια:	Muridea
Οικογένεια:	Muridae
Υποοικογένεια:	Murinae
Γένος:	<i>Rattus</i>
Είδος:	<i>norvegicus</i>

2.8. ΧΗΜΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.8.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΟΝΟΪΔΡΙΚΟΣ *cis* ΔΙΣ(ΓΛΥΚΙΝΙΚΟΣ)ΧΑΛΚΟΣ(II) *cis*-Cu(gly)₂·H₂O

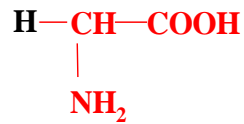
Τα φυσικά αμινοξέα αποτελούν τη βάση της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και διαφόρων ενζύμων. Παράλληλα, τα αμινοξέα στηρίζουν σημαντικά ανώτερες πρωτεϊνικές δομές και πιο συγκεκριμένα στην δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Έχει δειχθεί ότι τα αμινοξέα όντας δομικές μονάδες πολλών βιολογικών μεταλλομορίων μπορεί να αλληλεπιδρούν με μεταλλοϊόντα προσδίδοντας τους λειτουργικότητα. Κατά συνέπεια, η συναρμογή οργανικών μορίων, αμινοξέα, με μεταλλοϊόντα προσδίδει βιολογικές ιδιότητες τόσο στα αμινοξέα όσο και στα συναρμοζόμενα μεταλλοϊόντα. Το είδος της συναρμογής αυτής διακρίνεται σε μονοδοντική για κάθε αμινοξύ και πολυδοντική ανάλογα με την φύση του αμινοξέος καθώς και την φύση του μεταλλοϊόντος. Το χαρακτηριστικό αυτό επάγει φυσικοχημικές αλλαγές οι οποίες συνεπάγονται βιολογικές επιπτώσεις ήπιας ή δραστηκής μορφής. Κλασική περίπτωση συναρμογής αμινοξέος με μεταλλοϊόντα, όπως είναι ο χαλκός (Cu(II)), είναι η διαδικασία της χηλικοποίησης. Η χηλικοποίηση βασίζεται σε θερμοδυναμικά κριτήρια ως προς την εκλεκτικότητα σύνδεσης ενός μεταλλοϊόντος ενώ παράλληλα επηρεάζει τις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες είτε διατηρώντας την ακεραιότητα των φυσιολογικών αυτών διεργασιών

είτε προκαλώντας αποκλίσεις από την κυτταρική ομοιοστασία οδηγώντας έτσι σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος και ο νευροεκφυλισμός.

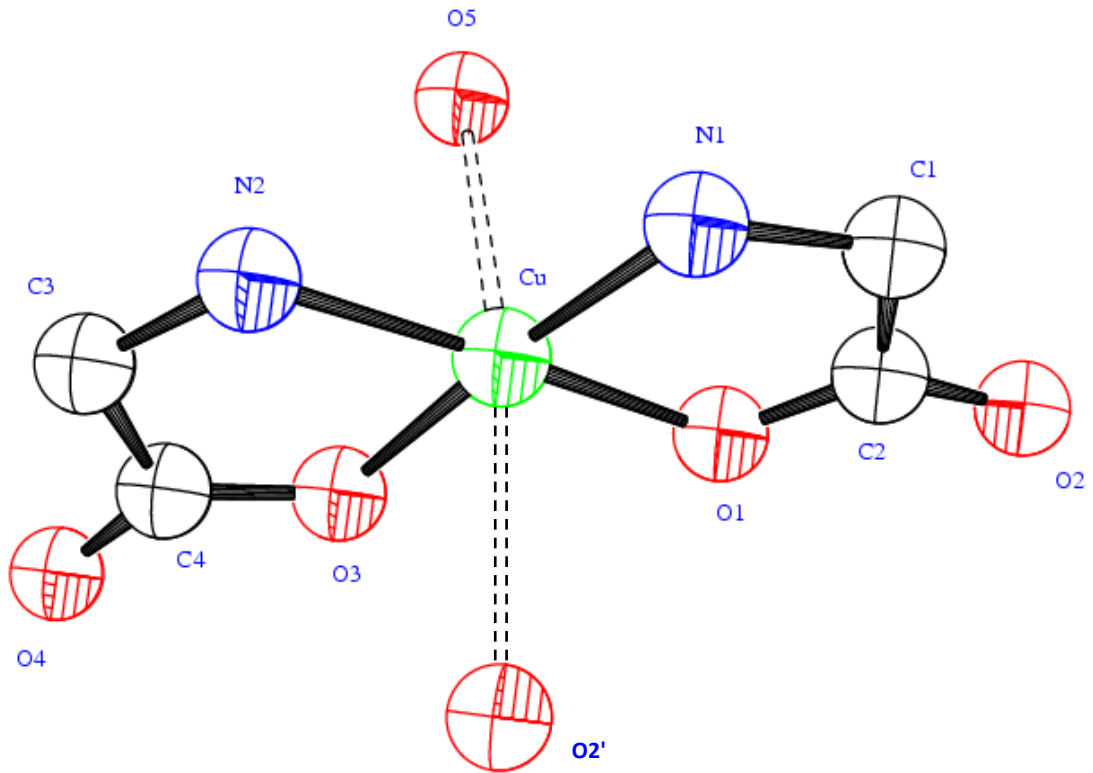
Εξέχοντα ρόλο στην βιολογική δραστικότητα ενός μεταλλοϊοντικού συμπλόκου διαδραματίζει η σχετική θέση των ατόμων του συναρμοζόμενου υποκαταστάτη γύρω από το μεταλλοϊόν. Συνεπώς, η γεωμετρική ισομέρεια σε ένα μεταλλοσύμπλοκο είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η φυσικοχημική ταυτότητα συνδέεται άμεσα με την βιολογική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο του λευκόχρυσου Pt με τους μονοδοντικούς υποκαταστάτες αμμωνία και Cl⁻, όπου το cis ισομερές [Pt(NH₃)₂Cl₂] είναι βιολογικά δραστικό αντικαρκινικό φάρμακο ενώ το trans ισομερές δεν εμφανίζει καμία δραστικότητα. Αν και η φύση του υποκαταστάτη που συναρμόζεται με το μεταλλοϊόν είναι και στις δύο περιπτώσεις μονοδοντική, η έννοια της επιλεκτικής βιολογικής δράσης εξαιτίας της διαφορετικής ισομέρειας γίνεται εμφανής. Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί το αργίλιο όπου η συμπλοκοποίηση του με διαφορετικό υποκαταστάτη επηρεάζει την διαλυτότητα, την βιοδιαθεσιμότητα και άρα τον βαθμό της δράσης του σε διάφορα βιολογικά συστήματα όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Στην παρούσα εργασία για τον έλεγχο της νευροτοξικής δράσης του Cu(II) επιλέχθηκε η cis μορφή του μονοϋδρικού γλυκινικού χαλκού. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση, σύνθεση και χαρακτηρισμός του cis-Cu(gly)₂·H₂O. Ο cis-γλυκινικός χαλκός είναι υδατοδιαλυτός και άρα κατάλληλος για την χρήση στα συγκεκριμένα πρωτόκολλα προκειμένου να μελετηθεί δράση του Cu(II) σε βιολογικά συστήματα σε αντίθεση με την ένωση CuCl₂ η οποία είναι αδιάλυτη σε pH 7,4 σε υδατικό διαλύτη. Η σύνθεση του επιθυμητού συμπλόκου πραγματοποιείται σε ποτήρι ζέσεως όπου διαλύεται ποσότητα μονοϋδρικού οξικού χαλκού (Cu(CH₃COOH)₂·H₂O σε 25 ml θερμού νερού. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 25 ml θερμής αιθανόλης και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται θερμό. Στη συνέχεια ποσότητα γλυκίνης ίση με 1,5 γραμμάρια (0,020 mol) διαλύεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 25 ml θερμού νερού. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται και διατηρούνται σε θερμοκρασία περίπου 70°C. Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο και σε σύντομο χρονικό διάστημα εμφανίζεται ίζημα το οποίο επικάθεται με την μορφή λεπτών βελονών. Το προϊόν απομονώνεται και ξηραίνεται.

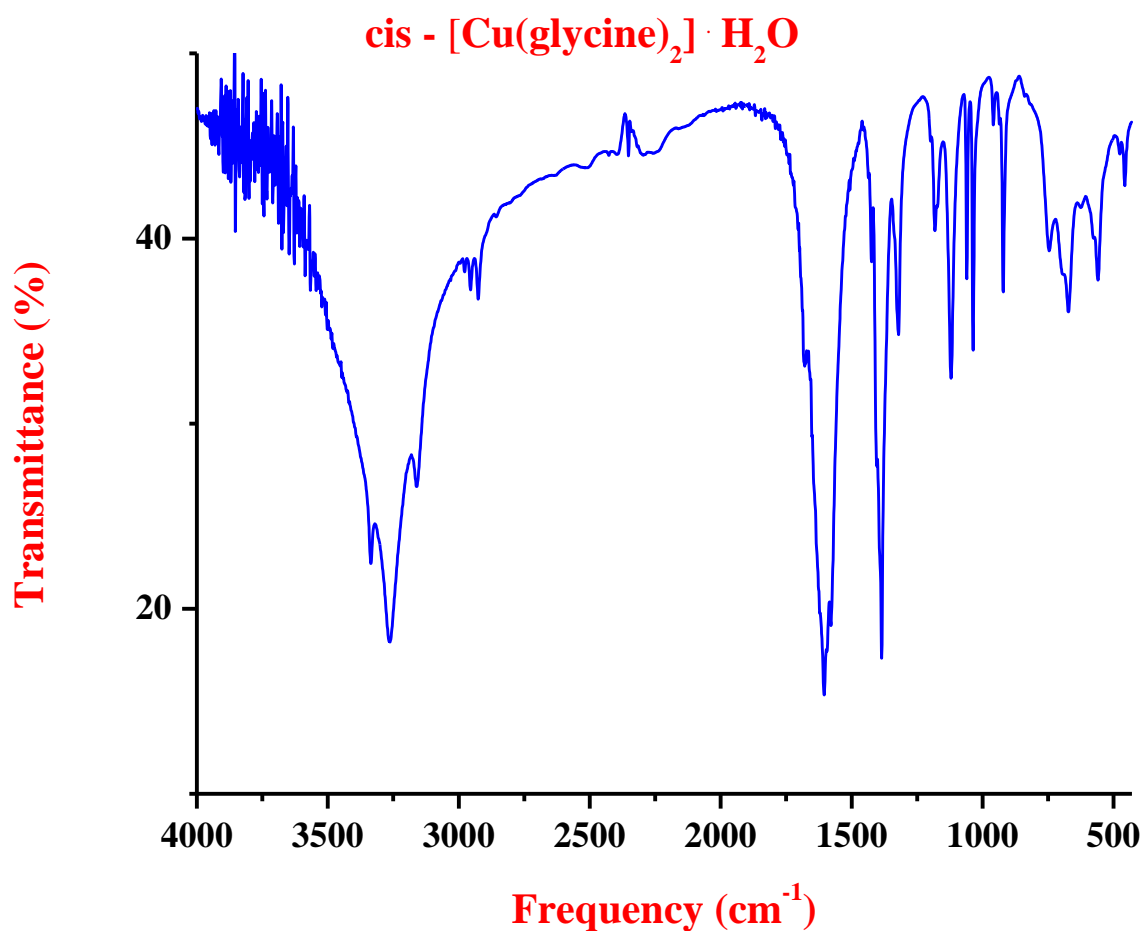
Σημαντικό μέρος της διαδικασίας χαρακτηρισμού ενός υλικού αποτελεί ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του. Στην προκειμένη περίπτωση ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτινών X ώστε να αποσαφηνιστεί η τρισδιάστατη δομή της ένωσης $\text{cis-Cu}(\text{gly})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$. Η κρυσταλλική δομή του cis ισομερούς του μονοεδρικού δις(γλυκινικού)χαλκού(II) υποδεικνύει την παρουσία δύο μορίων γλυκίνης τα οποία είναι συναρμοσμένα στο ιόν του Cu(II) . Τα δύο μόρια της γλυκίνης περιέχουν αποπρωτονιωμένα καρβοξύλια μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η συναρμογή του μεταλλοϊόντος. Κατά συνέπεια, το ολικό φορτίο του συμπλόκου που προκύπτει είναι μηδέν. Η συναρμογή των δύο αυτών υποκαταστατών γύρω από το μεταλλοϊόν του Cu(II) είναι τέτοια που οδηγεί στον σχηματισμό επίπεδου cis γεωμετρικού ισομερούς. Τα άτομα των O(1), O(3), N(1) και N(2) των δύο υποκαταστατών βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, με τις αποκλίσεις από το επίπεδο ελαχίστων τετραγώνων να κυμαίνεται από 0,019 έως 0,037 Å. Το ιόν του Cu(II) βρίσκεται 0,05 Å έξω από το επίπεδο αυτό προς την πλευρά του H_2O . Το τελευταίο βρίσκεται σε απόσταση 2,405(11) Å από το ιόν του χαλκού αναπτύσσοντας έτσι μια ασθενή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο. Επιπλέον, μια ακόμη ασθενέστερη αλληλεπίδραση αναπτύσσεται μεταξύ του ιόντος του Cu(II) και του οξυγόνου O(2'), το οποίο ανήκει στο καρβοξύλιο μορίου γλυκίνης ενός συμπλόκου του Cu(II) μιας γειτονικής ασύμμετρης μοναδιαίας κυψελίδας. Η απόσταση $\text{Cu}\dots\text{O(2')}$ υπολογίζεται σε 2,741(9) Å. Με βάση την περιγραφή του περιβάλλοντος συναρμογής οντότητας του Cu(II) που προηγήθηκε, η κρυσταλλογραφία δείχνει ότι το ιόν του Cu(II) βρίσκεται σε επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία τύπου cis ενώ επιπλέον βρίσκεται σε παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία όταν στη σφαίρα συναρμογής περιλαμβάνονται οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις με τα δύο άτομα οξυγόνου από το μόριο του νερού (O(5)) και το καρβοξύλιο (O(2')) της γλυκίνης γειτονικού μορίου. Οι τελευταίες αλληλεπιδράσεις δεν είναι δυνατό να χαρακτηρισθούν ως χημικοί δεσμοί καθώς τα μήκη τους είναι μεγαλύτερα από τα κλασικά μήκη δεσμών $\text{Cu}\dots\text{O}$ (1.946(9) – 1.957(9) Å).



Σχήμα 1: Το αμινοξύ γλυκίνη (gly)



Η ένωση $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ εμφανίζεται με δύο ισομερή, το *cis*- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ και το *trans*- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές. Από πλευράς συμμετρίας, το *cis*- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές επιδεικνύει περισσότερες ζώνες απορρόφησης στο IR (Σχήμα) από ότι το *trans*- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές. Τα φάσματα υπερύθρου (IR) έχουν μελετηθεί και για τα δύο ισομερή *cis* και *trans*.



Σχήμα: FT-IR φάσμα [Cu(γλυκινάτο)₂]·H₂O

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:

- 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate διχλωροφλουροσκεΐνη (C₂₄H₁₆Cl₂O₇) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Ιωδιούχο προπίδιο (C₂₇H₃₄I₂N₄) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- N-ακετυλ-κυστεΐνη (HSCH₂CH(NHCOCH₃)CO₂H) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- PBN *N-tert*-Butyl-*α*-phenylnitron από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)

- Το αντικαρκινικό φάρμακο οξαλιπλατίνα ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$) από την Sanofi-Aventis (Γαλλία)
- Το αντικαρκινικό φάρμακο cis platin από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$) από την Merck (Darmstadt, Γερμανία)
- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Xanthopren από την Heraeus Kulzer (Germany)
- HEPES από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χρωμιο (K_2CrO_4) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Σιδηρος ($FeCl_3$) την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Κοβάλτιο $CoCl_2$ την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Καλσεΐνη (Biochrom)
- Γλυκόζη την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)

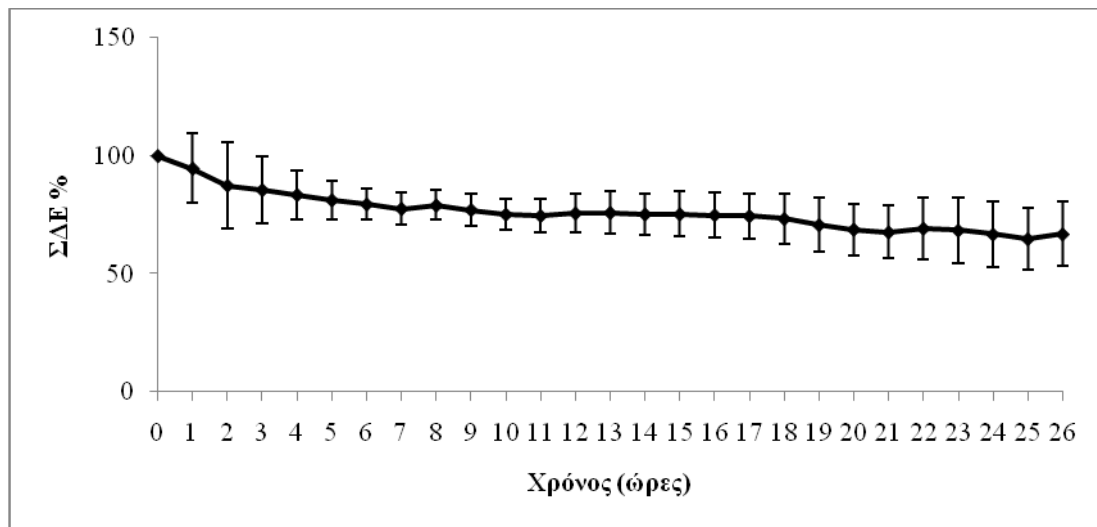
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες κανονικές συνθήκες (*ex vivo*)

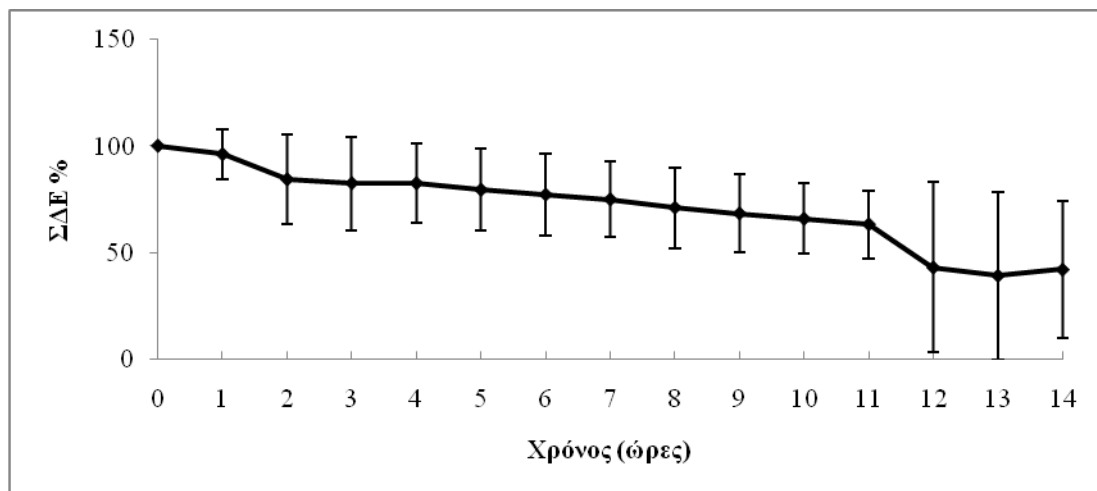
Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η μεταβολή του ύψους του ΣΔΕ. Η βιωσιμότητα είναι δυνατό να ελεγχθεί και μέσω της μεταβολής της ενέργειας του ΣΔΕ η οποία αντιστοιχεί στο ολοκλήρωμα της καμπύλης που προκύπτει από το ΣΔΕ. Ωστόσο, ο υπολογισμός της ενέργειας δίνει αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που προκύπτουν από τον υπολογισμό του ύψους. Επειδή ο υπολογισμός του ύψους μετράται πιο εύκολα συγκριτικά με την ενέργεια για το σύνολο των πειραμάτων στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται η μεταβολή του ΣΔΕ. Η βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου του επίμυος αξιολογήθηκε τόσο παρουσία όσο και απουσία του επινευρίου καθώς η αφαίρεσή του κρίθηκε αναγκαία σε ορισμένες ομάδες πειραμάτων προκειμένου να διευκολυνθεί η πρόσβαση της χημικής ουσίας που μελετάται στις νευρικές ίνες. Αρχικά, ο τρίχωρος θάλαμος καταγραφής, ο οποίος περιγράφεται παραπάνω, έφερε ηλεκτρόδια από άργυρο. Ενώ στη συνέχεια, στα πλαίσια βελτίωσης του συστήματος καταγραφής και αναζήτησης των βέλτιστων συνθηκών, τα ηλεκτρόδια αντικαταστάθηκαν από χρυσό. Η βελτιστοποίηση της βιωσιμότητας καθώς και η λήψη σταθερών μακροχρόνιων καταγραφών θεωρείται απαραίτητη για τον έλεγχο της επίδρασης χημικών ενώσεων των οποίων ο χρόνος δράσης είναι άγνωστος για το παρασκεύασμα που χρησιμοποιείται στην μελέτη αυτή.

Η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου είναι η τιμή IT_{50} , η οποία αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται ώστε το ύψος του ΣΔΕ να μειωθεί στο 50% της αρχικής του τιμής.

A

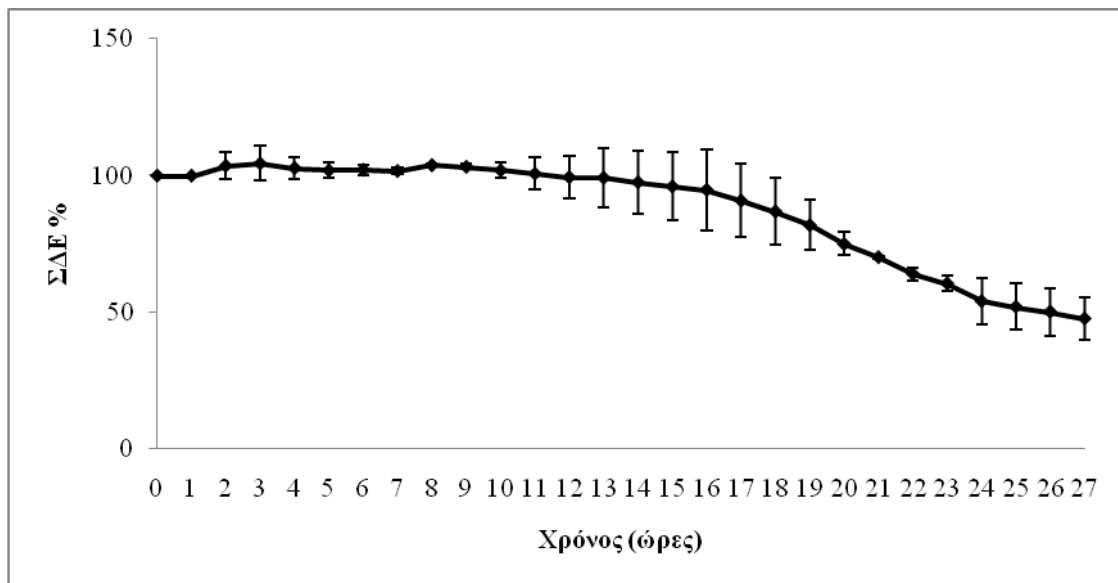


B

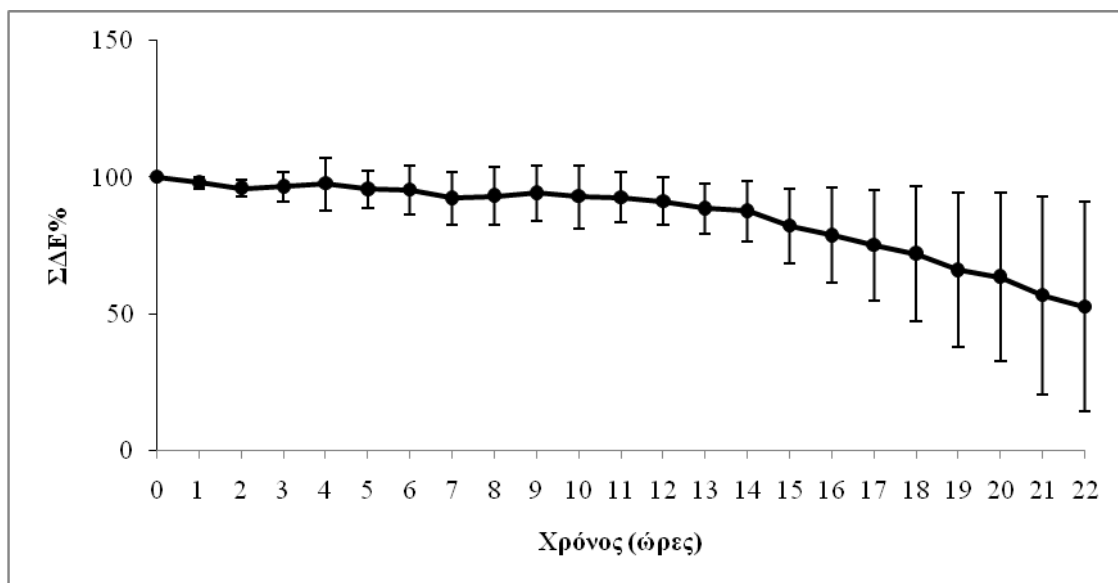


Εικόνα 22: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (A) και απουσία του επινευρίου (B) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων αργύρου στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

A

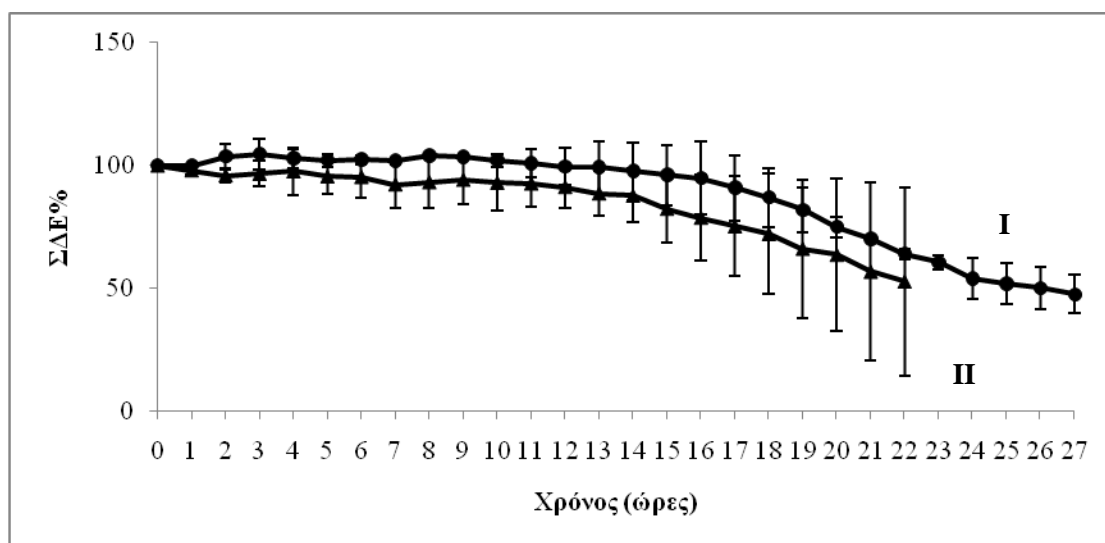


B



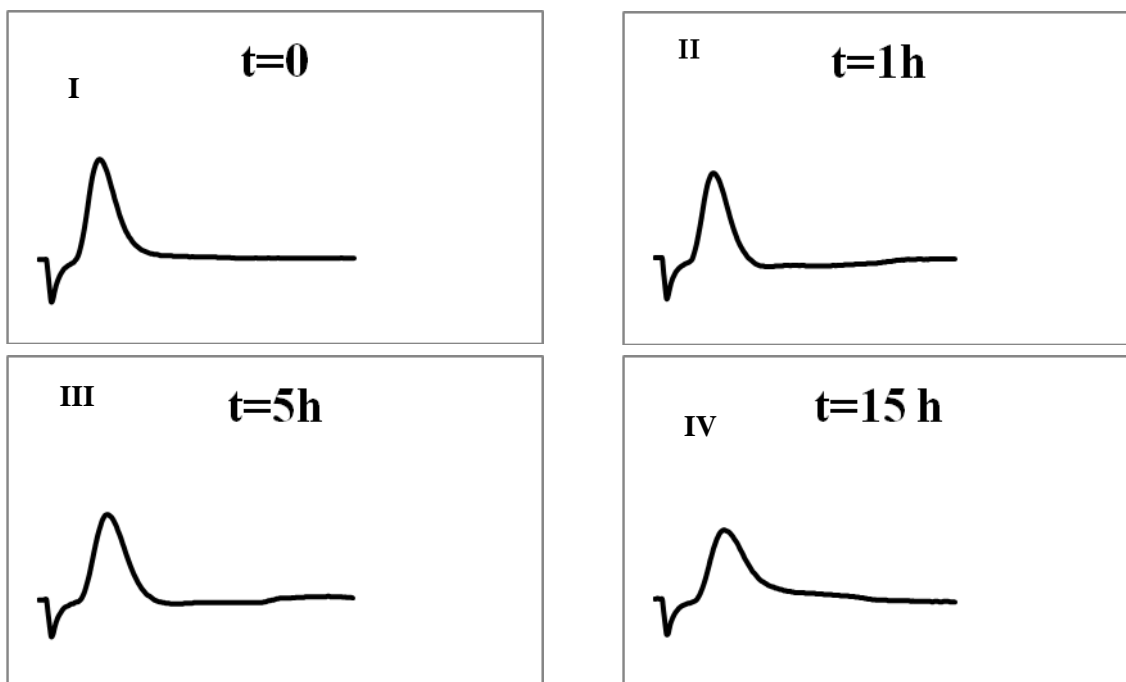
Εικόνα 23: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμουσ σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (A) και απουσία του επινευρίου (B) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Η τιμή του IT_{50} παρουσία επινευρίου είναι μεγαλύτερη των 26 ωρών ενώ απουσία του επινευρίου η τιμή του IT_{50} μειώνεται στις 11,5 ώρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην οξειδωτική δράση του αργύρου. Ο άργυρος είναι φωτοευαίσθητος και κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος ενδέχεται να παράγονται οξείδια τα οποία καταπονούν οξειδωτικά τις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου. Η οξειδωτική καταπόνηση γίνεται περισσότερο εμφανής στην περίπτωση όπου απουσιάζει το επινεύριο αφού οι ίνες έτσι είναι περισσότερο προσβάσιμες στις παραγόμενες ρίζες που μπορεί να παράγονται. Για τον λόγο αυτό τα ηλεκτρόδια του αργύρου αντικαταστάθηκαν με ηλεκτρόδια χρυσού. Ο χρυσός θεωρείται λιγότερο ενεργός χημικά σε σχέση με τον άργυρο χαρακτηριστικό που επιβεβαιώνεται από την σειρά δραστηρότητας των μετάλλων. Η τιμή του IT_{50} μετά την αντικατάσταση των ηλεκτροδίων αργύρου με ηλεκτρόδια χρυσού, έχει τιμή 24 ώρες παρουσία επινευρίου και 22 ώρες απουσία του επινευρίου. Στην συνέχεια γίνεται σύγκριση των δύο συνθηκών (παρουσία – απουσία του επινευρίου) όπου φαίνεται ότι η διατήρηση ή μη του επινευρίου δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των νευρικών ιών σε συνθήκες μάρτυρα.



