



## **Πτυχιακή Εργασία**

**Μελέτες σταθερότητας των βλαβών του DNA 5',8-  
κυκλο-2'-δεοξυπουρινών υπό συνθήκες οξειδωτικού  
στρες.**

Παρδάλη Ελένη

ΑΜ: 4546

Επιβλέπων καθηγητής: Τερζίδης Α. Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής

Αλεξάνδρεια Πανεπιστημιούπολη – Σίνδος

Μάρτιος, 2021



## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μιχάλη Τερζίδη, χωρίς τη βοήθεια του οποίου, δεν θα είχα καταφέρει να εκπονήσω την συγκεκριμένη Πτυχιακή Εργασία. Ευχαριστώ για την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, να γνωρίσω εργαστηριακές τεχνικές, καθώς και για τις εξαιρετικά ωφέλιμες κριτικές παρατηρήσεις του στην επεξεργασία του θέματος αυτού. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και την βοήθεια στην ανάδειξη αυτού του έργου.

Επίσης, ευχαριστώ την Μεταδιδάκτορα Νατάσα Καλογιούρη, η οποία μου προσέφερε απλόχερα οποιαδήποτε βοήθεια της ζητήθηκε. Ακόμη, ευχαριστώ τη Διδάκτορα Μαρία Σουινιάκη για τις παρατηρήσεις της στα τελικά στάδια αυτής της εργασίας. Τις ευλικρινείς μου ευχαριστίες εκφράζω και στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου, στη μητέρα μου Μαρία, στον πατέρα μου Χρήστο και στον αδερφό μου Δημήτρη για όλη την αγάπη και την διαρκή παρουσία τους στο πλάι μου όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ για την ηθική και υλική στήριξη, την υπομονή και την εμπιστοσύνη στις επιλογές μου. Ελπίζω να καταφέρνω να τους ανταμείβω για όσα έχουν επενδύσει σε εμένα.

*Παρδάλη Ελένη*



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι DNA 5',8-κυκλο-2'-δεοξυπουρίνες (cPu) είναι βλάβες διαδοχικού τύπου που παρατηρήθηκαν μεταξύ των τροποποιήσεων της πουρίνης και του σακχάρου και ταυτοποιήθηκαν σε πειράματα *in vitro* αλλά και σε κυτταρικό DNA θηλαστικών σε πειράματα *in vivo*. Αυτές οι βλάβες αφορούν στις βάσεις 2'-δεοξυ-αδενοσίνης και 2-δεοξυ-γουανοσίνης και βρίσκονται σε δύο διαστερομερείς μορφές, την 5'R και την 5'S. Παράγονται αποκλειστικά από την προσβολή της ρίζας υδροξυλίου στις μονάδες 2'-δεοξυριβόζης, δημιουργώντας την ρίζα στον C5', η οποία προσβάλλει τον άνθρακα C8' της βάσης πουρίνης, προκαλώντας κυκλοποίηση. Σε αυτήν την εργασία παρουσιάζονται μελέτες που αφορούν στη δημιουργία των κυκλοπουρινών, στους πιθανούς μηχανισμούς επιδιόρθωσής τους, σε μελέτες σταθερότητάς τους και στον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των βλαβών τόσο σε βιομιμητικά μοντέλα, όσο και σε διάφορους τύπους κυττάρων. Επιπλέον, παρουσιάζεται ο αντίκτυπός τους στη μεταγραφή και στη γενετική αστάθεια και κατ' επέκταση, ο τρόπος με τον οποίο αυτές επιδρούν στο σώμα μας και οδηγούν σε ασθένειες όπως, ο καρκίνος και η γήρανση. Ακόμη, συζητείται η πιθανή προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών ενώσεων, έναντι αυτών των βλαβών. Αυτή η έρευνα, θα δώσει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες, γεγονός που μπορεί να παρέχει τη δυνατότητα προστατευτικών μέσων στον οργανισμό μας. Η προστασία αυτή μπορεί να μειώσει την παραγωγή ριζών στον οργανισμό μας, με απώτερο στόχο την αντιμετώπιση ασθενειών από τις οποίες ταλαιπωρείται ο άνθρωπος και οι οποίες οφείλονται, μεταξύ άλλων, και στις κυκλοπουρίνες.

**Λέξεις - κλειδιά:** Κυκλοπουρίνες, Δραστικά Είδη Οξυγόνου, Βλάβες του DNA, Ρίζα Υδροξυλίου, Υπεριώδης Ακτινοβολία



# Studies on the stability of the 5',8-cyclo-2'-deoxypurine DNA lesions under oxidative stress conditions.

## ABSTRACT

5',8-Cyclo-2'-deoxypurines (cPu) are tandem-type lesions observed among DNA purine modifications and they are identified in *in vitro* experiments and in mammalian cellular DNA *in vivo*. These lesions are produced by the 2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyguanosine and they are found in two diastereomeric forms, the 5'R form and the 5'S. They are generated exclusively by hydroxyl radical attack to 2'-deoxyribose units generating the C5' radical, followed by cyclization with the C8 position of the purine base. This thesis presents indicative sample of the studies on cyclopurines, the possible pathways for their repair, stability studies and the quantitative determination of their levels of lesions in various types of cells. Moreover, the impact of cyclopurines lesions on transcription and genetic instability and, consequently, the way which they affect our body and lead to diseases like cancer and aging is presented. Furthermore, the effect of some antioxidants, which can act preventively against these damages, has been investigated and discussed. The latter findings may support further studies the on antioxidants protective role against damaging species leading to illnesses and diseases in the development of which cyclopurines play crucial role.

**Keywords:** Cyclopurines, Reactive Oxygen Species, DNA damage, Hydroxyl radical, UV radiation





## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Εισαγωγή στις Ελεύθερες Ρίζες και τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ROS).....	7
1.2. Ιστορική Αναδρομή στις «5',8-Κυκλοπουρίνες».....	9
1.3 Βιβλιοθήκες των cPus.....	11
1.3.1 Σύνθεση των cdG και cdA.....	11
1.3.2 <sup>15</sup> N ισοτοπικά επισημασμένα παράγωγα των cPus.....	13
1.3.3 Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν cPus σε ειδικές τοποθεσίες.....	13
1.3.4 Σταθερότητα των cPus σε όξινο περιβάλλον.....	15
1.3.4. Ποσοτικοποίηση των cPus σε δείγματα DNA.....	16
2. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης Βλαβών.....	19
2.1 Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης BER and NER.....	19
2.1.1 Μηχανισμός επιδιόρθωσης BER.....	19
2.1.2 Μηχανισμός Επιδιόρθωσης NER.....	20
2.1.3 Διαστερομερική αναγνώριση βλαβών cdA από ανθρώπινη πολυμεράση Poly (ADP-ριβόζη) 1.....	25
2.2 Παράκαμψη των βλαβών cPu από πολυμεράσες του DNA και RNA.....	26
2.2.1 RNA πολυμεράση II.....	26
2.2.2 DNA πολυμεράσες.....	26
2.3 Επίδραση των βλαβών cPus στη διαδικασία επιδιόρθωσης BER.....	31
3. Εφαρμογές στον Τομέα της Υγείας.....	32
3.1 Βιολογικές Μελέτες με Εφαρμογή στον Τομέα της Υγείας.....	32
3.1.1 Νευρολογικές Παθήσεις.....	32
3.1.2 Καρκίνος και Γήρανση.....	36
3.1.2.1 Κυκλοπουρίνες cPu.....	36
3.1.2.2 Γονίδιο p53 και 8-oxo-dG.....	38
3.1.3 Αθηροσκλήρωση.....	38
3.1.4 Καταστάσεις Χρόνιας Φλεγμονής.....	39
3.1.5 Νόσος Wilson.....	40
3.1.6 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 και Προ-διαβήτης.....	40
3.2 Ακτινοβολία βαρέων ιόντων στο διάστημα.....	41
4. Μελλοντικές Εφαρμογές.....	43
4.1 Βλάβες στο DNA από την υπεριώδη ακτινοβολία UV.....	43
4.2 Αντιοξειδωτικές Ουσίες και η Επίδρασή τους στον Οργανισμό.....	44

4.2.1 Σουλφοραφάνη .....	44
4.2.2 Ρεσβερατρόλη .....	48
4.2.3 Ραπαμυκίνη .....	50
4.2.4 Μετφορμίνη.....	51
4.2.5 Πολυφαινόλες .....	52
4.2.5.1 Φλαβονοεδή.....	52
4.2.5.2 Φισετίνη.....	53
4.2.5.3 Εκχυλίσματα φύλλων σταφυλιού και φύλλων μέντας .....	54
4.2.5.4 Ανθοκυανίνες και Κατεχίνες.....	54
4.2.6 Κινναμαλδεΰδη.....	55
4.2.7 Κουρκουμίνη και Τζίνσενγκ .....	55
4.3 Αντιοξειδωτική Δράση των Βιταμινών .....	56
4.3.1 Βιταμίνη E .....	56
4.3.2 Βιταμίνη C .....	56
4.3.3 Βιταμίνη A και καροτενοειδή .....	57
4.3.4 Βιταμίνη D.....	59
5. Συμπεράσματα .....	60
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>63</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> Κυκλοπουρίνες cPu .....	9
<b>Εικόνα 2.</b> Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης BER και NER .....	25
<b>Εικόνα 3.</b> Δράση της DNA πολυμεράσης β .....	30
<b>Εικόνα 4.</b> Επιδράσεις των αλλοιώσεων του DNA που εμποδίζουν τη μεταγραφή σε νευρολογικές δυσλειτουργίες .....	36
<b>Εικόνα 5.</b> Διάγραμμα που δείχνει αλλαγές στις κυκλοπουρίνες στο μοντέλο ποντικών SCID ανάλογα με την ηλικία τους και το όργανο μελέτης .....	37
<b>Εικόνα 6.</b> Επίδραση της φλεγμονής σε ιστό εντερικών κυττάρων και σε λιπώδη ιστό.....	39
<b>Εικόνα 7.</b> Επιδράσεις της σουλφοραφάνης στις οδούς Nrf2 και NF-κΒ .....	47
<b>Εικόνα 8.</b> Επιγενετικοί μηχανισμοί και οξειδωτικό στρες (OS) που σχετίζονται με τη γήρανση.....	49
<b>Εικόνα 9.</b> Προτεινόμενη Αντιοξειδωτική Δράση.....	59



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑ

**ROS** Reactive Oxygen Species, Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου

**RNS** Reactive Nitrogen Species, , Δραστικές Ρίζες Αζώτου

**HO<sup>•</sup>** Ρίζα Υδροξυλίου

**BER** Base Excision Repair, Επισκευή της Εκτομής Βάσης

**NER** Nucleotide Excision Repair, Επισκευή Εκτομής Νουκλεοτιδίων

**GG-NER** Global Genome- Nucleotide Excision Repair

**TC-NER** NER-Transcription-Coupled (NER-συζευγμένο με μεταγραφή)

**SOD** Υπεροξειδική δισμουτάση

**cPu** Κυκλοπυρίνες

**cdA** 5',8-κυκλο-2'-δεοξυαδενοσίνη

**cdG** 5'-8-κυκλο-2'-δεοξυγουανίνη

**8-oxo-dA** 8-οξο-2'-δεοξυαδενοσίνη

**8-oxo-dG** 8-οξο-2'-δεοξυγουανίνη

**8-oxo-Pu** 8-οξο-2'-δεοξυ-πυρίνη

**8-OH-G** 8-υδροξυ-γουανίνη

**PARP1** Ανθρώπινη Πολυμεράση 1

**TFIIH** Transcription Initiation Factor IIH

**CS** Σύνδρομο Cockayne

**XP** Xeroderma Pigmentosum

**UDG** Γλυκοζυλάση της DNA-Ουρακίλης

**CSA** Cockayne syndrome Protein A

**CSB** Cockayne syndrome Protein B

**ssDNA** μονόκλωνο DNA

**dsDNA** δίκλωνο DNA

**UVA** Υπεριώδης Ακτινοβολία A

**UVB** Υπεριώδης Ακτινοβολία B

**UVC** Υπεριώδης Ακτινοβολία C

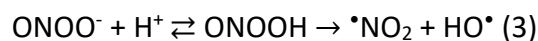
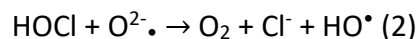
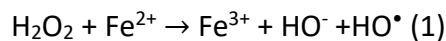
**HeLa** Εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων

**HaCaT** Ανθρώπινα Κερατινοκύτταρα  
**BPDE-dG** Εποξειδίο βενζο[a]πυρενοδιόλης  
**ODNs** Ολιγονουκλεοτίδια  
**CPD** Διμερή Κυκλοβουτανίου Πυριμιδίνης  
**6-4PP** Φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης (6-4) πυριμιδόνης  
**T2DM** Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2  
**PoI** Πολυμεράση  
**SCID** Σοβαρή Ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined ImmunoDeficient)  
**IBD** Φλεγμονώδεις Διαταραχές του Εντέρου  
**iNOS** Επαγόμενη Συνθάση του Μονοξειδίου του Αζώτου  
**Nrf2** nuclear factor erythroid 2-related factor 2  
**Keap1** διμερές πρωτεΐνης 1  
**HO-1** heme oxygenase 1  
**ARE** Στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element)  
**NF-κB** Πυρηνικός Παράγοντας κB  
**MAPK** Mitogen-activated protein kinase  
**SIRT1** Σιρτουίνη 1  
**SFN** Σουλφοραφάνη  
**NQO1** quinone dehydrogenase 1  
**TNF-α** Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου α  
**IL-1** Ιντερλευκίνη 1  
**IL-2** Ιντερλευκίνη 2  
**IL-4** Ιντερλευκίνη 4  
**IL-5** Ιντερλευκίνη 5  
**IL-6** Ιντερλευκίνη 6  
**mTor** αναστολέας τεμσιρόλιμους

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Εισαγωγή στις Ελεύθερες Ρίζες και τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ROS)

Από την αρχή της ύπαρξης ζωής στη Γη, το ανθρώπινο σώμα ζει σε μία οξειδωτική ατμόσφαιρα λόγω της παρουσίας μοριακού οξυγόνου, το οποίο παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες (McCord & Fridovich, 1968). Καθημερινά, κάθε ανθρώπινος οργανισμός καταναλώνει περίπου 3,5 kg μοριακού οξυγόνου, τα 98 gr εκ των οποίων χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Δύο κατηγορίες ενζύμων που ελέγχουν την παραγωγή ριζών υπεροξειδικού ανιόντος ( $O_2^-$ ) και προκαλούν τον σχηματισμό του οξειδίου του αζώτου (NO) είναι η Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η Συνθάση νιτρικού οξέος (iNOS, Επαγόμενη Συνθάση του Μονοξειδίου του Αζώτου) (Winterbourn, 2012). Αυτές οι δύο ενώσεις είναι πρόδρομες του σχηματισμού ενδογενώς δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των δραστικών ειδών αζώτου (RNS). Τα δραστικά είδη ROS και RNS περιλαμβάνουν μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υπεροξυνιτρώδες ( $ONOO^-$ ) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Ακόμη, περιλαμβάνουν ρίζες όπως είναι οι ρίζες υδροξυλίου ( $HO^\bullet$ ), των ανιονικών ανθρακικών ριζών ( $CO_3^{\bullet-}$ ) και της ρίζας του διοξειδίου του αζώτου ( $^{\bullet}NO_2$ ). Από την άλλη, το δίκτυο αυτό συμμετέχει στη μείωση των μολύνσεων από ιούς και μικρόβια, ως ένα μηχανισμός κυτταρικής άμυνας. Η εμφάνιση πολλών ασθενειών έχει συνδεθεί με την υπερπαραγωγή του δικτύου ROS/RNS. Οι κύριες αντιδράσεις με τις οποίες παράγονται οι ρίζες  $HO^\bullet$  απεικονίζονται παρακάτω:



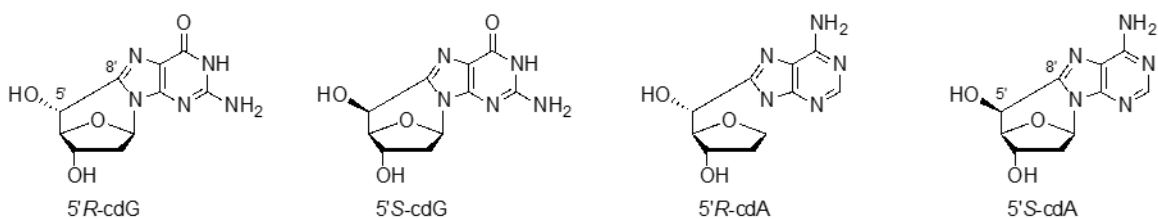
Η αντίδραση τύπου Fenton του  $H_2O_2$  (1), η μείωση του HOCl από τη ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος (2) και η αυθόρμητη αποσύνθεση του πρωτονιωμένου ONOO<sup>-</sup> (3) (Winterbourn, 2012) (Shafirovich & Geacintov, 2012).

Η HO<sup>\*</sup> αντιδρά με περιορισμένους ρυθμούς διάχυσης με τα περισσότερα βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων (Aydogan, et al., 2002). Είναι γνωστό ότι προκαλεί ρήξη στον κλώνο του DNA και χημικές τροποποιήσεις των νουκλεοβάσεων των νουκλεοζιτών. Αυτή η ρίζα παράγεται σε βιολογικά συστήματα μέσω του μεταβολισμού του οξυγόνου ή από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή ακτινοβολία UV ή και σε μεταλλαξιγόνα. Η πλειονότητα των DNA βλαβών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες είναι μεμονωμένες βλάβες, αλλά υπάρχουν και τύποι πολλαπλών βλαβών όπως είναι οι διαδοχικές ή οι ομαδοποιημένες, καθώς και οι βλάβες σύζευξης DNA/DNA ή και DNA/πρωτεΐνης, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα κατά την επιδιόρθωση από τους μηχανισμούς του κυττάρου. Συστήματα ενζύμων όπως αυτό της επισκευής της εκτομής βάσης (BER) και αυτό της επισκευής εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) προστατεύουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και ελαττώνουν τα επίπεδα των βλαβών που εντοπίζονται στο DNA. Μπορεί να συμβεί συσσώρευση των βλαβών στους ιστούς εξαιτίας της προοδευτικής απώλειας της αποτελεσματικότητας των μηχανισμών προστασίας αλλά και της μη επαρκούς επιδιόρθωσης. Το τελευταίο συμβαίνει στη διαδικασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση και συσσώρευση των βλαβών στο DNA (Friedberg, et al., 1995).

Όσον αφορά τους χημικούς μηχανισμούς στο DNA, οι διάχυτες HO<sup>\*</sup> μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από τις μονάδες της 2-δεοξυριβόζης (von Sonntag, 2006). Γίνεται αποδεκτό πως η σειρά δραστηριότητας των HO<sup>\*</sup> προς τα διάφορα άτομα υδρογόνου της 2-δεοξυριβόζης ακολουθεί την έκθεση του εκάστοτε ατόμου στον διαλύτη (δηλαδή, H5' > H4' > H3' ≈ H2' ≈ H1') (Balasubramanian, et al., 1998). Συγκεκριμένα εκτιμάται ότι υπάρχει 55% πιθανότητα να συμβεί η προσβολή στο H5' σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες θέσεις και παραχθεί η ρίζα C5' (Aydogan, et al., 2002). Η χημεία της ρίζας C5' είναι πολύ ιδιαίτερη σε σχέση με τις άλλες θέσεις



της 2-δεοξυριβόζης, διότι δεν δημιουργεί ένα σημείο απώλειας βάσης, αλλά στην περίπτωση των κυκλοπυρινών, σχηματίζονται μοναδικά κυκλο-βασικά προϊόντα προσθήκης, τα οποία εκφράζονται ως βλάβες κυκλοπυρίνης. Έτσι, πέρα από τον γλυκοσιδικό δεσμό, δημιουργείται ακόμη ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του C5' του σακχάρου και του άνθρακα C8 της πουρίνης (Chatgililoglu, et al., 2011). Οι πουρίνες που δημιουργούνται, ονομάζονται 5',8'κυκλο-2'-δεοξυνουκλεοζίτες των πουρινών (purine 5',8-cyclo-2'-deoxynucleosides, cPu). Η 5',8-κυκλο-2'-δεοξαδενοσίνη (cdA) και η 5'-8-κυκλο-2'-δεοξυγουανίνη (cdG) σχηματίζονται ως 5'R και 5'S διαστερεομερή και έχουν εντοπιστεί στο κυτταρικό DNA θηλαστικών in vivo (Chatgililoglu, et al., 2011). Οι βλάβες θεωρούνται ισχυροί βιοδείκτες για τη παρουσία οξειδωτικού στρες από τις HO<sup>•</sup> και γενικά δεν αναγνωρίζονται εύκολα από τον NER μηχανισμό επισκευής των κυττάρων. Οι διαδοχικές αυτές βλάβες συσσωρεύονται με τη γήρανση με διαφορετικό τρόπο στους διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού. Συγκεκριμένα, φαίνεται να εντοπίζονται περισσότερες βλάβες στο ήπαρ, λιγότερες στα νεφρά και ακόμη λιγότερες στον εγκέφαλο. Το γεγονός αυτό μας δείχνει την ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA σε αυτές τις βλάβες, και κατά συνέπεια την αποτυχία στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού (Wang, et al., 2012).



Εικόνα 1. Κυκλοπυρίνες cPu.

## 1.2. Ιστορική Αναδρομή στις «5',8-Κυκλοπυρίνες»

Η χημεία των cPus αναφέρεται στη βιβλιογραφία της ιονίζουσας ακτινοβολίας και χρονολογείται το 1968, όταν ο Keck ανακάλυψε πως η προσβολή των HO<sup>•</sup> στην 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη οδηγεί, μεταξύ άλλων και στη παραγωγή 5'S και 5'R

διαστερεομερών της 5'-μονοφωσφορικής 5',-8-κυκλο-αδενοσίνης (von Sonntag, 1987). Το αρχικό στάδιο αυτής της αντίδρασης ήταν η απόσπαση του ατόμου H5' του τμήματος της 2-δεοξυριβόζης από τη HO•, και ακολούθησε ενδομοριακή κυκλοποίηση της ρίζας C5' με τον C8 της βάσης, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός νέου ομοιοπολικού δεσμού, έπειτα από οξείδωση του ενδιάμεσου προϊόντος (Keck, 1968).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, βρέθηκε πως οι *cPus* παράγονται ως 5'R και 5'S διαστερεομερη από την αντίδραση των HO• με το γενετικό υλικό μέσω του σχηματισμού της ρίζας στον C5' (Dizdaroglu, 1968). Το αυξανόμενο ενδιαφέρον των βλαβών των κυκλοπουρινών οδήγησε και άλλους ερευνητές στο να ασχοληθούν με αυτό το θέμα αυτό, σε επίπεδο νουκλεοτιδίου, με χρήση βιομημικτών μοντέλων, αναφορικά με τα συστήματα επιδιόρθωσης στο DNA, με δομικές έρευνες, με τις βιολογικές επιδράσεις και τη συνάφειά τους με τις ανθρώπινες ασθένειες (Chatgililoglu, et al., 2011) Οι *cPus* βρίσκονται μεταξύ των πλέον μικρότερων βλαβών που αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER (Chatgililoglu, et al., 2019).

Επειδή οι *cPus* μπορούν να προκαλέσουν στρεβλώσεις στο δίκλωνο DNA, μπορούν να αναγνωριστούν από πρωτεΐνες επισκευής αφαίρεσης νουκλεοτιδίων NER. Αυτός είναι και ο μόνος τρόπος επισκευής που μπορεί να διορθώσει μια τέτοιου είδους βλάβη (Jiang, et al., 2015). Από μελέτες που έγιναν, οι *cdA* και *cdG* φαίνεται να αποκόπηκαν στον ίδιο βαθμό, αλλά η αποτελεσματικότητα στις κυκλοπουρίνες με την 5'R μορφή ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με τις 5'S διαστερεομερείς μορφές τους. Υπολογιστικά μοριακά μοντέλα και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, στηρίζουν τον προτεινόμενο μηχανισμό επιδιόρθωσης και είναι συγκλίνουν στο ότι η επίδραση της στερεοχημείας της κάθε βλάβης οδηγεί σε διαφορετικές αποτελεσματικότητες επιδιόρθωσης από τον μηχανισμό NER (Terzidis & Chatgililoglu, 2015).

