

Οξειδωτική ένταση και οξειδωτική βλάβη του DNA στη νόσο του Αλζχάιμερ.

Γ. ΝΤΙΚΜΠΑΣΑΝΗ*, ΧΡ. ΚΟΡΟΣ**, Ε. ΜΠΟΒΙΑΤΣΗΣ***, Κ. ΚΟΝΤΖΟΓΛΟΥ****, Ι. ΔΟΝΤΑ*****, Δ. ΠΕΡΡΕΑ*****

Περίληψη

Σύμφωνα με τα νεώτερα στατιστικά δεδομένα από τα <<Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη της Νόσου>> (ΗΠΑ), για το χρονικό διάστημα 2000- 2004, ενώ τα ποσοστά των θανάτων από τις κυριότερες παθήσεις έχουν ελαττωθεί (π.χ. οι θάνατοι από καρδιολογικές νόσους έχουν ελαττωθεί κατά 8%, από καρκίνο του μαστού κατά 2,6%, από καρκίνο του προστάτη κατά 6,3%, από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο κατά 10,4%), οι θάνατοι που οφείλονται στη νόσο του Αλζχάιμερ, συνεχίζουν να εμφανίζουν ανοδική τάση, έχοντας φθάσει το ποσοστό 33% κατά τη διάρκεια της προαναφερθείσας χρονικής περιόδου¹. Ολοένα και αυξανόμενες, σημαντικές μαρτυρίες, εμπλέκουν την οξειδωτική ένταση, ως μηχανισμό, με τη νόσο του Αλζχάιμερ, υποδεικνύοντας ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου^{2,3}, καθώς επίσης και ότι πρόκειται για ένα καθοριστικό συμβάν, το οποίο λαμβάνει χώρα νωρίς κατά την πορεία της νόσου⁴. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που ανασκοπήθηκε⁹⁻¹⁸, υπάρχουν πολλές

αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Αβ και των μορίων του οξειδωτικού καταρράκτη. Σε αυτό το άρθρο, έχουμε ανασκοπήσει τους πιθανούς μηχανισμούς, που συσχετίζουν την υπόθεση της οξειδωτικής έντασης με την υπόθεση του καταρράκτη του β- αμυλοειδούς. Αυξανόμενες μαρτυρίες εμπλέκουν την οξειδωτική βλάβη ως ένα μηχανισμό, ο οποίος μεσολαβεί, προκειμένου να συμβούν τοξικά φαινόμενα στη νόσο του Αλζχάιμερ⁵. Υπάρχουν κάποιες μαρτυρίες αυξημένης οξειδωσης μορίων, όπως του DNA (δεσοξυριβο-νουκλεϊνικό οξύ), του RNA (ριβο-νουκλεϊνικό οξύ), των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδρογονανθράκων στον πάσχοντα από Αλζχάιμερ εγκέφαλο και επιπλέον ορισμένοι δείκτες της οξειδωτικής έντασης ανευρίσκονται αυξημένοι στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο αίμα και στα ούρα των ασθενών από νόσο του Αλζχάιμερ, αν και μερικά αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά⁶. Καθώς η νόσος του Αλζχάιμερ προς το παρόν διαγιγνώσκεται μόνο μέσω κλινικών εκτιμήσεων και επιβεβαιώνεται από τη μεταθανάτια παθολογοανατομία του εγκεφάλου, η ανάπτυξη και η χρήση βιοχημικών δεικτών, που θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη διάγνωση και να χρησιμοποιηθούν για να καταγραφεί η αποτελεσματικότητα των θεραπειών, οι οποίες τροποποιούν τη νόσο, συνιστά μια αναδυόμενη ανάγκη⁷. Αυτό το άρθρο συζητά την οξειδωτική βλάβη του DNA σε πάσχοντες από Αλζχάιμερ εγκεφάλους, καθώς και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της οξειδωτικής βλάβης του DNA και της εκσεσημασμένης παραγωγής ελευθέρων ριζών, στη νόσο του Αλζχάιμερ.

Λέξεις κλειδιά: οξειδωτικό, δείκτες, 8-υδροξυ-2-δεσοξυγουανωσίνη, αέριος χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας, ανοσοφθορισμός

Ορισμός της οξειδωτικής εντάσεως

Ο όρος οξειδωτική ένταση αναφέρεται σε εκείνη την κατάσταση κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες υπερέχουν συγκριτικά με τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς^[8].

* Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Νευροχειρουργικής, ΝΙΜΙΤΣ, Αθήνα, Ελλάδα, georgia-irene@ath.forthnet.gr

** M.D., Phd, Τμήμα Νευρολογίας, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αθήνα, Ελλάδα.

*** M.D., Phd, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Νευροχειρουργικής, Γενικό Νοσοκομείο «Ευαγγελισμός», Αθήνα, Ελλάδα.

**** M.D., Phd, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, «Λαϊκό» Νοσοκομείο, Αθήνα, Ελλάδα.

***** Phd, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας», Αθήνα, Ελλάδα.

***** Phd, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας», Αθήνα, Ελλάδα.

Συσχετίσεις μεταξύ της υπόθεσης της οξειδωτικής εντάσεως και εκείνης του καταρράκτη του β-αμυλοειδούς

Η νόσος του Αλτσχάιμερ (AD= Alzheimer's Disease) αποτελεί την πιο συχνή μορφή άνοιας και ο επιπολασμός της αναμένεται ότι θα αυξηθεί [9]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, που ανασκοπήθηκε στην παρούσα μελέτη, ανευρίσκονται πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Αβ και των μορίων του οξειδωτικού καταρράκτη.

Η οξειδωτική ένταση επιταχύνει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών του αμυλοειδούς στη νόσο του Αλτσχάιμερ [10]. Υπάρχει αυξανόμενος αριθμός μαρτυριών ότι η οξειδωτική ένταση, η οποία προκαλείται από το Αβ, πιθανότατα παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στον ολιγομερισμό του [11]. Πολλές ερευνητικές ομάδες βρήκαν, ότι το Αβ έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη προκαλώντας δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS= reactive oxygen species) [12]. Όπως έχουν δείξει μελέτες σε in-vitro μοντέλλα καλλιιεργειών κυττάρων νευρικού ιστού, το Αβ μπορεί και δεσμεύεται στην αλκοολική δεϋδρογενάση που συνδέει το πεπτιδίο του β-αμυλοειδούς (ABAD= Αβ peptide-binding alcohol dehydrogenase) και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, προκαλώντας έτσι εκφύλιση του ABAD, κάτι που καταλήγει στην αύξηση της παραγωγής προϊόντων, που δημιουργούνται κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων [13].

Η αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων (lipid peroxidation) με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της παραγωγής των ειδών του Αβ(1-42), τα οποία προκαλούν, όπως και τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης απόπτωση των νευρώνων [14]. Πολυάριθμες μελέτες σε in vitro καλλιέργεια κυττάρων νευρικού ιστού έχουν δείξει ότι το ίδιο το Αβ συμμετέχει στην οξείδωση πρωτεϊνών, μια βιοχημική διαδικασία την οποία μπορούν να παρεμποδίσουν συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά, όταν χορηγηθούν [15]. Το Αβ έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products), γεγονός που συνεπάγεται την ανάπτυξη προ-οξειδωτικών αντιδράσεων στους νευρώνες, στη μικρογλοία και στα κύτταρα των αγγείων των ημισφαιρίων του εγκεφάλου [10].

Με βάση τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, έχει προταθεί πως η συσσώρευση του Αβ στους νευρώνες παίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της διακοπής της ομοιόστασης του σιδήρου στα κύτταρα αυτά

και συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι της οξειδωτικής εντάσεως της νόσου του Αλτσχάιμερ [16]. Ο σίδηρος μπορεί να προάγει τη θραύση (cleavage), αλλά και τη σύνθεση της πρόδρομης πρωτεΐνης του Αβ, ακολουθώντας ένα βιοχημικό μονοπάτι, το οποίο προκαλείται από την οξειδωτική ένταση και επιπλέον το Αβ (που προκύπτει) μπορεί να τροποποιηθεί οξειδωτικώς από τις «καταλυόμενες» από μέταλλα υδροξυλικές ρίζες (hydroxyl radicals) και να γίνει λιγότερο υδατοδιαλυτό και να είναι ανθεκτικό στην πρωτεάση [17].

