



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ, ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ ΣΕ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΥΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΦΥΛΩΝ



winesisternood.com, photo credit: Bernard Vangrin

ASSESSMENT OF GLUTATHIONE, TOTAL ANTIOXIDANT
CAPACITY AND PROTEIN CARBONYLS IN ENDOTHELIAL CELLS
TREATED WITH POLYPHENOLIC EXTRACT FROM GRAPE
POMACE

Στατήρη Αργυρώ
Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής αυτής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτον από όλους τον καθηγητή μου, και επιβλέποντα της πτυχιακής μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, καθώς επίσης και για την συνεχή καθοδήγηση και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της.

Ακόμα ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την επίκουρο καθηγήτρια κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία και τον λέκτορα κο. Στάγκο Δημήτριο για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την διόρθωση και βελτιστοποίηση της έντυπης εικόνας της πτυχιακής μου εργασίας. Απαραίτητο θεωρώ, να ευχαριστήσω την κ.ο. Γκουτζουρέλα Νικόλαο υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την απεριόριστη στήριξη τόσο στο εργαστηριακό τμήμα της πτυχιακής αυτής εργασίας, όσο και στην συγγραφή της.

Δεν μπορώ να παραλείψω τους φίλους μου και την οικογένεια μου για την βοήθεια που μου έδωσαν σε κάθε δύσκολη στιγμή της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας.

1. Περίληψη

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και του συνόλου των αντιοξειδωτικών μορίων, προς την επικράτηση των πρώτων. Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών παρουσιάζει δυσμενείς επιδράσεις σε διάφορα βιομόρια όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια με αποτέλεσμα την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος, το πάρκινσον, ο διαβήτης κ.α. Τα αντιοξειδωτικά μόρια που παράγονται από τον οργανισμό ή προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής αποτελούν τα αμυντικά μέσα του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ικανότητα ενός εκχυλίσματος στεμφύλων της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου να ασκεί προστατευτική δράση, σε ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EA.hy 926, έναντι του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl (t-BHT). Για τον σκοπό αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα tert-butyl για μια ώρα αφού είχε προηγηθεί καλλιέργειά τους παρουσία τριών μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος για να μελετηθεί η πιθανή προστατευτική δράση του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες: ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το t-BHT από μόνο του αύξησε το οξειδωτικό στρες επηρεάζοντας αρνητικά τους παραπάνω δείκτες. Ωστόσο η 24ωρη καλλιέργεια των κυττάρων με το εκχύλισμα είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με t-BHT.

Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος είχε την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης κατά 14.4 και 12.3% στις συγκεντρώσεις 0.125 και 0.25μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο t-BHT. Επίσης στις ίδιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος αυξήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 15.1 και 14.8% σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο t-BHT. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε μείωση κατά 41.5, 26.2 και 28,3% στις συγκεντρώσεις 0.068, 0.125 και 0.25μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο t-BHT.

Συμπεραίνουμε ότι εκχύλισμα έχει την ικανότητα να προστατεύει στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις τα κύτταρα της σειράς EA.Hy 926 από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το εκχύλισμα μπορεί και επηρεάζει θετικά την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων.

Abstract

As oxidative stress is defined an imbalance between the production of free radicals and total antioxidant molecules, to the prevalence of the former. The increased production of free radicals causes adverse effects on various biomolecules such as DNA, proteins and lipids, and results in the loss of normal cell function. Increased oxidative stress is associated with the appearance of various degenerative diseases including cancer, Parkinson's, diabetes, etc. Antioxidants are molecules produced by the organism or taken up through the diet and are a part of the organism's defense mechanisms against oxidative stress.

In this study, it was examined the ability of an extract from Batiki Tyrnavou variety to protect endothelial cells EA.hy926 against the oxidizing agent tert-butyl (t-BHT). For this purpose, the cells were cultured in the presence of tert-butyl for 1 hour after 24 h incubation with three non-cytotoxic concentrations of the extract. Subsequently, the oxidative stress markers: reduced glutathione (GSH), protein carbonyls (CARB) and the total antioxidant capacity (TAC) were measured spectrophotometrically. According to the results, the t-BHP alone increased oxidative stress. However, the 24-hour culture of the cells with the extract resulted in the reduction of t-BHP-induced oxidative stress compared to cells treated with t-BHP alone.

Specifically, the results showed that administration of the extract had the ability to increase the levels of glutathione by 14.4 and 12.3% at concentrations of 0.125 and 0.25 µg/ml compared to cells treated with t-BHP alone. Moreover, at the same concentrations extract increased total antioxidant capacity by 15.1 and 14.8% compared with the cells treated with t-BHP alone. Moreover, protein carbonyls were reduced by 41.5, 26.2 and 28.3% at concentrations of 0.068, 0.125 and 0.25 µg/ml compared with the cells treated with t-BHP alone.

In conclusion, the extract treatment protected endothelial cells EA.hy926 from the oxidizing agent t-BHP-induced oxidative stress. Further studies are needed to elucidate the mechanisms by which the extract exerts its antioxidant activity.

Περίληψη	4
Abstract	5
Περιεχόμενα	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου	8
1.2. Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών	8
1.2.1. Ενδογενείς πηγές	8
1.2.2. Εξωγενείς πηγές	10
1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	11
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	13
1.5. Πολυφαινόλες και δράση τους	16
1.6. Οξειδωτικό στρες	19
1.7. Σταφύλια	22
1.8. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.Hy 926	23
2. Σκοπός	23
3. Υλικά και μέθοδοι	25
3.1. Υλικά	25
3.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.Hy 926	26
3.3. Καλλιέργεια ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EA.Hy 926	27
3.4. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	28
3.5. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)	29
3.5.1. Πειραματικό πρωτόκολλο	30
3.6. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων	31
3.7. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	34
3.8. Στατιστική ανάλυση	36
4. Αποτελέσματα	37
5. Συζήτηση	40
6. Βιβλιογραφία	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins et al., 1988). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στοιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002). Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντιούνται συνηθέστερα είναι οι ROS. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες υξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

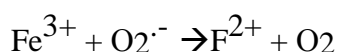
1.2.1. Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία

της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti, 2001). Ο μηχανισμός παραγωγής τους βασίζεται στο γεγονός ότι κατά την παραγωγή του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες δραστικές ουσίες είναι ROS.

Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

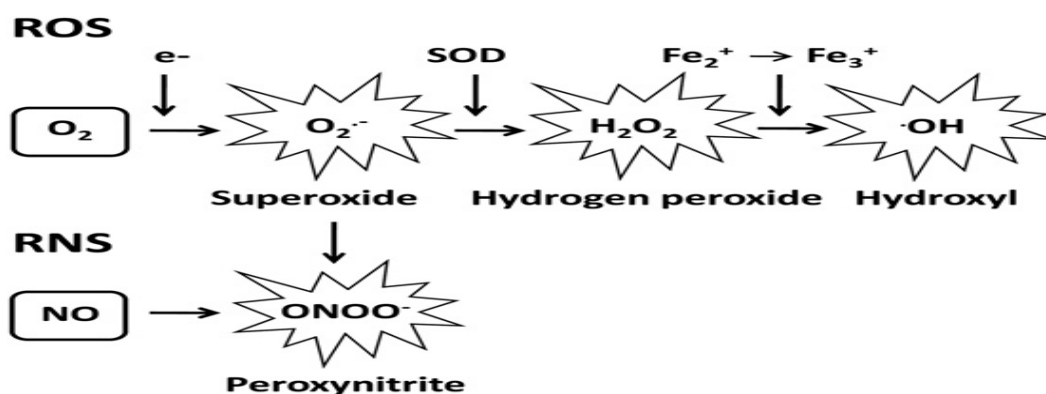


Εκτός από τις ROS στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου από τη συνθετάση του NO. Πέρα από τα μιτοχόνδρια, μια άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδισώματα. Τα υπεροξειδισώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό

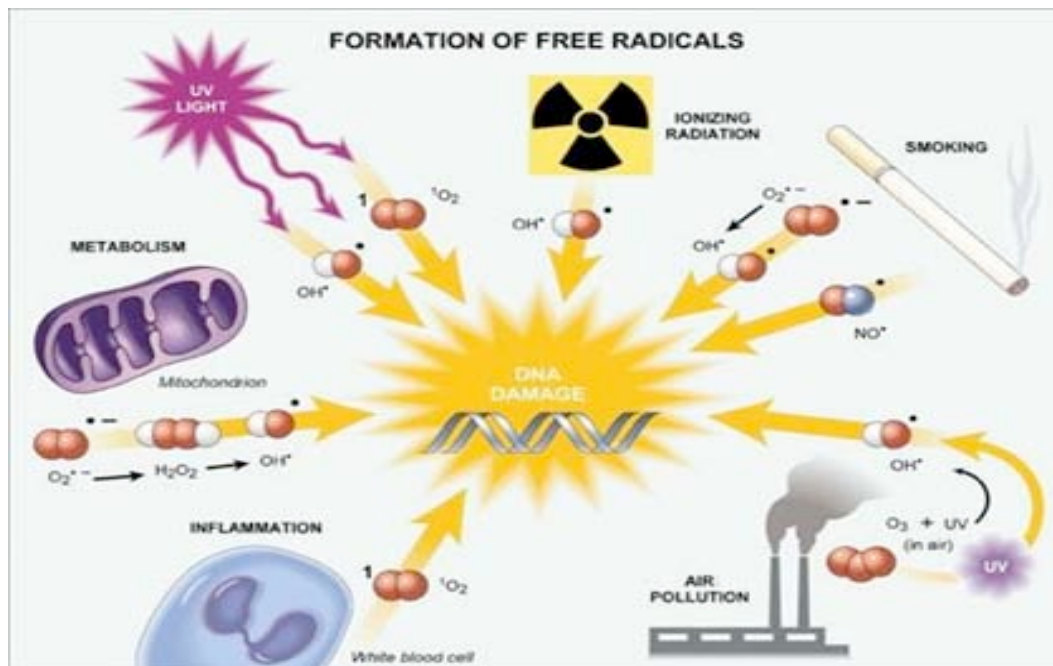
να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames et al., 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα $O_2^{\cdot-}$ (Cooper et al., 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brandley et al., 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.



Εικόνα 1: παραγωγή ROS και RNS

1.2.2. Εξωγενείς πηγές

Εδώ περιλαμβάνονται διάφοροι και ετερογενείς παράγοντες όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίξει σημαντικό ρόλο (Ames et al., 1981; Halliwell & Gutteridge 1998).



Εικόνα 2. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Jenkins, 1988). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Malm et al., 2001). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid et al., 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή

(Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Bettors et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O₂) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δείχτει ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Λιπίδια

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO[•], συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΐδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα.

Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002).

DNA Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

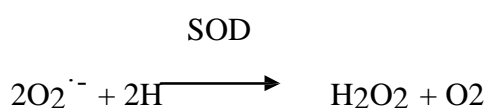
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

A) Ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:

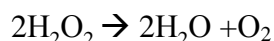


Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδισώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H₂O₂ (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂.

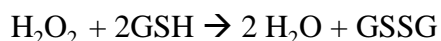
CAT



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂ χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

GPX



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

B) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

B-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

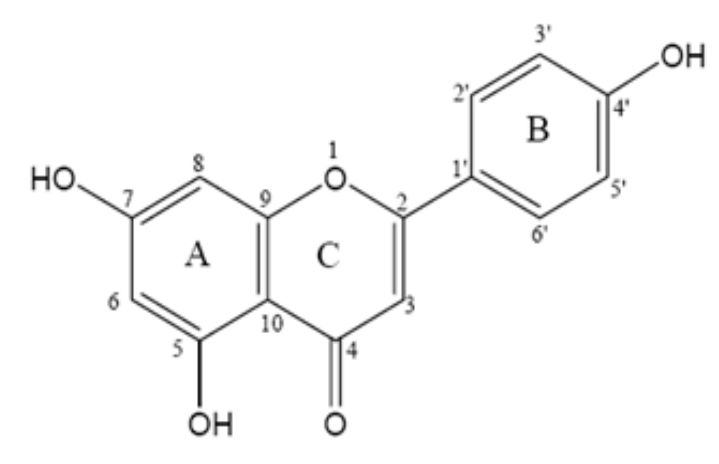
Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.5. Πολυφαινόλες και δράση τους

Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που συναντάμε ευρέως σε φυτικούς οργανισμούς. Αρκετά φρούτα και λαχανικά είναι πλούσια σε διάφορες πολυφαινόλες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η πολυφαινόλη ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών και έχει σημαντική χημειοπροστατευτική και αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο ρόλος της αφορά την μείωση της σύνθεσης των ελεύθερων ριζών, του κινδύνου φλεγμονής και την συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων. Επίδραση ανάλογη της ρεσβερατρόλης, έχουν και οι τανίνες και η κερκετίνη που επίσης αποτελούν συστατικά του σταφυλιού.