Εικόνα 24: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Πέρα από την μεταβολή του ΣΔΕ, υπολογίστηκαν οι α) η μεταβολή του χρόνου της ανόδου καθώς και η διάρκεια του ΣΔΕ. Οι παράμετροι αυτές παρέμειναν σταθερές κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος χωρία να παρουσιάζουν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή.

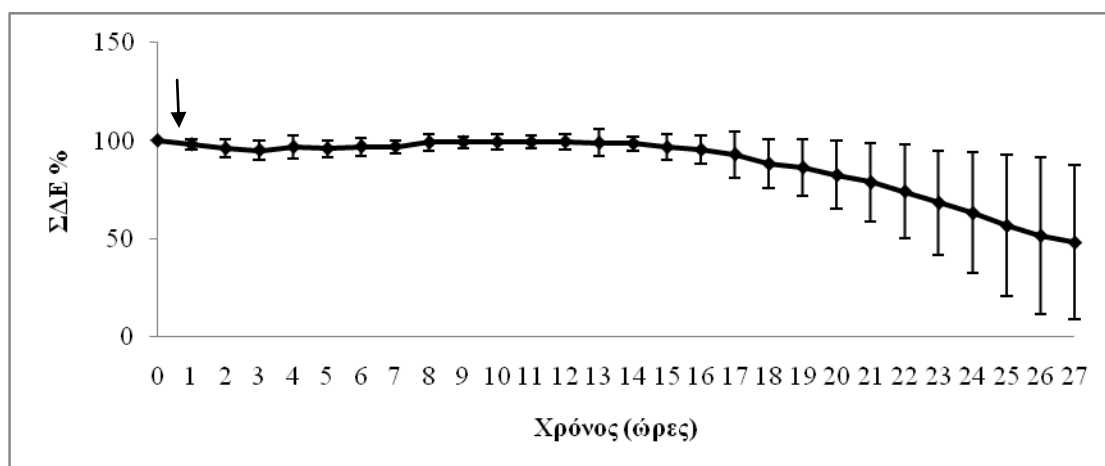


Εικόνα 25: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής την χρονική στιγμή $t=0$ (I), μετά από 1 ώρα (II), 5 ώρες (III) και 15 ώρες (IV).

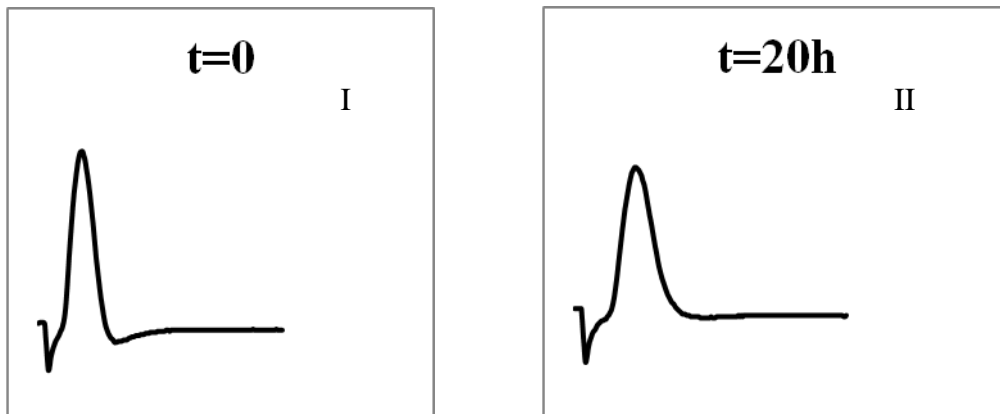
3.2 Βιωσιμότητα των περιφερικών ινών του ισχιακού νεύρου του επίμυος υπό την επίδραση μεταλλοτοξινών

3.2.1 Σίδηρος

Για την αξιολόγηση της δράσης του σιδήρου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχος σίδηρος (FeCl_3) η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το $\Sigma\Delta\text{E}$, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται FeCl_3 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως ο FeCl_3 δεν έχει καμία επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} ισούται με $25,5 \pm 0,07$ και δεν έχει σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, ο FeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του $\Sigma\Delta\text{E}$.



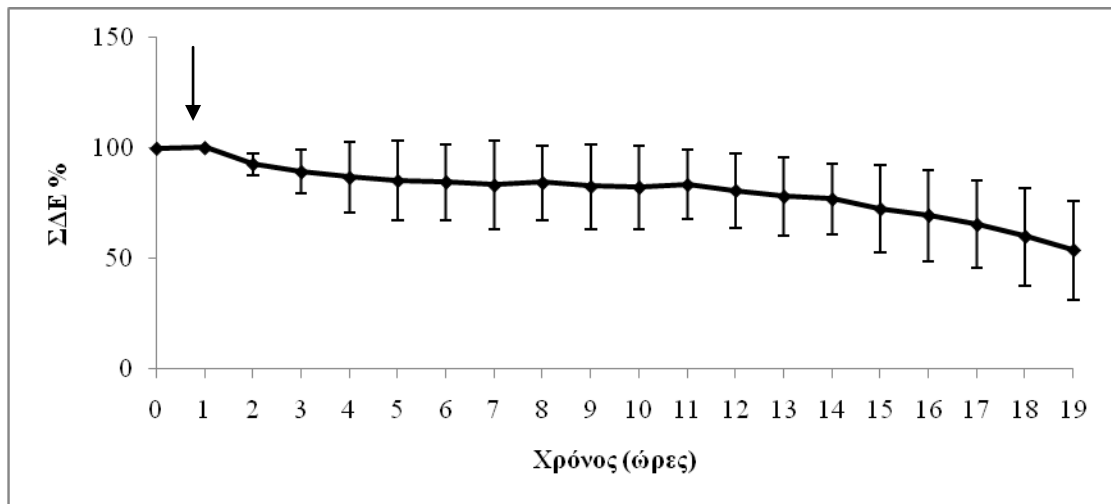
Εικόνα 20: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του $\Sigma\Delta\text{E}$ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του FeCl_3 σε συγκέντρωση 500 μM ($n=4$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του FeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



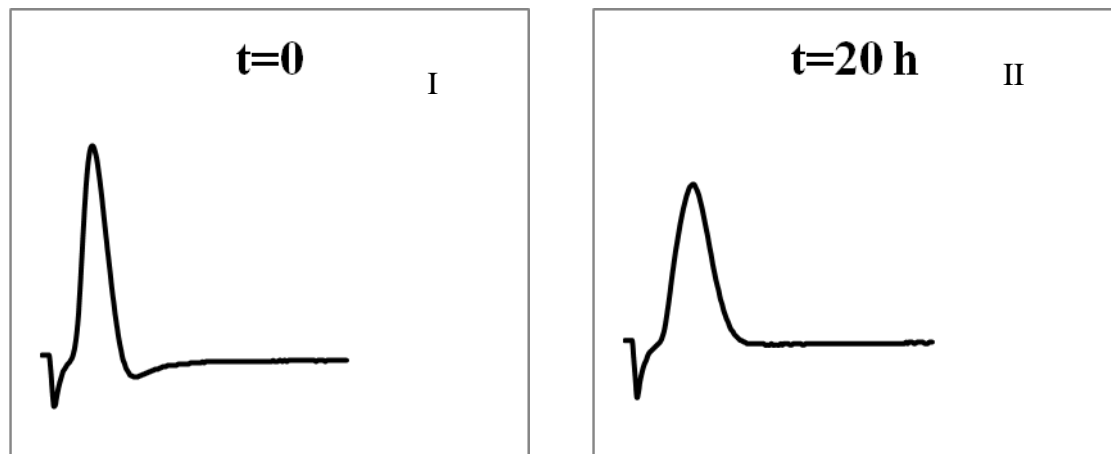
Εικόνα 27: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

3.2.2 Κοβάλτιο

Όμοια, για την αξιολόγηση της δράσης του κοβαλτίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο κοβάλτιο CoCl_2 , η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή, σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίγωνου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται CoCl_2 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το CoCl_2 δεν έχει σχεδόν καμία επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} δεν έχει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, όπως και ο FeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του ΣΔΕ.



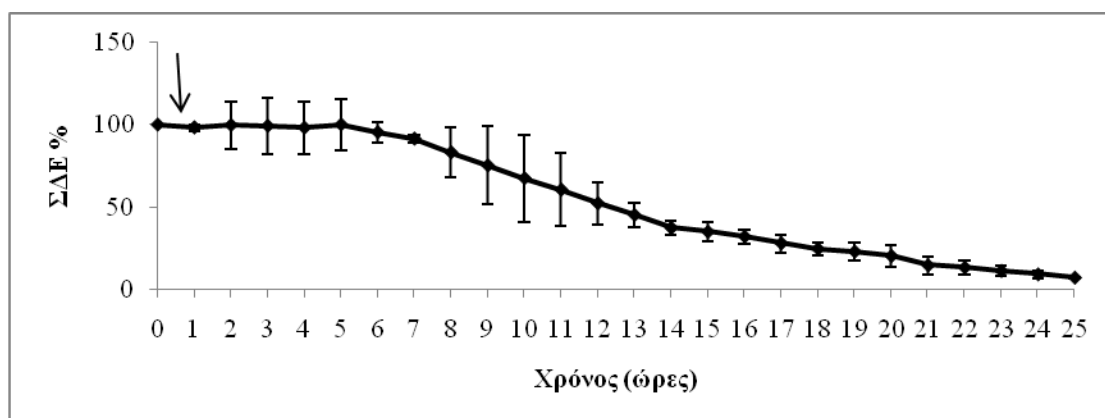
Εικόνα 28: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CoCl_2 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CoCl_2 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



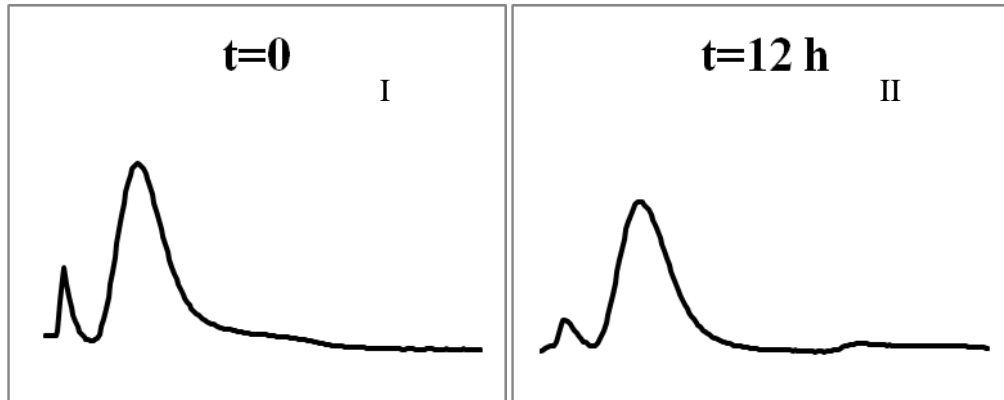
Εικόνα29: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

3.2.3 Δημήτριο

Στα ίδια πλαίσια, για την αξιολόγηση της δράσης του ιόντος του δημητρίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο δημήτριο CeCl_3 , η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή, σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το $\Sigma\Delta\text{E}$, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται CeCl_3 . Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως το CeCl_3 έχει σχεδόν ήπια επίδραση επί των νευρικών ιών καθώς η τιμή του IT_{50} αντιστοιχεί σε $12,22 \pm 0,24$ ώρες η οποία παρουσιάζει διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Ωστόσο, το CeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του $\Sigma\Delta\text{E}$.



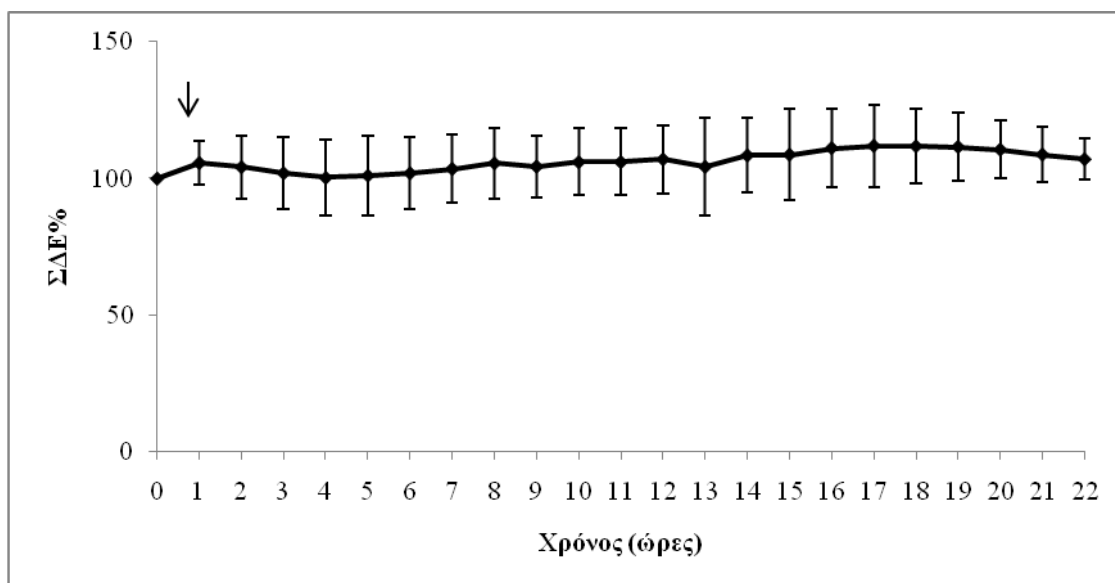
Εικόνα 30: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του $\Sigma\Delta\text{E}$ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CeCl_3 σε συγκέντρωση 500 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



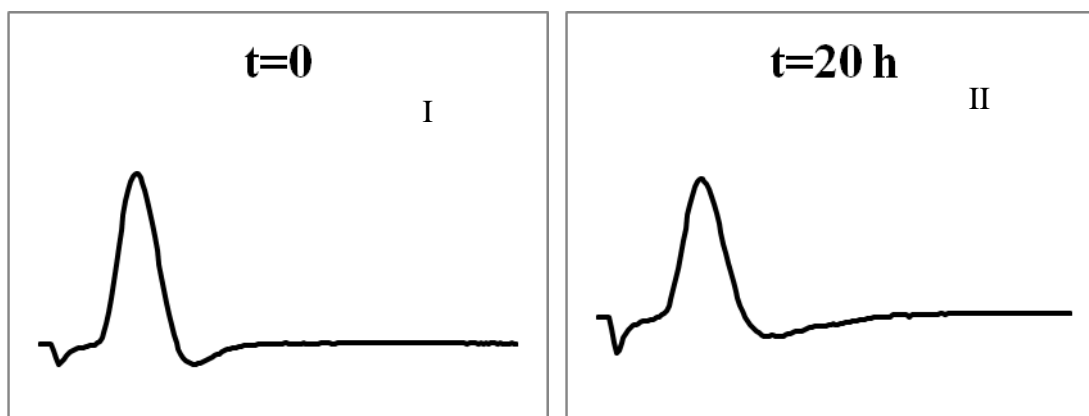
Εικόνα 31: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 12 ώρες (II).

3.2.4 Αργίλιο

Για την αξιολόγηση της δράσης του αργιλίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3) η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται AlCl_3 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το AlCl_3 δεν έχει καμία επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} δεν έχει σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, το AlCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του ΣΔΕ.



Εικόνα 32: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του AlCl_3 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του AlCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

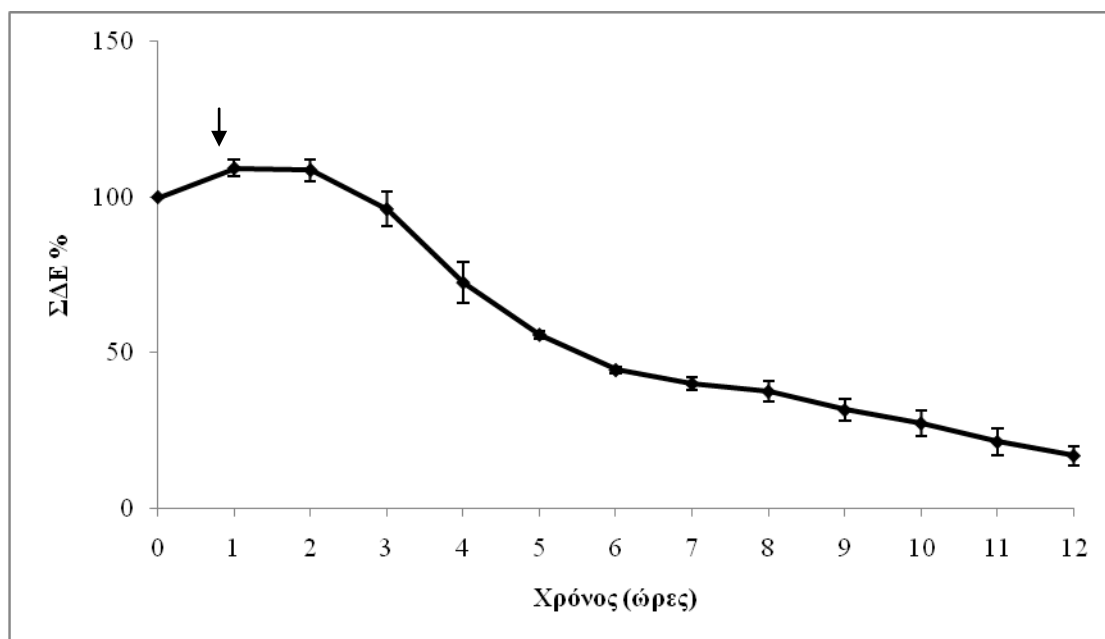


Εικόνα 33: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

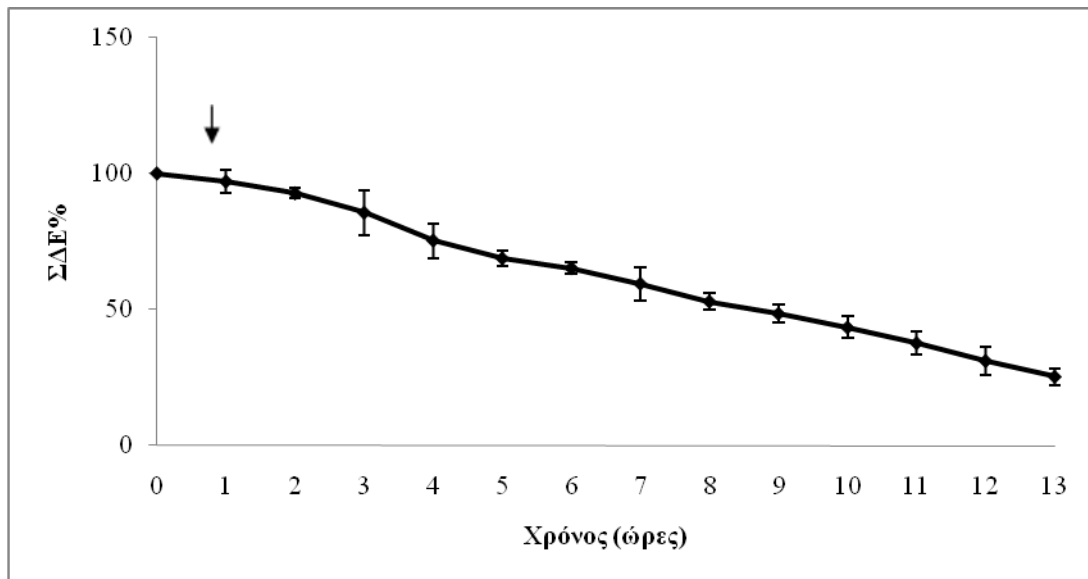
3.2.5 Χρώμιο

Όμοια, για την αξιολόγηση της δράσης του εξασθενούς χρωμίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χρωμικό κάλιο (K_2CrO_4), η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή σε αντίθεση με το χλωριούχο χρώμιο το οποίο σε pH 7.4 είναι αδιάλυτο σε υδατικό διαλύτη. Η συγκέντρωση που ελέγχθηκε είναι και εδώ $500 \mu\text{M}$. Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται το υπό μελέτη ιόν. Τα

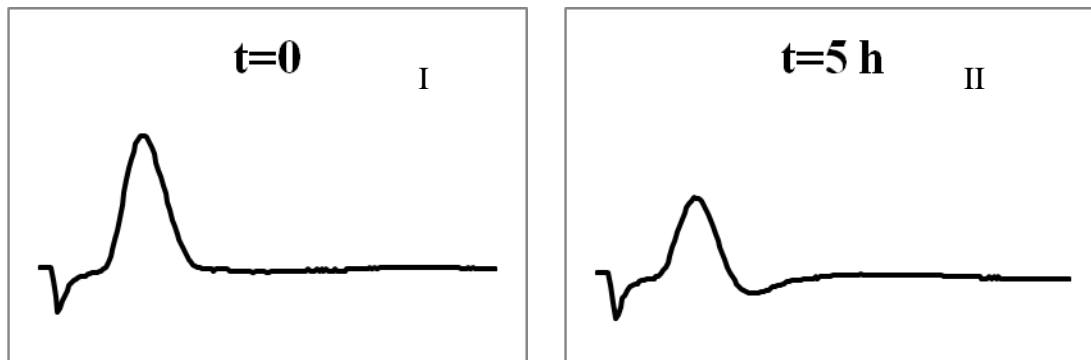
αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το Cr(VI) έχει σαφή επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και σε χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία αντιστοιχεί σε 200 μ M. Όμοια, παρατηρείται σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ωστόσο με σχετικά μεγαλύτερο IT_{50} υποδεικνύοντας τοξικότητα η οποία μπορεί να εξαρτάται από την συγκέντρωση του υπό μελέτη παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή IT_{50} είναι $5,7 \pm 0,42$ μετά από επίδραση με 500 μ M και $7,8 \pm 0,22$ ώρες μετά από επίδραση με 200 μ M. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το χρώμιο στην εξασθενή του μορφή επιδεικνύει έντονη βιολογική δραστηριότητα σε αντίθεση με το τρισθενές χρώμιο το οποίο βιολογικά αδρανές.



Εικόνα 34: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K_2CrO_4 σε συγκέντρωση 500 μ M (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K_2CrO_4 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



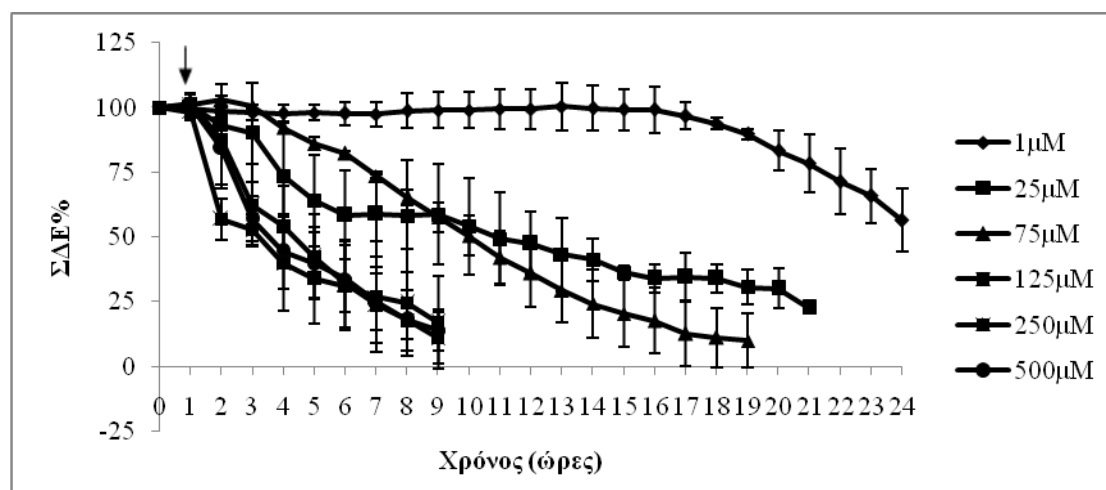
Εικόνα 35: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K_2CrO_4 σε συγκέντρωση 200 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K_2CrO_4 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 15: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 5 ώρες (II) μετά από επώαση σε 500 μM εξασθενούς χρωμίου.

3.2.6 Χαλκός

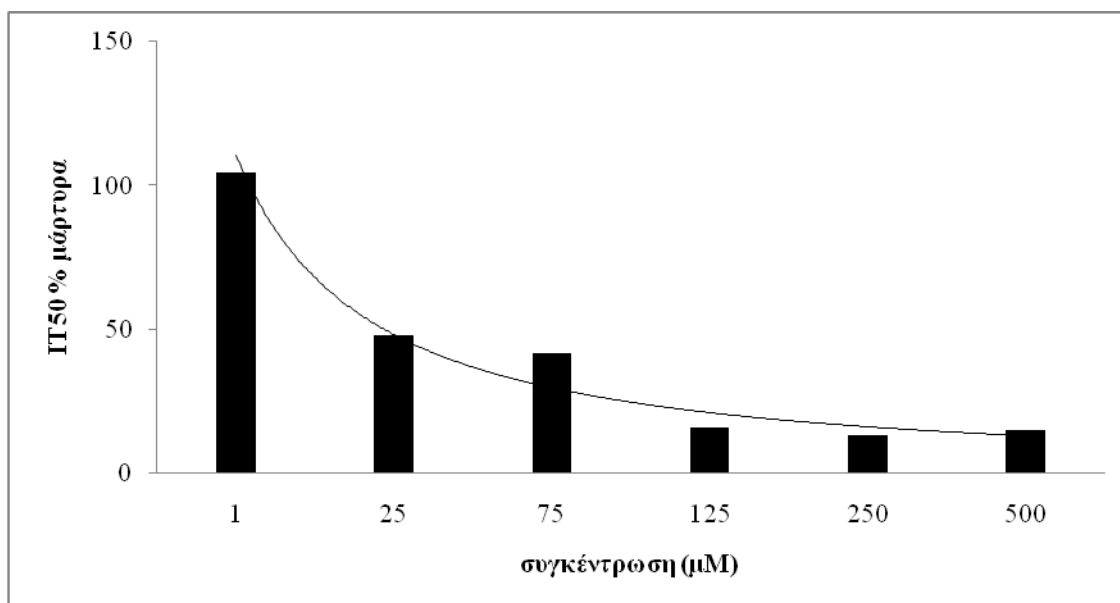
Τέλος πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της δράσης του χαλκού στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ένωση γλυκινικός χαλκός $cis-[Cu(II)(glycinate)_2] \cdot H_2O$ ($cis-CuGly$) η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκεντρώσεις 1, 25, 75, 125, 250 και 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής, προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται $Cu(II)$. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το ιόν του δισθενούς χαλκού παρουσιάζει σαφή νευροτοξική δράση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση του μεταλλοϊόντος. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος ανόδου καθώς και η διάρκεια του ΣΔΕ δεν επηρεάζονται από την παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλοτοξίνης



Εικόνα 36: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του $Cu(II)$ σε συγκεντρώσεις από 1 μM έως 500 μM ($n=3$, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του $Cu(II)$. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

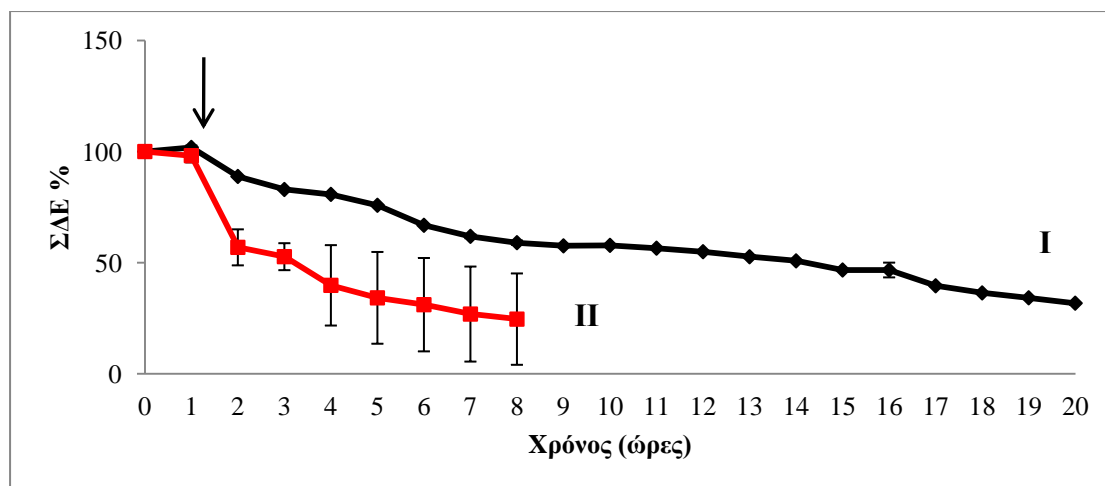
$cis-[Cu(II)-glycinate]$

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (μM)	1	25	75	125	250	500
IT₅₀	23,55±0,14	10,84±0,54	9,39±0,17	3,64±0,23	2,98±0,46	3,4±0,31



3.2.6.1 Συντελεστής διαπερατότητας επινευρίου

Για τον καθορισμό της διαπερατότητας του επινευρίου του ισχιακού νεύρου του επίμοις υπολογίστηκε η τιμή του λόγου του IT_{50} παρουσία του επινευρίου προς την τιμή του IT_{50} απουσία του επινευρίου για την συγκεκριμένη χημική ένωση που μελετάται [Cu(II)]. Για τον υπολογισμό της τιμής αυτής επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 250μM. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα νεύρα που εκτέθηκαν στο μεταλλοϊόν του χαλκού με διατήρηση του επινευρίου παρουσίασαν μικρότερη μείωση της βιωσιμότητας στον ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτά όπου το επινεύριο αφαιρέθηκε. Πιο συγκεκριμένα το IT_{50} παρουσία του επινευρίου έχει τιμή $12,56 \pm 0,53$ ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το IT_{50} μετά από αφαίρεση του επινευρίου αντιστοιχεί σε $2,56 \pm 0,46$. Συνεπώς, η παρουσία του επινευρίου επιφέρει 4,2 φορές πιο αργή μείωση του ΣΔΕ μετά από επίδραση με Cu(II) και άρα το επινεύριο δεν είναι πλήρως και άμεσα περατό από τα μεταλλοϊόντα του χαλκού.