Κλείνοντας την παράγραφο θα θέλαμε να αναφέρουμε μια ενδιαφέρουσα θεωρία του Zhu και των συνεργατών του, οι οποίοι διατύπωσαν την υπόθεση του «διπλού χτυπήματος», σύμφωνα με την οποία η πρώιμη και προοδευτική οξειδωτική βλάβη των νευρώνων δημιουργεί μια «σταθερή οξειδωτική κατάσταση» με σκοπό να προστατευθεί το κύτταρο, αλλά τελικώς το κύτταρο γίνεται ευάλωτο σε επιπρόσθετες προσβολές, όπως είναι η εναπόθεση του Αβ [18].

Βιολογικοί δείκτες οξειδωτικής εντάσεως σε εγκεφάλους πασχόντων από νόσο του Αλτσχάιμερ.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς σε υψηλό βαθμό και ικανές να αντιδρούν με άλλα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπαρά οξέα [8]. Όπως προτείνεται σ' όλη τη βιβλιογραφία που εδώ ανασκοπείται, η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με τα βιομόρια καταλήγει στο σχηματισμό μορίων, τα οποία συνιστούν δείκτες της οξειδωτικής εντάσεως. Οι βιολογικοί δείκτες της οξειδωτικής εντάσεως στους εγκεφάλους των πασχόντων από Αλτσχάιμερ διακρίνονται ως ακολούθως (σύμφωνα με την τάξη των βιολογικών μορίων που διαταράσσονται) : δείκτες υπεροξειδωσης λιπιδίων (lipid peroxidation) (αντιδρώσες ουσίες με θειοβαρβιτουρικό οξύ, μαλονδιαλδεΐδη, 4-υδροξυ-2-νονενάλη, ακρολείνη, ισοπροστάνες, νευροπροστάνες), δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών (πρωτεϊνικά καρβονύλια, νιτροτυροσίνη), δείκτες οξείδωσης του DNA (8-υδροξυ-2-δεσοξυγουανωσίνη, 8-υδροξυγουανωσίνη), δείκτες οξείδωσης του RNA (8-υδροξυ-γουανίνη) [19].

Οξειδωτική βλάβη του DNA

α) Κύτταρα του ΚΝΣ, τα οποία επηρεάζονται από την οξειδωτική ένταση:

Οι νευρώνες είναι επιρρεπείς στην οξειδωτική

βλάβη του DNA, καθώς οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί τους είναι λιγότερο αποτελεσματικοί και λειτουργούν μόνο στο ικανό για μεταγραφή γονιδίωμα [20]. Η οξειδωτική ένταση προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα της γλοίας, στα ολιγοδενδροκύτταρα, στη μικρογλοία και στα αστροκύτταρα, όπως φάνηκε με την τεχνική της τελικής σήμανσης του DNA (DNA end-labeling technique)[21].

β) Σε τι συνίσταται η οξειδωτική βλάβη του DNA:

Παρατηρείται αύξηση της 8-OHdG (8-υδροξυ-2-δεσοξυγουανοσίνη) (δείκτης οξειδωσης του DNA) και ελάττωση της επιδιορθωσης του DNA, που εντοπίζεται στο ENY (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) [22]. Στη νόσο του Αλτσχάιμερ παρατηρείται επίσης αυξημένος τεμαχισμός (σπάσιμο του DNA) (fragmentation), ο οποίος οφείλεται στο μηχανισμό της οξειδωτικής θραύσεως (ρήγματος) (cleavage) των ελίκων (strand) του DNA και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιορθωσης των οξειδωτικώς τροποποιημένων βάσεων, γεγονότα που λαθραία αποδόθηκαν σε απόπτωση [23]. Η οξειδωση του DNA μπορεί να προκαλέσει ρήγματα των ελίκων (strand breaks), ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, χιαστή σύνδεση DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις βάσεων [8].