Όσον αφορά την δομή τους, οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και απαρτίζουν μια μεγάλη και ετερογενή κατηγορία χημικών ενώσεων. Μάλιστα, οι ενώσεις αυτές υπολογίζεται ότι είναι περισσότερες από 8000, όμως λίγες από αυτές είναι αντιοξειδωτικές. Όσον αφορά την δομή τους, βασικό τους χαρακτηριστικό, αποτελεί η ύπαρξη του αρωματικού δακτυλίου του βενζολίου, στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες.

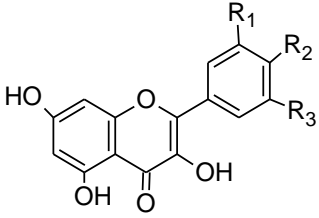
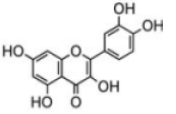
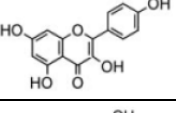
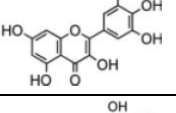
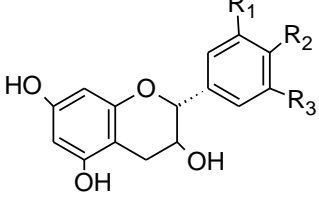
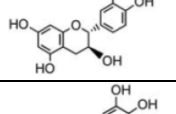
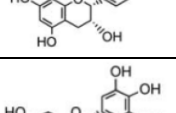
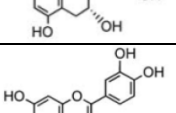
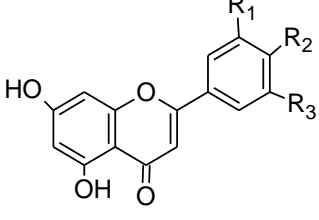
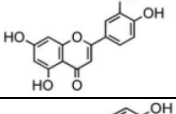
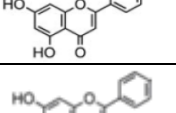
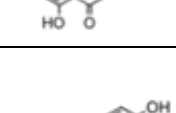
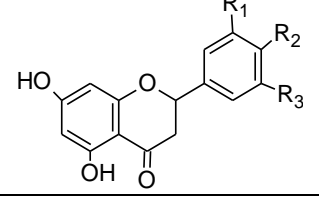
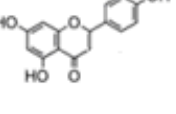
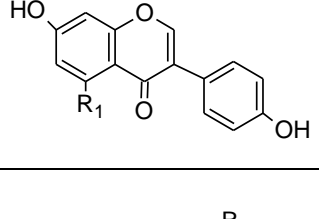
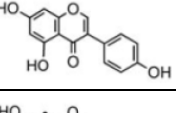
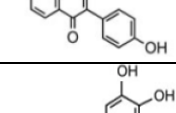
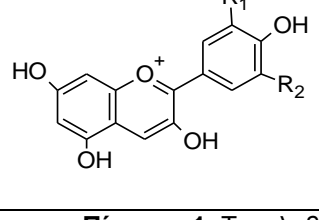
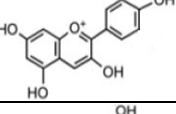
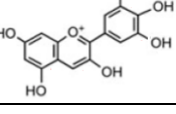


Εικόνα 3: Χημική δομή πολυφαινολών

Ανάλογα λοιπόν με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες με αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες (Manach et al., 2004):

- φλαβονοειδή,
- πολυφαινολικά οξέα,
- στιλβένια
- λιγνάνες

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται αναλυτικά η κατηγορία των φλαβονοειδών:

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R _{1,2,3} : -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή	
Φλαβονόλες		κερκετίνη	
		καιμπφερόλη	
		μυρικετίνη	
Φλαβανόλες		(+)-κατεχίνη	
		(-)-επικατεχίνη	
		επιγαλλοκατεχίνη	
Φλαβόνες		λουτεολίνη	
		απιγενίνη	
		χρυσίνη	
Φλαβανόνες		ναριγενίνη	
Ισοφλαβόνες		γενιστεΐνη	
		ντετζεΐνη	
Ανθοκυανιδίνες		κυανιδίνη	
		δελφινιδίνη	

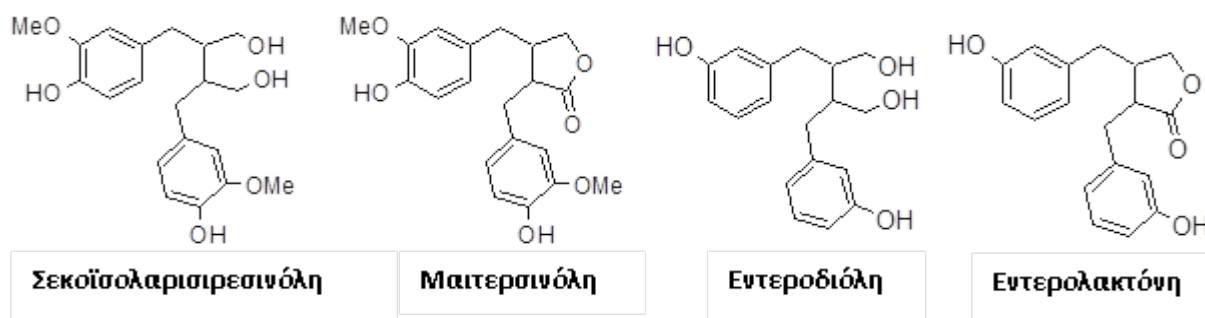
Πίνακας 1: Τα φλαβονοειδή

Στον παρακάτω πίνακα , παρουσιάζονται οι χημικές δομές των πολυφαινολικών οξέων:

Υδροξυβενζοϊκά οξέα			Υδροξυκινναμικά οξέα			
						
	Γαλλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ		Κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό οξύ	Φερουλικό οξύ
R1	OH	OH	R1	OH	OH	OCH3
R2	OH	OH	R2	-	OH	OH
R3	OH	H				

Πίνακας 2: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων

Ακολουθούν παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των λιγνάνων:



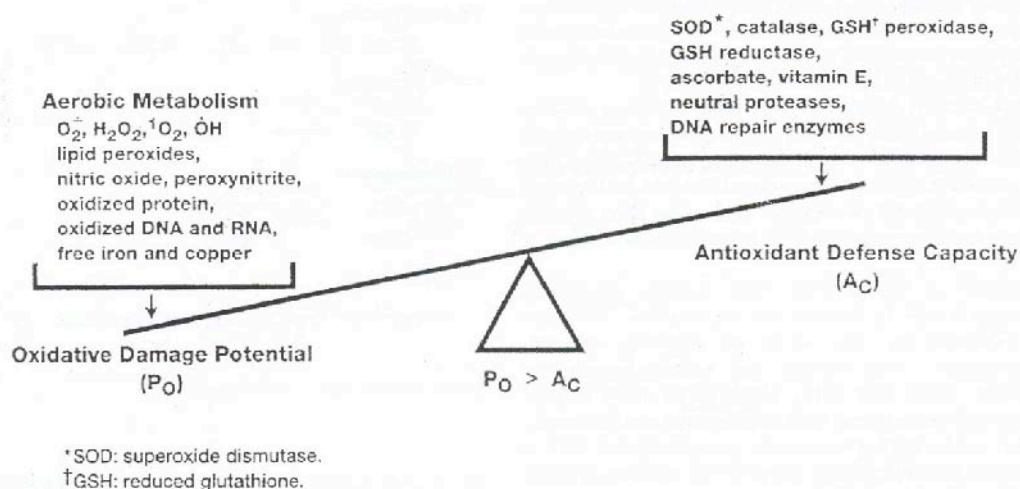
Εικόνα 4: Ενώσεις όπως η Εντεροδιόλη και η Εντερολακτόνη, ανήκουν στις λιγνάνες

Παρόλο που η σημασία των πολυφαινολών είναι εξαιρετικά μεγάλη, η αξιολόγηση των φυσιολογικών επιδράσεων συγκεκριμένων φυσικών φαινολικών αντι οξειδωτικών είναι εξίσου δύσκολη. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι από την στιγμή που υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από συστατικά που ενδεχομένως να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιέχονται στο ίδιο τρόφιμο. Για παράδειγμα, πάνω από εξήντα διαφορετικά χημικά φλαβονοειδή περιέχονται στο κόκκινο κρασί.

1.6. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies et al., 1991).

OXIDATIVE STRESS



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

A) Εξωγενείς παράγοντες:

- Ξενοβιοτικές ουσίες
- Παθογόνα βακτήρια και ιοί
- Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
- Ακτινοβολία
- Διατροφή
- Κάπνισμα
- Φάρμακα

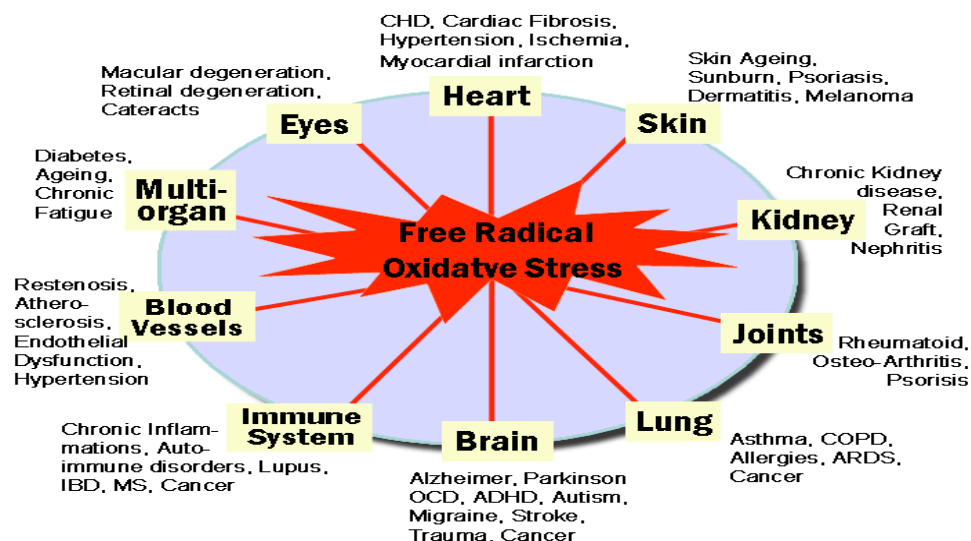
B) Ενδογενείς παράγοντες:

- Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
- Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχondρίων
- Λευκοκύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

Ο κατάλογος των ασθενειών, που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών συνεχώς αυξάνεται (Halliwell et al., 2001). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- ο καρκίνος (Toyokuni et al., 1998),
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal et al., 1998),
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans et al., 1993),
- η αθηροσκλήρυνση (Halliwell et al., 1994),
- το AIDS (Baruchel & Wainberg 1992),
- η ηπατίτιδα (Elliot and Strunin 1993)
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991)



Εικόνα 6: Νόσοι που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και ελεύθερες ρίζες