Εικόνα 37: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμουσ σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκέντρωση 250μM (n=3, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του Cu(II) . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

$$\frac{IT_{50}(\text{παρουσία επινευρίου})}{IT_{50}(\text{απουσία επινευρίου})}$$

$$IT_{50}(\text{παρουσία επινευρίου}) = 12,56 \pm 0,53$$

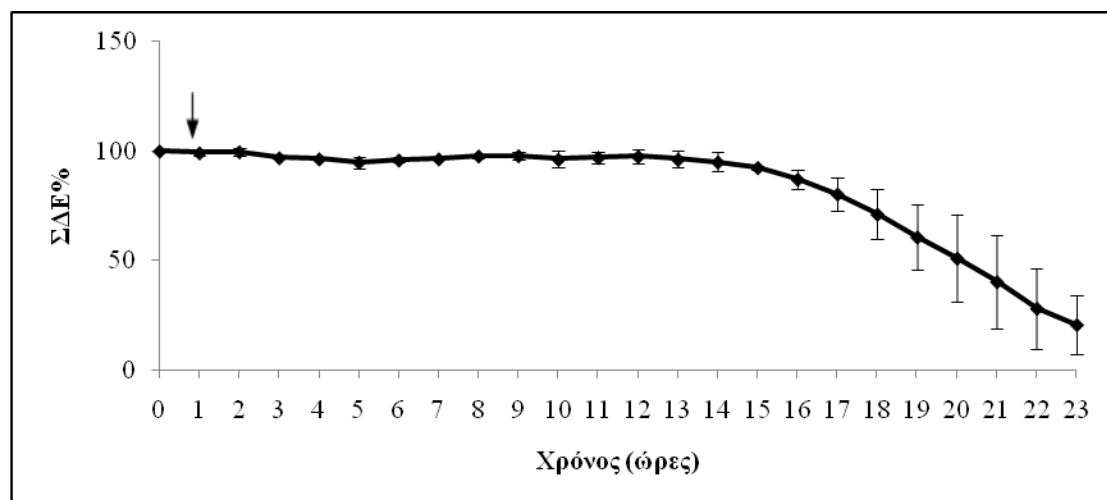
$$IT_{50}(\text{απουσία επινευρίου}) = 2,98 \pm 0,46$$

$$\text{Συντελεστής διαπερατότητας επινευρίου} \rightarrow 4,214765$$

3.2.6.2 Γλυκίνη

Στην συνέχεια έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης της νευροτοξικής δράσης του συγκεκριμένου συμπλόκου cis [Cu(II)-glycinate]. Για τον λόγο αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε έκθεση των νευρικών ινών για το ίδιο χρονικό διάστημα μόνο στον υποκαταστάτη του γλυκινικού χαλκού, το αμινοξύ γλυκίνη και σε συγκέντρωση 500 μM. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία της γλυκίνης ακόμη και σε μεγάλη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου κάνοντας παράλληλα σαφές πως η όποια τοξικότητα παρατηρείται μετά από επώαση με

[Cu(II)-glycinate], οφείλεται στην παρουσία του μεταλλοϊόντος. Η τιμή του IT_{50} ισούται με $19,05 \pm 0,08$ ώρες.

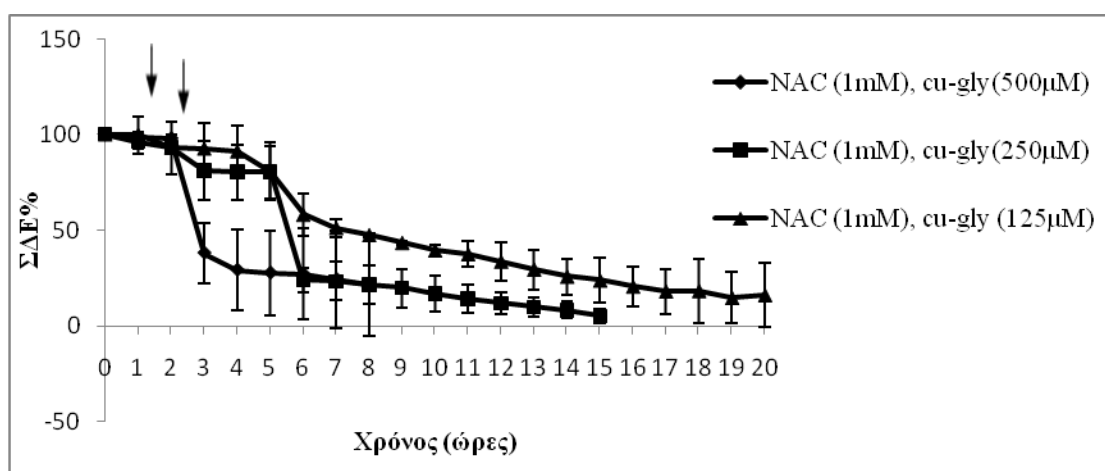


Εικόνα 38: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αμινοξέος γλυκίνη σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

3.2.6.3 N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC)

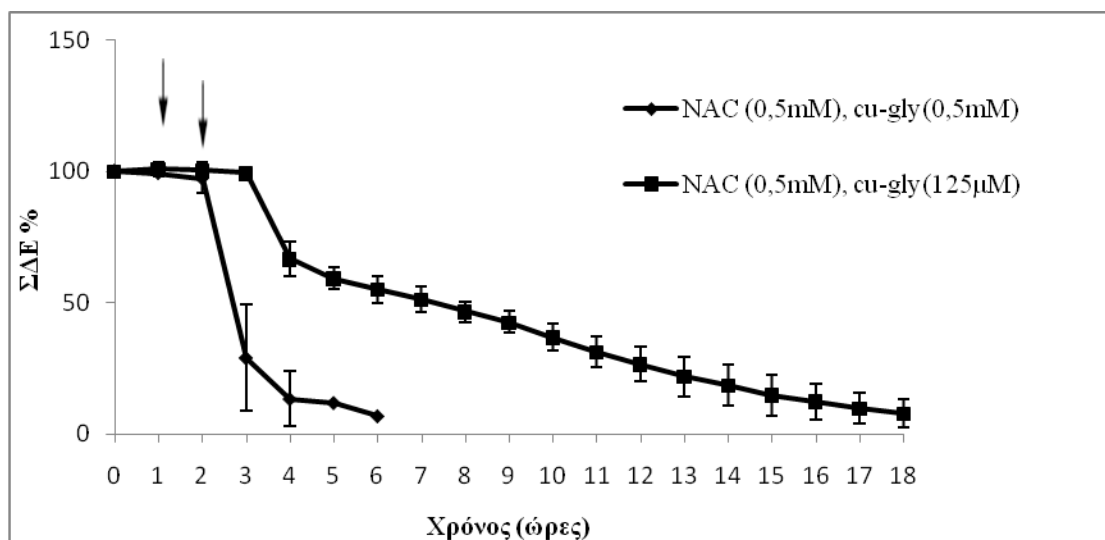
Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή της παραγωγής ελεύθερων ριζών στην μεταβολή του ΣΔΕ που παρατηρείται μετά από επίδραση με Cu(II), χρησιμοποιήθηκε το γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Το NAC έχει την ιδιότητα να δεσμεύει την τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με αποτέλεσμα να αναστέλλει την τοξική τους δράση όπως έχει δείχθει και σε άλλες εργασίες (He et al., 2008; Moschou et al., 2008a; Papaefthimiou et al., 2009). Το NAC δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση μέχρι και 1 mM . Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προ-επώαση του ισχιακού νεύρου για μία ώρα με NAC (1 mM ή $0,5 \text{ mM}$) αφού σταθεροποιήθηκε το ΣΔΕ και στην συνέχεια προστέθηκε Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 125 , 250 και $500 \mu\text{M}$ προκειμένου να διερευνηθεί η σχετική αναλογία (στοιχειομετρικά) όπου το NAC μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία του NAC οδηγεί σε μικρή αύξηση του IT_{50} του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε Cu(II) ωστόσο η αντιοξειδωτική του δράση εξαρτάται από την συγκέντρωση της μεταλλοτοξίνης. Προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 1 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη $500 \mu\text{M}$ αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με $1,69 \pm 0,51$. Επιπλέον,

προεπώαση με 1mM NAC και ακόλουθη προσθήκη 250 και 125 μM Cu(II) οδηγεί σε IT_{50} ίσο με $3,79 \pm 0,33$ και $7,26 \pm 0,41$ ώρες. Προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0,5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μM Cu(II) αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με $6.04 \pm 0,35$ ενώ προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0,5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 125 μM αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με $2,7 \pm 0,12$. Ακόμα, Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η παρουσία του Cu(II) συντελεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου.



Εικόνα 39: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκεντρώσεις 125, 250 και 500 μM ($n=3$ ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

NAC (1mM)			
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	125	250	500
Cu(II) (μM)			
IT_{50}	$1.69 \pm 0,51$	$3.79 \pm 0,33$	7.26 ± 0.41



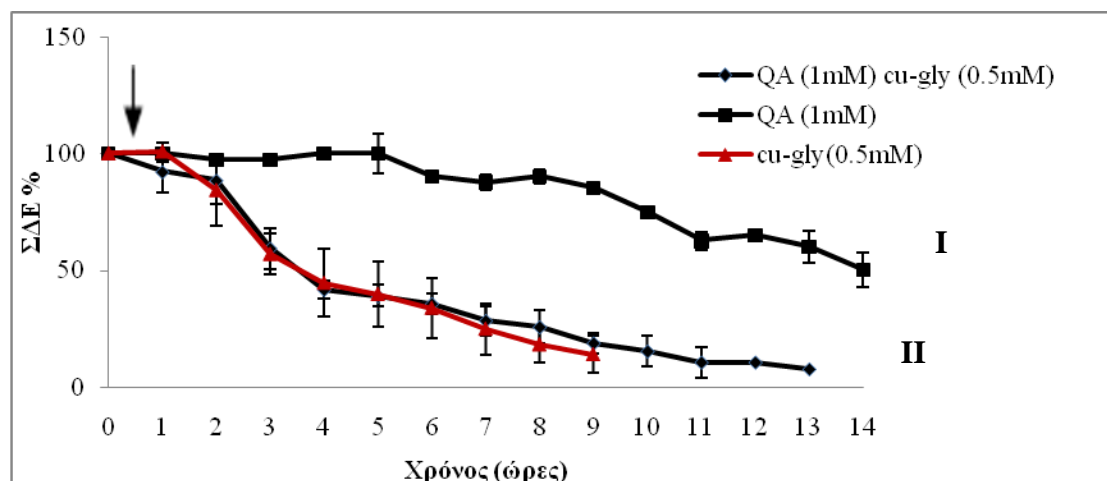
Εικόνα 40: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκεντρώσεις 152,250 και 500 μM ($n=3$ ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 0,5 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

NAC (0,5 mM)		
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	125	500
Cu(II) (μM)		
IT ₅₀	6,04±0,38	2,7±0.12

3.2.6.4 Κινικό οξύ (quinic acid- QA)

Όμοια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το κινικό οξύ είναι φυσικό μόριο και απαντάται κυρίως στα φυτά σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως υποκαταστάτης πολλών μετάλλων λόγω της ιδιότητάς του να χηλικοποιεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1mM. Το ισχιακό νεύρο επώαστηκε για μία ώρα με QA και στην συνέχεια προστέθηκε το Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 500 μM . Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση του κινικού οξέος στην βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση 1mM. Από

τα αποτελέσματα προκύπτει ότι μειώνει ελάχιστα την βιωσιμότητα των ιών του ισχιακού νεύρου. Ωστόσο, φαίνεται να μην επιφέρει καμία μεταβολή στην τοξική επίδραση η οποία οφείλεται στην δράση της μεταλλοτοξίνης [(IT₅₀ παρουσία QA/Cu(II) ίσο με IT₅₀ παρουσία Cu(II)]. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται και σε θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς η συμπλοκοποίηση του κινικού οξέος με τον χαλκό δεν είναι σταθερή με αποτέλεσμα του κινικού οξέου να μη μπορεί να δράσει χηλικοποιητικά έναντι του χαλκού.

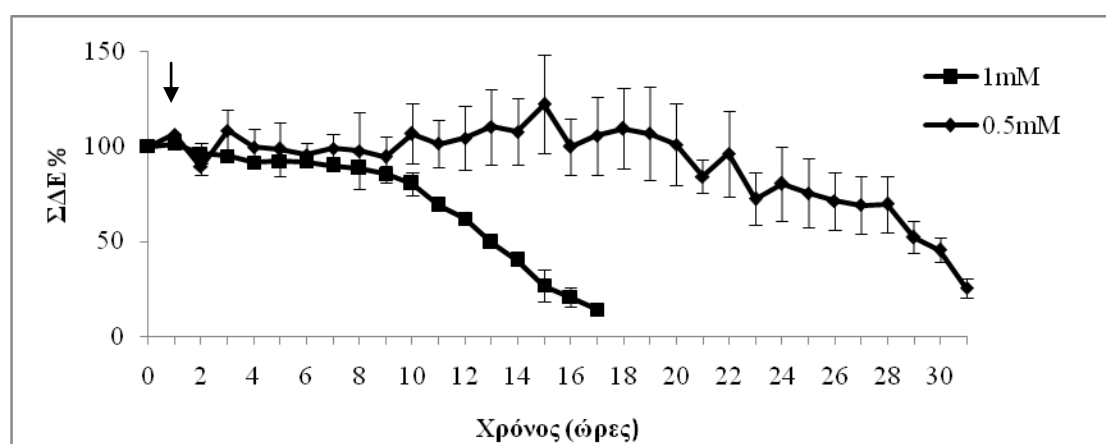


Εικόνα 41: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 1 mM QA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μM (n=3 ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM QA. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε 500 μM του Cu(II). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

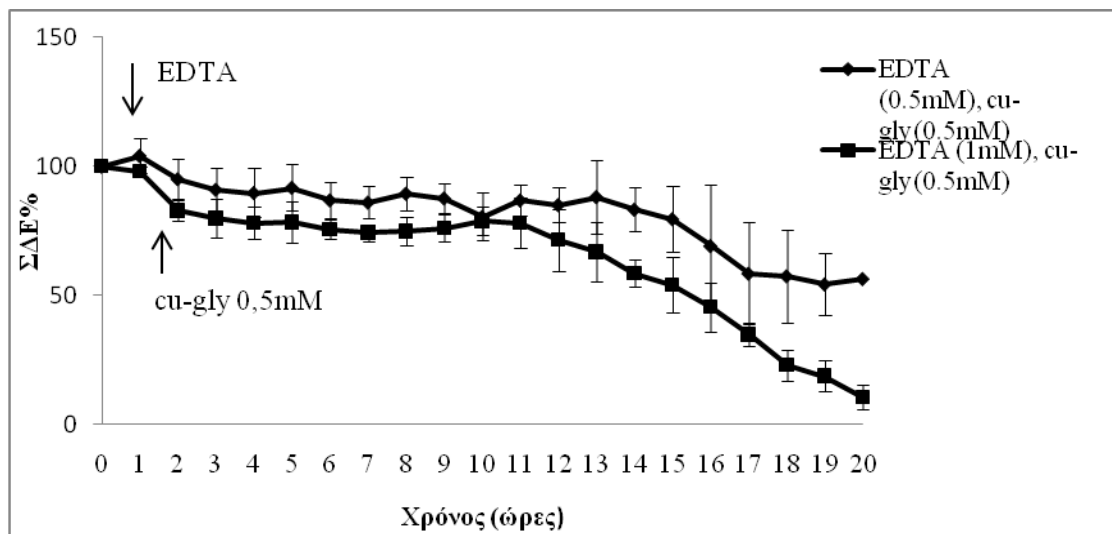
3.2.6.5 EDTA

Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) είναι ο γνωστότερος και πλέον τυπικός εκπρόσωπος μιας σειράς ενώσεων, οι οποίες γενικά ονομάζονται πολυαμινοκαρβοξυλικά οξέα και χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά έντονη συμπλεκτική ικανότητα ως προς τα περισσότερα μεταλλοϊόντα. Το EDTA είναι χηλικός εξαδοντικός υποκαταστάτης (hexadentate chelator) διαθέτοντας 2 θέσεις σύνδεσης από τις αμινοομάδες και 4 θέσεις σύνδεσης από τις καρβοξυλομάδες. Η

σταθερότητα των συμπλόκων που σχηματίζει οφείλεται στις πολλές θέσεις σύνδεσης του μορίου του EDTA (μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων ατόμων αζώτου και οξυγόνου), το οποίο είναι ένας τυπικός πολυσχιδής (ή πολυδοντικός) υποκαταστάτης (multidentate ligand). Όμοια, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του χηλικποιητικού μορίου EDTA έναντι στην τοξικότητα που επάγεται από την επίδραση του Cu(II). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της δράσης του EDTA στην βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε δύο συγκεντρώσεις (0,5 και 1 mM) καθώς δεν υπήρχαν αντίστοιχα δεδομένα από την βιβλιογραφία. Το ισχιακό νεύρο επώαστηκε στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά από μια ώρα σταθεροποίησης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το EDTA σε συγκέντρωση 0,5 mM δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των νευρικών ινών (IT_{50} $28,04 \pm 0,42$). Ωστόσο. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι πιθανό να χηλικποιεί και να απομακρύνει άλλα ενδογενή – απαραίτητα μέταλλα των οποίων η έλλειψη οδηγεί σε πτώση της βιωσιμότητας (IT_{50} $11,93 \pm 0,11$). Στη συνέχεια, το ισχιακό νεύρο επώαστηκε για μία ώρα με EDTA (0,5 mM) και ακολούθως προστέθηκε ο Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 500 μ M [αναλογία EDTA/Cu(II) \rightarrow 1/1] (IT_{50} = $13,4 \pm 0,53$). Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση του EDTA σε μεγαλύτερη στοιχειομετρική αναλογία [αναλογία EDTA/Cu(II) \rightarrow 2/1] σε σχέση με τον χαλκό (IT_{50} = $19,86 \pm 0,73$). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το EDTA χηλικποιεί αποτελεσματικά τον χαλκό ενώ η στοιχειομετρική αναλογία φαίνεται να μην επηρεάζει την αλληλεπίδραση των δύο μορίων.



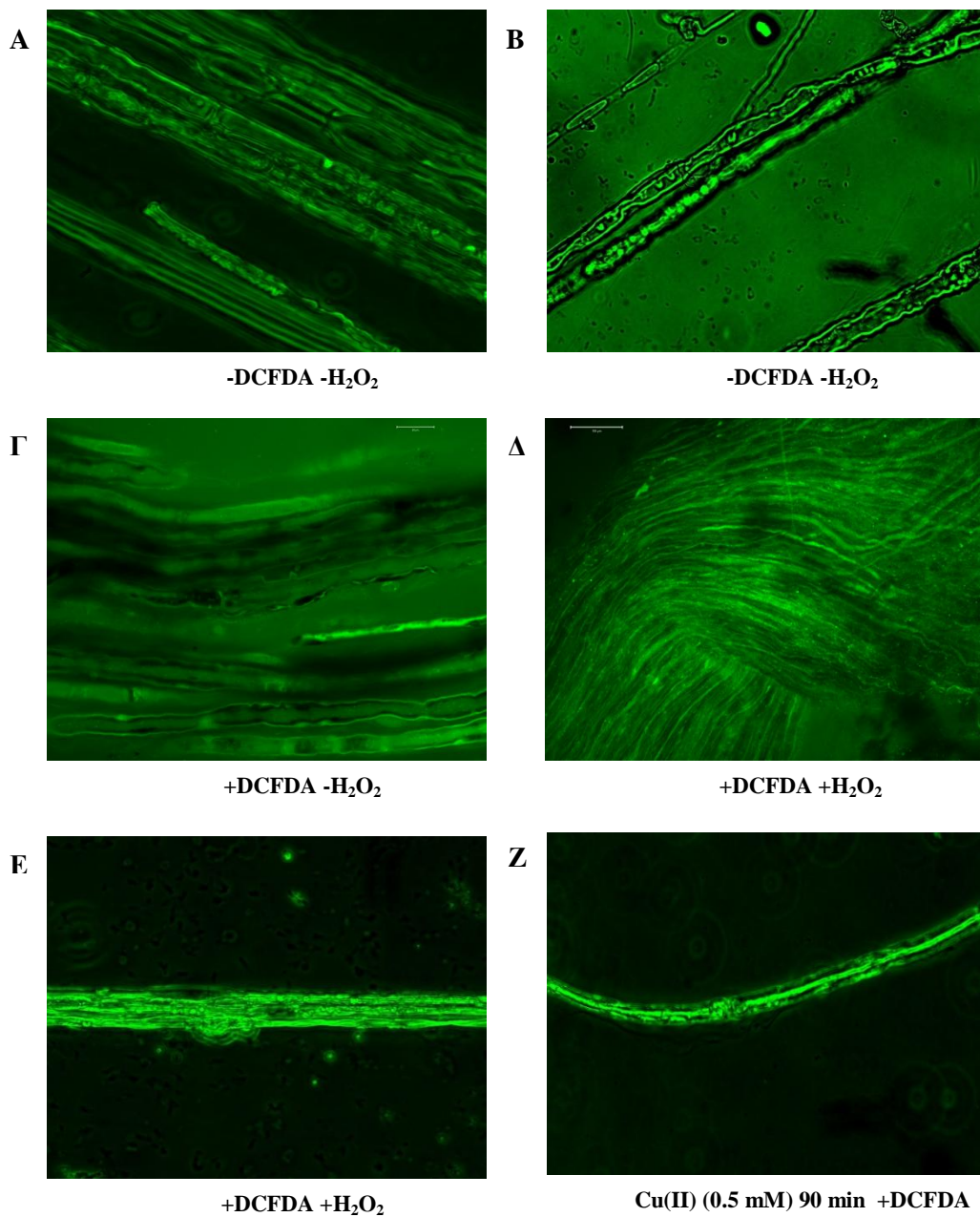
Εικόνα 42: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του EDTA σε συγκεντρώσεις 0.5 mM και 1 mM (n=3, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του EDTA. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 43: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 500 μM Cu(II) μετά από προ-επόαση με 1 mM EDTA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μM μετά από προ-επόαση με 0.5 mM EDTA (n=3 ανά συνθήκη). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

3.3 Ιστολογική διερεύνηση της σχέσης της δράσης του Cu(II) με τον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου.

Ο χαλκός ως οξειδοαναγωγικά ενεργό μεταλλοϊόν συμβάλλει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και γενικά δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω αντιδράσεων Fenton και Fenton-Weiss. Προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή των ενεργών μορφών οξυγόνου στην παρατηρούμενη μείωση της βιωσιμότητας των νευρικών ινών μετά από επίδραση με την μεταλλοτοξίνη του χαλκού χρησιμοποιήθηκε και ιστολογική μέθοδος. Για το σκοπό αυτό ισχιακά νεύρα που είχαν εκτεθεί σε Cu(II) στη συγκέντρωση των 500 μM καθώς και νεύρα που αποτελούσαν το μάρτυρα επισημάνθηκαν με τη φθορίζουσα χημική ένωση DCFDA η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Στην Εικόνα 44 Α, Β φαίνονται νεύρα τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία επίδραση. Στη φωτογραφία 44 Γ φαίνονται νευρικές ίνες μετά από χρώση με DCFDA χωρίς την επίδραση κάποιας χημικής ένωσης, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κατά μήκος των νευρικών ινών σε νεύρο το οποίο αποτελεί το μάρτυρα παρά μόνο παρατηρούνται μικρά συσσωματώματα τα οποία πιθανόν να αντιστοιχούν σε περιοχές με έντονο μεταβολισμό και κατά συνέπεια μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Οι εικόνες 44 Δ και Ε αντιστοιχούν στον θετικό μάρτυρα, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς αποτελεί γνωστό οξειδωτικό παράγοντα που οδηγεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Στην εικόνα 44 Ζ φαίνονται νευρικές ίνες οι οποίες εκτέθηκαν σε Cu(II) 500 μM για 90 λεπτά και στην οποία φαίνεται ότι υπάρχει παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά μήκος του κυτταροπλάσματος σχεδόν παρόμοια με αυτή μετά την επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου.



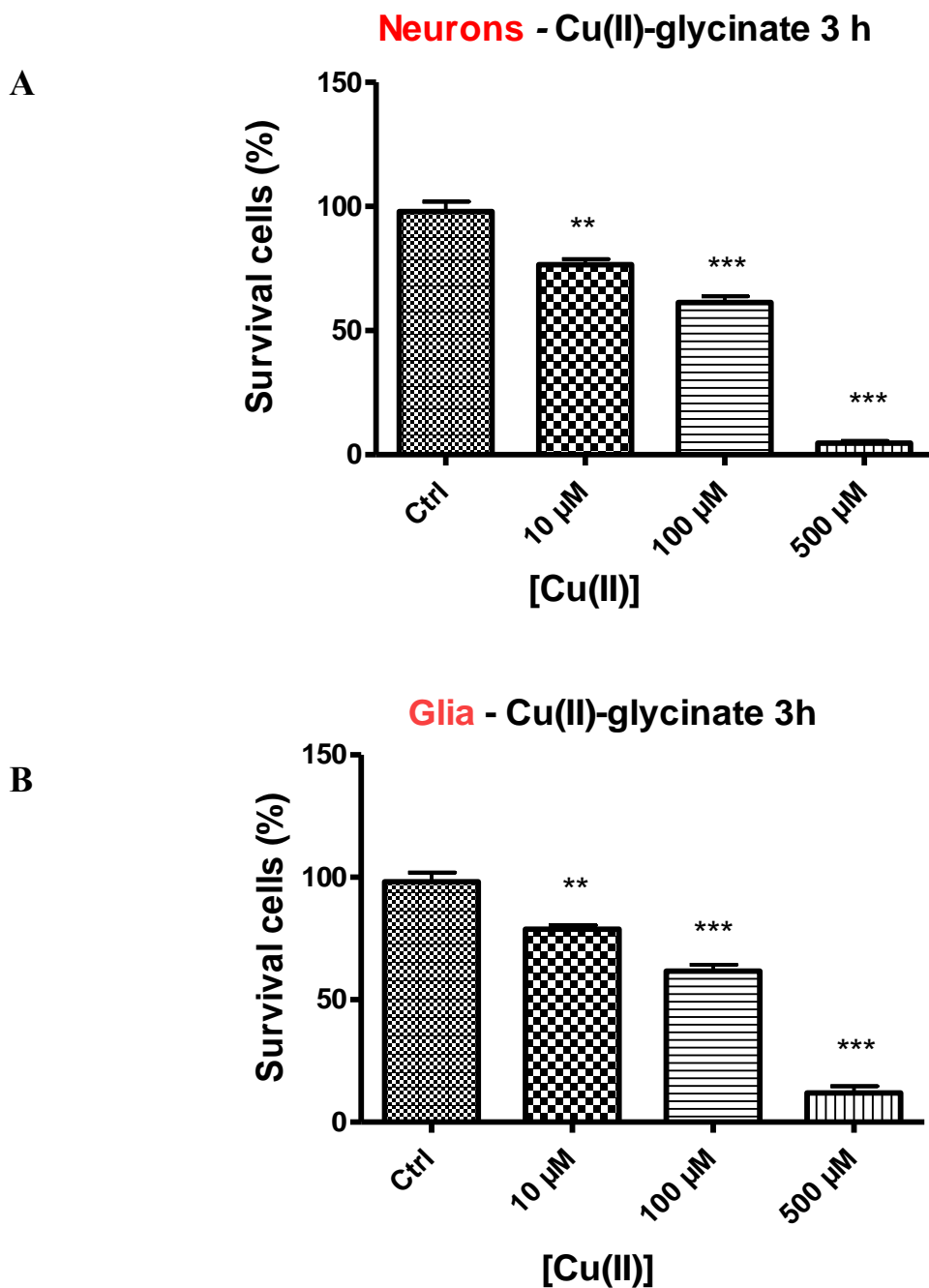
Εικόνα 44: Μικροφωτογραφία συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης λέιζερ νευρικών ιών του ισχιακού νεύρου του επίμυος μετά από σήμανση με την φθορίζουσα DCFDA για την σήμανση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (A,B) απουσία χημικής επίδρασης και φθορίζουσας χρωστικής, (Γ) παρουσία χρωστικής – μάρτυρας, (Δ,E) μετά από επίδραση με H₂O₂ – θετικός μάρτυρας, και (Z) μετά από επώαση με 500 μM Cu(II) για 90 λεπτά (x40).

3.4 Βιωσιμότητα πρωτογενούς καλλιέργειας ιπποκαμπιαίου ιστού υπό βραχυπρόθεσμες συνθήκες (*in vitro*)

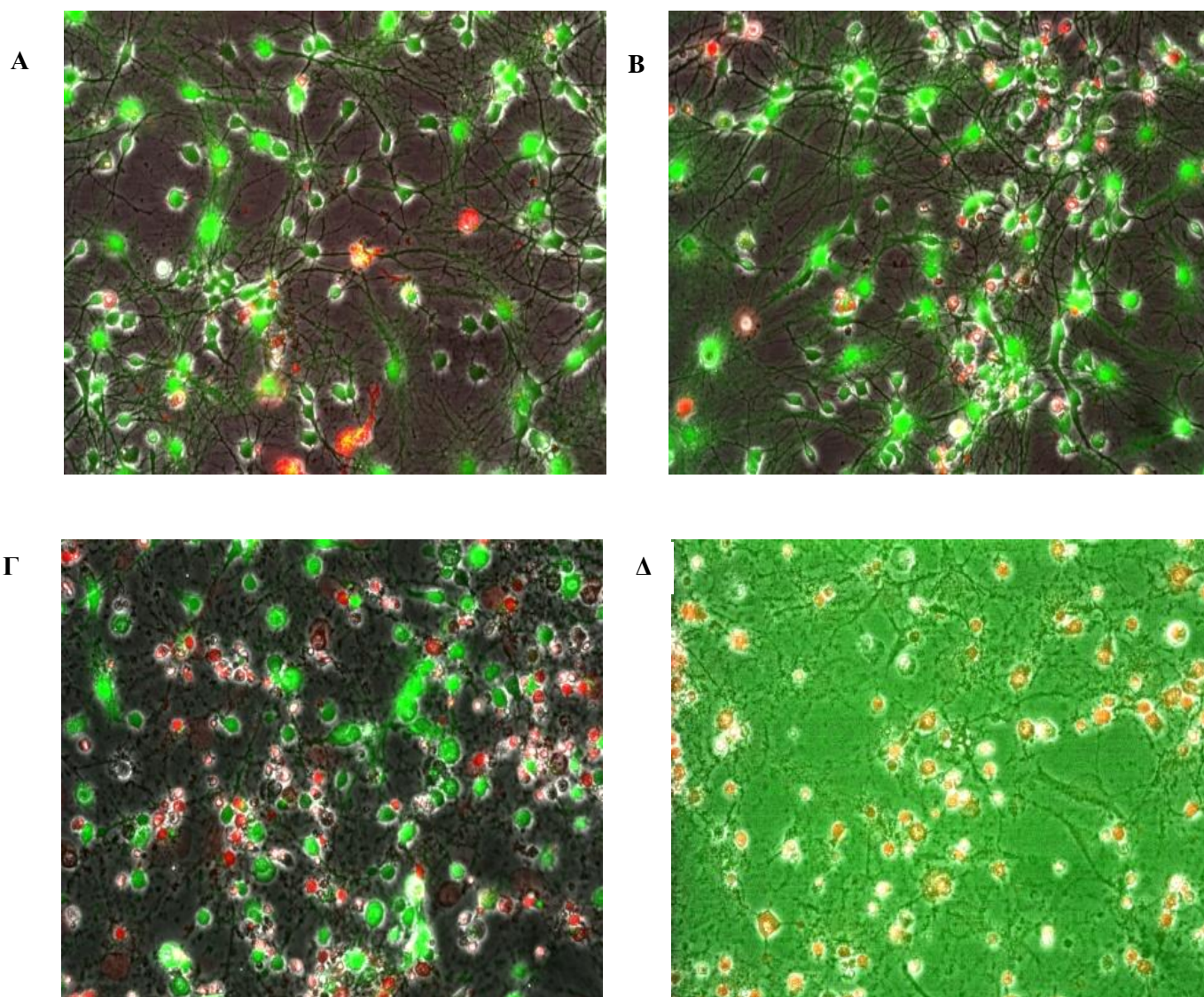
Η τοξικότητα που επάγεται από το μεταλλοϊόν του χαλκού και η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση χημικών ενώσεων αξιολογήθηκε επιπλέον και σε *in vitro* μοντέλο σε πρωτογενή καλλιέργεια ιπποκαμπιαίου ιστού. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιστού πραγματοποιήθηκε στοχευμένα καθώς έχει δειχθεί ότι η συγκέντρωση του χαλκού αυξάνει σε ιστούς του εγκεφάλου σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες ανάγοντας συχνά την παράμετρο αυτή σε παθολογοανατομικό δείκτη των ασθενειών αυτών.