γ) Αντιστοίχιση του είδους της βλάβης, που υφίσταται βλάβη με την πηγή (προέλευσης) του DNA:

Η αύξηση της 8-OHdG παρατηρείται τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA του εγκεφάλου των πασχόντων από νόσο του Αλτσχάιμερ, ενώ κάποια αύξηση της 5-υδροξυουρακίλης από την 5-υδροξουριδίνη, της 8-υδροξυαδενίνης από την 8-υδροξυδεσοξυαδενοσίνη και της 5-υδροξυ-κυτοσίνης από την 5-υδροξυδεσοξυκυτιδίνη, έχει αναγνωρισθεί σε τεμάχια πυρήνων από εγκέφαλο πασχόντων από νόσο του Αλτσχάιμερ [8].

δ) Το είδος της οξειδωτικής βλάβης του DNA εξαρτάται από το είδος της ελεύθερης ρίζας που επιδρά επάνω του:

Οι υδροξυλικές (hydroxyl) ρίζες επηρεάζουν πολλές βάσεις ταυτόχρονα [8]. Η υδρο-ξυλική ρίζα είναι εκείνη, που αντιδρά πιο ισχυρά απ'όλες τις ελεύθερες ρίζες, με τον C-8 της γουανίνης (8-οξο-γουανίνη), η

οποία είναι μια από τις βάσεις του DNA, που ανευρίσκονται συχνότερα οξειδωμένες [24]. Τα ενεργά είδη οξυγόνου (ROS), ο υπεροξυνιτρίτης (peroxynitrite) και το νιτρικό οξείδιο (nitric oxide) μπορούν να οδηγήσουν σε ρήγμα (cleavage) του DNA και πιο συγκεκριμένα προκαλούν ρήγμα του DNA κατά τη διάρκεια της υδροξυλίωσης της γουανίνης και της μεθυλίωσης της κυτοσίνης [25]. Ο υπεροξυνιτρίτης (peroxynitrite) σχηματίζει την 8-νιτρογουανίνη, την 8-οξογουανίνη και ρήγμα μονής έλικας του DNA (single strand break) [26].

ε) Πού αναζητούμε την αύξηση της 8-OHdG :

Στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος πασχόντων από Αλτσχάιμερ με HPLC [υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (ή απόδοσης) = high performance liquid chromatography] + ηλεκτροχημική ανίχνευση, σε εγκεφαλικό ιστό πασχόντων από Αλτσχάιμερ [το μιτοχονδριακό (mtDNA) και το πυρηνικό (nDNA) DNA προσβάλλονται] και σε DNA από το ENY (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) των κοιλιών του εγκεφάλου [27].

στ) Μέθοδοι μέτρησης της οξειδωσης του DNA

Η HPLC αναγνωρίζει την αύξηση της 8-OHdG, σε mtDNA και nDNA από θραύσματα (fractions) εγκεφάλου στην προχωρημένη ηλικία (που δε συνοδεύεται από παρουσία άνοιας) υπάρχει μια αύξηση της 8-OHdG, στο μιτοχονδριακό και στο πυρηνικό DNA [28]. Η έλλειψη ιστονών στο μιτοχονδριακό DNA και η ελαττωμένη ικανότητα επιδιορθωσης των βλαβών, καθιστά το μιτοχονδριακό DNA έναν εύκολο στόχο για την οξειδωτική ένταση [3]. HPLC + ECD (ηλεκτροχημική ανίχνευση) χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της 8-oxo-dG (8-οξο-δεσοξυγουανοσίνη) [29]. Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ποσοτική μέθοδος και αποκλειστικά για την ανίχνευση του οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA [30]. Η μέτρηση της 8-oxo-dG (8-οξο-δεσοξυγουανοσίνης) εκτελείται σε υδρολυμένο DNA με τη χρήση HPLC σε συνδυασμό με ηλεκτροχημική ανίχνευση ή προκειμένου για την ανάλυση της 8-οξο-γουανίνης με GC-MS (αέριο χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας) [31]. Ο Aruoma και οι συνεργάτες του (1997) [32] ανέφεραν ότι: η οξειδωση του DNA μπορεί να μετρηθεί στα ούρα με HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση, όπου ανευρίσκονται υψηλές συγκεντρώσεις

