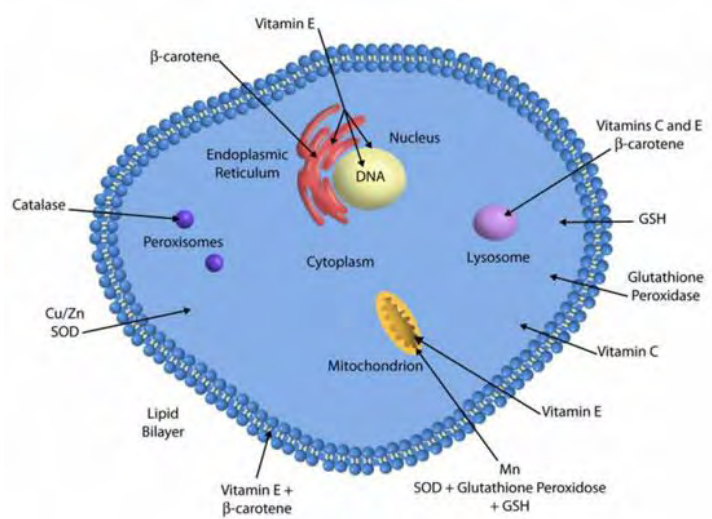


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΣΤΕΜΦΥΛΑ
ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ
ΜΥΪΚΑ ΚΑΙ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ



EFFECT POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPES IN THE
EXPRESSION AND ACTION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN MUSCLE
AND EPITHELIAL CELLS

Χουσμεκερίδου Αναστασία

Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Άννα Μαρία Ψαρρά: Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΤΟΝ ΠΑΤΕΡΑ ΜΟΥ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τους ορίζοντες μου πάνω στην επιστήμη μου και υπήρξε εμπνευστής της θέλησης και της επιμονής μου να προσπαθώ για το καλύτερο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο, Λέκτορα του Τμήματος για την προσοχή και την υπομονή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Γκουτζουρέλα για την τεράστια βοήθεια του, την υπομονή, τον σεβασμό και την ψυχολογική μου στήριξη όλον αυτόν τον καιρό στο εργαστήριο. Ήταν δίπλα μου σε όλα και έτοιμος να μου μεταφέρει τις γνώσεις του σε κάθε μου απορία.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στον πατέρα μου, Στυλιανό Χουσμεκερίδη, ο οποίος όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου, συμμερίζεται τους φόβους μου, τις ανασφάλειες μου, άγρυπνος φρουρός σε κάθε βήμα μου, έτοιμος να με συμβουλευσει, να με καθοδηγήσει και να με στηρίξει. Έχοντας έναν τέτοιο πατέρα δίπλα μου, με υπομονή και όνειρα για μένα, είναι σίγουρο ότι νιώθω ασφαλής και γεμάτη συναισθηματικά για να προχωρήσω μπροστά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου Ελένη, τα αδέρφια μου Στάθη και Κωνσταντίνο καθώς και την γιαγιά μου Αναστασία και τον παππού μου Στάθη, γιατί όλοι μαζί με στήριξαν και με βοήθησαν να φτάσω στον στόχο μου.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή.....	7
2.1 Ελεύθερες ρίζες.....	7
2.2 Δραστικά είδη οξυγόνου και σχηματισμός.....	7
2.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	8
2.4. Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς -Οξειδωτικό στρες.....	8
2.5 Αντιοξειδωτικοί κυτταρικοί μηχανισμοί.....	11
2.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας.....	12
2.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας.....	17
2.6. Ποιες τροφές περιέχουν αντιοξειδωτικά;.....	29
2.6.1 Ελαιόλαδο.....	29
2.6.2. Τσάι.....	29
2.6.3. Κακάο.....	30
2.6.4. Μπύρα.....	30
2.6.5. Ξηροί καρποί.....	31
2.6.6. Καφές.....	32
2.6.7. Φρούτα και λαχανικά.....	33
2.6.8. Σταφύλια.....	34
3. Μυικά κύτταρα C2C12.....	35
4. Ενδοθηλιακά κύτταρα σειράς EAhy 926.....	36
5. Υλικά.....	37
6. Αποτελέσματα.....	45
7. Συζήτηση.....	59
8.Βιβλιογραφία.....	63

1. Περίληψη

Η αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών προκαλεί πολλές δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς. Έτσι οι περισσότεροι οργανισμοί περιέχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι τους προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από την επίδραση εξωγενών παραγόντων είτε ενδογενών. Οι οργανισμοί λαμβάνουν αντιοξειδωτικές ουσίες μέσω τις τροφής. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων εστιάζεται σε τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά όπως είναι το ρόδι, τα πράσινο τσάι και τα σταφύλια, τα οποία είναι πλούσια σε πολυφαινόλες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των στέμφυλων *Vitis Vinifera* (Μπατίκι Τυρνάβου) σε μυϊκά κύτταρα C2C12 και επιθηλιακά κύτταρα EaHY926. Τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 3,6,12,18 και 24 ώρες σε συγκεντρώσεις οι οποίες δεν ήταν κυτταροτοξικές. Πιο συγκεκριμένα, τα C2C12 επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις 2,5 μg/ml και 10μg/ml εκχυλίσματος, και τα EaHY926 επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις 0,25 μg/ml και 0,068 μg/ml. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν κάποια αντιοξειδωτικά ένζυμα και παρατηρήθηκε αν αυξάνεται ή όχι η συγκέντρωσή τους. Μελετήθηκε η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση, η συνθετάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η οξυγενάση της αίμης. Χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της Western blot καθώς και φασματοφωτομετρική διαδικασία.

Τα αποτελέσματα έδειξαν, στα C2C12 μείωση της καταλάσης και αύξηση της συνθετάσης της γλουταθειόνης καθώς και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Στα EaHY926 παρατηρήθηκε αύξηση της συνθετάσης της γλουταθειόνης και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Αυτά τα αποτελέσματα αυξάνουν το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτες για να μπορέσει να αποσαφηνιστεί όλος ο καταρράκτης των αντιοξειδωτικών ενζύμων που παίζουν ρόλο στη άμυνα του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες.

Abstract

The increased production of free radicals causes many adverse effects on organisms. So, most organisms contain antioxidant mechanisms that protect them from oxidative stress. Free radicals may be generated either by the effect of endogenous or exogenous factors. The agencies take antioxidants through food. The interest has focused on foods rich in antioxidants such as pomegranate, green tea and grapes, which are rich in polyphenols.

In the present study we investigated the effect of grape pomace *Vitis Vinifera* (Batiki Tyrnavou) in C2C12 muscle cells and epithelial cells EaHY926. These cells were incubated with the extract for 3,6,12,18 and 24 hours at concentrations which were not cytotoxic. More specifically, the C2C12 were incubated at concentrations of 2.5 µg/ml and 10 µg/ml extract and EaHY926 incubated at concentrations of 0.25 µg/ml and 0.068 µg/ml. Then studied some antioxidant enzymes was observed whether or not the increased concentration. Studied as catalase, superoxide dismutase, glutathione synthetase, glutathione transferase and heme oxygenase. We use the procedure of Western blot and spectrophotometric procedure.

The results showed in C2C12 a reduction of catalase and increase of glutathione synthetase and glutathione transferase. In EaHY926 observed increase in glutathione synthetase and glutathione transferase. These results increase the interest for further studies in order to clarify the whole cascade of antioxidant enzymes that play a role in defending the body against oxidative stress.

2. Εισαγωγή

2.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους, (1) είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή του στιβάδα. (2) Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό και παριστάνεται συνήθως με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας. Είναι μόρια ασταθή τα οποία έχουν την τάση να συνδέονται με άλλα μόρια για να αυξήσουν την σταθερότητά τους, οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελευθέρων ριζών. Παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος καθώς και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες.

2.2 Δραστικά είδη οξυγόνου και σχηματισμός

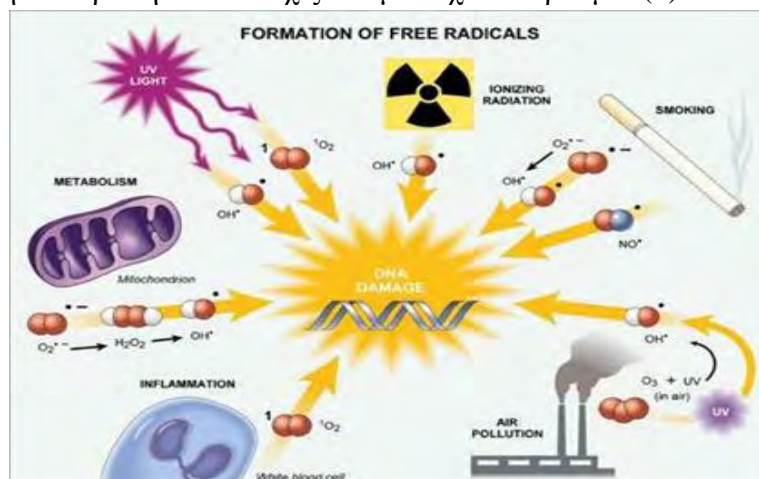
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: 1. Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\bullet$) 2. Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέος (HClO) 3. Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων όπως το ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) και 4. Μόρια όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). (3) Εκτός από τις δραστικές μορφές οξυγόνου που προέρχονται από το οξυγόνο, στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται 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. Αυτές οι κατηγορίες ριζών μπορούν να προέλθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (4).

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: Ο πρώτος είναι με ομοιοπολική διάσπαση. Δηλαδή, ένας ομοιοπολικός δεσμός θα διασπαστεί και είτε το ζεύγος ηλεκτρονίων θα παραμείνει το μητρικό μόριο και θα σχηματιστούν δύο ιόντα, είτε θα διαχωριστεί και θα δημιουργηθούν δύο ρίζες. Ο δεύτερος τρόπος παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που είναι και ο πιο σύννηθος τρόπος για τα βιολογικά συστήματα.

Ο μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και το τερματισμό. Στη διάδοση κάθε σχηματιζόμενη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με ένα ουδέτερο μόριο και να δώσει μια νέα ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα θα αντιδράσει με τη σειρά της με άλλο μόριο και έτσι να προαχθεί η διάδοση. Θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δε παρέχουν νέες ελεύθερες ρίζες.

Η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στο σχηματισμό των πρώτων ελευθέρων ριζών, δηλαδή ομάδων με μονήρες ηλεκτρόνιο. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξειδωσης είναι τα υδροξυ-υπεροξειδία Αυτά στη συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδροξυ-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το

υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με τη σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτατο ρυθμό. (5)



Εικόνα 1: Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

2.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να παραχθούν ενδογενώς στους οργανισμούς καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στην μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά. Συγκεκριμένα μπορούν να παραχθούν στους οργανισμούς κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα και τη λιπιδική υπεροξειδωση. Επίσης μπορούν να παραχθούν λόγω της επίδρασης εξωγενών πηγών όπως η ακτινοβολία, η φλεγμονή, το κάπνισμα και η μολυσμένη ατμόσφαιρα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο. (6) (7)

2.4. Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς -Οξειδωτικό στρες.

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Γενικότερα, η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται οξειδωτικό στρες (oxidative stress). (8)

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι βλάβες και οι επιπτώσεις που προκαλούνται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου εις βάρος του DNA και των λιπιδίων. παραδείγματα των οξειδωτικών βλαβών (Πίνακας 1)

Οξειδωτικές βλάβες	Στόχοι	Είδος βλαβών	Επιπτώσεις
DNA	Πυρηνικό, μιτοχονδριακό και DNA χλωροπλαστών	DNA εγκοπές, DNA σπασίματα	Μεταλλαξιγένεση, κυτταρική δυσλειτουργία, καρκινογένεση
	Βάσεις πουρίνης, βάσεις πυριμιδίνης	Χημικές τροποποιήσεις: 8 Υδροξυ-5-γουανίνη Υδροξυ-6-υδροθυμίνη	
	Πρωτεΐνες DNA	Σχηματισμός ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA protein διασυνδέσεις), ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμός μεταξύ γειτονικών διπυριμιδινών από ακτινοβολία UV.	
Λιπίδια (9)	Φωσfolιπιδική διπλοστοιβάδα κυτταροπλασματικής και ενδοκυττάρων μεμβρανών (υδρόφοβο τμήμα)	Υπεροξείδωση λιπιδίων: σχηματισμός ριζών άνθρακα, παραγωγή οργανικών υδροϋπεροξειδίων (ROOH). Αποικοδόμηση λιπιδικών υπεροξειδίων σε τοξικά προϊόντα (κετόνες, εποξειδία, μαλονική διαλδεϋδη, 4-υδροξυνονενάλη, ισοπροστάνες κ.α)	Καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών. Βιοφυσικές και βιοχημικές διαταραχές στο κύτταρο.

Πίνακας 1: Οι επιπτώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου στο DNA και στα λιπίδια.

Οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα λιπίδια, ο σχηματισμός υπεροξειδίων είτε στον πεπτιδικό κορμό είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος

υπεροξειδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου (OH•, ONOO-, HClO, O₂) ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες (π.χ. από προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, όπως οι αλδεΰδες MDA και HNE).

Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη. Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα κυριότερα είδη οξειδωτικών τροποποιήσεων που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες, Στον πίνακα 3 φαίνονται τα πλέον επιρρεπή στην οξείδωση αμινοξέα με τα συνήθη προϊόντα τους και στον πίνακα 4 αναφέρονται οι πιθανές βιοχημικές συνέπειες της οξειδωτικής βλάβης διαφόρων πρωτεϊνικών. (10)

Οι περισσότερες οξειδωτικές επιδράσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία πολλών πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυτή την άμεση μεταβολή/αλλαγή αμινοξέων που βρίσκονται σε μια λειτουργική περιοχή για την πρωτεΐνη ή σε μερική αποδιάταξή της (Εικ. 2). Αν οι πρωτεΐνες δεν αποδομηθούν εγκαίρως σ' αυτό το στάδιο, τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία μακροπρόθεσμα σχηματίζουν ομοιοπολικές ενώσεις (cross links) μεταξύ τους και με τη συσσώρευσή τους, μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο. (11)



Εικόνα 2: Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του στην πρωτεϊνική δομή. (11)

Πίνακας 2: Γενικοί τύποι οξειδωτικής τροποποίησης
Οξείδωση θειολικών ομάδων
Σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων
Σχηματισμός διτυροσινών, χλωρινίωση, νιτροσυλίωση, υδροξυλίωση
Τροποποιήσεις της τρυπτοφάνης
Σχηματισμός χλωραμινών, οξειδωτική απαμίνωση
Διαμετατροπές αμινοξέων (π.χ. His σε Asn, Pro σε OH-Pro)
Προσθήκη προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων (MDA, HNE)
Προσθήκη προϊόντων οξείδωσης (π.χ. p-hydroxyphenylacetaldehyde)
Αντοδράσεις γλυκίωσης και γλυκοξειδίωσης (π.χ. Maillard browning)
Cross-links, συμπλοκοποίηση, διάσπαση πεπτιδικών δεσμών
Υδρο(υπερό)ξυπαράγωγα αλειφατικών αμινοξέων

Πίνακας 3: Οξειδωτικώς ευάλωτα αμινοξέα και προϊόντα οξείδωσης τους	
Αμινοξύ	Προϊόν οξείδωσης
Κυστεΐνη	Δισουλφίδια, Μεικτά δισουλφίδια
Μεθειονίνη	Σουλφοξειδίο μεθειονίνης
Τυροσίνη	Διτυροσίνη, νιτροτυροσίνη
Τρυπτοφάνη	Υδροξυ- και νιτρο- τρυπτοφάνη
Φαινυλαλανίνη	Υδροξυφαινυλαλανίνη
Βαλίνη, Λευκίνη	Υδρο(υπερο)ξειδία
Ιστιδίνη	2-οξοϊστιδίνη, ασπαραγίνη, HNE-His
Γλουταμίνη	Οξαλοξικό, Πυροσταφυλικό οξύ
Προλίνη	Υδροξυπρολίνη, πυρολιδόνη
Θρεονίνη	2-άμινο-3-κετοβουτυρικό οξύ
Αργινίνη	Γλουταμινική ημιαλδεύδη, χλωραμίνες
Λυσίνη	MDA-Lys, HNE-Lys

Πίνακας 4: Βιοχημικές συνέπειες οξειδωτικής τροποποίησης πρωτεϊνών
1. Μείωση ή αύξηση ενζυμικής δραστηριότητας
2. Απώλεια λειτουργικότητας
3. Απώλεια ενεργότητας αναστολέα
4. Συμπλοκοποίηση
5. Αυξημένη ή μειωμένη ευαισθησία σε πρωτεόλυση
6. Μη φυσιολογική πρόσληψη ουσιών από τα κύτταρα
7. Τροποποιημένη μεταγραφή γονιδίων
8. Αυξημένη ανοσογονικότητα

2.5 Αντιοξειδωτικοί κυτταρικοί μηχανισμοί

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενδογενή (κυτταρικές λειτουργίες) και εξωγενή (για παράδειγμα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τη διατροφή). (12) Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Για να χρηστεί μια λειτουργία αντιοξειδωτικός μηχανισμός θα πρέπει να διαθέτει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Να εξουδετερώνει αποκλειστικά και μόνο τις ελεύθερες ρίζες.
- Να αλληλεπιδρά με άλλα αντιοξειδωτικά εντός του οργανισμού ενεργοποιώντας νέους μηχανισμούς άμυνας.
- Να απορροφάται εύκολα
- Η συγκέντρωσή του στους ιστούς και στον οργανισμό γενικά να μην υπερβαίνει τα φυσιολογικά πλαίσια.
- Να δρα τόσο σε υδατικό περιβάλλον αλλά και στις κυτταρικές μεμβράνες

2.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί προκαλούν τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, δυο εξαιρετικά τοξικών προ-οξειδωτικών, στο ακίνδυνο νερό. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) προκαλεί τη μετατροπή της ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) τη μετασχηματίζουν σε νερό. (13) Άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οξυγενάση της αίμης, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η συνθετάση της γλουταθειόνης.

