



**Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής**

**Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών**

**ΑΙΘΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ**

Πτυχιακή Εργασία

**“ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ  
ΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ”**

Μπακοπούλου Ηλιάννα

14026

Επιβλέπουσα **Βασιλική Ράικου**, Ακαδημαϊκός Συνεργάτης ΠΑΔΑ.

Αθήνα 2021

***Επιτροπή εξέτασης***

*Ράικου Βασιλική*

*Κίντζιου Ελένη*

*Γαρδίκη Βασιλική*

## Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	3
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	4
Περίληψη.....	5
Κεφάλαιο 1 – Ελεύθερες ρίζες και οξειδωση.....	6
1.1 Χημικές ιδιότητες ελευθέρων ριζών – Δραστικές μορφές O <sub>2</sub> .....	7
Κεφάλαιο 2 – Ελεύθερες ρίζες και γήρανση κυττάρων .....	13
2.1 Άμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών .....	14
2.2 Έμμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών .....	14
2.3 Θεωρία γήρανσης λόγω ελευθέρων ριζών.....	16
2.4 Γήρανση κυττάρων.....	18
2.5 Η συμβολή των μιτοχονδρίων στη γήρανση των κυττάρων.....	20
Κεφάλαιο 3 –Η επιρροή του οξειδωτικού στρες στο δέρμα.....	23
3.1 Γήρανση του δέρματος.....	23
3.2 Οξειδωτικό στρες .....	24
3.3 Γήρανση δέρματος και τελομερή .....	26
Κεφάλαιο 4 – Οξειδωτικό στρες στην καθημερινότητα.....	31
4.1 Κάπνισμα και μολυσμένη ατμόσφαιρα .....	31
4.2 Διατροφή .....	32
4.3 Φωτογήρανση.....	33
Κεφάλαιο 5 - Συμπεράσματα .....	35
Κεφάλαιο 6 – Βιβλιογραφία.....	36

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Ατομική δομή σταθερού μορίου και ελεύθερης ρίζας.....7
- Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που οδηγούν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών και της ζημιάς που προκαλείται στο DNA.....12
- Εικόνα 3:** In vitro παγίδευση περιστροφής σε κερατινοκύτταρα και ομογενοποίηση επιδερμίδας.....16
- Εικόνα 4:** Τα μιτοχόνδρια από παλιά ζώα είναι κατεστραμμένα μέσα στα κύτταρα. (Α) Εμφανίζει μιτοχόνδρια ήπατος από νεαρούς αρουραίους και (Β) δείχνει μιτοχόνδρια ήπατος από ηλικιωμένους αρουραίους (αρχική μεγέθυνση 30.000-1). Τα μιτοχόνδρια από παλιά ζώα παρουσιάζουν περισσότερη ετερογένεια, μεγαλύτερο μέγεθος και διαταραγμένα cristae. Όλες οι ενδείξεις ιστολογικής βλάβης λαμβάνονται από τους Sastre et al. (45).....18
- Εικόνα 5:** (Α) Το ATP παράγεται με οξειδωτική φωσφορυλίωση που διεξάγεται από τα τέσσερα σύμπλοκα RC (CI -CIV) και συνθάση ATP (CV) που βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη μεταφορά ηλεκτρονίων από NADH και FADH<sub>2</sub> σε O<sub>2</sub> χρησιμοποιείται για την άντληση πρωτονίων (H<sup>+</sup>) μέσω CI, CIII και CIV. Η κλίση του πρωτονίου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγεί την παραγωγή ATP μέσω της συνθάσης ATP. Η κλίση πρωτονίων μπορεί να διαλυθεί με επανεισαγωγή πρωτονίων στη μιτοχονδριακή μήτρα μέσω αποσύνδεσης πρωτεϊνών (UCPs), γεγονός που οδηγεί σε αποσύνδεση αναπνοής και σύνθεση ATP.
- (Β) Τα ROS σχηματίζονται ως υποπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το υπεροξείδιο είναι ένα άφθονο ROS στο κύτταρο και παράγεται από CI και CIII. Τα κύτταρα προστατεύονται από την οξειδωτική βλάβη εκφράζοντας μια ποικιλία αντιοξειδωτικών ενζύμων που μετατρέπουν το ROS σε λιγότερο επιβλαβή υποπροϊόντα. Το ανιόν υπεροξειδίου μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με SOD μαγγανίου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέπεται στη συνέχεια σε νερό από υπεροξειδάση γλουταθειόνης, την πιο άφθονη υπεροξειδάση στο κυτταρόλυμα και τα μιτοχόνδρια. Παρόλο που το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ουσιαστικά επιβλαβές για το κύτταρο, μπορεί να μετατραπεί σε εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH •) παρουσία μετάλλων μετάπτωσης μέσω της αντίδρασης Fenton. CytC, κυτόχρωμα C; CoQ, συνένζυμο Q10.....22

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

**Πίνακας 1:** Δομή και λειτουργία του δέρματος: Επιδερμίδα, χόριο και υποδόριος ιστός.....23

**Πίνακας 2:** Αντιοξειδωτικά και τρόφιμα από τα οποία είναι δυνατή η πρόσληψή τους.....33

## Περίληψη

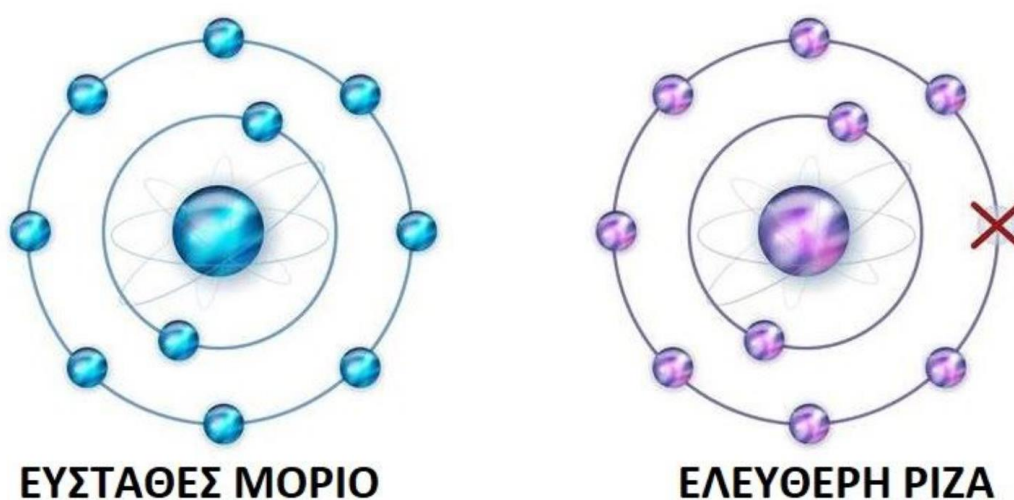
Αρχικά, παρουσιάζονται οι ελεύθερες ρίζες, η δομή και η χημική δραστηριότητα των οποίων αποτελούν βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη γήρανση των κυττάρων του οργανισμού γενικά. Η αντίχνευση τους αποτελεί επομένως πρωταρχική σημασίας πρόβλημα για την αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεών τους. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί δύο τύποι μεθόδων οι άμεσες και οι έμμεσες. Δίνονται οι μηχανισμοί γήρανσης που έχουν προταθεί έως σήμερα, τόσο των κυττάρων εν γένει αλλά και ειδικότερα των κυττάρων του δέρματος. Στη συνέχεια αναλύεται διεξοδικά η επίδραση του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα του δέρματος, όσο και η επίδραση των τελομερών, τμημάτων DNA που βρίσκονται στο τέλος της αλληλουχίας του γραμμικού DNA. Τέλος, παρουσιάζονται συνοπτικά οι βασικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα και το ρυθμό εκδήλωσης του οξειδωτικού στρες, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, το κάπνισμα, η διατροφή και η ρυπογόνος ατμόσφαιρα.

## Κεφάλαιο 1 – Ελεύθερες ρίζες και οξείδωση

Οι ελεύθερες ρίζες είναι τα προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί ως άτομο ή μόριο που περιέχει ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια σε στοιβάδα σθένους ή εξωτερική τροχιά και είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη. Ο περιττός αριθμός ηλεκτρονίων μιας ελεύθερης ρίζας την καθιστά ασταθή, βραχύβια και ιδιαίτερα δραστική (Εικόνα 1). Λόγω της υψηλής δραστικότητάς τους, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αφαιρέσουν ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις για να επιτύχουν σταθερότητα. Έτσι το προσβαλλόμενο μόριο χάνει το ηλεκτρόνιο του και μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα, ξεκινώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση που βλάπτει τελικά το ζωντανό κύτταρο. Τόσο οι δραστικές ρίζες που περιέχουν οξυγόνο (ROS) όσο και αυτές που περιέχουν άζωτο (RNS), αποτελούν συλλογικά τις ελεύθερες ρίζες αλλά και διαφορετικές δραστικές ενώσεις (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015). Οι ROS/RNS διαδραματίζουν μια διπλή δουλειά ως ωφέλιμες και τοξικές ενώσεις για το ζωντανό σύστημα. Σε μέτρια ή χαμηλά επίπεδα τα ROS/RNS έχουν ευεργετικά αποτελέσματα και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως στην ανοσολογική λειτουργία (δηλαδή άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών), σε μια σειρά κυτταρικών οδών σηματοδότησης, σε μιτογόνο ανταπόκριση αλλά και σε οξειδοαναγωγική ρύθμιση (Nordberg & Arner, 2001). Αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση, τόσο τα ROS όσο και τα RNS δημιουργούν οξειδωτικό στρες και νιτροζωτικό στρες, αντίστοιχα, προκαλώντας πιθανή βλάβη στα βιομόρια. Το οξειδωτικό στρες και το νιτροζωτικό στρες αναπτύσσονται όταν υπάρχει υπερβολική παραγωγή ROS/RNS στη μία πλευρά και έλλειψη ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών στην άλλη πλευρά. Το πιο σημαντικό, το υπερβολικό ROS, μπορεί να βλάψει την ακεραιότητα διαφόρων βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA (Marnett, 2000), οδηγώντας σε αυξημένο οξειδωτικό στρες σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως σακχαρώδη διαβήτη, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ρευματοειδή αρθρίτιδα, καταρράκτη, καρδιαγγειακές παθήσεις, αναπνευστικές παθήσεις καθώς και στη διαδικασία γήρανσης.

Γενικά τα προ-οξειδωτικά/οξειδωτικά ονομάζονται ROS/RNS. Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων είναι ρίζες που προέρχονται από οξυγόνο, το ROS. Τόσο το ROS όσο και το RNS μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες ενώσεων, συγκεκριμένα. ρίζες και μη ρίζες. Τα ριζικά είναι τα είδη που περιέχουν τουλάχιστον ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο στις

στοιβάδες γύρω από τον ατομικό πυρήνα και είναι ικανά ανεξάρτητης ύπαρξης. Το μόριο οξυγόνου από μόνο του έχει σθένος (-2) και λόγω της παρουσίας δύο μη ζευγαρωμένων ηλεκτρονίων αναφέρεται ως βιοδραστικό. Τα παραδείγματα για τις ρίζες περιλαμβάνουν υπεροξειδίο ( $O^{-2}$ ), ρίζα οξυγόνου ( $O^2$ ), Υδροξύ- ( $OH\cdot$ ), Αλκόξυ- ( $RO\cdot$ ), Περόξυ- ( $ROO\cdot$ ), Νιτρικό οξειδίο (μονοξειδίο του αζώτου) ( $NO\cdot$ ) και διοξειδίο του αζώτου ( $NO^2$ ) (Marnett, 2000). Η υψηλή αντιδραστικότητα αυτών των ριζών οφείλεται στην παρουσία ενός μη ζευγαρωμένου ηλεκτρονίου που τείνει να το δωρίσει ή να αποκτήσει ένα άλλο ηλεκτρόνιο για να επιτύχει σταθερότητα. Τα μη ριζικά είδη περιλαμβάνουν υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), υποχλωρικό οξύ ( $HOCl$ ), υποβρωμικό οξύ ( $HOBr$ ), όζον ( $O_3$ ), απλό οξυγόνο ( $O_2$ ), νιτρώδες οξύ ( $HNO_2$ ), κατιόν νιτροζύλιο ( $NO^+$ ), νιτροξυλοανιόν ( $NO^-$ ), τριοξειδίο του δινιτρογόνου ( $N_2O_3$ ), τετραοξειδίο του δινιτρογόνου ( $N_2O_4$ ), κατιόν νιτρονίου (νιτριλίου) ( $NO^{2+}$ ), οργανικά υπεροξειδία ( $ROOH$ ), αλδεΰδες ( $HCO_R$ ) και υπεροξυνιτρίτη ( $ONOOH$ ). Αυτά τα είδη δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς (Genestra, 2007).