της 8-OHdG, της 8- OHdA και της 7- μεθυλ-8-υδροξυγουανίνης. Γενικά, στην εκτίμηση της οξειδωσης του DNA, ο δείκτης που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η 8-OHdG και η HPLC + ECD, ενώ είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική, έχει το μειονέκτημα ότι θα μπορούσε να υποτιμήσει το ενεργό ποσό της 8-OHdG του DNA για τεχνικούς λόγους, που αφορούν τη μέθοδο επεξεργασίας του δείγματος [32]. Επίσης αναφέρουν ότι η HPLC έχει το μειονέκτημα να είναι πολύ ειδική για μια μόνο βλάβη του DNA [33]. Η αέριος χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας είναι μια ευαίσθητη μέθοδος, που ανιχνεύει οξειδωμένα δομικά τμήματα (adducts) και για τις τέσσερις βάσεις του DNA ταυτοχρόνως [28]. Σε μείγμα μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA από δείγματα βρεγματικών λοβών πασχόντων από Αλζχάιμερ, που εξετάστηκαν με την προαναφερθείσα μέθοδο, η 8-υδροξυαδενίνη, η 8- υδροξυγουανίνη και η 5-υδροξυκυτοσίνη ανευρέθησαν αυξημένες, ενώ σε δείγματα από μετωπιαίους λοβούς, βρεγματικούς λοβούς και από παρεγκεφαλίδες πασχόντων από Αλζχάιμερ, που αναλύθηκαν για πυρηνικό DNA και επίσης εξετάστηκαν με GC-MS, διαπιστώθηκε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση της 5-υδροξουρακίλης, της 8-υδροξυαδενίνης, της 8- υδροξυγουανίνης (η αύξηση της 8-υδροξυγουανίνης, που σημειώθηκε, ήταν η πλέον έκδηλη), στο μετωπιαίο, βρεγματικό και κροταφικό λοβό συγκριτικά με τις τιμές που ανευρέθησαν στα δείγματα των μη-πασχόντων, που συνιστούσαν την ομάδα ελέγχου· παρομοίως στην παρεγκεφαλίδα υπήρξε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση της 5-υδροξουρακίλης [28]. Η αέριος χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας με εκλεκτική καταγραφή ιόντος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ελεύθερης 8-υδροξυδεσοξυγουανίνης (η οποία είναι προϊόν υδρόλυσης του DNA) καθώς και της συνδεδεμένης μορφής της (στο άθικτο DNA), σε ENY από κοιλίες πασχόντων από νόσο του Αλζχάιμερ και σύμφωνα με μια μελέτη, το συνδεδεμένο μόριο σημειώνει μια στατιστικώς σημαντική αύξηση, ενώ το ελεύθερο ανευρίσκεται ελαττωμένο στους πάσχοντες από νόσο του Αλζχάιμερ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου· παράλληλα έχει προταθεί η χρήση της αναλογίας του συνδεδεμένου μορίου προς το ελεύθερο «στοιχείο» (ανπιρροσωπεί το προϊόν επιδιόρθωσης) ως ένας δείκτης της προόδου της νόσου και της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών παρεμβάσεων [34]. Η αέριος χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας με εκλεκτική καταγραφή ιόντος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη

μέτρηση της 8OHdG στα ούρα με όριο ανίχνευσης τα 1.8 pmol [32]. Η 8-υδροξυ-δεσοξυγουανοσίνη των ούρων φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη διαίτα, αλλά είναι άγνωστο εάν κάποια ποσότητα της 8-υδροξυ-δεσοξυγουανοσίνης μεταβολίζεται προς άλλα προϊόντα στους ανθρώπους [32]. Η αέριος χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιεί ως εσωτερικές σταθερές (standards) χημικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν ανάλογα των τροποποιημένων βάσεων και είναι χημικώς σταθερές και σεσημασμένες με ισότοπα και ενώ ως μέθοδος πλεονεκτεί έναντι άλλων, ως προς την ακρίβεια με την οποία επιτυγχάνει ποσοτική μέτρηση της βλάβης του DNA και ως προς το ό,τι αναγνωρίζει τον τύπο της υπεύθυνης για τη βλάβη ρίζας (π.χ. οι ρίζες του οξυγόνου οξειδώνουν τη γουανίνη, ο υπεροξυ-νιτρίτης σχηματίζει 8-νιτρογουανίνη, η ρίζα υδροξυλίου οξειδώνει τις τέσσερις βάσεις), έχει το μειονέκτημα ότι για τεχνικούς λόγους πιθανώς υπερεκτιμάει τα επίπεδα της 8-υδροξυγουανίνης (κατά τη φάση θέρμανσης του DNA, θα έπρεπε να μην υπάρχει κατά το στάδιο της προετοιμασίας οξυγόνου) [32]. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay = ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέτρηση): μπορεί να προσδιορίσει την αλλαγή στο επίπεδο της 8-οξο-δεσοξυγουανίνης, όταν αυτό διπλασιασθεί, αλλά απαιτεί μια σχετικά πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος, δύναται παρόλα αυτά να μετρήσει την 8-οξο-δεσοξυγουανίνη στα ούρα, αν και αυτός ο προσδιορισμός μειονεκτεί ως προς την ακρίβειά του, γιατί οι τιμές της 8-οξο-δεσοξυγουανίνης στα ούρα μπορούν να επηρεασθούν από το γενικό μεταβολικό ρυθμό [29]. Σε κάποιες περιπτώσεις η 8-υδροξυ-δεσοξυγουανοσίνη ανευρίσκεται αρκετά αυξημένη στο γήρας, καθώς αποτελεί ένα δείκτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA [35]. Ανοσοφθορισμός (immunofluorescence) μπορεί να εφαρμοσθεί για την εκτίμηση του οξειδωτικού δείκτη 8-OHdG, σε μιτοχονδριακό DNA30. In situ υβριδισμός σε μιτοχονδριακό DNA και ανοσοκυτταροχημεία για την ανίχνευση της 8-υδροξυ-2-γουανοσίνης, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της οξειδωτικής βλάβης του μιτοχονδριακού DNA σε ποικίλα κύτταρα π.χ. στα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων [36]. Υπάρχει στη βιβλιογραφία μια αναφορά σχετική με την προσπάθεια απαρίθμησης των κυττάρων που ήταν θετικά για την 8-υδροξυ-δεσοξυγουανοσίνη, με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας [37].

Συμπεράσματα

Η οξειδωτική ένταση λαμβάνει χώρα κάθε φορά που οι ελεύθερες ρίζες υπερέχουν συγκριτικά με τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς και θεωρείται ότι είναι ένα ενδιαφέρον βήμα της παθοφυσιολογίας της νόσου του Αλζχάιμερ, επειδή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, που εδώ ανασκοπήθηκε: i) υπάρχουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Αβ και των μορίων του οξειδωτικού καταρράκτη, οι οποίες αφορούν την παραγωγή του Αβ(1-42), τη συσσώρευση του Αβ, τον ολιγομερισμό του Αβ, την παραγωγή των ενεργών ριζών του οξυγόνου (ROS), τη δημιουργία προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, τη σύνθεση και τη θραύση (τεμαχισμό) της APP, την ικανότητα του Αβ να διαλύεται στο νερό, την αντίσταση του Αβ στην πρωτεάση. ii) Η οξειδωτική

ένταση καταλήγει στην παραγωγή μορίων, τα οποία συνιστούν δείκτες της οξειδωτικής έντασης. Η τροποποίηση του DNA από την οξειδωτική ένταση καταλήγει σε: ρήγμα κλώνων, ανταλλαγή μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, χιαστή σύνδεση μεταξύ DNA και πρωτεΐνης και τροποποιήσεις βάσεων, τέτοιων που να προκαλούν για παράδειγμα αύξηση της 8-OHdG ` αλλαγές που είναι παρούσες σε πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA από εγκεφαλικούς ιστούς και σε ENY από τις κοιλίες πασχόντων από Αλζχάιμερ, καθώς και σε DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος πασχόντων από νόσο του Αλζχάιμερ. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, που ανασκοπήσαμε, δύο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη μέτρηση της 8oxodG είναι η HPLC+ECD και η GC-MS.

Summary

Oxidative stress and DNA oxidative damage in Alzheimer's disease.