3.4.1 Εκτίμηση της νευροτοξικής δράσης του *cis*-[Cu(II)-glycinate]

Για την διερεύνηση της τοξικής δράσης του Cu(II) *in vitro*, κύτταρα (νευρώνες και γλοία) του ιπποκαμπιαίου ιστού νεογνών αρουραίων διεγέρθηκαν για 3 ώρες με Cu(II)-glycinate σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μ M ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς καμία επίδραση. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η μορφή αυτή του χαλκού είναι υδατοδιαλυτή. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται άμεσα πριν την εφαρμογή των πειραματικών συνθηκών. Τα πειράματα βραχυπρόθεσμης έκθεσης πραγματοποιήθηκαν παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος HBS όπου και διαλύεται ο Cu(II)-glycinate στις τελικές συγκεντρώσεις που αναφέρονται. Στην εικόνα 45 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από 3 ώρες επώασης με Cu(II)-glycinate σε τρεις διακριτές συγκεντρώσεις στη γλοία (A) και τους νευρώνες (B). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή δόσο-εξερτώμενη τοξικότητα του Cu(II) και στους δύο κυτταρικούς τύπους η οποία εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μ M. Αξίζει να αναφερθεί ότι η γλοία εμφανίζει σχετικά πιο αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρατήρηση αναμενόμενη καθώς έχει προστατευτικό και στηρικτικό ρόλο ως προς τους νευρώνες.



Εικόνα 45: Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση Cu(II) σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μM για 3 ώρες (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 46: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (Α) μάρτυρας, (Β) 10 μM , (Γ) 100 μM και (Δ) 500 μM Cu(II) μετά από επώαση 3 ωρών (x10).

ΣΥΝΘΗΚΗ	ΝΕΥΡΩΝΕΣ				ΓΛΟΙΑ			
	μάρτυρας	10 μM	100 μM	500 μM	μάρτυρας	10 μM	100 μM	500 μM
% κυτταρική επιβίωση	97% \pm 4,06	76% \pm 2,2	61,3 \pm 2,5	4,6% \pm 0,8	98,2% \pm 3,7	78,7% \pm 1,6	61,7% \pm 2,5	11,9% \pm 0,7

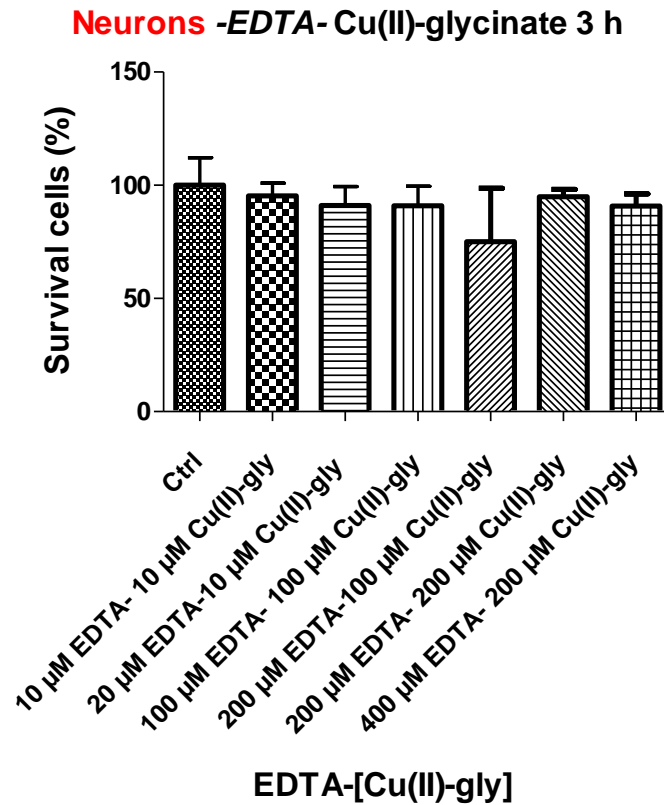
3.4.2 Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA.

Για την μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA έναντι του Cu(II), οι καλλιέργειες επωάστηκαν για μία ώρα παρουσία του EDTA ή του QA σε HBS σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 200, 400 μM) και στη συνέχεια προστέθηκε Cu(II)-glycinate χωρίς να προηγηθεί αφαίρεση του διαλύματος που περιέχει το EDTA ή το QA. Η επώαση με τον Cu(II)-glycinate διήρκεσε 3 ώρες. Οι συγκεντρώσεις του Cu(II) εξαρτώνται από την συγκέντρωση του υπό μελέτη νευροπροστατευτικού μορίου προκειμένου να ελεγχθεί η στοιχειομετρική αναλογία μεταλλοτοξίνης-νευροπροστατευτικού παράγοντα και διαμορφώνονται ως εξής : [(10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II)]. Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιείται και στην περίπτωση του QA με αναλογίες συγκεντρώσεων : 10 μM QA – 10 μM Cu(II), (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (400 μM QA – 200 μM Cu(II).

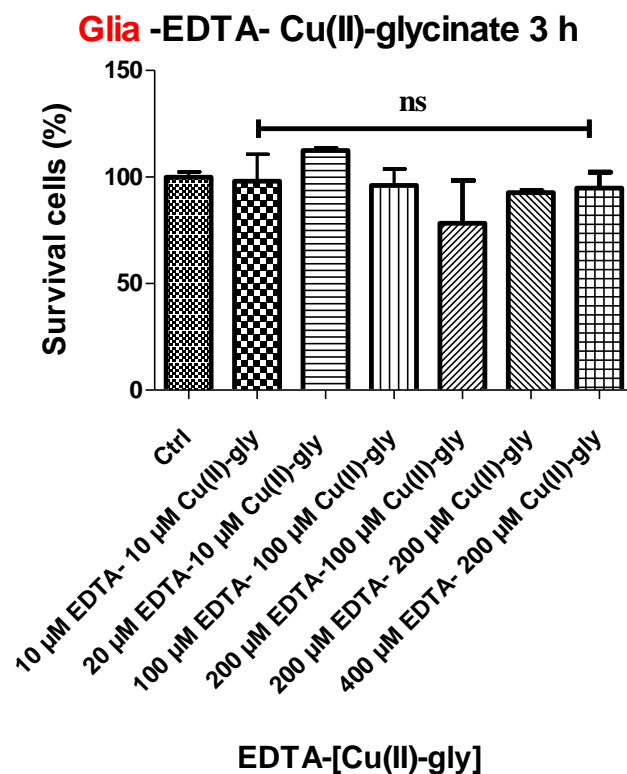
Στην εικόνα 47 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση των κυττάρων με EDTA και την ακόλουθη προσθήκη του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή και σχεδόν απόλυτη προστασία του EDTA έναντι στην επαγόμενη από τον χαλκό τοξικότητα. Η κυτταρική επιβίωση δεν επηρεάστηκε από την μεταβολή της στοιχειομετρικής αναλογίας EDTA/Cu(II). Συνεπώς, το EDTA αναδεικνύεται σε αποτελεσματικό και παράλληλα ατοξικό χηλικοποιητικό παράγοντα.

Στην εικόνα 49 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση των κυττάρων με QA και την ακόλουθη προσθήκη του Cu(II). Το QA δείχνει να μην επηρεάζει ιδιαίτερα την επαγόμενη από το χαλκό τοξικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ την ενισχύει στις υψηλές.

A

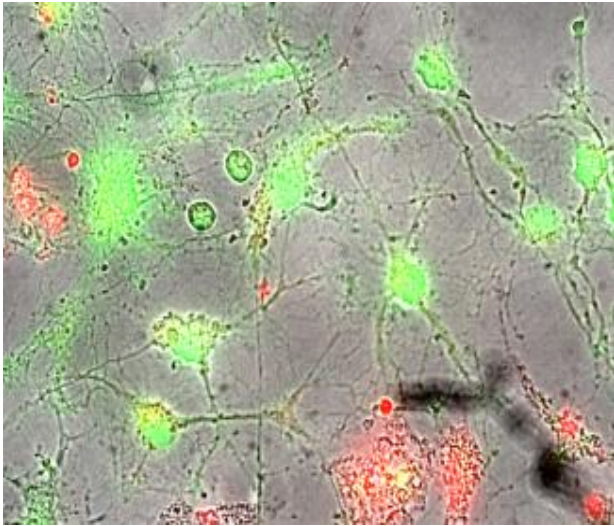


B

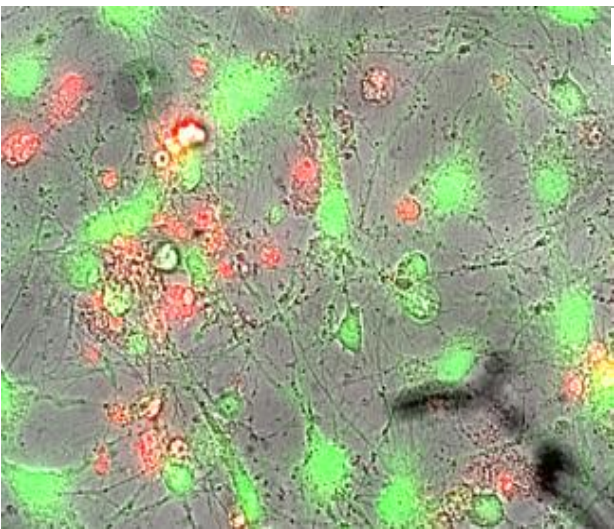


Εικόνα 47: Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις : (10μM EDTA – 10μM Cu(II), (20μM EDTA – 10μM Cu(II), (100μM EDTA – 100μM Cu(II), (200μM EDTA – 100μM Cu(II), (200μM EDTA – 200μM Cu(II), (400μM EDTA – 200μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

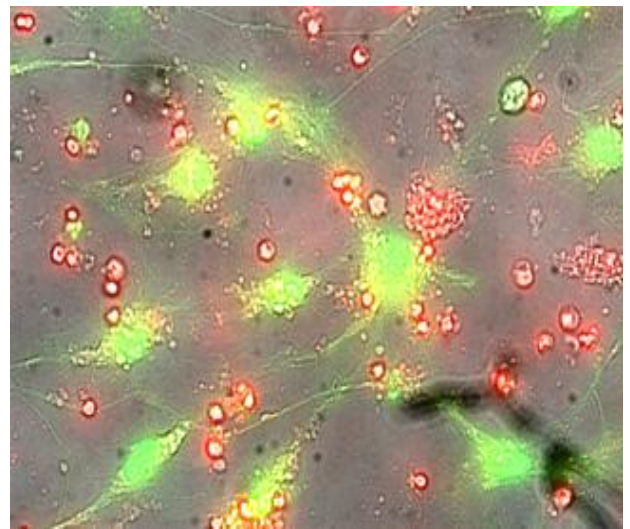
A



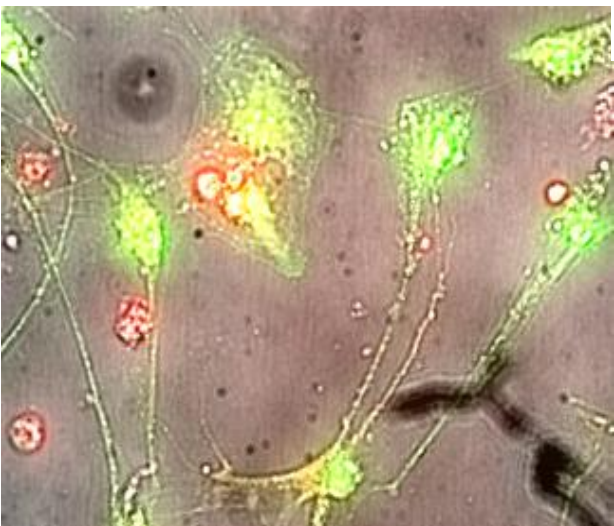
B



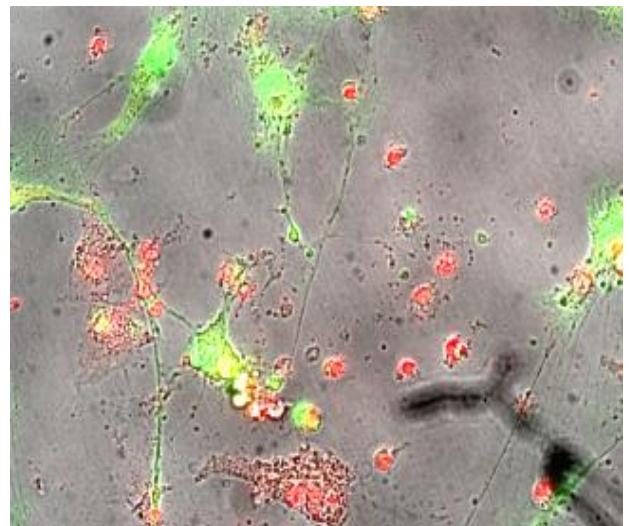
Г

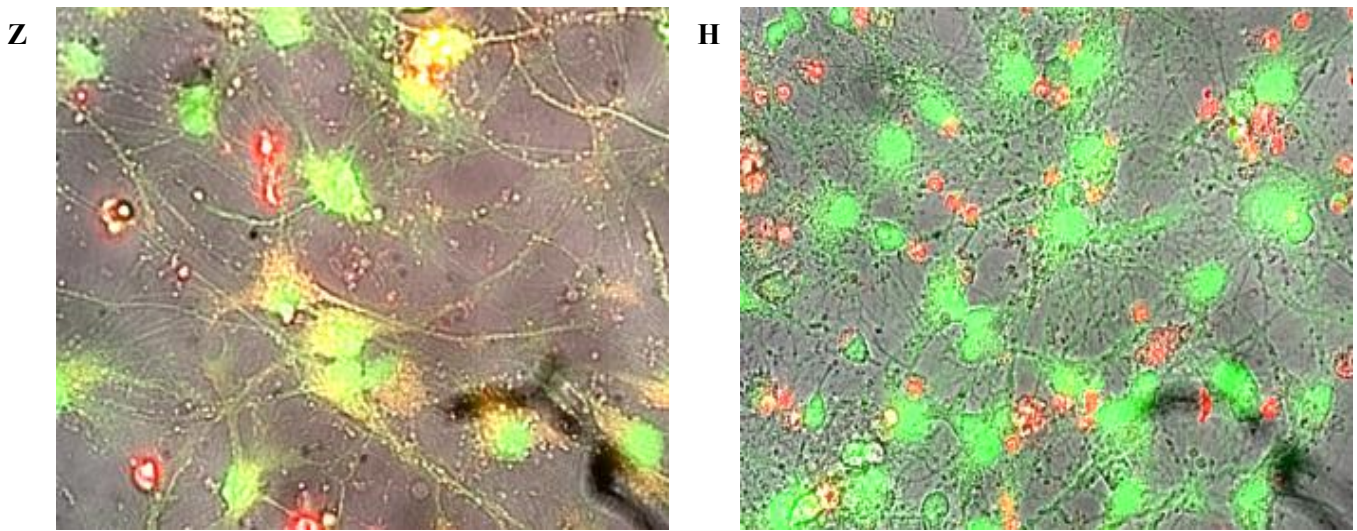


Δ



E

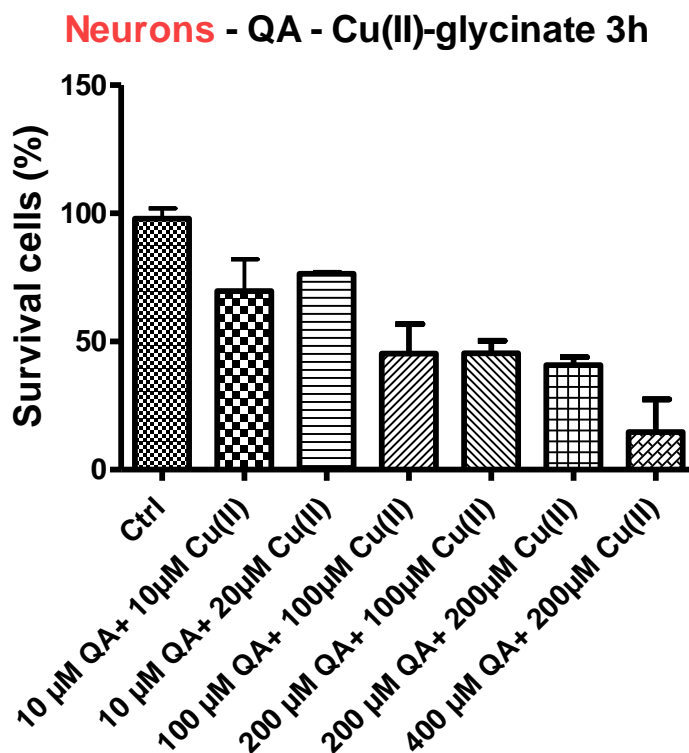




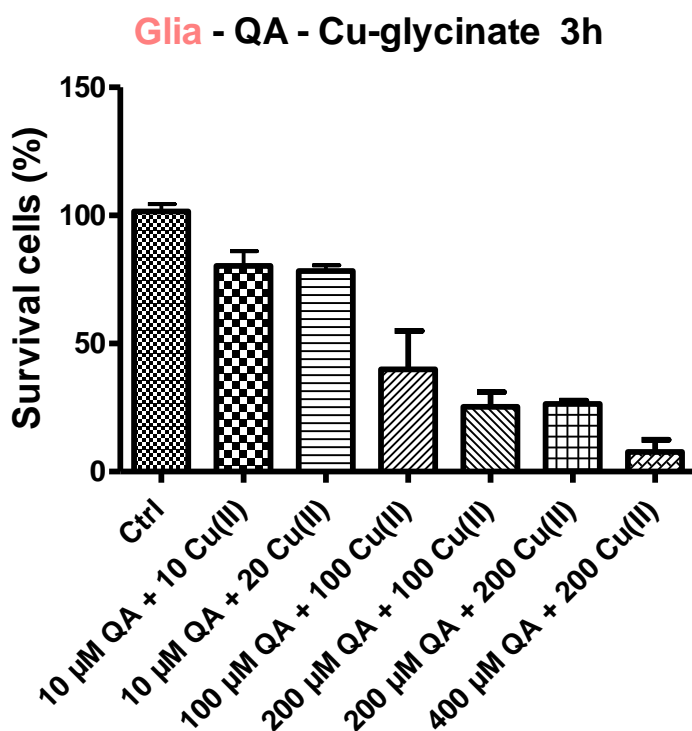
Εικόνα 48: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (Α) μάρτυρας, (Β) (10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)), (Γ) (20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)), (Δ) (100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)), (Ε) (200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)), (Ζ) (200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)), και (Η) (400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)) (x32).

ΝΕΥΡΩΝΕΣ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)	400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	100% \pm 12,2	95,35% \pm 5,6	91,02 \pm 8,4	90,95% \pm 8,6	75,01% \pm 23,6	94,97% \pm 3,2	90,81% \pm 5,3
ΓΛΟΙΑ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)	400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	100% \pm 2,3	98,04% \pm 12,6	112,4% \pm 1,2	96,05% \pm 7,7	78,31% \pm 20,1	92,73% \pm 0,8	94,87% \pm 7,4

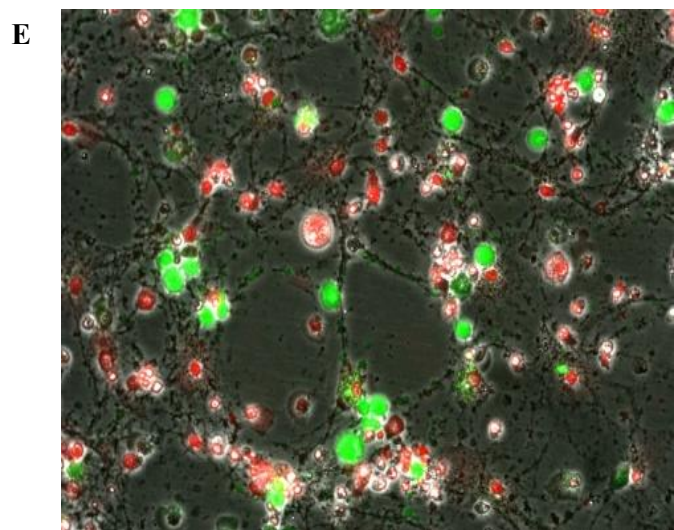
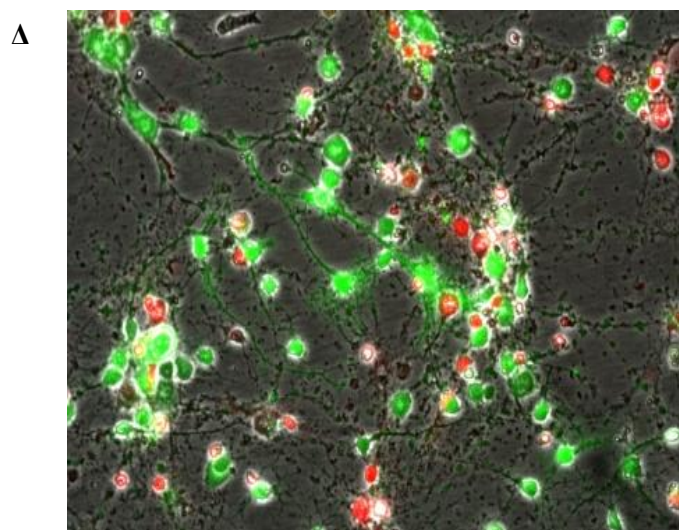
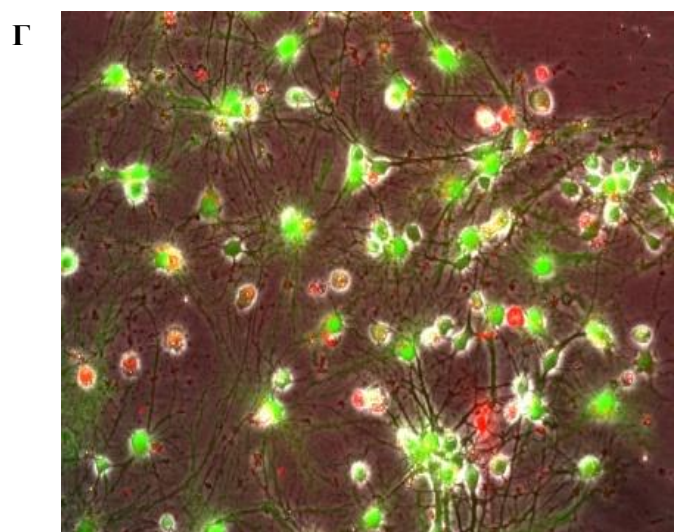
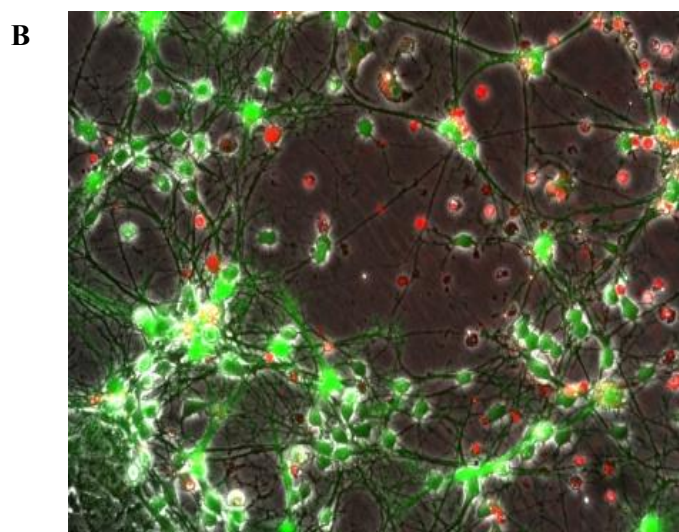
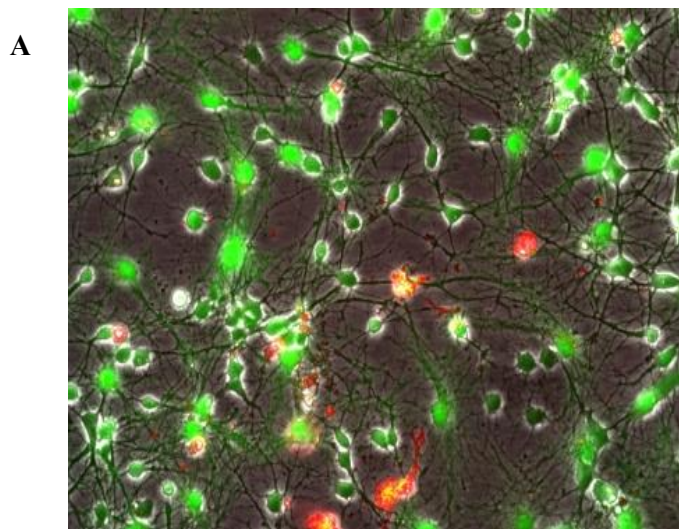
A

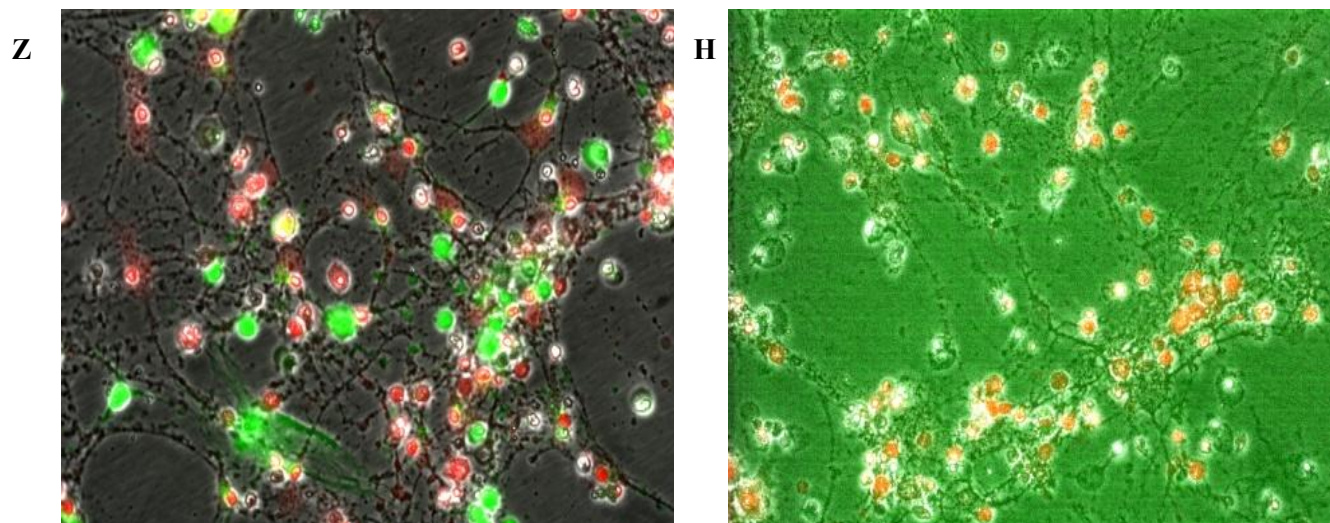


B



Εικόνα 49: Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις : (10μM QA – 10μM Cu(II), (20μM QA – 10μM Cu(II), (100μM QA – 100μM Cu(II), (200μM QA – 100μM Cu(II), (200μM QA – 200μM Cu(II), (400μM QA – 200μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοιας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.





Εικόνα 50: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπύδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (Α) μάρτυρας, (Β) (10μM QA – 10μM Cu(II)), (Γ) (20μM QA – 10μM Cu(II)), (Δ) (100μM QA – 100μM Cu(II)), (Ε) (200μM QA – 100μM Cu(II)), (Ζ) (200μM QA – 200μM Cu(II)), και (Η) (400μM QA – 200μM Cu(II)) (x32).

ΝΕΥΡΩΝΕΣ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10μM QA – 10μM Cu(II)	20μM QA – 10μM Cu(II)	100μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 200μM Cu(II)	400μM QA – 200μM Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	97.89%±4.06	69.67%±12.35	76.43±0.75	45.37%±11.39	45.45%±4.8	40.79%±3,18	14.6%±12.7
ΓΛΟΙΑ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10μM QA – 10μM Cu(II)	20μM QA – 10μM Cu(II)	100μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 200μM Cu(II)	400μM QA – 200μM Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	101.5%±2.95	80.35%±5.6	78.3%±2.3	39.88%±15.5	25.33%±5.7	26.48%±1.18	7.72%±4.7

3.5 Ανάπτυξη μοντέλου εκτίμησης περιφερικής νευροπάθειας

3.5.1 Συχνότητα διέγερσης-εφαρμογή 2^{ου} ηλεκτρικού παλμού στην σχετική ανερέθιστη περίοδο.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση μεταλλοτοξινών στην επαγωγή περιφερικής νευροπάθειας, κρίθηκε αρχικά απαραίτητη η ανάπτυξη ενός μοντέλου διάκρισης της φυσιολογικής από την παθολογική κατάσταση. Για τον σκοπό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ζώων, φυσιολογικοί ενήλικοι αρουραίοι και αρουραίοι οι οποίοι ήταν διαβητικοί. Ο διαβήτης στα ζώα αυτά προκαλείται επίκτητα μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (Regup CC (1970)). Η ένωση αυτή επιδρά στα β-κύτταρα του παγκρέατος και η χρήση της είναι κοινή στα περισσότερα πρωτόκολλα για την ανάπτυξη *in vivo* μοντέλων Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και 2.