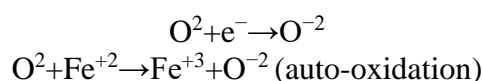
*Εικόνα 1: Ατομική δομή σταθερού μορίου και ελεύθερης ρίζας.*

### 1.1 Χημικές ιδιότητες ελευθέρων ριζών – Δραστικές μορφές $O_2$

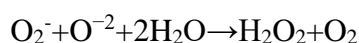
Η ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου είναι το πιο σημαντικό διαδεδομένο ROS που σχηματίζεται από την ενζυματική διαδικασία, την αντίδραση αυτοοξειδωσης και από μη ενζυματικές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στις οποίες ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο. Παράγεται ως επί το πλείστον εντός των



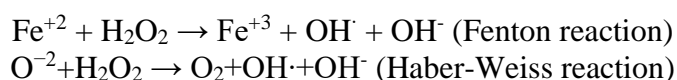
μιτοχονδρίων και η δραστηριότητά του με τα βιομόρια είναι χαμηλή. Τα ένζυμα που μπορούν να παράγουν υπεροξειδίο περιλαμβάνουν την ξανθίνη οξειδάση, τη λιποοξυγενάση και τη κυκλοοξυγενάση και την εξαρτώμενη από τη NADPH οξειδάση. Μπορεί να υπάρχει σε δύο μορφές όπως  $O^{2-}$  ή ρίζα υδροϋπεροξυλίου ( $HO^2$ ) σε χαμηλό pH (Bielski & Cabelli, 1995). Η ρίζα υδροπεροξυλίου είναι η πιο σημαντική μορφή και μπορεί εύκολα να εισέλθει στη διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων από τη φορτισμένη μορφή. Υπό φυσιολογικό pH, η πιο διαδεδομένη μορφή είναι το υπεροξειδίο. Μπορεί να δράσει ως αναγωγικός παράγοντας και μειώνει τα σύμπλοκα σιδήρου όπως το κυτοχρώμιο-γ και το διαμινοτετραοξικό οξύ σιδηροαιθυλενίου ( $Fe^{+2}$ -EDTA), στο οποίο το  $Fe^{+3}$  ανάγεται σε  $Fe^{+2}$ . Μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως οξειδωτικός παράγοντας και να οξειδώσει το ασκορβικό οξύ και την τοκοφερόλη.



Η ρίζα υπεροξειδίου αντιδρά με μια άλλη ρίζα υπεροξειδίου σε αντίδραση μετουσίωσης, στην οποία μία ρίζα οξειδώνεται σε οξυγόνο και η άλλη ανάγεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.

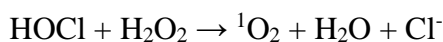


Η ρίζα υδροξυλίου είναι η ουδέτερη μορφή ιόντος υδροξειδίου και είναι μια εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα. Μπορεί να αντιδράσει έντονα τόσο με οργανικά όσο και με ανόργανα μόρια συμπεριλαμβανομένου του DNA, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων και να προκαλέσει σοβαρή βλάβη στα κύτταρα από ό, τι μπορεί να κάνει οποιοδήποτε άλλο ROS. Σχηματίζεται σε μια αντίδραση Fenton, στην οποία το  $H_2O_2$  αντιδρά με ιόντα μετάλλων ( $Fe^{+2}$  ή  $Cu^{+}$ ), συχνά συνδεδεμένο σε σύμπλεγμα με διαφορετικές πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη (μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη που αποθηκεύει σίδηρο) και η σερουλοπλασμίνη (πλάσμα πρωτεΐνη μεταφοράς χαλκού) ή άλλα μόρια. Υπό συνθήκες στρες, μια περίσσεια  $O^{2-}$  απελευθερώνει ελεύθερο σίδηρο από τη φερριτίνη και ο απελευθερωμένος σίδηρος συμμετέχει στην αντίδραση Fenton για να σχηματίσει  $OH^{\cdot}$ . Σχηματίζεται επίσης από την αντίδραση μεταξύ ρίζας υπεροξειδίου και  $H_2O_2$  σε μια αντίδραση που ονομάζεται αντίδραση Haber – Weiss.



Οι ρίζες υπεροξειδίου προέρχονται από το οξυγόνο στα ζωντανά συστήματα. Η

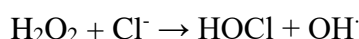
απλούστερη μορφή ρίζας υπεροξειδίου είναι η ρίζα υπεϋδροξυλίου (HOO<sup>•</sup>) η οποία σχηματίζεται από την πρωτονίωση του υπεροξειδίου. Περίπου 0,3% του συνολικού O<sup>2-</sup> στο κυτταρόλυμα ενός τυπικού κυττάρου βρίσκεται στην πρωτονιωμένη μορφή. Ξεκινά την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων και μπορεί επίσης να προωθήσει την ανάπτυξη όγκου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται *in vivo* σε μια αντίδραση μετουσίωσης που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδίου δισμουτάση (SOD). Δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο κύτταρο σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (10μM), αλλά σε υψηλότερα επίπεδα, η κυτταρική ενέργεια που παράγει ένζυμα όπως η αφυδρογονάση γλυκεραλδεϋδης-3-φωσφορική αδρανοποιείται. Μπορεί εύκολα να διεισδύσει στις βιολογικές μεμβράνες. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν έχει άμεση επίδραση στο DNA αλλά μπορεί να βλάψει το DNA παράγοντας ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων. Τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που μπορούν να εξαλείψουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> περιλαμβάνουν την καταλάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τις υπεροξειδωτοξίνες. Είναι μια ηλεκτρονικά υψηλή διέγερση, μετασταθερή κατάσταση μοριακού οξυγόνου και είναι ένα εξαιρετικά αντιδραστικό τοξικό αντιδραστικό είδος οξυγόνου (Hojo, Okado, Kawazoe, & Mizutani, 2000). Κατά την ενεργοποίηση, το μοριακό οξυγόνο διεγείρεται στην πρώτη κατάσταση 1Δg και στη συνέχεια στην επόμενη υψηλότερη διεγερμένη μονή κατάσταση, 1Eg. Η πρώτη διεγερμένη κατάσταση, 1Δg, έχει δύο ηλεκτρόνια με αντίθετες περιστροφές στο ίδιο τροχιακό p\* ενώ η δεύτερη διεγερμένη κατάσταση, 1Eg, έχει ένα ηλεκτρόνιο σε κάθε εκφυλισμένο p\* τροχιακό με αντίθετες περιστροφές. Η κατάσταση 1Δg είναι εξαιρετικά αντιδραστική και συγκρίνεται με τις άλλες ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Παράγεται *in vivo* από την ενεργοποίηση ουδετερόφιλων (Hampton, Kettle, & Winterbourn, 1998) και ηωσινοφίλων. Σχηματίζεται επίσης από μερικές από τις ενζυματικές αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα όπως οι λιποξυγενάσες, οι διοξυγενάσες και η λακτοπεροξειδάση. Είναι ένας εξαιρετικά ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA και βλάβη στους ιστούς.



Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που μπορεί να παραχθεί *in vivo* από την οδό οξείδωσης του νερού που καταλύει με αντίσωμα, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στις διάφορες φλεγμονές. Μπορεί να σχηματίσει ελεύθερες ρίζες και άλλα αντιδραστικά ενδιάμεσα με την οξείδωση των βιολογικών μορίων. Μπορεί να προκαλέσει υπεροξειδωση λιπιδίων και να οξειδώσει διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, για

παράδειγμα, αμίνη, αλκοόλη, αλδεΐδη και σουλφυδρύλιο, που υπάρχουν σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Μπορεί επίσης να προκαλέσει χρωμοσωμικές εκτροπές που μπορεί να οφείλονται σε άμεση επίθεση από το O<sub>3</sub> ή από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από αυτό.

Το υποχλωρικό οξύ (HOCl) είναι ένα κύριο οξειδωτικό που παράγεται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα στο σημείο της φλεγμονής από υπεροξείδιο του υδρογόνου και χλωρίδιο σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο μυελοπεροξειδάση.



Το HOCl είναι ένα ισχυρό αντιδραστικό είδος που εμπλέκεται σε αντιδράσεις οξείδωσης και χλωρίωσης. Μπορεί να οξειδώσει τις θειόλες και άλλα βιολογικά μόρια συμπεριλαμβανομένων, ασκορβικών, ουρικών, νουκλεοτιδίων πυριδίνης και τρυπτοφάνης. Το HOCl χλωριώνει αρκετές ενώσεις όπως αμίνες για να δώσει χλωραμίνες, τυροσυλικά κατάλοιπα για να δώσουν χλωριωμένα προϊόντα δακτυλίου, χοληστερόλη και ακόρεστα λιπίδια για να δώσουν χλωροϋδρίνες, και μπορεί επίσης να χλωριώσει το DNA (Prütz, 1996).

Το νιτρικό οξείδιο ή μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα μικρό μόριο που παράγεται στους ιστούς από διαφορετικές συνθέσεις νιτρικού οξειδίου (NOS) που μετατρέπουν την L-αργινίνη σε L-κιτρουλίνη (Andrew & Mayer, 1999). Σε αυτή την αντίδραση ένα από τα τελικά άτομα guanido αζώτου υφίσταται οξείδωση και παράγει NO. Τρεις τύποι ισομορφών NOS όπως νευρωνικός NOS (nNOS), ενδοθηλιακός NOS (eNOS) και επαγόμενος NOS (iNOS) εμπλέκονται στο σχηματισμό του NO ριζικό.

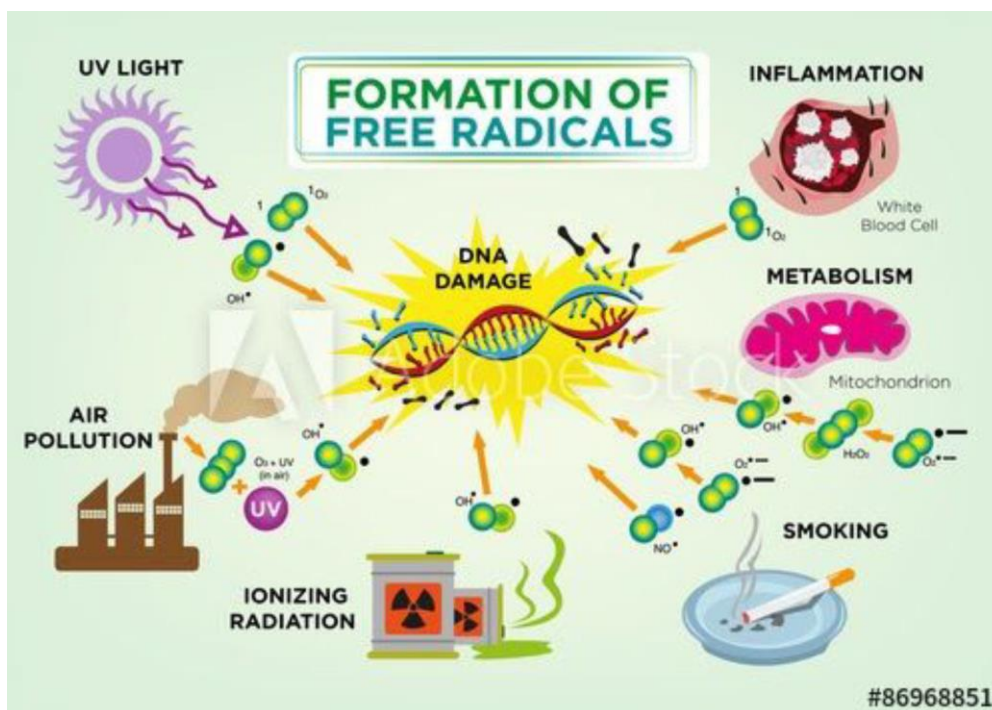


Είναι τόσο υδατικό όσο και λιποδιαλυτό και επομένως διαχέεται εύκολα μέσω του κυτταροπλάσματος και της μεμβράνης πλάσματος. Το NO<sup>•</sup> είναι ένας σημαντικός ενδοκυτταρικός δεύτερος αγγελιοφόρος που διεγείρει τη γουανυλική κυκλάση και τις πρωτεϊνικές κινάσες και βοηθά στη χαλάρωση των λείων μυών στα αιμοφόρα αγγεία. Είναι πανομοιότυπος με τον παράγοντα χαλάρωσης που προέρχεται από το ενδοθήλιο (EDRF) που παράγεται από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι σημαντικός διαμεσολαβητής των αγγειακών αποκρίσεων. Μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως σημαντικός ρυθμιστής οξειδοαναγωγής κυττάρων και να ρυθμίσει την ενζυματική δραστηριότητα με νιτροσυλίωση των πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι εμπλέκεται σε πολλές

βιολογικές δραστηριότητες όπως η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η χαλάρωση των λείων μυών, η νευροδιαβίβαση, οι αμυντικοί μηχανισμοί και η ανοσολογική ρύθμιση, αυτό το μόριο θεωρήθηκε ως μόριο του έτους 1992.