2.5.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

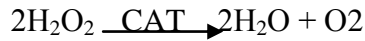
Ένα από τα πλέον αποτελεσματικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά, η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού, είναι το υπεροξείδιο της δισμουτάσης, το οποίο εξουδετερώνει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος, $O_2^{\cdot-}$, οδηγώντας στη δημιουργία του, λιγότερο δραστικού, υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 , και σε μοριακό οξυγόνο O_2 .



Το H_2O_2 εξουδετερώνεται στη συνέχεια από την καταλάση ή αντιδρώντας με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, σε νερό. Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα καθώς και στα μιτοχόνδρια. (14) Έτσι, το $O_2^{\cdot-}$ που παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορύλιωση στα μιτοχόνδρια, ανάγεται από την μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα, ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

2.5.1.2. Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα εξαιρετικά ενεργό ένζυμο το οποίο απαντάται σε φυτικά και ζωικά κύτταρα καθώς και σε ορισμένα αερόβια βακτήρια. Απαντάται κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα υπεροξειδιοσώματα (ή μικροσώματα) και προκαλεί την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο:

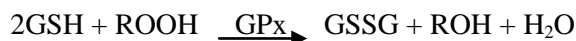


Η καταλάση είναι εξαιρετικά ενεργό ένζυμο καθώς ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει $\sim 6 \cdot 10^6$ μόρια H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο κάθε λεπτό. Η αδυναμία της εξουδετέρωσης του H_2O_2 που εντοπίζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους συνδέεται με χαμηλά επίπεδα καταλάσης σε αυτούς (13)· (14).

2.5.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης απαντάται σε δύο μορφές, την μη εξαρτώμενη από το σελήνιο γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (glutathione-S-transferase, GST) και την εξαρτώμενη από το σελήνιο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν στον αριθμό των υπομονάδων, στο είδος του δεσμού του σεληνίου στο ενεργό κέντρο και στους καταλυτικούς τους μηχανισμούς (π.χ. η GST καταλύει την διάσπαση διαφόρων ξενοβιοτικών χωρίς να μετέχει το σελήνιο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό). Στον οργανισμό εντοπίζεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο ήπαρ, λιγότερο στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στους πνεύμονες ενώ ελάχιστα στους μύες (14).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αντιδρά σε συνδυασμό με το τριπεπτιδίο γλουταθειόνη (GSH), η οποία βρίσκεται σε μεγάλες (μmol) συγκεντρώσεις σε όλα τα κύτταρα. Απαραίτητο υπόστρωμα για να δράσει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι διάφορα οργανικά υπεροξειδία (ROOH) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τα διασπά σε νερό και αλκοόλη με ταυτόχρονη οξειδωση της γλουταθειόνης (σε GSSG). Θεωρείται ότι η γλουταθειόνη ανάγει το σελήνιο στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPx και αυτή η ανηγμένη μορφή του ενζύμου καταλύει τη διάσπαση (14):



Η δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης είναι από τους σημαντικότερους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου προστατεύοντας τα κύτταρα των ζώντων οργανισμών από το οξειδωτικό στρες.

2.5.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται απόλυτα από τη NADPH. Το NADPH

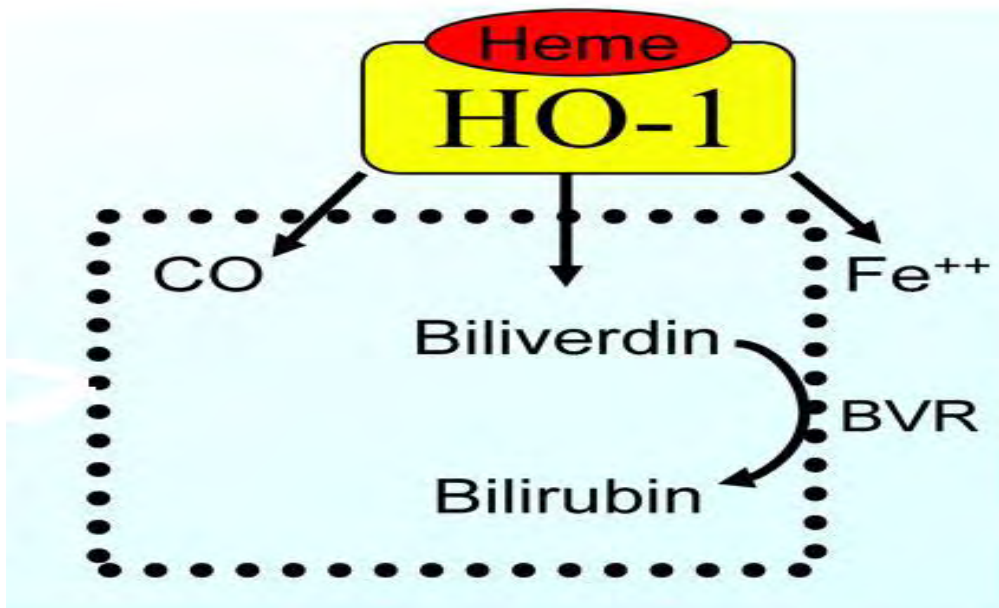
ανάγει το FAD, το οποίο το χρησιμοποιεί τη GR σαν συνένζυμο. Η GR διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου καταλύοντας την αναγωγή της GSSG σε GSH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH.



2.5.1.5 Οξυγενάση της αίμης (HO-1)

Η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και στη λειτουργία του μεταβολισμού της αίμης. Καταλύει το πρώτο βήμα για την αποδόμηση της αίμης το οποίο είναι κρίσιμης σημασίας. Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες δείχνουν ότι η HO επάγεται όχι μόνο από το υπόστρωμα της αίμης αλλά και από μία ποικιλία μη αιμικών επαγωγέων όπως βαρέα μέταλλα, ενδοτοξίνες, heat shock πρωτεΐνες, κυτοκίνες και προσταγλαδίνες. Αυτή η ποικιλία των επαγωγέων της, αποδεικνύει ότι η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο και στη ομοιόσταση των κυττάρων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. (15).

Η αίμη, μέσω της HO, καταβολίζεται σε μονοξείδιο του άνθρακα και χολοπρασίνη (biliverdin), καθώς απελευθερώνεται ο σίδηρος, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί πάλι από τα κύτταρα. Υπάρχουν δύο ισομορφές της οξυγενάσης της αίμης, η HO-1 και η HO-2. Έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και δρουν σαν αντιφλεγμονώδης πρωτεΐνες, όπου προκληθεί οξειδωτική βλάβη. Η HO-2 παράγεται εντός του εγκεφάλου και των όρχεων, ενώ η HO-1 βρίσκεται παντού, αλλά σε χαμηλά επίπεδα όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας. Διάφορες καταπονήσεις, επάγουν την ταχεία παραγωγή της HO-1. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η HO-1 έχει προστατευτικό ρόλο σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις αλλά καμία νόσος μέχρι στιγμής δεν έχει αποδοθεί σε πρωτογενή ανεπάρκεια της HO-1 (16).



Εικόνα 3: Μεταβολισμός της αίμης.

2.5.1.6. Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, αποτελούν μια οικογένεια των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μεταβολικών ισοενζύμων, οι οποίες καταλύουν τη σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) προς ξενοβιοτικά υποστρώματα, έχοντας σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση. Καταλύουν τη σύζευξη της GSH – μέσω μιας ομάδας σουλφυδρυλίου – σε ηλεκτρονιόφιλα κέντρα, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, για να καταστούν οι ενώσεις περισσότερο διαλυτές. (17) Η οικογένεια GST αποτελείται από τρεις υπεριοικογένειες: την κυτοσολική, την μιτοχονδριακή και τη μικροσωμική οικογένεια. Εκτός από τον βασικό τους ρόλο να καταλύουν τη σύζευξη των ηλεκτροφιλικών υποστρωμάτων σε γλουταθειόνη, έχουν και άλλους σημαντικούς ρόλους. Έχουν ικανότητα υπεροξειδάσης και ισομεράσης, μπορούν να αναστείλουν την Jun N-τερματική κινάση (προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από τον θάνατο λόγω του H₂O₂), μπορούν να δεσμεύσουν τις τοξίνες και να λειτουργήσουν ως πρωτεΐνες μεταφοράς και είναι ικανά να συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα ενδογενών και εξωγενών προσδετών. (18)

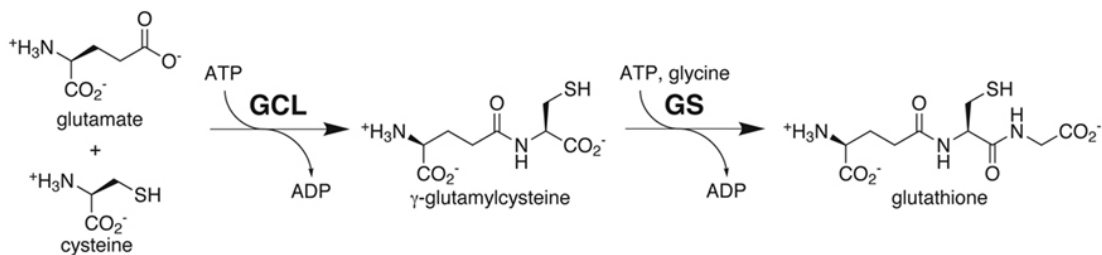
2.5.1.7. Συνθετάση της γλουταθειόνης (GCL)

Η συνθετάση της γλουταθειόνης (GCL), γνωστή και ως gamma-glutamylcysteine συνθετάση (GCS), είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης που καταλύει την χημική αντίδραση (19):



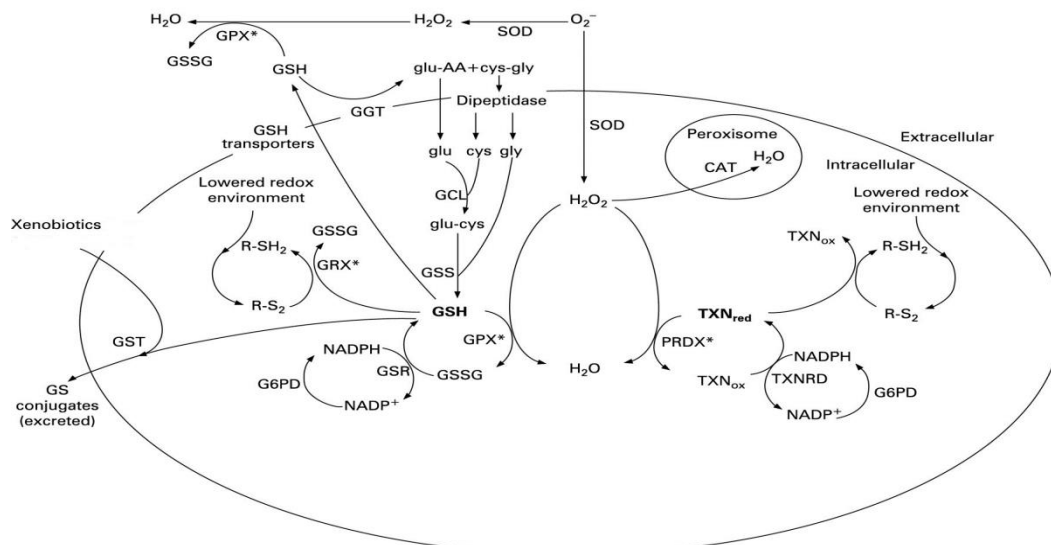
Η GSH, και κατ' επέκταση η GCL, είναι σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων. Σχεδόν κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, από τα φυτά μέχρι τους ζυμομύκητες και τον άνθρωπο, εκφράζουν μια μορφή της πρωτεΐνης GCL για το σκοπό της σύνθεσης της GSH.

Η GCL καταλύει το πρώτο και σημαντικό βήμα για την παραγωγή της κυτταρικής αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης (GSH), που περιλαμβάνει τη συμπύκνωση της κυστεΐνης και του γλουταμικού, για να σχηματίσει το διπεπτιδίο gamma-glutamylcysteine (γ-GC), χρησιμοποιώντας ATP (20). Αυτή η σύζευξη του πεπτιδίου είναι μοναδική διότι λαμβάνει χώρα μεταξύ της αμινο χαρακτηριστικής ομάδας της κυστεΐνης και του τερματικού καρβοξυλικού οξέος της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού (21). Αυτός ο πεπτιδικός δεσμός είναι ανθεκτικός στη διάσπαση από κυτταρικές πεπτιδάσες και απαιτεί ένα εξειδικευμένο ένζυμο, τη gamma-glutamyl τρανσπεπτιδάση, για να μεταβολίσει τη γ-GC και τη GSH στα συστατικά της αμινοξέα (22).



Εικόνα 4: Δράση της GCL

Η ενζυμική δραστηριότητα της GCL επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής έκφρασης των υπομονάδων της GCL, της πρόσβασης σε υποστρώματα (η κυστεΐνη είναι τυπικά περιορισμένη για την παραγωγή της γ-GC), και λειτουργικώς σχετικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες θέσεις επί των υπομονάδων GCL (23). Λαμβάνοντας υπόψιν το ρόλος της ως το ένζυμο περιορισμού του ρυθμού της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, οι αλλαγές στη δραστηριότητα της GCL σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές στη κυτταρική ικανότητα βιοσύνθεσης της GSH. Γι' αυτό, θεραπευτικές στρατηγικές για να μεταβάλλουν την παραγωγή της GSH έχουν επικεντρωθεί στη GCL (24).



Εικόνα 5: Αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών ενδογενώς με διαφορετικούς μηχανισμούς

2.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια, υδατοδιαλυτές και λιπόφιλες βιταμίνες.

2.5.2.1 Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η βιταμίνη C είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο δρα σε υδατικά περιβάλλοντα στον οργανισμό, όπως αυτά στα μάτια και στους πνεύμονες. Θεωρείται ίσως το σημαντικότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Μετατρέπει τα δραστικά οξυγονούχα είδη σε ελάχιστα δραστικά παράγωγα ασκορβικού. Συνεργάζεται με τη βιταμίνη E, τα καροτενοειδή καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα (25). Προστατεύει τις μεμβράνες από την οξείδωση. Η πλειοψηφία των μελετών συγκλίνει ότι κατόπιν χορήγησης βιταμίνης C μειώνονται οι δείκτες οξειδωτικού στρες στο DNA καθώς και η φθορά στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες. Άλλες μελέτες δείχνουν προ-αποπτωτική δράση της βιταμίνης C και προστασία από τον κυτταρικό θάνατο μετά από έκθεση σε διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα (14).

Η χημική δομή του L-ασκορβικού οξέος είναι γνωστή από το 1932. Κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες και η αναγωγική της μορφή είναι ένα σακχαρικό οξύ. Ενώ πολλοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν βιταμίνη C, ο άνθρωπος δεν μπορεί να τη βιοσυνθέσει. Αυτό συμβαίνει διότι απουσιάζει από τον οργανισμό του το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, η οποία καταλύει την τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών. Αποτελεί αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), δηλαδή μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμα όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις.

Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει τόσο το Fe^{3+} σε Fe^{2+} όσο και το Cu^{2+} . Έτσι μίγμα σιδήρου ή χαλκού με ασκορβικό οξύ παράγει in vitro την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Η συγκεκριμένη προ-οξειδωτική δράση, που εμφανίζει το ασκορβικό οξύ in vitro έχει μεγάλη σημασία επειδή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του ασκορβικού στα τρόφιμα. Σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις θα παρουσιάζει τοξική δράση. Η περίσσεια της βιταμίνης C αποβάλλεται μέσω των ούρων.

2.5.2.2. Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή από τις οκτώ μορφές της βιταμίνης E στους ανθρώπους και είναι εξαιρετικά ισχυρό αντιοξειδωτικό, θεωρείται δε το αντιοξειδωτικό το οποίο προστατεύει κατεξοχήν τις κυτταρικές μεμβράνες (λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του) (12). Κύρια αντιοξειδωτική λειτουργία του είναι η προστασία από τη λιπιδική υπεροξείδωση. Θεωρείται ότι η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ λειτουργούν μαζί σε μια διαδικασία ανακύκλωσης της βιταμίνης E, με το ασκορβικό οξύ να είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, ενώ το ασκορβικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών βιταμινών, γεγονός που πιθανώς δημιουργεί πρόβλημα μιας και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαφορετική φάση. Όμως, έχει αποδειχτεί ότι στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται ενδιάμεσα, μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξείδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (26).