1.7. Σταφύλια

Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες σταφυλιού, οι οποίες είναι δυνατόν να διαθέτουν χρώματα όπως κόκκινο, κίτρινο, αλλά και μαύρο (σκούρο κόκκινο). Παρόλα αυτά, όλες ανεξαιρέτως οι ποικιλίες διαθέτουν εξίσου ωφέλιμες ουσίες, καθώς είναι πλούσια σε Βιταμίνες Α, Β και C. Επίσης, περιέχουν κάλιο και η απόδοσή του υπολογίζεται κοντά στις 60 θερμίδες ανά 100 gr μάζας (10-12 ρόγες).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τις ευεργετικές επιδράσεις του σταφυλιού, αυτό συντελεί στην διούρηση και στην αποβολή τοξινών. Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στον κάλιο που περιέχεται στον καρπό. Μάλιστα, οι αποτοξινωτικές ιδιότητες του σταφυλιού είναι γνωστές από αρχαιοτάτων χρόνων. Στην αρχαία Ελλάδα, οι Έλληνες εφάρμοζαν την σταφυλοθεραπεία, η οποία περιελάμβανε κατανάλωση μόνο σταφυλιού για σύντομο χρονικό διάστημα. Όμως, εκτός από την αρχαιότητα, ένα κλασσικό παράδειγμα της σύγχρονης εποχής που καταδεικνύει την ευεργετική επίδραση του σταφυλιού είναι το λεγόμενο «Γαλλικό παράδοξο». Σύμφωνα λοιπόν με αυτό, οι Γάλλοι εμφανίζουν μειωμένη συχνότητα καρδιοπαθειών, παρόλο που καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε λιπαρά. Σύμφωνα με τους Renaud και de Lorgeril (1992), οι ποσότητες κρασιού που καταναλώνουν οι Γάλλοι, βοηθούν στην αποφυγή εμφάνισης τέτοιων παθήσεων.

Παρόλο που έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την εύρεση της ακριβούς σύστασης των σταφυλιών και του κρασιού, αυτή δεν έχει καταστεί πλήρως γνωστή. Για την ακρίβεια, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 χημικές ουσίες, εκ των οποίων οι 150 ανήκουν στην κατηγορία των εστέρων. Ακόμα, μεταξύ αυτών των συστατικών συγκαταλέγονται το νερό, σάκχαρα, οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νερού εντός του καρπού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Η πλειοψηφία των ενώσεων, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις με εύρος 10-1-10⁻⁶ mg/Lt ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση >100mg/Lt οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson et al., 1993).

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα στέμφυλων από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου. Η σύστασή του αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Polyphenols	mg/g extract
Catechin	10.87
Gallic acid	4.58
Caftaric acid	1.20
Procyanidin B1	0.96
Quercetin	0.35
Caffeic acid	0.24
Kaempferol	0.03
TPC (Total polyphenol content)	648 (mg gallic acid/g extract)

Εικόνα 7: Σύσταση του εκχυλίσματος στέμφυλων

1.8. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πολυλειτουργικά, πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση, τα οποία έρχονται σε επαφή με το αίμα. Διασυνδέονται με συναπτικά συμπλέγματα και φέρουν πολλά πινοκυτταρικά κυστίδια. Στο κυτταρόπλασμά τους αναγνωρίζονται λίγα οργανίδια (συσσκευή Golgi, ΑΕΔ, μιτοχόνδρια και ελεύθερα ριβοσώματα), ενδιάμεσα νημάτια βιμεντίνης και άφθονα μικρονημάτια (<http://emed.med.uoa.gr/>). Αυτή η κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Bern et al., 1991; Graham et al., 1996; Conti et al., 2013; Kossi et al., 2001).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη και ο προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EA.hy926 υπό την επίδραση

εκχυλίσματος από στέμφυλα της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις καθώς και η πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος έναντι του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl (t-BHP). Με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες και εν συνεχεία μέσω της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων εξετάστηκε σε ποιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε σχέση με την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl. Ο κύριος σκοπός ήταν να προσδιοριστεί εάν το εκχύλισμα μπορεί να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων με απώτερο σκοπό την δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής ή τροφίμων εμπλουτισμένων με εκχύλισμα που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο για την βελτίωση της υγείας του.

3 .Υλικά και μέθοδοι

3.1. Υλικά

Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα των εταιρειών Gibco, Sigma-Aldrich και Becton-Dickinson.

Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων τύπου EA.hy 926 περιείχε:

- Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, 25mM Hepes, Gilbo BRL 41966)
- L-γλουταμίνη 2mM (Biochrom KG Seromed)
- Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δύο θρεπτικά μέσα:

1) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

2) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων από στέμφυλα που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη
-

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των κυττάρων:

- Τρυψίνη 0.25% (Gibco)

3.3. Καλλιέργεια ενδοθηλιακής κυτταρικής σειρά EA.Ay 926

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε επανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1mL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow).

Η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH έπειτα από την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα στεμφύλων για 24 ώρες πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Τα κύτταρα επωάζονται σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (10 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και το εκχύλισμα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0.068, 0.125 και 0.250 μg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού FBS με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH συγκέντρωσης 0,3mM για 1 h. Χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με το εκχύλισμα και τον t-BOOH και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml

ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρωση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Ακολούθησε ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της γλουταθειόνης (GSH), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) αφού προηγήθηκε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.4. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

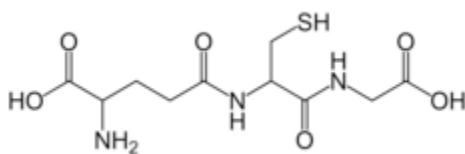
Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 µL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 µL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

3.5. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.



Εικ.1 Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

3.5.1. Πειραματικό πρωτόκολλο

Τα κύτταρα έχουν συλλεχθεί και διαρρηχθεί με υπερήχους (για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec). Ακολουθεί μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε Eppendorf 1,5ml:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	620 μL	620 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	50 μL	—
Κυτταρικό αιώρημα	—	50 μL

Αναδεύουμε τα eppendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. Κάθε δείγμα επαναλαμβάνεται

Υπολογισμοί

Ποσότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{Abstυφλού}) / 13.6 \times 20$, όπου το 20 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000 μL) με τον όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (50 μL, >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης) ($1000 / 50 = 20$). Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Μετά τον υπολογισμό των mmol/L GSH στα δείγματα, τα αποτελέσματα ανάγονται σε nmol GSH/mg πρωτεΐνης στα αντίστοιχα δείγματα.

3.6. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι αξιόπιστης δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα.