Ο υπεροξυνιτρίτης ( $\text{OONO}^-$ ) σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ  $\text{O}^{-2}$  και  $\text{NO}$ . Είναι εξαιρετικά τοξικό (Beckman & Koppenol, 1996) και μπορεί να αντιδράσει άμεσα με το  $\text{CO}_2$  για να σχηματίσει άλλο εξαιρετικά αντιδραστικό νιτροζοπεροξυκαρβοξυλικό ( $\text{ONOOCO}^{2-}$ ) ή υπεροξυνιτρικό οξύ ( $\text{ONOOH}$ ). Το  $\text{ONOOH}$  υποβάλλεται περαιτέρω σε ομόλυση για να σχηματίσει  $\text{OH}^\bullet$  και  $\text{NO}_2$  ή να αναδιατάξει για να σχηματίσει  $\text{NO}_3$ .  $\text{OONO}^-$  μπορεί να οξειδώσει τα λιπίδια, να οξειδώσει τα υπολείμματα μεθειονίνης και τυροσίνης σε πρωτεΐνες και να οξειδώσει το DNA για να σχηματίσει νιτρογουανίνη. Τα υπολείμματα νιτροτυροσίνης θεωρούνται ως δείκτες της κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από υπεροξυνιτρίτη.

Το  $\text{NO}$  αντιδρά με το  $\text{O}_2$  και το νερό σχηματίζοντας νιτρικά και νιτρώδη ιόντα. Η οξείδωση ενός ηλεκτρονίου του  $\text{NO}^\bullet$  οδηγεί σε κατιόν νιτροζονίου ( $\text{NO}^{+2}$ ) ενώ στη μείωση ηλεκτρονίων οδηγεί σε νιτροξυλοανιόν ( $\text{NO}_2$ ). Αυτά τα δύο ιόντα μπορούν να αντιδράσουν με  $\text{NO}$  και να σχηματίσουν  $\text{N}_2\text{O}$  και  $\text{OH}$ . Το  $\text{NO}^\bullet$  μπορεί να αντιδράσει με μια ποικιλία ριζών όπως  $\text{H}_2\text{O}_2$  και  $\text{HOCl}$  για να σχηματίσει  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}^{2-}$  και  $\text{NO}^{3-}$ .



*Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που οδηγούν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και της ζημιάς που προκαλείται στο DNA.*

## **Κεφάλαιο 2 – Ελεύθερες ρίζες και γήρανση κυττάρων**

Γενικά υπάρχει η πεποίθηση ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αρκετών ανθρώπινων ασθενειών. Ωστόσο, μια αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι συνέπεια βλάβης των ιστών, ένα φαινόμενο γενικό στον οργανισμό ή μόνο περιορισμένης κλινικής σημασίας. Εάν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται σε κλινική κατάσταση, πρέπει ναδειχθεί ότι αυτά τα είδη σχηματίζονται και αποτελούν υποχρεωτικό ενδιάμεσο για την παθολογία. Από τις διάφορες διαθέσιμες μεθόδους για τη μελέτη των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα, η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) είναι η πιο σημαντική τεχνική. Χρησιμοποιώντας την εξαιρετικά επιλεκτική τεχνική EPR, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ανιχνευθούν, να χαρακτηριστούν και να ποσοτικοποιηθούν σε βιολογικά συστήματα. Η φασματοσκοπία EPR αφορά την ηχηρή απορρόφηση της ακτινοβολίας μικροκυμάτων από παραμαγνητικά δείγματα παρουσία εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου. Οι ελεύθερες ρίζες είναι παραμαγνητικά είδη λόγω του μη ζευγαρωμένου ηλεκτρονίου στην εξωτερική τροχιά και έχουν μαγνητική ροπή. Εάν ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμοστεί σε αυτά τα μόρια, οι άξονές τους κατευθύνονται είτε παράλληλα (ενεργειακά πιο σταθεροί) στο εξωτερικό πεδίο είτε στην αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλος). Εάν εφαρμοστούν ηλεκτρομαγνητικά κύματα που αντιστοιχούν στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ των παράλληλων και των αντιπαράλληλων ηλεκτρονικών ροπών (μικροκύματα) σε αυτό το σύστημα, θα προκύψει αλλαγή στον προσανατολισμό αυτών των μορίων. Η καθαρή απορρόφηση της ενέργειας των μικροκυμάτων υπό αυτές τις συνθήκες συντονισμού ποσοτικοποιείται και το 2<sup>ο</sup> παράγωγο καταγράφεται ως σήμα EPR. Αμέσως μετά την ανακάλυψη της μεθοδολογίας EPR από τον Ρώσο φοιτητή Zavoisky το 1945, η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον εντοπισμό ελεύθερων ριζών σε βιολογικά δείγματα. Έκτοτε, εμφανίστηκε ένας αμέτρητος αριθμός αναφορών σχετικά με την ανάπτυξη και την εφαρμογή της φασματοσκοπίας EPR στη βιοϊατρική. Μία από τις πιο ολοκληρωμένες συλλογές της βιβλιογραφίας EPR παρέχεται ετησίως στις «Ειδικές Περιοδικές Αναφορές από τη Βασιλική Εταιρεία Χημείας». Το δέρμα είναι όργανο - στόχος οξειδωτικού στρες, επειδή είναι συνεχώς εκτεθειμένο σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και ηλιακή ακτινοβολία, χρησιμεύει ως κύρια πύλη εισόδου για πολλούς οξειδωτικούς περιβαλλοντικούς ρύπους και επαγγελματικούς κινδύνους και περιέχει αρκετά άμεσα οξειδωσιμα μόρια κρίσιμα για τη δομή και τη λειτουργία.

Για αυτούς και άλλους πρακτικούς λόγους που περιγράφονται παρακάτω, οι βιολόγοι των ελεύθερων ριζών ενδιαφέρονται όλο και περισσότερο για δερματικές εφαρμογές EPR. Σκοπός αυτής της ανασκόπησης είναι να παρέχει στον αναγνώστη τρέχουσες πληροφορίες σχετικά με τις εξελίξεις της ανίχνευσης ελεύθερων ριζών στο δέρμα με τη μεθοδολογία EPR και άλλες εφαρμογές της τεχνικής EPR στην δερματική βιολογία (Thiele & Elsner, 2001).

## **2.1 Άμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών**

Άμεση απόδειξη για το σχηματισμό ελευθέρων ριζών στο ανθρώπινο αλλά και το ζωικό δέρμα μετά από συνεχή έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία έχουν ληφθεί με χαμηλή θερμοκρασία (π.χ.  $-196^{\circ}\text{C}$ ) με φασματοσκοπία EPR *in vitro*. Σε θερμοκρασία υγρού αζώτου, η συγκέντρωση ριζικής σταθερής κατάστασης είναι αρκετά υψηλή για να δώσει επαρκή ένταση σήματος EPR. Ωστόσο, αυτά τα σήματα είναι πολύ ευρεία και συνήθως δεν παρέχουν καθόλου ή μόνο πολύ περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη χημική ταυτότητα της δομής των ελεύθερων ριζών. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μόνο οι επίμονες ελεύθερες ρίζες όπως η μελανίνη ή η ρίζα ασκορβυλίου έχουν ανιχνευθεί άμεσα στο δέρμα και/ή στα προσαρτήματα δέρματος *in vitro*. Ο δερματικός μεταβολισμός των ενώσεων που παράγουν ελεύθερες ρίζες όπως η 4-υδροξυανισόλη και η ανθραλίνη έχει αποδειχθεί ότι δημιουργούν επίμονες ρίζες ημικινόνης στο δέρμα των αρουραίων ή ρίζες που έχουν υποστεί διασταύρωση ανθρόνης/αντρόνης στο δέρμα χοίρου ή ποντικού *in vitro* (Shroot & Brown, 1986), αντίστοιχα. Οι τοκοφεροξυλικές ρίζες ανιχνεύθηκαν σε δέρμα ποντικού που είχε υποστεί αγωγή με βιταμίνη E *in vitro* μετά από υπεριώδη ακτινοβολία (Fuchs, 1992). Μερικοί ερευνητές έχουν αναλύσει λυοφιλοποιημένα ή αποξηραμένα δείγματα δέρματος (π.χ. από κέρατο) για ελεύθερες ρίζες. Η τεχνική λυοφιλοποίησης και οι μηχανικές διεργασίες όπως η κοπή και η λείανση μπορούν να παράγουν παραμαγνητικά τεχνουργήματα σε βιολογικούς ιστούς. Αυτές οι τεχνικές πρέπει να αποφεύγονται, επειδή μπορούν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα σε πειράματα EPR.

## **2.2 Έμμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών**

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η χαμηλή συγκέντρωση σταθερής κατάστασης αντιδραστικών ελεύθερων ριζών σε βιολογικά δείγματα επιτρέπει μόνο την έμμεση ανίχνευση με τη μέθοδο παγίδευσης περιστροφής. Η παγίδευση περιστροφής ορίζεται ως η χημική αντίδραση στην οποία μια ρίζα προσθέτει σε ένα μόριο έτσι ώστε η ομάδα

που ήταν η ριζοσπαστική (ριζική προσθήκη) παραμένει στο μόριο για μελλοντική ανάλυση. Το μόριο που δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα ονομάζεται παγίδα περιστροφής. Το πρόσθετο προϊόν ονομάζεται πρόσθετο περιστροφής. Οι παγίδες περιστροφής είναι συνήθως νιτρόνια ή νιτρώδεις ενώσεις, οι οποίες είναι μία ηλεκτρονική κατάσταση οξείδωσης πάνω από τα νιτροξείδια και τα οποία, όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μετατρέπονται σε νιτροξείδια. Η παγιδευμένη ρίζα έχει ένα χαρακτηριστικό φάσμα EPR που επιτρέπει τη χημική ταυτοποίηση της εξαιρετικά δραστηρής ελεύθερης ρίζας. Η ερμηνεία των φασμάτων EPR και ο επακόλουθος προσδιορισμός του πρόσθετου των ελεύθερων ριζών είναι το πιο εξελιγμένο και δύσκολο συστατικό της διαδικασίας παγίδευσης περιστροφής. Η σταθερότητα του ριζικού πρόσθετου και η μετατροπή του σε άλλα παραμαγνητικά ή διαμαγνητικά προϊόντα μπορεί να αποτελέσουν πηγή πειραματικής σύγχυσης. Η ιστορία της παγίδευσης περιστροφής ξεκίνησε με C-φαινυλ-N-τριτ-βουτυλνιτρόνη (PBN), η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των ελεύθερων ριζών με ανθρακικό και οξυγονοκεντρικό κέντρο. Οι δυνατότητες του PBN βελτιώθηκαν με σύνθεση του ανάλογου πυριδίνης-N-οξειδίου του PBN, C- (4-πυριδινύλο-N-οξειδίου) -N-tert-βουτυλνιτρόνης (4-POBN). Τα σύμπλοκα διθειοκαρβαμικού σιδήρου (II) χρησιμοποιούνται επιτυχώς για παγίδευση NO σε βιολογικά συστήματα, ενώ η 2,2,6,6-τετραμεθυλο-πιπεριδίνη και η 2,2,6,6-τετραμεθυλο-4-πιπεριδίνη είναι ευαίσθητοι παράγοντες παγίδευσης για απλό οξυγόνο (Konaka et al., 1999). Η 5,5-διμεθυλ-1-πυρρολίνη-N-οξείδιο (DMPO) είναι πιθανώς η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη παγίδα περιστροφής σε βιολογικά συστήματα, απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες με επίκεντρο τον άνθρακα, το οξυγόνο και το θείο. Η Εικόνα 3 δείχνει μερικά επιλεγμένα παραδείγματα παγίδευσης περιστροφής σε κερατινοκύτταρα, ομογενοποίησης επιδερμίδας και βιοψιών δέρματος. Ο ξενοβιοτικός μεταβολισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να διερευνηθεί με την τεχνική παγίδευσης περιστροφής σε ζώα in vivo και ορισμένα επιλεγμένα παραδείγματα παγίδευσης περιστροφής in vivo φαίνονται στον Πίνακα 2. Από τη γνώση μας, ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχουν δημοσιευθεί ακόμη μελέτες in vivo στο δέρμα.