Κατά την αντιοξειδωτική αντίδραση η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται σε ρίζα α-τοκοφερόλης δίνοντας ένα υδρογόνο σε ένα λιπίδιο ή ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου. Η ρίζα α-τοκοφερόλης ανάγεται στη μητρική μορφή της α-τοκοφερόλης από το ασκορβικό οξύ (25) (14). Η απορρόφηση της α-τοκοφερόλης πραγματοποιείται στο βλεννογόνο του εντερικού σωλήνα και μεταβολίζεται στο ήπαρ. Η απορρόφησή της εξαρτάται από την ικανοποιητική παρουσία χολικών αλάτων, από τις παγκρεατικές εστεράσες και από την περιεκτικότητα της τροφής σε λίπος.

2.5.2.3. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές οι οποίες βρίσκονται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς αλλά δεν μπορούν να συντεθούν σε ζωικούς οργανισμούς. Ευθύνονται για το κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Περισσότερα από 600 είδη απαντώνται στη φύση με τα κυριότερα της κατηγορίας να είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο. Ειδικά το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο (12).

Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, με τη βοήθεια του ενζύμου της β-καροτενοειδή 15, 15' διοξυγονάσης, το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε δύο όμοια μόρια βιταμίνης Α. Δεν έχουν όμως όλα τα καροτενοειδή τη δυνατότητα να συνθέσουν ρετινόλη, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το λυκοπένιο. Επιπλέον δρουν σταθεροποιώντας τις υπεροξειδικές ρίζες (14). Όσα καροτενοειδή κατέχουν ενεργότητα της βιταμίνης Α μπορούν να απορροφηθούν χωρίς να διασπασθούν ή να διασπαστούν σχηματίζοντας βιταμίνη Α και στη συνέχεια να απορροφηθούν στα βλεννογόνα κύτταρα του εντέρου. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μέσο μεταφοράς των καροτενοειδών στο πλάσμα. Το λυκοπένιο και το β-καροτένιο μεταφέρονται με τις LDL και εντοπίζονται στον πυρήνα των λιποπρωτεϊνών.

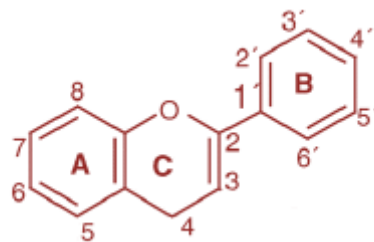
Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα ισχυροί απενεργοποιητές του μονήρους οξυγόνου ($^1\text{O}_2$). Ένας τρόπος είναι η διεγερμένη μορφή του $^1\text{O}_2$ οδηγείται στο καροτονοειδές και εν συνεχεία αποβάλλεται στο περιβάλλον με τη μορφή θερμότητας και ο δεύτερος τρόπος αφορά την χημικά εξουδετέρωση του $^1\text{O}_2$ από το καροτενοειδές με την εισαγωγή του σε διπλό δεσμό (26).

2.5.2.4. Πολυφαινόλες

Οι φυσικές πολυφαινόλες, ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες απαραίτητοι για τη φυσιολογία των φυτών. Συνιστούν την φυσική άμυνα του φυτού απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια μύκητες και ιούς αλλά τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας, του όζοντος καθώς και περιβαλλοντολογικών μολύνσεων (27). Επιπλέον επιδρούν στους μηχανισμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των φυτών.

Οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες προέρχονται από πρωτογενείς, κυρίως αμινοξέα και υδρογονάνθρακες, μέσω μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης και γλυκοξυλίωσης. Μέχρι σήμερα χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αναγνωριστεί, οι οποίοι κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες τα τερπένια, τις πολυφαινόλες και τα μόρια που περιέχουν άζωτο (27). Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 8000 διαφορετικές δομές, διακρίνονται σε флаβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδή, κουρκουμιοειδή, ταννίνες κ.α. (28). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ειδών είναι ότι διαθέτουν μια κοινή δομή, αρωματικό δακτύλιο (ή και περισσότερους) υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, φαινολική ένωση (29). Ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποδίδουν τις ωφέλιμες για την υγεία ιδιότητες των φυτών, των φρούτων, των βοτάνων, αλλά και τροφίμων και ποτών φυτικής προέλευσης στις πολυφαινόλες. Συνήθως οι πολυφαινόλες είναι περίπλοκα σύμπλοκα περισσοτέρων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων (27).

Τα флаβονοειδή (Εικόνα 6) είναι η σημαντικότερη υποκατηγορία των πολυφαινολών, με πάνω από 4000 αναγνωρισμένα μόρια τα οποία κατατάσσονται σε 13 τάξεις (29).

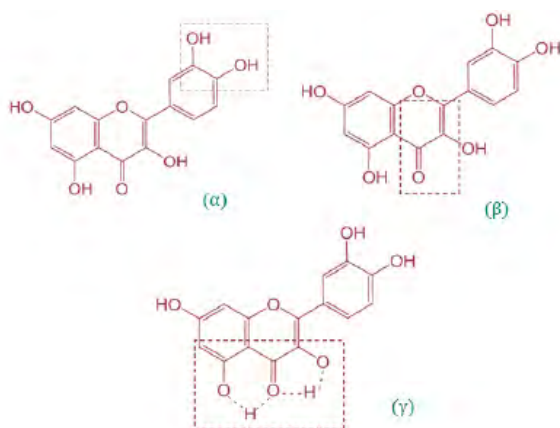


Εικόνα 6: Βασική δομή φλαβονοειδούς

A) Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

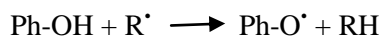
Η χημική σύνθεση των πολυφαινολών τις καθιστά ιδανικές αντιοξειδωτικές ενώσεις και έχειδειχτεί ότι είναι περισσότερο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τη βιταμίνη E και το ασκορβικό σε επίπεδο κυττάρου (30) (31). Η βιολογική δράση των πολυφαινολών και των φλαβονοειδών ειδικότερα εξαρτάται άμεσα και ισχυρά από την έκταση, τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών, κυρίως όμως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου στο μόριο του φλαβονοειδούς. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή τα οποία διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του B δακτυλίου έχουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (14) (31). Τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά για να είναι αποτελεσματικό το φλαβονοειδές στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών παραθέτονται στην εικόνα 8.

Τα φλαβονοειδή δρουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες εκκαθαρίζοντας άμεσα δραστικά οξυγονούχα είδη αλλά και ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα. Επιπρόσθετα, προκαλούν αντιδράσεις χηλικοποίησης μετάλλων (κυρίως σιδήρου) και αυξάνουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αντιοξειδωτικών χαμηλού μοριακού βάρους. Άλλες αντιοξειδωτικές τους δράσεις περιλαμβάνουν καταστολή των οξειδασών και του νιτρικού στρες (οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από το νιτρικό οξύ) (31).



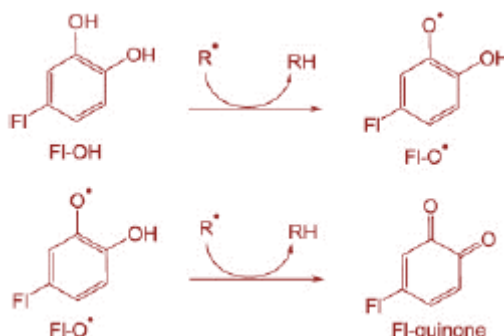
Εικόνα 7: Βασικά δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδούς ώστε να δρα αντιοξειδωτικά: (α) κατεχολική δομή στον B δακτύλιο. (β) διπλός δεσμός στο δακτύλιο C (γ) υδροξυλομάδες στις θέσεις 5 και 3 των δακτυλίων A και C

Η εξαιρετική τους ικανότητα να δεσμεύουν άμεσα δραστικά οξυγονούχα είδη οφείλεται στην εγγενή τους δυνατότητα να δρουν ως ισχυροί δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνου. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής των πολυφαινολών είναι χαμηλό, καθιστώντας τες δότες ηλεκτρονίων σε μόρια με υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, όπως για παράδειγμα είναι το υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\cdot-}$, η ρίζα υδροξυλίου $\cdot OH$, η ρίζα αλκυλίου $RO\cdot$. Οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν αντιοξειδωτικά τερματίζοντας αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Αποτέλεσμα των αντιδράσεων αυτών είναι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (14)· (27)· (30):



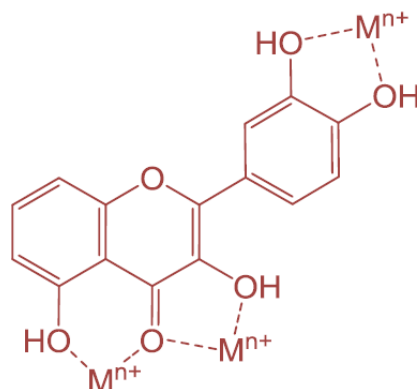
Όπου $R\cdot$ ελεύθερη ρίζα, $Ph-OH$ φαινολικό μόριο (γενικά) και $Ph-O\cdot$ φαινοξυλική ρίζα.

Η ικανότητα αυτή δεν θα ήταν σημαντική εάν δεν εξασφαλιζόταν ότι η φαινοξυλική ρίζα μπορεί να σταθεροποιηθεί με κάποιον τρόπο ώστε να μην ξεκινήσει έναν καινούργιο οξειδωτικό μηχανισμό. Η φαινοξυλική ρίζα, ή ημικινόνη, είναι σχετικά δραστική (αν και δεν συντηρεί επί μακρόν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών) και αντιδρά με δεύτερη ελεύθερη ρίζα για να αποκτήσει σταθερή δομή κινόνης (27)· (31). Παραστατικά η εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών από ένα φλαβονοειδές δίνεται παρακάτω (Εικόνα 8):



Εικόνα 8: Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών ($R\cdot$) από ένα φλαβονοειδές. Η ημικινόνη $FI-O\cdot$ αντιδρά με τη δεύτερη ρίζα αποκτώντας τη σταθερή δομή κινόνης.

Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα χηλικοποίησης μεταβατικών μετάλλων, κυρίως σιδήρου και χαλκού, απομακρύνοντας με αυτόν τον τρόπο έναν από τους αιτιώδεις παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (αντίδραση Fenton) (30)· (31). Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται οι θέσεις στις οποίες δένονται τα μεταβατικά μέταλλα, στον δακτύλιο B η κατεχολική δομή, στον δακτύλιο C η υδροξυλομάδα στη θέση 3 και το οξυγόνο στη θέση 4 και τέλος ανάμεσα στο οξυγόνο του δακτυλίου C και της υδροξυλομάδας στη θέση 5 του δακτυλίου A (31).



Εικόνα 9: Θέσεις σύνδεσης μεταβατικών μετάλλων (M^{n+}) στη δομή φλαβονοειδούς

Επιπλέον τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και να αναστείλουν τη χαλάρωση και διαπερατότητα των μεμβρανών που προκαλείται λόγω της υπεροξειδωσης. Έτσι μπορούν να περιορίσουν την έκταση των αντιδράσεων υπεροξειδωσης (30).

Η αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, ανοσολογική δράση αλλά και η προστασία που παρέχουν στις λειτουργίες της καρδιάς, του ήπατος και των νεύρων αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων. Η εκκαθάριση του υπεροξειδικού ανιόντος από τις πολυφαινόλες έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δημιουργίας του υπεροξυνιτριδίου μέσω του οποίου προκαλείται νιτρικό στρες το οποίο ενοχοποιείται ότι παρέχει το χημικό υπόστρωμα για καρκινογένεση (27) (31).

Κάτω από ορισμένες συνθήκες ωστόσο, για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, παρουσία μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού), υψηλό pH, μπορούν να δράσουν ως προ-οξειδωτικά. Τη βιολογική δράση, αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική των πολυφαινόλων (τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού) καθορίζουν η θέση των υποκαταστάσεων καθώς και ο αριθμός των υδροξυλομάδων. Οι παράγοντες αυτοί καθορίζουν εάν η ένωση θα δράσει αντιοξειδωτικά και ως ρυθμιστής της ενζυμικής δραστηριότητας ή εάν θα εκφράσει κυτταροτοξικές ιδιότητες. Φλαβονοειδή με περισσότερες υδροξυλομάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (14) (31).

B. Αντιοξειδωτική/ προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

Σκοπός ενός «δικτύου αντιοξειδωτικής άμυνας» δεν είναι να εξαλείψει όλες τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά οξυγονούχα είδη σε ένα βιολογικό σύστημα αλλά να ελέγξει τα επίπεδά τους επιτρέποντας τη διατήρηση των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών του συστήματος, μειώνοντας παράλληλα την οξειδωτική φθορά (32). Τα αντιοξειδωτικά γενικά, και οι πολυφαινόλες ειδικότερα, ενεργοποιούν αντιδράσεις ανακύκλωσης των ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξειδωτική τους δράση. Πέραν όμως της ωφέλιμης για τα βιολογικά συστήματα δράσης τους υπάρχει πληθώρα

ενδείξεων και αντίστοιχες μελέτες στις οποίες επισημαίνεται η καταστροφική / προ-οξειδωτική δράση των αντιοξειδωτικών γενικότερα αλλά και των πολυφαινολών ειδικότερα (33). Ημικινόνες ή άλλα υποπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια ενεργοποιώντας αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης, οξειδωσης πρωτεϊνών και DNA και μείωσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές τελικά οδηγούν σε καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών, σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και ενζύμων και στη σύνθεση του εξωκυττάρου χώρου. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, ανώμαλες κυτταρικές λειτουργίες, καταστροφή της δομής του ιστού (27).

Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών στα βιολογικά συστήματα αποδίδεται στην εμπλοκή τους σε οξειδοαναγωγικό κύκλο και στην ικανότητά τους να υποστούν αυτοοξειδωση. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι ο κυτταρικός θάνατος αλλά και η καρκινογένεση. Οι σταθερές κινόνες από την άλλη, αλλά και ελεύθερες ρίζες – υποπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών με μικρό χρόνο ζωής, μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Ανάλογα με τη χημική τους δομή, το δυναμικό οξειδοαναγωγής τους και τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν είτε αντιοξειδωτικά, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, είτε προ-οξειδωτικά δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες (27) (31).

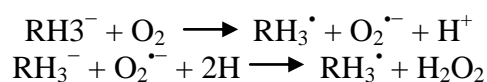
Γ. Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών

Η προ-οξειδωτική δράση θεωρείται ότι είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλές υδροξυλομάδες, τουλάχιστον 3, κυρίως στον Β δακτύλιο αυξάνουν σημαντικά την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω αντίδρασης Fenton. Στην πραγματικότητα φαίνεται πως τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ταυτόχρονα υπεύθυνα και για την προ-οξειδωτική τους δράση. Για παράδειγμα τα φλαβονοειδή προκαλούν την αναγωγή του Cu(I) σε Cu(II) οδηγώντας στη δημιουργία πρόδρομων ελευθέρων ριζών (31).

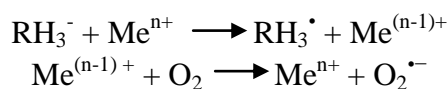
Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών, των φλαβονοειδών ειδικότερα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά από αύξηση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών αποδεικνύουν την σχέση αυτή (31).

Παρουσία μοριακού οξυγόνου, πολυφαινόλες με χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορούν να οξειδωθούν μέσω αυτοοξειδωσης, ακολουθώντας μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (27).