### 1.3 Βιβλιοθήκες των cPus

Για την ενδεδειγμένη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στον σχηματισμό των μορίων αυτών, είναι απαραίτητο να συντεθούν σε ικανοποιητική ποσότητα ώστε να μπορούν να μελετηθούν. Η σύγκρισή τους με τη φυσική τους σύνθεση βοηθάει ώστε να γίνει πλήρως κατανοητή η δράση τους και να προσδιοριστούν τυχόν διαφορές στη συμπεριφορά τους (Chatgililoglu, et al., 2019).

#### 1.3.1 Σύνθεση των cdG και cdA

Η ενδεδειγμένη έρευνα αναφορικά με τον σχηματισμό και την δραστηριότητα της ρίζας C5' των νουκλεοζιτών της πουρίνης, οδήγησε στην κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού των βλαβών αυτών (Chatgililoglu, et al., 2019). Σε σημαντικό αριθμό μελετών χρησιμοποιούνται οι ρίζες HO\* μέσω ακτινοβόλησης υδατικών διαλυμάτων με γ-ακτινοβολία παρουσία N<sub>2</sub>O (Chatgililoglu, et al., 2007).

Στην περίπτωση της dA τα δύο διαστερεομερή 5'S-cdA και 5'R-cdA βρέθηκαν σε αναλογία R/S 6:1, με απόδοση αντίδρασης 10-11% (Flyunt, et al., 2000) (Chatgililoglu, et al., 2003). Η παρουσία O<sub>2</sub> φάνηκε να ευνοεί τον σχηματισμό ενυδατωμένων 5'-αλδευδών αντί των κυκλοπουρινών, υποδηλώνοντας οι ρίζες C5' αντιδρούν εκλεκτικά με το οξυγόνο, πριν προλάβουν να δώσουν την αντίδραση κυκλοποίησης (Boussicault, et al., 2008).

Ακόμα, αναφέρονται συνθετικές πορείες που οδηγούν στις τέσσερις cPu, ξεκινώντας από παράγωγα της 8-βρωμοπουρίνης υπό συνεχή ραδιόλυση ή φωτόλυση (Chatgililoglu, et al., 2011) (Chatgililoglu, et al., 2003). Αυτές οι διαδικασίες περιλάμβαναν μια σειρά αντιδράσεων ριζών που οδηγούν στο σχηματισμό των cdA και cdG (Chatgililoglu, et al., 2019). Επιλεκτική παραγωγή ρίζας στον C5' στην 2-δεοξυαδενοσίνη μπορεί να πραγματοποιηθεί με UV φωτόλυση του δεσμού C-Br της 8-βρωμο-2'-δεοξυαδενοσίνης. Η δραστηριότητα της ρίζας C5'

μελετήθηκε σε διαφορετικούς διαλύτες και παρουσία προσθέτων, όπως ανιόντα αλογονιδίου. Έτσι επιτεύχθηκε η μετατροπή της 8-βρωμο-2'-δεοξυαδενοσίνης σε 5',8-κυκλο-2'-δεοξυαδενοσίνης με απόδοση 65% και αναλογία διαστερομερούς (5'R) : (5'S) = 1:7 με φωτόλυση UV σε ακετονιτρίλιο (Jimenez, et al., 2004). Η ισορροπία  $Br^{\bullet} + Br^{-} \leftrightarrow Br_2$  ρυθμίζει τις σχετικές συγκεντρώσεις των δύο δραστικών οξειδωτικών ειδών (Jimenez, et al., 2004).

Η μελέτη της φωτόλυσης με UV διαλύματος 8-Br-dG οδήγησε στον σχηματισμό των cdG με απόδοση 26% και αναλογία R/S 8:1. Σε μία μελέτη που αφορούσε στους παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των pro-5'R και pro-5'S διαμορφωτών κατά τη διάρκεια της ριζικής κυκλοποίησης εντόπισε την αποσταθεροποίηση του pro-5'R, όταν οι ομάδες 3'OH και 5'OH είναι ελεύθερες, σε υδατικές συνθήκες. Αντίθετα, στη περίπτωση απρωτικών διαλυτών, παρατηρήθηκε η αποσταθεροποίηση του pro-5'S όταν τα 3'OH και 5'OH συνδέονται με σχετικά ογκώδεις λιπόφιλες ομάδες όπως η ομάδα TBDMS (Terzidis & Chatgililoglu, 2013) (Navacchia, et al., 2006).

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα σχετικά με τη διαδικασία σύνθεσης των cPus οδήγησαν στην ανάπτυξη βραχύτερων πειραματικών πορειών που έδωσαν τα τέσσερα διαστερομερή σε καλές έως και πολύ καλές αποδόσεις. Ξεκινώντας από το 8-Br-dA, σε απρωτικούς διαλύτες, απουσία οξυγόνου και με τη χρήση ακτινοβολίας υπεριώδους φωτός, ελήφθησαν τα R-cdA και S-cdA. Όσον αφορά στη 8-Br-dG, η εκλεκτική προστασία των ελεύθερων υδροξυλομάδων με ογκώδεις λιπόφιλες ομάδες όπως η ομάδα TBDMS βελτίωσε την απόδοση της κυκλοποίησης σε απρωτικούς διαλύτες και μετατόπισε την αναλογία R/S υπέρ του S διαστερομερούς. Η αποπροστασία ενός σταδίου έδωσε και τις δύο βλάβες σε καλή απόδοση. Τα παράγωγα 8-βρωμο μπορούν να συντεθούν ακολουθώντας τυπικές συνθήκες βρωμίωσης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Terzidis & Chatgililoglu, 2013), (Navacchia, et al., 2006).

### 1.3.2 <sup>15</sup>N ισοτοπικά επισημασμένα παράγωγα των cPus

Οι cPus δεν βρίσκονται παρά μόνο σε μικρές ποσότητες στο κυτταρικό DNA. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης εξαιρετικά ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά δείγματα. Η φασματομετρία μάζας με αραίωση ισοτόπων υγρής χρωματογραφίας αποτελεί μία από τις πιο ευαίσθητες και αξιόπιστες τεχνικές που βρίσκουν εφαρμογή μέχρι σήμερα από ερευνητές στο πεδίο αυτό. Η σύνθεση των ισότοπων <sup>15</sup>N<sub>5</sub> των R-cdA, S-cdA, R-cdG και S-cdG στηρίζεται με τις παραπάνω αναφερθείσες μεθοδολογίες. Συγκεκριμένα, φωτο-ακτινοβόληση με υπεριώδες φως ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) της επισημασμένης με <sup>15</sup>N<sub>5</sub>, 8-Br-2'-dA σε ακετονιτρίλιο, αποδείχθηκε ότι αποδίδει τα <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-επισημασμένα προϊόντα R-cdA και S-cdA. Φωτο-ακτινοβόληση της <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-επισημασμένης 8-Br-dG με υπεριώδες φως ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) σε νερό, αποδίδει επίσης τα <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-επισημασμένα R-cdG και S-cdG προϊόντα (Terzidis & Chatgialloglu, 2015).

Χρησιμοποιείται ακόμα, μια πιο απλή μεθοδολογία για τη σύνθεση <sup>15</sup>N<sub>5</sub> cPus με γ-ραδιόλυση υδατικού διαλύματος επισημασμένης με <sup>15</sup>N<sub>5</sub> dA ή dG παρουσία N<sub>2</sub>O. Τα προϊόντα των αντιδράσεων διαχωρίζονται με HPLC-UV και συλλέγονται σε καθαρή μορφή για μελλοντική χρήση. Η μέθοδος διαχωρίζει και τα δυο 8-οξο-2'-δεοξυ-παράγωγα, την 8-οξο-dG και 8-οξο-dA (Terzidis & Chatgialloglu, 2015).

### 1.3.3 Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων που περιέχουν cPus σε ειδικές τοποθεσίες

Προκειμένου να μελετηθούν οι cPus, είναι απαραίτητη η σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων DNA που περιέχουν ενσωματωμένες βλάβες στο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, σύμφωνα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων στηρίζεται στη χρήση φωσφοραμιδιτών των cPus (Chatgialloglu, et al., 2019). Οι κλώνοι συντίθενται σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους αυτοματοποιημένης σύνθεσης DNA (Chatgialloglu, et al., 2014). Τα παράγωγα φωσφοραμιδίτη ενσωματώνονται ακολουθώντας την κατεύθυνση 3'→5' σε συγκεκριμένες αλληλουχίες ολιγοδεοξυνουκλεοτιδίων (oligodeoxynucleotides,

ODNs). Τα συνθετικά ODNs που περιέχουν τις βλάβες των cPus, αλλά είναι λιγότερο πολύπλοκα από ό,τι το DNA στο φυσικό του περιβάλλον (Brooks, et al., 2000). Τα διαστερομερή R βρέθηκε να προκαλούν μεγαλύτερη παραμόρφωση της δομής, καθώς και βλάβες στη τοποθέτηση βάσεων, σε σχέση με τα διαστερομερή S, ενώ αναγνωρίζονται καλύτερα από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER. Το γεγονός αυτό ίσως θεωρείται πως οφείλεται στη μεγαλύτερη δομική παραμόρφωση που προκαλούν τα διαστερομερή R σε σχέση με τα S (Kugaoka, et al., 2000).

Κατά την ποσοτικοποίηση των cPus και των 8-oxo-Pus που προκαλούνται από HO<sup>\*</sup> σε δίκλινα ODNs (ds-ODNs) μετά από ακτινοβολία με ακτίνες γ, σε υδατικά διαλύματα κάτω από διάφορες συγκεντρώσεις οξυγόνου, παρατηρήθηκε πως σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, οι βλάβες των 8-oxo-Pus είναι περίπου τετραπλάσιες από τις βλάβες των cPus. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, οι 8-oxo-Pus σταδιακά αυξάνονται και οι cPus μειώνονται. Η χρήση του συνδυασμού των cPus και των 8-oxo-Pus, προσφέρει τη δυνατότητα προσδιορισμού αυτών ως δεικτών βλάβης στο DNA με διαφορετικές ιδιότητες: η cPu ως δείκτης βλάβης HO<sup>\*</sup> στη γήρανση και άλλες ασθένειες (με μηχανισμό επιδιόρθωσης τον NER) με ιδιαίτερη έμφαση στις καταστάσεις υποξίας, ενώ η 8-oxo-Pu είναι δείκτης διαφόρων οξειδωτικών ειδών που περιλαμβάνουν τις HO<sup>\*</sup>, αλλά δεν περιορίζονται μόνο σε αυτές (επισκευάζονται από τον μηχανισμό BER) (Chatgialloglu, et al., 2020).

Στη δημιουργία βλάβης στο dsDNA, τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη βλάβη σε εκτεταμένη ή ξετυλιγμένη τοπολογία του DNA καθώς η συνολική τάση οξείδωσης ακολουθεί την εξής κλίμακα: γραμμική διαμόρφωση > ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση >> υπερκάλυψη. Ακόμη, η υπερ-ελικωμένη δομή DNA εξασθενεί τις βλάβες που δεν δημιουργούνται από ρίζες υδροξυλίου HO<sup>\*</sup>, με τα επίπεδα της 8-oxo-dG και της 8-oxo-dA να είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερα σε κυκλικές και γραμμικές διαμορφώσεις (Terzidis, et al., 2016). Η προσβολή από ρίζες HO<sup>\*</sup> (υπό πανομοιότυπες συνθήκες N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub>) δημιουργεί βλάβες της 8-oxo-dG και της 8-oxo-dA στο ssDNA σε διπλάσια επίπεδα σε σχέση με το dsDNA, γεγονός που δείχνει, σε άμεση αντίθεση με

τις ξεδιπλωμένες δομές τετραπλής έλικας, μεγαλύτερη ζημιά έναντι των μη υβριδισμένων νουκλεοτιδίων πουρίνης (Terzidis, et al., 2016).

#### 1.3.4 Σταθερότητα των cPus σε όξινο περιβάλλον

Οι 5',8-κυκλο-2-δεοξυπουρίνες είναι οι μοναδικές διαδοχικές βλάβες που περιέχουν έναν επιπλέον ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ της βάσης και του σακχάρου. Η επιδιόρθωση αυτών των μεταλλαξιγόνων και γενοτοξικών βλαβών στηρίζεται αποκλειστικά στον μηχανισμό NER. Ο *N*-γλυκοσιδικός (ή C1-N9) δεσμός των παραγώγων της 2'-δεοξυγουανοσίνης (dG) είναι συνήθως ευαίσθητος σε όξινη υδρόλυση. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και μετά τη διάσπαση αυτού του δεσμού των cPus, η βάση παραμένει προσκολλημένη στο σάκχαρο. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, εντοπίστηκαν μόνο τα  $\alpha$  και  $\beta$  ανωμερή της δεοξυριβοπυρανόζης και τα ολιγομερή της από το αρχικό σάκχαρο. Η υδρόλυση της S-cdG σε διάλυμα φορμικού οξέος έδειξε (μελέτες βασισμένες σε πειράματα NMR), ότι τα κύρια προϊόντα ήταν η γουανίνη συνδεδεμένη με  $\alpha$  και  $\beta$  δεοξυριβοπυρανόζη. Ωστόσο, η S-cdG έδωσε ένα κλάσμα των δύο ανωμερών της συνδεδεμένης δεοξυριβοφουρανόζης της γουανίνης και άλλων κυκλικών προϊόντων. Η αλδεΐδη με τη μορφή ανοιχτού δακτυλίου, ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη. Όσον αφορά στη σταθερότητα των βλαβών σε όξινο περιβάλλον, τα 5'S-διαστερομερή των cdA και cdG είναι πιο ανθεκτικά στην όξινη υδρόλυση σε σχέση με τους φυσιολογικούς νουκλεοζίτες (dA, dG). Συγκριτικά, πιο ανθεκτική στην όξινη υδρόλυση βρέθηκε να είναι η 8-oxo-dG. Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη σταθερότητα των διαστερομερών 5'R υπό όξινες συνθήκες (Das, et al., 2012).

Σε μία άλλη μελέτη διερευνήθηκαν οι αποδόσεις ανάκτησης των cPus και 8-oxo-dG και 8-oxo-dA, υπό όξινες συνθήκες. Η διερεύνηση έγινε με την προσθήκη διαλυμάτων που περιείχαν τις έξι βλάβες (τέσσερις cPus και 8-oxo-dA και 8-oxo-dG) με διαφορετικά ποσοστά φορμικού οξέος, με επώαση στους 37°C για 4 ώρες. Η διερεύνηση της σταθερότητας των βλαβών σε ρυθμιστικά διαλύματα (pH = 5,6 και pH = 9) και οι συνθήκες που ακολούθησαν έως ότου πραγματοποιηθεί η ανάλυση LC-

MS/MS και η αποθήκευση στον αυτόματο δειγματολήπτη, έδειξαν ότι η 8-oxo-dG είναι το μόνο αποτέλεσμα νουκλεοσιδίου που ανακάμπτει σε χαμηλά επίπεδα όταν δεν λαμβάνεται υπόψη η προστασία από την οξείδωση (χρήση χηλικών μετάλλων, αργού και αντιοξειδωτικών) (Terzidis & Chatgialloglu, 2015).

#### *1.3.4. Ποσοτικοποίηση των cPus σε δείγματα DNA*

Έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία αναλυτικών τεχνικών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε υλικό που προέρχεται από διάφορους τύπους κυττάρων και οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των προσεγγίσεων ραδιοεπίσημανσης, των ενζυμικών ανοσοπροσοροφητικών προσδιορισμών (ELISA) και των χρωματογραφικών και φασματομετρικών προσεγγίσεων με βάση τη μάζα, ενώ η περιγραφή της βλάβης του DNA (μιτοχόνδρια έναντι πυρηνικής) παραμένει μια σημαντική πρόκληση (Gonzalez-Hunt, et al., 2018). Προκειμένου να κατανοήσουμε τον βιολογικό ρόλο τον cPus, είναι απαραίτητο να ποσοτικοποιηθούν με ακρίβεια οι βλάβες αυτές. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτεί την διαμόρφωση αναλυτικών τεχνικών για την παραγωγή επαναλήψιμων και αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Οι μεγάλες διακυμάνσεις στα παρατηρούμενα επίπεδα των βλαβών οφείλονται σε διαφορετικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί πιθανώς οφείλονται σε μεταβολές στις αναλυτικές διαδικασίες, κυρίως στα στάδια της εκχύλισης DNA, της υδρόλυσης των νουκλεοζιτών ή και της παραγοντοποίησης (Terzidis & Chatgialloglu, 2015). Οι περισσότερες τεχνικές ποσοτικοποίησης που έχουν δοκιμαστεί παρουσιάζουν περιορισμούς στην εφαρμογή τους. Μία εκ των τεχνικών που αναφέρεται ήταν με επίσημανση με ραδιενεργό <sup>32</sup>P για τη μέτρηση των βλαβών cdA. Η σημαντικότητα αυτή της τεχνικής, ήταν πως κατάφερε να αυξήσει το όριο ανίχνευσης σε 1-5 βλάβες ανά 10<sup>10</sup> μη τροποποιημένους νουκλεοζίτες (Zhou & Moorthy, 2015). Ακόμη, συνδυάστηκε η τεχνική ανοσοδοκιμασίας με την τεχνική ανοσοφθορισμού, μαζί με την παρουσία ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατασκευασμένου ειδικά για τη βλάβη. Η νέα αυτή τεχνική, φάνηκε να αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Οι μεθοδολογίες ανοσοδοκιμασίας



χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των οξειδωτικά επαγόμενων προσθηκών DNA εντός μεμονωμένων κυττάρων ή ιστών (Okasaki, et al., 2010).

Παρόλο που οι μέθοδοι ELISA και επισήμανσης με <sup>32</sup>P αντιπροσωπεύουν εφαρμόσιμες προσεγγίσεις με ευρεία χρήση, λόγω του ότι δεν απαιτούν εξειδικευμένη εμπειρία και ακριβό εξοπλισμό, η έλλειψη δομικής ειδικότητας φαίνεται να είναι το κύριο πρόβλημα της υπερεκτίμησης των βλαβών σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις που μετρώνται με τεχνικές που βασίζονται σε χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρικές μεθοδολογίες μάζας με χρήση αραιώσης ισοτόπων (Guo, et al., 2016). Μία ακόμη τεχνική που αναφέρεται είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC/MS). Αυτή τη διαδικασία περιλαμβάνει και ένα επιπλέον βήμα παραγοντοποίησης μετά την υδρόλυση του δείγματος DNA για να σχηματιστούν τα πτητικά παράγωγα (Jaruga, et al., 2004). Ωστόσο η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου δεν κρίνεται γενικά ικανοποιητική (Dizdaroglu, et al., 2015). Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τους σύγχρονους εξαιρετικά ευαίσθητους ανιχνευτές μάζας, που ακολουθεί μια προσέγγιση από το γενετικό υλικό και κατευθύνεται στο επίπεδο του νουκλεοζίτη, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και χρησιμοποιείται ευρέως λόγω των πλεονεκτημάτων της στην ειδικότητα και την επαναληψιμότητα. Αντίθετα με τους ανοσοπροσδιορισμούς και την υπερεκτίμηση συγκεκριμένων προϊόντων προσθήκης DNA η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) επιβεβαιώνει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων προσθήκης DNA, παρέχοντας χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, βελτιώνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθοδολογίας. Ακόμη, στην αξιοπιστία της διαδικασίας συμβάλει και η χρήση ισοτοπικά επισημασμένων ενώσεων αναφοράς για τις βλάβες. Κατά συνέπεια, αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό η επαναληψιμότητα και η ανάκτηση της ποσοτικοποίησης. Όλες αυτές οι εκτιμήσεις καθιστούν την προσέγγιση LC-MS/MS ένα εξαιρετικά σημαντικό εργαλείο για τον εντοπισμό και την εκτίμηση των οξειδωτικά παραγόμενων προϊόντων ή προϊόντων προσθήκης DNA σε σχέση με φλεγμονώδεις και εξαρτώμενες από την ηλικία διαταραχές. Τα μέχρι πρότινος τρία πρωτόκολλα που υπήρχαν στη βιβλιογραφία, έχουν συγκριθεί ως προς την ακριβή ποσοτικοποίηση

των cPus. Τα πρωτόκολλα A (Wang, et al., 2011) και C (Belmadoui, et al., 2010) εμφάνισαν παρόμοιες αποδόσεις, ενώ το πρωτόκολλο B (Jaruga, et al., 2004) έφτασε μόνο το 50%. Το πρωτόκολλο A φάνηκε να υπερισχύει του πρωτοκόλλου Γ στην ικανότητα απελευθέρωσης των βλαβών (Terzidis & Chatgililoglu, 2015). Τα στάδια για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βλαβών στο DNA περιλαμβάνει την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA από το βιολογικό δείγμα (βιολογικό υγρό, κύτταρα, ιστούς κ.λπ.) και την υδρόλυση σε απλούς νουκλεοζίτες με ένα ενζυμικό κοκτέιλ που περιέχει νουκλεάσες, ακολουθούμενο από την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό των τροποποιημένων νουκλεοσιδίων. Ένα από τα προβλήματα για την ακριβή ποσοτικοποίηση είναι η επιμόλυνση του γενετικού υλικού πριν από τα στάδια της ενζυμικής υδρόλυσης ή από παραπροϊόντα, όπως αυτά που δημιουργούνται μέσω οξειδωσης των μη τροποποιημένων νουκλεοσιδίων ή/και αποδόμησης των βλαβών, όπως για παράδειγμα μέσω οξειδωσης των βλαβών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά κατά την επεξεργασία, προστίθενται χηλικές ενώσεις και αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ όλη η διαδικασία γίνεται υπό συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας (Terzidis, et al., 2015), (Wang, et al., 2011).

Προτάθηκε ένα νέο πρωτόκολλο πέψης που σχεδιάστηκε με βάση τον ενζυμικό συνδυασμό βενζονάσης και P1 νουκλεασών. Η νουκλεάση P1 αποδείχτηκε να είναι το μόνο κατάλληλο ένζυμο, από όσα δοκιμάστηκαν, για την ποσοτική απελευθέρωση των απλών βλαβών των νουκλεοσιδίων (Terzidis & Chatgililoglu, 2015).

## 2. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης Βλαβών

### 2.1 Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης BER and NER

Η συνεχής έκθεση σε ROS ή σε ρίζες που προκαλούν βλάβη στις πρωτεΐνες και στο DNA, αποτελεί μία από τις πιο κυρίαρχες μορφές κυτταρικού στρες. Αυτά προέρχονται από εξωγενείς πηγές αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών υπάρχει ως προϊόντα ενδογενών αντιδράσεων, όπως ο κυτταρικός μεταβολισμός. Στο κυτταρικό DNA θηλαστικών έχουν εντοπιστεί πολλές τροποποιήσεις που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες. Δεν είναι ακόμη γνωστό ποιες από αυτές τις τροποποιήσεις είναι βιολογικά οι πιο σημαντικές. Η πλέον μελετημένη βλάβη είναι η 8-οχο-dG. Τα κύτταρα των θηλαστικών μπορούν να χρησιμοποιήσουν αρκετούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Δύο από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης είναι ο μηχανισμός της εκτομής βάσης (BER) και ο μηχανισμός εκτομής νουκλεοτιδίων (NER). Η κύρια διαδικασία επιδιόρθωσης στην αφαίρεση απλών βλαβών στο DNA είναι μέσω του μηχανισμού BER (Bohr & Dianon, 1999).