Free radical or reactive species detected	Sample	Spin trap
Alkyl hydroxyl	rat epidermis homogenate	DMPO
Lipid alkyl	mouse skin biopsy	DMPO
Lipid alkoxy	human skin biopsy	4-POBN
Alkyl Alkoxy	mouse skin biopsy	DMPO
Singlet oxygen	human bronchial epithelial cells	2-(9,10-dimethoxyanthracenyl)-tert-butylhydroxylamine
Glutathione thyl	keratinocytes	DMPO
Alkyl Alkoxy	mouse keratinocytes	DMPO
Hydroxyl	murine skin fibroblasts	DMPO
Methyl	human keratinocytes	4-POBN
Methyl	human squamous carcinoma keratinocytes	3,5-dibromonitrosobenzene sulfonic acid
Hydroxyl	guinea pig epidermis homogenate	DMPO
Lipid alkyl hydroxyl	rat epidermis homogenate	DMPO
Carbon-centered	mouse skin biopsy	4-POBN

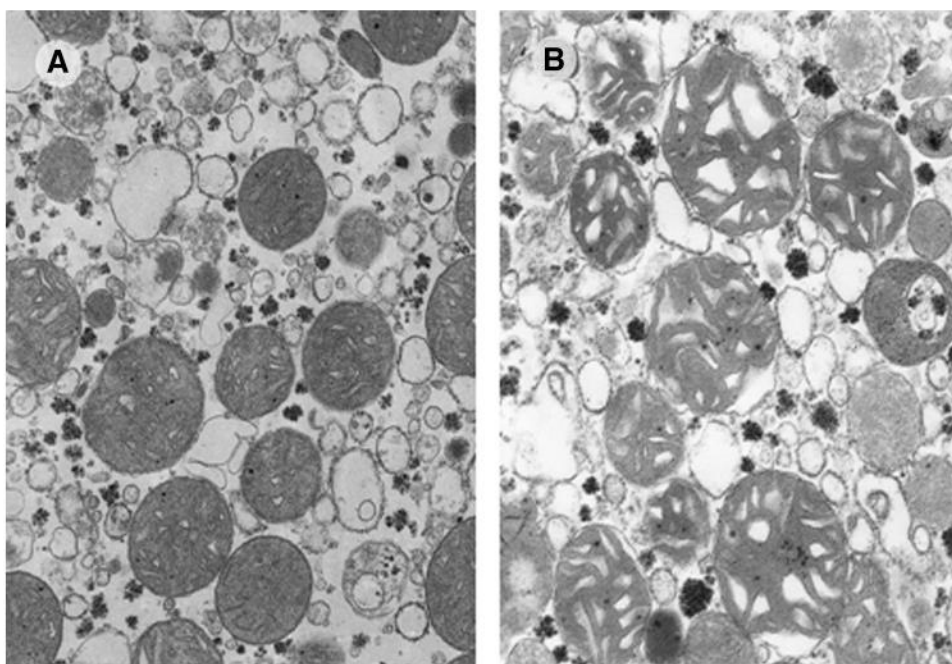
*Εικόνα 3: In vitro παγίδευση περιστροφής σε κερατινοκύτταρα και ομογενοποίηση επιδερμίδας.*

### 2.3 Θεωρία γήρανσης λόγω ελευθέρων ριζών

Το 1956 ο χημικός και γιατρός Denham Harman δημοσίευσε μια έρευνα με τίτλο “Γήρανση: Μια θεωρία βασισμένη στις ελεύθερες ρίζες και τη χημεία της ραδιενέργειας”. Σήμερα, η θεωρία του Harman είναι γνωστή ως Free Radical Theory of Aging (FRTA). Σύμφωνα με αυτή, οι οργανισμοί γερνάνε διότι τα κύτταρα, με τη πάροδο του χρόνου, συσσωρεύουν βλάβες προκαλούμενες από ελεύθερες ρίζες. Δύο ήταν οι κύριες πηγές έμπνευσης για την έρευνα του Harman. Η πρώτη ήταν η Θεωρία του Ρυθμού της Διαβίωσης (Rate-of-Living theory), σύμφωνα με την οποία η διάρκεια ζωής ενός οργανισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη με το ρυθμό του μεταβολισμού του, ο οποίος είναι ανάλογος της κατανάλωσης οξυγόνου του οργανισμού. Η δεύτερη, ήταν η παρατήρηση της Rebecca Gershman πως η τοξικότητα υπερβαρικού οξυγόνου και η τοξικότητα ραδιενέργειας μπορεί να εξηγηθεί από το ίδιο υποκείμενο φαινόμενο: τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Με τη πάροδο του χρόνου, η θεωρία των ελευθέρων ριζών επεκτάθηκε στο να δώσει εξήγηση όχι μόνο στην ίδια τη γήρανση, αλλά και σε ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Έτσι, βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες έχουν συσχετιστεί με πλήθος διαταραχών όπως καρκίνος, αρθρίτιδα, αθηροσκλήρωση, Αλτσχάιμερ και διαβήτη.



Το γεγονός ότι η δηλητηρίαση από οξυγόνο έχει κοινούς μηχανισμούς με την ακτινοβολία Χ και ότι εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες, αναφέρθηκε για πρώτη φορά από την Rebeca Gerschman, ερευνήτρια που εργαζόταν στο Ρότσεστερ στο εργαστήριο του Wallace O. Fenn. Αυτή η κριτική εργασία, που δημοσιεύθηκε το 1954, άνοιξε το δρόμο για την πρώτη δήλωση του Denham Harman το 1956 σχετικά με τη θεωρία των ελεύθερων ριζών της γήρανσης. Στο κύριο άρθρο του, ο Harman δήλωσε ότι «η γήρανση και οι εκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με αυτήν αποδίδονται βασικά στις επιβλαβείς επιθέσεις των ελεύθερων ριζών στα συστατικά των κυττάρων και στους συνδεδεμένους ιστούς» (Harman, 1956). Ο Harman πρότεινε αρχικά ότι τα μιτοχόνδρια είναι βασικά οργανίδια που εμπλέκονται στη γήρανση. Ωστόσο, η μιτοχονδριακή θεωρία των ελεύθερων ριζών της γήρανσης τέθηκε σαφώς στη δεκαετία του 1970 από τους (Miquel, Economos, Fleming, & Johnson, JE., 1980). Η συμβολή του Miquel στη θεωρία των ελεύθερων ριζών της γήρανσης ήταν σημαντική για την επισήμανση των μιτοχονδρίων ως πηγών ελεύθερων ριζών και του μιτοχονδριακού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) ως κρίσιμου στόχου για την εξήγηση της βλάβης που σχετίζεται με τη γήρανση στα κύτταρα. Στη συνέχεια δόθηκαν οι πρώτες αποδείξεις ότι τα μιτοχόνδρια έχουν υποστεί βλάβη σαν κύτταρα και ότι οι επιδράσεις της γήρανσης στα μιτοχόνδρια δεν οφείλονται στο γεγονός ότι είναι πιο εύθραυστα και κατεστραμμένα κατά την απομόνωση, αλλά στην εγγενή βλάβη που συμβαίνει στα κύτταρα καθώς προχωρά η ηλικία. Τα ευρήματά αυτά επιβεβαιώθηκαν ανεξάρτητα και σχεδόν ταυτόχρονα από την ομάδα του Ames που έδειξε τα χαρακτηριστικά κοινά στοιχεία της μιτοχονδριακής αποσύνθεσης με τη γήρανση (Εικόνα 4). Έτσι, στο τέλος του αιώνα, η θεωρία των ελεύθερων ριζών της γήρανσης φάνηκε να έχει καθιερωθεί, αλλά νέες πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι αυτή δεν είναι απόλυτη. Επιπλέον, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της θεωρίας ήταν ότι άνοιξε χώρο για ιατρική παρέμβαση, επειδή η χορήγηση αντιοξειδωτικών θα μπορούσε να είναι ευνοϊκή για την καθυστέρηση της γήρανσης και ίσως ακόμη περισσότερο, για την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Η υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα ήταν γενικά καλά για την υγεία σας, δεν αποδείχθηκε πανάκεια.



**Εικόνα 4:** Τα μιτοχόνδρια από παλιά ζώα είναι κατεστραμμένα μέσα στα κύτταρα. (Α) Εμφανίζει μιτοχόνδρια ήπατος από νεαρούς αρουραίους και (Β) δείχνει μιτοχόνδρια ήπατος από ηλικιωμένους αρουραίους (αρχική μεγέθυνση 30.000-1). Τα μιτοχόνδρια από παλιά ζώα παρουσιάζουν περισσότερη ετερογένεια, μεγαλύτερο μέγεθος και διαταραγμένα cristae. Όλες οι ενδείξεις ιστολογικής βλάβης λαμβάνονται από τους Sastre et al. (45).

## 2.4 Γήρανση κυττάρων

Η κυτταρική γήρανση είναι μια κατάσταση μόνιμης διακοπής του κυτταρικού κύκλου που αρχικά ορίστηκε σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε κυτταρική καλλιέργεια. Αργότερα, αυτή η κυτταρική απόκριση ταυτοποιήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* για κύτταρα που υπέστησαν διαφορετικές μορφές στρες και πιο πρόσφατα ανιχνεύθηκε επίσης σε φυσιολογικές καταστάσεις κατά την ανάπτυξη των κυττάρων. Η αρχική παρατήρηση της γήρανσης των κυττάρων έγινε για τους ανθρώπινους πρωτογενείς ινοβλάστες, ενώ γινόταν προσπάθεια να καθορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας (Hayflick & Moorhead, 1961). Ο στόχος ήταν να υπάρξει πρόσβαση σε μια ασφαλή πηγή ανθρώπινων διαταραγμένων κυττάρων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη εμβολίων και άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Εκείνη την εποχή, η πρόωμη τεχνολογία κυτταρικής καλλιέργειας βασίστηκε στη χρήση καθιερωμένων κυτταρικών σειρών που προέρχονταν από όγκους ανθρώπων και ποντικών. Σε αντίθεση με τον ισχυρό και μόνιμο πολλαπλασιασμό που παρατηρήθηκε για τα καρκινικά κύτταρα, οι άνθρωποι πρωτογενείς ινοβλάστες θα μπορούσαν να προσαρμοστούν σε *in vitro* συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας και να πολλαπλασιαστούν με σταθερό ρυθμό κατά τις αρχικές

φάσεις της καλλιέργειας. Ωστόσο, πάντοτε καθώς οι καλλιέργειες συσσωρεύουν περάσματα, τα κύτταρα μετατρέπονται σε πεπλατυσμένα και διευρυμένα μορφολογία και παύουν να πολλαπλασιάζονται. Αυτή η αναστολή ανάπτυξης ήταν σταθερή αφού η προσθήκη νέων παραγόντων ανάπτυξης δεν είχε ως αποτέλεσμα την επανέναρξη της κυτταρικής διαίρεσης. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν τους συγγραφείς να συσχετίσουν τη γήρανση των κυττάρων με τη διαδικασία της γήρανσης. Η πολλαπλασιαστική εξάντληση θεωρήθηκε ως η κυτταρική αντανάκλαση της οργανικής αποσύνθεσης. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα ήταν αθάνατα και δεν εμφάνιζαν σημάδια γήρανσης των κυττάρων. Ένα βασικό στοιχείο που προέρχεται από αυτό το θεωρητικό πλαίσιο είναι ότι τα κύτταρα πρέπει να έχουν έναν μηχανισμό μέτρησης υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του προγράμματος γήρανσης. Αυτό ώθησε πολλά εργαστήρια να ξεκινήσουν την αναζήτηση παραγόντων που θα μπορούσαν να εμπλακούν στη ρύθμιση της εισόδου στη γήρανση ως τρόπο αποκρυπτογράφησης των μοριακών μηχανισμών που κρύβονται πίσω από τη γήρανση.

Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν τους συγγραφείς να συσχετίσουν τη γήρανση των κυττάρων με τη διαδικασία της γήρανσης. Η πολλαπλασιαστική εξάντληση θεωρήθηκε ως η κυτταρική αντανάκλαση της οργανικής αποσύνθεσης. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα ήταν αθάνατα και δεν εμφάνιζαν σημάδια γήρανσης των κυττάρων. Ένα βασικό στοιχείο που προέρχεται από αυτό το θεωρητικό πλαίσιο είναι ότι τα κύτταρα πρέπει να έχουν έναν μηχανισμό μέτρησης υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του προγράμματος γήρανσης. Αυτό ώθησε πολλά εργαστήρια να ξεκινήσουν την αναζήτηση παραγόντων που θα μπορούσαν να εμπλακούν στη ρύθμιση της εισόδου στη γήρανση ως τρόπο αποκρυπτογράφησης των μοριακών μηχανισμών που κρύβονται πίσω από τη γήρανση. Δεκαετίες αργότερα, ενώ προσπαθούσε να μοντελοποιηθεί η έναρξη του καρκίνου μετά την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου, η γήρανση των κυττάρων αναγνωρίστηκε ως απάντηση που αντιτίθεται στον ογκογόνο μετασχηματισμό. Τα κύτταρα που φέρουν ενεργοποιημένο ογκογονίδιο φάνηκε ότι είτε πεθαίνουν μέσω απόπτωσης, είτε εισέρχονται στη χαρακτηριστική σταθερή διακοπή του κυτταρικού κύκλου που καθορίζει την γήρανση των κυττάρων. Αυτές οι παρατηρήσεις τεκμηριώθηκαν *in vivo* χρησιμοποιώντας ζωικά μοντέλα και ανθρώπινα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ογκογόνο στρες και η γήρανση των κυττάρων αποδείχθηκε ότι ήταν ένα ισχυρό εμπόδιο που εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου (Collado & Serrano, 2010). Η ογκογονική ενεργοποίηση ήταν το πρώτο παράδειγμα επαγωγής της γήρανσης των κυττάρων ως απάντηση ενάντια σε ένα στρες που θα

μπορούσε δυνητικά να αλλάξει την κυτταρική ακεραιότητα. Ακολούθησαν σύντομα άλλες καταπονήσεις και η γήρανση των κυττάρων άρχισε να θεωρείται ως μια κοινή προστατευτική αντίδραση που αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των κατεστραμμένων κυττάρων. Πρόσφατα, ο προσδιορισμός της γήρανσης των κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ως μηχανισμός αναδιαμόρφωσης ανοίγει την πιθανότητα ότι η γήρανση προήλθε ως μια φυσιολογική διαδικασία που επιλέχθηκε στην ενήλικη ζωή για να ανταποκριθεί σε αγχωτικές συνθήκες. Οι συνέπειες της γήρανσης των κυττάρων για τη φυσιολογική φυσιολογία των ιστών σε υγιείς συνθήκες ή κατά τη γήρανση ή την ασθένεια εξακολουθούν να αποτελούν θέμα έντονης έρευνας, αλλά η συνάφεια αυτής της κυτταρικής απόκρισης είναι αδιαμφισβήτητη.

## **2.5 Η συμβολή των μιτοχονδρίων στη γήρανση των κυττάρων**

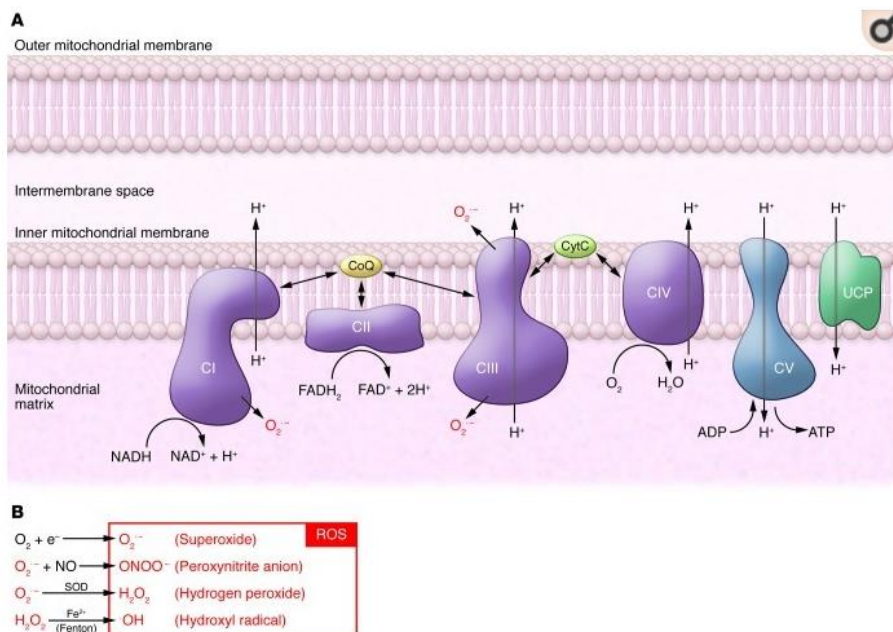
Οι ακριβείς λόγοι για τους οποίους γερνάμε είναι ελάχιστα κατανοητοί. Η γήρανση θεωρείται μια εκφυλιστική διαδικασία που προκαλείται από συσσωρευμένη βλάβη που οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία, αποτυχία ιστών και θάνατο. Έχει προταθεί μια σειρά θεωριών γήρανσης και η θεωρία των μιτοχονδριακών ελεύθερων ριζών της γήρανσης (MFRTA) έχει βρεθεί στο επίκεντρο για αρκετές δεκαετίες. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, τα ROS θεωρούνται ανεπιθύμητα τοξικά υποπροϊόντα αερόβιου μεταβολισμού που προκαλούν οξειδωτική βλάβη σε διάφορα κυτταρικά μακρομόρια λόγω της υψηλής χημικής τους αντιδραστικότητας. Η αναπνευστική αλυσίδα (RC), που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, είναι μια κύρια τοποθεσία παραγωγής υπεροξειδίου, ένα άφθονο ROS στο κύτταρο που σχηματίζεται στο επίπεδο των συμπλεγμάτων I και III κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων.

1) Το ανιόν υπεροξειδίου μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με SOD. Αν και το υπεροξείδιο του υδρογόνου από μόνο του δεν είναι ελεύθερη ρίζα, μπορεί να μετατραπεί σε εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου παρουσία μετάλλων μετάπτωσης μέσω της αντίδρασης Fenton.

2) Η ρίζα υδροξυλίου θεωρείται η πιο επιζήμια μορφή του ROS, καθώς είναι ιδιαίτερα αντιδραστική και προκαλεί οξειδωτική βλάβη σχεδόν σε κάθε τύπο μορίου στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων.

Η θεωρία MFRTA βασίζεται σε διάφορες παρατηρήσεις: (α) η παραγωγή μιτοχονδριακών ROS αυξάνεται με την ηλικία λόγω της μείωσης της μιτοχονδριακής λειτουργίας, (β) η δραστηριότητα πολλών ενζύμων που καταστρέφουν το ROS

μειώνεται με την ηλικία, συσσωρεύονται κατά τη γήρανση και (γ) εμφανίζεται ένας φαύλος κύκλος επειδή οι σωματικές μεταλλάξεις του mtDNA επηρεάζουν τη λειτουργία του RC, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της παραγωγής ROS και συσσωρευμένη οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Σύμφωνα με το MFRTA, τα μιτοχόνδρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμεσολάβηση και την ενίσχυση του οξειδωτικού στρες που οδηγεί τη διαδικασία γήρανσης. Παρόλο που ένας πλούτος συσχετιστικών δεδομένων υποστηρίζει το MFRTA και έναν ρόλο για αυξημένη παραγωγή ROS και οξειδωτική βλάβη σε διαφορετικούς τύπους ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, πιο πρόσφατα δεδομένα θέτουν υπό αμφισβήτηση αυτό το μοντέλο γήρανσης. Εδώ συζητάμε το ρόλο των μιτοχονδρίων στη γήρανση, με ιδιαίτερη έμφαση στα εξής: (α) το ρόλο των μεταλλάξεων mtDNA ως κινητήρια δύναμη στη γήρανση, (β) το ρόλο των μιτοχονδριακών ROS στη γήρανση και (γ) τη σχέση μεταξύ της μιτοχονδριακής λειτουργίας και διαδρομές σηματοδότησης που αναφέρονται ότι ρυθμίζουν τη μακροζωία.



**Εικόνα 5:** (Α) Το ATP παράγεται με οξειδωτική φωσφορυλίωση που διεξάγεται από τα τέσσερα σύμπλοκα RC (CI -CIV) και συνθάση ATP (CV) που βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή

μεμβράνη. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη μεταφορά ηλεκτρονίων από NADH και FADH<sub>2</sub> σε O<sub>2</sub> χρησιμοποιείται για την άντληση πρωτονίων (H<sup>+</sup>) μέσω CI, CIII και CIV. Η κλίση του πρωτονίου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη οδηγεί την παραγωγή ATP μέσω της συνθάσης ATP. Η κλίση πρωτονίων μπορεί να διαλυθεί με επανεισαγωγή πρωτονίων στη μιτοχονδριακή μήτρα μέσω αποσύνδεσης πρωτεϊνών (UCPs), γεγονός που οδηγεί σε αποσύνδεση αναπνοής και σύνθεση ATP.

(B) Τα ROS σχηματίζονται ως υποπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το υπεροξείδιο είναι ένα άφθονο ROS στο κύτταρο και παράγεται από CI και CIII. Τα κύτταρα προστατεύονται από την οξειδωτική βλάβη εκφράζοντας μια ποικιλία αντιοξειδωτικών ενζύμων που μετατρέπουν το ROS σε λιγότερο επιβλαβή υποπροϊόντα. Το ανιόν υπεροξειδίου μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με SOD μαγγανίου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέπεται στη συνέχεια σε νερό από υπεροξειδάση γλουταθειόνης, την πιο άφθονη υπεροξειδάση στο κυτταρόλυμα και τα μιτοχόνδρια. Παρόλο που το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ουσιαστικά επιβλαβές για το κύτταρο, μπορεί να μετατραπεί σε εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH•) παρουσία μετάλλων μετάπτωσης μέσω της αντίδρασης Fenton. CyC, κυτόχρωμα C; CoQ, συνένζυμο Q10.

### Κεφάλαιο 3 –Η επιρροή του οξειδωτικού στρες στο δέρμα

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, μελετήσαμε πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στη λειτουργία και την αναπαραγωγή των κυττάρων. Το τι σημαίνει αυτό για το δέρμα θα αναλυθεί στις παραγράφους που ακολουθούν στη συνέχεια.

#### 3.1 Γήρανση του δέρματος

Το δέρμα λειτουργεί ως προστατευτικό φράγμα μεταξύ των εσωτερικών οργάνων και του σώματος και του περιβάλλοντος. Χωρίζεται σε τρεις κύριες περιοχές: την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό (Πίνακας 1). Η επιδερμίδα, ένα στρώμα πλούσιο σε κύτταρα αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα, τα οποία είναι τα πιο πολυάριθμα είδη κυττάρων, τα οποία τελικά σχηματίζουν τον εξωτερικό προστατευτικό φραγμό του δέρματος στο περιβάλλον. Το υγιές δέρμα είναι κάτι που επιδιώκει η κοινωνία και μερικοί ξοδεύουν ό, τι μπορούν και δεν μπορούν να επιτύχουν την καλύτερη εμφάνιση και την απλή εμφάνιση. Η ηλικία, χωρίζοντας από την πραγματική ηλικία, προβλέπει σημαντικές πτυχές της υγείας και της ευημερίας. Υπάρχουν δύο κύριες διαδικασίες που προκαλούν τη γήρανση του δέρματος: εσωτερική και εξωτερική. Η εξωγενής γήρανση προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η έκθεση στον ήλιο, η ατμοσφαιρική ρύπανση, το κάπνισμα και η κακή διατροφή. Η εσωτερική γήρανση αντικατοπτρίζει το γενετικό υπόβαθρο και εξαρτάται από το χρόνο. Το εξωτερικά γερασμένο δέρμα χαρακτηρίζεται από βλάβη στη φωτογραφία ως ρυτίδες, χρωματισμένες βλάβες, αποσπασματικές χρωστικές και ακτινικές κερατώσεις.