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

Αντιδραστήρια

Διάλυμα HCl 2.5 N

HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του

2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

DNPH 14 mM (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in \approx 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 200 μ L κυτταρικού εωρήματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
4. Προσθέτουμε στο ίζημα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCl) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCl για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. Προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
 9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 μια ακόμα φορά.
 10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
 11. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
 12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
 13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.
- *(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος – Ατυφλού / 0.022 × 1000/50.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹.

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ mg/mL

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος – Ατυφλού / 0.022 × 1000/50 × 2 × 10.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹.

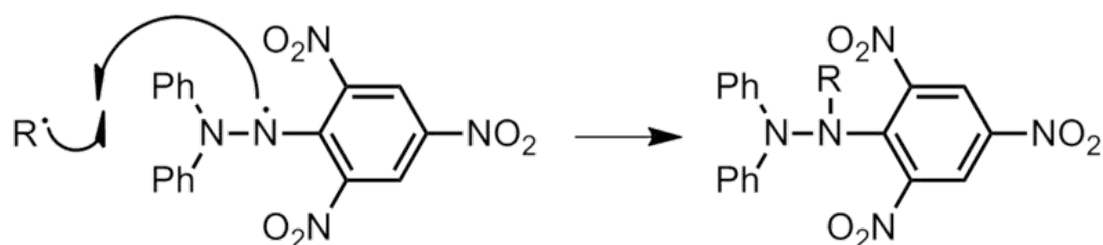
Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 10 για να συνυπολογίσουμε την 1:10 αραίωση του δείγματος.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των καρβονυλίων εκφράζεται ως προς την ποσότητα των πρωτεϊνών.

3.7. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η οποία ορίζεται ως η ικανότητα των συστατικών του κυτταρικού αιωρήματος να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες. Ακόμα, το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο με τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%), προκαλώντας μεγάλη αύξησή της, όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Η βιταμίνη C είναι το δεύτερο κατά σειρά ισχυρότερο μόριο, με τις βιταμίνες E και A να την ακολουθούν. Μάλιστα, οι βιταμίνες C και E είναι πιθανό να αποτελούν το 25% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η μέθοδος TAC, αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο). Η διαδικασία αυτή, στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας. Το DPPH φέρει μπλε χρώμα, δίνει απορρόφηση στα 517 nm και είναι φωτοευαίσθητο. Στην περίπτωση που το DPPH αναμιχθεί με μια αντιοξειδωτική ουσία, έχουμε την εξής αντίδραση αναγωγής:



Εικόνα 4.3: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό

Το παραγόμενο προϊόν είναι η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη. Σε αντίθεση με την αρχική, η παραγόμενη ουσία έχει κίτρινο χρώμα. Απόρροια του φαινομένου είναι η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος.

Για την διαδικασία TAC, προσθέτουμε σε Eppendorf 1,5ml την απαιτούμενη ποσότητα των αντιδραστηρίων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Blank	Θετικό control	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μ L	495 μ L	450 μ L
DPPH 0.1 mM	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ασκορβικό Οξύ 10 mM	—	5 μ L	—
Κυτταρικό αιώρημα	—	—	50 μ L

Πίνακας 4.3: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο TAC

Προηγουμένως, πραγματοποιείται συλλογή των κυττάρων, τα οποία και διαλύονται με υπερήχους. Αναλυτικότερα, αποκολλούμε τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας, σύμφωνα με την διαδικασία της τρυψινοποίησης, η οποία παρουσιάστηκε στην παραπάνω ενότητα.

Το επόμενο βήμα είναι η συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση 3000 g για 5 min στους 4 °C. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) το οποίο είναι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των πλύσεων, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Η διάρρηξη των κυττάρων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του μηχανήματος Sonicator για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 15 min στους 4 °C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Το υπερκείμενο διάλυμα, είναι δυνατόν να αποθηκευτεί -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Έπειτα, το επόμενο βήμα είναι μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέτρηση απαιτεί >10 μ g απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα που συλλέγουμε μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, μπορούν να εκφραστούν ως:

$$\begin{aligned} & \% \text{ μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, } \% \text{ Abs} \\ \text{μείωση} &= (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \cdot 100 \\ \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL αιωρήματος} &= [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \cdot 50 \cdot \\ &50] / 1000 \end{aligned}$$

Σημειώνουμε τα εξής:

- α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.
- β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.
- γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 20 διότι η αραιώση του αιωρήματος στην κυψελίδα είναι 20-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 20).
- δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

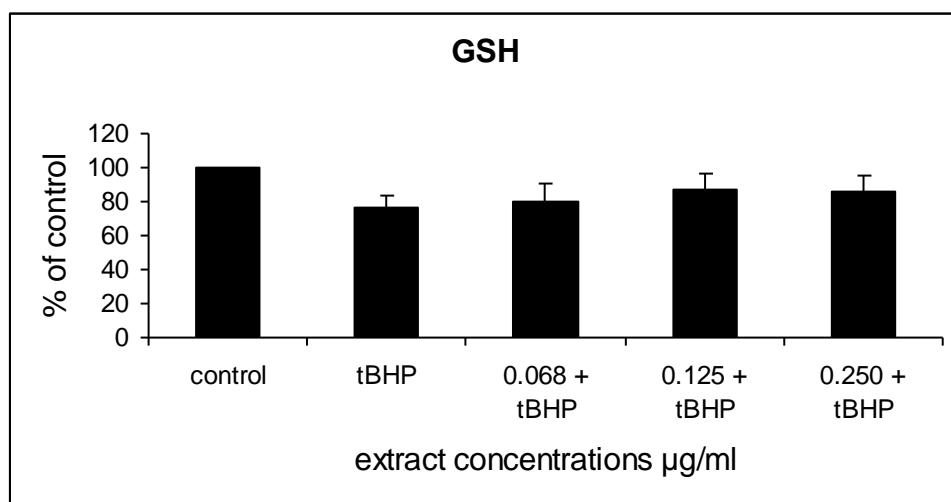
3.8. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης του τεστ του Tukey. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Τα κύτταρα μελετήθηκαν στην κατάσταση control στα οποία δεν προστέθηκε κάποιος παράγοντας στο θρεπτικό υλικό, στην κατάσταση tBHP όπου στα κύτταρα προστέθηκε tBHP 0,3mM για 1 ώρα, στην κατάσταση 0.068 + tBHP όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με εκχύλισμα συγκέντρωσης 0.125μg/ml και στη συνέχεια προστέθηκε tBHP 0,3mM για 1 ώρα, στην κατάσταση 0.125 + tBHP όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με εκχύλισμα συγκέντρωσης 0.25μg/ml και στη συνέχεια προστέθηκε tBHP 0,3mM για 1 ώρα και στην κατάσταση 0.25 + tBHP όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με εκχύλισμα συγκέντρωσης 0.068μg/ml και στη συνέχεια προστέθηκε tBHP 0,3mM για 1 ώρα.