#### 2.1.1 Μηχανισμός επιδιόρθωσης BER

Η σταθερότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος που υπόκειται σε οξειδωτικό στρες διατηρείται με την επιδιόρθωση αυτών των βλαβών στο DNA (Kidane, et al., 2014). Οι μη ογκώδεις οξειδωτικά παραγόμενες βλάβες στο DNA συνήθως επιδιορθώνονται με μηχανισμούς BER που διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό και στα Βακτήρια, στα Αρχαία και στα Ευκάρυα (Wallace, et al., 2012). Οι πρωτεΐνες BER δεσμεύονται στον νουκλεοζίτη που έχει υποστεί βλάβη και προκαλούν διάσπαση του *N*-γλυκοζυλικού δεσμού, σχηματίζοντας έτσι θέσεις που δεν περιέχουν βάσεις (Doetsch & Cunningham, 1990). Ο γενικός τρόπος λειτουργίας των BER πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πέντε βασικά στάδια: Πρώτα αναγνωρίζεται και απομακρύνεται η λανθασμένη ή η κατεστραμμένη βάση από μια DNA γλυκοζυλάση για να δημιουργηθεί απευθείας ένα σημείο που δεν περιέχει βάση και έπειτα γίνεται η τομή αυτού του σημείου από μια απουρινική/απυριμιδική (AP) ενδονουκλεάση ή μια AP

λυάση. Στη συνέχεια απομακρύνεται το εναπομείναν θραύσμα σακχάρου από μια λυάση ή φωσφοδιεστεράση και ακολουθεί η πλήρωση του κενού από μια DNA πολυμεράση. Τέλος, γίνεται η σφράγιση του κενού από μια DNA λιγάση (Krokan & Bjørås, 2013). Στην περίπτωση μονολειτουργικών γλυκοζυλασών, οι θέσεις που δεν περιέχουν κάποια βάση διασπώνται από μια απουρινική ανθρώπινη ενδονουκλεάση (APE1) που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό θραυσμάτων με φωσφορική 3'-OH και 5'-δεοξυριβόζη (5'-dRP) στα άκρα (Doetsch & Cunningham, 1990). Με τη σειρά τους, οι δυσλειτουργικές γλυκοζυλάσες διασπούν τις θέσεις που δεν περιέχουν βάσεις από τις δραστηριότητες της LP λυάσης που έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό διασπάσεων ss-DNA που περιέχουν είτε μία φωσφορική ομάδα (P) ( $\beta$ ,  $\delta$ -elimination), είτε μια  $\alpha$ , $\beta$ -ακόρεστη αλδεΐδη (PUA,  $\beta$ -elimination) στο 3'-άκρο. Έτσι, ο μηχανισμός BER έχει ως αποτέλεσμα την εκτομή κατεστραμένου νουκλεοτιδίου και τον σχηματισμό διασπάσεων ενός κλώνου. Οι διασπάσεις αυτές μπορούν να ανιχνευθούν με μεθόδους ηλεκτροφόρησης πηκτής (Bally & Verly, 1987). Ακόμη, οι BER πρωτεΐνες Endo III, Endo V, Endo VIII, NEIL1, NEIL2, human OGG1 και *E. Coli* Fpg δεν μπορούν να αναγνωρίσουν και να δράσουν ευθέως με τις S-cdA και S-cdG (Pande, et al., 2012). Ακόμη, βρέθηκε πως δεν υπάρχουν στοιχεία σύνδεσης της γλυκοζυλάσης BER και της cdA. Η cdA αποτελεί υπόστρωμα για εκτομή νουκλεάσης σε εκχυλίσματα από κύτταρα θηλαστικών, γεγονός που υποδηλώνει πως μπορεί να επισκευαστεί από τον μηχανισμό NER (Brooks, et al., 2000). Επομένως, αποδεικνύεται πως οι βλάβες των cPus δεν μπορούν να επισκευαστούν από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης BER (Chatgililoglu, et al., 2019).

### 2.1.2 Μηχανισμός Επιδιόρθωσης NER

Η επισκευή εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) είναι η κύρια οδός που είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση κυρίως ογκωδών βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ακτινοβολία UV, περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα και ορισμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Τα κληρονομικά ελαττώματα στον μηχανισμό NER που έχουν εντοπιστεί στους ανθρώπους έχουν εμπλακεί σε αρκετές αυτοσωμικές υπολειπόμενες διαταραχές. Τέτοιες διαταραχές είναι το xeroderma pigmentosum

(XP), το σύνδρομο Cockayne, η τριχοϊδοδυστροφία και το ευαίσθητο στην υπεριώδη ακτινοβολία σύνδρομο. Το NER των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελείται από δύο δευτερεύουσες οδούς: Global Genomic NER (GG-NER) και NER-transcription-coupled (NER-συζευγμένο με μεταγραφή, TC-NER). Η πρώτη είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καταστολή της μεταλλαξογένεσης και της καρκινογένεσης που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, όπως αποκαλύπτεται από μια έντονη προδιάθεση για καρκίνο του δέρματος που σχετίζεται με ασθενείς με XP (Kusakabe, et al., 2019).

Η αναγνώριση ζημιών στο DNA επηρεάζει τη συνολική αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης. Όσον αφορά τον μηχανισμό GG-NER στα θηλαστικά, δύο γονιδιακά προϊόντα που σχετίζονται με το XP, το XPC και το DDB2 (XPE), διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης των βλαβών. Μετά την αρχική ανίχνευσή τους, η επαλήθευση της παρουσίας τους είναι σημαντική για τη διασφάλιση της ακρίβειας ολόκληρου του συστήματος επιδιόρθωσης, στο οποίο εμπλέκονται ο παράγοντας μεταγραφής IIH (TFIIH) και η πρωτεΐνη XPA (Kusakabe, et al., 2019). Όσον αφορά στο TC-NER, είναι εξειδικευμένο στην απομάκρυνση βλαβών από τον μεταγραφόμενο κλώνο DNA των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων, όπου η RNA πολυμεράση II κατά την επιμήκυνση εντοπίζει και αντιμετωπίζει μια βλάβη (Naegeli & Sugawara, 2011). Η έναρξη του μονοπατιού TC-NER πραγματοποιείται από την παρεμπόδιση της RNA πολυμεράσης II από τις βλάβες, και η παρεμπόδιση αυτή επιστρατεύει τις πρωτεΐνες CSA (Cockayne syndrome A) και CSB (Cockayne syndrome protein B). Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό του TC-NER και στην ενεργοποίησή του. Μετά την αναγνώριση της βλάβης, επιστρατεύεται το σύμπλοκο του μεταγραφικού παράγοντα TFIIH (transcription initiation factor IIH), τόσο στο GG-NER όσο και στο TC-NER μονοπάτι. Η ελικάση του TFIIH ανοίγει περισσότερο την έλικα στο σημείο της βλάβης και η ύπαρξή της επιβεβαιώνεται με τη βοήθεια των υπομονάδων του TFIIH, XPA και XPB, οι οποίες προσδένονται σε μονόκλωνα, χημικά τροποποιημένα νουκλεοτίδια. Στο σημείο αυτό, επιστρατεύεται επίσης η πρωτεΐνη RPA που προσδένεται σε μονόκλωνο DNA και καλύπτει την ακέραιη αλυσίδα. Η XPA επιστρατεύει μια ενδονουκλεάση, το ετεροδιμερές XPF-ERCC1, το οποίο κατευθύνεται από την RPA προς την αλυσίδα με

τη βλάβη και δημιουργεί μια τομή στο 5' της βλάβης (Marteijn, et al., 2014) Το XPA συνδέεται κοντά στην 5' πλευρά μιας δομής φυσαλίδας, στην οποία θα μπορούσε να ιδανικά για να αλληλεπιδράσει με το RPA και το ERCC1-XPF για να συντονίσει περαιτέρω βήματα στην αντίδραση NER. Η προτιμώμενη θέση σύνδεσης για το RPA είναι το ssDNA περίπου 22-30 νουκλεοτιδίων ή περίπου στο μέγεθος του ολιγομερούς που αποκόπτεται κατά τον NER. Το RPA πιστεύεται ότι δεσμεύει τον μη αλλοιωμένο κλώνο DNA, στον οποίο βοηθά στην τοποθέτηση των δύο ενδονουκλεασών ERCC1-XPF και XPG στο υπόστρωμα τους του κατεστραμμένου κλώνου DNA. Το RPA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό της εκτομής και επιδιόρθωσης (Schärer, 2013).

Σε έρευνα που έγινε για την κατανόηση της δράσης NER σε δομικά διακριτές βλάβες στο DNA σε άθικτα κύτταρα, τοποθετήθηκαν βλάβες στις περιστροφικές ρυθμίσεις (In) και στις πιο προσιτές στο διαλύτη (Out) των νουκλεοσωμάτων. Οι μη ογκώδεις βλάβες cPus και τα ογκώδη N2-γουανινικά παράγωγα *cis*- και *trans*- του εποξειδίου της βενζο[α]πυρενοδιόλη (BPDE-dG) αναγνωρίζονται από τον ανθρώπινο μηχανισμό επιόρθωσης NER. Αυτές οι βλάβες στο DNA ενσωματώθηκαν στις περιστροφικές ρυθμίσεις εσωτερικά ή εξωτερικά κοντά στον συμπληρωματικό άξονα σε σωματίδια νουκλεοσωμάτων του πυρήνα που ανασυστάθηκαν είτε με φυσικές ιστόνες που εξήχθησαν από κύτταρα HeLa (HeLa-NCP), ή με ανασυνδυασμένες ιστόνες (Rec-NCP). Οι cPus εμφανίστηκαν να είναι εντελώς ανθεκτικές στο μηχανισμό NER σε ανθρώπινα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa. Σε αντίθεση, τα πρόσθετα BPDE-dG αναγνωρίστηκαν από τον μηχανισμό NER στα κύτταρα HeLa NCPs αλλά ήταν πιο ανθεκτικά στο NER σε Rec-NCPs. Τα αποτελέσματα εξετάστηκαν τοποθετώντας τις ίδιες βλάβες στις περιστροφικές ρυθμίσεις εισόδου ή εξόδου που γειτνιάζουν με τον άξονα νουκλεοσωμάτων όπου η αποκατάσταση των βλαβών έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ανασταλτική. Ενώ οι βλάβες στο DNA που προέρχονται από τη cPu και το BPDE στο ελεύθερο DNA αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό NER, οι μη ογκώδεις βλάβες cdA και cdG που είναι ενσωματωμένες είτε στις εσωτερικές, είτε στις εξωτερικές περιστροφικές ρυθμίσεις των φυσικών νουκλεοσωμάτων ιστών HeLa είναι εντελώς ανθεκτικές στο μηχανισμό NER στα εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων. Αντίθετα, η

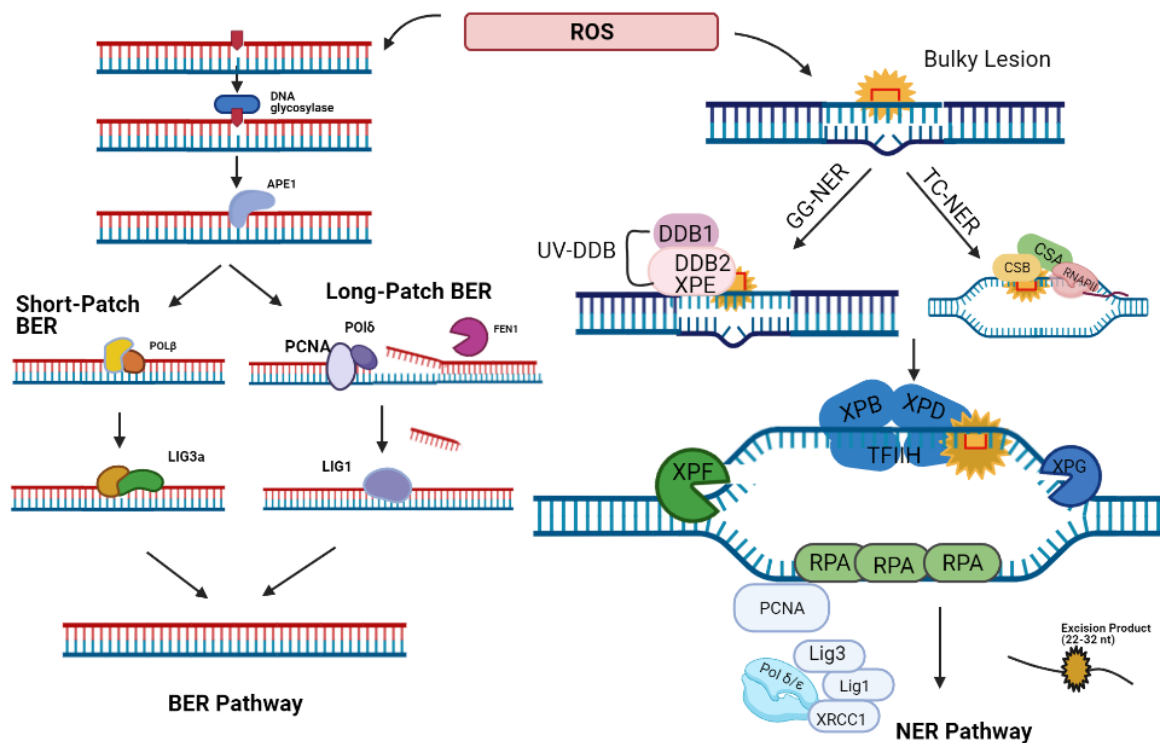
εκτομή των *trans*- και *cis*-BPDE-dG προσαγωγών που αποκόπηκαν με διαφορετικούς ρυθμούς σε ελεύθερο DNA, μειώνεται από τον ίδιο παράγοντα περίπου 2,2 φορές στα νουκλεοσώματα HeLa και από έναν παράγοντα περίπου 11 φορές σε ανασυνδυασμένα νουκλεοσώματα ιστόνης. Η ακαμψία αυτής της βλάβης με περιορισμένο αντίκτυπο στη δομή και τη δυναμική του νουκλεοσώματος φαίνεται να αναστέλλει τους μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για την πρόκληση πρόσβασης στη βλάβη που απαιτείται για την επιτυχή δραστηριότητα του GG-NER σε εκχυλίσματα ανθρώπινων κυττάρων (Shafirovich, et al., 2019). Ωστόσο, οι cPus προκαλούν τη ρήξη δύο δεσμών υδρογόνου μεταξύ του DNA του συνεργαζόμενου κλώνου και μιας γειτονικής αργινίνης, όταν ο κλώνος που περιέχει R-cdG βρίσκεται μακριά από τις ιστόνες. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην έναρξη αργών διαδικασιών ανοίγματος χρωματίνης ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση, μόλις το DNA είναι ελεύθερο (Cai, et al., 2020).

Στις δραστηριότητες του μηχανισμού NER υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων και των ανασυνδυασμένων νουκλεοσωμάτων ιστόνης. Οι διαφορές αυτές συμβαδίζουν με την αντίληψη ότι οι ενέργειες του μηχανισμού NER εξαρτώνται από την παροδική αποσυμπίεση και τη μερική έκθεση των αλληλουχιών νουκλεοσωμάτων DNA στον παράγοντα NER XPC-RAD23B. Η δραστηριότητα του NER μπορεί να σχετίζονται με την ακετυλίωση των NCP (σωματίδιο νουκλεοσώματος). Το σχετικά μικρό φυσικό μέγεθος των βλαβών cdG και cdA, το οποίο μοιάζει με το μέγεθος των φυσικών νουκλεοτιδίων, είναι αυτό που τις κάνει να αντιστέκονται στον μηχανισμό NER. Οι βλάβες των cPus δεν διαταράσσουν επαρκώς τις τοπικές αλληλεπιδράσεις της DNA-ιστόνης, σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα μεγέθη και ογκώδη προϊόντα των BPDE-dG προσθέτων. Οι cPus εμποδίζουν την επιτυχή πρόσδεση του παράγοντα NER XPC-RAD23B που ξεκινά τη διαδικασία του μηχανισμού NER σε HeLa. Αυτή η υπόθεση είναι σύμφωνη με τα δομικά χαρακτηριστικά που συνάγονται από το NMR και την ανάλυση μοριακής δυναμικής βλάβης S-cdG απέναντι από την 2'-δεοξυκυτοσίνη dC σε μία δίκλωνη έλικα ολιγονουκλεοτιδίων. Ενώ η βλάβη cdG διαταράσσει την ελικοειδή συστροφή και την προσθήκη ζευγών βάσεων στη θέση βλάβης και στα γειτονικά ζεύγη βάσεων,

διατηρείται το ζεύγος βάσεων Watson-Crick και η ελικοειδής δομή του δίκλωνου, αν και αλλαγμένη. Αυτό υποδηλώνει ότι τα δίκλινα DNA που περιέχουν cPus, ίσως να μην προκαλούν επαρκείς τοπικές διαταραχές στα νουκλεοσώματα της ιστόνης, ώστε να προκαλέσουν την απόκριση του μηχανισμού NER. Η ισχυρή δραστηριοποίηση του μηχανισμού NER που παρατηρείται με τις ίδιες βλάβες που είναι ενσωματωμένες σε ελεύθερο δίκλινο DNA, αποδίδεται στη σημαντική θερμοδυναμική αποσταθεροποίηση του δίκλωνου DNA που προκαλείται από τις αλλοιώσεις των cPus (Shafirovich, et al., 2019). Η επιδιόρθωση στο διαστερομερές 5'R έγινε με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, σε σχέση με το διαστερομερές 5'S από τον ανθρώπινο μηχανισμό NER. Παρ' όλα αυτά, ο μηχανισμός NER μπορεί να απομακρύνει και τα δύο διαστερομερή των υπολειμμάτων cPu (Kuraoka, et al., 2000). Παράλληλα με την προηγούμενη εργασία, σε άλλη έρευνα βρέθηκε πως το διαστερομερές 5'S-cdA μπορεί να επιδιορθωθεί από τον μηχανισμό NER σε εκχυλίσματα κυττάρων ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (Brooks, et al., 2000).

Παραμένει άγνωστο εάν αυτές οι παρατηρήσεις που βρέθηκαν με τα μεταγραφικά τροποποιημένα και ανασυνδυασμένα νουκλεοσώματα που προέρχονται από ιστόνες *in vitro*, είναι το ίδιο σχετικές με τις ίδιες βλάβες που είναι ενσωματωμένες στη χρωματίνη σε άθικτα ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς. Είναι επομένως σημαντικό να επεκταθούν τέτοιες μελέτες σε πιο απαιτητικό περιβάλλον *in vivo*, προκειμένου να προσδιοριστεί εάν οι φυσικά μικρότερες βλάβες cPu είναι το ίδιο πιο ανθεκτικές στην επιδιόρθωση στο φυσικό περιβάλλον της χρωματίνης, από τις βλάβες που προέρχονται από τη δέσμευση μεταβολιτών ογκωδών πολυκυκλικών ενώσεων στο φυσικό DNA *in vivo* (Chatgililoglu, et al., 2019). Η βλάβη στο μηχανισμό NER έχει συσχετιστεί με μετάλλαξη και απώλεια λειτουργίας στο p53 (Ford & Hanawalt, 1997).





Εικόνα 1. Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης BER και NER.

### 2.1.3 Διαστερομερική αναγνώριση βλαβών cdA από ανθρώπινη πολυμεράση Poly (ADP-ριβόζη) 1

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της Poly (ADP-ριβόζης) 1 (PARP-1) να αναγνωρίζει *in vitro* και να δεσμεύει επιλεκτικά τις αλληλουχίες DNA που περιέχουν 5'S-cdA και 5'R-cdA, προτείνοντας συγκεκριμένες οδούς για την επιδιόρθωση του DNA, που προκαλούνται από καθεμία από αυτές τις αλλοιωμένες βάσεις. Συγκεκριμένα, η PARP1 δεσμεύει τα ολιγονουκλεοτίδια, συμπεριλαμβανομένου μιας 5'S-cdA. Η δέσμευση συμβαίνει με υψηλότερη σταθερά συγγένειας για την αλλοίωση 5'S σε ένα μοντέλο δίκλωνου DNA σε σχέση με την 5'R-cdA, που δείχνει διαφορετικά μοτίβα αναγνώρισης, σε σύγκριση με τη μη κατεστραμμένη δεοξυ-αδενοσίνη dA. Αυτό υπογραμμίζει την ικανότητα της PARP1 να αναγνωρίζει και να διαφοροποιεί τον παραμορφωμένο σκελετό DNA σε ένα βιομιμητικό σύστημα που προκαλείται από διαφορετικές διαστερομερείς μορφές της βλάβης cdA (Masi, et al., 2019).

## 2.2 Παράκαμψη των βλαβών cPu από πολυμεράσες του DNA και RNA

### 2.2.1 RNA πολυμεράση II

Στα ανθρώπινα κύτταρα, οι οξειδωτικές βλάβες cdA στο DNA προκαλούν παρατεταμένη διακοπή λειτουργίας της RNA pol II, ακολουθούμενη από μεταγραφική παράκαμψη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντιγράφων χωρίς σφάλματα και μεταλλάξεις (Walmacq, et al., 2015). Σε κύτταρα XP επιμολυσμένα με πλασμίδιο που φέρει τη βλάβη S-cdA, διατηρήθηκε το 20-30% της συνολικής δραστικότητάς τους (Brooks, et al., 2000). Η παρουσία της βλάβης S-cdA δεν οδήγησε στη πλήρη ανικανότητα της δραστικότητας της RNA πολυμεράσης II. Συνεπώς, η RNA πολυμεράση έχει την ικανότητα να παρακάμψει κάποιες από τις βλάβες S-cdA που εντοπίζονται στον πρότυπο κλώνο και να οδηγήσει σε προϊόντα μεταγραφής πλήρους μήκους. Παρουσία UTP, η RNA pol II ζύμης μπορεί να παρακάμψει μία cdA, ενώ παρουσία του ATP μπορεί να ενσωματώσει το νουκλεοτίδιο αποτελεσματικά στο ζεύγος βάσεων που περιέχουν τη cdA, αλλά σε πολύ χαμηλότερη απόδοση. Ο παράγοντας εκκίνησης/επιμήκυνσης της μεταγραφής TFIIIF μπορεί να διεγείρει τη δραστηριότητα της RNA pol II να παρακάμψει μια βλάβη cdA χωρίς να επηρεάσει την πιστότητά της, υποδεικνύοντας ότι οι παράγοντες *cis* και *trans* μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της παράκαμψης μιας βλάβης cPu από την RNA pol II (Walmacq, et al., 2015).

### 2.2.2 DNA πολυμεράσες

Οι πολυμεράσες του DNA είναι ένζυμα που συνθέτουν το DNA. Τα ένζυμα αυτά έχουν ουσιαστικό ρόλο στην αναπαραγωγή του γονιδιώματος. Είναι σημαντικές για την προστασία του κυττάρου από τις επιπτώσεις των βλαβών στο DNA (Lange, et al., 2011). Οι δραστηριότητες σύνθεσης αντιγραφής του DNA του θύμου αδένου του μοσχαριού, όπως η δράση της πολυμεράσης δ (pol δ) και της πολυμεράσης DNA T7 του βακτηριοφάγου, εμποδίζονται από τις βλάβες R-cdA και S-cdA, με αποτέλεσμα

την αναστολή της αντιγραφής. Η έναρξη της αντιγραφής από την *pol δ*, καταστέλλεται με την ύπαρξη βλάβης R-cdA ή S-cdA που εντοπίζεται στον αντιγραφόμενο κλώνο DNA, ενώ η πολυμεράση DNA T7 μπορεί να συνεχίσει την επιμήκυνση του πρωταρχικού τμήματος της αντιγραφής, παρά τον εντοπισμό βλαβών cPus (Kuraoka, et al., 2000). Επομένως, η σύνθεση DNA από την *pol δ* σταματά πριν από τις βλάβες cPus, σε αντίθεση με την DNA *pol T7*, η οποία μπορεί να παρακάμψει μία βλάβη R-cdA ή S-cdA, ενσωματώνοντας ένα ακόμη νουκλεοτίδιο. Η DNA *pol T7* μπορεί να παρακάμψει μία βλάβη R-cdA πιο αποτελεσματικά σε σχέση με μία βλάβη S-cdA (Chatgialloglu, et al., 2019). Η S-cdG δεν εμποδίζει την επιμήκυνση του εκκινήτη από το θραύσμα Klenow της πολυμεράσης DNA I και το dAMP ενσωματώνεται κατά προτίμηση απέναντι από αυτό (Gasparutto, et al., 2000).

Η S-cdA που βρίσκεται σε δίκλωνο DNA μπορεί επίσης να αναστέλλει τη σύνθεση DNA από την *pol β* και τον μηχανισμό BER. Κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης μιας θέσης που δεν περιέχει βάση στον συμπληρωματικό κλώνο, η θέση της S-cdA επηρεάζει τη δράση της *pol β*. Εάν η θέση δράσης της DNA *pol β* βρίσκεται δίπλα στην S-cdA, τότε η *pol β* αδυνατεί να τοποθετήσει την κατάλληλη βάση, ενώ στην περίπτωση που η βλάβη βρίσκεται σε απόσταση μεγαλύτερη των 5 νουκλεοτιδίων, η διαδικασία εξελίσσεται φυσιολογικά (Howard, et al., 2017). Η S-cdA προκαλεί μια γεωμετρική αλλοίωση που περιβάλλει τη θέση που δεν περιέχει βάση και αποτελεί το σημείο δράσης της *pol β*, με αποτέλεσμα να μειώνει την ικανότητα αναγνώρισής της (Chatgialloglu, et al., 2019).