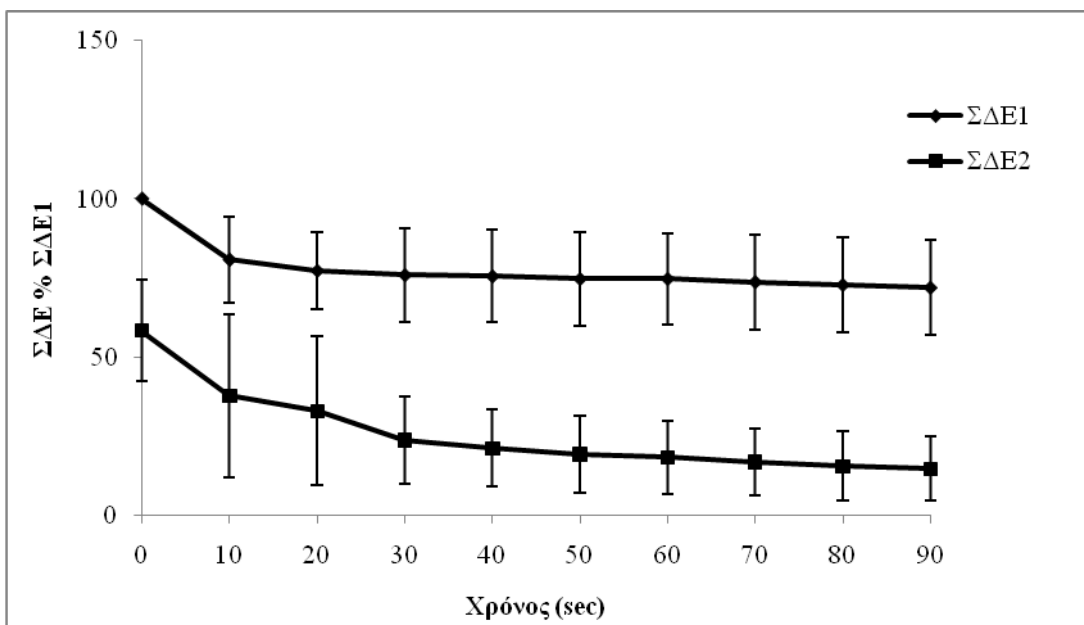
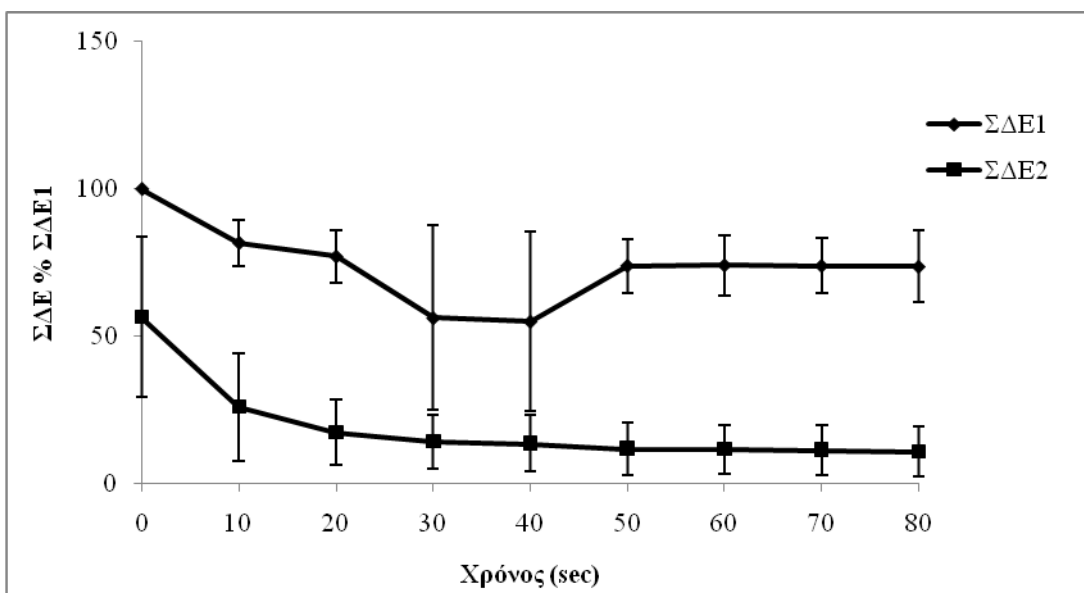
Με τον όρο Διαβητική Νευροπάθεια νοείται μια ομάδα κλινικών νοσημάτων, τα οποία είτε το καθένα από μόνο του, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους προσβάλλουν διαφορετικά τμήματα του νευρικού συστήματος. Ιδιαίτερη μορφή επώδυνης νευροπάθειας αποτελεί η νευροπάθεια των περιφερικών ινών όπου προσβάλλονται οι μικρές εμμύελες ίνες καθώς και οι αμύελες.

Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου πραγματοποιήθηκε καταπόνηση μέσω εφαρμογής 2^{ου} παλμού στην περίοδο σχετικής ανερεθιστότητας. Για την εκτέλεση των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν απαιτείται η αφαίρεση του επινευρίου. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής όπως και στην περίπτωση των εξωκυττάρων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών. Το ισχιακό νεύρο παραμένει στον τρίχωρο θάλαμο για μία ώρα προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ και στη συνέχεια διεγείρεται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1Hz ενώ παράλληλα με χρήση ειδικής διάταξης εφαρμόζεται δεύτερος ηλεκτρικός παλμός σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της σχετικής ανερέθιστης περιόδου.

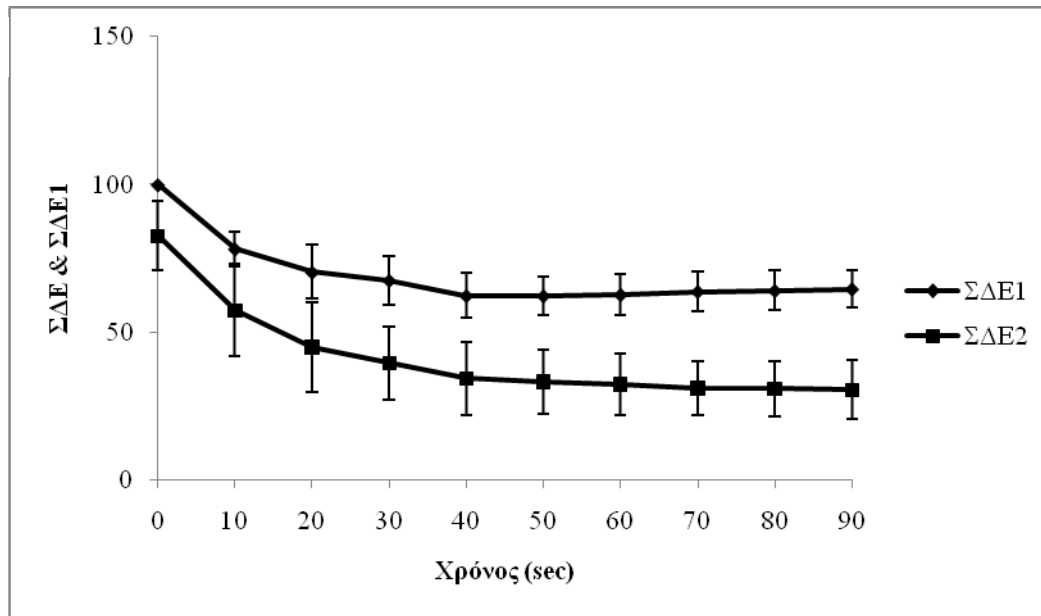
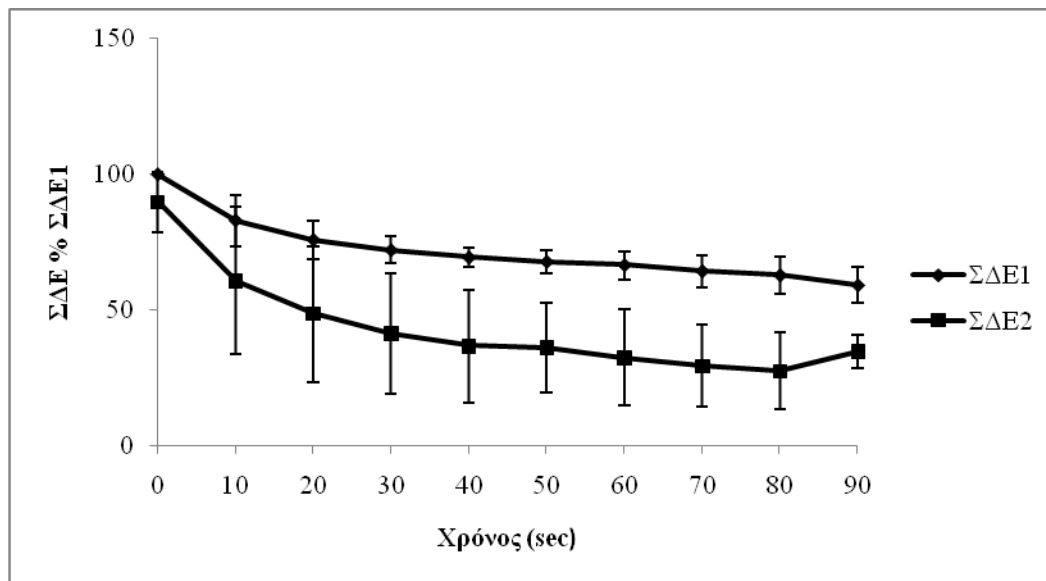
Τόσο οι νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου φυσιολογικών ζώων, όσο και των διαβητικών διεγέρθηκαν σε τρεις διακριτές συνθήκες οι οποίες έχουν ως εξής: συχνότητα διέγερσης 80-90 Hz και 4,2 msec από την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο, 80-90 Hz και 2,2 msec και 50 Hz και 2,2 msec αντίστοιχα. Από τις τρεις διακριτές συνθήκες που εφαρμόστηκαν, προκύπτει ότι η διέγερση με 50 Hz 2,2 msec μετά την απόλυτη περίοδο ανερεθιστότητας επιτρέπει σαφή διάκριση μεταξύ της φυσιολογικής

από την παθολογική κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, όταν το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με συχνότητα 80-90 Hz 4,2 msec μετά την απόλυτη περίοδο ανερεθιστότητας, το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $69\% \pm 5,6$ ενώ το ΣΔΕ2 μειώνεται στο $14\% \pm 3,8$ ενώ στην περίπτωση του ισχιακού νεύρου διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $73\% \pm 6,08$ και το ΣΔΕ2 μειώνεται στο $10\% \pm 4,2$. Όταν, το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με την ίδια συχνότητα αλλά 4,2 msec από την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο, το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $64\% \pm 2,6$ και το ΣΔΕ2 στο $30\% \pm 4,04$ ενώ στην περίπτωση του διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $62\% \pm 2,5$ και το ΣΔΕ2 μειώνεται στο $28\% \pm 4,4$. Αντίστοιχα, όταν το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με συχνότητα 50 Hz και ο δεύτερος παλμός εφαρμόζεται 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $91\% \pm 4,7$ και το ΣΔΕ2 αντιστοιχεί στο $42\% \pm 5,2$ ενώ στην περίπτωση του διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο $71\% \pm 6,7$ και το ΣΔΕ2 στο $23\% \pm 3,2$. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται και στον παρακάτω πίνακα.

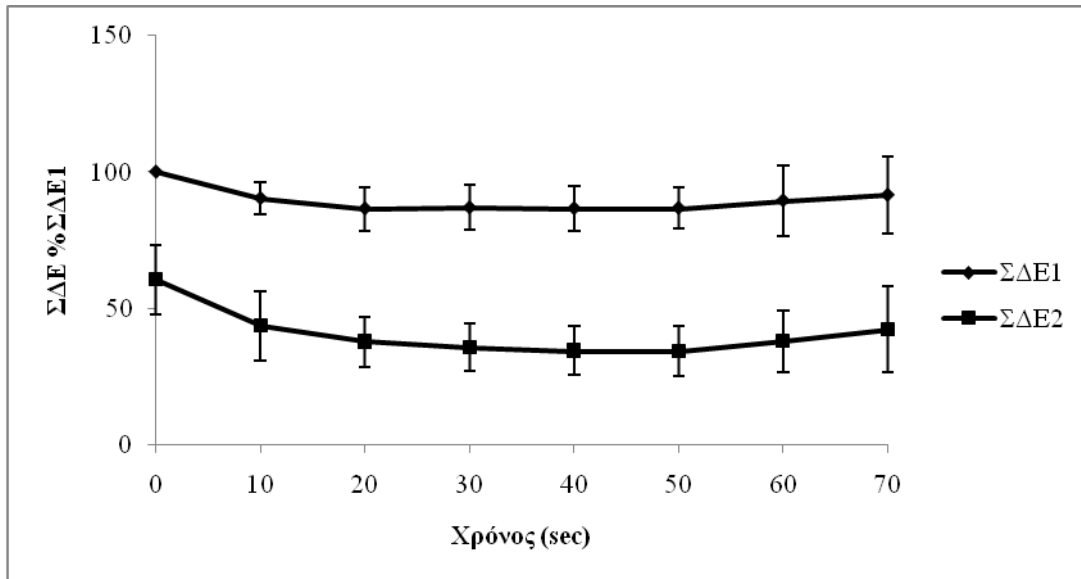
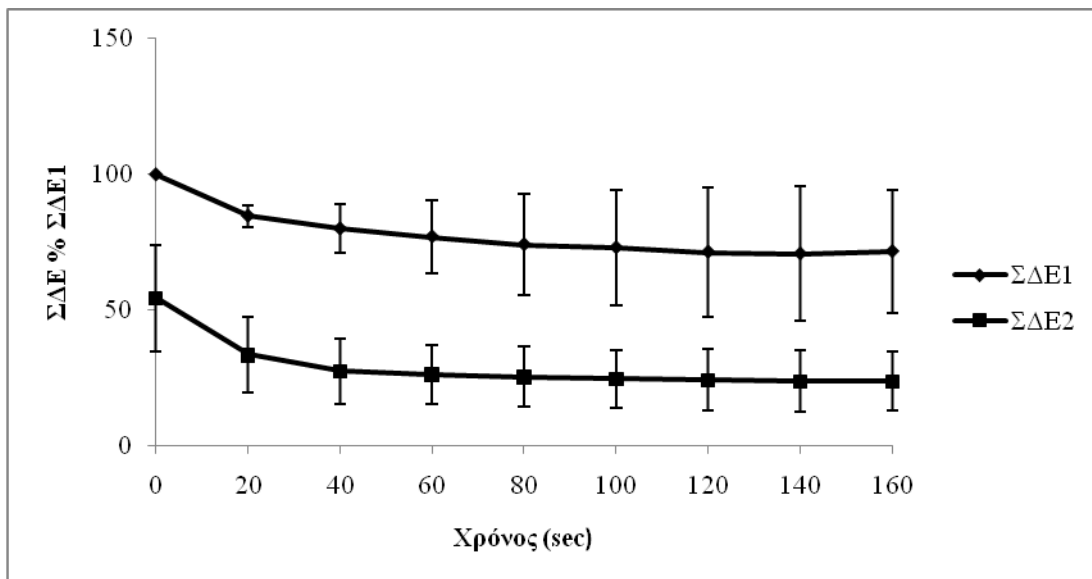
	80-90 Hz 4,2 msec		80-90 Hz 2,2 msec		50 Hz 2,2 msec	
ΣΔΕ	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΤΙΜΗΣ μάρτυρας	$69\% \pm 5,6$	$14\% \pm 3,8$	$64\% \pm 2,6$	$30\% \pm 4,04$	$91\% \pm 4,7$	$42\% \pm 5,2$
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΤΙΜΗΣ διαβητικό	$73\% \pm 6,08$	$10\% \pm 4,2$	$62\% \pm 2,5$	$28\% \pm 4,4$	$71\% \pm 6,7$	$23\% \pm 3,2$

A**B**

Εικόνα 51: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=7) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

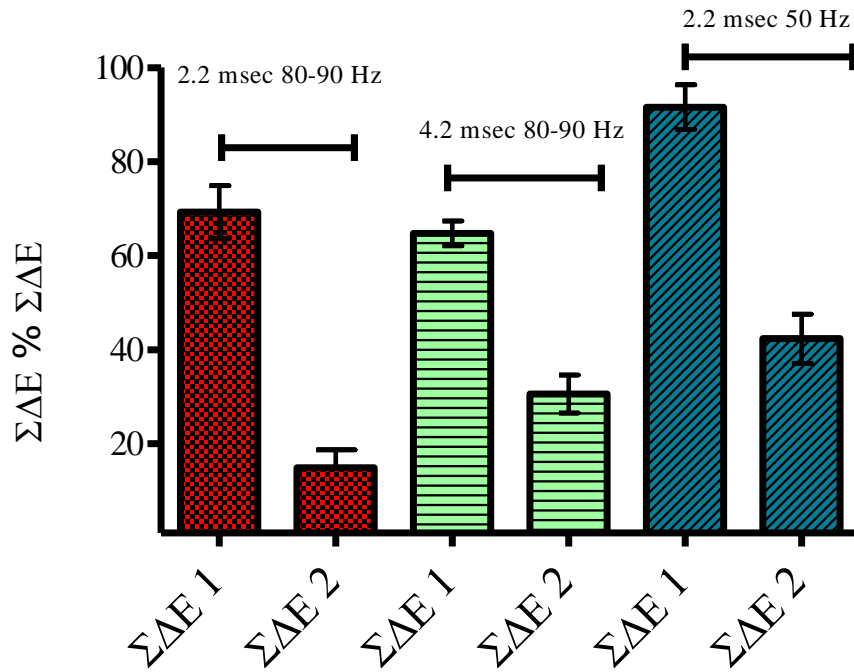
A**B**

Εικόνα 52: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτέρου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 4,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=7) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

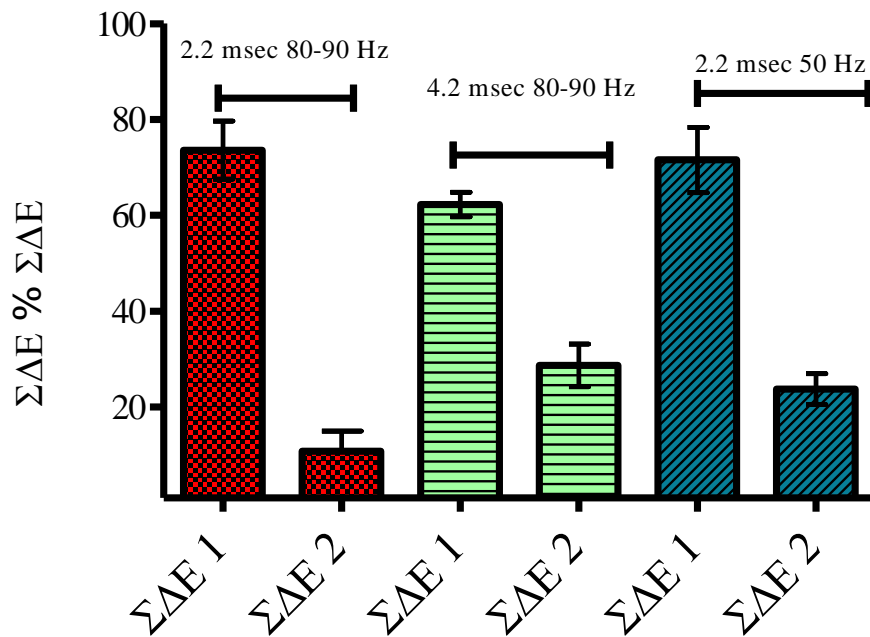
A**B**

Εικόνα 53: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=11) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

A

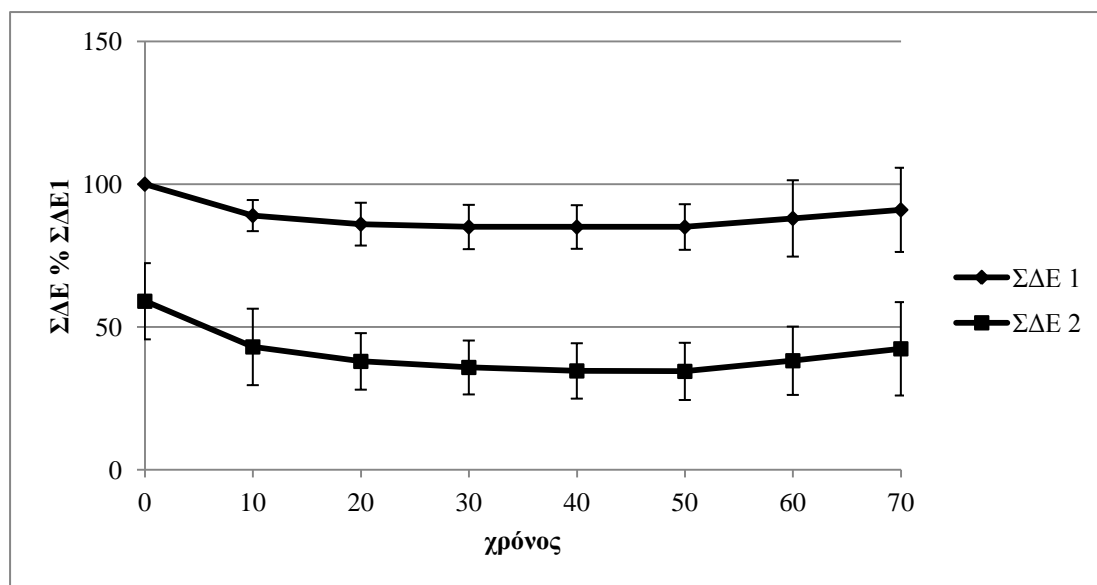


B



Εικόνα 54: Συγκριτική απεικόνιση των τριών διακριτών συνθηκών. Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσους όρους και τυπικό σφάλμα της ελάχιστης τιμής του ΣΔΕ για το ίδιο χρονικό διάστημα καταπόνησης. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα.

Για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του EDTA έναντι στην τοξικότητα που προέρχεται μετά από έκθεση των ινών σε χαλκό επιλέχθηκε ο τρίτος συνδυασμός συνθηκών δηλαδή διέγερση με συχνότητα 50 Hz και 2,2 msec από την ανερέθιστη περίοδο. Τα νεύρα για τον σκοπό αυτό διεγέρθηκαν μετά προεπώαση σε EDTA σε συγκέντρωση 0,5mM και ακόλουθη προσθήκη Cu(II) για τουλάχιστον μία ώρα (Εικόνα 55).



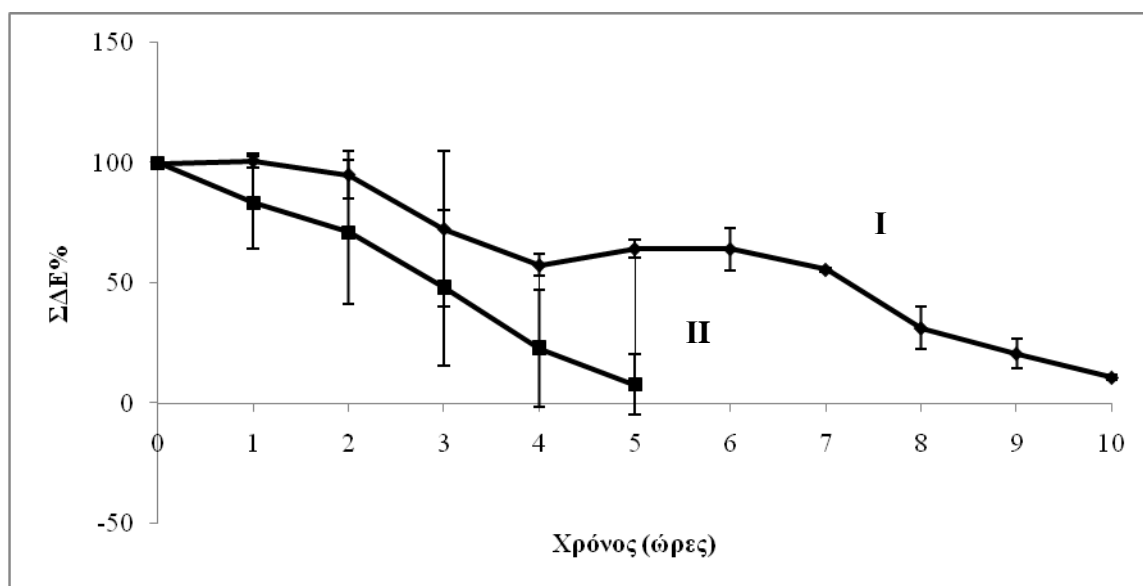
Εικόνα 55: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ μετά από προεπώαση με EDTA (0.5mM) και την ακόλουθη προσθήκη Cu(II) σε συγκέντρωση 0,5mM. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=3) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

3.5.2 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες συνθήκες σε συχνότητα διέγερσης 100 Hz (*ex vivo*)

Στα πλαίσια ανάπτυξης μοντέλου διάκρισης της φυσιολογικής από την παθολογική κατάσταση, εφαρμόστηκε επιπλέον μια δοκιμασία όπου το ισχιακό νεύρο διεγείρεται με απλό παλμό όπως στην περίπτωση των κανονικών καταγραφών, ωστόσο στην περίπτωση αυτή η συχνότητα διέγερσης αυξάνεται από 1 σε 100 Hz. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον κατάλληλα διαμορφωμένο τρίχωρο θάλαμο και μετά από μία ώρα σταθεροποίησης (συχνότητα διέγερσης 1 Hz), διεγείρεται με συχνότητα 100 Hz. Τα πειράματα αυτά διακρίνονται και πάλι σε δύο ομάδες, αυτά των φυσιολογικών ζώων (μάρτυρες) και αυτά των διαβητικών. Στην εικόνα φαίνεται η εκατοστιαία

μεταβολή του ΣΔΕ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή καταπόνηση και στις δύο ομάδες ζώων καθώς το ΣΔΕ μειώνεται σημαντικά σε σχέση με αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες καταγραφής. Επιπλέον, φαίνεται ότι το ΣΔΕ μειώνεται πιο γρήγορα στην περίπτωση των ισχιακών νεύρων που προέρχονται από διαβητικά ζώα. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του IT_{50} στην περίπτωση του μάρτυρα αντιστοιχεί σε $7,2 \pm 0,36$ ώρες ενώ στην περίπτωση των ισχιακών νεύρων από διαβητικά ζώα η τιμή του IT_{50} είναι $3,87 \pm 0,07$ ώρες. Η βιωσιμότητα δηλαδή των νεύρων των διαβητικών ζώων μειώνεται σχεδόν δύο φορές πιο γρήγορα υπό συνθήκες αυξημένης συχνότητας διέγερσης.

Η μορφή αυτή της καταπόνησης συνδέεται με ενεργειακή εξάντληση. Η περιφερική νευροπάθεια η οποία οφείλεται στον Σακχαρώδη Διαβήτη έχει συνδεθεί με ενεργειακές μεταβολές στους νευρώνες λόγω διαταραχών στην πρόσληψη και τον μεταβολισμό της γλυκόζης.

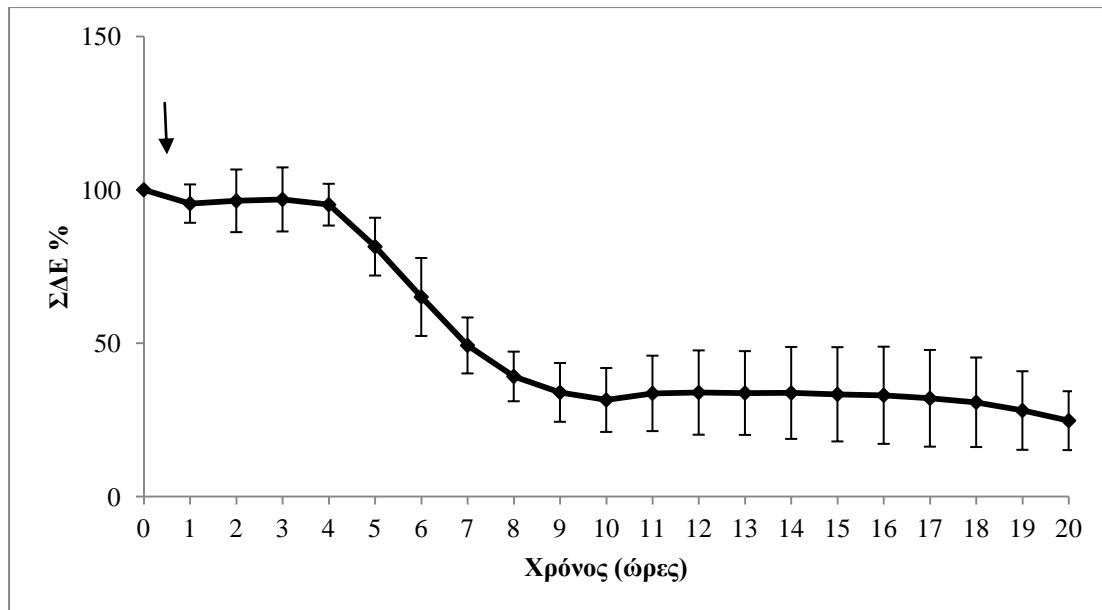


Εικόνα 56: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός), (II) σε διαβητικά ζώα μετά από διέγερση με συχνότητα 100 Hz. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων (n=4) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

3.6 Αντικαρκινικά φάρμακα

ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ

Η απόκριση των νευρικών ινών, μπορεί εκτός από μείωση του ύψους του δυναμικού που αντιστοιχεί στην βιωσιμότητα, μπορεί να εκφράζεται και μέσω άλλων χαρακτηριστικών όπως είναι η μεταβολή της διάρκειας του δυναμικού που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την εκπολωτική, επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η δράση του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα η οποία χρησιμοποιείται σε θεραπευτικά πρωτόκολλα κατά του παχέος εντέρου και έχει συνδεθεί με πρόκληση οξείας μορφής νευροπάθειας (Grothey & Goldberg, 2004; Chung & Saltz, 2007). Η οξαλιπλατίνα κατηγοριοποιείται ως αναστολέας των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν σε συγκέντρωση 100μM (0,039mg/ml). Το IT_{50} αντιστοιχεί σε $8 \pm 0,5$ ώρες παρουσιάζοντας σαφή διαφορά από αυτό του μάρτυρα. Επιπλέον, όπως φαίνεται και από τις καταγραφές του ΣΔΕ, η οξαλιπλατίνα δεν επηρεάζει τον χρόνο ανόδου του ΣΔΕ. Ωστόσο, μετά από το πέρας της πρώτης ώρας έκθεσης των νευρών στην οξαλιπλατίνα, εμφανίζονται δευτερογενείς εκπολωτικές φάσεις οι οποίες διατηρούνται για τουλάχιστον 8 ώρες. Η σημαντική διαφορά του χρόνου επαναφοράς το ΣΔΕ υποδηλώνει την αλληλεπίδραση της συγκεκριμένης ουσίας με τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου τα οποία σχετίζονται με την επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού.