Όσον αφορά την γλουταθειόνη παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στην κατάσταση tBHP σε σχέση με την κατάσταση control κατά 26%. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στις καταστάσεις 0.125 και 0.250μg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 14,4 και 12,3% αντίστοιχα.

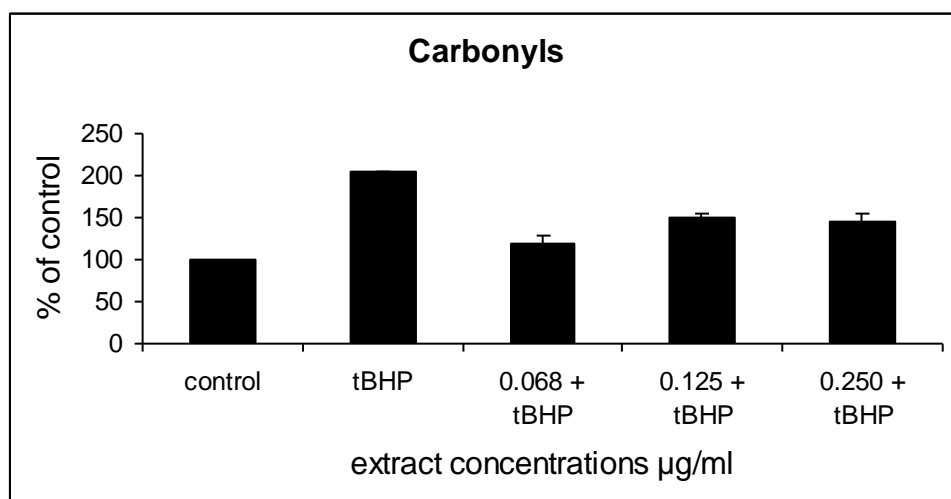


Γράφημα 1: Επίπεδα γλουταθειόνης

GSH	% of tBHP
tBHP	100,0
0.068 + tBHP	105,6
0.125 + tBHP	114,4
0.250 + tBHP	112,3

Πίνακας 1: Ποσοστιαία μεταβολή της γλουταθειόνης

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στην κατάσταση tBHP σε σχέση με την κατάσταση control κατά 104%. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στις καταστάσεις 0.068, 0.125 και 0.250 μg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 41.5, 26.2 και 28,3% αντίστοιχα.

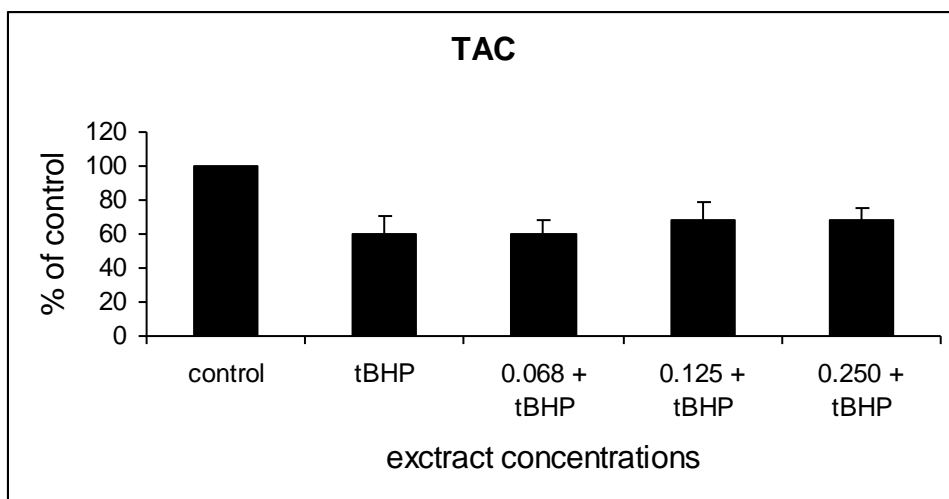


Γράφημα 2: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων

CARB	% of tBHP
tBHP	100
0.068 + tBHP	58,5
0.125 + tBHP	73,8
0.250 + tBHP	71,7

Πίνακας 2: Ποσοστιαία μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στην κατάσταση tBHP σε σχέση με την κατάσταση control κατά 40,3%. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στις καταστάσεις 0.125 και 0.250 μg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 15.1 και 14.8% αντίστοιχα.



Γράφημα 3: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

TAC	% of tBHP
tBHP	100,0
0.068 + tBHP	101,6
0.125 + tBHP	115,1
0.250 + tBHP	114,8

Πίνακας 3: Ποσοστιαία μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

5. Συζήτηση

Τα αντιοξειδωτικά μόρια έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να τις εξουδετερώνουν. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να προστατεύσουν τα βιομόρια των κυττάρων από οξείδωση και κατ' επέκταση να προφυλάξουν τον οργανισμό από μια πληθώρα ασθενειών που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό καρκίνου καθώς και τη πρόκληση και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων.

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να εμποδίσουν τις άκρως επιβλαβείς συνέπειες της οξείδωσης. Ουσιαστικά λειτουργούν ως χημειοπροστατευτικά για τον οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά απαντώνται σε μια ευρεία ποικιλία στα τρόφιμα και για αυτό το λόγο η πρόσληψή τους είναι ιδιαίτερα εύκολη. Κύριους διατροφικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες αποτελούν τόσο ορισμένες βιταμίνες, ιχνοστοιχεία όσο και μερικές φυτοχημικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη E (ή τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ), η νιασίνη, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ουσιών και ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση. Οι πολυφαινόλες επίσης είναι μια ετερογενής κατηγορία αντιοξειδωτικών μορίων που απαντώνται σε μια πληθώρα καρπών φρούτων και λαχανικών.