G. NTIKBASANI, CH. KOROS , E. BOVIATSI, C. KONTZOGLOU, I. DONTAS, D. PERREA:

According to the latest statistics from the Centers for Disease Control and Prevention (USA), from 2000-2004 death rates have declined for most major diseases –heart disease (-8 percent) , breast cancer (-2.6 percent), prostate cancer (-6.3 percent) and stroke (-10.4 percent), while Alzheimer's disease deaths continue to trend upward, increasing 33 percent during that period [1]. There is accumulating and substantial evidence, that oxidative stress involves in AD and plays an important role in the disease pathophysiology [2,3] and that it is an early determinative event of AD [4]. According to the reviewed literature [9-18], there are a lot of interactions between Aβ and the molecules of oxidative cascade. In this article, we have reviewed the possible mechanisms, that link together oxidative stress hypothesis and abeta amyloid cascade hypothesis. Increasing evidence implicates oxidative damage as a mediator of toxicity in Alzheimer's disease [5]. There is some evidence of increased oxidation of molecules, such as DNA (Deoxyribo-Nucleic Acid), RNA (Ribo-Nucleic Acid), proteins, lipids and carbohydrates in AD brain and in addition, some oxidative stress markers have also been found to be increased in cerebrospinal fluid, blood and urine of AD patients although the results remain contradictory [6]. As Alzheimer's disease (AD) is currently diagnosed only via clinical assessments and confirmed by postmortem brain pathology, the development and use of biochemical markers could facilitate diagnosis and be used to monitor efficacies of disease- modifying therapies, is an emerging need [7]. This article discusses the oxidative damage of DNA in AD brains and the possible interactions between DNA oxidative damage and the overproduction of free radicals.

Key words: oxidative, markers, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, Gas chromatography/mass spectrometry, immunofluorescence.

Βιβλιογραφία

1. Alzheimer's Disease Prevalence Rates Rise to Move than Five Million in the United States. http://www.alz.org/news_and_events_rates_rise.asp
2. Kim, J.-R., Lee, S.-R., Chung, H.J., Kim, S., Baek, S.-H., Kim, J.-H., Kim, Y.-S.: Identification of amyloid β -peptide responsive genes by cDNA microarray technology: Involvement of RTP 801 in amyloid β -peptide toxicity. *Exp Mol Med.* 2003; 35: 403-411.
3. Moreira, P.I., Zhu, X., Liu, Q., Honda, K., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Smith, M.A., Perry, G.: Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease. *Biol Res.* 2006; 39: 7-13.
4. Zheng, L., Marcusson, J., Terman, A.: Oxidative Stress and Alzheimer Disease. *The Autophagy Connection? Autophagy* 2006; 2: 143-145.
5. Perrin, R.J., Fagan, A.M., Holtzman, D.M.: Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 2009; 461: 916-922.
6. Korolainen, M.A., Pirttilä, T.: Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2009; 119: 32-38.
7. Tang, B. L., Kumar, R.: Biomarkers of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37: 406-410.
8. Markesbery, W.R.: The Role of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 1999; 56: 1449-1452.
9. Newman, M., Musgrave, F.I., Lardelli, M.: Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772: 285-297.
10. Querfurth, H.W., La Ferla, F.M.: Mechanisms of disease Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 329-344.
11. Aluise, C.D., Sowell Robinson, R. A., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A.: Preclinical Alzheimer disease: Brain oxidative stress A β peptide and proteomics. *Neurobiology of Disease* 2010; 39 : 221-228.
12. Yang, X., Askarova, S., Lee, J.C.-M.: Membrane Biophysics and Mechanics in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2010; 41: 138-148.
13. Isobe, C., Abe, T., Terayama Y.: Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and /or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *J Neurol* 2010; 257: 399-404.
14. Butterfield, D.A., Bader Lange, M. L., Sultana, R.: Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1801: 924-929.
15. Butterfield, D.A.: Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Synergy Between the Butterfield and Markesbery Laboratories. *Neuromol Med.* 2010; Published online: 02 July 2010. DOI 10.1007/s12017-010-8123-9
16. Wan, L., Nie, G., Zhang, J., Luo, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Zhao, B.: β -amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2011; 50: 122-129.
17. Kong, G., Glenn Lin, C.-I.: Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67: 1817-1829.
18. Bonda, D.J., Wang, X., Perry, G., Nunomura, A., Tabaton, M., Zhu, X., Smith, M.A.: Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology* 2010; 59 : 290-294.
19. Praticò, D.: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29: 609-615.
20. Forero, D.A., Casadesus, G., Perry, G., Arboleda, H.: Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: Emerging mechanisms. *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 796-805.
21. Kitamura, Y., Taniguchi, T., Shimohama, S.: Apoptotic Cell Death in Neurons and , Glial Cells: Implications for Alzheimer's Disease. *Jpn J Pharmacol.* 1999; 79: 1-5.
22. Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., Perry, G.: Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann 1st Super Sanita* 2005; 41: 143-164.
23. Smith, M.A., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Harris, P.L.R., Flint Beal, M., Kowall, N., Perry, G.: Cytochemical Demonstration of Oxidative Damage in Alzheimer Disease by Immunochemical Enhancement of the Carbonyl Reaction with 2,4-Dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 731-735.
24. Rao, K.S.: Free Radical Induced Oxidative damage to DNA: Relation to Brain Aging and Neurological Disorders. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 9-15.
25. Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K.: Employing New Cellular Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease: A Change for the Better?. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2: 55-72.
26. Ohshima, H., Virág, L., Souza, J., Yermilov, V.