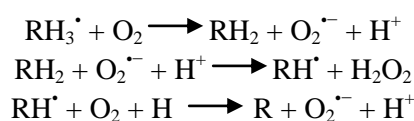
Αρχικά η πολυφαινολική ένωση οξειδώνεται παράγοντας ρίζα ημικινόνης:



Μεταβατικά μέταλλα καταλύουν την πρώτη αντίδραση της πορείας αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών:

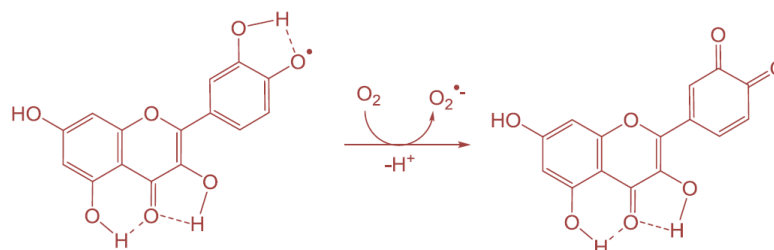


Πρωτογενείς ημικινόνες ή ρίζες φαινοξυλίου μπορούν επίσης να παραχθούν ενζυμικά, μέσω αντιδράσεων των πολυφαινολών με το H_2O_2 ή με το κυτόχρωμα P-450. Μόλις σχηματιστούν οι πρωτογενείς ημικινόνες εμπλέκονται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις μετατροπής της πολυφαινολικής ένωσης σε κινόνη:



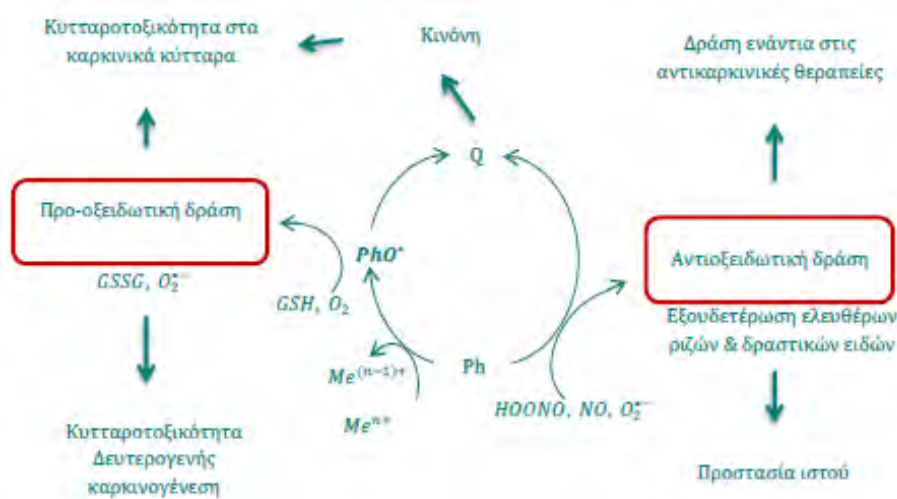
Ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια προκαλώντας λιπιδική υπεροξειδωση, οξειδωση πρωτεϊνών και DNA καθώς και μείωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε μη αναστρέψιμη βλάβη στις μεμβράνες, αλλαγή στη λειτουργία ενζύμων και των υποδοχέων τους καθώς και σε μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα αλλαγή στις κυτταρικές λειτουργίες μέχρι και κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να οξειδώσουν τη γλουταθειόνη ή το NADH οδηγώντας στη δημιουργία ακόμα περισσότερων δραστικών οξυγονούχων ειδών. Αντίθετα, σταθεροποιημένες κινόνες και ελεύθερες ρίζες παραπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών, μικρό χρόνου ημιζωής, δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες (27).

Οι φαινοξυλικές ρίζες, Fl-O^\bullet , τελικά προϊόντα των αντιδράσεων εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών από τα φλαβονοειδή, έχουν χρόνο ζωής $200\mu\text{s}$, είναι δραστικές, υποκείμενες σε περαιτέρω οξειδωση, οδηγώντας ανάμεσα σε άλλα και στις πιο σταθερές κινόνες. Μολονότι οι κινόνες είναι δραστικές εξουδετερώνονται καθώς συνδέονται σε μόρια όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη. Παρουσία μεταβατικών μετάλλων οι φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο παράγοντας ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος και κινόνη, αντίδραση στην οποία οφείλεται η προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Εικόνα 10) (31):



Εικόνα 10: Προ-οξειδωτική δράση φλαβονοειδών (31)

Οι αντιοξειδωτικές ή προ-οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον η χημική δομή, οι χημικές ιδιότητες και οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται καθορίζουν το αν θα δράσουν αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες, ή προ-οξειδωτικά, ενεργοποιώντας την παραγωγή τους. Την ιδιότητα των πολυφαινολών να δρουν προ-οξειδωτικά αξιοποιεί μια καινούργια τάση που διέπει τις αντικαρκινικές θεραπείες. Η ιδέα αυτή αφορά το σχεδιασμό και τη χρήση φαινολικών προϊόντων για να ευαισθητοποιήσουν τον καρκινικό όγκο στις θεραπείες, με στόχο τη μείωση της δόσης του δραστικού (και τοξικού συνήθως) φαρμάκου. Παράλληλα υπάρχουν αναφορές ότι οι πολυφαινόλες δρουν κυτταροτοξικά στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στο αγγειακό δίκτυο που τροφοδοτεί τον καρκινικό όγκο, γεγονός που συμβάλει στην κατεύθυνση αυτή (27)· (31). Η δράση των πολυφαινολών συνοψίζεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Εικόνα 11):



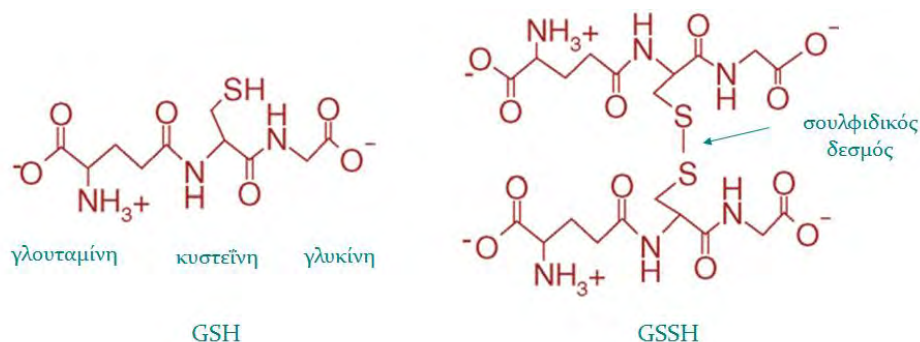
Εικόνα 11: Προ-οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών (31)

2.5.2.5 Γλουταθειόνη

Το τριπεπτίδιο, L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη (L-γ-glutamyl-Lcysteinyl-glycine) ή GSH με μοριακό βάρος 307 είναι η σπουδαιότερη μικρομοριακή θειόλη που έχει βρεθεί σε φυτικά, ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια (π.χ. στο *E. coli*) σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM, καθώς επίσης σπανιότερα και σε αναερόβια βακτήρια. Με το μόριο αυτό δεν παρατηρούνται τα φαινόμενα τοξικότητας που έχουν αναφερθεί ότι προκαλεί από μόνο του το αμινοξύ κυστεΐνη (34) και έτσι έχει επιλεγεί στη φύση ως το πλέον κατάλληλο μόριο για να διευθετήσει τη θειολική οξειδοαναγωγική ισορροπία που χαρακτηρίζεται από την αναλογία των θειολών προς τα δισουλφίδια. Η παρουσία γ-πεπτιδικού δεσμού στο μόριο το καθιστά ανθεκτικό στην αποικοδόμηση μέσω αμινοπεπτιδασών.

Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG (Εικόνα 12), συχνά αναφερόμενο και ως οξειδωμένη γλουταθειόνη, προκύπτει ύστερα από οξείδωση και σχηματισμό

δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης. Εκτός όμως από την οξείδωση με τον εαυτό του, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως ελεύθερη κυστεΐνη, συνένζυμο A, καθώς και με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (8).



Εικόνα12: Δομή της γλουταθειόνης και του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης

Το μεγαλύτερο ποσοστό της γλουταθειόνης του κυττάρου εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και μόνο το 10% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια στερούνται ενζύμων σύνθεσης GSH και γι' αυτό πρέπει να την προσλάβουν από το κυτταρόπλασμα. Επιπρόσθετα, ένα μέρος της GSH βρίσκεται και στον πυρήνα (7).

Ρόλος της γλουταθειόνης:

1. Η GSH είναι ευρέως διαδεδομένη σε κατώτερους και ανώτερους οργανισμούς και θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης της ενεργής της θειολικής ομάδας (35).
2. *In vitro* η GSH αντιδρά άμεσα και εξουδετερώνει τη ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite), υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο (7).
3. Ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ή μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (36). Ο κύκλος γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων είναι γνωστός ως κύκλος Foyer-Halliwell-Asada (7).
4. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι συμμετέχει στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε ορισμένα μεμβρανικά συστήματα (7).
5. Εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η GSH αναστέλλει την καταλάση (37), ενώ εμπλέκεται και σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων, στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (8).
6. Η γλουταθειόνη, σχηματίζοντας S-νιτρωδογλουταθειόνη (S-nitrosoglutathione, GSNO), χρησιμεύει ως αποθήκη και μεταφορέας NO και

εμπλέκεται επίσης στη μεταφορά του χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου καθώς τον δεσμεύει και εμποδίζει ταυτόχρονα την αντίδρασή του με ελεύθερες ρίζες.

7. Ένας πολύ σημαντικός ρόλος της γλουταθειόνης, είναι ότι αποτελεί υπόστρωμα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες και τρανσφεράσες της GSH, καθώς και η αναγωγή του GSSG.

2.5.2.6. Συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q10 είναι ένα σημαντικότερο αντιοξειδωτικό στοιχείο, που όμως εμφανίζει και άλλες αξιόλογες επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Το συνένζυμο Q10 είναι μια λιπιδική δομή με δραστηριότητα βιταμίνης. Υπάρχουν διάφοροι τύποι συνενζύμων (γνωστά και ως ουβικινόνες - ubiquinones), αλλά αυτό που συναντάται φυσικά σ' όλα τα ανθρώπινα κύτταρα είναι το συνένζυμο Q10. Οι εξέχουσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του, συνοψίζονται τόσο στην αυτούσια δράση του ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών, αλλά και στη συνεισφορά του ως διεγέρτης της επαναφοράς της βιταμίνης E στην ενεργή της μορφή, έπειτα από την αντίδρασή της με κάποια ελεύθερη ρίζα. Το συνένζυμο Q10 το παράγει ο οργανισμός μας αλλά το παίρνουμε και μέσω κάποιων τροφών (όπως το σκουμπρί). Επίσης, το συνένζυμο Q10 εντοπίζεται και στα τρόφιμα (κυρίως στο κρέας), αλλά το μαγείρεμα και οι μέθοδοι κατεργασίας το καταστρέφουν. Το συνένζυμο Q10 δρα σε ένα θεμελιώδες βιοχημικό επίπεδο ως φορέας στην αλυσίδα «μεταφοράς ηλεκτρονίων». Αυτή η αλυσίδα είναι το τελικό στάδιο της πολύπλοκης διαδικασίας παραγωγής ενέργειας από την τροφή και η οποία καταλήγει στο σχηματισμό ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), που αποτελεί το άμεσο ενεργειακό «νόμισμα» για κάθε κύτταρο. Η ενδογενής σύνθεση του Q10 εξαρτάται από την επάρκεια των αμινοξέων τυροσίνη και φαινυλαλανίνη, αλλά και από την συμμετοχή 7 ακόμα βιταμινών και αρκετών ιχνοστοιχείων. Κάθε λοιπόν έλλειψη σε έναν από τους προδρόμους της σύνθεσης του Q10, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή παραγωγή, αυτού του πολύτιμου συνενζύμου (7).

2.5.2.7. Μελατονίνη

Η μελατονίνη, γνωστή ως N-ακετυλο - 5 - μεθοξυτροπταμίνη, βρίσκεται στα ζώα, τα φυτά και τα μικρόβια. Είναι μια φυσική ορμόνη που παράγεται από την επίφυση του σώματος και γενικά, αυξάνονται τα ποσοστά της στο σκοτάδι κατά την διάρκεια της νύχτας. Η μελατονίνη είναι πολύ ισχυρός δέκτης των ελευθέρων ριζών και γενικός αντι-οξειδωτικός παράγοντας. Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, η μελατονίνη δεσμεύει ισχυρά την πολύ τοξική ρίζα του υδροξυλίου και τη ρίζα του υπεροξειδίου. Η αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης επιτελείται και μέσω των μεταβολιτών της (38). Η ιδιότητα αυτή της μελατονίνης να δρα σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας και μέσω των μεταβολιτών της την καθιστά εξαιρετικά αποτελεσματική, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στην προστασία των οργανισμών από το οξειδωτικό stress. Το έντονο οξειδωτικό stress καταλήγει σε οξεία ελάττωση των κυκλοφορούντων επιπέδων της μελατονίνης. Η ελάττωση αυτή των επιπέδων της

μελατονίνης σχετίζεται με την κατανάλωσή της. Η ταχεία κατανάλωση της μελατονίνης σε έντονο stress μπορεί να είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός του οργανισμού, κατά τον οποίο η μελατονίνη χρησιμοποιείται σαν αμυντικό μόριο πρώτης γραμμής έναντι της οξειδωτικής καταστροφής (39). Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προστατεύονται από την καταστροφή τους από τις ελεύθερες ρίζες παρουσία μελατονίνης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, που επάγεται με διάφορους τρόπους, που όλοι τους συμπεριλαμβάνουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, ελαττώνεται δραστικά από την παρουσία της μελατονίνης. Οι δράσεις αυτές της μελατονίνης είναι ενδοκυτταρικές. Άλλες είναι ανεξάρτητες από τη σύνδεση με τον υποδοχέα της μελατονίνης και άλλες επιτυγχάνονται μέσω σύνδεσης με πυρηνικούς υποδοχείς (40) (41).

2.5.2.8. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ βρίσκεται τόσο στα κύτταρα όσο και σε όλα τα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών για το ανθρώπινο είδος και αντίδραση για το σχηματισμό του καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό μέσο, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες (26). Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (42). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

2.5.2.9. Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη δημιουργείται από την δράση του ενζύμου χολοπράσινη ρεδουκτάση (biliverdin reductase) επί της χολοπρασίνης (biliverdin) (Εικόνα 3). Η χολοπρασίνη είναι προϊόν του καταβολισμού της αίμης και αποτελεί μία πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η χολοπρασίνη ρεδουκτάση αφαιρεί το διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρρολικού δακτυλίου. Στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπράσινη. Σε μελέτες in vitro φαίνεται να αναστέλλει τη παραγωγή του σουπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο και αποτελεί ισχυρό παράγοντα απομάκρυνσης της υπεροξειδικής ρίζας. Συνδεόμενη η χολερυθρίνη με την αλβουμίνη, προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες τόσο την αλβουμίνη όσο και τα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται από αυτή. Η αέναη αυτή κυκλική διαδικασία, σε συνδυασμό με τη δραστική αντιοξειδωτική λειτουργικότητα της χολερυθρίνης, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο βασικός της ρόλος είναι η αντιοξειδωτική δράση της στα κύτταρα (43).

2.6. Ποιες τροφές περιέχουν αντιοξειδωτικά;

2.6.1 Ελαιόλαδο

Η λιπαρή ύλη που εκχυλίζεται με μηχανικούς μόνο τρόπους από τη πολτοποιημένη μάζα του καρπού της ελιάς, είναι το γνωστό ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στη πυραμίδα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής. Είναι η κύρια πηγή πρόσληψης λίπους στη δίαιτα των μεσογειακών χωρών. Το ελαιόλαδο παραγόταν στις ακτές της Μεσογείου για διάφορες χρήσεις από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα (44). Οι χρήσεις του ήταν φαρμακευτικές, θρησκευτικές, καλλυντικές και διατροφικές. Ανάμεσα στα συστατικά του ελαιολάδου που ευθύνονται για τα πλεονεκτήματα υγείας που αποδίδει φαίνεται να είναι τα λιπαρά του οξέα, με τα μονοακόρεστα να είναι περισσότερα από τα πολυακόρεστα (45), (46), (47). Το ποσοστό ακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δίνει το δείκτη ακορεστότητας ενός ελαιολάδου. Ο βαθμός ακορεστότητας του ελαιολάδου αυξάνει όσο πιο ώριμος είναι ο καρπός. Αυξάνονται δηλαδή τα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό και μειώνεται το παλμιτικό, με αποτέλεσμα το ελαιόλαδο να είναι πιο ευαίσθητο στην οξειδωση. Το ελαιόλαδο έχει θεωρηθεί υπεύθυνο για τη μείωση της χοληστερόλης πλάσματος, με αποτέλεσμα τη μείωση της θνησιμότητας σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα (48). Υπεύθυνες ουσίες του ελαιολάδου για τα πλεονεκτήματα υγείας που αποδίδει φαίνεται να είναι τα μικροσυστατικά αυτού όπως φαινολικές ενώσεις, τριτερπενικά οξέα, τοκοφερόλες, σκουαλένιο (πρόδρομη ένωση των στερολών) και καροτενοειδή, τα οποία είναι γνωστά αντιοξειδωτικά. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, θεωρείται πως είναι εν μέρει υπεύθυνο για τα χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας και συχνότητας εμφάνισης καρκίνου και καρδιαγγειακών νοσημάτων στις χώρες της Μεσογείου. Τέλος, από μελέτη φάνηκε να συμβάλλει και στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης του DNA.

2.6.2. Τσάι

Τα βασικά αντιοξειδωτικά των αφεψημάτων και προπάντων του τσαγιού, είναι τα φλαβονοειδή. Ιδιαίτερα σημαντικά θεωρούνται τα πολυμερή φλαβονοειδή που είναι πλούσια σε κατεχίνες, ουσίες που κι αυτές χωρίζονται σε μικρότερες υποκατηγορίες στη χημεία. Οι κατεχίνες φαίνεται να επηρεάζουν θετικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων έναντι των υψηλών επιπέδων ROS. Το κάπνισμα είναι γνωστό ότι προκαλεί οξειδωτικό στρες και αύξηση στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Η αύξηση των ROS έχει αρνητική επίδραση στους οστεοβλάστες. Σε μελέτες απεδείχθη πως το πράσινο τσάι επηρεάζει την οστική πυκνότητα σε καπνιστές. Δρα μειώνοντας τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες και ενισχύοντας τη βιωσιμότητα των οστεοβλαστών. Εκείνο που έχει σημασία είναι, ότι τα πολυμερή φλαβονοειδή μπορούν να λάβουν μέρος σε πολλά συστήματα του οργανισμού με αποτέλεσμα ένα πλήθος ωφελειών για την υγεία μας, από την αναχαίτιση των καρκινικών κυττάρων του μαστού ή του προστάτη μέχρι την υποστήριξη σε

περίπτωση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το πράσινο τσάι είναι το πλουσιότερο σε πολυμερή φλαβονοειδή (49).