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η πιθανή ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών από εκχύλισμα στεμφύλων πλούσιο σε πολυφαινόλες παρουσία οξειδωτικού στρες λόγω του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl (t-BHP) σε ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EA.hy926. Το εκχύλισμα των στέμφυλων απομονώθηκε από την ελληνική ποικιλία *V. vinifera* Μπατίκι Τυρνάβου. Σε προηγούμενη μελέτη, είχε προσδιοριστεί η πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος και είχε δεχθεί *in vitro* ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Veskoukis et al., 2012).

Για την μελέτη τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά σε μια κατάσταση ελέγχου και σε μια κατάσταση όπου τους χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας tert-butyl (t-BHP) σε συγκέντρωση 0,3 mM για μια ώρα, με σκοπό την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Η πρόκληση οξειδωτικού στρες επιτεύχθηκε καθώς οι τρεις δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν επηρεάστηκαν αρνητικά. Συγκεκριμένα

η ανηγμένη γλουταθειόνη μειώθηκε κατά 26%, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν κατά 104% και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε κατά 40,3%.

Στην συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο που περιείχε τρεις διαφορετικές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 0.068, 0.125 και 0.250 $\mu\text{g/ml}$. Η καλλιέργεια διήρκεσε 24 ώρες και έπειτα τα κύτταρα επωάστηκαν με τον οξειδωτικό παράγοντα tert-butyl (t-BHP) συγκέντρωσης 0,3mM για μια ώρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλλιέργεια με το εκχύλισμα είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μειωμένου οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με τον παράγοντα tert-butyl (t-BHP). Συγκεκριμένα στην ανηγμένη γλουταθειόνη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 0.125 και 0.250 $\mu\text{g/ml}$ σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 14,4 και 12,3% αντίστοιχα. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 0.068, 0.125 και 0.250 $\mu\text{g/ml}$ σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 41,5, 26,2 και 28,3% αντίστοιχα. Τέλος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 0.125 και 0.250 $\mu\text{g/ml}$ σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 15,1 και 14,8% αντίστοιχα. Παρατηρούμε λοιπόν ότι το εκχύλισμα άσκησε μια αντιοξειδωτική δράση καθώς αύξησε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενώ παράλληλα μείωσε τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές εργασίες που μελέτησαν την επίδραση εκχυλισμάτων στεμφύλων σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τον εκφυλισμό του ενδοθηλίου. Μια κλινική μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού αύξησε τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο (Kar et al, 2009). Έτσι, με βάση τα αποτελέσματα μπορεί να προταθεί η χρήση των εκχυλισμάτων στέμφυλων με σκοπό την προστασία από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς στο καρδιαγγειακό σύστημα. Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού ανέστειλε την αύξηση του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- α από επαγόμενη οξείδωση του DNA σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς HUVEC, ενώ εκχυλίσματα από φλούδες και σπόρους σταφυλιών ανέστειλαν την αύξηση των ελευθέρων ριζών που προκαλείται από τη γλυκόζη σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (Chao et al, 2011 και Felice et al., 2012).

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος σταφυλιού οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στον υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενό του. Έτσι, η σύνθεση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος σταφυλιού αξιολογήθηκε και βρέθηκαν διαφορετικές κατηγορίες των πολυφαινολών όπως φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες, ανθοκυάνες και φαινολικά οξέα. Όλες αυτές οι πολυφαινόλες που προσδιορίζονται στα εκχυλίσματα σταφυλιού παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Hosu et al., 2013 και Hribar et al., 2013).

Συμπερασματικά, τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων μπορεί να ενισχύσει την αντιοξειδωτική άμυνα των ενδοθηλιακών κυττάρων, με την παρουσία ενός οξειδωτικού παράγοντα που προκαλεί οξειδωτικού στρες. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα στεμφύλων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής για τη μείωση των αρνητικών επιδράσεων που προκαλούνται από οξειδωτικές στρες που προκαλείται σε αυτά τα κύτταρα. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος σταφυλιού παρατηρήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ, σε πολλές μελέτες, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι δύσκολο να επιτευχθούν σε έναν ζωντανό οργανισμό ή παρουσιάζουν τοξικότητα. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν τα εκχυλίσματα καθώς και κλινικές δοκιμές σε ζωντανούς οργανισμούς για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα και *in vivo*.

Βιβλιογραφία

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
- Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2004; 170:1179-1184.
- Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
- Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol.* 2002 40:717-726.
- Barreiro Esther, Hussain Sabah N.A., (2010), Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 12, Number 3
- Chao CL, Chang NC, Weng CS, et al. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- α -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr* 2011; 50(6): 401–419.

- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
- Conti V, Russomanno G, Corbi G, Guerra G, Grasso C, Filippelli W, Paribello V, Ferrara N, Filippelli A. Aerobic training workload affects human endothelial cells redox homeostasis. *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Apr;45(4):644-53.
- Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.
- Felice F, Zambito Y, Di Colo G, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80(1): 176–184.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000 48:3597-3604.
- Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.
- Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.

- Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
- Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzymology* 186, 1990.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “The antioxidants of human extracellular fluids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.
- Hosu A, Cristea VM, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem* 2013; 150: 113–118.
- Hribar U, Ulrich NP. The metabolism of anthocyanins. *Curr Drug Metab* 2014; 15(1): 3–13.
- Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 89-95.
- Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.

- Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
- Kar P, Laight D, Rooprai HK, et al. Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med* 2009; 26(5): 526–531.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976 24:117–191.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
- Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233-9.
- Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13: 295-309.
- Manach, C., A. Mazur, and A. Scalbert. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology* 16, no. 1: 77-84. Database on-line. Available from Scopus.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.

- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.* 2004; 357: 83-86.
- Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004; 213-218.
- Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.
- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
- Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
- St-Pierre J, Buckingham, JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.

- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716-8.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
- Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, et al. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 185867.