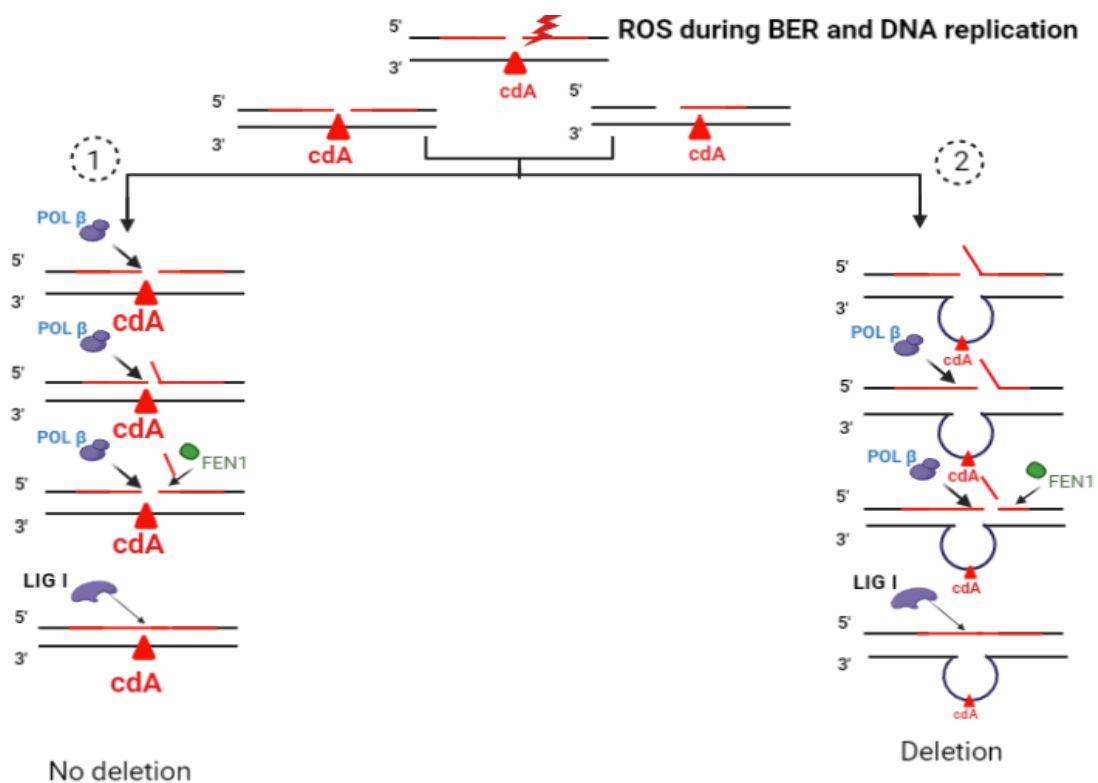
Στο *Saccharomyces cerevisiae*, η ανθρώπινη πολυμεράση η τοποθέτησε 2'-δεοξυνουκλεοτίδια απέναντι από τις βλάβες της cdA και της cdG με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Η ακριβής και αποτελεσματική παράκαμψη της *pol η* των βλαβών των cPus δείχνει πως η δράση της δεν επηρεάζεται από αυτές (Swanson, et al., 2012). Κατά την έναρξη της δράσης της, αν η cdA βρίσκεται στη θέση -2 από την θέση εκκίνησής της, τότε η *pol δ* δρα αποτελεσματικά. Στην περίπτωση που η cdA βρίσκεται στη θέση -1 από την θέση εκκίνησής της, τότε το ένζυμο χάνει τη ικανότητα δράσης του (Weng, et al., 2018).

Πλασμίδιο που φέρει βλάβη S-cdG αναδιπλασιάστηκε σε βακτήριο *Escherichia coli* με συγκεκριμένα στάδια αδρανοποίησης των πολυμερασών του DNA. Η αρχική βιωσιμότητα του πλασμιδίου ήταν <1%, ενώ αυξήθηκε στο 5,5% με SOS (SOS είναι η βακτηριακή αντίδραση στη βλάβη του DNA, όπου εισάγονται 40-50 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων αρκετών πρωτεϊνών επιδιόρθωσης DNA (Sale, et al., 2012)). Στο στέλεχος με έλλειψη στη pol II, η βιωσιμότητα μειώθηκε, ενώ σε στέλεχος χωρίς τη pol IV, η βιωσιμότητα αυξήθηκε. Από τα στελέχη στα οποία είχε αδρανοποιηθεί η pol V, δεν ανακτήθηκε κανένας απόγονος. Επομένως, η pol V είναι απαραίτητη για παράκαμψη της S-cdG. Η pol II έχει δευτερεύοντα ρόλο, αλλά χρειάζεται την pol V για να επιτελέσει τη λειτουργία της. Η pol IV ανταγωνίζεται την pol V στην επιδιόρθωση των βλαβών (Jasti, et al., 2011) (Pednekar, et al., 2014).

Η ανθρώπινη πολυμεράση ι (pol ι) και ένα σύμπλοκο πολυμεράσης ζ (pol ζ) ζύμης δύο υπομονάδων (REV3/REV7) μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά στα βήματα εισαγωγής και επέκτασης, αντίστοιχα, στην επιδιόρθωση του DNA στις βλάβες S-cdA και S-cdG. Η ανθρώπινη πολυμεράση κ (pol κ) και η πολυμεράση η (pol η) μπορούν επίσης να επεκτείνουν σε αυτές τις βλάβες, αν και με μικρότερη αποτελεσματικότητα. Σε ανθρώπινα κύτταρα, οι S-cdA και S-cdG αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA και προκαλούν συχνές μεταλλάξεις στις θέσεις βλάβης. Οι pol η, pol ι, και pol ζ, έχουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μπορούν να πραγματοποιήσουν επιτυχώς την εισαγωγή νουκλεοτιδίων απέναντι από τις βλάβες των cPus, ενώ η pol κ δεν φαίνεται να διατηρεί την ακεραιότητα της λειτουργικότητάς της (You, et al., 2013).

Η πολυμεράση β μπορεί να παρακάμψει μία δομή φουρκέτας ή θηλειά (flap or loop) (Xu, et al., 2012), (Lai, et al., 2018) ιδιαίτερα εάν αυτή η βλάβη αποτελεί μέρος μια αλληλουχίας γονιδίου (Howard, et al., 2017). Η pol β μπορεί να προσπεράσει μία βλάβη cdA που βρίσκεται τοποθετημένη σε μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία CAG, στο σημείο της οποίας δημιουργείται μία θηλειά, ενώ η θηλειά παραμένει μετά την δράση της. Η βλάβη cdA μπορεί να διεγείρει τη διάσπαση του ενζύμου FEN1, υποδηλώνοντας το σχηματισμό μιας ενδιάμεσης θηλειάς με ένα μακρύ «πτερύγιο»

κατεύθυνσης 5'→3', το οποίο μπορεί να διασπαστεί αποτελεσματικά από την ενδονουκλεάση FEN1. Η FEN1 αφαιρεί το 5'-«πτερύγιο», κόβοντας τις επαναλήψεις τριπλετών και προκαλώντας επανάληψη της διαγραφής. Η ροΙ β μπορεί αποτελεσματικά να παρακάμψει μία 5'R-cdA, ακόμη και όταν εισάγει λανθασμένα νουκλεοτίδια και οδηγεί σε μετάλλαξη. Αναποτελεσματικά, μπορεί να παρακάμψει τη βλάβη 5'S-cdA, που βρίσκεται σε τυχαία ακολουθία, προκαλώντας τη συσσώρευση ενδιάμεσων μονοκλωνικών διακοπών του DNA που με τη σειρά τους οδηγούν σε ανασυνδυασμό και αστάθεια του γονιδιώματος (Χυ, et al., 2014). Η DNA λιγάση (DNA LIG I) είναι απαραίτητη για την απολίνωση των ενδιάμεσων φουρκετών, που οδηγούν στην επέκταση του νουκλεϊκού οξέος (Liu, et al., 2009).



Εικόνα 3. Δράση της DNA πολυμεράσης β. Η διαγραφή της τριπλέτας CTG επαναλαμβάνεται μέσω παράκαμψης μιας βλάβης cdA από τη pol β κατά την αντιγραφή DNA και τον μηχανισμό επιδιόρθωσης BER. Οι ελεύθερες ρίζες ROS που παράγονται από ενδογενείς πηγές και ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του Οκαζάκι και του μηχανισμού BER προκαλούν την παραγωγή μιας cdA στον πρότυπο κλώνο μιας οδού TNR (Trinucleotide repeat) που βρίσκεται απέναντι ή στη συνέχεια ενός κενού. Σε ένα σενάριο, το pol β μπορεί να παρακάμψει άμεσα τη βλάβη αφήνοντας ένα αναγνωριστικό για στεγανοποίηση της DNA LIG I, με αποτέλεσμα να μην επαναληφθεί το προϊόν διαγραφής (διαδρομή (1)). Σε ένα άλλο σενάριο, μία cdA μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό θηλειών TNR διαφόρων μεγεθών που βρίσκονται απέναντι ή στη συνέχεια ενός διακένου 1-nt (διαδρομή (2)). Αυτό οδηγεί στη συνέχεια στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου με θηλειά και ένα 5'-«πτερύγιο». Στη συνέχεια, η Pol β προσπερνά τη θηλειά για να πραγματοποιήσει σύνδεση παράκαμψης της βλάβης. Στη συνέχεια, το FEN1 διασπά το «πτερύγιο» αυτού του κλώνου αφήνοντας ένα αναγνωριστικό για σφράγιση με τη DNA LIG I, με αποτέλεσμα μικρά προϊόντα διαγραφόμενης επανάλψης αλληλουχίας CTG (διαδρομή (2)) (Xu, et al., 2014)

### 2.3 Επίδραση των βλαβών cPus στη διαδικασία επιδιόρθωσης BER

Η ενεργοποίηση του BER ξεκινά με αναγνώριση βλάβης DNA από τις γλυκοσυλάσες. Η γλυκοζυλάση της ουρακίλης-DNA (UDG) είναι μία από τις πιο εξελικτικές γλυκοζυλάσες που μπορούν να απομακρύνουν την συχνά εμφανιζόμενη 2'-δεοξουριδίνη (dU) από ss- και ds-ολιγονουκλεοτίδια. Η συσσώρευση των cPus μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία του μηχανισμού BER. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη της cdA στην πλευρά 5' της dU, καταστέλλει τη δράση της UDG και στις δύο διαστερομερείς μορφές, στο ss-DNA. Στο ds-DNA, η 5'S-cdA η αποκλείει εντελώς την εκτομή της ουρακίλης από την UDG, ενώ την επιτρέπει. Στην περίπτωση όμως της 5'R-cdA, η διαδικασία επιδιόρθωσης δεν μπορεί να ολοκληρωθεί διότι το κατεστραμμένο DNA δεν αναγνωρίζεται από την ανθρώπινη ενδονουκλεάση 1 (hAPE1) (Karwowski, 2019).

## 3. Εφαρμογές στον Τομέα της Υγείας

### 3.1 Βιολογικές Μελέτες με Εφαρμογή στον Τομέα της Υγείας

#### 3.1.1 Νευρολογικές Παθήσεις

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων της οδού NER σχετίζονται με νευρολογικές ασθένειες, όπως είναι το Xeroderma Pigmentosum (XP), το σύνδρομο Cockayne (CS) και η τριχοθειοδυστροφία (TTD). Οι ασθένειες αυτές περιλαμβάνουν καρκίνο του δέρματος και αναπτυξιακά και νευρολογικά συμπτώματα (Cleaver, et al., 2009). Το Xeroderma pigmentosum (XP) είναι μια σπάνια, αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή της επιδιόρθωσης του DNA. Χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στον ήλιο, καρκίνο του δέρματος και των βλεννογόνων, ο οποίος προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εκδηλώνεται κλινικά ως φωτοευαισθησία, ακτινική βλάβη στο δέρμα, καρκίνος σε περιοχές του δέρματος και των βλεννογόνων των ματιών και του στόματος που εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία (DiGiorganna & Kraemer, 2012).

Το XP μπορεί να προκύψει από μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα οκτώ γονίδια XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG και XP-V. Τα κύτταρα των ασθενών σε ομάδες συμπληρώματος που φέρουν γονίδια από A έως G είναι ελαττωματικά στην επιδιόρθωση νουκλεοτιδίων (NER). Όπως έχει αναφερθεί, το NER είναι το κύριο μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA που προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία UV. Οι ασθενείς της ομάδας V δεν έχουν κάποιον τύπο πολυμεράσης DNA που να έχει τη δυνατότητα να παρακάμψει τη μεταλλαξιγόνο βλάβη του DNA, η οποία προκαλείται από την UV (DiGiorganna & Kraemer, 2012). Οι ασθενείς με XP που φέρουν ελαττώματα στις ομάδες συμπλήρωσης A, B, D και G τείνουν να έχουν εγκαύματα με φουσκάλες σε ελάχιστη έκθεση στον ήλιο. Οι ασθενείς με ελλείψεις στις ομάδες C, E δεν εμφανίζουν κάτι αντίστοιχο (Black, 2016). Όταν το DNA εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, προκύπτουν φωτοπροϊόντα με βάση το νουκλεϊκό οξύ που αναγνωρίζονται από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER. Το κατεστραμμένο DNA



αναγνωρίζεται στις περιοχές των γονιδίων που μεταγράφονται ενεργά μέσω της οδού TC-NER (NER-συζευγμένο με μεταγραφή). Στο υπόλοιπο γονιδίωμα, το κατεστραμμένο DNA αναγνωρίζεται μέσω της βραδύτερης Global Genome-NER, GG-NER. Στην οδό TC-NER, εξειδικευμένες πρωτεΐνες (προϊόντα γονιδίων CSA και CSB) αναγνωρίζουν το μη φυσιολογικό τμήμα και αποκλείουν τη δραστικότητα της πολυμεράσης II RNA. Στο μονοπάτι GG-NER, ένα διαφορετικό σύνολο πρωτεϊνών (DDB2, το προϊόν του γονιδίου XPE και προϊόντα του γονιδίου XPC) αναγνωρίζει το DNA που έχει τροποποιηθεί από την υπερϊώδη ακτινοβολία, επισημαίνοντας τα σημεία που μπορούν να επιδιορθωθούν. Και οι δύο οδοί οδηγούν σε μεταλλάξεις κατά την επιδιόρθωση του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε ποικιλία κλινικών συνδρόμων. Στη συνέχεια, ακολουθεί ξετύλιγμα της έλικας DNA στην περιοχή του κατεστραμμένου DNA μέσω διαφορετικών πρωτεϊνών. Δύο ελικάσες, η ERCC3 και η ERCC2, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια XPB και XPD, αντίστοιχα, και πρωτεΐνες του γονιδίου XPA και XPG (ERCC5) και της αντιγραφής της πρωτεΐνης A (RPA), παίζουν σημαντικό ρόλο. Οι ενδονουκλεάσες XPF (ERCC4) και XPG (ERCC5) δημιουργούν τον κλώνο του DNA και αποκόπτουν μικρά θραύσματα του προσβεβλημένου γονιδιώματος. Το ελάττωμα που δημιουργείται, επιδιορθώνεται χρησιμοποιώντας οδούς σύνθεσης DNA που περιλαμβάνουν τη DNA πολυμεράση και λιγάσες (Black, 2016).

Στην ανεπάρκεια NER, η προκαλούμενη από τη UV βλάβη, μπορεί να συσσωρευτεί, προκαλώντας νευρωνικό θάνατο και αναστέλλοντας τη μεταγραφή βασικών γονιδίων. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, οι βλάβες cPu μπορεί να συσχετίζονται με τις βλάβες του νευροεκφυλιστικού DNA στην ασθένεια XP. Συγκεκριμένα, αυτές οι βλάβες είναι: χημικώς σταθερές (Theruvathu, et al., 2007) (Das, et al., 2012), σχηματίζονται ενδογενώς σε κυτταρικό DNA θηλαστικών (Brooks, 2017), επιδιορθώνονται από το μονοπάτι NER και όχι από οποιαδήποτε άλλη γνωστή διαδικασία, όπως αποδεικνύεται από άλλες μελέτες (Kuraoka, et al., 2000) (Pande, et al., 2012), και είναι ικανές να αποκλείσουν έντονα, αλλά όχι πλήρως, τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II που εμφανίζεται σε κύτταρα από ασθενείς με XP (Brooks, et al., 2000). Επομένως, οι cPus οφείλονται εν μέρει για τον νευροεκφυλισμό που

υπέστησαν οι ασθενείς με XP, και οι οποίοι δεν έχουν την ικανότητα να επιδιορθώσουν αυτές τις βλάβες μέσω του NER (Brooks, 2008). Η παρουσία της παραμόρφωσης που προκαλείται από τις cPus στη δομή του DNA εμποδίζει τη σύνδεση παραγόντων μεταγραφής στο DNA, προκαλώντας μειωμένη ή μη ρυθμισμένη γονιδιακή έκφραση, που θα οδηγήσει στον νευρωνικό θάνατο (Abraham & Brooks, 2011). Ακόμη, οι cPus στα άτομα με XP μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα της επιδιόρθωσης του μηχανισμού BER ή άλλων πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και εμποδίζουν τη μεταγραφή, οδηγώντας στον μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό (Arczewska, et al., 2013).

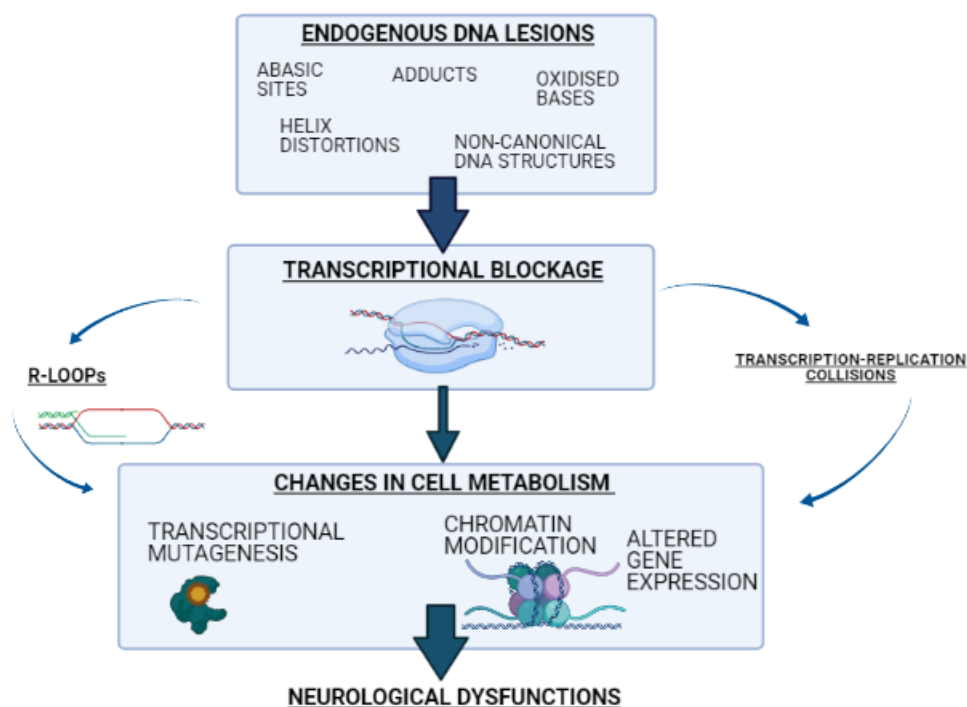
Το μιτοχονδριακό DNA παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των μελανοκυττάρων και τη μελάγχρωση, αλλά ταυτόχρονα, τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια ενδοκυτταρική πηγή των ROS, με αποτέλεσμα να υποδηλώνουν μια σημαντική συνιστώσα των συνδρόμων με ελαττωματική επιδιόρθωση DNA (Feichtinger, et al., 2014).

Όσον αφορά στη συγκέντρωση οξυγόνου σε κύτταρα με έλλειψη μηχανισμού επιδιόρθωσης DNA, έχουν ελεγχθεί τα επίπεδα cPus, συγκεκριμένοι δείκτες ριζικής βλάβης HO<sup>\*</sup> και οι 8-oxo-Pus, σε συνδυασμό και με την αξιολόγηση απόκρισης λιπιδαιμικών μεμβρανών. Βρέθηκε πως οι βλάβες των 8-oxo-dX σε συνθήκες υπεροξίας αυξάνονται περισσότερο σε σχέση με τις cPus. Ακόμη, σε κύτταρα με ανεπάρκεια της XPA βρέθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων σιδήρου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε έντονη απόκριση κυτταρικού στρες (Krokidis, et al., 2019).

Οι νευρολογικές ανωμαλίες που επηρεάζουν ασθενείς με CS είναι ποιοτικά διαφορετικές από αυτές που παρατηρούνται σε ασθενείς με ανεπάρκεια NER. Οι περισσότερες περιπτώσεις CS προκαλούνται από μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια, το CSB και το CSA, που εμπλέκονται στον μηχανισμό TC-NER (Lehrmann, 2003). Το CSA συμμετέχει στην απόκριση οξειδωτικού στρες και συσχετίζεται με την αναποτελεσματική επιδιόρθωση των οξειδωτικά επαγόμενων βλαβών στο DNA και συγκεκριμένα της 8-oxo-dG και της S-cdA (D'Errico, et al., 2007). Εντοπίστηκαν

αυξημένα επίπεδα βλαβών cPu και 8-οχο-Pu σε ελαττωματικά κύτταρα CSA σε συνθήκες υποξίας, καθώς και σε ελαττωματικά κύτταρα CSB. Η συσσώρευση των cPus υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες CS εμπλέκονται στην επιδιόρθωσή τους από τον μηχανισμό NER. Τόσο ο σχηματισμός cPus όσο και ο σχηματισμός των 8-οχο-Pus αυξήθηκε έντονα, καθώς η συγκέντρωση οξυγόνου μειωνόταν. Συγκρίνοντας τη συσσώρευση συνολικών 8-οχο-Pus και cPus, βρέθηκε 1,3 και 1,9 φορές υψηλότερο το επίπεδο για τις πρώτες βλάβες και στις δύο ομάδες κυττάρων. Επιπλέον οι βλάβες 8-οχο-Pus ποσοτικοποιήθηκαν και βρέθηκαν 1,2 και 1,7 φορές υψηλότερες από τις συνολικές βλάβες cPus (Krokidis, et al., 2020).

Οι cPus συσχετίστηκαν με την παθολογία που διέπει την εξασθενημένη σπερματογένεση σε ποντίκια ηλικίας 3 μηνών με έλλειψη ΧΡΑ. Στα ποντίκια αυτά, ανιχνεύτηκε υψηλότερη συσσώρευση της cdA στον εγκέφαλο, τα νεφρά, το ήπαρ και τους όρχεις των 1-, 3-, 6-, 24 μηνών. Η συσσώρευση ενδογενούς cPu εξαρτάται από την ηλικία. Στον εγκέφαλο, οι cPus μπορεί να οδηγήσουν σε νευρολογικές ανωμαλίες των ασθενών με ΧΡ. Οι βλάβες των cPus φαίνεται να συσσωρεύτηκαν στο DNA των όρχεων των ποντικών με έλλειψη της ΧΡΑ και ηλικία 3 μηνών, γεγονός που αργότερα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη σπερματογένεση (Mori, et al., 2019). Επομένως, ο σχηματισμός μεγάλων κενοτόπων στους όρχεις των ποντικών αυτών, θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα γεννητικά κύτταρα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται συνεχώς και οι cPus μπορεί να σταματούν τη μεταγραφή και την αντιγραφή σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, προκαλώντας έτσι αυτοφαγία ή κυτταρικό θάνατο των προσβεβλημένων κυττάρων των όρχεων που οδηγούν στο σχηματισμό μεγάλων κενών (Nakane, et al., 2020).