2.6.3. Κακάο

Ο Κόκκος του Κακάο αποτελεί εξαιρετική πηγή θρεπτικών αντιοξειδωτικών, βιταμινών και ανόργανων συστατικών που μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της ενέργειας και μπορεί να βοηθήσουν να κρατηθεί η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε ένα βέλτιστο επίπεδο. Ο Κόκκος Κακάο προσφέρει ένα αφέψημα με ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Σημαντικός αριθμός επιστημονικών μελετών παρουσιάζουν το κακάο να περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και προκυανιδίων, συστατικά που έχουν αντιοξειδωτική δράση και είναι ιδιαίτερος σημαντικά για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Τα φλαβονοειδή του κακάου θεωρούνται ότι έχουν προστατευτική επίδραση στην καρδιαγγειακή υγεία, καθώς βοηθούν στη ρύθμιση των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αντιδράσεων στα τοιχώματα των αγγείων. Ταυτόχρονα μπορούν να βοηθήσουν στην παρεμπόδιση της οξειδωσης της LDL-χοληστερόλης («κακή» χοληστερόλη) από τις ελεύθερες ρίζες που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Σε κυτταρικό επίπεδο έχει αποδειχθεί ότι οι προκυανιδίνες αντιδρούν με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, δημιουργώντας δεσμούς που έχουν σαν αποτέλεσμα την προστασία από την οξειδωση της κυτταρικής μεμβράνης. Το Κακάο περιέχει τρυπτοφάνη, ένα συστατικό που απαιτείται για την παραγωγή του νευροδιαβιβαστή της σεροτονίνης. Ενισχυμένα επίπεδα της σεροτονίνης μπορεί να καταστείλουν το αίσθημα άγχους και να οδηγήσουν σε βελτίωση της διάθεσης. Η κατανάλωση Κακάο μπορεί να οδηγήσει και στην απελευθέρωση ενδορφινών, φυσικές οπιούχες ουσίες του σώματος. Οι ενδορφίνες είναι ορμόνες που δίνουν φυσικά υψηλή αντοχή (50).

2.6.4. Μπύρα

Η μπύρα παρασκευάζεται από φυσικές πρώτες ύλες με υψηλή διατροφική αξία όπως είναι το κριθάρι, η μαγιά, τα δημητριακά και το νερό, οι οποίες συμβάλλουν σ'έναν υγιεινό τρόπο ζωής και μια ισορροπημένη διατροφή. Η μπύρα διαθέτει πολλά ωφέλιμα συστατικά όπως είναι οι αντιοξειδωτικές ουσίες, τα μεταλλικά άλατα, τα ιχνοστοιχεία και οι βιταμίνες (κυρίως του συμπλέγματος Β). Προσφέρει πολλές βιταμίνες στον οργανισμό αλλά καμιά τροφή δεν παρέχει το σύνολο των ζωτικών ιχνοστοιχείων που χρειάζεται ο οργανισμός γι' αυτό πρέπει να καταναλώνεται με μέτρο για μια ισορροπημένη διατροφή. Η μπύρα αποτελείται από νερό σε ποσοστό περίπου 93% και είναι ένα δροσιστικό ποτό με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Τα ποτά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, όπως η μπύρα, απορροφούνται πιο αργά από το στομάχι με αποτέλεσμα και η συγκέντρωση αλκοόλ στο αίμα να είναι χαμηλή.

Η ήπια κατανάλωση μπύρας σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων όχι μόνο λόγω της μικρής περιεκτικότητας σε αλκοόλ αλλά και στα συστατικά που περιέχει όπως είναι τα αντιοξειδωτικά στοιχεία, τα ιχνοστοιχεία και οι βιταμίνες που έχουν προστατευτική δράση. Η μπύρα αποτελεί

πηγή διαλυτών ινών που προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα του κριθαριού. Δύο ποτήρια μύρα περιέχουν περίπου το 10% των συνιστώμενων καθημερινών αναγκών σε φυτικές ίνες. Οι φυτικές ίνες ρυθμίζουν την ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος, επιβραδύνουν την πέψη και απορρόφηση του φαγητού και μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης. Τα αντιοξειδωτικά στοιχεία στη μύρα βρίσκονται στο κριθάρι και στο λυκίσκο. Η ποσότητα αντιοξειδωτικών στη μύρα εξαρτάται από το είδος της μύρας, τα ακατέργαστα υλικά και την διαδικασία παρασκευής. Η μύρα περιέχει τα διπλάσια αντιοξειδωτικά σε σχέση με το λευκό κρασί αλλά τα μισά από το κόκκινο. Έρευνες έδειξαν η περιεκτικότητα αίματος σε αντιοξειδωτικά αυξάνεται με την κατανάλωση μύρας που σημαίνει ότι απορροφάται ευκολότερα από τον οργανισμό. Τα στοιχεία αυτά έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι του καρκίνου χάρη στην δράση των ελεύθερων ριζών καθώς παίζουν και σημαντικό ρόλο στην μείωση των καρδιακών παθήσεων γιατί παρεμποδίζουν την θρόμβωση.

Η μύρα είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β και κυρίως νιασίνη, ριβοφλαμίνη (Β2), πυριδοξίνη (Β6), φολικό οξύ (Β9), και κοβαλαμίνη (Β12). Η μύρα αποτελεί τη φυσική πηγή της βιταμίνης Β12, η οποία είναι απαραίτητη για τον οργανισμό. Οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β δρουν προστατευτικά στον οργανισμό από τις καρδιαγγειακές παθήσεις και είναι περισσότερο ωφέλιμη από το κρασί. Ο λυκίσκος βρίσκεται σε αφθονία μέσα στη μύρα και τα άνθη λυκίσκου που προστίθενται κατά την επεξεργασία της λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά και αρωματικά. Ο λυκίσκος περιέχει φλαβονοειδή που έχουν προστατευτικές ιδιότητες σε κάποιες ασθένειες και βοηθούν στην καταπολέμηση κάποιων ειδών καρκίνου. Η μύρα περιέχει κάλιο σε υψηλή συγκέντρωση ενώ στο νάτριο είναι χαμηλή. Επίσης, περιέχει ασβέστιο και αρκετό μαγνήσιο το οποίο είναι χρήσιμο κατά της πέτρας της χολής, της απόφραξης των χοληφόρων οδών και του ήπατος (51).

2.6.5. Ξηροί καρποί

Οι ξηροί καρποί είναι σύνθετα τρόφιμα που περιέχουν διάφορες ποικιλία μακροθρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχείων. Ειδικά οι ωμοί ξηροί καρποί έχουν χαμηλά επίπεδα νατρίου και περιέχουν σημαντικές ποσότητες μονοακόρεστων , πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μετάλλων όπως μαγνήσιο, κάλιο καθώς επίσης περιέχουν ασβέστιο, φυτικές ίνες και αντιοξειδωτικά. Τα αμύγδαλα, τα φιστίκια, τα φουντούκια και τα καρύδια ανήκουν στη κατηγορία ξηρών καρπών με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες (κυρίως αδιάλυτες φυτικές ίνες). Τα φιστίκια και τα φουντούκια δε είναι πιο πλούσια σε φυλλικό οξύ. Οι ξηροί καρποί περιέχουν διάφορα είδη των αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, τα αμύγδαλα περιέχουν φλαβονοειδή όπως οι κατεχίνες, φλαβονόλες, ενώ τα φιστίκια με κέλυφος περιέχουν φλαβονοειδή και τα υψηλότερες συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης από όλους τους ξηρούς καρπούς. Τα καρύδια περιέχουν ένα ευρύ φάσμα πολυφαινόλων και τοκοφερολών ενώ τα κάσιους έχουν αλκυλοφαινόλες ως κύρια αντιοξειδωτική πηγή. Τα αμύγδαλα είναι μια καλή πηγή α-τοκοφερόλης ενώ τα καρύδια περιέχουν μεγάλες ποσότητες γ-τοκοφερόλης, η οποία λόγω των ιδιοτήτων της έχει ταυτοποιηθεί ως αντι-αθηρωματική ουσία. Τέλος, τα καρύδια Βραζιλίας αποτελούν εξαιρετική πηγή

σεληνίου. Οι κατανάλωση ξηρών καρπών, και ειδικά δε των ωμών, σχετίζεται με τη πρόληψη της υπέρτασης. Αυτή η θεώρηση βασίζεται, εκτός από ερευνητικές μελέτες, και στα συστατικά των ξηρών καρπών. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι σε θέση να μειώνουν τα επίπεδα της θρομβοξάνης 2 (αγγειοσταλτική ουσία), που ενδέχεται να επηρεάσει τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης, το μαγνήσιο έχει την ικανότητα να διεγείρει την παραγωγή οξειδίου του αζώτου και προστακυκλινών και έτσι εμποδίζει το ασβέστιο να προκαλέσει αγγειοδιαστολή. Εν συνεχεία το κάλιο πιθανώς να συμβάλλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, εφόσον μπορεί να ελαττώσει τον όγκο των εξωκυττάρων υγρών και να ρυθμίσει το σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης. Με τη μείωση της αγγειοτασίνης επέρχεται χαλάρωση στο λείους αγγειακούς μύες και πλέον απουσιάζει η όποια αγγειακή αντίσταση. Τέλος, οι φυτικές ίνες έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης έμμεσα. Συγκεκριμένα, η κατανάλωσή τους στο καθημερινό διαιτολόγιο των ασθενών, να τους αναπτύξει ένα αίσθημα κορεσμού, με αποτέλεσμα να επέλθει σταδιακά η ελάττωση του σωματικού τους βάρους και εξομάλυνση της υπέρτασης. Ως τώρα τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την κατανάλωση ξηρών καρπών και πρόληψης της υπέρτασης είναι περιορισμένα και τα αποτελέσματα τους θα χαρακτηρίζονταν συγκεχυμένα. Έρευνα σε 15.996 συμμετέχοντες, με φυσιολογικό βάρος, έδειξε να υπερισχύουν όσοι κατανάλωναν ξηρούς καρπούς (με κέλυφος) έναντι εκείνων που δεν ήταν καταναλωτές. Οι μη καταναλωτές εμφάνισαν υπέρταση σε μεγαλύτερο ποσοστό από τη πρώτη ομάδα. Τέλος, σε μια δεύτερη κλινική μελέτη με δείγμα της τάξης των 9.919 ατόμων, οι οποίοι βρίσκονταν υπό παρακολούθηση για περισσότερο από τέσσερα χρόνια, δεν επαληθεύτηκε συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ξηρών καρπών και της εμφάνισης υπέρτασης (52).

2.6.6. Καφές

Μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις που έγιναν τελευταία σχετικά με τον καφέ είναι η παρουσία σημαντικών ουσιών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Κυριότερες από αυτές είναι τα χλωρογενή οξέα (πολυφαινόλες). Ένα φλιτζάνι (150 ml) συνήθως περιέχει 120 mg χλωρογενών οξέων. Τα αντιοξειδωτικά αυτά απαντώνται σε όλα τα είδη καφέ, όποια κι αν είναι η προέλευση, η μέθοδος καβουρντίσματος και αλέσματος, καθώς και στους στιγμιαίους και ντεκαφεϊνέ. Οι ποσότητες μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την προέλευση του καφέ και τα χαρμάνια, την παρασκευή και τη μέθοδο ζύμωσης. Ο καφές είναι πλούσιος σε χλωρογενικό, καφεϊκό, φερούλικό και p-κουμαρικό οξύ, καθώς και σε μελανοϊδίνες. Τα αντιοξειδωτικά πολεμούν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ευθύνονται για την φθορά των κυττάρων. Η συνεχής επίδραση των ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει σε γήρανση και βλάβες σε κύτταρα, ιστούς και όργανα. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να οξειδώνουν την LDL “κακή χοληστερόλη”, με αποτέλεσμα να επικάθεται στα τοιχώματα των αρτηριών δημιουργώντας αθηρωματικές πλάκες, στενεύοντας με το χρόνο τις αρτηρίες μας. Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η μέτρια κατανάλωση παραδοσιακού ελληνικού καφέ, μείωνε σημαντικά τον κίνδυνο παθήσεων των στεφανιαίων αρτηριών, καθώς τα αντιοξειδωτικά του καφέ λειτουργούν

προστατευτικά στην υγεία του ενδοθηλίου, του ζωτικού στρώματος των κυττάρων στην εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Επίσης νέα έρευνα έδειξε ότι τα αντιοξειδωτικά της καφεΐνης εντοπίζουν και καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer και άλλων μορφών άνοιας. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι μια έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο καφές μειώνει τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, όσοι έπιναν τουλάχιστον ένα φλιτζάνι καφέ την ημέρα, είχαν περίπου 20% μικρότερο κίνδυνο για εγκεφαλικό επεισόδιο σε σχέση με όσους έπιναν σπανίως καφέ. Τέλος, εδώ και πολλά χρόνια υπάρχει η υποψία ότι ο καφές έχει και αντικαρκινική δράση λόγω των αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχει. Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι ο καφές περιέχει μια αντιοξειδωτική ουσία με σημαντική αντικαρκινική δράση, η οποία βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά μόνο στον καφέ. Δημιουργείται όταν καβουρδιστεί ο καφές και βρίσκεται τόσο στον κανονικό καφέ όσο και στον στιγμιαίο καφέ, ακόμα και στον ντεκαφεϊνέ. Σε πειράματα που έκαναν οι ερευνητές, σε καλλιέργειες κυττάρων του ανθρώπινου εντέρου, βρήκαν ότι η συγκεκριμένη αντιοξειδωτική ουσία, αύξησε την δράση των αντικαρκινικών ενζύμων με αποτέλεσμα να υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση καφέ συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου (53).

2.6.7. Φρούτα και λαχανικά

Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και τη τελευταία δεκαετία έχουν πλέον αναγνωριστεί για τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Λόγω των συστατικών τους, παρουσιάζουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, ασκώντας προστατευτική δράση έναντι εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ειδικότερα η λειτουργία τους έγκειται στη προστασία των κυττάρων από τις επιβλαβείς συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη αναφέρει πως η κατανάλωση χυμών φρούτων και λαχανικών για περισσότερο από τρεις φορές την εβδομάδα οδηγεί σε ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης νόσου Αλτσχάιμερ (54). Στις ΗΠΑ διεξήχθη έρευνα ώστε να εντοπιστεί η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ φρούτων και λαχανικών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, για την εξαγωγή αποτελεσμάτων ήταν η μέθοδος ABTS και DPPH. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα κατέχουν τα φρούτα σε σχέση με τα λαχανικά. Με τη μέθοδο ABTS προέκυψε ότι η ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζεται στις φράουλες, ενώ με τη μέθοδο ABTS βρέθηκε στα βατόμουρα. Στη λίστα με τα δέκα φρούτα (συμπεριλαμβανομένων και των χυμών/εκχυλισμάτων) και λαχανικά με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση περιέχονται: τα κεράσια, το πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί, το μπρόκολο, το μήλο, το κόκκινο λάχανο, η φράουλα, το βατόμουρο και το δαμάσκηνο. Επιπλέον, με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε στα κόκκινα φασόλια, στα δαμάσκηνα, στη φράουλα, στο κόκκινο κρασί, στο μήλο, στο αχλάδι ενώ η χαμηλότερη στο λεμόνι. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκαν στη βάση δεδομένων του Αμερικάνικου Οργανισμού Γεωργίας (55).

2.6.8. Σταφύλια

Λίγα φρούτα έχουν κερδίσει τόσο πολύ την προσοχή στην έρευνα, για την υγεία, όσο τα σταφύλια. Αυτό οφείλεται στο ότι αποτελούν συστατικό της διατροφής των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο. Με εξαίρεση την Ανταρκτική, τα σταφύλια καλλιεργούνται σε όλες τις ηπείρους της γης, γι αυτό και πολύ ερευνητές από πολλές χώρες έδειξαν ενδιαφέρον γι αυτό το φαγητό. Το γεγονός της εμφάνισης μεγάλης βιβλιογραφίας οφείλεται στην καταπληκτική σύνθεση των θρεπτικών συστατικών των σταφυλιών. Κάθε χρόνο φαίνεται ότι η λίστα με τα θρεπτικά συστατικά που περιέχουν τα σταφύλια και αφορούν την υγεία, μεγαλώνει, και αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόκληση για την έρευνα των φυτοθρεπτικών συστατικών που περιέχουν.

Παρακάτω υπάρχει μια λίστα που αναφέρει τα μέχρι στιγμής γνωστά θρεπτικά συστατικά που περιέχουν διάφορες ποικιλίες σταφυλιών:

- ✓ Στιλβένια: ρεσβερατρόλη, piceatannol, πτεροστιλβένιο
- ✓ Φλαβονόλες: κατεχίνες, επικατεχίνες, προκυανιδίνες, προανθοκυανιδίνες, βινιφερόνες
- ✓ Φλαβονόλες: quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin
- ✓ Φαινολικά οξέα: καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ, γαλλικό οξύ
- ✓ Καροτενοειδή: β-καροτένιο, λουτένη, ζεαξανθίνη

Επιπρόσθετα, με τη λίστα των θρεπτικών, τα σταφύλια φαίνεται ότι περιέχουν την αντιοξειδωτική ορμόνη μελατονίνη καθώς και ολιγοπεπτίδια (μικρά μόρια πρωτεϊνών) που έχουν αντιβακτηριδιακή δράση και άλλες ιδιότητες (56), (57).