- Pignatelli, B., Masuda, M., Szabó, C. Detection of Certain Peroxynitrite- Induced DNA Modifications. In: Armstrong, D. (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols*, Vol. 186. Humana Press, Totowa 2002, p. 77.
27. Mecocci, P., Polidori, M.C., Cherubini, A., Ingegneri, T., Mattioli, P., Catani, M., Rinaldi, P., Cecchetti, R., Stahl, W., Senin, U., Flint Beal, M.: Lymphocyte Oxidative DNA Damage and Plasma Antioxidants in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2002; 59: 794-798.
 28. Markesbery, W.R., Ehmann, W.D. Oxidative Stress in Alzheimer Disease. In : Terry, R.D., Katzman, R., Bick, K.L., Sisodia, S.S. (Eds.), *Alzheimer Disease, Second Edition*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 1999, p.p. 404-407.
 29. Handelman, G.J., Pryor, W.A. Evaluation of Antioxidant Status in Humans. In: Papas, A.M. (Ed.), *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*, CRC Press LLC, Boca Raton 1999, p.p. 38-39, 46, 50-51, 54-55.
 30. Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H.: Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1437-1449.
 31. Dušinska, M., Lietava, J., Olmedilla, B., Rašlová, K., Southon, S., Collins, A.R. Indicators of Oxidative Stress, Antioxidants and Human Health. In: Basu, T.K., Temple, N.J., Garg, M.L. (Eds.), *Antioxidants in Human Health and Disease*, (AB) Publishing, International (Oxon, New York) 1999, p.413.
 32. Halliwell, B., Aruoma, O.I. Free Radicals and Antioxidants: The Need for in vivo Markers of Oxidative Stress. In: Aruoma, O.I., Cuppett, S.L. (Eds.), *Antioxidant Methodology In vivo and in vitro Concepts*, AOCS Press, Champaign 1997, p.p. 6-7.
 33. Pool-Zobel, B.L., Bud, A., Rechkemmer, G. Application of the Comet Assay to Study Oxidative DNA- Damage in Human Cells. In: Aruoma, O.I., Cuppett, S.L. (Eds.), *Antioxidant Methodology In vivo and in vitro Concepts*, AOCS Press, Champaign 1997, p.39.
 34. Lovell, M.A., Markesbery, W.R.: Ratio of 8-Hydroxyguanine, in Intact DNA to Free 8-Hydroxyguanine Is Increased in Alzheimer Disease Ventricular Cerebrospinal Fluid. *Arch Neurol* 2001; 58: 392-396.
 35. Blumberg, J.B., Halpner, A.D. Antioxidant Status and Function: Relationships to Aging and Exercise. In: Papas, A.M. (Ed.), *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*, CRC Press LLC, Boca Raton 1999, p.p. 259-260.
 36. Zhu, X., Smith, M.A., Honda, K., Aliev, G., Moreira, P.I., Nunomura, A., Casadesus, G., Harris, P.,L.R., Siedlak, S.L., Perry, G.: Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 2007; 257: 240-246.
 37. Uberti, D., Carsana, T., Bernardi, E., Rodella, L., Grigolato, P., Lanni, C., Racchi, M., Govoni, S., Memo, M.: Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J Cell Sci* 2002; 115: 3131-3138.