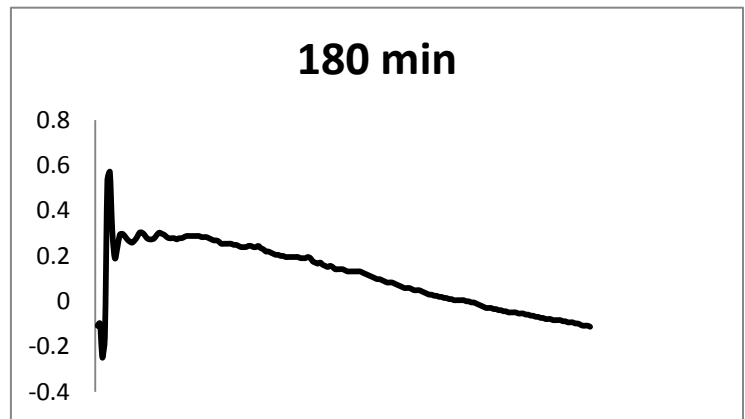
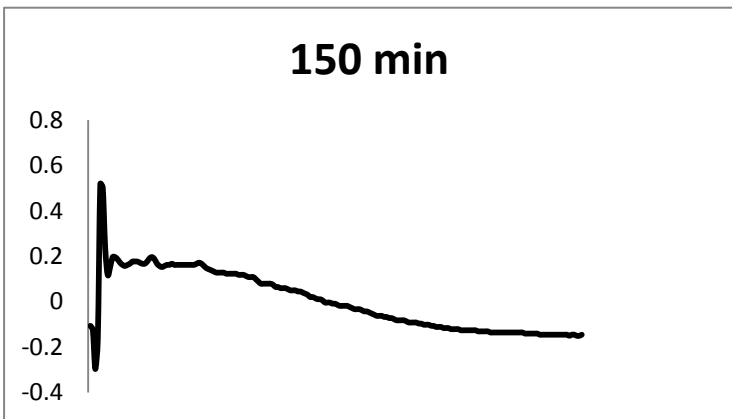
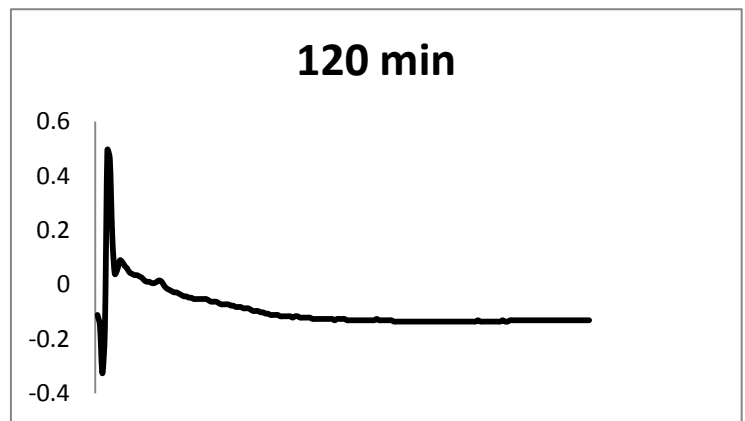
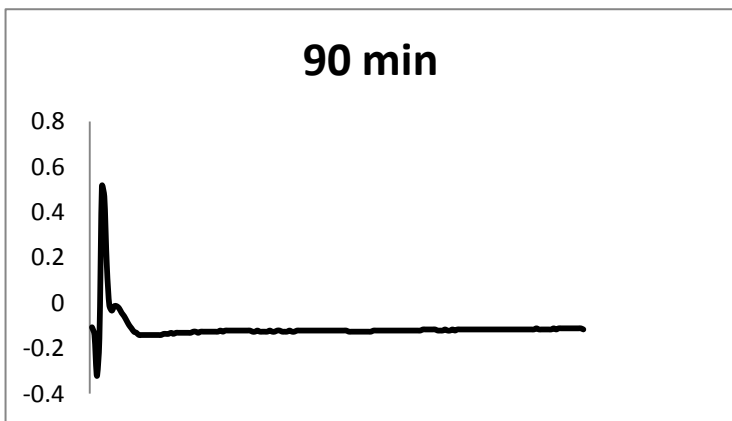
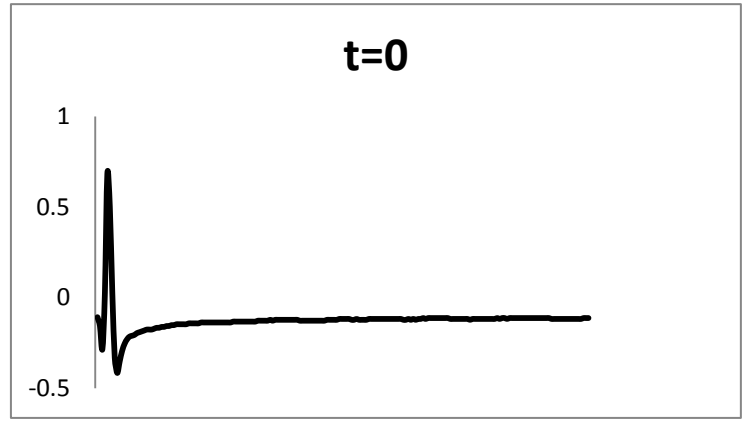
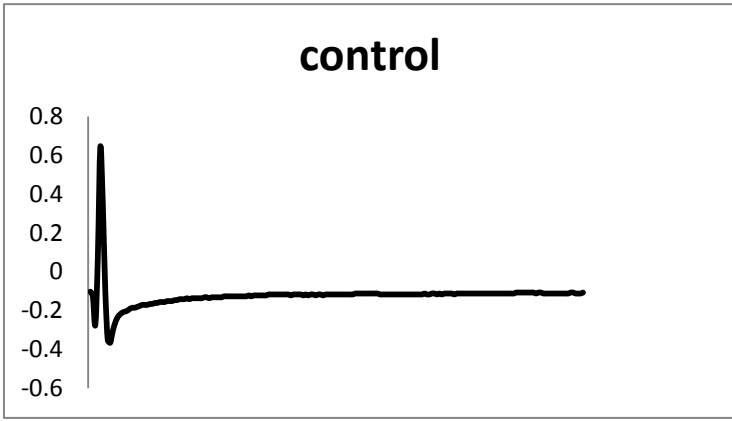
Εικόνα 57: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100 μM ($n=4$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

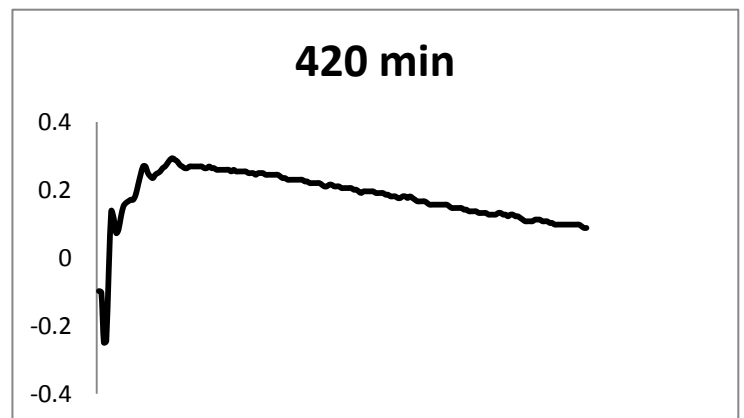
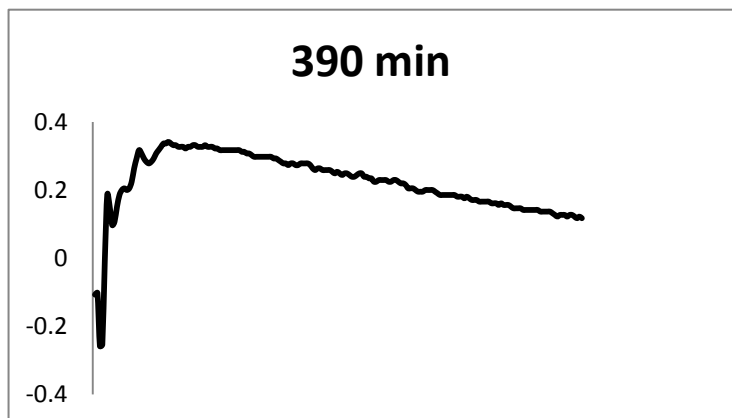
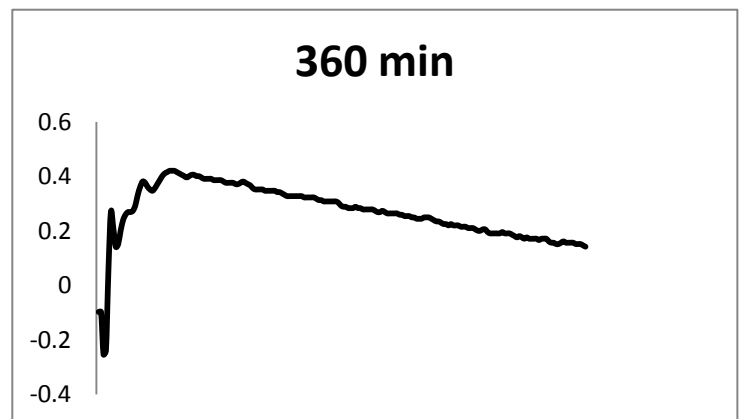
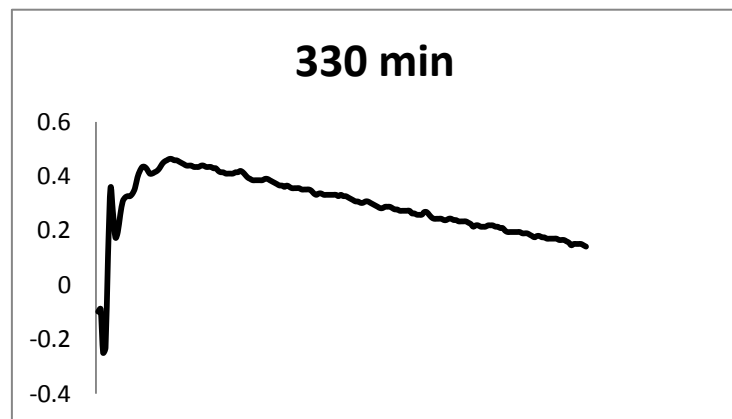
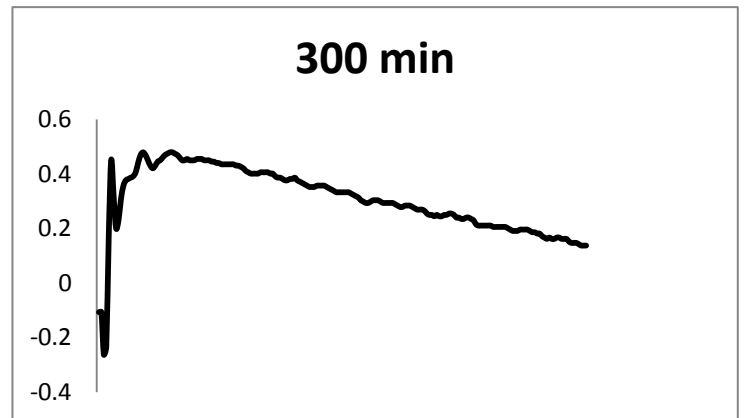
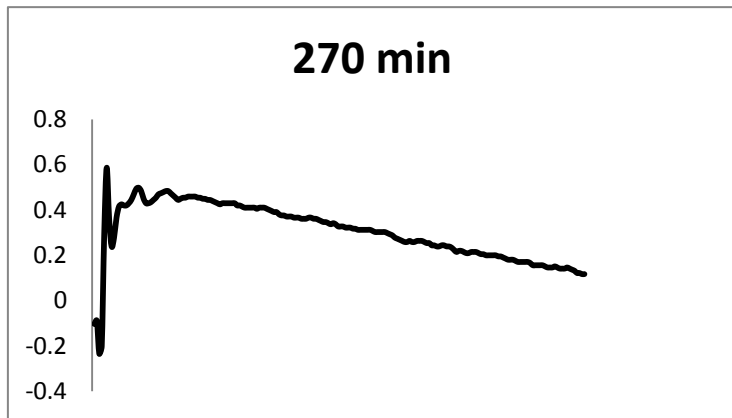
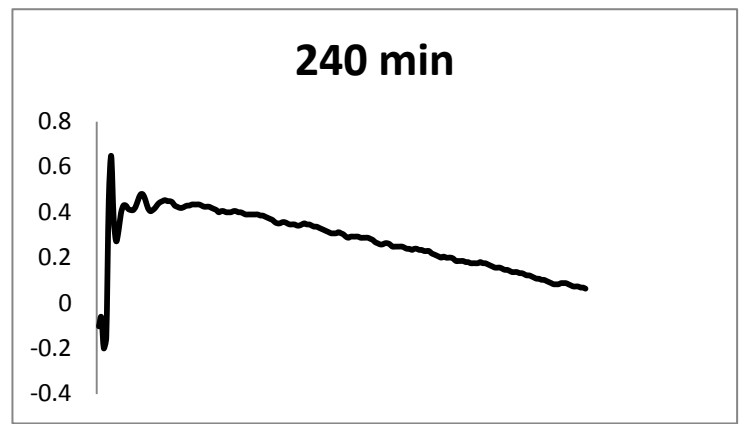
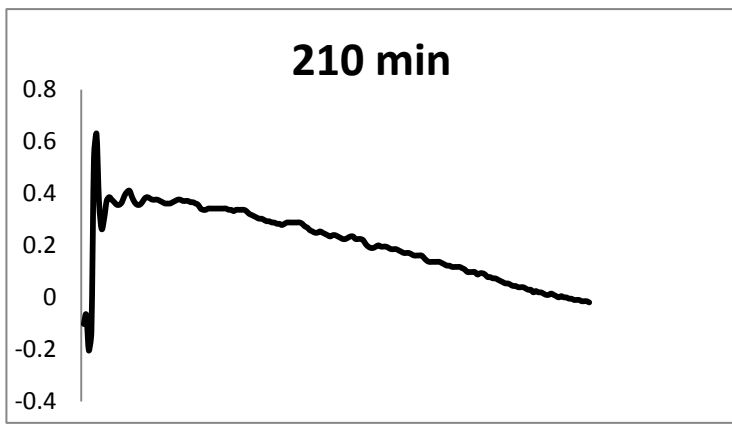
Πίνακας 6: Το ύψος και ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ σε συνθήκες μάρτυρα απουσία επινευρίου εκφρασμένο σε εκατοστιαίο ποσοστό της αρχικής τιμής του ΣΔΕ. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Χρόνος (λεπτά)	1	60	120	240	300	600
Φυσιολογικός ορός n=4						
ΣΔΕ %	100	108,89 ±7,17	107,30±6,01	100,84±3,20	100,06±2,78	99,73±4,06
Χρόνος ανόδου (ms)	0.60± 0.06	0.62±0.06	0.60±0.06	0.61±0.06	0.63±0.06	0.61±0.06

Πίνακας 7: Το ύψος και ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ μετά από προσθήκη 100μΜ οξαλιπλατίνας απουσία επινευρίου εκφρασμένο σε εκατοστιαίο ποσοστό της αρχικής τιμής του ΣΔΕ. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Χρόνος (λεπτά)	1	60	120	240	300	600
Oxaliplatin 100μΜ n=4						
ΣΔΕ %	100	97,52 ±6,88	100,21 ±7,86	103,26 ±2,11	86,14 ±4,3	35,41 ±4,72
Χρόνος ανόδου (ms)	0.53 ±0.067	0.56± 0.13	0.53±0.18	0.53±0.13	0.60±0.11	1.20±0.5





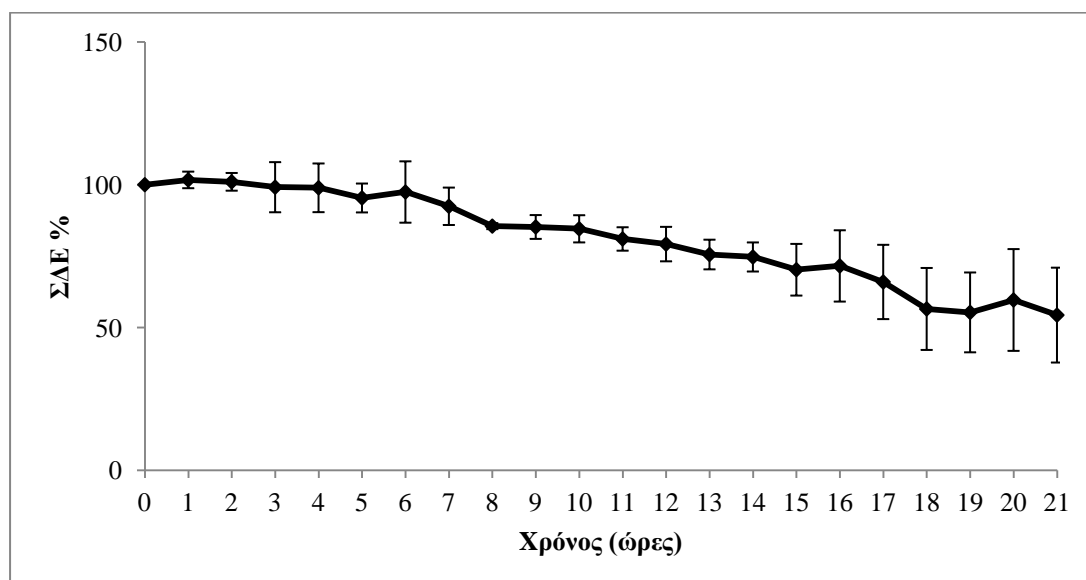
Εικόνα 58: Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100 μ M.

Cis-πλατίνη

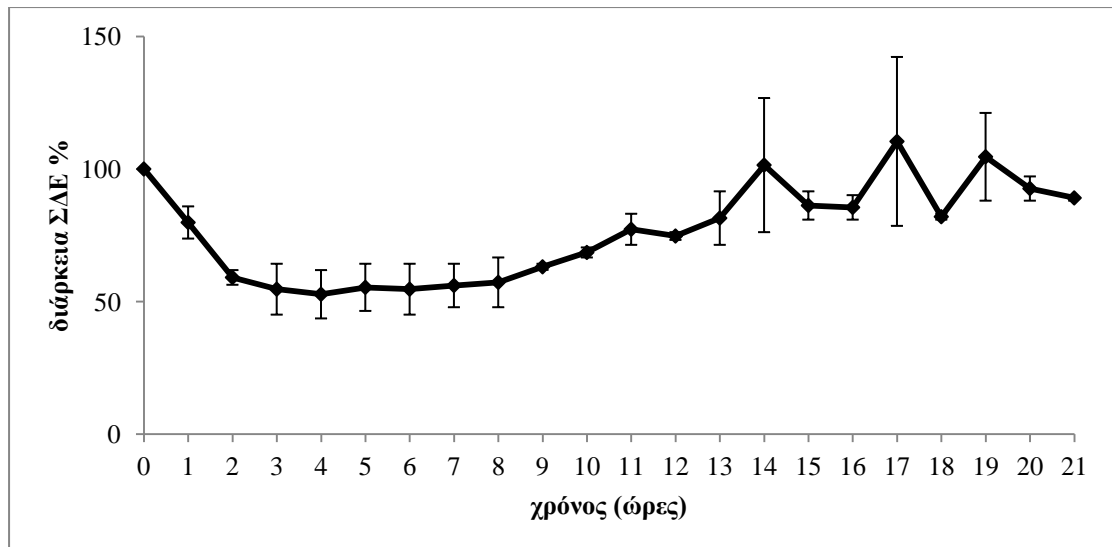
Στα ίδια πλαίσια και προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των δύο αντικαρκινικών φαρμάκων τα οποία έχουν ως βάση την πλατίνα, χρησιμοποιήθηκε η ένωση cis-πλατίνη. Όπως και στην περίπτωση της οξαλιπλατίνας, η ανάπτυξη περιφερικής νευροτοξικότητας και νευροπάθειας αποτελούν το πιο κοινό περιορισμό για την χορήγηση της cis-πλατίνης. Η cis-πλατίνη διαλύεται αρχικά σε DMSO, χρησιμοποιώντας την ελάχιστη δυνατή ποσότητα διαλύτη για αποφυγή της γνωστής τοξικής του δράσης. Η τελική αναλογία στο διαμέρισμα εμποτισμού είναι 0,039mg/ml που αντιστοιχούν σε 130μM.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η συγκεκριμένη ένωση δεν έχει καμία σχεδόν επίδραση στην βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ιών καθώς το ΣΔΕ δεν μειώνεται σημαντικά ειδικά στις πρώτες ώρες του πειράματος. Το IT_{50} αντιστοιχεί σε 19,93±0,4 ώρες τιμή η οποία πλησιάζει αυτή του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα.

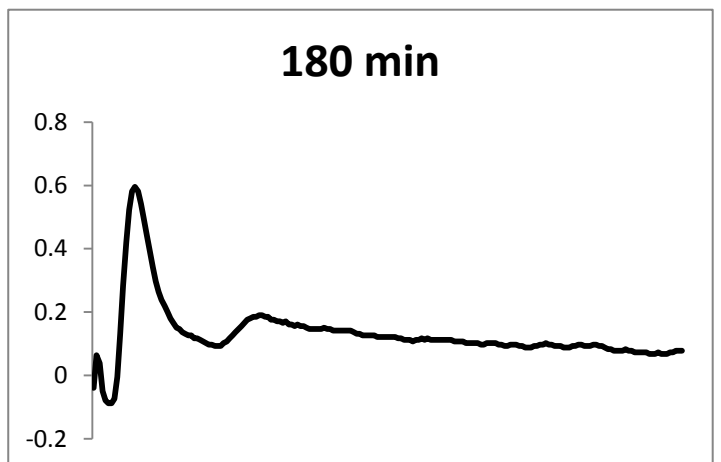
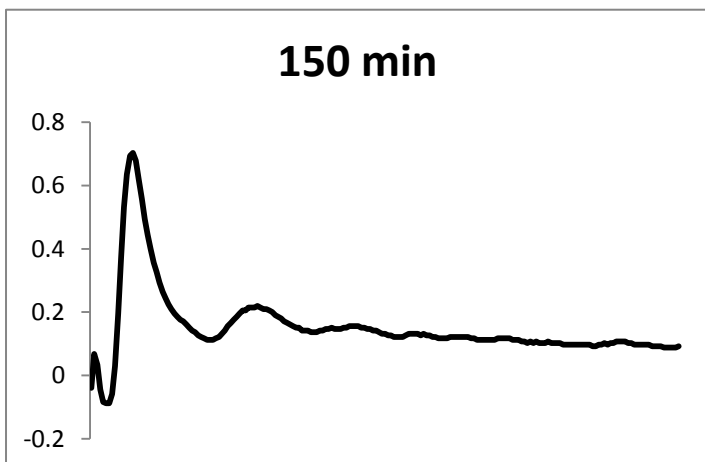
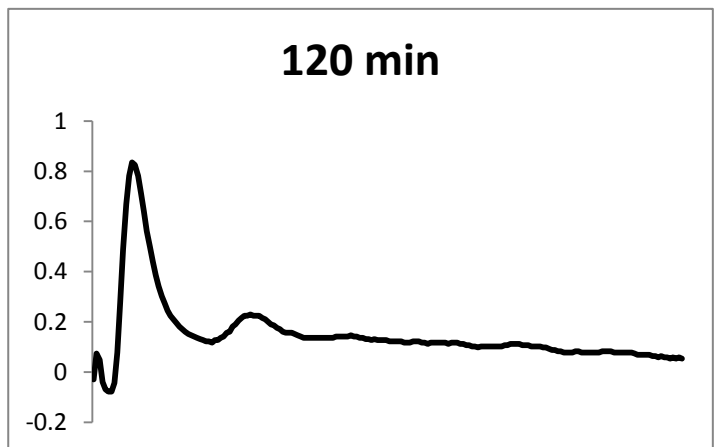
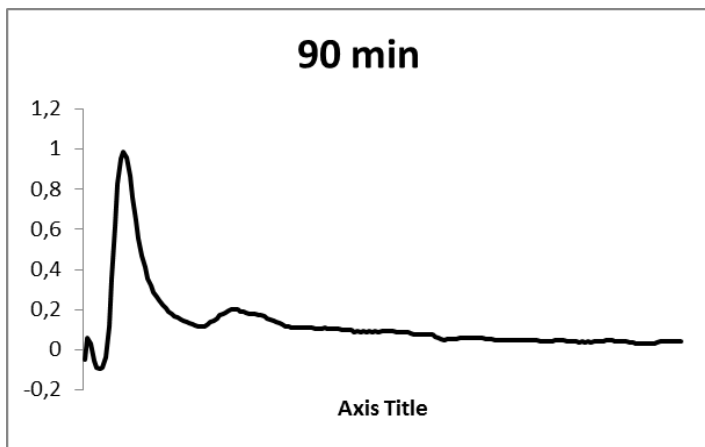
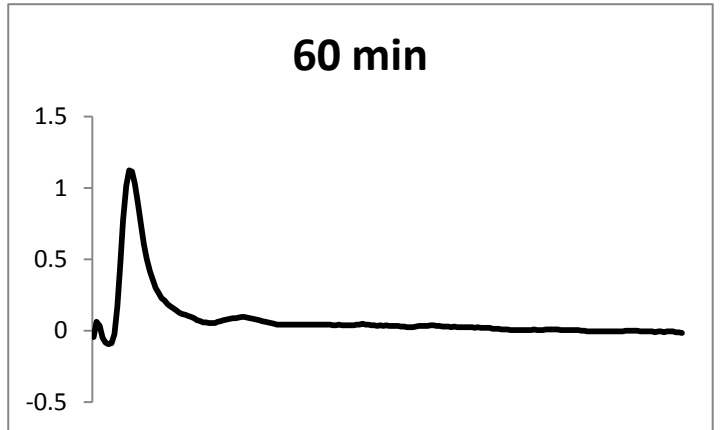
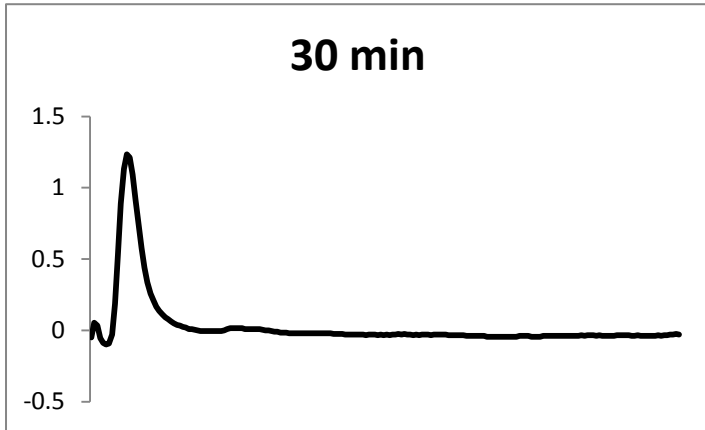
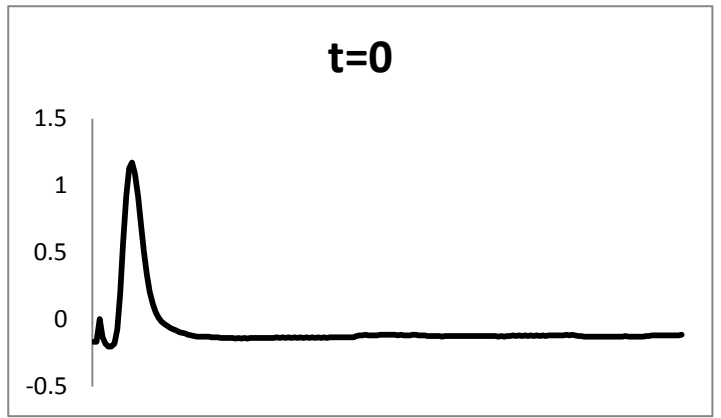
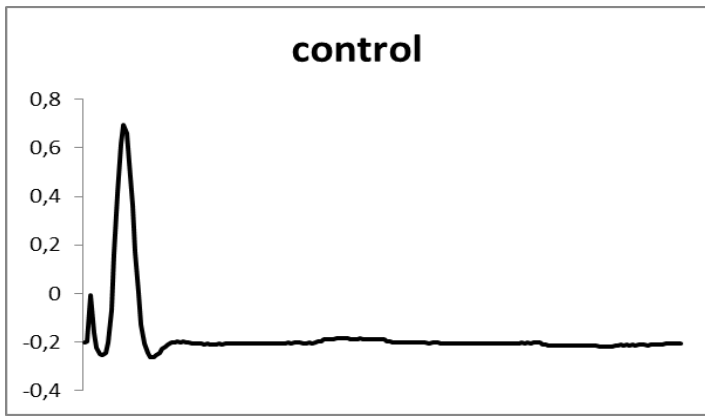
Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική επίδραση στην διάρκεια του ΣΔΕ και μεταβολές που αντιστοιχούν στην επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού.

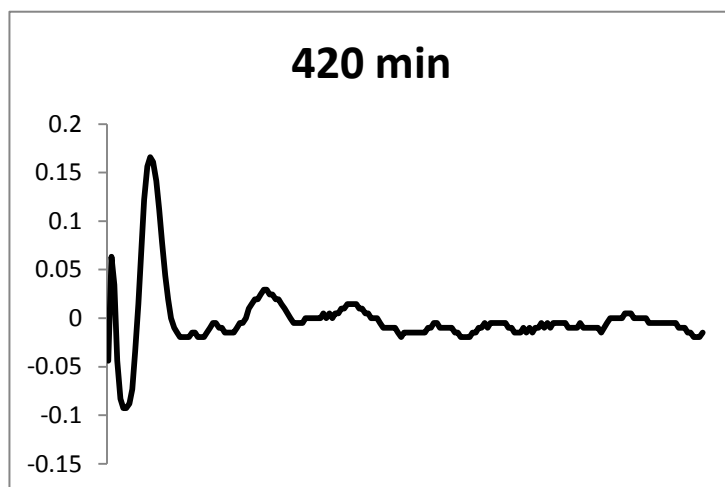
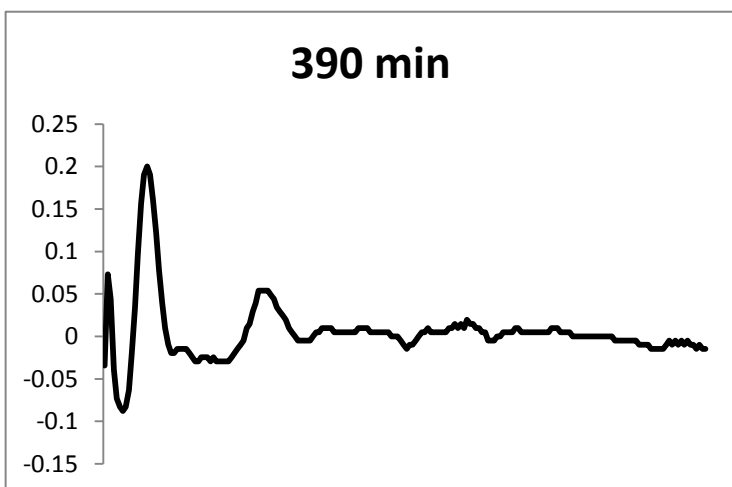
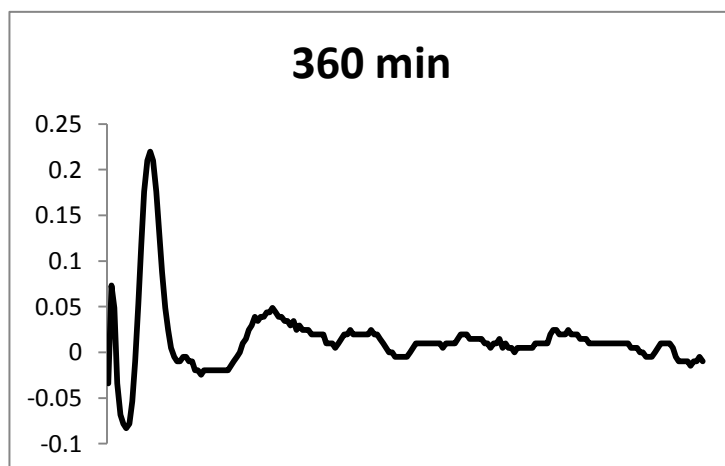
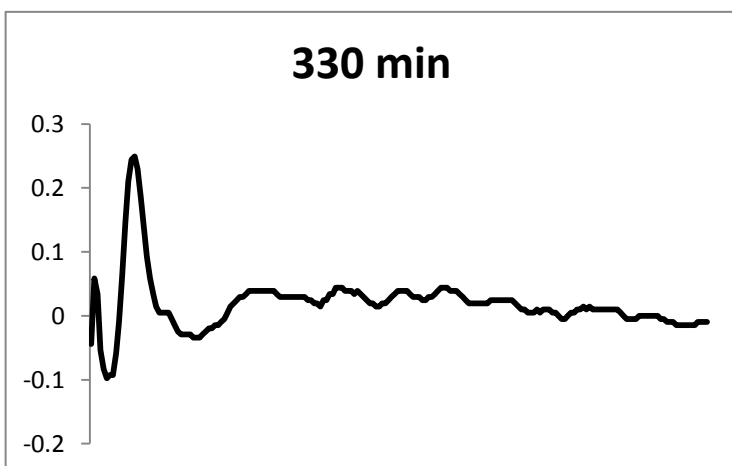
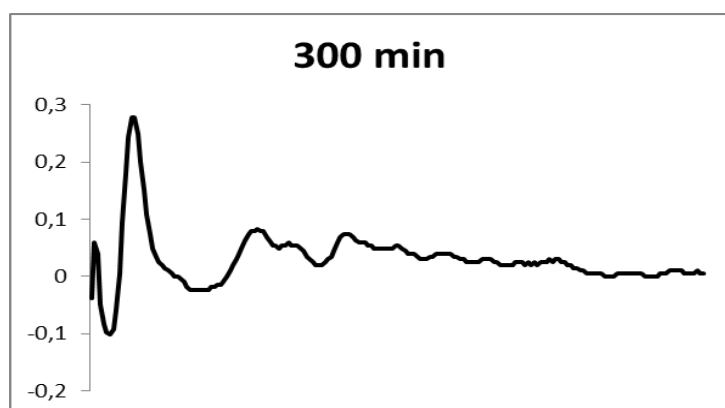
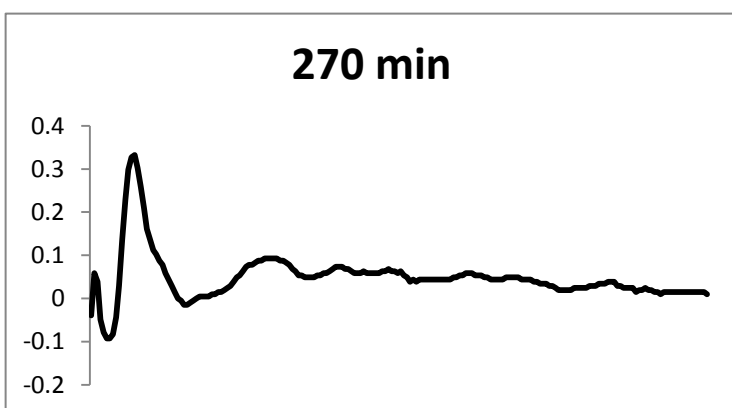
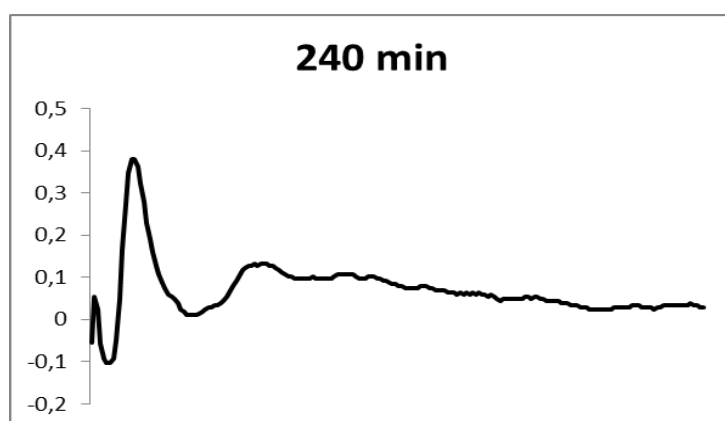
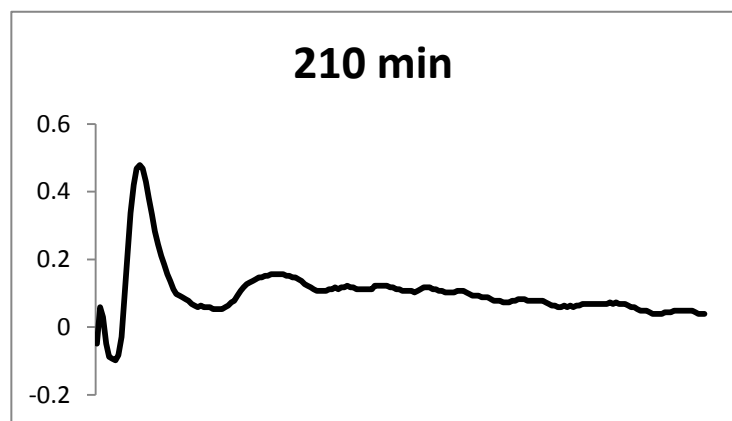


Εικόνα 59: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μM (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 60: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή της διάρκειας του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.