Μαζί με την συντριπτική πλειοψηφία των θετικών συστατικών που περιέχουν τα σταφύλια για την υγεία μας, έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν πολλά οφέλη στα συστήματα του σώματός μας. Τα συστήματα που ωφελούνται είναι το καρδιαγγειακό, το αναπνευστικό, το ανοσοποιητικό, το νευρικό καθώς και τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα. Ένας άλλος τομέας της ειδική παροχής είναι η πρόληψη του καρκίνου και συγκεκριμένα του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου .

Εκτός από την παροχή των συμβατικών αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη C και το μαγνήσιο, τα σταφύλια είναι πλούσια σε φυτοχημικά αντιοξειδωτικά συστατικά που ποικίλλουν από τα κοινά καροτενοειδή όπως η βήτα-καροτίνη, σε ασυνήθιστα στιλβένια όπως η ρεσβερατρόλη. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι σπόροι και το η φλούδα των σταφυλιών περιέχουν την πλουσιότερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών. Είναι πολύ σπάνιο να βρεθεί μια υψηλότερη συγκέντρωση ενός αντιοξειδωτικού στο σαρκώδες μέρος του σταφυλιού από ότι υπάρχει στο σπόρο ή στο δέρμα. Για το λόγο αυτό, το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας σε αντιοξειδωτικά δεν έχει διεξαχθεί σε ολόκληρα τα σταφύλια. Αντί αυτού, η έρευνα έχει διεξαχθεί στο εκχύλισμα της φλούδας του σταφυλιού, στους σπόρους σταφυλιών, σε εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού, ή σε εκχυλίσματα σταφυλιών που περιέχουν τη φλούδα, τους σπόρους και τη σάρκα. Κατά γενικό κανόνα, η σάρκα του σταφυλιού περιέχει περίπου 1/20-1/100

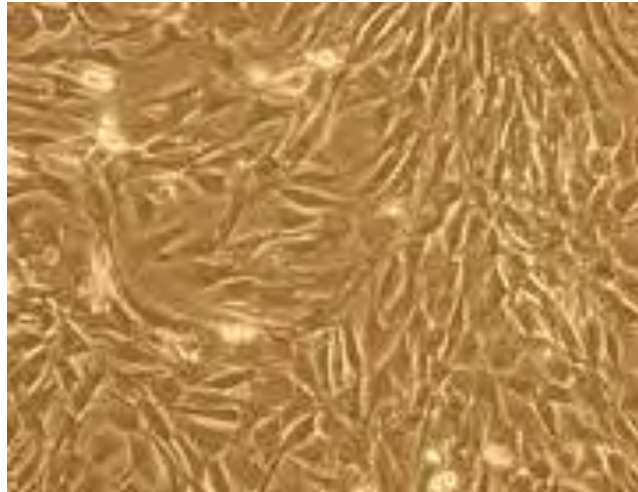
της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του σπόρου ή του δέρματος. Έρευνα σχετικά με αντιοξειδωτικά οφέλη που παρέχονται από σταφύλια ή τα συστατικά σταφυλιών περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαπιστώσεις. Τα σταφύλια και τα συστατικά των σταφυλιών μπορούν να :

- ✓ Βοηθήσουν στην αύξηση της παραγωγής ορισμένων ενζύμων. Αυτά τα ένζυμα περιλαμβάνουν την οξυγενάση της αίμης και την καταλάση.
- ✓ Να αυξήσουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο αίμα καθώς και να αυξήσουν την αναλογία της ανηγμένης προς οξειδωμένης γλουταθειόνης στο αίμα. (μέτρο αντιοξειδωτικής ικανότητας)
- ✓ Βοηθούν στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από ελεύθερες ρίζες.
- ✓ Μειώνουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων.
- ✓ Μειώνουν τους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες (58) (59).

Μαζί με την ισχυρή αντιοξειδωτική τους ικανότητα, τα σταφύλια παρουσιάζουν και αντιφλεγμονώδη δράση. Φαίνεται ότι μειώνουν τον κίνδυνο μιας ανεπιθύμητης φλεγμονής με διάφορους τρόπους. Πολλά προ-φλεγμονώδη μόρια μειώνουν τη δράση τους λόγω της παρουσίας των συστατικών των σταφυλιών. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνεται η ιντερλευκίνη 1-βήτα, η ιντερλευκίνη-6 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-alpha). Υπερπαραγωγή των προ-φλεγμονωδών ενζύμων κυκλο-οξυγενάσης 1 και 2 (COX-1 και COX-2) αναστέλλεται μετά την κατανάλωση σταφυλιών (60).

3. Μυϊκά κύτταρα C2C12

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ ποντικού μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (61). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 13: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

4. Ενδοθηλιακά κύτταρα σειράς EAhY 926

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/>).

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης ενός εκχυλίσματος, από μια ελληνική ποικιλία σταφυλιού *Vitis Vinifera* (Μπατίκι Τυρνάβου), στα επίπεδα και την δραστηρότητα ενζύμων με αντιοξειδωτική δράση σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα επίπεδα των ενζύμων προσδιορίστηκαν με Western Blot ενώ η ενζυμική δραστηρότητα προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Ο σκοπός ήταν να προσδιοριστούν πιθανές αλλαγές στα επίπεδα και την δράση των ενζύμων ως αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5. 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 κυττάρων περιείχε:

- ✓ Για EAhy926:Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, 25mM HEPES, Gibco BRL 41966)
- ✓ Για C2C12: Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- ✓ L-γλουταμίνη 2mM (Biochrom KG Seromed)
- ✓ Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)
- ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δύο θρεπτικά μέσα:

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

Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος που περιείχε: 250ml DMEM41966, 2.5ml pen/str, 2.5ml Γλουταμίνη

Καθώς επίσης, Τρυψίνη 0.25% (Gibco) και PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco).

Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα βρισκόντουσαν σε φλάσκες 75cm², μέσα σε ειδικό κλίβανο, ο οποίος διατηρούσε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) και συγκέντρωσης CO₂ (5%) για τον πολλαπλασιασμό τους. Όταν τα κύτταρα καλυπταν πάνω από το 80% της

επιφάνειας της φλάσκας, για να αποφύγουμε μεταλλάξεις και διαφοροποιήσεις των κυττάρων, την διαχωρίζουμε σε περισσότερες φλάσκες. Στα C2C12 χρειαζόντουσαν περίπου 2 μέρες ενώ στα EAhY926, 3 μέρες. Όταν είχαμε συγκεκριμένο αριθμό φλασκών, ξεκινούσαμε τη χορήγηση του εκχυλίσματος των στέμφυλων Μπατίκι Τυρνάβου, μαζί με θρεπτικό μέσο χωρίς FBS. Τα κύτταρα επωάζονταν με το εκχύλισμα για 3,6,12,18 και 24 ώρες, σε συγκεντρώσεις μη κυτταροτοξικές. Στα C2C12 βάζαμε τις συγκεντρώσεις 2,5μg/ml και 10μg/ml και στα EAhY926 βάζαμε τις συγκεντρώσεις 0,068μg/ml και 0,25μg/ml.

Cytosolic buffer: 10mM HEPES-KOH pH 7.9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,5% NP-40.

Nuclear buffer: 10mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 0,5% Triton X-100.

Cytosolic and nuclear fractionation

- ✓ Μετά από μια πλύση με PBS, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 50-150μl cytosolic lysis buffer μαζί με protease inhibitor cocktail completeTM.
- ✓ Το cell lysate το αφήνουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16250g, 4oC, 15min
- ✓ Το υπερκείμενο απομακρύνεται (cytosolic extract) και το ίζημα λύεται ξανά με 50-150μl nuclear lysis buffer και protease inhibitor cocktail completeTM.
- ✓ Φυγοκεντρούμε στα 16250g, 4oC, 15min.

WESTERN BLOT BUFFERS

10x Running Buffer

60g Tris base, 288g glycine, 200ml 10% SDS, ddH₂O μέχρι τα 2L, store at RT

1x Running Buffer

1800ml ddH₂O, 200ml 10x Running Buffer, store at 4oC

10x Transfer Buffer

60,6gr Tris base, 288gr glycine, ddH₂O μέχρι τα 2L

1x Transfer Buffer

200 ml 10x Transfer Buffer, 1400ml ddH₂O, 400 ml methanol, store at 4oC

10x TBST

31,4gr Tris base, 174gr NaCl, 40ml TWEEN, ddH₂O μέχρι τα 2L, store at RT

1x TBST

1800ml ddH₂O, 200ml 10x TBST, store at RT

TBSTMS (5% dry milk in 1x TBST)

Για 100ml Total: 5gr non-fat dry milk, 100ml 1x TBST

Αναδεύουμε για 10 λεπτά

Resolving Gel: 8% SDS Gel για κυτταρόπλασμα

4,6ml ddH₂O, 2,5ml 1,5 Tris (pH 8,8 RT), 2,7ml acrylamide (30%), 100μl 10% SDS (RT), 100μl 10% APS (-20oC), 6μl TEMED (το προσθέτουμε τελευταίο)

Resolving Gel: 12% SDS Gel για πυρήνα

3,3ml ddH₂O, 2,5ml 1,5 Tris (pH 8,8 RT), 4ml acrylamide (30%), 100μl 10% SDS (RT), 100μl 10% APS (-20oC), 4μl TEMED (το προσθέτουμε τελευταίο)

Stacking Gel

3ml ddH₂O, 1,25ml 0.5 Tris (pH 8,8 RT), 650μl acrylamide (30%), 50μl 10% SDS (RT), 50μl 10% APS (-20oC), 5μl TEMED (το προσθέτουμε τελευταίο)

10% SDS

10gr SDS, 100ml ddH₂O, store at RT

0.5M Tris

6,05gr Tris base, 100ml ddH₂O, store at RT

1.5Tris

18.17gr Tris base, 100ml H₂O, store at RT

Developer Solution: 109ml developer buffer + 391ml H₂O

Fixer Solution: 109ml fixer solution + 391ml H₂O

Western Blot Assay

Φάση 1: SDS Page Electrophoresis

- Ξεπλένουμε το τζάμι και το κάλυμμα με ddH₂O και σκουπίζουμε και με αιθανόλη.
- Τοποθετούμε το τζάμι και το κάλυμμα μέσα στο Green Holder με το τζάμι να είναι μπροστά στο Casting Apparatus. Βάζουμε κάτω το γκρι λαστιχάκι για να μην τρέξει το Gel.

- Φτιάχνουμε το Resolving Gel σε falcon (15ml) και αναποδογυρίζουμε για να αναμειχθεί.
- Ρίχνουμε το Resolving Gel με πιπέτα μεταξύ του γυαλιού και του καλύμματος. Προσθέτουμε από πάνω ddH₂O για να φύγουν οι φυσαλίδες και το αφήνουμε να πήξει (~40 λεπτά). Το Resolving Gel πρέπει να μπει μέχρι 1cm κάτω από το χτενάκι.
- Αφού πήξει, αδειάζουμε το νερό και βάζουμε διηθητικό χαρτί για να τραβήξει ότι έχει μείνει.
- Φτιάχνουμε το Stacking Gel και το ρίχνουμε πάνω από το Resolving Gel. Βάζουμε το χτενάκι και το αφήνουμε να πήξει (~45 λεπτά).
- Ετοιμάζουμε τα δείγματά μας. Βάζουμε 30μg πρωτεΐνης. Προσθέτουμε και 6x loading buffer και βράζουμε για 3 λεπτά
- Βγάζουμε το χτενάκι ρίχνοντας ddH₂O αφού έχει πήξει το gel.
- Τοποθετούμε το gel στη θήκη, την βάζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γεμίζουμε τη θήκη με 1x Running Buffer μέχρι επάνω, και τη συσκευή μέχρι την ένδειξη 2gels. Το Running Buffer πρέπει να είναι κρύο. Χρειαζόμαστε 700ml/πείραμα.
- Ηλεκτροφορούμε στα 150V για 45-60 λεπτά.

Φάση 2: Transfer

Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, ετοιμαζόμαστε για τη μεταφορά. Πρέπει να έχουμε 2lt Transfer Buffer. Βάζουμε σε ένα δοχείο λίγο 1x Transfer Buffer. Με μια σπάτουλα σηκώνουμε το κάλυμμα και βάζουμε στο μπολ το τζάμι με το gel για να ξεκολλήσει. Στο μπολ τοποθετούμε την κασετίνα ανοιχτή, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω. Μουσκέυουμε 2 σφουγγαράκια και πάνω στην κασετίνα τα τοποθετούμε με την εξής σειρά: σφουγγάρι-χαρτί Whatman-gel-μεμβράνη-χαρτί Whatman-σφουγγάρι. Τη μεμβράνη την κόβουμε στις διαστάσεις του χαρτιού Whatman, τη βάζουμε στη μεθανόλη για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε ddH₂O.

Κλείνουμε την κασετίνα και τη βάζουμε στη μαύρη/κόκκινη θήκη. Η μαύρη πλευρά της κασετίνας θα κοιτάει την μαύρη πλευρά της θήκης. Τη θήκη τη βάζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γεμίζουμε τόσο τη θήκη όσο και τη συσκευή με 1x Transfer buffer μέχρι επάνω. Βάζουμε την παγοκύστη στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τη συσκευή ηλεκτροφόρησης τη βάζουμε σε ένα κουτί με πάγο και ηλεκτροφορούμε στα 110V για 2 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τοποθετούμε τη μεμβράνη σε 50ml TBSTMS. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και το βάζουμε στους 40C overnight.

Φάση 3:

- Φτιάχνουμε 50ml TBSTMS και προσθέτουμε 10ml στη μεμβράνη (αφού αφαιρέσουμε το παλιό). Προσθέτουμε το αντίσωμα και πιπετάρουμε πάνω κάτω. Βάζουμε να αναδευτεί για 1 ώρα.
- Κάνουμε 5 πλύσεις για 5 λεπτά η κάθε μία με 1x TBST (προσθέτουμε τόσο ώστε να καλυφθεί η μεμβράνη) και το αναδεύουμε.

- Προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα σε 10ml TBST και αναδεύουμε για 30 λεπτά.
- Κάνουμε 3 πλύσεις με 1x TBST, 15 λεπτά η κάθε μία και αναδεύουμε.
- Στο μεταξύ έχουμε πάρει το light box και έχουμε απλώσει πάνω μεμβράνη. Προς το τέλος της 3^{ης} πλύσης ετοιμάζουμε το Chemiluminescence reagent (1ml από κάθε μπουκαλάκι σε 15ml falcon) και αναποδογυρίζουμε να αναμειχθεί.
- Όταν τελειώσει η 3^η πλύση, πιάνουμε τη μεμβράνη από τη γωνία με λαβίδα και τη χτυπάμε για να στεγνώσει πάνω σε διηθητικό χαρτί.
- Απλώνουμε τη μεμβράνη πάνω στη διαφανή μεμβράνη και ρίχνουμε το Chemiluminescence reagent (το απλώνουμε με το falcon) και το αφήνουμε για 1 λεπτό. Στη συνέχεια στεγνώνουμε τη μεμβράνη και την τοποθετούμε σε ζελατίνα μέσα στην κασέτα.
- Παίρνουμε την κασέτα, το φιλμ, λαβίδα, χαρτί, το developer solution, το fixer solution και πηγαίνουμε στο σκοτεινό δωμάτιο.
- Γεμίζουμε 3 δοχεία με developer solution, fixer solution και νερό.
- Βγάζουμε το φιλμ και το βάζουμε στην κασέτα (5sec-30min).
- Βάζουμε το φιλμ στο developer, μετά στο νερό, στο fixer και πάλι στο νερό (το φιλμ μπορεί να μείνει στο fixer για μεγάλο χρονικό διάστημα ενώ στο developer για λίγο)
- Χύνουμε τα διαλύματα στα μπουκάλια και ανοίγουμε το φως.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Η διαδικασία Bradford χρησιμοποιήθηκε για να βάλουμε ίσες ποσότητες πρωτεΐνης για τη διαδικασία της Western. 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.

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 H_2O 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.

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT στα δείγματα έγινε με βάση την μέθοδο του Aebi (Aebi, 1984).

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 3 ml στο οποίο περιέχονται 150 μl κυτταροπλασματικού αιωρήματος και 2845 μl 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37°C. Πέντε μl από διάλυμα H_2O_2 30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 240 nm (UV) για 1.5 min. Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται ως η μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O_2 . Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της CAT με το υπόστρωμα (H_2O_2). Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του H_2O_2 .

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$) της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >30 μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ CAT}/ \text{mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/40) \times 20 \times 1000]/C_{\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}$: Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240}\text{H}_2\text{O}_2$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 .

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{l}$ αιωρήματος [3000 μl /150 μl]).

Τιμή 1000: Για την μετατροπή mol/l σε $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

C_δ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberly & Spitz (1984).