*Πίνακας 1: Δομή και λειτουργία του δέρματος: Επιδερμίδα, χόριο και υποδόριος ιστός.*

Στρώματα δέρματος			
	Επιδερμίδα	Δέρμα	Υποδερμικός Ιστός
Δομή	Επιφανειακό τμήμα του δέρματος. στρωματοποιημένο ανεπιθύμητο επιθήλιο. αποτελείται από τέσσερα από πέντε στρώματα.	Βαθύ μέρος του δέρματος και συνδετικού ιστού αποτελείται από δύο στρώματα.	ΟΧΙ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ. Χαλαρά συνδετικό ιστό με άφθονο εναποθέσεις λιπώδους ιστού.
Λειτουργία	Αποτρέπει την απώλεια νερού και την είσοδο χημικών και μικροοργανισμών. Προστατεύει από την τριβή και το υπεριώδες φως παράγει βιταμίνη D. γεννά μαλλιά, νύχια και αδένες.	Είναι υπεύθυνο για τη δομική δύναμη και ευελιξία του δέρματος. Η επιδερμίδα ανταλλάσσει αέρια, θρεπτικά συστατικά, και απόβλητα προϊόντων με αιμοφόρα αγγεία στο χόριο.	Συνδέει το χόριο στο υποκείμενο δομές. Ο λιπώδης ιστός παρέχει αποθήκευση ενέργειας, μόνωση και πλήρωση αιμοφόρα αγγεία και νεύρα από το ο υποδόριος ιστός παρέχει το χόριο.

### 3.2 Οξειδωτικό στρες

Η θεωρία της γήρανσης των ελεύθερων ριζών ή του οξειδωτικού στρες προτείνει ότι η συσσώρευση οξειδωτικής κυτταρικής βλάβης είναι ένας σημαντικός συντελεστής στη διαδικασία γήρανσης και καθοριστικός παράγοντας για τη μακροζωία του είδους. Σε μια μελέτη που διερεύνησε τα γηράσκοντα είδη μικρής διάρκειας ζωής αχινού και εξαιρετικής μακροζωίας, διαπίστωσε ότι τα επίπεδα ήταν χαμηλότερα οξειδωτικά και η αντιοξειδωτική δραστηριότητα ήταν υψηλότερη σε κύτταρα ή ιστούς μακρόβιων ειδών σε σύγκριση με τα βραχύβια είδη. Σύμφωνα με τις προβλέψεις της θεωρίας του οξειδωτικού στρες της γήρανσης, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αμελητέα γήρανση συνοδεύεται από μείωση της κυτταρικής συσσώρευσης οξειδωτικής βλάβης με την ηλικία και τη διατήρηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης και οι δραστηριότητες των ενζύμων του πρωτεασώματος μπορεί να είναι σημαντικοί μηχανισμοί για τον μετριασμό τη ζημιά. Υπάρχουν ουσιαστικά στοιχεία που δείχνουν ότι η γήρανση σχετίζεται με βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες που αντιπροσωπεύονται από διάφορα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Δύο γενικά χαρακτηριστικά είναι υπεύθυνα για τη μακρά ζωή σε ορισμένα ζώα: ένα χαμηλό ποσοστό γενετικής ενδογενούς βλάβης και η ύπαρξη εξαιρετικά ανθεκτικών σε οξειδωτικά τροποποιητικά μακρομόρια ιστού. Επομένως, ο ρόλος του ROS στη γήρανση εξηγεί γιατί τα ζώα με υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό έχουν χαμηλότερο προσδόκιμο ζωής. Η γήρανση σχετίζεται με αλλαγές στη μοριακή δομή του DNA, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των προσταγλανδινών. Όλοι είναι δείκτες οξειδωτικού στρες, αν και όλες οι αλλαγές δεν οφείλονταν μόνο στην οξείδωση, υπάρχουν και άλλοι τρόποι, συμπεριλαμβανομένων αυθόρμητων σφαλμάτων και άλλων τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Η συσσώρευση αυτών των μοριακών οι αλλαγές, ιδίως οι πρωτεΐνες, αποτελούν τη βάση της κυτταρικής γήρανσης. Ωστόσο, αναγνωρίζεται επίσης ότι η παραγωγή ROS, που παίζει ρόλο στις κανονικές διαδικασίες σηματοδότησης, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιότητας και της κυτταρικής απόκρισης. Η έννοια της θεωρίας των ελεύθερων ριζοσπαστικών για τη γήρανση των ψήφων μέχρι τώρα, έχει αντικρούσει σε ορισμένες μελέτες και σήμερα συζητώντας την απιστία, την ετερογένεια και την ατέλεια κάθε βιολογικής διαδικασίας μπορεί να ευθύνεται για την αναπόφευκτη συσσώρευση προϊόντων και άλλων μορφών βλάβης. Επομένως, απομένουν πολλά για να ερευνησουμε αυτόν τον τομέα. Το δέρμα υπόκειται επίσης σε μια εσωτερική διαδικασία γήρανσης παρόμοια με ολόκληρες τις οργανίνες. Οι εξωγενείς παράγοντες



επηρέασαν επίσης τη γήρανση του δέρματος. Η εξωγενής γήρανση του δέρματος (φωτογήρανση) μπορεί να συμβεί με υπερϊώδη ακτινοβολία που προκαλεί πρόωρη γήρανση του δέρματος. Ο σχηματισμός ROS μπορεί να αντικατοπτρίζει τις κεντρικές πτυχές της γήρανσης του δέρματος. Η αντίχνευση του Οι μηχανισμοί εξωγενών παραγόντων στη γήρανση του δέρματος είναι σημαντικοί για τον προγραμματιστή διάφορες θεραπευτικές και προληπτικές στρατηγικές. Το δέρμα έχει ένα πολύπλοκο αμυντικό σύστημα για την αντιμετώπιση επιβλαβών περιβαλλοντικών και χημικών ουσιών, αλλά η υπερβολική ή χρόνια έκθεση μπορεί να κατακλύσει το σύστημα οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και οξειδωτική βλάβη. Αυτές είναι ρίζες υπεροξειδίου ( $2O_2$ ), υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ρίζα υδροξυλίου (-OH). Κατά τη γήρανση του δέρματος η αποτελεσματικότητα του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος μειώνεται και ο σχηματισμός ROS προκαλεί κυρίως βλάβη στο DNA. Το οξειδωτικό στρες λόγω της διαδικασίας γήρανσης όχι μόνο προκαλεί βλάβη στο DNA, αλλά και ενδοκυτταρική υπεροξείδωση των λιπιδίων, μη φυσιολογικές αντιδράσεις οξείδωσης της πρωτεΐνης, όλα αυτά οδηγούν σε κυτταρική βλάβη, φλεγμονή, ανοσοκαταστολή, οξειδωτικό στρες, υπερπλαστικές αντιδράσεις στο δέρμα καθώς και διαταραγμένες ορμονικές ισορροπίες, και πρόωρη γήρανση του δέρματος. Οι βιολογικές συνέπειες της βλάβης που προκαλείται από το οξειδωτικό του στρες και κατά συνέπεια τη βλάβη στο DNA είναι η αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση και κατά συνέπεια η έκφραση της πρωτεΐνης μπορεί να τροποποιηθεί, ο αποκλεισμός της μεταγραφής RNA, ο αυξημένος κυτταρικός θάνατος, η μεταβολική ισορροπία οξειδοαναγωγής του μεταβολισμού και οι βλάβες μπορεί να συμβεί μεταγραφή μέσω πολυμεράσης RNA I και II. Ο μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τη βλάβη του DNA στη γήρανση του δέρματος λόγω του οξειδωτικού στρες είναι το δυνητικό αποτέλεσμα σε απόφραξη της σύνθεσης του DNA, καθώς οι αντιγραφικές πολυμεράσες του DNA δεν έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν κατεστραμμένα πρότυπα. Αυτό το σημαντικό μπλοκάρισμα μπορεί να οδηγήσει στην κατάρρευση της διχαλωτής διχάλας, στην παραγωγή διπλών κλώνων και, τελικά, στον κυτταρικό θάνατο. Αυτές οι βλάβες, αν δεν επιδιορθωθούν εγκαίρως, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές δομικές στρεβλώσεις στο μόριο του DNA, επηρεάζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η αντιγραφή και μεταγραφή του DNA, και θέτοντας σε κίνδυνο την κυτταρική βιωσιμότητα και τη λειτουργική ακεραιότητα. Η βλάβη του DNA μπορεί επίσης να αλλάξει τον κύκλο των πρωτεϊνών λόγω των αλλαγών στην αντιγραφή του DNA και τις μεταγραφές που σχετίζονται ήδη παραπάνω. Και για υγιές και νεανικό

δέρμα είναι απαραίτητη η βασική μεμβράνη (BM) να είναι άθικτη και λειτουργική για τη διατήρηση της φυσιολογικής πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ορισμένα καλλυντικά συστατικά προωθούν επίσης την επιδιόρθωση του BM αυξάνοντας τη σύνθεση των συστατικών του BM, όπως η λαμινίνη 332, και τα κολλαγόνα τύπου IV και VII, στην επιδερμίδα και/ή στο δέρμα. Ως εκ τούτου, η BM αντιπροσωπεύει έναν καλό στόχο για προϊόντα περιποίησης του δέρματος. συστατικά που ενισχύουν την επιδιόρθωση του BM μπορεί να βελτιώσουν την επιδερμική-δερματική επικοινωνία και την ομοιόσταση του δέρματος, ενισχύοντας έτσι την άμυνα κατά της «γήρανσης του δέρματος». Το οξειδωτικό στρες είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες της διαδικασίας γήρανσης των κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η β-κατενίνη μπορεί να ρυθμίζει το FoxO3a και αυτή η συσχέτιση ενισχύθηκε σε κύτταρα εκτεθειμένα σε οξειδωτικό στρες. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η β-κατενίνη μπορεί να ρυθμίσει ορισμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη γήρανση. Αποδείχθηκε ότι η β-κατενίνη μπορεί να προστατεύσει τους φυσιολογικούς ανθρώπινους πρωτογενείς ινοβλάστες του δέρματος από την πρόωρη γήρανση που προκαλείται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ανακουφίζοντας το οξειδωτικό στρες και ρυθμίζοντας ορισμένα μόρια που σχετίζονται με τη γήρανση. Η βλάβη του DNA λόγω υψηλών επιπέδων ROS μπορεί να αναπτύξει γονιδιωματική αστάθεια. Και μια προστατευτική απάντηση σε αυξημένα επίπεδα ROS είναι η πρόκληση της γήρανσης των κυττάρων. Το ROS μπορεί να προκαλέσει πρόωρη γήρανση των κυττάρων, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στη γήρανση του δέρματος και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Αναστολή ενεργοποίησης της σηματοδότησης που εξαρτάται από το Nrf2 που προκαλείται από οξειδωτικά, προάγει την πρόωρη γήρανση και αναστέλλει τον μετασχηματισμένο φαινότυπό τους. Έτσι, αναστέλλοντας τη σηματοδότηση με τη μεσολάβηση Nrf2, η caveolin-1 συνδέει τις ελεύθερες ρίζες με την ενεργοποίηση της οδού p53/γήρανσης.

### **3.3 Γήρανση δέρματος και τελομερή**

Τα διπλοειδή κύτταρα παρουσιάζουν περιορισμένη δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Μια εξήγηση για τα κύτταρα φτάνουν σε αυτό το όριο προκύπτει από τα τελομερή, τα οποία είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που υπάρχουν στο τέλος του γραμμικού DNA. Τα τελομερή συντομεύονται λίγο κάθε φορά που το κύτταρο διαιρείται (περίπου 50 - 200bp ανά κυτταρική διαίρεση). Η συντόμευση του τελομερούς DNA αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση. Οι συνθήκες της πρόωρης γήρανσης των ιστών από μια δεδομένη χρονολογική ηλικία περιέχουν πολύ πιο κοντά