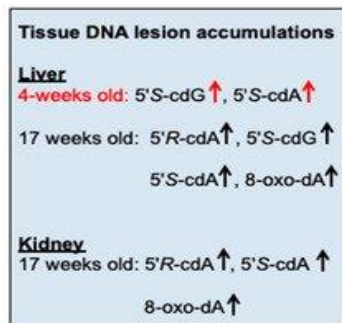
Εικόνα 4. Επιδράσεις των αλλοιώσεων του DNA που εμποδίζουν τη μεταγραφή σε νευρολογικές δυσλειτουργίες. Το μέγεθος του γονιδίου επηρεάζει την πιθανότητα της πολυμεράσης RNA να παρουσιάσει βλάβη αποκλεισμού μεταγραφής. Έτσι, οι βλάβες αυτές είναι πιο σχετικές με τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια, τα οποία έχουν μεγάλο μήκος. Εάν οι βλάβες δεν επιδιορθωθούν, μπορούν να προκαλέσουν διακοπή της πολυμεράσης RNA, με αποτέλεσμα τη περαιτέρω γονιδιωματική αστάθεια και αλλαγές στον κυτταρικό μεταβολισμό. Με τη σειρά τους, αυτά συνεπάγονται φλεγμονή, απομυελίνωση, γήρανση και κυτταρικό θάνατο. Τα χαρακτηριστικά αυτά των νευρολογικών δυσλειτουργιών σχετίζονται με ασθένειες με ανεπάρκεια NER (Kajitani, et al., 2020).

### 3.1.2 Καρκίνος και Γήρανση

#### 3.1.2.1 Κυκλοπουρίνες cPu

Η καρκινογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Χαρακτηρίζεται από την εξέλιξη των ανωμαλιών με την πάροδο του χρόνου προτού ένα κύτταρο γίνει κακοήθες, σε συνδυασμό με μια ποικιλία μεταλλάξεων DNA που διαδραματίζουν

κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της διαδικασίας (Dizdaroğlu, 2015). Αυξημένα επίπεδα ROS/RNS εμπλέκονται σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκίνου, που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου, προκαλώντας βλάβη σε βιομόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια μεμβράνης, σε διαφορετικά βιολογικά διαμερίσματα (Krokidis, et al., 2019).



Εικόνα 5. Διάγραμμα που δείχνει αλλαγές στις κυκλοπυρίνες στο μοντέλο ποντικών SCID ανάλογα με την ηλικία τους και το όργανο μελέτης (Krokidis, et al., 2019).

κυκλοποίηση του άνθρακα C5', οι οποίες καθιστούν τον έναν τύπο διαστερεομερούς πιο ευνοϊκό. Αυτό επηρεάζεται και από την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού NER στην επιδιόρθωση των διαστερεομερών (Chatgillaloglu, et al., 2019).

Σε έρευνα που έγινε για τον καρκίνο του μαστού σε γυναίκες, μετρήθηκαν τα επίπεδα των διαστερεομερών μορφών R και S των cdA και cdG στον υποδοχέα οιστρογόνου-α (Estrogen Receptor-α, ER-α) MCF-7 των καρκινικών κυττάρων του μαστού πριν και μετά από έκθεση σε δύο διαφορετικές συνθήκες: ιονίζουσες ακτινοβολίες και παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολουθήθηκε μία περίοδος που να επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA. Παρατηρήθηκε αύξηση στα μετρούμενα επίπεδα και των τεσσάρων cPus, είτε μετά από ακτινοβολία γ (δόση 5Gy), είτε με κατεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου (300μM) σε σύγκριση με τα μη

κατεργασμένα κύτταρα. Η ανάλυση LC-MS/MS έδειξε ότι η κυτταρική σειρά ER-α MCF-7 και αυτή των αρνητικών υποδοχέων οιστρογόνων είναι πολύ ευαίσθητες σε βλάβες που εντοπίζονται στο DNA που προκαλούνται από ακτινοβολία. Μετά από έκθεση σε ακτινοβολία γ (δόσης 5Gy) ή κατεργασία με υπεροξειδίο του υδρογόνου, και οι δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου είναι ελαττωματικές στην επιδιόρθωση των cPus στο δεδομένο χρονικό πλαίσιο. Ταυτόχρονα, εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα 8-oxo-dA σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα (Krokidis, et al., 2017) (Nyaga, et al., 2007).

### 3.1.2.2 Γονίδιο p53 και 8-oxo-dG

Οι ROS οδηγούν σε πιθανές βλάβες που προκαλούν μεταλλαξογένεση στο γονίδιο p53 καταστολής όγκου, το οποίο σε υπερέκφραση προκαλεί καρκίνο (Yu, et al., 2002). Ο παράγοντας καταστολής όγκου p53 είναι ένας κύριος ρυθμιστής των αντιδράσεων στο στρες. Εκφράζεται σε ολόκληρο το σώμα (Uhlen, et al., 2017) και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μοίρας των κυττάρων ως απόκριση στο στρες (Vousden & Prives, 2009). Μελέτες που συγκρίνουν ποντικούς σε ομάδα ελέγχου και ποντικούς με ανεπάρκεια p53 έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για απόπτωση σε έκθεση στην ακτινοβολία (Lowe, et al., 1993). Σε κύτταρα με ανεπάρκεια του p53, εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα της 8-oxo-dG (Ming, et al., 2014).

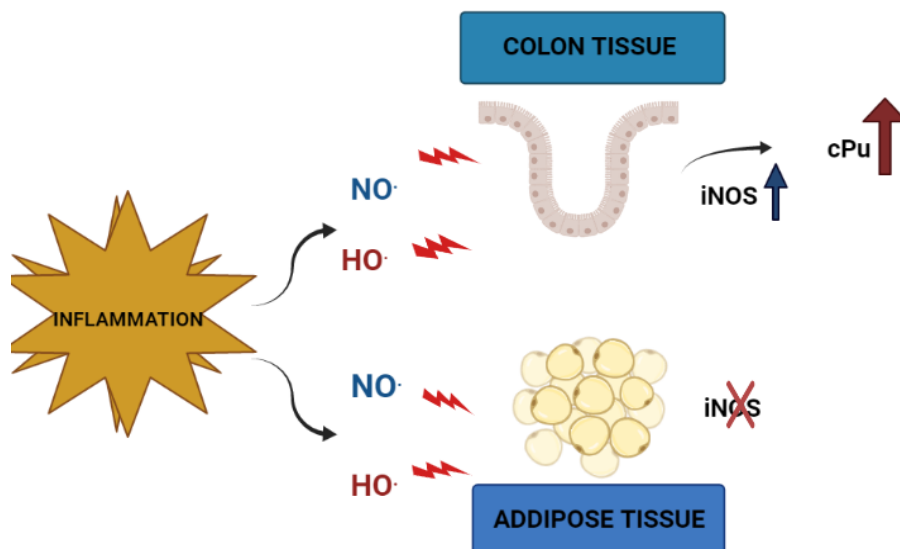
### 3.1.3 Αθηροσκλήρωση

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκαν τα προϊόντα βλάβης του DNA 5'R-cdA και 5'S-cdA ως πιθανοί βιοδείκτες κινδύνου και διάγνωσης για αθηροσκλήρωση. Μετρήθηκαν τα επίπεδα των R-cdA και S-cdA και της 8-OH-dG, στα ούρα ασθενών με αθηροσκλήρωση. Τα επίπεδα αυτά συγκρίθηκαν με υγιή άτομα, με τη χρήση LC/MS-MS. Στα ούρα των ατόμων που έπασχαν από αθηροσκλήρωση εντοπίστηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των R-cdA, S-cdA και 8-OH-dG, σε σχέση με τα υγιή άτομα. Συνεπώς, οι βλάβες αυτές μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και

επαναληψιμότητα και να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες κινδύνου και διάγνωσης για αθηροσκλήρωση (Jaruga, et al., 2012).

### 3.1.4 Καταστάσεις Χρόνιας Φλεγμονής

Δύο χρόνιες διαδικασίες φλεγμονής, η φλεγμονώδης διαταραχή του εντέρου (IBD) και η σοβαρή παχυσαρκία, μελετήθηκαν σε συνάρτηση με το οξειδωτικό στρες. Οι φλεγμονώδεις βιοψίες του παχέος εντέρου, που συλλέχθηκαν από ασθενείς με IBD, χαρακτηρίστηκαν από σημαντική αύξηση των cPus, παράλληλα με την υπερέκφραση της iNOS, της οποίας η δραστικότητα οδηγεί στο σχηματισμό HO<sup>•</sup>. Η συσσώρευση αυτών των μεταλλαξιόγνων προσθέτων μπορεί να συσχετίζεται με τη φλεγμονή στα άτομα που πάσχουν από αυτές τις χρόνιες ασθένειες. Αντιθέτως, στις βιοψίες λιπώδους ιστού, που συλλέχθηκαν από σοβαρά παχύσαρκους ασθενείς, τα μη ανιχνεύσιμα επίπεδα cPus και η έλλειψη επαγωγής iNOS, οδηγούν στον αποκλεισμό της πιθανής εμπλοκής αυτών των βλαβών στην υψηλότερη ευαισθησία στον καρκίνο που σχετίζεται με την παχυσαρκία. Ο πιθανός αιτιώδης ρόλος των cPus στην ογκογένεση που σχετίζεται με τις φλεγμονώδεις διαταραχές του εντέρου υποδηλώνει τη χρησιμότητά τους ως πρώιμους προγνωστικούς βιοδείκτες για καρκίνο του παχέος εντέρου που σχετίζεται με τις IBD (Masi, et al., 2020).



Εικόνα 6. Επίδραση της φλεγμονής σε ιστό εντερικών κυττάρων και σε λιπώδη ιστό και η ανίχνευση της iNOS, που σχετίζεται με κακοήγη νόσο.

### 3.1.5 Νόσος Wilson

Στη νόσο του Wilson, η προκαλούμενη από τη νόσο, μειωμένη απέκκριση χαλκού από ηπατοκύτταρα προκαλεί συσσώρευση ιόντων χαλκού. Η συσσώρευση αυτή ακολουθείται από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου μέσω της αντίδρασης τύπου Fenton. Η ανθρώπινη νόσος Wilson μελετήθηκε σε ποντίκια. Μετρήθηκαν οι τέσσερις βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, συμπεριλαμβανομένων των S-cdA και S-cdG. Τα αποτελέσματα έδειξαν αποτελεσματικότερο σχηματισμό ή/και λιγότερο εύκολη επιδιόρθωση άμεσων βλαβών των cPus που προκαλούνται από ROS, υποδηλώνοντας ότι η παρεκκλίνουσα συσσώρευση χαλκού μπορεί να διαταράξει τη γονιδιωματική σταθερότητα αυξάνοντας τις οξειδωτικά επαγόμενες βλάβες στο DNA και μεταβάλλοντας τις επιγενετικές οδούς της γονιδιακής ρύθμισης (Yu, et al., 2016).

### 3.1.6 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 και Προ-διαβήτης

Ο προ-διαβήτης είναι το προκλινικό στάδιο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (T2DM) με ενδιάμεση κατάσταση υπεργλυκαιμίας. Η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε μια κατάσταση οξειδωτικού στρες. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκύψει αύξηση στην αντίσταση στην ινσουλίνη, δυσλειτουργία των β-κυττάρων και να εμφανιστούν οι μακροχρόνιες επιπλοκές του διαβήτη. Σε ανθρώπους που πάσχουν από προ-διαβήτη έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα της 8-οχο-dG και της S-cdA. Τα υψηλά ποσοστά αυτών των βλαβών υποδηλώνουν την αυξημένη καταστροφή του DNA που προκαλείται από την οξείδωση, πριν από την καθιέρωση του T2DM (Kant, et al., 2016).

Σε πρόσφατη έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με ανεπάρκεια στο γονίδιο Ercc1 επιδιόρθωσης του DNA, ώστε να μελετηθεί η συσσώρευση των βλαβών του ενδογενούς DNA στον μεταβολισμό ενέργειας, στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στη λειτουργία των β-κυττάρων. Το προϊόν του γονιδίου Ercc1 λειτουργεί στον μηχανισμό επιδιόρθωσης NER και απαιτείται για την αποκατάσταση βλαβών στο DNA που



προκαλούνται από την ακτινοβολία UV. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με την ενδονουκλεάση XPF (γνωστή ως ERCC4). Η ERCC4 καταλύει την τομή 5' στη διαδικασία εκτομής της βλάβης του DNA. Τα ποντίκια με έλλειψη στο Ercc1 εμφάνισαν καταστολή του μεταβολισμού ενέργειας, μείωση της ινσουλίνης στο πλάσμα και παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η νηστεία, τους προκάλεσε υπογλυκαιμία που ήταν το αποτέλεσμα της αυξημένης απόρριψης γλυκόζης. Ακόμη, παρουσίασαν δυσλειτουργία στη περιοχή β-κυττάρων, μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και αυξημένους δείκτες βλάβης στο DNA (Huerta Guevara, et al., 2021).

Ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης σχετίζεται με πολλές επιπλοκές στην υγεία για μια μητέρα και το έμβρυό της. Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξή του. Ακόμη και μια ήπια μορφή υπεργλυκαιμίας μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στο DNA της μητέρας, η οποία μπορεί να γίνει αντληπτή από το αυξημένο επίπεδο της 8-OHdG/8-oxo-dG. Επιπλέον, το αυξημένο αυτό επίπεδο βλαβών στην πρώιμη κύηση πιθανώς να διεγείρει την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη κύησης. Σε περίπτωση που τα υψηλά επίπεδα της 8-OHdG ή της 8-oxodG παραμείνει και μετά την εγκυμοσύνη, ίσως να προκαλέσει ανάπτυξη του T2DM αργότερα (Urbaniak, et al., 2020).

### 3.2 Ακτινοβολία βαρέων ιόντων στο διάστημα

Οι διαστημικές αποστολές μεγάλης διάρκειας εκτός της χαμηλής τροχιάς της γης εκθέτουν τους αστροναύτες σε μια συσσωρευτική δόση ακτινοβολίας σωματιδίων υψηλής ενέργειας, ειδικά σε εξαιρετικά βλαβερή ακτινοβολία βαρέων ιόντων, η οποία ενέχει σημαντικό κίνδυνο για την υγεία των αστροναυτών. Μελετήθηκαν ποσοτικά οι τέσσερις cPus και η 8-OH-G μετά από έκθεση σε ακτίνες γ και ακτινοβολίας σιδήρου (iron radiation). Τα ποντίκια στην ομάδα ελέγχου δεν ακτινοβολήθηκαν. Η έκθεση σε ακτινοβολία σιδήρου είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα των R-cdG, S-cdG, S-cdA και της 8-OH-G των εκτεθειμένων ποντικιών, σε σχέση με τα ποντίκια στην ομάδα ελέγχου και σε εκείνα που εκτέθηκαν

σε ακτινοβολία  $\gamma$ . Η αξιολόγηση των BER και NER έδειξε μείωση της επιδιόρθωσης τόσο στο RNA όσο και στα επίπεδα πρωτεΐνης. Προτείνεται ότι η μειωμένη ρύθμιση των οδών BER και NER συμβάλλει στη δημιουργία συνεχιζόμενων βλαβών σε βάσεις DNA πολύ καιρό μετά την έκθεση σε ακτινοβολία και έχει επιπτώσεις σε χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των γαστρεντερικών παθήσεων μετά από έκθεση σε ακτινοβολία βαρέων ιόντων κατά τη διάρκεια του διαστημικού ταξιδιού (Suman, et al., 2020).

## 4. Μελλοντικές Εφαρμογές

### 4.1 Βλάβες στο DNA από την υπεριώδη ακτινοβολία UV

Τα πρόσθετα (adducts) προκύπτουν με την επίδραση τοξικών χημικών ουσιών και της υπεριώδους ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας UV. Προκαλούνται από τη χημική τροποποίηση βάσεων στο DNA ή των αμινοξέων σε πρωτεΐνες (Bieler, et al., 1999). Τα DNA-πρόσθετα μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις είτε κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης του DNA, είτε κατά την αντιγραφή του DNA, στη θέση που έχει συμβεί η προσθήκη (Andziak, et al., 2006). Η ακτινοβολία UVA μπορεί επίσης να προκαλέσει άμεσα διμερή κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης (CPDs) στο DNA (Jiang, et al., 2009) και να οδηγήσει στον σχηματισμό φωτοπροϊόντων πυριμιδίνης (6-4) πυριμιδόνης (6-4PP) (Passaglia Schuch, et al., 2009). Τα CPDs και τα 6-4PPs εμποδίζουν τη μεταγραφή του RNA και οδηγούν σε αναποτελεσματική ενεργοποίηση του γονιδίου p53 (Batista, et al., 2009). Τα CPDs σχηματίζονται από δύο ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα C5 και C6 των γειτονικών βάσεων του αζώτου. Έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διαστερομερή δακτυλίου που αποτελείται από τέσσερα στοιχεία. Τα 6-4PPs σχηματίζονται από έναν ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του 5'-άκρου του άνθρακα C6 και του 3'-άκρου του άνθρακα C4, γειτονικών πυριμιδινών μέσω καταστάσεων μεταφοράς φορτίου και αναδιατάξεων που συμβαίνουν όταν στο άκρο 3' βρίσκεται θυμίνη (T) ή κυτοσίνη (C), αντίστοιχα (Markovitsi, 2016).

Η ακτινοβολία UVB προκαλεί περισσότερα CPDs από την UVA σε ισομεταγενείς δόσεις. Όμως, τα φωτοπροϊόντα DNA που προκαλούνται από την UVA είναι δυνητικά πιο μεταλλαξιγόνα από αυτά που προκαλούνται από την UVB. Αυτό συμβαίνει λόγω της αναποτελεσματικής ενεργοποίησης των p53 και p95, που συνεπάγεται αδιάκοπη αντιγραφή του DNA. Έτσι, το προσβεβλημένο DNA διαιωνίζεται και συνεπάγεται συσσώρευση των μεταλλάξεων (Rünger, et al., 2012). Η ηλιακή ακτινοβολία μετατρέπει ένα κλάσμα 6-4PP σε ισομερή Dewar και προκαλεί το σχηματισμό της 8-oxo-G (Kozmin, et al., 2003). Παρόλο που τα 6-4PPs ( $t_{1/2} \sim 2-4$  ώρες) αφαιρούνται από τον μηχανισμό NER με σημαντικά ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με τα CPDs ( $t_{1/2} \sim 24$

ώρες), εντοπίστηκαν επίσης κατά την έκθεση σε ακτινοβολία UVA σε μοντέλα κυττάρων με ανεπάρκεια επιδιόρθωσης DNA (Cortat, et al., 2013). Δεν έχει εντοπιστεί παραγωγή των CPDs με ακτινοβολία UVA μεγαλύτερη των 385nm (Sethi, 2017).

Μελέτες που αφορούν στην μέτρηση της ημίσειας ζωής των cPus σε ζώντες οργανισμούς δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής.

## 4.2 Αντιοξειδωτικές Ουσίες και η Επίδρασή τους στον Οργανισμό

### 4.2.1 Σουλφοραφάνη

Τα λαχανικά περιέχουν ορισμένα μόρια που είναι ικανά να προκαλέσουν ξενοβιοτικό μεταβολισμό και ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η κατανάλωση πράσινων και κίτρινων λαχανικών (φυλλώδη λαχανικά, κουνουπίδι, καρότα, μπρόκολο, λαχανάκια Βρυξελλών κ.λπ.) ίσως δρα προστατευτικά στην εμφάνιση ορισμένων τύπων καρκίνου (Colditz, et al., 1985). Από τα εκχυλίσματα μπρόκολου εντοπίστηκε ένα ισοθειοκυανικό και ταυτοποιήθηκε ως 1-ισοθειοκυανάτο-(4R)-(μεθυλοσουλφινυλο)βουτάνιο ή αλλιώς, ως σουλφοραφάνη (Zhang, et al., 1992). Η σουλφοραφάνη περιγράφεται ως «ισχυρός επαγωγέας ενζύμων φάσης II», τα οποία αποτελούνται από αντιοξειδωτικά και συζευκτικά ένζυμα και προάγουν την αντιοξειδωτική απόκριση και την αποτοξίνωση των κυττάρων (Χυ, et al., 2005).

Η σουλφοραφάνη αναγνωρίστηκε ως ισχυρός επαγωγέας της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στον εντοπισμό του μονοπατιού Keap1/Nrf2 ως έναν τρόπο της δράσης της. Υπό βασικές συνθήκες οξειδοαναγωγής, ο πυρηνικός παράγοντας 2 που σχετίζεται με τον ερυθροειδή 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) αποσπάται από ένα διμερές πρωτεΐνης 1 (Keap1) που μοιάζει με Kelch, και αμέσως γίνεται ουμπικιτίνωση από τη στρατολόγηση της E3 λιγάσης ουμπικιτίνης Cul3, με αποτέλεσμα την αποδόμηση του Nrf2 μέσω του πρωτεασώματος (Silva-

Palacios, et al., 2018). Σε συνθήκες οξειδωσης, ορισμένες ρυθμιστικές κυστεΐνες του Keap1 (όπως cys151, cys273 και cys288) οξειδώνονται και προάγουν μια αλλαγή στη διαμόρφωση που οδηγεί στην απελευθέρωση του Nrf2 και αποτρέπει την αποδόμησή του (Dinkova-Kostova, et al., 2017). Το Nrf2, αφού ελευθερωθεί, απαιτεί ορισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από κινάσες, όπως η MAPK ή η PKC. Οι μετα-μεταφραστικές αυτές τροποποιήσεις σχετίζονται με την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 (Bhakkiyalakshmi, et al., 2015). Όταν το Nrf2 εισαχθεί στον πυρήνα, σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με μικρές πρωτεΐνες Maf (MafG, MafK, MafF). Έτσι, αποκτά την ικανότητα δέσμευσης στο DNA, το οποίο ονομάζεται στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element, ARE) (Silva-Palacios, et al., 2018), με αποτέλεσμα τη μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης, όπως η NQO1 (quinone dehydrogenase 1), η HO-1 (Οξυγενάση της αίμης 1) και η γ-GCL (γ-glutamylcysteine ligase) (Guerrero-Beltrán, et al., 2012). Πειράματα *in vivo* έχουν δείξει μία αύξηση στην έκφραση του Nrf2, καθώς και στην πυρηνική του μετατόπιση, μετά από θεραπεία με σουλφοραφάνη (Bai, et al., 2013).

Παρ' όλο που η χορήγηση της σουλφοραφάνης σχετίζεται κυρίως με την αντιοξειδωτική απόκριση, έχει βρεθεί πως συσχετίζεται και με την φλεγμονώδη απόκριση. Συγκεκριμένα, εμπλέκεται στο μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β (NF-κΒ). Η οδός NF-κΒ αποτελεί τον κλασικό μηχανισμό σηματοδότησης σε καταστάσεις φλεγμονής και δρα σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Το μονοπάτι NF-κΒ εμπλέκεται στη μεταγραφή και στη ρύθμιση διαφορετικών προ- και αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, ανάλογα με τα ερεθίσματα που θα δώσει ο ενεργοποιητής. Το NF-κΒ ενεργοποιείται από δύο διαφορετικές οδούς: τη «κανονική» και την «εναλλακτική». Οι διαφορετικές αυτοί οδοί αναγνωρίζονται από την παρουσία διαφορετικών αναστολέων: από την οικογένεια κινάσης IκΒ (μεταγραφικοί καταστολείς που σταματούν το NF-κΒ στο κυτοσόλιο) και την οικογένεια IKK (πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση κινάσης IκΒ με επακόλουθη αποδόμηση) (Sun, 2017). Η αναστολή του NF-κΒ φάνηκε να είναι υπεύθυνη για την αντιφλεγμονώδη δράση της σουλφοραφάνης καθώς υπήρχε μείωση της έκφρασης NF-κΒ και της φωσφορυλίωσης της IκΒ κινάσης (IKK). Ακόμη, συνέβαλε στη μείωση

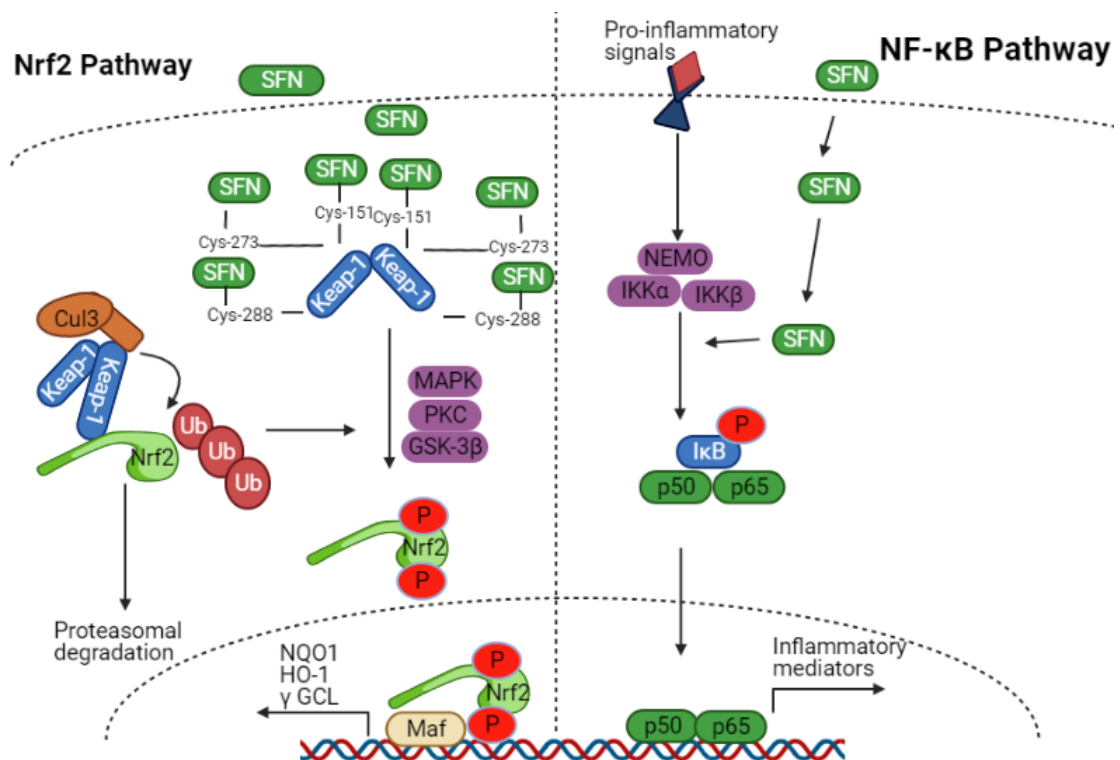
των επιπέδων της iNOS, της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) (Negi, et al., 2011). Η έκκριση αρκετών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι IL-2, IL-4, IL-6 και IFN-γ μπορεί να ανασταλεί με τη χορήγηση σουλφοραφάνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, υποδηλώνοντας ότι το NF-κΒ θα μπορούσε να αλληλοεπιδρά άμεσα με τη σουλφοραφάνη (Checker, et al., 2015).