Εικόνα 61: Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-πλατίνη σε συφκέντρωση 130 μ M.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Νευροτοξική δράση μεταλλοϊόντων και τη νευροπροστατευτική δράση χημικών παραγόντων (ex vivo)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες καταπόνησης των περιφερικών νευρικών ινών των θηλαστικών. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν μεταλλοτοξίνες οι οποίες μπορεί να έρθουν σε επαφή με το περιφερικό νευρικό σύστημα μέσω του περιβάλλοντος, της τροφικής αλυσίδας ή ακόμα κατά την διάρκεια ή μετά από θεραπευτική αγωγή όπως στην περίπτωση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι παράγοντες αυτοί ομαδοποιούνται κάτω από τον όρο χημική καταπόνηση και η διερεύνηση της δράσης τους αποτέλεσε τον στόχο της παρούσας εργασίας.

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλοϊόντων θεωρείται απαραίτητος για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών και τα μεταλλοϊόντα αυτά θεωρούνται ενδογενή. Επιπλέον, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία δεν υπάρχουν στον οργανισμό και μπορεί δυνητικά να προκαλέσουν τοξικότητα. Τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μεταλλοϊόντα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως είναι η συγκέντρωση του ίδιου του μετάλλου, το pH του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο υπάρχει καθώς και η φύση των ενώσεων που σχηματίζει και η αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα μόρια μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη του οργανισμού. Ακόμη, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία βρίσκονται στην φύση και δρουν εξ' αρχής ως τοξικά με διάφορες ανεπιθύμητες συνέπειες με τελικούς αποδέκτες τους έμβιους οργανισμούς. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης αλλά και ποιοτικής διερεύνησης της δράσης ορισμένων μεταλλοϊόντων στις περιφερικές νευρικές ίνες των θηλαστικών.

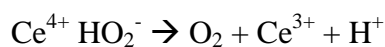
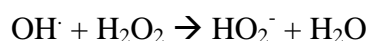
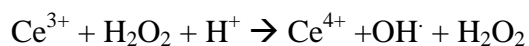
ΣΙΔΗΡΟΣ

Ο σίδηρος αποτελεί στοιχείο ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό όλων των ανθρώπινων κυττάρων και είναι απαραίτητος σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως στην παραγωγή ενέργειας. Στο νευρικό σύστημα, ο σίδηρος χρησιμοποιείται για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων του εγκεφάλου ενώ ακόμη εμπλέκεται στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών και πιθανώς της

μυελίνης. Ο ουσιαστικός βιολογικός ρόλος του σιδήρου βασίζεται στην ιδιότητα του να μεταβάλλεται εύκολα από την δισθενή στην τρισθενή μορφή. Ο σίδηρος είναι οξειδωαναγωγικά ενεργό μέταλλο συμμετέχοντας έτσι στον σχηματισμό οξειδωτικού stress. Διαταραχές στην ομοιόσταση του σιδήρου έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων του νευρικού συστήματος όπως είναι η νόσος Alzheimer και Parkinson. Επίδραση του σιδήρου στις περιφερικές νευρικές ίνες δεν μειώνει την βιωσιμότητά τους καθώς το IT_{50} είναι ίδιο σχεδόν με αυτό του αντίστοιχου μάρτυρα ($25,5 \pm 0,07$). Η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται τοξικότητα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η μορφή του μεταλλοϊόντος και πιο συγκεκριμένα η βιοδιαθεσιμότητά του. Επιπλέον, είναι πιθανό ο τρισθενής σίδηρος να μετατρέπεται σε δισθενή κατά την διάρκεια των μακροχρόνιων καταγραφών ή ακόμα και να μειώνεται η διαλυτότητά του και άρα η βιοδιαθεσιμότητά του στο υπό μελέτη σύστημα.

ΔΗΜΗΤΡΙΟ

Το δημήτριο είναι μέταλλο το οποίο ανήκει στις σπάνιες γαίες. Ως μέταλλο δεν παρουσιάζει καμία βιολογική δραστηριότητα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα οξείδια του δημητρίου έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή ικτιωμάτων διαφόρων καταλυτών. Επιπλέον, τα ίδια τα οξείδια του δημητρίου επιδεικνύουν καταλυτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο σε ιστούς όσο και σε *in vivo* μοντέλα πειραματοζώων (D'Angelo et al., 2009). Είναι γνωστό ότι το δημήτριο εμφανίζεται σε δύο οξειδωτικές βαθμίδες, +3 και +4. Στην παρούσα εργασία το δημήτριο εξετάστηκε στην οξειδωτική βαθμίδα +3. Για το χρονικό διάστημα των καταγραφών το ΣΔΕ δεν μειώθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ επίσης δεν επηρεάστηκε καμία άλλη ηλεκτροφυσιολογική παράμετρος όπως είναι η διάρκεια το δυναμικού ή ο χρόνος εκπόλωσης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το δημήτριο στην συγκεκριμένη οξειδωτική βαθμίδα ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης των millimolar, δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου των θηλαστικών και δεν αλληλεπιδρά με τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου ή καλίου. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της συμπεριφοράς του Ce(III) σε συνθήκες οξειδωτικού stress. Έχει δείχθει ότι το Ce(III), παρουσία H_2O_2 μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις Fenton\Haber Weiss ως εξής:



Η μεταλλοεπαγόμενη οξειδωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων αποτελεί κύρια πηγή οξειδωτικού stress για τα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων δημητρίου μπορεί να συνεισφέρουν στην παραγωγή οξειδωτικού stress τόσο σε κυτταροκαλιέργειες (Lin et al., 2006; Park et al., 2008) όσο και σε βακτήρια (Thill et al., 2006).

ΚΟΒΑΛΤΙΟ

Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό και σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του μπορεί να επιφέρουν τα αντίθετα αποτελέσματα (D. Beyersmann & Hartwig, 1992). Η παρουσία κοβαλτίου για τον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται να είναι σημαντική και απαραίτητη, εντούτοις η υπερβολική συγκέντρωση κοβαλτίου στα βιολογικά υγρά (παρόμοια δηλαδή με άλλα μεταλλοϊόντα όπως Mn(II), Fe(III), Cu(II), κ.ά.) μπορεί να επιφέρει αντίθετες συνέπειες και να προκαλέσει προβλήματα όπως άσθμα και πνευμονία, ειδικότερα σε ανθρώπους που έρχονται συχνά σε επαφή με αυτό. Όπως και στην περίπτωση του σιδήρου, δεν επιδρά στην βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ινών ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (500 μM) καθώς το IT_{50} αντιστοιχεί σε αυτή του μάρτυρα.

ΑΡΓΙΛΙΟ

Το αργίλιο αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μέταλλα στην φύση. Το στοιχείο αυτό δεν απαντάται ελεύθερο αλλά βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με κάποιο υποκαταστάτη. Η αναγνώριση του αργιλίου ως νευροτοξικού παράγοντα έγινε το 1988 και προστέθηκε στην λίστα υπονηφίων παραγόντων μόλυνσης από την υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των Η.Π.Α.. Όπως και τα δύο προηγούμενα μέταλλα που εξετάστηκαν έτσι και στην περίπτωση του αργιλίου δεν φαίνεται καμία ουσιαστική επίδραση του αργιλίου στις περιφερικές νευρικές ίνες. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα πολύπλοκη χημεία του συγκεκριμένου μετάλλου σε υδατικά διαλύματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η διαλυτότητα του αργιλίου είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενη από το pH. Επιπλέον, η βιολογική δράση του αργιλίου και άρα

η εμφάνιση οποιασδήποτε μορφής τοξικότητας είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με την φύση του υποκαταστάτη του μετάλλου αυτού. Δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένο ποιες είναι εκείνες οι ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Θεωρείται ότι τα ιδιαίτερα δραστικά ιόντα του Al(III) είναι υπεύθυνα για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου καθώς τα ιζήματα δεν εμφανίζουν καμία ουσιαστικά βιοδιαθεσιμότητα. Σε βιολογικά συστήματα, το ποσό των ελεύθερων ιόντων Al(III) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό των δεσμευμένων ιόντων σε σύμπλοκα με υποκαταστάτες. Όσον αφορά στην τοξικότητα, ο σχηματισμός συμπλόκων καθίσταται απαραίτητος καθώς η συμπλοκοποίηση είναι αυτή που προωθεί ή μειώνει αντίστοιχα την βιοδιαθεσιμότητα των ιόντων Al(III) και καθορίζει επίσης το σημείο σχηματισμού του συμπλόκου. Επιπλέον, το αργίλιο δεν μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδωαναγωγής λόγω του σταθερού αριθμού οξείδωσης (+3) που διαθέτει. Η τοξική του δράση σε ορισμένα *in vitro* συστήματα ωστόσο υποδεικνύει περαιτέρω διερεύνηση σε ότι αφορά τη φύση του υποκαταστάτη στο οποίο συναρμόζεται το ιόν του αργιλίου, τις φυσικοχημικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος όπου μπορεί να δράσει τοξικά το αργίλιο καθώς και ο χρόνος έκθεσης.

ΧΡΩΜΙΟ

Το χρώμιο ανάλογα με την οξειδωτική βαθμίδα που εμφανίζει μπορεί να είναι τοξικό η μη, ενδογενές ή εξωγενές. Το χρώμιο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής και της κατανάλωσης τροφής και ποτών που το περιέχουν. Το τρισθενές χρώμιο, Cr(III), θεωρείται απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον οργανισμό και παράλληλα βιολογικά αδρανές. Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) έχει χαρακτηριστεί ως αποδεδειγμένο καρκινογόνο. Το εξασθενές χρώμιο, έχει δείχθει ότι προκαλεί καρδιοτοξικότητα (Soudani, 2010) και άλλες μορφές τοξικότητας κυρίως μέσω πρόκλησης σχηματισμού οξειδωτικού stress. Στις περιφερικές νευρικές ίνες, το εξασθενές χρώμιο έχει σαφή επίδραση την βιωσιμότητα των ινών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το Cr(VI) έχει σαφή επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή IT_{50} είναι $5,7 \pm 0,42$ μετά από επίδραση με 500 μ M και $7,8 \pm 0,22$ ώρες μετά από επίδραση με 200 μ M υποδεικνύοντας ότι τοξικότητα μπορεί να εξαρτάται από την συγκέντρωση της συγκεκριμένης μεταλλοτοξίνης.

ΧΑΛΚΟΣ

Ο χαλκός αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο για πολλούς αερόβιους οργανισμούς, συμμετέχοντας σε πληθώρα βιοχημικών διεργασιών. Μετέχει εξίσου ως δομικό συστατικό πολλών κρισίμων πρωτεϊνών και ενζύμων που συμβάλλουν σε αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια, σε αντιδράσεις οξειδίας φάσης, και βοηθά στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εμφανιζόμενος με δυο οξειδωτικές μορφές, Cu(I) και Cu(II), ο χαλκός συνεισφέρει στο σχηματισμό ελευθέρων δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ακραίες τιμές συγκέντρωσης του στοιχείου έχουν αποδειχθεί τοξικές, ενώ ακόμα μελέτες έχουν δείξει ότι συσσωρεύεται και απορροφάται από πληθώρα βιολογικών ιστών, όπως τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα και οι πλάκες γήρανσης. Για τον άνθρωπο οι κύριες οδοί έκθεσης στον χαλκό αποτελούν η τροφή, το πόσιμο νερό ο αναπνεόμενος αέρας καθ'ως και το δέρμα. Στον οργανισμό, οι διάφορες ενώσεις του χαλκού εισέρχονται κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ειδικότερα μέσω του δωδεκαδάκτυλου με ενεργό μεταφορά και σπανιότερα μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου. Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικής δράσης του χαλκού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Είναι γνωστό ότι ο χαλκός καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα χαλκού (Cu^{+2}) ανάγονται από τις θειολικές ομάδες της κυτταρικής μεμβράνης προς Cu^{+1} . Ο Cu^{+1} στη συνέχεια οξειδώνεται προς Cu^{+2} από το οξυγόνο ενώ το οξυγόνο μετατρέπεται από σε ROO^{\cdot} . Βασική κληρονομική διαταραχή η οποία σχετίζεται με τον μεταβολισμό του χαλκού είναι η νόσος Wilson και που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, τα νεφρά και τον κερατοειδή. Η συσσώρευση χαλκού στο ΚΝΣ προκαλεί καταστροφή των νευρικών κυττάρων του κελύφους, του φακοειδούς και του εγκεφαλικού φλοιού. Αντικείμενο βιολογικών μελετών αποτελούν εδώ και πολλά χρόνια ο χαλκός και οι ενώσεις του για την αντιρρευματική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση. Ωστόσο, το είδος του υποκαταστάτη δηλαδή το μόριο στο οποίο συναρμόζεται το μεταλλοϊόν του χαλκού διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στον βαθμό και την δράση που επιδεικνύει το κάθε σύμπλοκο. Ανάλογα λοιπόν με το μόριο και την φύση του υποκαταστάτη μπορεί να μεταβληθεί η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του μετάλλου. Για την αξιολόγηση της δράσης του δισθενούς χαλκού, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο γλυκινικός χαλκός ο οποίος παρουσιάζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα καθώς η γλυκίνη είναι αμινοξύ που μπορεί

φυσιολογικά να βρεθεί στον οργανισμό και παράλληλα το σύμπλοκο αυτό είναι υδατοδιαλυτό σε αντίθεση με άλλα σύμπλοκα ή ενώσεις του χαλκού όπως είναι το CuCl_2 . Στις περιφερικές νευρικές ίνες των θηλαστικών, ο χαλκός παρουσιάζει σαφή δοσο-εξαρτώμενη νευροτοξικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-500 μM . Από τα αποτελέσματα προκύπτει σημαντική πτώση του ΣΔΕ, σε μικρό χρονικό διάστημα από την προσθήκη του κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, το IT_{50} για την συγκέντρωση των 500 μM είναι $3,4 \pm 0,31$, των 250 μM είναι $2,98 \pm 0,46$, των 125 μM είναι $3,64 \pm 0,23$, των 75 μM είναι $9,39 \pm 0,17$, των 25 μM είναι $10,84 \pm 0,54$ ενώ για συγκέντρωση 1 μM το IT_{50} είναι $23,55 \pm 0,14$ το οποίο είναι σχεδόν ίσο με αυτό του μάρτυρα. Στις τρεις υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν το IT_{50} είναι σχεδόν το ίδιο συμπεραίνοντας ότι συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα 100 μM και μέχρι τα 500 μM τουλάχιστον ανήκουν στο πλατώ τοξικότητας του συγκεκριμένου μετάλλου για το σύστημα το οποίο μελετάται. Σε συγκέντρωση 500 μM το ΣΔΕ μειώνεται 6,61 φορές πιο γρήγορα σε σχέση με τον μάρτυρα. Ωστόσο, η επίδραση του χαλκού δεν επηρεάζει άλλες ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος εκπόλωσης ή διάρκεια του ΣΔΕ. Επιπλέον υπολογίστηκε και το IC_{50} δηλαδή η συγκέντρωση εκείνη που επιφέρει μείωση του ΣΔΕ στο 50% του μάρτυρα με χρήση του προγράμματος Graph pad Prism 5 και που αντιστοιχεί στα 60 μM .

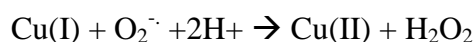
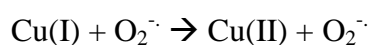
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το επινεύριο διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο εμποδίζοντας ή καθυστερώντας την πρόσβαση ορισμένων ουσιών στις νευρικές ίνες. Το IT_{50} παρουσία του επινευρίου έχει τιμή $12,56 \pm 0,53$ ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το IT_{50} μετά από αφαίρεση του επινευρίου αντιστοιχεί σε $2,56 \pm 0,46$. Συνεπώς, η παρουσία του επινευρίου επιφέρει 4,2 φορές πιο αργή μείωση του ΣΔΕ μετά από επίδραση με Cu(II) και άρα το επινεύριο δεν είναι πλήρως και άμεσα περατό από τα μεταλλοϊόντα του χαλκού.

Μετά την επιβεβαίωση της νευροτοξικής δράσης του χαλκού στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού της τοξικής του δράσης. Για τον σκοπό αυτό αρχικά, τα νεύρα εκτάθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM στον υποκαταστάτη του υπό μελέτη συμπλόκου, δηλαδή την γλυκίνη. Το IT_{50} για την γλυκίνη αντιστοιχεί σε $19,05 \pm 0,08$ ώρες, τιμή η οποία πλησιάζει αρκετά αυτή του μάρτυρα. Συνεπώς η τοξική δράση που παρατηρείται στις νευρικές ίνες

μετά από επώαση με γλυκινικό χαλκό οφείλεται στο μεταλλοϊόν και όχι στον υποκαταστάτη του συμπλόκου.

N-ακετυλοκυστεΐνη

Ο χαλκός είναι οξειδωαναγωγικά ενεργό μεταλλοϊόν οπότε μέσω αντιδράσεων Fenton και Fenton Weiss είναι δυνατό να συμμετέχει στον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η ένωση N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Το NAC είναι γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει την τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με αποτέλεσμα να αναστέλλει την τοξική τους δράση όπως έχει δειχθεί και σε άλλες εργασίες (He et al., 2008; Moschou et al., 2008a; Papaefthimiou et al., 2009). Το NAC δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση μέχρι και 1 mM. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προεπώαση του νεύρου με NAC σε συγκεντρώσεις 1 και 0,5mM και έπειτα προστέθηκε ο χαλκός σε διάφορες συγκεντρώσεις (125, 250 και 500 μ M) προκειμένου να διερευνηθεί η σχετική αναλογία (στοιχειομετρικά) όπου το NAC μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία του NAC οδηγεί σε μικρή αύξηση του IT₅₀ του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε Cu(II) ωστόσο η αντιοξειδωτική του δράση εξαρτάται από την συγκέντρωση της μεταλλοτοξίνης. Προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 1mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M αντιστοιχεί σε IT₅₀ ίσο με 1,69±0,51. Επιπλέον, προεπώαση με 1mM NAC και ακόλουθη προσθήκη 250 και 125 μ M Cu(II) οδηγεί σε IT₅₀ ίσο με 3,79±0,33 και 7,26±0,41 ώρες. Προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0,5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M Cu(II) αντιστοιχεί σε IT₅₀ ίσο με 6,04±0,35 ενώ προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0,5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 125 μ M αντιστοιχεί σε IT₅₀ ίσο με 2,7±0,12. Ακόμα, συμπεραίνεται λοιπόν ότι η παρουσία του Cu(II) συντελεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Ωστόσο, η ιδιαίτερα μικρή διαφοροποίηση του IT₅₀ σε συνδυασμό με την ελάττωσή του όταν η στοιχειομετρική αναλογία ήταν 1\1 σε υψηλές συγκεντρώσεις (0,5mM NAC-0.5mM Cu(II)), δικαιολογείται από την ιδιότητα του χαλκού να αντιδρά με τις θειόλες προς σχηματισμό H₂O₂. Σε *in vitro* καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, το NAC έχει χρησιμοποιηθεί επικουρικά με τον δισθενή χαλκό με στόχο τον κυτταρικό θάνατο μέσω παραγωγής H₂O₂ (Zheng et al., 2010). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν ως εξής:



Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση του δισθενούς χαλκού με θειόλες όπως είναι η Ν-ακετυλοκυστεΐνη είναι δυνατό να συνεισφέρει στην παραγωγή υεροξειδίου του υδρογόνου με τρόπο ωστόσο που εξαρτάται από την σχετική στοιχειομετρική αναλογία των αντιδρώντων όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Κινικό οξύ (quinic acid- QA)

Στα ίδια πλαίσια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το κινικό οξύ είναι φυσικό μόριο και απαντάται κυρίως στα φυτά σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως υποκαταστάτης πολλών μετάλλων λόγω της ιδιότητάς του να χηλικοποιεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1mM. Η παρουσία του κινικού οξέος φαίνεται να μην επιφέρει καμία μεταβολή στην τοξική επίδραση η οποία οφείλεται στην δράση της μεταλλοτοξίνης [(IT₅₀ παρουσία QA/Cu(II) ίσο με IT₅₀ παρουσία Cu(II)]. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται και σε θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς η συμπλοκοποίηση του κινικού οξέος με τον χαλκό δεν είναι σταθερή με αποτέλεσμα του κινικό οξύ να μη μπορεί να δράσει χηλικοποιητικά έναντι του χαλκού.

Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δράση ενός ισχυρού χηλικοποιητικού μορίου, του EDTA. Η σταθερότητα των συμπλόκων που σχηματίζει οφείλεται στις πολλές θέσεις σύνδεσης του μορίου του EDTA (μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων ατόμων αζώτου και οξυγόνου), το οποίο είναι ένας τυπικός πολυσχιδής (ή πολυδοντικός) υποκαταστάτης (multidentate ligand). Το EDTA σε παρόλο που φαίνεται να μην είναι τοξικό, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατό να χηλικοποιεί και να απομακρύνει από το σύστημα άλλα ενδογενή απαραίτητα μέταλλα. Για τον λόγο αυτό σε συγκέντρωση 1mM το IT₅₀ αντιστοιχεί σε 11,93±0,11 ώρες ενώ σε συγκέντρωση 0,5mM IT₅₀ είναι

IT₅₀ 28,04±0,42, τιμή που επιτρέπει την χρήση έναντι της δράσης του χαλκού. Το EDTA χρησιμοποιήθηκε σε στοιχειομετρική αναλογία, σε σχέση με τον χαλκό, 1/1 και 1/2. Το IT50 στην πρώτη περίπτωση είναι 13,4±0,53 ώρες ενώ στην δεύτερη IT₅₀ = 19,86±0,73. Το EDTA χηλικοποιεί αποτελεσματικά τον χαλκό ενώ η στοιχειομετρική αναλογία φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά την αλληλεπίδραση των δύο μορίων.

Η χρήση αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών μορίων προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης του χαλκού επί των περιφερικών νευρικών ινών προσφέρει έμμεσα δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν την εμπλοκή του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος στο σχηματισμό οξειδωτικού stress. Για την επιβεβαίωση της συμμετοχής των ενεργών μορφών οξυγόνου στην παρατηρούμενη μείωση της βιωσιμότητας των νευρικών ινών μετά από επίδραση με την μεταλλοτοξίνη του χαλκού χρησιμοποιήθηκε και ιστολογική μέθοδος και πιο συγκεκριμένα χρώση με το φθοριόχρωμα διχλωροφλουροσκεΐνη. Στα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά μήκος του κυτταροπλάσματος σχεδόν παρόμοια με αυτή μετά από επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο είναι γνωστό οξειδωτικό μέσο και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

4.2 Νευροτοξική δράση του cis-[Cu(II)-glycinate] (*in vitro*)

Η τοξικότητα που επάγεται από το μεταλλοϊόν του χαλκού και η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση χημικών ενώσεων αξιολογήθηκε επιπλέον και σε *in vitro* μοντέλο σε πρωτογενή καλλιέργεια ιπποκαμπιαίου ιστού. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιστού πραγματοποιήθηκε στοχευμένα καθώς έχει δείχθει ότι η συγκέντρωση του χαλκού αυξάνει σε ιστούς του εγκεφάλου σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες ανάγοντας συχνά την παράμετρο αυτή σε παθολογοανατομικό δείκτη των ασθενειών αυτών.

Για την διερεύνηση της τοξικής δράσης του Cu(II) *in vitro*, κύτταρα (νευρώνες και γλοία) του ιπποκαμπιαίου ιστού νεογνών αρουραίων διεγέρθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα (3 ώρες) με Cu(II)-glycinate σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μM ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς καμία επίδραση. Και στην περίπτωση των κυτταροκαλιεργειών τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή δόσο-εξερτώμενη τοξικότητα του Cu(II) και στους δύο κυτταρικούς τύπους η οποία

εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM . Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης για τους νευρώνες είναι $76\% \pm 2,2$ ενώ για την γλοία είναι $78,7\% \pm 1,6$. Αξίζει να αναφερθεί ότι η γλοία εμφανίζει σχετικά πιο αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις (2,58 φορές σε συγκέντρωση 500 μM), παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνει τον προστατευτικό και στηρικτικό ρόλο ως προς τους νευρώνες.

Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA

Όπως και στην περίπτωση των ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών (*ex vivo*), έγινε χρήση του χηλικοποιητικού μορίου EDTA καθώς και του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το EDTA χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες σε σχέση με το μεταλλοϊόν του χαλκού και τα αποτελέσματα δείχνουν σαφή και νευροπροστατευτική δράση καθώς το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης είναι ίδια με αυτό του μάρτυρα τόσο στους νευρώνες όσο και στην γλοία. Η νευροπροστατευτική δράση του EDTA ως χηλικοποιητικού παράγοντα, σε αλληλεπίδραση με τις διαλύτες και τις βιοδιαθέσιμες μορφές του Cu(II) , αναδεικνύεται ως σημαίνον θέμα προς περαιτέρω μελέτη.

Αντίθετα, το κινικό οξύ φαίνεται να μην έχει σχεδόν καμία επίδραση στην προκαλούμενη από τον χαλκό τοξικότητα και μάλιστα φαίνεται να ενισχύει σε μικρό βαθμό την τοξική δράση του χαλκού τόσο στην γλοία όσο και στους νευρώνες. Το κινικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως νευροπροστατευτικός παράγοντας έναντι της τοξικότητας του σιδήρου σε πρωτογενείς υποκαμπιαίες καλλιέργειες (Nday et al., 2012) αλλά και έναντι του αργιλίου (Nday et al., 2010) όπου βραχεία έκθεση 3 ωρών καθώς και μακρά έκθεση 24 ωρών των καλλιιεργειών σε Fe(III) και Al(III) υποδεικνύει σαφή διαφορά της επίδρασης του σε κύτταρα της γλοίας και των νευρικών κυττάρων όσον αφορά την βιωσιμότητα αυτών και η χρήση του κινικού οξέος στην ελεύθερη και δεσμευμένη του μορφή παρουσιάζει βασικές δομικές και χημικές ιδιότητες των φυσικών χηλικοποιητών μεταλλικών ιόντων. Η νευροπροστατευτική επίδραση του QA οφείλεται α) στην ικανότητά του να χηλικοποιεί τα αντίστοιχα μεταλλοϊόντα επηρεάζοντας έτσι τη χημική τους δραστηριότητα, και τελικά επηρεάζοντας την τοξικότητα τους στη γλοία και στους νευρώνες. Η έλλειψη νευροπροστατευτικής δράσης του κινικού οξέος έναντι στον

νευροτοξικότητα του χαλκού οφείλεται βέβαια σε θερμοδυναμικά δεδομένα όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

4.3 Αξιολόγηση της δράσης αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων

Οξαλιπλατίνα – cis-πλατίνη

Η απόκριση των νευρικών ιών, μπορεί εκτός από μείωση του ύψους του δυναμικού που αντιστοιχεί στην βιωσιμότητα, να εκφράζεται και μέσω άλλων χαρακτηριστικών όπως είναι η μεταβολή της διάρκειας του δυναμικού που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη.

Η οξαλιπλατίνη και η cis-πλατίνη αποτελούν αντινεοπλασματικά φάρμακα για διάφορους τύπους καρκίνου. Η οξαλιπλατίνα χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου και αποτελεί αντικαρκινικό φάρμακο τρίτης γενιάς αντικαθιστώντας σε πολλές περιπτώσεις την cis-platin.