Πιο αναλυτικά, 800 μl SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8); 1 U καταλάσης; 5.6×10^{-5} M NBT; 10^{-4} M ξανθίνης) αναμιγνύονται με 200 μl 0.05M potassium phosphate buffer. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κυψελίδα και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα στην κυψελίδα προστίθενται ~60 mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3.5 min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια 200 μl του ολικού κυτταρολύματος προστίθενται σε 800 μl SOD buffer και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα προστίθενται ~60mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3.5 min στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ inhibition} = [(control \text{ rate} - sample \text{ rate}) / control \text{ rate}] \times 100 / C_{\delta}$$

Control rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του μάρτυρα ανα λεπτό.

Sample rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του δείγματος ανα λεπτό.

C_δ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτταρικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al. (1974).

Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 7.4) με 50 μl GSH (1 mM) και 20 μl CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30°C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10 μl του κυτταρικού κυτταρολύματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm για 5 min. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτταρικό κυτταρόλυμα

αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του C_{DNB}.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ CAT/ mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/0.0096) \times 100]/C_{\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}$: Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240}\text{CDNB} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$: 0.0096 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του C_{DNB}.

Τιμή 100: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{l αιωρήματος}$ [1000 μl /10 μl]).

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

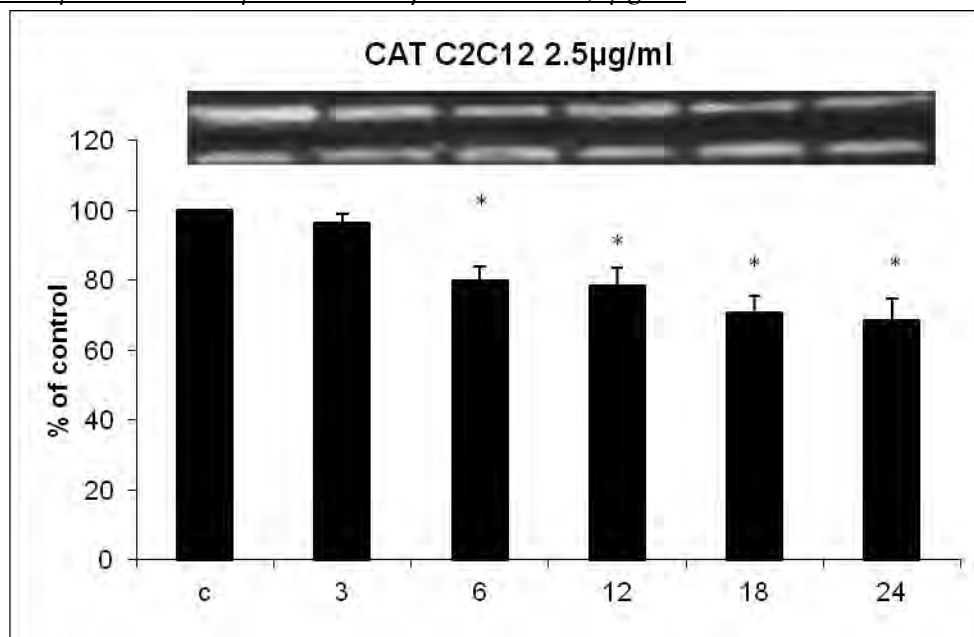
Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

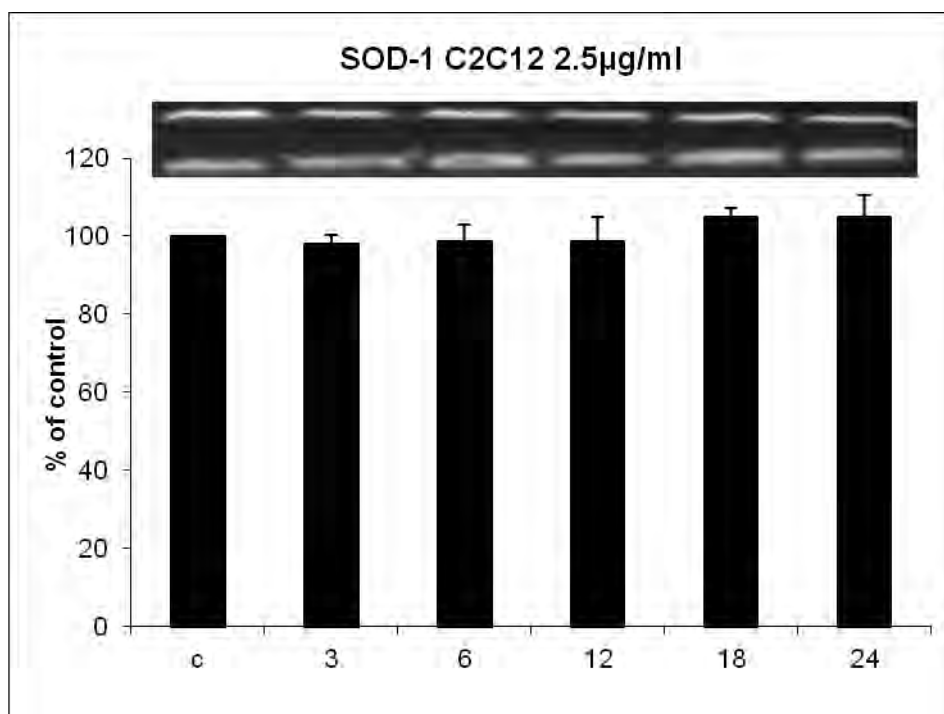
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

6. Αποτελέσματα

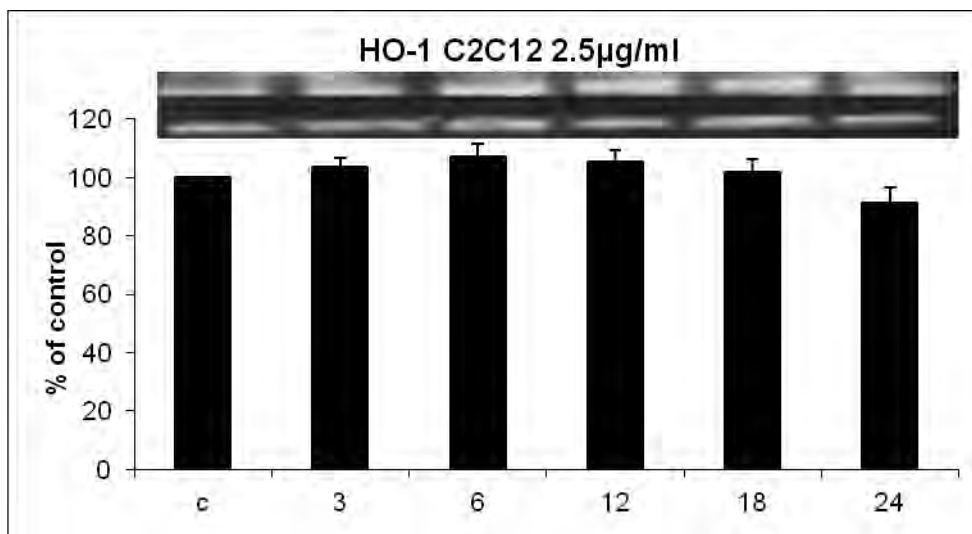
Αποτελέσματα Western μυικών κυττάρων C2C12 2,5μg/ml



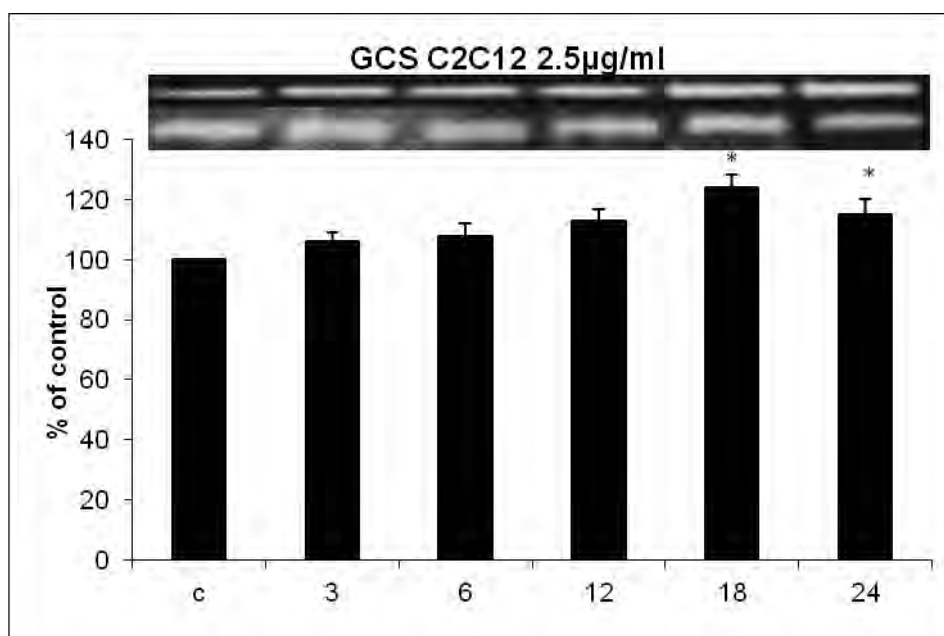
Διάγραμμα 1: Επίπεδα καταλάσης: παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της καταλάσης κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 6, 12, 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$



Διάγραμμα 2: Επίπεδα SOD: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

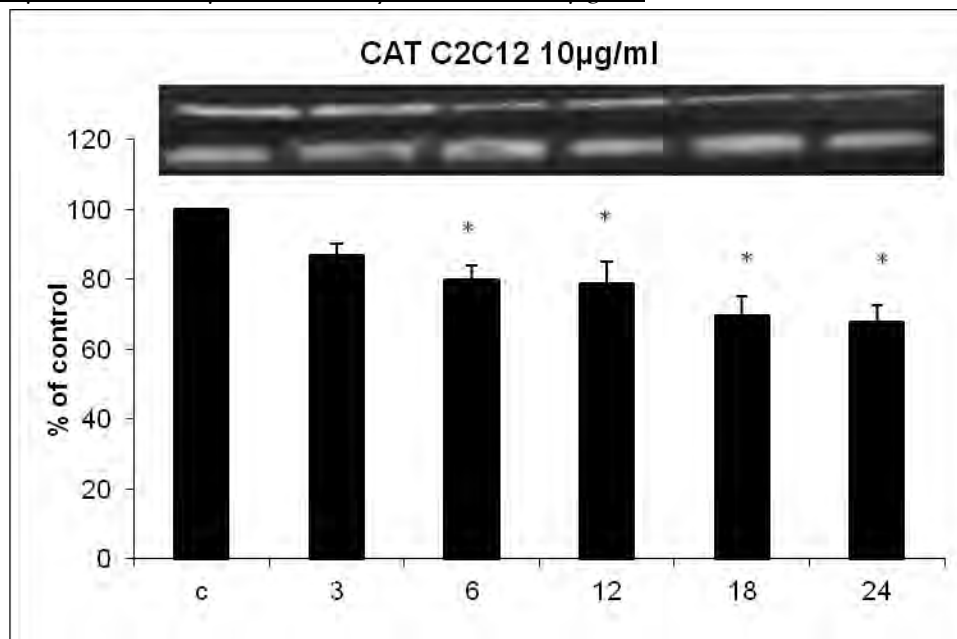


Διάγραμμα 3: Επίπεδα ΟΗ-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

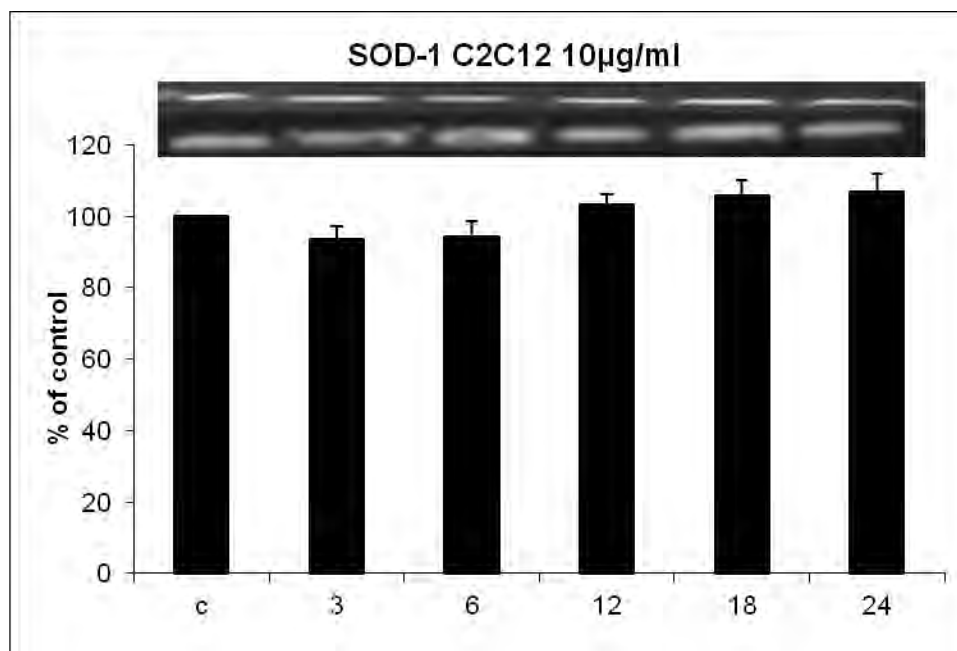


Διάγραμμα 4: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

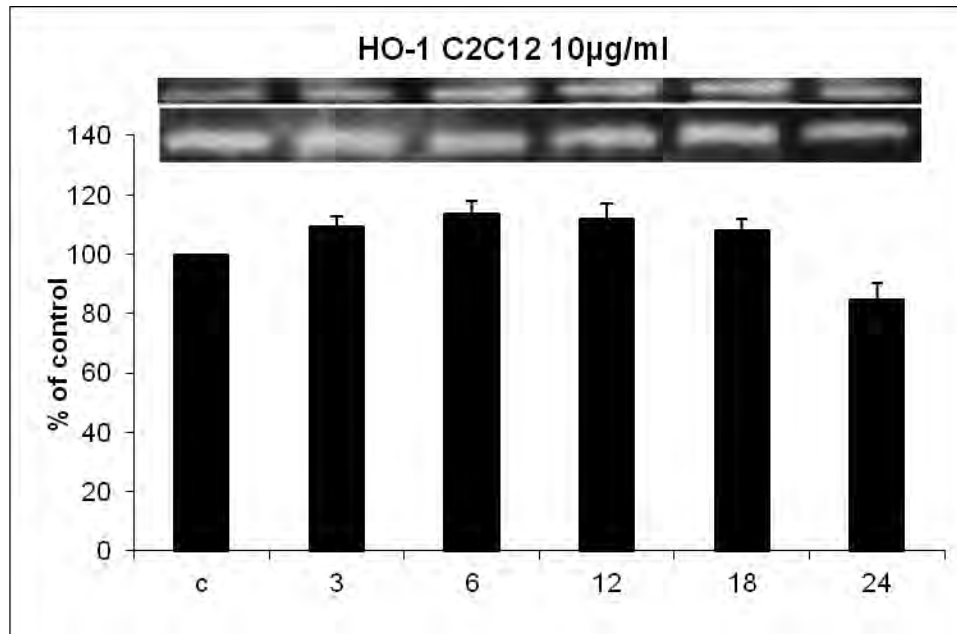
Αποτελέσματα Western μυικών κυττάρων C2C12 10μg/ml



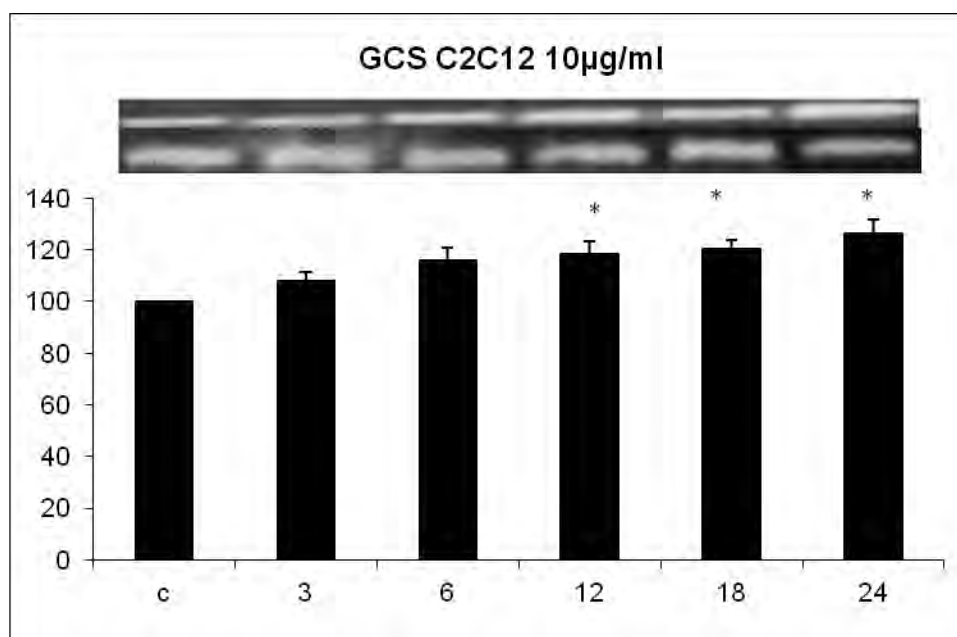
Διάγραμμα 5: Επίπεδα καταλάσης: παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της καταλάσης κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 6, 12, 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$