Το ένζυμο NQO1 παρέχει σημαντικές αντιοξειδωτικές λειτουργίες χάρη στον υποχρεωτικό μηχανισμό αναγωγής δύο ηλεκτρονίων που επιτρέπει στις κινόνες να συμμετέχουν στον οξειδωτικό κύκλο και στην παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων οξυγόνων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το NQO1 είναι εξαιρετικά επαγωγίμο και η αυξημένη επαγωγή του προστατεύει τα ζώα και τα κύτταρα τους από το οξειδωτικό στρες (Dinkova-Kostova, et al., 2010). Η σουλφοραφάνη θεωρείται ένας από τους πιο ισχυρούς φυτοχημικούς επαγωγείς του NQO1. Ως εκ τούτου, οι επιρροές της διατροφογενωμικής της σουλφοραφάνης SFN συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων (Fahley & Kensler, 2008).

Η σουλφοραφάνη έχει αποδειχθεί ότι διαμορφώνει διάφορες κυτταρικές οδούς προκειμένου να ενεργοποιήσει ποικίλες προστατευτικές αποκρίσεις και μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική. Από τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα που μπορούν να τεθούν υπό έρευνα από την επιστημονική κοινότητα. Για παράδειγμα η αντιοξειδωτική δράση της σουλφοραφάνης, πιθανώς να μειώνει την παραγωγή των ROS και αλυσιδωτά να οδηγηθούμε σε μείωση της iNOS, και συνεπώς στη προστασία των κυττάρων από το σχηματισμό HO<sup>•</sup>. Ακόμη, έχει βρεθεί σε έρευνα για τον καρκίνο των πνευμόνων (Li, et al., 2012), υπερέκφραση του γονιδίου p53, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μετάλλαξη του. Μαζί με την υπερέκφραση του γονιδίου p53, εντοπίστηκαν και μεταλλάξεις στο διμερές της πρωτεΐνης 1 (Kear1). Επομένως, θα μπορούσαμε να πούμε πως θα υπάρξει βλάβη στο μονοπάτι Kear1/Nrf2 και συνεπώς θα μειωθεί και η αντιοξειδωτική απόκριση του Nrf2. Συμπερασματικά, η σουλφοραφάνη μπορεί να αποτελέσει εν δυνάμει μόριο για μελέτη της προστατευτικής της δράσης έναντι των

ROS που παράγονται στον οργανισμό μετά από επίδραση από υπεριώδη ακτινοβολία UV.

Η δράση της σουλφοραφάνης ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα ποσοστά παραγωγής cPus στα κύτταρα, δεν έχει αναφερθεί μέχρις στιγμής.



Εικόνα 7. Επιδράσεις της σουλφοραφάνης στις οδούς Nrf2 και NF-κB. Με την εισαγωγή της σουλφοραφάνης στο κύτταρο, αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας άμεσα πολλές κυτταρικές οδούς. Διαδρομή Nrf2: Πρόκειται για μία από τις πιο σημαντικές οδούς που επηρεάζονται από τη σουλφοραφάνη και είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική απόκριση και τον ξενοβιοτικό μεταβολισμό (αριστερό πλαίσιο). Υπό βασικές συνθήκες, το Nrf2 καταστέλλεται από το Keap1 και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα. Όταν οι ρυθμιστικές κυτοσίνες Keap1 οξειδώνονται, το Nrf2 απελευθερώνεται και επιδέχεται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Αυτό οδηγεί στη πυρηνική του μετατόπιση, όπου διμερίζεται με μικρές πρωτεΐνες Maf. Το Nrf2 μπορεί στη συνέχεια να δεσμευτεί σε αντιοξειδωτικά στοιχεία απόκρισης, δηλαδή στα ARE. Διαδρομή NF-κB: Το μονοπάτι NF-κB μπορεί επίσης να ρυθμιστεί από τη σουλφοραφάνη. Είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της φλεγμονώδους

απόκρισης. Σε βασικές συνθήκες, το NP-κΒ διαχωρίζεται στο κυτοσόλιο με την ΙκΒ. Όταν προφλεγμονώδεις συνδέτες συνδέονται με τους υποδοχείς του, η οικογένεια πρωτεϊνών ΙΚΚ φωσφορυλιώνει την ΙκΒ για να την αποικοδομήσει μέσω του πρωτεοσώματος. Έτσι ο μηχανισμός NP-κΒ μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να προάγει τη μεταγραφή αρκετών φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η σουλφοραφάνη είναι ικανή να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση ΙκΒ και την πυρηνική μετατόπιση του NF-κΒ. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της σουλφοραφάνης σε αυτό το μονοπάτι δεν είναι πλήρως γνωστός (Santín-Márquez, et al., 2019).

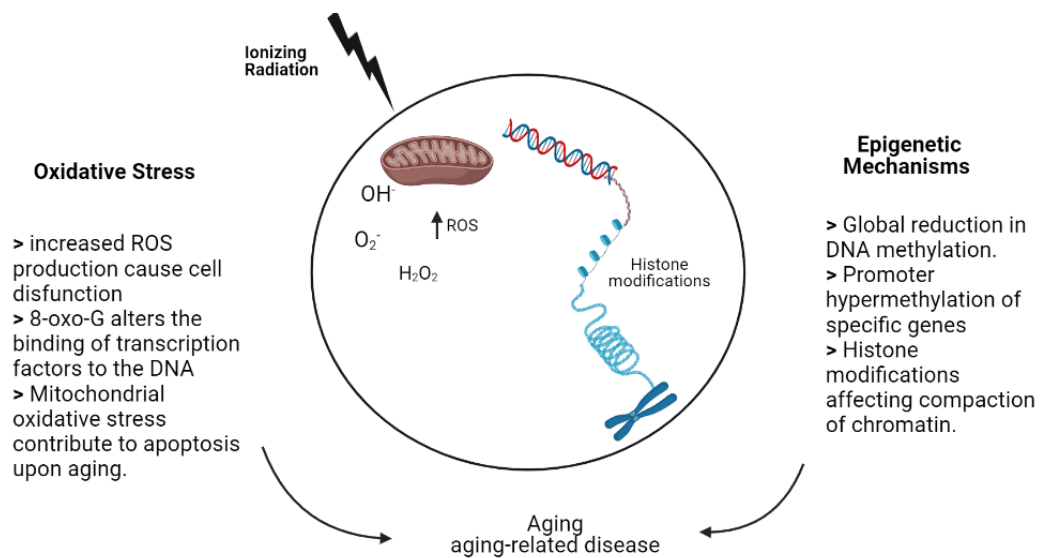
#### 4.2.2 Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη, ως στυλβενοειδές, έχει δομή C6-C2-C6 με τρεις ομάδες υδροξυλίου. Χρησιμεύει ως προστατευτικό από τις υπεριώδεις ακτινοβολίες (UV) στα φυτά και δρα ως φυτοαλεξίνη σε αυτά (Vermeirris & Nicholson, 2006). Βρίσκεται σε διατροφικές πηγές όπως είναι το κόκκινο κρασί, τα μούρα, τα σταφύλια, τα φιστίκια, και σε ορισμένες φυτικές θεραπείες. Μεταξύ των άλλων ιδιοτήτων της, ξεχωρίζει η αντιοξειδωτική της δράση (Oomen, et al., 2009). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη ασκεί τα αποτελέσματά της ενεργοποιώντας οδούς σηματοδότησης πρωτεϊνών κινάσης όπως η ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPk) και η πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο (p38-Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK), καθώς και μέσω του μονοπατιού Sirtuins (SIRT) που δρουν ως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές οδοί. Ωστόσο, η ρεσβερατρόλη μπορεί να δράσει και μέσω άλλων οδών σηματοδότησης. Έτσι καταφέρνει να αλλάξει διάφορα αγγελιοφόρα μόρια, τροποποιώντας τον μεταβολισμό των κυττάρων (Cetrullo, et al., 2015).

Η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης οφείλεται στην ικανότητά της να καθαρίζει ελεύθερες ρίζες και μέταλλα. Μπορεί να προστατεύσει τις βλάβες στο DNA που προκύπτουν λόγω ριζών υδροξυλίου HO<sup>\*</sup> που παράγονται από την αντίδραση τύπου Fenton. Ακόμη, μπορεί να παρεμποδίσει την ενεργοποίηση του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ (Leonard, et al., 2003). Η ρεσβερατρόλη μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την παραγωγή HO-1 για την αντιοξειδωτική προστασία του



οργανισμού και να καταστείλει την iNOS, και την υπερέκφραση της HO-1 (Huang, et al., 2011). Έχει επίσης βρεθεί, πως το συμπλήρωμα ρεσβερατρόλης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, μειώνει το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται από τη κακή διατροφική σίτιση της μητέρας, τόσο στην ίδια τη μητέρα, όσο και στο έμβryo (Vega, et al., 2016).



Εικόνα 8. Επιγενετικοί μηχανισμοί και οξειδωτικό στρες (OS) που σχετίζονται με τη γήρανση. Οι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες συμβάλουν στη δημιουργία οξειδωτικού στρες, και κατά συνέπεια στην αύξηση των επιπέδων δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Τα μιτοχόνδρια ενεργούν ως κύρια πηγή παραγωγής ROS. Η ανεξέλεγκτη παραγωγή ROS εμπλέκεται στη γήρανση και τις ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Εκτός αυτού, το ROS είναι ένας παράγοντας διαγονιδιακής διαμόρφωσης της δραστηριότητας. Οι επιγενετικές αλλαγές, για παράδειγμα, η μείωση της μεθυλίωσης του DNA ή η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων, μεταξύ άλλων, συνδέονται επίσης με τη γήρανση (Guillaumet-Adkins, et al., 2017).

Οι ελεύθερες ρίζες ROS και το οξειδωτικό στρες έχουν εμφανιστεί ως νέοι παράγοντες, διαμορφώνοντας το επιγενετικό τοπίο ολόκληρου του γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, μπορούν να δημιουργήσουν μεταλλάξεις στο DNA μέσω της τροποποίησης αυτού, της τροποποίησης των ιστονών, των RNA μεταγράφων και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, με σημαντικές συνέπειες στο DNA του πυρήνα και των μιτοχονδρίων (Kietzmann, et al., 2017). Είναι σημαντική και η αντίθετη δράση της επιγενετικής, αυτή της γενωμικής/γονιδιωματικής, μέσω της οποίας μπορούμε να

επιδράσουμε σε βλάβες και μεταλλάξεις του γονιδιώματος χωρίς να το επηρεάσουμε. Στην προκειμένη περίπτωση, μέσω της διατροφογενωμικής, η λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως αυτό της ρεσβερατρόλης υπόσχεται πολλά στη βελτίωση του προφίλ μιας νόσου που προέρχεται από τις ελεύθερες ρίζες ή ακόμη και στη διατήρηση του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, η ρεσβερατρόλη ίσως μπορεί να αντισταθμίσει την βλαβερή εξέλιξη μιας νόσου, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευρολογικές παθήσεις, οι μιτοχονδριακές παθήσεις και καταστάσεις του οργανισμού που περιλαμβάνουν φλεγμονή, όπως για παράδειγμα, ο καρκίνος. Η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης μπορεί να μελετηθεί και κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, μετά από ακτινοβολία με UV και σε θηλαστικά *in vivo*. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει κάποια βιβλιογραφική αναφορά που να αποδεικνύει αυτή της τη δράση, παρ' όλο που φαίνεται, πως θα μπορούσε να συμβάλλει θετικά στην αντιμετώπιση των βλαβών στο DNA. Λόγω της φωτοπροστατευτικής της δράσης που ασκεί στα φυτά, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ουσία στην προστασία από την ακτινοβολία UV και στα θηλαστικά.

Η δράση της ρεσβερατρόλης ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα ποσοστά παραγωγής cPus στα κύτταρα, δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής.

#### **4.2.3 Ραπαμυκίνη**

Η ραπαμυκίνη είναι ένας αναστολέας του αναστολέα τεμσιρόλιμους (mTOR). Ο mTOR έχει σημαντικές ρυθμιστικές λειτουργίες στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στον μεταβολισμό και στη διαδικασία της γήρανσης και είναι ευαίσθητος σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών και ενδοκρινικών ερεθισμάτων (Arriola Arpele & Lamming, 2016). Η ραπαμυκίνη μειώνει τη συσσώρευση ROS που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία UVB και προάγει την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων (Qin, et al., 2018).

Ο καταστολέας όγκου p53 εμπλέκεται στις κυτταρικές διεργασίες της απόπτωσης, της νέκρωσης, της γήρανσης και της αυτοφαγίας. Επίσης, αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της οδού απόκρισης βλάβης του DNA (Mrakoncic & Fröhlich, 2018). Το HSP27 είναι μέλος μιας οικογενείας πρωτεϊνών θερμικού σοκ και προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα HaCat. Η θεραπεία με ραπαμυκίνη μείωσε την έκφραση του p53 και του φωσφορυλιωμένου HSP27, καθώς και τα επίπεδα γονοτοξικής και οξειδωτικής κυτταρικής καταπόνησης στους πρωτογενείς ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (HDFs), που προκλήθηκαν από υπεριώδη ακτινοβολία UVA. Τα αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή αντιοξειδωτική και φωτοπροστατευτική δράση της ραπαμυκίνης, παρά τις πολλές καλά τεκμηριωμένες ανεπιθύμητες ενέργειες της ραπαμυκίνης ως ανοσοκατασταλτικού (Bai, et al., 2021). Η ραπαμυκίνη, είναι ακόμη μία αντιοξειδωτική ουσία με εν δυνάμει μελέτη στο χώρο της καταπολέμησης των ελευθέρων ριζών, καθώς, σαν αναστολέας του mTOR εμπλέκεται σε πάρα πολλές μεταβολικές διαδικασίες που σχετίζονται με την οξειδωτική βλάβη και την πρόκληση ασθενειών.

Η δράση της ραπαμυκίνης ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα ποσοστά παραγωγής cPus στα κύτταρα, δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής.

#### 4.2.4 Μετφορμίνη

Η μετφορμίνη (*N, N*-dimethylbiguanide) είναι μια διγουανίδη, που προέρχεται από το φυτό *Galega officinalis* (Violett, et al., 2012). Η χορήγηση της μετφορμίνης σε κύτταρα HaCaT που ακτινοβολήθηκαν με UVB, οδήγησε σε μείωση των ROS. Αυτό συνέβη μέσω της άμεσης αναστολής των ενζύμων σχηματισμού ROS όπως η NADPH οξειδάση και μέσω της επακόλουθης απενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2 MAPK για την προστασία των κυττάρων από την απόπτωση. Η μετφορμίνη, ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, παρέχει μια νέα προσέγγιση και νέες πληροφορίες για τις δερματικές διαταραχές που προκαλούνται από την UVB και πιθανούς στόχους για θεραπευτικές παρεμβάσεις στοχεύοντας πιθανές πηγές ROS (Ribeiro, et al., 2020).

Σε έρευνα που αφορά στη παροδική παγκόσμια εγκεφαλική ισχαιμία, βρέθηκε πως ο μηχανισμός AMPK ενεργοποιήθηκε από τη μετφορμίνη στους νευρώνες του ιππόκαμπου και προστάτευε τα κύτταρα μέσω της αναστολής της φλεγμονής και της επαγωγής των αντιοξειδωτικών οδών Nrf2. Η αναστολή του μηχανισμού AMPK μπορεί να αυξήσει τη φλεγμονή και να μειώσει την ενδογενή παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Επομένως, η μετφορμίνη μέσω της ενεργοποίησης του AMPK μπορεί να προστατεύσει τα νευρωνικά κύτταρα μέσω της ρύθμισης των φλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών οδών (Ashabi, et al., 2015).

Η δράση της μετφορμίνης ως αντιοξειδωτικός παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα ποσοστά παραγωγής cPus στα κύτταρα, δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής.

#### 4.2.5 Πολυφαινόλες

##### 4.2.5.1 Φλαβονοειδή

Τα φυτά της οικογενείας Brassicaceae, περιλαμβάνουν τα υποείδη *Brassica oleraceae* (π.χ. κουνουπίδι, λάχανο, ραπανάκια Βρυξελλών, μπρόκολο) και *Brassica rapa* (π.χ. γογγύλια). Τα φλαβονοειδή του Kale αποτελούνται κυρίως από παράγωγα φλαβονολών, τα οποία αναφέρονται ότι αποτελούνται από διάφορους γλυκοζίτες ισοραμμεντίνης, κουερκετίνης ή καμπεφερόλης (Olsen, et al., 2009). Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών προκύπτει από συζεύξεις με ποικίλους αριθμούς υδροξυλομάδων. Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως είδη που δίνουν υδρογόνο ή ηλεκτρόνια, καθώς και ενάντια των ROS (Duthie, et al., 2000). Η επίδραση της ακτινοβολίας UVB στα φυτά Brassicaceae, τροποποίησε τις ποσότητες γλυκοσίδης και του υδροξυκιναμικού οξέος αυξάνοντας τις ενώσεις που έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Neugart & Bumke-Vogt, 2021). Σε άλλη μελέτη, μετρήθηκε η ποσότητα κουερσετίνης στα φύλλα του *Dendrobium officinale* μετά από ακτινοβολία UVB. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης της κουερσετίνης στα φύλλα των ακτινοβολημένων φυτών σε σχέση

με την ομάδα ελέγχου. Το μέγιστο συγκέντρωσης της κουερσετίνης εκδηλώθηκε τη δεύτερη μέρα, στην ομάδα υψηλής ακτινοβολίας και το μέγιστο στην ομάδα χαμηλής ακτινοβολίας με UVB τη τέταρτη μέρα. Μετά από αυτό, η περιεκτικότητα σε κουερσετίνη σταδιακά μειώθηκε και σταθεροποιήθηκε, αλλά ήταν ακόμη υψηλότερη από εκείνη της ομάδας ελέγχου (Zhu, et al., 2019).

Μία άλλη ερευνητική ομάδα σχεδίασε ένα μείγμα αποτελούμενο από κουερσετίνη, λουτεολίνη και λυκοπένιο και χρησιμοποίησε το *Caenorhabditis elegans* ως μοντέλο για τη μελέτη της αντοχής αυτών των φυσικών και χημικών ουσιών στην ακτινοβολία UVB. Επιβεβαίωσαν πως η κουερσετίνη, καθώς και το παραπάνω μείγμα, μπορούν να αυξήσουν την αντοχή του *Caenorhabditis elegans* στην ακτινοβολία UVB, γεγονός που εκτιμήθηκε και από τα επίπεδα ROS και επομένως, μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες (Li, et al., 2020). Η μελέτη των παραπάνω ιδιοτήτων των φλαβονοειδών *in vivo* και στα θηλαστικά, μπορεί να ανακαλύψει ένα προστατευτικό μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των ουσιών, έναντι της βλάβης από την υπεριώδη ακτινοβολία UV.

#### 4.2.5.2 Φισετίνη

Η φισετίνη είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές με χημικό τύπο 3,7,3',4'-τετραϋδροξυφλαβόνη. Βρίσκεται σε φρούτα και λαχανικά όπως είναι το μήλο, η φράουλα, το κρεμμύδι και ο λωτός και έχει αντιοξειδωτική δράση (Arai, et al., 2000). Η τοπική δερματική εφαρμογή της φισετίνης σε ποντίκια που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία UVB μείωσε αποτελεσματικά τη φλεγμονή και κατέστειλε το επίπεδο διαφόρων φλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η TNF- $\alpha$ , η IL-1 $\beta$  και η IL-6 (Pal, et al., 2014). *In vivo* μελέτη αποκάλυψε ότι τα ποντίκια που έλαβαν αγωγή με τζελ φισετίνης με δυαδικά αιθοσώματα προκάλεσαν σημαντική μείωση στα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτοκινών TNF- $\alpha$  και IL-1 $\alpha$  σε σύγκριση με τους ποντικούς που εκτέθηκαν στην υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά δεν έλαβαν φισετίνη. Ακόμη, οι βιοχημικές μελέτες έδειξαν μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών σε ποντίκια που υποβλήθηκαν στην αγωγή με τα δυαδικά αιθοσώματα φισετίνης, με αυξημένη σύνθεση φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων για προστασία από την έκθεση σε UV

ακτινοβολία (Moolakkadath, et al., 2019). *In vivo* μελέτη σε ποντίκια με τοπική εφαρμογή της φισετίνης, μείωσε το δερματικό ερύθημα που προκαλείται από την UVB. Επίσης, μπορεί να μετριάσει τη βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή και να αναστέλλει την επαγόμενη από την UVB, έκφραση των MMPs, της COX-2, της IL-6 και του NF-κB, προστατεύοντας έτσι το δέρμα από τις ρυτίδες και το ερύθημα. Η φισετίνη φάνηκε να αυξάνει επίσης την έκφραση του Nrf2 στο δέρμα των ποντικών και να αναστέλλει αποτελεσματικά τη βλάβη της ακουαρίνης και της φιλαγκρίνης που προκαλείται από την ακτινοβολία UV (Wu, et al., 2017).

#### 4.2.5.3 Εκχυλίσματα φύλλων σταφυλιού και φύλλων μέντας

Σε πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η χρήση εκχυλίσματος φύλλων σταφυλιού *Vitis vinifera L.* ως αντιοξειδωτικού παράγοντα έναντι της ακτινοβολίας UVA και UVB σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (HaCaT). Οι πολυφαινολικές ενώσεις από φύλλα αμπέλου έδειξαν προστατευτική δράση *in vitro* έναντι της δερματικής βλάβης που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία UV (Marabini, et al., 2020).

Σε μία άλλη έρευνα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων μέντας, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, σε DNA από θύμο αδένα μοσχαριού. Το εκχύλισμα απέτρεψε την προσβολή του DNA που δημιουργείται από την ακτινοβολία UV. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε και βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη BHA (400μM) για σύγκριση της αντιοξειδωτικής του δράσης. Βρέθηκε πως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) παρείχε προστασία 54%, ενώ το εκχύλισμα μέντας έδειξε προστασία 72%. Το εκχύλισμα φύλλων μέντας έδειξε μια πολλά υποσχόμενη προστατευτική δράση του DNA έναντι των βλαβών στο DNA που προκλήθηκαν από τις ακτίνες UV (Kowti, et al., 2020).