στο όριο προγραμματισμένης κυτταρικής διαίρεσης σε σύγκριση με εκείνα τα κανονικά κύτταρα ηλικιωμένων ατόμων. Βλαστικά κύτταρα, βλαστικά κύτταρα ή άλλα κανονικά διπλοειδή κύτταρα περιέχουν ένα ένζυμο που ονομάζεται τελομεράση και αντικαθιστά το χαμένο τελομερικό DNA κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων. Έχει εξεταστεί η δυνατότητα αντιστροφής της κυτταρικής γήρανσης κατά την ανταλλαγή ενός αντιγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης σε κανονικά κύτταρα, για την αποκατάσταση της δραστηριότητας της τελομεράσης. Αυτή η στρατηγική μπορεί επίσης να αυξήσει τον κίνδυνο να απαθανατιστούν τα κύτταρα. Η θεωρία της κυτταρικής γήρανσης της γήρανσης έχει περιορισμούς επειδή όργανα όπως ο εγκέφαλος, τα οποία αποτελούνται κυρίως από κύτταρα που δεν υφίστανται διαιρέσεις, αλλά και την ηλικία. Το δέρμα είναι ένας αυτο-ανανεώσιμος ιστός που απαιτείται να περάσει από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. Η συντόμευση των τελομερών λειτουργεί ως μιτωτικό ρολόι που αποτρέπει τον εκτροπικό πολλαπλασιασμό, όπως ο καρκίνος. Συνέπεια αυτής της προστασίας είναι η γήρανση και η γήρανση των κυττάρων. Το ένζυμο σύμπλεγμα τελομεράσης διατηρεί το μήκος των τελομερών στα κύτταρα της γεννητικής γραμμής και στα καρκινικά κύτταρα. Η τελομεράση είναι επίσης ενεργή σε ορισμένα σωματικά κύτταρα όπως αυτά στην επιδερμίδα αλλά είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στο δέρμα. Τα αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η τελομεράση παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργίας και του πολλαπλασιασμού του δέρματος. Η κυτταρική γήρανση είναι η μη αναστρέψιμη αναστολή ανάπτυξης μεμονωμένων μιτωτικών κυττάρων, τα οποία ως συνέπεια εμφανίζουν έναν ριζικά τροποποιημένο φαινότυπο που πιστεύεται ότι επηρεάζει τη λειτουργία των ιστών και προδιαθέτει τους ιστούς για ανάπτυξη ή/και εξέλιξη της νόσου καθώς σταδιακά συσσωρεύονται. Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η κυτταρική γήρανση συμβάλλει πράγματι στη γήρανση του δέρματος και στην ανάπτυξη/εξέλιξη της νόσου. Ο κυρίαρχος μηχανισμός γήρανσης των μιτωτικών ιστών πιστεύεται ότι οφείλεται στη σταδιακή συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων. Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη διακοπή κυτταρικού κύκλου και εμφανίζουν έναν ριζικά τροποποιημένο φαινότυπο: γενετικά, μορφολογικά και συμπεριφορικά διακριτά από τα αντίστοιχα που είναι ικανά για ανάπτυξη. Αυτές οι αλλαγές πιστεύεται ότι έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στα γειτονικά κύτταρα, τη γύρω εξωκυτταρική μήτρα και άλλα δομικά συστατικά, οδηγώντας σε γηρασμένους ιστούς, ασθένειες και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Οι ανώτεροι οργανισμοί περιέχουν δύο τύπους κυττάρων:

μεταμιτωτικά κύτταρα, τα οποία δεν διαιρούνται ποτέ, και μιτωτικά (ή μιτωτικά ικανά) κύτταρα, τα οποία μπορούν να διαιρεθούν. Τα μεταμιτωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν ώριμα νευρικά, μυϊκά και λιπώδη κύτταρα, μερικά από τα οποία επιμένουν για μια ζωή. Τα μιτωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα οργάνων όπως το δέρμα. Επειδή τα μεταμιτωτικά και μιτωτικά κύτταρα διαφέρουν ως προς την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, μπορεί να γερνούν με διαφορετικούς μηχανισμούς. Τα φυσιολογικά σωματικά μιτωτικά ικανά κύτταρα δεν διαιρούνται επ'αόριστων. Η διαδικασία που περιορίζει τον αριθμό της κυτταρικής διαίρεσης ονομάζεται κυτταρική ή αντιγραφική γήρανση. Η αναπαραγωγική γήρανση θεωρείται ένας ισχυρός, αν και ατελής, μηχανισμός καταστολής όγκων. Θεωρείται επίσης ότι συμβάλλει στην οργανική γήρανση. Τα γηρασμένα κύτταρα υφίστανται τρεις φαινοτυπικές αλλαγές: αναστέλλουν ανεπανόρθωτα την ανάπτυξη, αποκτούν αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο και αποκτούν μεταβαλλόμενες διαφοροποιημένες λειτουργίες. Η αναστολή ανάπτυξης είναι πολύ πιθανό κρίσιμη για το ρόλο της αντιγραφικής γήρανσης στην καταστολή του όγκου, αλλά μπορεί να είναι λιγότερο σημαντική για τη γήρανση οργάνων όπως το δέρμα. Από την άλλη πλευρά, η τροποποιημένη διαφοροποίηση μπορεί να είναι κρίσιμη για τον κίνδυνο της λειτουργίας και της ακεραιότητας οργάνων όπως το δέρμα κατά τη γήρανση. Τα γηρασμένα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες φαίνεται να συσσωρεύονται με την ηλικία στο ανθρώπινο δέρμα. Επιπλέον, τα γηρασμένα κύτταρα εκφράζουν γονίδια που έχουν μακράς εμβέλειας, πλειοτροπικά αποτελέσματα-αποικοδομητικά ένζυμα, αυξητικούς παράγοντες και φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Το δέρμα έχει συνεχή ανανέωση καθ'όλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου. Ωστόσο, υπάρχει μια μείωση του αναγεννητικού δυναμικού των ιστών με την ηλικία. Η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων με την πάροδο του χρόνου πιθανώς μειώνει την ικανότητα αναγέννησης των ιστών και συμβάλλει στη φυσιολογική γήρανση του ίδιου του ιστού. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη γήρανση παραμένουν ασαφείς και βρίσκονται υπό έντονη διερεύνηση, και η κατανόηση θα μπορούσε να αποκτηθεί με τη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση. *In vitro*, τα κερατινοκύτταρα και οι δερματικοί ινοβλάστες υφίστανται γήρανση σε απόκριση πολλαπλών κυτταρικών καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένης της υπερπαραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και συντόμευσης των τελομερών, ή απλά φθάνοντας στο τέλος του αναπαραγωγικού δυναμικού τους (δηλαδή φθάνοντας σε αντιγραφική γήρανση). Πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν ότι το microRN παίζουν βασικούς ρόλους στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ της πολλαπλασιαστικής ικανότητας ενός

κυττάρου και της αντιγραφικής γήρανσης. Τα τελομερή είναι σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης που καλύπτουν χρωμοσωμικά άκρα, προάγοντας τη χρωμοσωμική σταθερότητα. Η τελομεράση είναι ένα σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών με άμεση προστατευτική λειτουργία τελομερών. Η μείωση των τελομερών αντιπροσωπεύει την έκθεση σε οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της ζωής και συσχετίζεται αρνητικά με την ηλικία, το κάπνισμα και τη θνησιμότητα. Το κάπνισμα αυξάνει την οξειδωτική τροποποίηση του DNA και έτσι μπορεί να επηρεάσει τη δυναμική των τελομερών και τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT). Το μήκος των τελομερών είναι ένας μοριακός δείκτης της γήρανσης των κυττάρων και η γονιδιωματική αστάθεια λόγω της μείωσης των τελομερών έχει συνδεθεί με διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Προτάθηκε ότι το μήκος των τελομερών στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες μπορεί να συντομευθεί με μία μόνο υψηλή δόση ακτινοβολίας UVA και ότι η οξεία φωτοκαταστολή μπορεί να συμβάλει στην πρόωμη φωτογήρανση στο ανθρώπινο δέρμα μέσω ταχείας συντόμευσης των τελομερών. Πώς συζητήθηκε σε προηγούμενες συνεδρίες, η αύξηση του ROS και τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια σχετίζονται στενά με τα κύτταρα γήρανσης. Και η γήρανση των οργανισμών χαρακτηρίζεται από μια σταδιακή λειτουργική παρακμή όλων των συστημάτων οργάνων. Τα σωματικά κύτταρα θηλαστικών σε καλλιέργεια εμφανίζουν περιορισμένη διάρκεια ζωής πολλαπλασιασμού, στο τέλος του οποίου υφίστανται μη αναστρέψιμη διακοπή κυτταρικού κύκλου γνωστή ως αντιγραφική γήρανση. Το αν η κυτταρική γήρανση συμβάλλει στη γήρανση του οργανισμού ήταν αμφιλεγόμενο. Οι Herbig et al. (2006) διερεύνησαν τη δυσλειτουργία των τελομερών, έναν πρόσφατα ανακαλυφθέντα βιοδείκτη κυτταρικής γήρανσης, και διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των γηρασμένων ινοβλαστών αυξάνεται εκθετικά στο δέρμα των γηρασμένων μπαμπούνων, φτάνοντας > 15% όλων των κυττάρων σε πολύ ηλικιωμένα άτομα. Επιπλέον, τα ίδια κύτταρα περιέχουν ενεργοποιημένη μεταξωτή κίνηση αταξίας-τελαγγειεκτασίας και ετεροχρωματισμένους πυρήνες, επιβεβαιώνοντας την γήρανση τους. Επιπλέον, η κυτταρική γήρανση μπορεί επίσης να προκληθεί από μια σειρά περιβαλλοντικών καταπονήσεων και σηματοδοτικών ανισορροπιών που είναι ανεξάρτητες από τη μείωση των τελομερών. Οι εξαρτώμενοι από κυκλίνη αναστολείς κίνησης p21 και p16 (INK4a) έχουν αποδειχθεί ότι εκτελούν και διατηρούν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε γήρανση, αλλά η φύση των σημάτων που προκαλούν υπερρύθμιση αυτών των αναστολέων στα γηρασμένα κύτταρα μόλις τώρα αρχίζει να ανακαλύπτεται και προτείνεται μοντέλο που δείχνει ανεξάρτητα σήματα ενεργοποιούν

ξεχωριστές διαδρομές σηματοδότησης για τη ρύθμιση των επιπέδων p21 και p16 (INK4a) στα γηρασμένα κύτταρα. Κοινά χαρακτηριστικά του γηρασμένου φαινοτύπου, που μπορεί να είναι επιζήμια για τους ιστούς στους οποίους κατοικούν, είναι η ρύθμιση των αυξητικών παραγόντων, οι πρωτεΐνες που αποικοδομούν την εξωκυτταρική μήτρα (ECM) και οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Το γιατί τα γηρασμένα κύτταρα υιοθετούν αυτόν τον φαινότυπο είναι προς το παρόν άγνωστο. Μια πιθανότητα είναι ότι το γηρασμένο κύτταρο εκκρίνει κυτοκίνες για να προσελκύσει τα ανοσοκύτταρα στη θέση του (για την απομάκρυνσή του), εκκρίνει πρωτεΐνες που αποικοδομούν μήτρα για να επιτρέψουν στα ανοσοκύτταρα να έχουν πρόσβαση και να εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες για να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των γύρω κυττάρων μόλις αφαιρεθεί το κύτταρο. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι αποτελεσματική σε νέους οργανισμούς, αλλά μπορεί σταδιακά να μειωθεί με την ηλικία. Δεδομένου ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ρυθμίζονται επίσης από τη διαδικασία γήρανσης, η αφαίρεση των γηρασμένων κυττάρων μπορεί σταδιακά να εξασθενήσει. Αυτό θα οδηγούσε στη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων στους ιστούς, προκαλώντας επιβλαβείς αλλαγές στη δομή και κατά συνέπεια στη λειτουργία αυτών των ιστών.

## **Κεφάλαιο 4 – Οξειδωτικό στρες στην καθημερινότητα**

Έχοντας αναλύσει τη βιοχημεία της γήρανσης λόγω του οξειδωτικού στρες, είναι σημαντικό να δούμε πως αυτό γίνεται μέρος της ζωής των ανθρώπων σε καθημερινή βάση. Αν και βλάβες λόγω οξείδωσης μπορούν να προκληθούν από μόνες τους κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού στα κύτταρα, περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εξωτερικοί παράγοντες που αυξάνουν τέτοιου είδους βλάβες και ενδεχομένως επιταχύνουν τη διαδικασία της γήρανσης του δέρματος. Παράγοντες όπως το κάπνισμα, η ρύπανση της ατμόσφαιρας, φυτοφάρμακα σε τροφές είναι μέρη της καθημερινότητας μας. Επίσης, κύριος παράγοντας στην αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στον οργανισμό είναι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Άλλωστε οι επιπτώσεις της φωτογήρανσης ήταν ανέκαθεν γνωστές στην επιστήμη της αισθητικής. Στο κεφάλαιο αυτό, θα αναλυθούν εκτενέστερα οι κύριοι παράγοντες οξειδωτικού στρες που έχουν να κάνουν με συνήθειες και συνθήκες της καθημερινότητας μας.