Και τα δύο αυτά φάρμακα έχουν συνδεθεί με την πρόκληση ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης νευροπάθειας. Η δράση τους επικεντρώνεται στο ΠΝΣ καθώς δεν είναι δυνατό να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Quasthoff & Harung, 2002). Υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες ασχολούνται με την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των ουσιών αυτών καθώς και με την πρόκληση περιφερικής νευροπάθειας. Τα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία έχουν ως βάση την πλατίνα ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς (Donzelli et al., 2004) ενώ ακόμη μπορεί να δρουν επί των ιοντικών καναλιών που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη (Rosetto et al., 2006). Έχει δειχθεί ότι η οξαλιπλατίνα μπορεί να μεταβάλει την αξονική διεγερσιμότητα των νευρικών ιών, ιδιότητα η οποία οφείλεται σε μεταβολή της φυσιολογικής λειτουργίας των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου (TEKNa) και μάλιστα με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση της ένωσης (Krishmann et al., 2006; Park et al., 2009). Παρόλο που η οξαλιπλατίνα είναι σαφώς πιο υδατοδιαλυτή σε σχέση με την cis-πλατίνη, η χρόνια χορήγηση των ουσιών αυτών επιφέρει περιφερική νευροπάθεια ίδιου τύπου. Σε επίμυες η χρόνια χορήγηση των αντικαρκινικών αυτών φαρμάκων οδήγησε σε περιφερική νευροπάθεια όμοια με αυτή σε ανθρώπους και σχετίζεται με την προσβολή των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας

(Cavaletti et al., 1992; Tredici et al., 1998; Cavaletti et al., 1998; Holmes et al., 1998; Cavaletti et al., 2001). Η πρόκληση βλάβης του γάγγλιου της ραχιαίας ρίζας μετά από έκθεση σε cis-πλατίνη οφείλεται σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών. Η οξαλιπλατίνα σε κύτταρα του νευροβλαστώματος της σειράς SH-SY5Y παρουσιάζει την ίδια νευροτοξική δράση με την cis-πλατίνη ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, μειώνοντας την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και αυξάνοντας παράλληλα την προαποπτωτική πρωτεΐνη p53 (Donzelli et al, 2004).

Στις περιφερικές νευρικές ίνες του επίμυος η οξαλιπλατίνα ($IT_{50}=8\pm 0,5$ μειώνει το ΣΔΕ αμεσότερα σε σχέση με την cis-πλατίνη ($IT_{50}=19,93\pm 0,4$). Και τα δύο φάρμακα σε αναλογία $0,039\text{mg/ml}$ προκαλούν την εμφάνιση δευτερογενών εκπολώσεων με το φαινόμενο να είναι σαφώς πιο έντονο στην περίπτωση της οξαλιπλατίνας ειδικότερα κατά το πρώτο χρονικό διάστημα και μέχρι το πέρας των πρώτων 5 ωρών μετά την χορήγηση των ενώσεων αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων ενδογενών και μη μεταλλοιδόντων στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης των μεταλλοιδόντων αυτών καθώς και αξιολόγηση του νευροπροστατευτικού δυναμικού γνωστών αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών παραγόντων.

Η διάφοροι χημικοί παράγοντες καταπόνησης έχουν ως στόχο δράσης την συνολική δομή των νευρώνων καθώς και τα τασεοελεγχόμενα κανάλια τα οποία εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Ο τρόπος δράσης των παραγόντων αυτών μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών που δεν αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο.

- Ο σίδηρος και το αργίλιο δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου ενώ το κοβάλτιο και το δημήτριο εμφανίζουν ήπια τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- Ο χαλκός και το χρώμιο μειώνουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται σε πρόκληση οξειδωτικού stress και γίνεται έκδηλη μέσω μείωσης του ΣΔΕ.
- Ο χαλκός εκτός από τις περιφερικές νευρικές ίνες, επιδρά και στα κύτταρα του ιπποκάμπου του εγκεφάλου και η τοξικότητα αυτή είναι δόσο-εξαρτώμενη.

- Τα αντικαρκινικά φάρμακα, οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη τα οποία ανήκουν στις αντινεοπλασματικές ενώσεις με βάση την πλατίνα επηρεάζουν το ΣΔΕ μειώνοντάς το. Ωστόσο, επιδρούν άμεσα στα τασεοελεγχόμενα κανάλια Na^+ και K^+ . Η δράση αυτή γίνεται έκδηλη με παρατεταμένη εκπολωτική και επαναπολωτική περίοδο.
- Η N-ακετυλο-κυστεΐνη, παρότι αναγωγικό μόριο, δρα επικουρικά με τον χαλκό ενισχύοντας σε πολλές περιπτώσεις την νευροτοξική του δράση καθώς αντιδρά με τον Cu(II) προς παραγωγή H_2O_2 .
- Το κινικό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από το χαλκό τοξικότητα ενώ το EDTA χηλικοειί αποτελεσματικά το χαλκό προστατεύοντας τον νευρικό ιστό στο σύνολό του.
- Η προστατευτική δράση των διαφόρων χημικών παραγόντων εξαρτάται από θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς και από την φύση των μορίων που συμπλοκοποιούν τα εκάστοτε μεταλλοϊόντα.
- Η νευροτοξική και καταπονητική δράση των μεταλλοϊόντων διακρίνεται ανάλογα με τον στόχο και το τελικό αποτέλεσμα που επιφέρουν σε: άμεση ή έμμεση, δομική ή λειτουργική.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Andreou A, Dabarakis N, Kagiava A, Kosmidis EK, Geronikaki A, Theophilidis G.** Assessing the effects of three dental impression materials on the isolated sciatic nerve of rat and frog. 2007. *Toxicology in Vitro*. 21: 103–108
- **Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M., Preuss HG.** Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. 2002. *Toxicology*, 30:5-22
- **Balaran RS, Nemoto S, Finkel T.** Mitochondria, oxidants, and aging. 2005. *Cell* ;120:483–495
- **Barranco-Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF.** Risk factors for Alzheimer's disease. 2005. *Rev Neurol*. 40(10):613-8
- **Bate L. C., Leddicotte G. W.** NAS-NS Nuclear Series (1961) 3041
- **Becker K, Herold-Mende C, Park JJ, Lowe G, Schirmer RH.** Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2' '-terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy. 2001. *J Med Chem.*;44(17):2784-2792.
- **Berne RM and Levy MN** Αρχές Φυσιολογίας τόμος I 3th ed. 2003. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο; 95-109
- **Beyersmann D., Hartwig A.** The genetic toxicology of cobalt. 1992. *Toxicology and Applied Pharmacology* 115; 137-145.
- **Bezprozvanny I, Mattson MP.** Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. 2008. *Trends Neurosci*. 31(9):454-63
- **Bird TD.** Genetic aspects of Alzheimer disease. 2008. *Genet Med.*;10(4):231-9
- **Bojarski L, Herms J, Kuznicki J.** Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. 2008. *Neurochem Int.*;52(4-5):621-33

- **Braun V., Hantke K., Köster W.** in Metal Ions in Biological Systems. 1998. H. Sigel, A. Sigel, , Eds. Marcel Dekker, Inc.; N. York pp. 67-145.
- **Brewer GJ, Althaus J.** How reliable and robust are current biomarkers for copper status? 2008. Br J Nutr;100(6):1341–2.
- **Bridgewater LC, Manning FCR, Woo ES, Patierno SR** DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium. **1994.** Molecular Carcinogenesis, 9:122-133,
- **Brouwers N, Slegers K, Van Broeckhoven C.** Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. 2008. Ann Med. 40(8):562-83
- **Brzyska M, Elbaum D.** Dysregulation of calcium in Alzheimer's disease. 2003. Acta Neurobiol Exp (Wars).;63(3):171-83
- **Bush A., Strozzyk D.** Serum copper, a biomarker for Alzheimer disease. Arch Neurol 2004; 61(5):631-632
- **Caban-Holt A, Mattingly M, Cooper G, Schmitt FA.** Neurodegenerative memory disorders: a potential role of environmental toxins. 2005. Neurol Clin.;23(2):485-521
- **Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Vasto S, Listi F, Chiappelli M, Licastro F, Lio D, Caruso C.** Age-related inflammatory diseases: role of genetics and gender in the pathophysiology of Alzheimer's disease. 2006. Ann N Y Acad Sci. 1089:472-86
- **Cassidy J, Misset JL.** Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. 2002. Seminars in Oncology. 29: 11–20
- **Cavaletti G, Fabbrica D, Minoia C, Frattola L, Tredici G:** Carboplatin toxic effects on the peripheral nervous system of the rat. 1998. Ann Oncol 9: 443–447.
- **Cavaletti G, Tredici G, Marmiroli P, Petruccioli MG, Barajon I, Fabbrica D.** Morphometric study of sensory neuron and peripheral nerve changes

induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. 1992. *Acta Neuropathol* 84: 364–371.

- **Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Dond`e E, Tredici P, Marmioli P, Minoia C, Ronchi A, Bayssas M, Griffon-Etienne G:** Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. 2001. *Eur J Cancer* 37: 2457–2463.
- **Chandra T. T. and Brown K. T.** Vitamin B12 and I \pm -ribonucleosides. 2008. *Tetrahedron* 64; 9–38.
- **Chang L. W.,** 1996. *Toxicology of Metals*, CRC Lewis Publishers, Boca Raton
- **Chung KY, Saltz LB.** Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future directions. 2007. *Journal of Cancer*. 13:192–197
- **Collery P., Bratter P., Negetti V.** 1998. *Metal ions in Biology and Medicine* 5; 172-178.
- **Cotton F. A., Wilkinson G., Murillo C. A.** *Advanced Inorganic Chemistry* 1999. (6th edition), New York; 237
- **Cousins R.** Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. 1985. *Physiol Rev* 65:238-44
- **Covino BG** Pharmacologicology of local anaesthetic drugs. 1986. *Br J Anaesth* 58:701-16
- **Cullota VC, Gitlin JD.** Disorders of copper transport. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The molecular and metabolic basis of inherited disease*. 2001. New York Volume 3. New York: McGraw-Hill 3105-3136
- **Cullota VC., Lin SJ, Schmidi P., Lomp LW., Casareno RL., Gitlin J.** Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans. 1999. *Adv Exp Med Biol*:448:247-54

- **D'Angelo B., Santucci S., Benedetti E., Di Loreto S., Phani R.A., Falone S., Amicarelli F., Cerù M.P. and Cimini A.** Cerium Oxide Nanoparticles Trigger Neuronal Survival in a Human Alzheimer Disease Model By Modulating BDNF Pathway. 2009. *Current Nanoscience*, 5, 167-176.
- **Dakiky, M., Khamis, M., Manassra, A., and Mereb, M.** Selective adsorption of chromium(VI) in industrial wastewater using low-cost a bundantly available adsorbents 2002.*Adv. Environ. Res.* 6, 533-540.
- **Danks DM.** Copper deficiency in humans. 1988. *Ann Rev Nutr*;8:235-57
- **De Flora S, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Corbett GE, Kerger BD** Estimates of the chromium(VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity. 1997. *Carcinogenesis*, 18:531-537
- **Dickinson L. C. and Chien J. C. W.** 1973. *J. Biol. Chem.* 248; 5005-5011.
- **Dillard J. G., Scheck C. V., Koppelman M. H.** Clays and clay minerals. 1983. 31; 69-72.
- **Disilvestro R., Cousins R.** Physiological ligands for copper and zinc. 1983. *Ann Rev Nutr* 3:261-88
- **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. 2002. *Physiol Rev*, 82:47–95.
- **Dupont S.** The anatomy of episodic memory: evolution of concepts. 2003. *Morphologie*. 87(276):5-9
- **Eggers AE.** Redrawing Papez' circuit: a theory about how acute stress becomes chronic and causes disease. 2007. *Med Hypotheses*. 69(4):852-7
- **Ehrsson H, Wallin I, Yachnin J:** Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. 2002. *Med Oncol*. 19(4):261-5.
- **Emard JF, Thouez JP, Gauvreau D.** Neurodegenerative diseases and risk factors: a literature review. 1995. *Soc Sci Med.*;40(6):847-58

- **Environmental Health Perspectives:** Focus: Reflections on Hexavalent Chromium . 2000.
- **European Association for Study of Liver.** EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. 2012. J Hepatol;56:671–85.
- **Extra J.M., Marty M., Brienza S. and Misset J.L.** Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. 1998. Semin. Oncol., **25**, 13–22.
- **Fan AM, Harding-Barlow J.** Chromium in genotoxic and carcinogenic metals. Environmental and occupational occurrence exposure. 1987. Advances in modern environmental toxicology. Vol. XI. eds. Fishbein et al., Princetown, Princetown Scientific Publishing, 87-125,
- **Fawcett E.** Spin-density-wave antiferromagnetism in chromium. 1988. Reviews of Modern Physics 60: 209
- **Feillet-Coudray C, Coudray C, Bayle D, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A.** Response of diamine oxidase and other plasma copper biomarkers to various dietary copper intakes in the rat and evaluation of copper absorption with a stable isotope. 2000. Br J Nutr;83:561–8.
- **Festa M. Anderson H, Dowdy R, Ellersieck M.** Effect of zinc intake on copper excretion and retention in men. 1985. Am J Clin Nutr 41:285-92
- **Fett J. P., LeVier K., Guerinot M. L.** in Metal Ions in Biological Systems 1998.H. Sigel, A. Sigel, Eds. Marcel Dekker, Inc.; N. York pp. 187-214.
- **Finkel T, Holbrook NJ.** Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. 2000. Nature, 408:239–247
- **Fischer E, Gerklewski F.** Influence of ascorbic acid supplementation on copper status in young adult men. 1983. Am J Clin Nutr 37:553-6
- **Food and Nutrition Board Institute of Medicine.** Dietary Reference Intakes: RDA and AI for Vitamins and Elements. 2001. National Academy Press.
- **Fosmire G.** Zinc toxicity. 1990. Am J Clin Nutr 51:225-7

- **Gerber N. C., and Sligar S. G.** Catalytic Mechanism of Cytochrome P - 450: Evidence for a Distal Charge Relay. 1992. J. Am. Chem. Soc. 114; 8742.
- **Gonzalez-Vilchez F. and Vilaplana R.** 29 Cu chemotherapeutic copper compounds. 2005. *Metallotherapeutic Drugs and Metal—Based Diagnostic Agents*, M. Gielen and E. R. T. Tiekink, Eds., John Wiley & Sons, New York, NY, USA chapter 12, pp. 219–236
- **Grolleau F, Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E.** A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. 2001. *Journal of Neurophysiology*. 85: 2293–2297.
- **Gromer S, Urig S, Becker K.** The thioredoxin system--from science to clinic. 2004. *Med Res Rev*. Jan;24(1):40-89.
- **Grothey A, Goldberg RM.** A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. 2004. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 5: 2159–2170
- **Grothey A.** Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. 2003. *Seminars in Oncology*. 30: 5–13
- **Guyton AG** Membrane Potentials and Action Potentials in : *Textbook of medical Physiology*. 1991b. 8th Edition. Saunders Co. Philadelphia 51-66
- **Guyton AG** Transport of ions and Molecules through the cell membrane in : *Textbook of Medical Physiology*. 1991. 8th Edition Saunders Co., Philadelphia 38-50
- **Hall C. A. and Cuppett S. L.** Structure-Activities of Natural Antioxidants, in *Antioxidant Methodology: In vivo and in vitro Concepts*, 1997. Edited by Aruoma O. I. and Cuppett S. L., AOCS Press, Champaign, Illinois ; pp 141-172.
- **Hamilton E. M. N. and Gopper S. A. S.** 1987. In *The Biochemistry of Human Nutrition* West Pub. Co. New York; 298-301.

- **Harrison MD, Jones CE., Dameron CT.** Copper chaperons: function, structure and copper-binding properties. 1999. *JBIC*;4:145-53
- **Harvey LJ, McArdle HJ.** 2008. Biomarkers of copper status: a brief update. *Br J Nutr*; 99(Suppl. 3):S10–3.
- **Haschke F., Zieger E., Edwards B., Fomon S.** Effect of iron fortification of infant formula on trace minerals absorption. 1986. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 5:768-73
- **He Y, Leung KW, Zhang YH, Duan S, Zhong XF, Jiang RZ, Peng Z, Tombran-Tink J, Ge J.** Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants. 2008. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 49: 1447-1458
- **Heinemann U, Schmitz D, Eder C, Gloveli T.** Properties of entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation. 2000. *Ann N Y Acad Sci*. 911:112-26.
- **Helis H. M., Meester P., Hodgson D. J. J.** Binding of penicillamine to toxic metal ions: synthesis and structure of potassium (D-penicillaminato) cobaltate (III) dehydrate $k[\text{Co}(\text{D-pen})(\text{L-pen})]\text{H}_2\text{O}$. 1976. *Am. Chem. Soc.* 99; 3309-3312.
- **Hoffman H., Phylinky R., Fleming C.** Zinc-induced copper deficiency. 1998. *Gastroenterology* 94:508-12
- **Holmes J, Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR, Wyrick SD, Chaney SG:** Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model. 1998. *Toxicol Sci* 46: 342–351.
- **Huffman DL., OHalloran TVO.** Function, structure and mechanism in intracellular copper trafficking proteins. 2001. *Annu Rev Biochem*;70:677-701
- **INCHEM,** International Programme on Chemical Safety: Environmental Health Criteria 61: CHROMIUM (Geneva 1988).

- **Jaccard, T., Ariztegui, D., Wilkinson, K.J** Incorporation of zinc into the frustule of the freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. 2008. in review a.Chem. Geol.
- **Jacob R., Skala J., Omayre S., Turnlund L.,** Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men. *J Nutr* 1987;117:2109-2115
- **Jacobsen D. and Mc Martin KE.** Methanol and ethylene glycol poisonings. Mechanism of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. 1986. *Med Toxicol. Sep-Oct;1(5):309-34*
- **Johnson P., Milne D., Lykken G.** Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life and status in humans. 1992. *Am J Clin Nutr;56:917-925*
- **Jones D. L., Darrah P. R, Kochian L. V.** Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution on the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. 1996. *Plant Soil* 180; 57-66. d) M. L. Guerinot, Y. Yi, *Plant Physiol.* 104; 815-820
- **Jones, M.M.** Design of new chelating agents for removal of intracellular toxic metals. 1994. In *Coordination Chemistry: A Century of Progress*; Kauffman, G.B., Ed.; The American Chemical Society: Washington, DC, USA,; pp. 427-438
- **Kagiava A, Tsingotjidou A, Emmanouilides C, Theophilidis G.** The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat. 2008. *Neurotoxicology.* 29: 1100-1106
- **Kaler SG.** ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. 2011. *Nat Rev Neurol;7:15–29.*

- **Karlin K. D. and Zubieta J.** Copper Coordination Chemistry, 1983. Adenine Press, New York
- **Kendig MW, Buchheit RG** Corrosion inhibition of aluminum and aluminum alloys by soluble chromates, chromate coatings, and chromate-free coatings. 2003. Corrosion, 59:379-400
- **Keunen E., Remans T., Bohler S., Vangronsveld J. and Cuypers A.** Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. 2011. Int J Mol Sci. 12, 6894-918.
- **Klerks P.L. and Weis J.S.** Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. 1987. Environ. Pollut. 45, 173-205.
- **Kouri G, Theophilidis G.** The action of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the isolated sciatic nerve of the frog (*Rana ridibunda*). 2002. Neurotoxicity Research. 4: 25-32
- **Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kieman MC.** Oxaliplatin and axonal Na⁺ channel function *in vivo*. 2006. Clinical Cancer Research. 12: 4481-4484
- **Lee J, Prohaska J., Thiele D.** Essential role for mammalian Copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. 2001. Proc Natl Acad Sci USA 98:6842-6847
- **Lin W. S., Huang Y. W., Zhou X. D., Ma Y. F.,** Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. Int. J. Toxicol. 2006, 25 (6), 451-457.
- **Linder M., Hazegh-Azam M.** Copper biochemistry and molecular biology. 1996. Am J Clin Nutr;797S-811S

- **Lopez E., Arce C. and Oset-Gasque M.J.** Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. 2006. *Free radic. Biol. Med.* 40, 940-951.
- **Lott IT, Head E.** Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. 2005. *Neurobiol Aging.* 26(3):383-9
- **Matsuda H.** The role of neuroimaging in mild cognitive impairment. 2007. *Neuropathology.* 27(6):570-7
- **Milne DB.** Copper intake and assessment of copper status. 1998. *Am J Clin Nutr;*67:1041S–5S.
- **Milosavljevic N, Duranton C, Djerbi N, Puech PH, Gounon P, Lagadic-Gossmann D et al.** 2010. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res.* 70 (19): 7514–22.
- **Molyneux MJ, Davies MJ** Direct evidence for hydroxyl radical-induced damage to nucleic acids by chromium (VI)-derived species: implications for chromium carcinogenesis. **1995.** *Carcinogenesis,* 16:875-882
- **Mori S.** in *Metal Ions in Biological Systems* 1998. H. Sigel, A. Sigel, Eds. Marcel Dekker, Inc.; N. York pp. 215-238
- **Moschou M, Kosmidis EK, Kaloyianni M, Geronikaki A, Dabarakis N, Theophilidis G.** In vitro assessment of the neurotoxic and neuroprotective effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on the rat sciatic nerve fibers. 2008 α . *Toxicology in vitro.* 22: 267-274
- **Moschou M, Papaefthimiou C, Kagiava A, Antonopoulou E, Theophilidis G.** In vitro assessment of the effects of cadmium and zinc on mammalian nerve fibres. 2008 β . *Chemosphere.* 71: 1996–2002
- **Nday CM, Drever BD, Salifoglou T, Platt B.** Aluminum does not enhance beta-amyloid toxicity in rat hippocampal cultures. 2010. *Brain Res.* Sep 17;1352:265-76.

- **Nday CM, Malollari G, Petanidis S, Salifoglou A.** In vitro neurotoxic Fe(III) and Fe(III)-chelator activities in rat hippocampal cultures. From neurotoxicity to neuroprotection prospects. 2012. *J Inorg Biochem.* Dec;117:342-50.
- **Nunomura A, Moreira PI, Takeda A, Smith MA, Perry G.** Oxidative RNA damage and neurodegeneration. 2007. *Curr Med Chem.* 14(28):2968-75.
- **Olivares M, Mendez MA, Astudillo PA, Pizarro F.** Present situation of biomarkers for copper status. 2008. *Am J Clin Nutr*;88:859S–62S.
- **O'Neill C, Cowburn RF, Bonkale WL, Ohm TG, Fastbom J, Carmody M, Kelliher M.** Dysfunctional intracellular calcium homoeostasis: a central cause of neurodegeneration in Alzheimer's disease. 2001. *Biochem Soc Symp.*;(67):177-94
- **Pacyna J. M., Pacyna E. G., Wenche A.** Changes of emissions and atmospheric deposition of mercury, lead, and cadmium. 2009. *Atmosph. Env.* 43 117–127.
- **Paesano R., Pietropaoli M., Gessani S., Valenti P.** The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. 2008. *Biochimie*; 1-8.
- **Papaefthimiou C, Antonopoulou E, Theophilidis G.** Inhibitory vs. protective effects of N-acetyl-l-cysteine (NAC) on the electromechanical properties of the spontaneously beating atria of the frog (*Rana ridibunda*): an *ex vivo* study. 2009. *Toxicology In Vitro.* 23: 272-280
- **Papaefthimiou C, Cabral MDG, Mixailidou C, Viegas CA, Sá-Correia I, Theophilidis G.** Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity. 2004. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 23: 1211-1218

- **Papas A. M.** Determinants of Status in Humans, in Antioxidant Status, diet, nutrition, and Health. 1999. Edited by Papas A. M., CRC Press LLC, N.Y. pp 21-36
- **Park E. J., Choi J., Park Y. K., Park K.,** Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 2008, 245 (1-2), 90–100.
- **Park SB, Goldstein D, Lin CS-Y, Krishnan AV, Friedlander ML, Kiernan MC.** Acute Abnormalities of Sensory Nerve Function Associated With Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity. 2009. *Journal of Clinical Oncology*. 27: 1243-1249
- **Park SB, Lin CSY, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC.** Dose effects of oxaliplatin on persistent and transient Na⁺ conductances and the development of neurotoxicity. 2011. *Plos One*. 6: e18469-18475
- **Peyrone M.** 1845. *Annals Chem Pharmacol* 51: 129,
- **Platt B.** Experimental approaches to assess metallotoxicity and ageing in models of Alzheimer's disease. 2006. *J Alzheimers Dis* 10(2-3):203-13
- **Pourreza N., Ghanemi K.** Determination of mercury in water and fish samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on agar modified with 2-mercaptobenzimidazole. 2009. *Haz Mater. J.* 161; 982–987
- **Qi W, Reiter RJ, Tan D-X, Garcia JJ, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR** Chromium(III)-induced 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. 2000. *Environ Health Perspect*, 108:399-412
- **Quasthoff S, Hartung HP.** Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. 2002 *J Neurol* 249: 9–17
- **Rabik CA, Dolan ME.** Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents . 2007. *Cancer Treat Rev.* 33(1):9-23

- **Ranganathan PN, Lu Y, Jiang L, Kim C, Collins JF.** Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. 2011. *Blood*;118:3146–53.
- **Ravin HA.** An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. 1961. *J Lab Clin Med*;58:161–8.
- **Raymond E., Faivre S., Woynarowski J.M., Chaney S.G.** Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. 1998. *Semin. Oncol.*;25:4–12.
- **Reedijk J.** Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? 1999. *Chemical Reviews*, Vol. 99, pp. 2499-2510
- **Rosenzweig AC.** Copper delivery by metallochaperone proteins. 2001. *Ass Chem Res*;34:119-281
- **Sandstead H.** Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. 1995. *Am J Clin Nutr*;61(suppl):621S-24S
- **Santander P. J., Kajiwarra Y., Williams H. J., Scott A. I.** Structural characterization of novel cobalt corrinoids synthesized by enzymes of the vitamin B₁₂ anaerobic pathway. 2006. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14; 724-731.
- **Sayre LM, Perry G, Smith MA.** Oxidative stress and neurotoxicity. 2008. *Chem Res Toxicol.* 21(1):172-88
- **Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF.** Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. 1974. *Clin Chem*;20:1556–63.
- **Shi X, Mao Y, Knapton AD, Ding M, Rojanasakul Y, Gannett PM, Dalal N, Liu K** Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction. 1994. *Carcinogenesis*, 15:2475-2478
- **Singel H. and Singel A.** 1995. *Metal ions in Biological Systems: Concepts on Metal Ion Toxicity*, Marcel Dekker. Inc, New York; 37.

- **Snedeker S, Smith S, Greger J.** Effect of dietary calcium and phosphorus levels on the utilization of iron, copper and zinc by adult males. 1982. *J Nutr* 1;112:136-43
- **Soudani N., Troudi A., Bouaziz H., Amara I.B., Boudawara T., Zeghal N.** Cardioprotective effects of selenium on chromium (VI)-induced toxicity in female rats. 2011. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 513–520
- **Springer, B. A., Sligar, S. G., Phillips, G. N., and Olson, J. S.** 1994. Mechanisms of Molecular Recognition in Myoglobin. *Chem. Rev.* 94, 699 - 714
- **Squitti R, Pasqualetti P, Dal Forno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, et al.** Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer’s disease. 2005. *Neurology*;64(6): 1040–6.
- **Squitti R, Polimanti R.** Copper hypothesis in the missing heritability of sporadic Alzheimer’s disease: ATP7B gene as potential harbor of rare variants. 2012. *J Alzheimer’s Dis*;29:493–501.
- **Stojiljkovic I., and Hantke K.** Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. 1992. *EMBO J.* 11; 4359-4367.
- **Strichard GR and Berde CB** Local Anesthetics in: *Anesthesia* 1994. Vol 1. Miller RD Churchill Livingstone New York 490-521
- **Strichard GR** Neural Physiology and local Anesthetic Action in *Neural Blockade*. 1988. 2d edition. Lippincott Co. Philadelphia, 25-45
- **Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X.** Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. 2008. *Curr Alzheimer Res.* 5(6):525-32
- **Sun Y., Zhou Q., Wang L., Liu W.** Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. 2009. *J. Haz.* 161; 808–814

- **Surai OF.** Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. 2002. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 233–304
- **Ternay A. L. and Sorokin V.** Redox, Radicals, and Antioxidants in Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. 1999. Edited by Baskin S. I. and Salem H, Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 1-21
- **Theophilidis G, Benaki M, Papadopoulou-Mourkidou E.** Neurotoxic action of six pyrethroid insecticides on the isolated sciatic nerve of a frog (*Rana ridibunda*). 1997. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 118: 97-103
- **Thill A., Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Auffan M., Flank A. M.,** Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40 (19), 6151–6
- **Tisato F., Marzano C., Porchia M., Pellei M., and Santini C.,** Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies, 2010. *Medicinal Research Reviews*, 30 (4): 708–749
- **Tredici G, Tredici S, Fabbrica D, Minoia C, Cavaletti G:** Experimental cisplatin neuropathy and the effect of retinoic acid administration. 1998. *J Neuro-Oncol* 36: 31–40.
- **Tsou TC, Chen CL, Liu TY, Yang JL** Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium(III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers 1996. *Carcinogenesis*, 17:103-108
- **Turnlund J, Keyes W, Peiffer G, Scott K.** Copper absorption excretion and retention by young men consuming low dietary copper determined using stable isotope ⁶⁵Cu. 1998. *Am J Clin Nutr*;67:1219-1225
- **Turnlund J. Human** Whole-body copper metabolism. 1998. *Am J Clin Nutr* 67(suppl):960S-4S

- **Urakami K, Wakutani Y, Wada-Isoe K, Yamagata.** Causative genes in Alzheimer's disease. 2001. Nippon Ronen Igakkai Zasshi. 38(2):117-20
- **Vidal-Alaball E. , J., Federici L., Loukili N. H., Zimmer J., Kaltenbach G.** Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatment with special focus on oral cobalamin therapy. 2007. Eur. J. Inter. Med. 18; 456–462.
- **Voitkun V, Zhitkovich A, Costa M** Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. 1998. Nucleic Acids Research, 26:2024-2030
- **Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH** Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. 2006. Toxicology, 228:16-23
- **Wetterhahn KE. and Hamilton JW.** Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: effect on gene expression. 1989. Sci Total Environ 86:113-129
- **Wildsmith J** Peripheral nerve and local anesthetic drugs. 1986. Br J Anaest 58:629-700
- **Wiley RG.** Targeting toxins to neural antigens and receptors. 2001. Methods Mol Biol.;166:267-76
- **Wilson R.H., Lehky T., Thomas R.R., Quinn M.G., Floeter M.K., Grem J.L.** Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. 2002. J. Clin. Oncol.;20:1767–1774.
- **Xia L, Akiyama E, Frankel G, McCreerya R** Storage and release of soluble hexavalent chromium from chromate conversion coatings - Equilibrium aspects of Cr-VI concentration. 2000. Journal of the Electrochemical Society, 147:2556-2562
- **Xia L, McCreerya R** Chemistry of a chromate conversion coating on aluminum alloy AA2024-T3 probed by vibrational spectroscopy. 1998. Journal of the Electrochemical Society, 145:3083-3089

- **Xia W., Zhang J., Perez R., Koo E. H., and Selkoe D. J.** Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: Implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. 1997. PNAS 94.:8208-8213
- **Xu J, Bublely GJ, Detrick B, Blankenship LJ, Patierno SR** Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. 1996. Carcinogenesis, 17:1511-1517,
- **Xue H. B., Stumm V., Sing L** The binding of heavy metal to algal surface.1988.Water Res. 22 917–922.
- **Yonetani T. and Laberge M.** Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. 2008. Biochimica et Biophysica Acta 1784; 1146–1158.
- **Yu S, West C, Beymen A.** Increasing intakes of iron reduce status, absorption and biliary excretion of copper in rats. 1994. Brit J Nutr 71:887-895
- **Zheng J, Lou JR, Zhang XX, Benbrook DM, Hanigan MH, Lind SE, Ding WQ.** N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. 2010. Cancer Lett. Dec 8;298(2):186-94
- **Θωμαΐδης Ν., Βαλαβανίδης Θ., Ευσταθίου Κ.** 2007. Η χημική ένωση του μίγνα. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- **Καράταγλης Σ. Σ.** Φυσιολογία Φυτών. 1999.Εκδ. Art of text, Θεσσαλονίκη; 149