#### 4.2.5.4 Ανθοκυανίνες και Κατεχίνες

Η χορήγηση εκχυλίσματος ροδιού στο δέρμα ποντικών, έδειξε φωτοπροστατευτική και αντιοξειδωτική δράση. Οι ανθοκυανίνες του ροδιού,

μπόρεσαν να αναστείλουν τη παραγωγή των βλαβών CPDs και των 8-OH-dG (Afaq, et al., 2009). Ακόμη, μπορούν να προστατέψουν το δέρμα από τις ακτινοβολίες UVA και UVB (Syed, et al., 2007). Οι ανθοκυανίνες που βρίσκονται στο βατόμουρο *Vaccinium myrtillus* L., έχουν φωτοπροστατευτική δράση από την ακτινοβολία UVA, μειώνοντας τη παραγωγή ROS (Svobodová, et al., 2009). Οι ανθοκυανίνες του βατόμουρου *Vaccinium uliginosum* L. μπορούν να προστατεύσουν από την ακτινοβολία UVB και συνεπώς να μειώσουν την παραγωγή ROS. Ακόμη, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των μονοπατιών NF-κB και MAPK, οδηγώντας σε μείωση των φλεγμονωδών κυτοκινών και συνεπώς λιγότερο σχηματισμό των HO<sup>•</sup> (Bae, et al., 2009).

Οι κατεχίνες ανήκουν στην οικογένεια των πολυφαινόλων και βρίσκονται σε αφθονία στα φύλλα τσαγιού. Μπορούν να προστατεύσουν τον οργανισμό από την προσβολή των HO<sup>•</sup> (Nanjo, et al., 1999) και να μειώσουν τα ROS, προστατεύοντας από την ακτινοβολία UVB (Camouse, et al., 2009).

#### 4.2.6 Κινναμαλδεΐδη

Η κινναμαλδεΐδη είναι το κύριο συστατικό του φλοιού της *Cinnamomum cassia*, δηλαδή της κανέλας και έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μπορεί να αναστείλει τη παραγωγή ROS αυξάνοντας την παραγωγή φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών από τον οργανισμό και συγκεκριμένα της HO-1 (Uchi, et al., 2017). Η ουσία αυτή προάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/Keap1, μειώνοντας την παραγωγή των ROS και προστατεύοντας από την ακτινοβολία UVB. Ακόμη, μπορεί να επιταχύνει την επιδιόρθωση των βλαβών των 6-4PP (Tanaka, et al., 2019).

#### 4.2.7 Κουρκουμίνη και Τζίνσενγκ

Η κουρκουμίνη προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa* L. και έχει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Συμμετέχει στη ρύθμιση των μονοπατιών NF-κB και MAPK, μειώνοντας την έκφραση της iNOS και της COX-2, και

συνεπώς ελαττώνοντας τον σχηματισμό HO<sup>\*</sup> (Sandur, et al., 2007). Ακόμη, έχει φωτοπροστατευτική δράση ενάντια στην ακτινοβολία UVB, και μπορεί να ρυθμίσει τη παραγωγή του TNF-α (Jang, et al., 2012).

Το τζίνσενγκ (ginseng) έχει την ικανότητα να μειώνει την έκφραση του TNF-α, της iNOS και της COX-2 που προκαλούνται από την ακτινοβολία UVB. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να συμβάλει στη μείωση του σχηματισμού των HO<sup>\*</sup>, ασκώντας αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα που προσβάλλονται από την ακτινοβολία UVB (Lee, et al., J Ginseng Res.).

### 4.3 Αντιοξειδωτική Δράση των Βιταμινών

#### 4.3.1 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι το σημαντικότερο μη-ενζυμικό, λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που προστατεύει το δέρμα από τις δυσμενείς επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες, συμπεριλαμβανομένης της φωτογήρανσης (Nachbar & Korting, 1995). Στο δέρμα, η βιταμίνη E μπορεί να προλαμβάνει τις βλάβες που δημιουργούνται από τις ελεύθερες ρίζες και τα ROS υπό την επίδραση της UVB ακτινοβολίας. Ακόμη, έχει αντιφλεγμονώδη δράση στην προσβολή που δημιουργείται από την ακτινοβολία UV, μειώνοντας τη σύνθεση φλεγμονωδών ουσιών όπως της προσταγλανδίνης, της IL και της COX-2 (Yoshida, et al., 2006). Η αντιοξειδωτική και η φωτοπροστατευτική δράση της βιταμίνης E εξαφανίζονται παρουσία ακτινοβολίας UVA (Kagan, et al., 1992). Η εξήγηση της απενεργοποίησης του μηχανισμού της βιταμίνης E κατά την ακτινοβολία UVA, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Sethi, 2017).

#### 4.3.2 Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι γνωστή και ως ασκορβικό οξύ (AA). Πρόκειται για ένα μόριο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sorice, et al., 2014). Η βιταμίνη C μπορεί να μειώσει την



παραγωγή οξειδωτικού στρες και τη φλεγμονή και να επιτύχει προστατευτικά αποτελέσματα. Έχει την ικανότητα να καταστρέφει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την ακτινοβολία UVB, την παραγωγή ROS και την απόπτωση. Ακόμη, φαίνεται πως μπορεί να καταστρέφει και τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του παράγοντα νέκρωσης του όγκου ( $\alpha$ ) (TNF- $\alpha$ ) (Kawashima, et al., 2018). Σε έρευνα που έγινε στους κερατοειδείς ποντικών έπειτα από ακτινοβολία UVB, βρέθηκε πως η ακτινοβολία UVB οδήγησε σε βλάβη του επιθηλιακού κερατοειδούς, οίδημα των κυττάρων, δομικές διαταραχές του στρώματος και διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η έκφραση της SOD, η οποία οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή των ROS, μειώθηκε δραματικά μετά την ακτινοβολία UVB. Η προσθήκη της βιταμίνης C με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, μπόρεσε να βελτιώσει τον τραυματισμό του κερατοειδούς που προκαλείται από την UVB, μείωσε το οίδημά του, βελτίωσε τη δομή του και ανακούφισε τη φλεγμονή. Ακόμη, κατάφερε να προσκαλέσει αύξηση της παραγωγής των φυσικών αντιοξειδωτικών (Chen, et al., 2020).

Είναι εμφανές πως η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης C χρήζει περαιτέρω έρευνας, ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως ο προστατευτικός της ρόλος έναντι της ακτινοβολίας UV. Χρειάζεται να γίνουν περισσότερες *in vivo* μελέτες με τη χορήγηση βιταμίνης C, καθώς και της απαραίτητης ποσότητας ή τον τρόπο χορήγησής της, λόγω της γρήγορης οξείδωσης στην οποία υπόκειται όταν βρεθεί σε φως και οξυγόνο, ώστε να ελεγχθεί ο μηχανισμός δράσης της στη βλάβη του DNA από τις οξειδωτικές ρίζες ROS που προέρχονται από την UV ακτινοβολία.

#### 4.3.3 Βιταμίνη A και καροτενοειδή

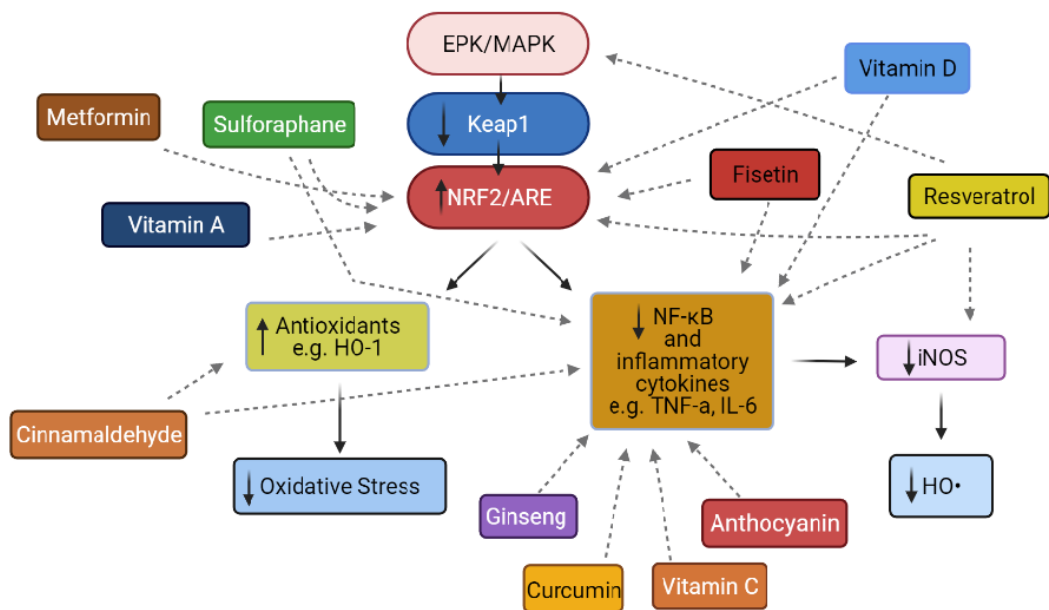
Τα καροτενοειδή μπορούν να καθαρίσουν τα ROS από το σώμα. Ορισμένα καροτενοειδή βρέθηκαν να ενεργοποιούν την αντιοξειδωτική γονιδιακή έκφραση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 που βοηθά στη μείωση της νευρολογικής διαταραχής και του διαβήτη (Merhan, 2017). Στο *Microbacterium sp.*, χορηγήθηκε κλάσμα καροτενοειδών με ύπαρξη νευροσπορενίου,  $\alpha$ -καροτενίου, εχινόνης,

κανταξανθίνης και ασταξανθίνης και βρέθηκε να έχει σημαντικό φωτοπροστατευτικό αποτέλεσμα, μετά από ακτινοβόληση UV (Reis-Mansur, et al., 2019). Οι φωτοπροστατευτικές δράσεις της λουτεΐνης, της ασταξανθίνης και της φουκοξανθίνης έχουν επίσης αποδειχθεί. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η λουτεΐνη προστατεύει τη γονιδιακή έκφραση από την επαγόμενη UVA/B και UVA1 στο ανθρώπινο δέρμα. Η συγκεντρώσεις της οξυγενάσης της αίμης HO-1, του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1) και του MMP-1 mRNA μειώθηκαν μετά από χορήγηση λουτεΐνης και λυκοπενίου, γεγονός που δείχνει πως αυτές οι ουσίες μπορούν να προστατεύσουν τη βλάβη του δέρματος που προκαλείται από την UVR (Grether-Beck, et al., 2017). Οι φωτοπροστατευτικές δράσεις της ασταξανθίνης, της κανταξανθίνης και του β-καροτενίου μελετήθηκαν υπό την επίδραση της ακτινοβολία UVA στον ανθρώπινο δερματικό ινοβλάστη. Βρέθηκε πως η ασταξανθίνη έχει σημαντική φωτοπροστατευτική δράση και εξουδετέρωσε τις βλάβες που προκλήθηκαν από την ακτινοβολία UVA σε μεγαλύτερο βαθμό, σε σχέση με τις άλλες δύο ουσίες (Camera, et al., 2009). Παρόμοια με την ασταξανθίνη, η φουκοξανθίνη εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι της βλάβης του δέρματος που προκαλείται από την UVB μειώνοντας το ενδοκυτταρικό ROS. Πρόκειται για μία πορτοκαλί ουσία που συσσωρεύεται στα θαλάσσια φυτά, και η οποία έχει αντιοξειδωτικές δράσεις (Heo & Jeon, 2009).

Η πλειοψηφία των μελετών για την αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών αφορούν στη φωτοπροστατευτική δράση που μπορούν να ασκήσουν στο δέρμα, μετά από ακτινοβόληση με UV. Τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής επιβεβαιώνουν την προστασία του δέρματος και του γενετικού υλικού από αυτά και ακόμη αναφέρουν μείωση των ριζών ROS. Χρειάζονται να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες που να αφορούν στην αντιοξειδωτική δράση αυτών των ουσιών και να ποσοτικοποιηθούν οι βλάβες στο DNA, μετά από ακτινοβόληση UV, ώστε να μπορέσουμε να τους προσδώσουμε αυτό το χαρακτηριστικό.

#### 4.3.4 Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D φαίνεται να παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και μείωση του σχηματισμού των ROS μέσω της καταστολής ενζύμων όπως η NADPH οξειδάση (Kono, et al., 2013). Η 25-υδροξύ-βιταμίνη D (βιταμίνη D<sub>3</sub>) μπορεί επίσης να ρυθμίσει την έκφραση της SOD, η οποία σε υπερέκφραση οδηγεί στον σχηματισμό HO<sup>•</sup> (Greή, 2013). Ακόμη, η βιταμίνη D μπορεί να ενεργοποιήσει το SIRT1 και την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 και να ασκήσει την προστατευτική της δράση μέσω αυτού του μηχανισμού (Nakai, et al., 2014). Επίσης, έχει αντιφλεγμονώδη δράση, μειώνοντας τον NF-κB και καταστέλλοντας την παραγωγή του TNF-α και της IL-1β (Ali, et al., 2021).



Εικόνα 9. Προτεινόμενη Αντιοξειδωτική Δράση.

## 5. Συμπεράσματα

Τα ROS που παράγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία UV, φαίνεται να αποτελούν τη βάση πίσω από πολλές διεργασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό και πιθανώς οδηγούν στην ανάπτυξη ασθενειών. Έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής, πως τα ROS προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA. Αυτή η ανασκόπηση συζητά μερικές από τις πιο πρόσφατες προόδους που έγιναν στην κατανόηση των βλαβών που εντοπίζονται στο DNA. Οι βλάβες που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα αφορούν στις cPus και στην 8-οξο-dG. Η πορεία της μελέτης τους στο χρόνο είχε διακοπεί λόγω προβλημάτων που αντιμετωπίστηκαν στις τεχνικές μελέτης και ποσοτικοποίησής τους. Όμως, η ανάπτυξη νέων τεχνικών και η σημαντικότητά τους, τις έφερε πάλι στο φως της έρευνας.

Οι cPus είναι βλάβες διαδοχικού τύπου που παρατηρήθηκαν μεταξύ των τροποποιήσεων της πουρίνης και του σακχάρου και ταυτοποιήθηκαν σε πειράματα *in vitro* αλλά και σε κυτταρικό DNA θηλαστικών σε πειράματα *in vivo*. Αυτές οι βλάβες αφορούν στις βάσεις 2'-δεοξυ-αδενοσίνης και 2'-δεοξυ-γουανοσίνης και βρίσκονται σε δύο διαστερομερείς μορφές, την 5'R και την 5'S. Παράγονται αποκλειστικά από τη προσβολή της ρίζας υδροξυλίου σε μονάδες 2'-δεοξυριβόζης, δημιουργώντας την ρίζα στον C5', η οποία προσβάλλει τον άνθρακα C8' της πουρίνης προκαλώντας κυκλοποίηση. Η κυκλοποιημένη αυτή μορφή τους, τις καθιστά δύσκολες ως προς την επιδιόρθωσή τους από τους μηχανισμούς του σώματός μας, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στον οργανισμό. Έχει βρεθεί πως πολλές ασθένειες από τις οποίες πάσχει ο άνθρωπος έχουν μέρος της αιτιολογίας τους στις cPus. Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τα υψηλά ποσοστά εμφάνισής τους σε ασθενείς που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές νόσους και από καρκίνο. Ακόμη, έχουν βρεθεί σε υψηλά ποσοστά σε άτομα που υποφέρουν από αθηροσκλήρωση. Έχουν εντοπιστεί και σε ιστούς του ανθρώπινου σώματος, σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής, όπως είναι ο ιστός του εντέρου στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Νέα ευρήματα έχουν φέρει στο φως την πιθανή συσχέτισή της με τον Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II καθώς και με τον διαβήτη κύησης. Όλες αυτές οι ανακαλύψεις, καθιστούν τις cPus πολύ σημαντικά

μόρια για την κατανόηση και θεραπεία πολλών ασθενειών. Κατά συνέπεια, τονίζεται και η επίδρασή τους στη γενετική αστάθεια και στις μεταλλάξεις που αυτές προκαλούν.

Η πλήρης κατανόηση της δράσης τους και της βιολογικής τους συνάφειας, καθώς και των συνθηκών κάτω από τις οποίες ακμάζουν ή αποσταθεροποιούνται, θα συμβάλει στην εύρεση του τρόπου αντιμετώπισής τους. Σε αυτή την εργασία συζητείται η δράση ορισμένων αντιοξειδωτικών ουσιών που πιθανώς να μπορούν να επιδράσουν θετικά και να μειώσουν τη παραγωγή και την προσβολή  $\text{HO}^\bullet$ . Οι ουσίες αυτές αφορούν στο μονοπάτι Nrf2/Keap1 το οποίο σε συνθήκες οξειδωσης, οδηγεί στον διαχωρισμό του Nrf2 από το Keap1, την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 και την εντολή να παράγει φυσικά αντιοξειδωτικά και να μειώνει τη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, έχουν βρεθεί να μπορούν να αυξήσουν τη δράση του iNOS, το οποίο σε υπερέκφραση οδηγεί στο σχηματισμό  $\text{HO}^\bullet$ . Για τον λόγο αυτό, προτείνονται ουσίες όπως η σουλφοραφάνη, η ρεσβερατρόλη, η μετφορμίνη, η φισετίνη και τα καροτενοειδή, οι οποίες προάγουν τη πυρηνική μετατόπιση του Nrf2. Ακόμη, τονίζεται η προστατευτική δράση αυτών των ουσιών, καθώς και των πολυφαινολών, της ραπαμυκίνης, της κινναμαλδεΐδης, της κουρκουμίνης και του τζίνσενγκ και των αντιοξειδωτικών βιταμινών C και E που φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση έναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία UV. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει σε κύτταρα ανθρώπου αλλά και σε φύλλα φυτών, που μετά την ακτινοβόλησή τους με υπεριώδη ακτινοβολία UV, η συγκέντρωση φυσικών πολυφαινολών στα φύλλα που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία, φαίνεται να αυξάνεται. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις, προτείνουν την περαιτέρω μελέτη αυτών των ουσιών ύστερα από ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία UV και τη ποσοτικοποίηση των βλαβών των cPus, πριν και μετά το συμπλήρωμα των αντιοξειδωτικών ουσιών. Μία τέτοια ανακάλυψη, μπορεί να επιβεβαιώσει την αντιοξειδωτική και φωτοπροστατευτική δράση αυτών των ουσιών, και στην περίπτωση των βλαβών των cPus. Η σημασία και η δυναμική αυτής της δράσης θα αποτελέσει σημείο έναρξης για την θεραπεία πολλών ασθενειών που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την ύπαρξη των cPus ή που πρόκειται να ανακαλυφθεί αυτή η συσχέτισή τους στο μέλλον. Ένα τέτοιο

γεγονός, μπορεί να μειώσει ή να εξαλείψει τα συμπτώματα των νόσων από τις οποίες πάσχει ο ανθρώπινος οργανισμός ή ακόμη και να προστατεύσει ολοκληρωτικά από την εμφάνισή τους. Συνεπώς, οδηγούμαστε σε μία καλύτερη ποιότητα ζωής για τον άνθρωπο, στην ενίσχυση του Συστήματος Υγείας και σε μία οικονομικά και κοινωνικά αναβαθμισμένη κοινωνία.

## BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, J. & Brooks, P. J., 2011. Divergent effects of oxidatively induced modification to the C8 of 2'-deoxyadenosine on transcription factor binding: 8,5'(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine inhibits the binding of multiple sequence specific transcription factors [...]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, May, 52(4), pp. 287-295.
- Afaq, F. et al., 2009. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Experimental Dermatology*, 18(6), pp. 553-561.
- Ali, A. et al., 2021. Vitamin D exerts neuroprotection via SIRT1/nrf-2/ NF-kB signaling pathways against D-galactose-induced memory impairment in adult mice. *Neurochemistry International*, Volume 142.
- Andziak, B. et al., 2006. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell*, December, 5(6), pp. 463-471.
- Arai, Y. et al., 2000. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *The Journal Of Nutrition*, September, 130(9), pp. 2243-2250.
- Arczewska, K. D. et al., 2013. Active transcriptomic and proteomic reprogramming in the *C. elegans* nucleotide excision repair mutant xpa-1. *Nucleic Acids Research*, 1 May, 41(10), pp. 5368-5381.
- Arriola Apelo, S. I. & Lamming, D. W., 2016. Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *The Journals of Gerontology: Series A*, July, 71(7), pp. 841-849.
- Ashabi, G. et al., 2015. Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metabolic Brain Disease*, Volume 30, pp. 747-754.
- Aydogan, B. et al., 2002. Site-specific OH attack to the sugar moiety of DNA: a comparison of experimental data and computational simulation. *Radiat. Res.*, January, 157(1), pp. 38-44.
- Bae, J.-Y. et al., 2009. Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(6), pp. 726-738.
- Bai, G.-L. et al., 2021. Rapamycin Protects Skin Fibroblasts From UVA-Induced Photoaging by Inhibition of p53 and Phosphorylated HSP27. *Frontiers*, February.
- Bai, Y. et al., 2013. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, April, pp. 82-95.
- Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K. & Tullius, T. D., 1998. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *PNAS*, 18 August, Volume 17, pp. 9738-9743.
- Bally, V. & Verly, W. G., 1987. *Escherichia coli* endonuclease III is not an endonuclease but a beta-elimination catalyst.. *Biochemical Journal*, 1 March, pp. 565-572.

- Batista, L. F., Kaina, B., Meneghini, R. & Menck, C. F., 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(2-3), pp. 197-208.
- Belmadoui, N. et al., 2010. Radiation-induced formation of purine 5',8-cyclonucleosides in isolated and cellular DNA: high stereospecificity and modulating effect of oxygen. *Org Biomol Chem*, 21 Jul, 8(14), pp. 3211-9.
- Bieler, C. A. et al., 1999. DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone.. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 19 February, 439(2), pp. 307-311.
- Black, J. O., 2016. Xeroderma Pigmentosum. *Head and Neck Pathology volume*, 14 March, Volume 10, pp. 139-144.
- Bohr, V. A. & Dianov, G. L., 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81, pp. 155-160.
- Boussicault, F. et al., 2008. The fate of C5' radicals of purine nucleosides under oxidative conditions. *Journal Of The American Chemical Society*, 2 July, pp. 8377-85.
- Brooks, P. J., 2008. The 8, 5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides: Candidate Neurodegenerative DNA Lesions in Xeroderma Pigmentosum, and Unique Probes of Transcription and Nucleotide Excision Repair. *DNA Repair*, 1 July, 7(7), pp. 1168-1179.
- Brooks, P. J., 2017. The cyclopurine deoxynucleosides: DNA repair, biological effects, mechanistic insights, and unanswered questions. *Free Radical Biology and Medicine*, June, Volume 107, pp. 90-100.
- Brooks, P. J. et al., 2000. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 21 July, Volume 29.
- Brooks, P. J. et al., 2000. The Oxidative DNA Lesion 8,5'-(S)-Cyclo-2'-deoxyadenosine Is Repaired by the Nucleotide Excision Repair Pathway and Blocks Gene Expression in Mammalian Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 4 May, 275(29).
- Cai, Y., Geacintov, N. E. & Broyde, S., 2020. Variable impact of conformationally distinct DNA lesions on nucleosome structure and dynamics: Implications for nucleotide excision repair. *DNA Repair*, March.
- Camera, E. et al., 2009. Astaxanthin, canthaxanthin and  $\beta$ -carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. *Experimental Dermatology*, 18(3), pp. 222-231.
- Camouse, M. M. et al., 2009. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Experimental Dermatology*, 18(6), pp. 522-526.
- Cetrullo, S. et al., 2015. mTOR, AMPK, and Sirt1: Key players in metabolic stress management. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 25(1), pp. 59-75.