### **4.1 Κάπνισμα και μολυσμένη ατμόσφαιρα**

Οι πνεύμονες είναι συνεχώς εκτεθειμένοι σε οξειδωτικούς παράγοντες που είτε ενδογενώς από τα φαγοκύτταρα, είτε εξωγενώς από τον καπνό των τσιγάρων και τους ατμοσφαιρικούς ρύπους προκαλούν σημαντικές βλάβες στα κύτταρα, αναμεσά τους και η γήρανση. Κάθε εισπνοή καπνού τσιγάρου ή αέρα μολυσμένης ατμόσφαιρας περιέχουν εκατομμύρια οξειδωτικά μόρια. Τα μόρια αυτά προκαλούν βλάβες στους πνεύμονες που παραμένουν και διαδίδονται σε κύτταρα διαφορετικών οργάνων μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μέσω των μηχανισμών που αναλύθηκαν στα κεφάλαια που προηγήθηκαν. Εκτός αυτού, αποδυναμώνεται η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, κάνοντας τον πιο ευάλωτο σε βλάβες από δραστικές μορφές οξυγόνου. In Vitro έρευνες έχουν δείξει πως εκχυλίσματα καπνού μειώνουν τη παραγωγή κολλαγόνου και αυξάνουν ραγδαία τις μεταλλοπρωτεϊνάσες λόγω της εισαγωγής εκατομμυρίων μορίων δραστικών μορφών οξυγόνου. Η καταστροφικές επιπτώσεις των μεταλλοπρωτεϊνάσων στην εξωκυττάρια μήτρα και στα μέσα που κάνουν τα κύτταρα του δέρματος ελαστικά έχει είναι πλέον γνωστή, και η συνεχής έκθεση σε τέτοιου είδους παράγοντες είτε λόγω χρόνιου καπνίσματος είτε λόγω ζωής σε αστικές περιοχές με υψηλούς ατμοσφαιρικούς ρύπους έχει εμφανιστεί αποτελέσματα στην υγεία του δέρματος. Τέλος, έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση του καπνίσματος

στη φυσική αντιοξειδωτική ικανότητα του σάλιου και του αίματος. Οι έρευνες έδειξαν πως το σάλιο και το αίμα είχε αρκετή μειωμένη άμυνα απέναντι σε δραστικές μορφές οξυγόνου μέσω της φυσικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του.

#### **4.2 Διατροφή**

Το οξειδωτικό στρες που παράγεται από την ανισόρροπη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου σε σχέση με την ικανότητα του οργανισμού να τις καταπολεμά μέσω αντιοξειδωτικών σχετίζεται άμεσα με τη διατροφή. Μια επαρκής διαίτα με καθημερινή λήψη τροφών που σχετίζονται με τη συνολική βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθρώπων μπορεί να κατευνάσει το βαθμό του οξειδωτικού στρες. Μικροθρεπτικά συστατικά σε διάφορες τροφές είναι άμεσα αντιοξειδωτικά ή αποτελούν μέρη αντιοξειδωτικών ενζύμων. Τροφές που χρόνια σχετίζονταν με καλύτερη υγεία και λειτουργικότητα του σώματος, είχαν και άμεση επίδραση στην εμφάνισή και υγεία του δέρματος. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα τρόφιμα αυτά είναι πλούσιες πηγές αντιοξειδωτικών, γεγονός που τις κάνει ικανές να περιορίζουν τις βλάβες που προκαλούνται από δραστικές πηγές οξυγόνου. Αντιθέτως, μια κακή διαίτα συμβάλλει σε αυξημένες ποσότητες δραστικών μορφών οξυγόνου στον οργανισμό, και συνεπώς γρηγορότερη γήρανση του δέρματος. Επεξεργασμένα τρόφιμα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οδηγούν σε αύξηση των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Επίσης, η υπερβολική κατανάλωση τροφίμων και η αυξημένη θερμιδική εισαγωγή θερμίδων είναι καταλυτικός παράγοντας στο οξειδωτικό στρες. Μη κανονικές αυξήσεις στη γλυκόζη του αίματος, στα τριγλυκερίδια και στα ελεύθερα λιπαρά οξέα αυξάνουν τη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια. Τέλος, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ λόγω του μεταβολισμού της αλκοόλης αυξάνει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. Πολλά αντιοξειδωτικά και οι τροφές που τα προσφέρουν δίνονται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί παρακάτω.



**Πίνακας 2:** Αντιοξειδωτικά και τρόφιμα από τα οποία είναι δυνατή η πρόσληψή τους.

Αντιοξειδωτικά	Τρόφιμα που τα προσφέρουν
Ενώσεις Θειούχου Αλλίου	Πράσο, Κρεμμύδι, Σκόρδο
Ανθοκυάνες Μελιτζάνα, Σταφύλι, Μούρα	Μελιτζάνα, Σταφύλι, Μούρα
Βήτα καροτίνη	Κολοκύθα, Μάνγκο, Βερίκοκο, Καρότο, Σπανάκι, Μαϊντανός
Κατεχίνες	Κόκκινο Κρασί, Τσάι
Χαλκός	Θαλασσινά, Λευκά Κρέατα, Γάλα, Ξηροί καρποί
Κρυπτοξανθίνες	Κόκκινο πιπέρι, Κολοκύθα, Μάνγκο
Φλαβονοειδή	Τσάι, Πράσινο Τσάι, Εσπεριδοειδή, Κόκκινο Κρασί, Κρεμμύδι, Μήλο
Ινδόλες	Μπρόκολο, Λάχανο, Κουνουπίδι
Ισοφλαβονοειδή	Φασόλια Σόγιας, Φακές, Αρακάς, Γάλα
Λιγνάες	Σπόροι Σουσαμιού, Πίτουρο, Προϊόντα Ολικής Άλεσης, λαχανικά
Λουτεΐνη	Σπανάκι, Καλαμπόκι, Μαρούλι
Λυκοπένιο	Ντομάτες, Ροζ Γκρέιπφρουτ, Καρπούζι
Μαγγάνιο	Μαγγάνιο Θαλασσινά, Λευκά Κρέατα, Γάλα, Ξηροί καρποί
Πολυφαινόλες	Θυμάρι, Ρίγανη

### 4.3 Φωτογήρανση

Ένα από τα κύρια αποτελέσματα της υπεριώδους ακτινοβολίας στα μόρια του δέρματος [π.χ. ουροκανικό οξύ, νικοτιναμίδιο-αδενίνη διουκλεοτίδιο (NADH) ή μελανίνη] είναι η ευαισθητοποίηση στο σχηματισμό ROS από απορροφημένη ενέργεια. Τα ROS (π.χ. μονό οξυγόνο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, υπεροξειδίο) είναι σε θέση να αντιδράσουν και να βλάψουν τα περισσότερα μόρια στις οδούς τους, όπως λιπιδικές μεμβράνες κυττάρων, πρωτεϊνών ή DNA. Επιπλέον, τα ROS διεγείρουν τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, ειδικά εκείνους για τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), τον αυξητικό παράγοντα κερατινοκυττάρων (KGF), την ιντερλευκίνη (IL) -1 και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) -α. Επιπλέον, το ROS προκαλεί βλάβη στα λιπίδια της μεμβράνης, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση βλαβερών ουσιών και στη συνέχεια στην ενεργοποίηση του AP-1.34 Η ακτινοβολία UVA προκαλεί την απελευθέρωση προσταγλανδίνης-F2α (PGF2α) και 12-HETE από το αραχιδονικό οξύ (AA) προκαλώντας φλεγμονώδη απόκριση στο δέρμα και αυξάνοντας τη ρύθμιση των ενζύμων κυκλοοξυγενάσης και λιποξυγενάσης. Ο σχηματισμός αυτών των μεταβολιτών έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με ανοσολογικές αντιδράσεις, φλεγμονώδεις διαταραχές, χρωματισμό του δέρματος και επούλωση των πληγών. Μια *in vitro* μελέτη για επιδερμικά κύτταρα που πραγματοποιήθηκε από τους Leung et al. (2017) έχει δείξει ότι τα κερατινοκύτταρα μπορεί να έχουν αμυντικούς μηχανισμούς στην έκθεση σε

UVA, για παράδειγμα αυξημένα επίπεδα δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA), τα οποία αποδεικνύονται χρήσιμα στην αναγέννηση μετά από πιθανές βλάβες. Οι επιδράσεις της ακτινοβολίας UVB στη δημιουργία και απελευθέρωση ROS σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα έχουν μελετηθεί από τους Beak et al. (2004). Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της ενδογενούς κυτταρικής παραγωγής και απελευθέρωσης νικοτιναμιδίου-αδενίνης δινουκλεοτιδικής φωσφορικής (NADPH) οξειδάσης και κυκλοοξυγενάσης (COX), που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή ROS που προκαλείται από την UVB και την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα B (NF-κB) σε κερατινοκύτταρα σε δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Οι Cavinato et al. (2017) έχουν μελετήσει το ρόλο των συστημάτων ελέγχου ποιότητας πρωτεΐνης και τη λειτουργική αλληλεπίδρασή τους στη διαμεσολάβηση της κυτταρικής γήρανσης των ινοβλαστών που υποβάλλονται σε θεραπεία με UVB in vitro. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα πρώτα γεγονότα στη διαδικασία γήρανσης των ινοβλαστών μετά την έκθεση σε UVB περιλαμβάνουν αυξημένη παραγωγή ROS και αναστολή του πρωτεασώματος, ακολουθούμενη από έναρξη αυτοφαγίας. Τα ληφθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αυξημένη παραγωγή ROS και η αυτοφαγία και η μειωμένη δραστηριότητα πρωτεασώματος συμβάλλουν στη γήρανση των ινοβλαστών που υποβάλλονται σε θεραπεία με UVB. Η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου της γήρανσης των ινοβλαστών που προκαλούνται από UVB και απαιτείται καταστολή της αυτοφαγίας για να τροποποιηθεί η πορεία των κυττάρων από τη γήρανση στον θάνατο της απόπτωσης. η παραγωγή απλού οξυγόνου, οξείδωση πρωτεϊνών και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων γνωστών από τη ρύθμιση της έκφρασης MMP-1.

## **Κεφάλαιο 5 - Συμπεράσματα**

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη γήρανση και κατά συνέπεια την καταστροφή των κυττάρων του δέρματος. Πολλές είναι οι περιβαλλοντικές αιτίες που μπορούν να εντείνουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών στο ανθρώπινο σώμα. Κάποιες από αυτές είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, το κάπνισμα η ατμοσφαιρική ρύπανση, η διατροφή αλλά και μεταβολικές διαταραχές. Η λειτουργία των μιτοχονδρίων, ως κυτταρικά σωματίδια, μπορεί να επιδράσει καταλυτικά στη γήρανση των κυττάρων του δέρματος (θεωρία MFRTA). Τα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων θεωρούνται υπεύθυνα για τη γήρανση των κυττάρων. Η λειτουργία των ελευθέρων ριζών μπορεί να ανασταλεί με την πρόσληψη, μέσω της τροφής, αντιοξειδωτικών ουσιών. Η θεωρία αυτή ήταν η επικρατέστερη για αρκετά χρόνια, αλλά την τελευταία δεκαετία η γήρανση αρχίζει να αποδίδεται και σε άλλους παράγοντες (π.χ. τελομερή).

## Κεφάλαιο 6 – Βιβλιογραφία

- Andrew, P. J., & Mayer, B. (1999). *Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovascular research*, 43(3), 521-531.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. American Journal of Physiology-cell physiology*, 271(5), C1424-C1437.
- Bielski, B. H., & Cabelli, D. E. (1995). *Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. Active oxygen in chemistry*, 66-104.
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*.
- Fuchs, J. (1992). *Elektronen paramagnetische Resonanz-Spektroskopie und Tomographie in der experimentellen Dermatologie; Habilitationsschrift für das Fach Dermatologie und Venerologie; Fachbereich Humanmedizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/M.*
- Genestra, M. (2007). *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(9), 3007-3017.
- Harman, D. (1956). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol.*;2:298–300.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). *The serial cultivation of human diploid cell strains*.
- Hojo, Y., Okado, A., Kawazoe, S., & Mizutani, T. (2000). *In vivo singlet-oxygen generation in blood of chromium (VI)-treated mice: an electron spin resonance spin-trapping study. Biological trace element research*, 76(1), 85-93.
- Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W., Yamamoto, Y., Chien, K., & Inoue, M. (1999). *Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. Free Radic Biol Med*;27:294– 300.
- Marnett, L. J. (2000). *Oxyl radicals and DNA damage. carcinogenesis*, 21(3), 361-370.

- Miquel, J., Economos, A., Fleming, J., & Johnson, JE., J. (1980). *Mitochondrial role in cell aging. Exp Gerontol.*;15:575–591.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Prütz, W. A. (1996). *Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. Archives of biochemistry and biophysics*, 332(1), 110-120.
- Shroot, B., & Brown, C. (1986). *Free radicals in skin exposed to dithranol and its derivatives. Drug Res*; 36:1253–1255.
- Thiele, J., & Elsner, P. (2001). *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology (Vol. 29). Karger Medical and Scientific Publishers.*