- Chatgililoglu, C., Bazzanini, R., Jimenez, L. B. & Miranda, M. A., 2007. (5'S)- and (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine: mechanistic insights on the 2'-deoxyguanosin-5'-yl radical cyclization. *Chemical Research in Toxicology*, 20 December, p. 1820–1824.
- Chatgililoglu, C., D'Angelantonio, M., Kciuk, G. & Bobrowski, K., 2011. New Insights into the Reaction Paths of Hydroxyl Radicals with 2'-Deoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, 22 September, pp. 2200-2206.
- Chatgililoglu, C. et al., 2020. Oxygen Dependent Purine Lesions in Double-Stranded Oligodeoxynucleotides: Kinetic and Computational Studies Highlight the Mechanism for 5',8-Cyclopurine Formation. *Journal Of The American Chemical Society*, 4 March, 142(12), pp. 5825-5833.
- Chatgililoglu, C. et al., 2019. 5',8-Cyclopurine Lesions in DNA Damage: Chemical, Analytical, Biological, and Diagnostic Significance. *Cell*, 28 May.
- Chatgililoglu, C. et al., 2021. On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA. *Free Radical Research*, 26 January.
- Chatgililoglu, C. et al., 2014. A problem solving approach for the diastereoselective synthesis of (5'S)- and (5'R)-5',8-cyclopurine lesions. *Organic Chemistry Frontiers*, July, pp. 698-702.
- Chatgililoglu, C., Guerra, M. & Mulazzani, Q. G., 2003. Model Studies of DNA C5' Radicals. Selective Generation and Reactivity of 2'-Deoxyadenosin-5'-yl Radical. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 12 March, pp. 3839-3848.
- Chatgililoglu, C., Terzidis, M. A. & Ferreri, C., 2011. Purine 5',8-Cyclonucleoside Lesions: Chemistry and Biology. *Chemical Society Reviews*, 1 March, 40(3), pp. 1368-1382.
- Checker, R. et al., 2015. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, exhibits anti-inflammatory effects by targeting GSK3 $\beta$ /Nrf-2 and NF- $\kappa$ B pathways in T cells. *Journal of Functional Foods*, December, Volume 19-A, pp. 426-438.
- Chen, W. et al., 2020. Protective Effect of Vitamin C against Infancy Rat Corneal Injury Caused by Acute UVB Irradiation. *BioMed International Research*.
- Cleaver, J. E., Lam, E. T. & Revet, I., 2009. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 7 October, pp. 756-768.
- Colditz, G. A. et al., 1985. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1 January, 41(1).
- Cortat, B. et al., 2013. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(8).
- Das, R. S. et al., 2012. Stability of N-Glycosidic Bond of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 1 October, 25(11), pp. 2451-2461.
- D'Errico, M. et al., 2007. The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells. *Oncogene*, 12 February, Volume 26, pp. 4336-4343.
- DiGiovanna, J. J. & Kraemer, K. H., 2012. Shining a Light on Xeroderma Pigmentosum. *Journal of Investigative Dermatology*, 1 March, 132(3), pp. 785-796.

- Dinkova-Kostova, A. T. et al., 2010. Dietary glucoraphanin-rich broccoli sprout extracts protect against UV radiation-induced skin carcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Photochemical & Photobiological Sciences*, Issue 4.
- Dizdaroglu, M., 1968. Free-radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid.. *Biochemical Journal*, 15 August, 238(1), pp. 247-254.
- Dizdaroglu, M., 2015. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, January–March, Volume 763, pp. 212-245.
- Dizdaroglu, M., Coskun, E. & Jaruga, P., 2015. Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radic Res*, May, Volume 5, pp. 525-548.
- Doetsch, P. W. & Cunningham, R. P., 1990. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutation Research/DNA Repair*, September-November, 236(2-3), pp. 173-201.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J. & Kyle, J. A. M., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13(1).
- Fahley, J. W. & Kensler, T. W., 2008. Role of Dietary Supplements/Nutraceuticals in Chemoprevention Through Induction of Cytoprotective Enzymes. April, 20(4), pp. 572-576.
- Feichtinger, R. G., Sperl, W., Bauer, J. W. & Kofler, B., 2014. Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases. 30 June, 23(9).
- Flyunt, R., Bazzanini, R., Chatgililoglu, C. & Mulazzani, Q. G., 2000. Fate of the 2'-Deoxyadenosin-5'-yl Radical under Anaerobic Conditions. *Journal Of The American Chemical Society*, 13 April, pp. 4225-4226.
- Ford, J. M. & Hanawalt, P. C., 1997. Expression of Wild-type p53 Is Required for Efficient Global Genomic Nucleotide Excision Repair in UV-irradiated Human Fibroblasts. *Journal Of Biological Chemistry*, 31 October, 272(44), pp. 28073-28080.
- Friedberg, E. C. et al., 1995. DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press*.
- Gasparutto, D. et al., 2000. Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides. *Biochimie*, January, 82(1), pp. 19-24.
- Gonzalez-Hunt, C., Wadhwa, M. & Sanders, L., 2018. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology*, April, pp. 87-94.
- Greń, A., 2013. Effects of vitamin E, C and D supplementation on inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Int J Vitam Nutr Res*, 83(3), pp. 168-75.
- Grether-Beck, S. et al., 2017. Molecular evidence that oral supplementation with lycopene or lutein protects human skin against ultraviolet radiation: results from a double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Dermatology*, 176(5), pp. 1231-1240.
- Guerrero-Beltrán, C. E., Calderón-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J. & Irasema Chirino, Y., 2012. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*, July, 64(5), pp. 503-508.
- Guillaumet-Adkins, A. et al., 2017. Epigenetics and Oxidative Stress in Aging.

- Guo, C. et al., 2016. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. *Scientific Reports*, September, Issue 6.
- Heo, S.-J. & Jeon, Y.-J., 2009. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, May, 95(2), pp. 101-107.
- Howard, M. J., Rodriguez, Y. & Wilson, S. H., 2017. DNA polymerase  $\beta$  uses its lyase domain in a processive search for DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 20 April, 45(7), pp. 3822-3832.
- Huang, T.-C., Lu, K.-T., Wo, Y.-Y. P. & Yang, Y.-L., 2011. Resveratrol Protects Rats from A $\beta$ -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation. 29 December.
- Huerta Guevara, A. P. et al., 2021. Increased insulin sensitivity and diminished pancreatic beta-cell function in DNA repair deficient *Ercc1d*<sup>-/-</sup> mice. *Metabolism*, April, Volume 117.
- Jang, S. et al., 2012. Inhibitory effects of curcuminoids from *Curcuma longa* on matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, Volume 42, p. 33-39.
- Jaruga, P. et al., 2012. DNA Damage Products (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-deoxyadenosines as Potential Biomarkers in Human Urine for Atherosclerosis. *Biochemistry*, 23 February, 51(9), pp. 1822-1824.
- Jaruga, P., Theruvathu, J., Dizdaroglu, M. & Brooks, P. J., 2004. Complete release of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine from dinucleotides, oligodeoxynucleotides and DNA, and direct comparison of its levels in cellular DNA with other oxidatively induced DNA lesions. *Nucleic Acids Res*, 23 Jun, Volume 11.
- Jasti, V. P. et al., 2011. (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-deoxyguanosine Is a Strong Block to Replication, a Potent pol V-Dependent Mutagenic Lesion, and Is Inefficiently Repaired in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 17 May, 50(19), pp. 3862-3865.
- Jiang, Y. et al., 2009. UVA Generates Pyrimidine Dimers in DNA Directly. *Biophysical Journal*, 4 February, 96(3), pp. 1151-1158.
- Jiang, Z. et al., 2015. Bypass of a 5',8-cyclopurine-2'-deoxynucleoside by DNA polymerase  $\beta$  during DNA replication and base excision repair leads to nucleotide misinsertions and DNA strand breaks. *DNA Repair*, 17 June, pp. 24-24.
- Jimenez, L. B. et al., 2004. The photochemistry of 8-bromo-2'-deoxyadenosine. A direct entry to cyclopurine lesions. *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2004*, 22 October, pp. 1043-1046.
- Jimenez, L. B. et al., 2004. The photochemistry of 8-bromo-2'-deoxyadenosine. A direct entry to cyclopurine lesions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, Issue 11-12, pp. 1042-1046.
- Kagan, V. et al., 1992. Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin. *Free Radic Res Commun*, 16(1), pp. 51-64.
- Kajitani, G. S. et al., 2020. Transcription blockage by DNA damage in nucleotide excision repair-related neurological dysfunctions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21 November.

- Kant, M. et al., 2016. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair*, December, pp. 1-7.
- Karwowski, B. T., 2019. The Influence of (5'R)- and (5'S)-5',8-Cyclo-2'-Deoxyadenosine on UDG and hAPE1 Activity. Tandem Lesions are the Base Excision Repair System's Nightmare. *Cells*, 23 October, 8(11).
- Kawashima, S. et al., 2018. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Scientific Reports*, November, Volume 8.
- Keck, K., 1968. Bildung von Cyclonucleotiden bei Bestrahlung wässriger Lösungen von Purinnucleotiden. *Zeitschrift für Naturforschung*, pp. 1034-1043.
- Kidane, D. et al., 2014. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 13 January, 49(2), pp. 116-139.
- Kietzmann, T. et al., 2017. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, June, 174(12), p. 1533–1554.
- Kono, K. et al., 2013. Anti-Oxidative Effect of Vitamin D Analog on Incipient Vascular Lesion in Non-Obese Type 2 Diabetic Rats. *American Journal of Nephrology*, Volume 37, p. 167–174.
- Kowti, R. et al., 2020. UV rays induced DNA damage: Protection by polyphenols enriched extract of mint leaves. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 8(2), pp. 152-157.
- Kozmin, S., Pavlov, Y. I., Kunkel, T. A. & Sage, E., 2003. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol $\epsilon$  and Pol $\zeta$  in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic Acids Research*, September, 31(15), pp. 4541-4552.
- Krokan, H. E. & Bjørås, M., 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 5 April.
- Krokidis, M. G. et al., 2020. Oxygen-Dependent Accumulation of Purine DNA Lesions in Cockayne Syndrome Cells. *Cells*, 11 July, 9(7).
- Krokidis, M. G. et al., 2019. Membrane Lipidome Reorganization and Accumulation of Tissue DNA Lesions in Tumor-Bearing Mice: An Exploratory Study. *Cancers*, 4 April, 11(4).
- Krokidis, M. G. et al., 2019. Purine DNA Lesions at Different Oxygen Concentration in DNA Repair-Impaired Human Cells (EUE-siXPA). *Cells*, 1 November, 8(11).
- Krokidis, M. G. et al., 2017. Purine 5',8-cyclo-2'-deoxynucleoside lesions: formation by radical stress and repair in human breast epithelial cancer cells. *Free Radical Research*, 2 May, 51(5), pp. 470-482.
- Kuraoka, I. et al., 2000. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purinecyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May, 97(8).
- Kusakabe, M. et al., 2019. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes and Environment*, 25 January, Issue 41.
- Lai, Y., Weizmann, Y. & Liu, Y., 2018. The deoxyribose phosphate lyase of DNA polymerase  $\beta$  suppresses a processive DNA synthesis to prevent trinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Research*, 28 September, 46(17), pp. 8940-8952.

- Lange, S. S., Takata, K.-i. & Wood, R. D., 2011. DNA polymerases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 24 January, 11(2), pp. 96-110.
- Lee, H. et al., J Ginseng Res.. Protective Effect of Processed Panax ginseng, Sun Ginseng on UVB-irradiated Human Skin Keratinocyte and Human Dermal Fibroblast. 2012, 36(1), pp. 68-77.
- Lehrmann, A. R., 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, 11 November, pp. 1101-1111.
- Leonard, S. S. et al., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3 October, 309(4), pp. 1017-1026.
- Li, Q. K. et al., 2012. KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma. *Journal of Human Genetics*, 30 January, 56(3), pp. 230-234.
- Li, S.-m. et al., 2020. Quercetin and Its Mixture Increase the Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans* to UV-B. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, February, 17(5), p. 1572.
- Liu, Y. et al., 2009. Coordination between Polymerase  $\beta$  and FEN1 Can Modulate CAG Repeat Expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 9 October, 284(41), pp. 28352-28366.
- Lowe, S. W. et al., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 29 April, Issue 362, pp. 847-849.
- Marabini, L. et al., 2020. Effects of *Vitis vinifera* L. leaves extract on UV radiation damage in human keratinocytes (HaCaT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, March, Volume 204.
- Markovitsi, D., 2016. UV-induced DNA Damage: The Role of Electronic Excited States†. *Photochemistry and Photobiology*, January/February, 92(1), pp. 45-51.
- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermuelen, W. & Hoeijmakers, J. J., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing.. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, July, Volume 15, pp. 465-481.
- Masi, A. et al., 2020. Increased levels of 5',8-Cyclopurine DNA lesions in inflammatory bowel diseases. *Redox Biology*, July, Volume 34.
- Masi, A. et al., 2019. Diastereomeric Recognition of 5',8-cyclo-2'-Deoxyadenosine Lesions by Human Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 in a Biomimetic Model. *Cells*, February, 8(2).
- McCord, J. M. & Fridovich, I., 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 10 November, pp. 5753-5760.
- Merhan, O., 2017. The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. June.
- Ming, X. et al., 2014. Mapping Structurally Defined Guanine Oxidation Products along DNA Duplexes: Influence of Local Sequence Context and Endogenous Cytosine Methylation. *Journal Of The American Chemical Society*, 136(11), pp. 4223-4235.
- Moolakkadath, T. et al., 2019. Fisetin loaded binary ethosomes for management of skin cancer by dermal application on UV exposed mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 5 Απριλ, Volume 560, pp. 78-91.

- Mori, T. et al., 2019. High levels of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine accumulate in the brain tissues of xeroderma pigmentosum group A gene-knockout mic. *DNA Repair*, August, Volume 80, pp. 52-58.
- Mrakovcic, M. & Fröhlich, L. F., 2018. p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules*, 8(2).
- Nachbar, F. & Korting, H. C., 1995. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *Journal of Molecular Medicine*, Volume 73, pp. 7-17.
- Naegeli, H. & Sugasawa, K., 2011. The xeroderma pigmentosum pathway: Decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair*, 15 July, 10(7), pp. 673-683.
- Nakai, K. et al., 2014. Vitamin D activates the Nrf2-Keap1 antioxidant pathway and ameliorates nephropathy in diabetic rats. *Am J Hypertens*, Volume 4, pp. 586-95.
- Nakane, H. et al., 2020. Autophagy induction on impaired spermatogenesis of xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice. *Biomedical Research*, 30 July, 41(5), pp. 237-242.
- Nanjo, F., Mori, M., Goto, K. & Hara, Y., 1999. Radical Scavenging Activity of Tea Catechins and Their Related Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(9), pp. 1621-1623.
- Navacchia, M. L., Chatgililoglu, C. & Montecvecchi, P. C., 2006. C5'-adenosinyl radical cyclization. A stereochemical investigation. *The Journal of Organic Chemistry*, 16 May, pp. 4445-4452.
- Negi, G., Ashutosh, K. & Shyam, S. S., 2011. Nrf2 and NF- $\kappa$ B Modulation by Sulforaphane Counteracts Multiple Manifestations of Diabetic Neuropathy in Rats and High Glucose-Induced Changes. *Current Neurovascular Research*, 8(4), pp. 294-304.
- Neugart, S. & Bumke-Vogt, C., 2021. Flavonoid Glycosides in Brassica Species Respond to UV-B Depending on Exposure Time and Adaptation Time. *Molecules*, 18 January, 26(2).
- Nyaga, S. G. et al., 2007. Accumulation of Oxidatively Induced DNA Damage in Human Breast Cancer Cell Lines Following Treatment with Hydrogen Peroxide. *Cell Cycle*, 20 June, 6(12), pp. 1471-1477.
- Okasaki, Y. et al., 2010. Quantitative detection of 4-hydroxyequilenin–DNA adducts in mammalian cells using an immunoassay with a novel monoclonal antibody. *Nucleic Acids Research*, 1 July, 38(12).
- Olsen, H., Aaby, K. & Borge, G. I. A., 2009. Characterization and Quantification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7).
- Oomen, C. A. et al., 2009. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9 December.
- Pal, H. C., Athar, M., Elmets, C. A. & Afaq, F., 2014. Fisetin Inhibits UVB-induced Cutaneous Inflammation and Activation of PI3K/AKT/NF $\kappa$ B Signaling Pathways in SKH-1 Hairless Mice. *Photochemistry and Photobiology*, 91(1), pp. 225-234.
- Pande, P. et al., 2012. Repair efficiency of (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine depends on the complementary base. *DNA Repair (Amst)*, 11 November.

- Passaglia Schuch, A. et al., 2009. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8 January, 8(1), pp. 111-120.
- Pednekar, V., Weerasooriya, S., Jasti, V. P. & Basu, A. K., 2014. Mutagenicity and Genotoxicity of (5'S)-8,5'-Cyclo-2'-deoxyadenosine in Escherichia coli and Replication of (5'S)-8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in Vitro by DNA Polymerase IV, Exo-Free Klenow Fragment, and Dpo4. *Chemical Research in Toxicology*, 6 January, pp. 200-210.
- Qin, D. et al., 2018. Rapamycin Protects Skin Fibroblasts from Ultraviolet B-Induced Photoaging by Suppressing the Production of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(5), p. 1849–1860.
- Reis-Mansur, M. C. P. P. et al., 2019. Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. *Scientific Report*, July.
- Ribeiro, F. M. et al., 2020. Metformin effect on driving cell survival pathway through inhibition of UVB-induced ROS formation in human keratinocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, December, Volume 192.
- Rünger, T. M., Farahvash, B., Hatvai, Z. & Rees, A., 2012. Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: a less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones. *Photochemical & Photobiological Science*, January, 11(1), pp. 207-215.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R. & Woodgate, R., 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23 February, 13(3), pp. 141-152.
- Sandur, S. K. et al., 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*, 28(8), p. 1765–1773.
- Santín-Márquez, R. et al., 2019. Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. *GeroScience*, 2 April, Issue 41, pp. 655-670.
- Schärer, O. D., 2013. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, October.
- Sethi, M. K., 2017. *Xeroderma pigmentosum: A disease model for clinical, cellular and molecular consequences of ultraviolet radiation-induced damage*, London: s.n.
- Shafirovich, V. & Geacintov, N. E., 2012. Reactions of Small Reactive Species with DNA. *Chemical Biology*, 15 March.
- Shafirovich, V. et al., 2019. Nucleotide Excision Repair and Impact of Site-Specific 5',8-Cyclopurine and Bulky DNA Lesions on the Physical Properties of Nucleosomes. *Biochemistry*, 12 February, 58(6), pp. 561-574.
- Sorice, A. et al., 2014. Ascorbic Acid: Its Role in Immune System and Chronic Inflammation Diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(5), pp. 444-452.

- Suman, S. et al., 2020. Heavy ion space radiation triggers ongoing DNA base damage by downregulating DNA repair pathways. *Life Sciences in Space Research*, November, Volume 27, pp. 27-32.
- Sun, S.-C., 2017. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 5 June, Volume 17, pp. 545-558.
- Svobodová, A., Rambousková, J., Walterová, D. & Vostalová, J., 2009. 2008. *BioFactors*, 33(4), pp. 249-266.
- Swanson, A. L., Wang, J. & Wang, Y., 2012. Accurate and Efficient Bypass of 8,5'-Cyclopurine-2'-Deoxynucleosides by Human and Yeast DNA Polymerase  $\eta$ . *Chemical Research in Toxicology*, July, 25(8), pp. 1682-1691.
- Syed, D. N. et al., 2007. Photochemopreventive Effect of Pomegranate Fruit Extract on UVA-mediated Activation of Cellular Pathways in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), pp. 398-405.
- Tanaka, Y., Uchi, H. & Furue, M., 2019. Antioxidant cinnamaldehyde attenuates UVB-induced photoaging. *Journal of Dermatological Science*, Volume 3, pp. 151-158.
- Terzidis, M. A. & Chatgialiloglu, C., 2013. Radical Cascade Protocol for the Synthesis of (5'S)- and (5'R)-5',8-Cyclo-2'-deoxyguanosine Derivatives. *Australian Journal of Chemistry*, 4 February, 66(3), pp. 330-335.
- Terzidis, M. A., Ferreri, C. & Chatgialiloglu, C., 2015. Radiation-induced formation of purine lesions in single and double stranded DNA: revised quantification. *Front. Chem*, 20 March.
- Terzidis, M. A. et al., 2016. Radical-induced purine lesion formation is dependent on DNA helical topology. *Free Radical Research*, October, Volume 50, pp. 91-101.
- Terzidis, M. A. & Chatgialiloglu, C., 2015. An ameliorative protocol for the quantification of purine 5',8-cyclo-2'-deoxynucleosides in oxidized DNA. *Frontiers in Chemistry*, 28 July, 3(Chemical Biology).
- Theruvathu, J. A., Jaruga, P., Dizdaroglu, M. & Brooks, P. J., 2007. The Oxidatively-Induced DNA Lesions 8,5'-Cyclo-2'-Deoxyadenosine and 8-Hydroxy-2'-Deoxyadenosine Are Strongly Resistant to Acid-Induced Hydrolysis of the Glycosidic Bond. *Mechanisms of Ageing and Development*, September, 128(9), pp. 494-502.
- Uchi, H. et al., 2017. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 85(1), pp. 39-43.
- Uhlen, M. et al., 2017. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*, 18 Aug, 357(6352).
- Urbaniak, S. K. et al., 2020. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. *Molecules*, 25(1).
- Vega, C. C. et al., 2016. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. *The Journal of Physiology*, March, 594(5), p. 1483-1499.



- Vermerris, W. & Nicholson, R., 2006. Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: *Phenolic Compound Biochemistry*. s.l.:Springer, pp. 1-34.
- Violett, B. et al., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, 122(6), pp. 253-270.
- von Sonntag, C., 1987. *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor and Francis.
- von Sonntag, C., 2006. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. s.l.:A Chemical Perspective.
- Vousden, K. H. & Prives, C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, May, 137(3), pp. 413-431.
- Wallace, S. S., Murphy, D. L. & Sweasy, J. B., 2012. Base Excision Repair and Cancer. *Cancer Letters*, 31 December, 327(1-2), pp. 73-89.
- Walmacq, C. et al., 2015. Mechanism of RNA polymerase II Bypass of Oxidative Cyclopurine DNA Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, January, 112(5).
- Wang, J. et al., 2012. The oxidative DNA lesions 8,5'-cyclopurines accumulate with aging in a tissue-specific manner.. *Aging Cell*, 24 April, pp. 714-716.
- Wang, J. et al., 2011. Quantification of Oxidative DNA Lesions in Tissues of Long-Evans Cinnamon Rats by Capillary High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Coupled with Stable Isotope-Dilution Method. *Analytical Chemistry*, Volume 6, p. 2201–2209.
- Weng, P. J. et al., 2018. Bypassing a 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine lesion by human DNA polymerase  $\eta$  at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 16 October, 115(42), pp. 10660-10665.
- Winterbourn, C. C., 2012. Biological Chemistry of Reactive Oxygen Species. *Chemical Biology*, 15 March.
- Wu, P.-J. et al., 2017. Fisetin Regulates Nrf2 Expression and the Inflammation-Related Signaling Pathway to Prevent UVB-Induced Skin Damage in Hairless Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).
- Xu, C., Yong-Tao Li, C. & Tony Kong, A.-N., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, March, 28(3), pp. 249-268.
- Xu, M., Gabison, J. & Liu, Y., 2012. Trinucleotide repeat deletion via a unique hairpin bypass by DNA polymerase and alternate flap cleavage by flap endonuclease 1. *Nucleic Acids Research*, December, 41(3).
- Xu, M. et al., 2014. A 5', 8-cyclo-2'-deoxypurine lesion induces trinucleotide repeat deletion via a unique lesion bypass by DNA polymerase  $\beta$ . *Nucleic Acids Research*, 16 December, p. 13749–13763.
- Yoshida, E. et al., 2006. Topical application of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative reduces photo-inflammation in mice skin. *J Invest Dermatol*, Jul, 126(7), pp. 1633-1640.
- You, C. et al., 2013. Translesion Synthesis of 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides by DNA Polymerases  $\eta$ ,  $\iota$ , and  $\zeta$ . *Journal of Biological Chemistry*, 4 October, 288(40), pp. 28548-28556.

Yu, D., Berlin, J. A., Penning, T. M. & Field, J., 2002. Reactive Oxygen Species Generated by PAH o-Quinones Cause Change-In-Function Mutations in p53. *Chemical Research in Toxicology*, May, 15(6), pp. 832-842.

Yu, Y. et al., 2016. Comprehensive Assessment of Oxidatively Induced Modifications of DNA in a Rat Model of Human Wilson's Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, March, 15(3), pp. 810-817.

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. & Posner, G. H., 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *PNAS*, March, pp. 2399-2403.

Zhou, G.-D. & Moorthy, B., 2015. Detection of bulky endogenous oxidative DNA lesions derived from 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine by 32P-postlabeling assay. *Curr Protoc Toxicol*, 4 May, 64(1), pp. 17.17.1-17.17.14.

Zhu, Y. et al., 2019. Optimization of quercetin extraction method in *Dendrobium officinale* by response surface methodology. *Heliyon*, September, 5(9).