Διάγραμμα 6: Επίπεδα SOD: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

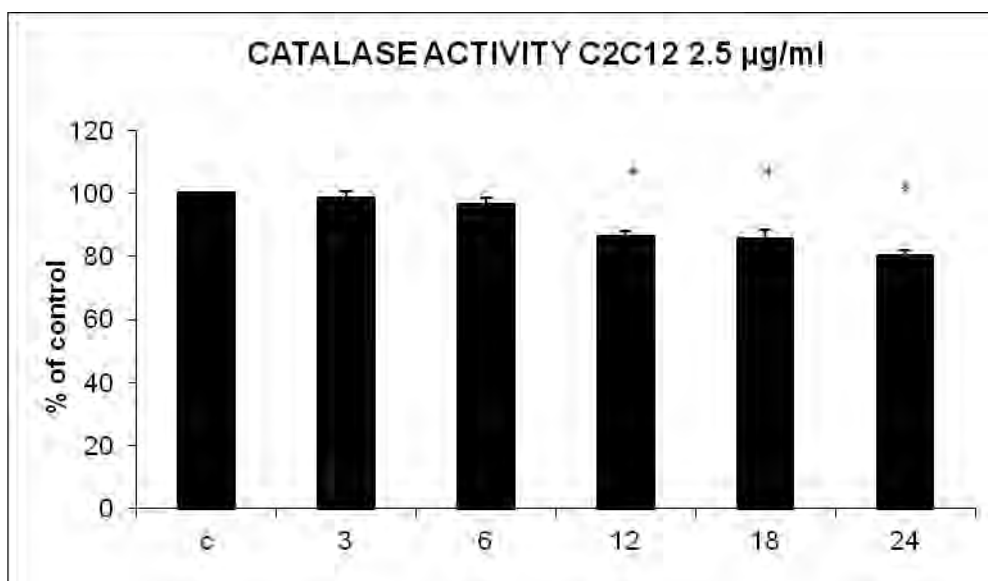


Διάγραμμα 7: Επίπεδα ΟΗ-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

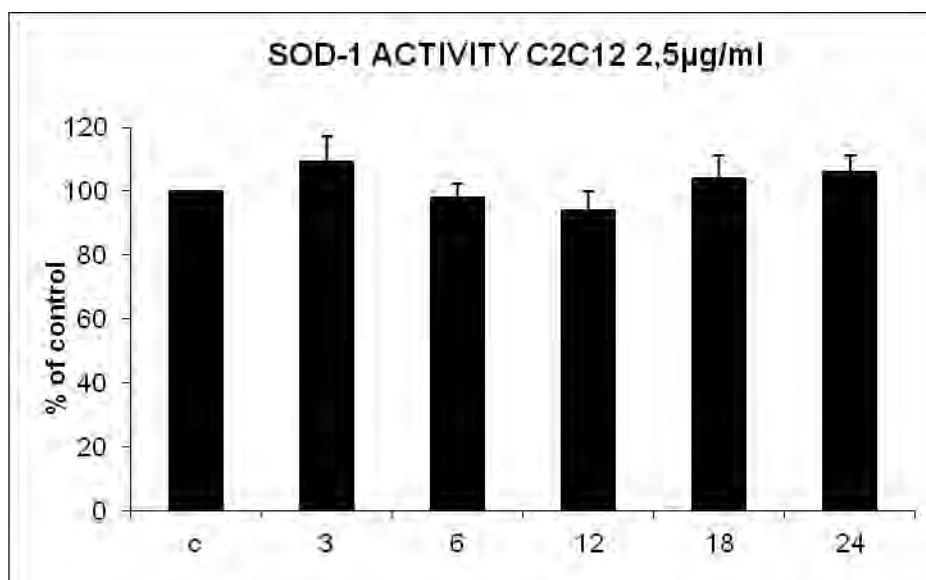


Διάγραμμα 8: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 12, 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

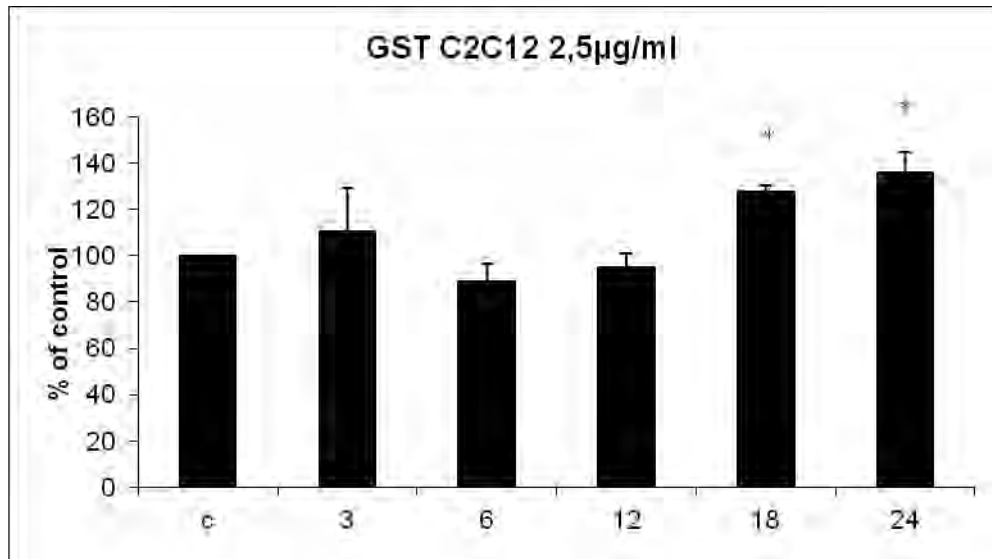
Αποτελέσματα δραστικότητας ενζύμων των μυϊκών κυττάρων C2C12 2,5μg/ml



Διάγραμμα 9: Επίπεδα καταλάσης: παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της καταλάσης κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 12, 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

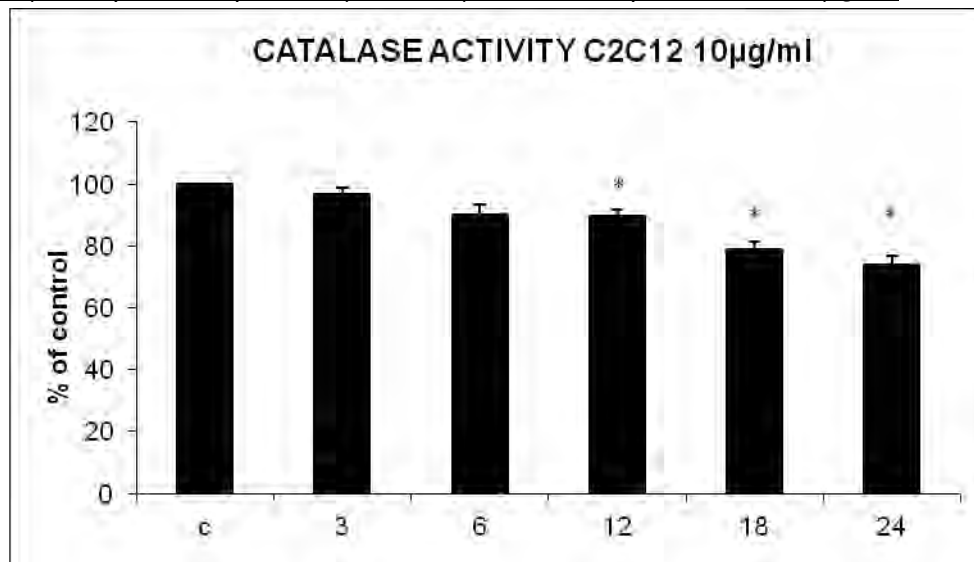


Διάγραμμα 10: Επίπεδα SOD: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

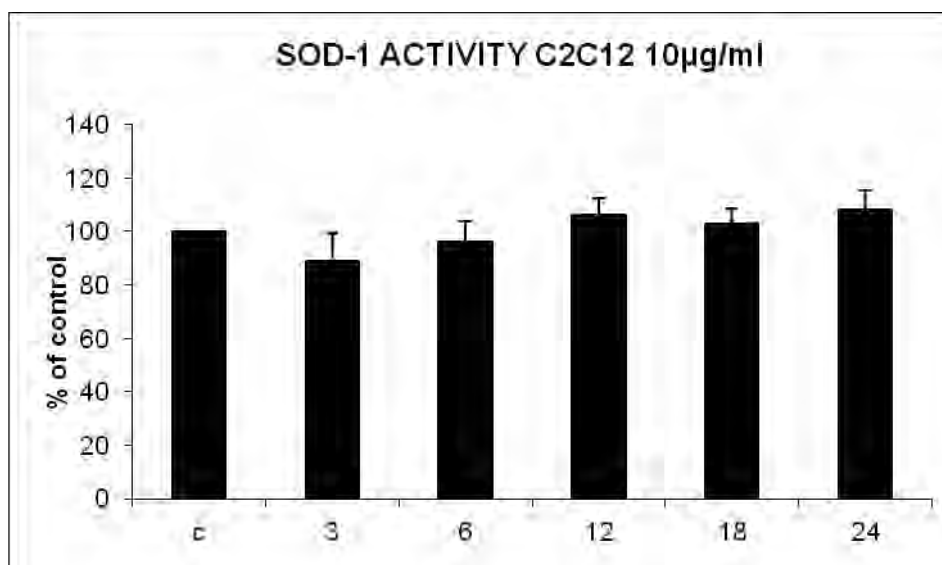


Διάγραμμα 11: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

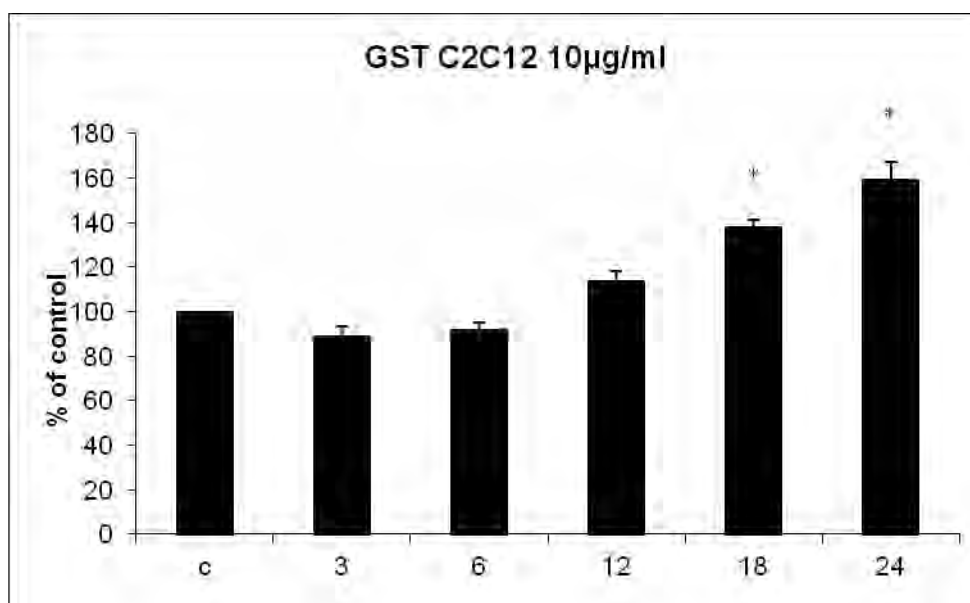
Αποτελέσματα δραστηριότητας ενζύμων των μυϊκών κυττάρων C2C12 10µg/ml



Διάγραμμα 12: Επίπεδα καταλάσης: παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της καταλάσης κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 12, 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

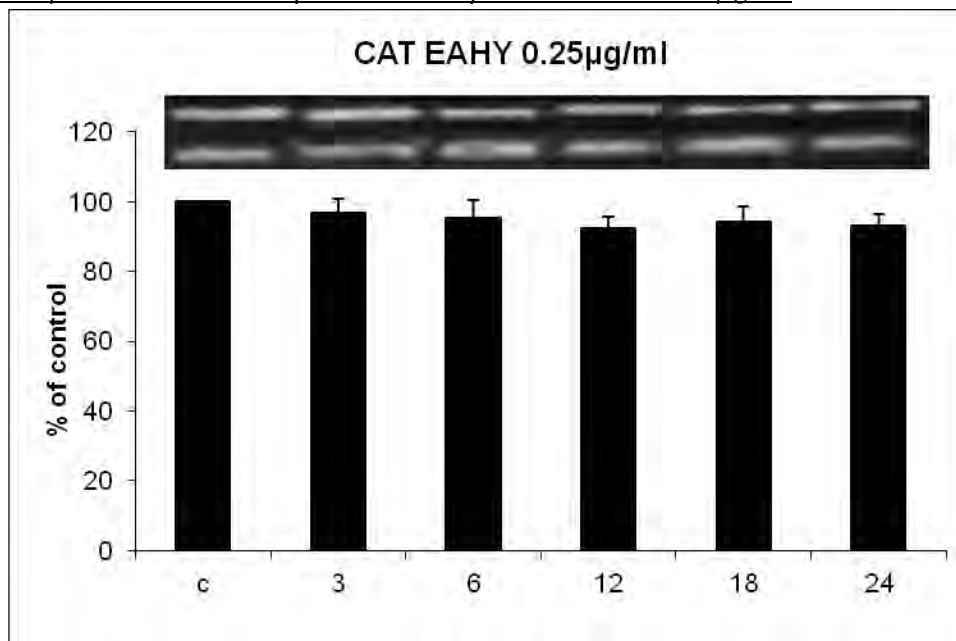


Διάγραμμα 13: Επίπεδα SOD: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

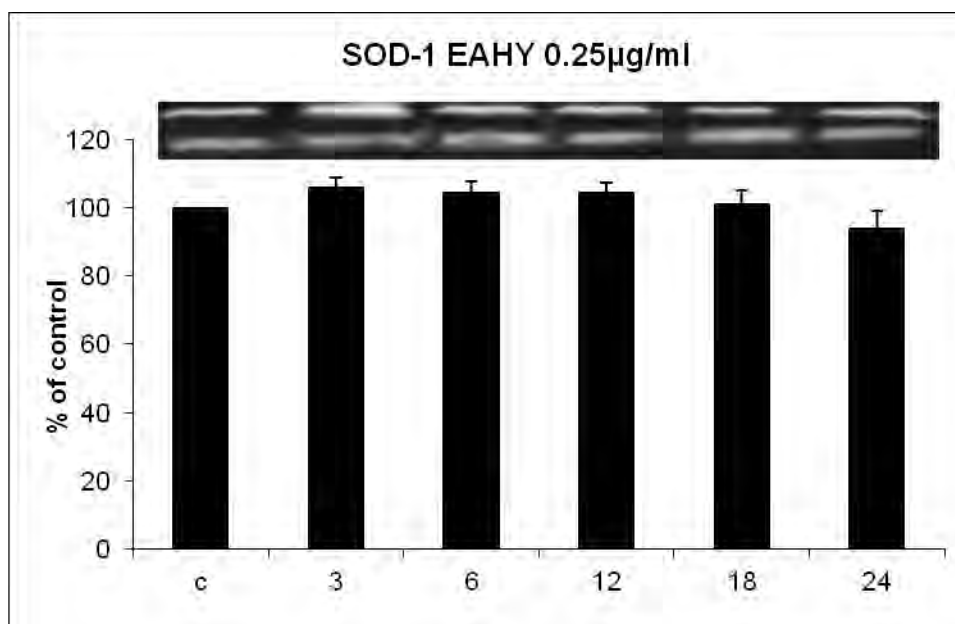


Διάγραμμα 14: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

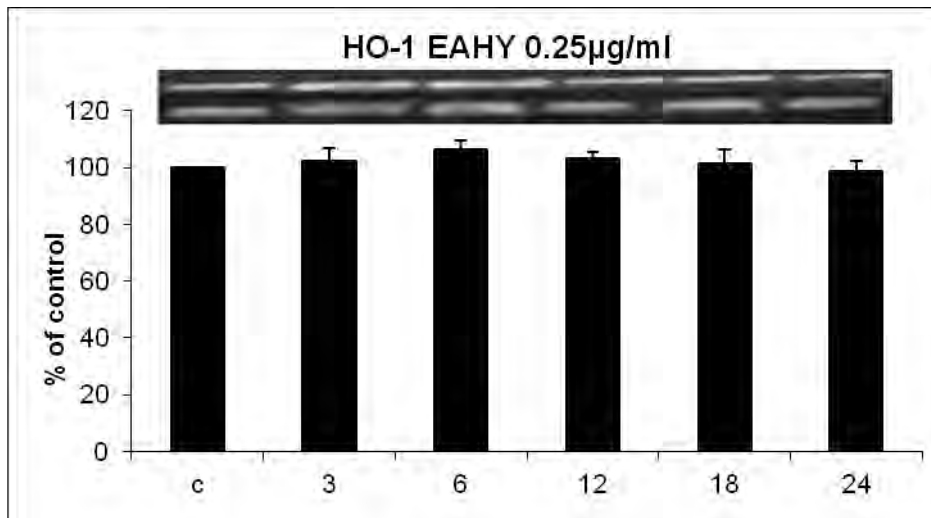
Αποτελέσματα Western επιθηλιακών κυττάρων EAhy926 0.25μg/ml



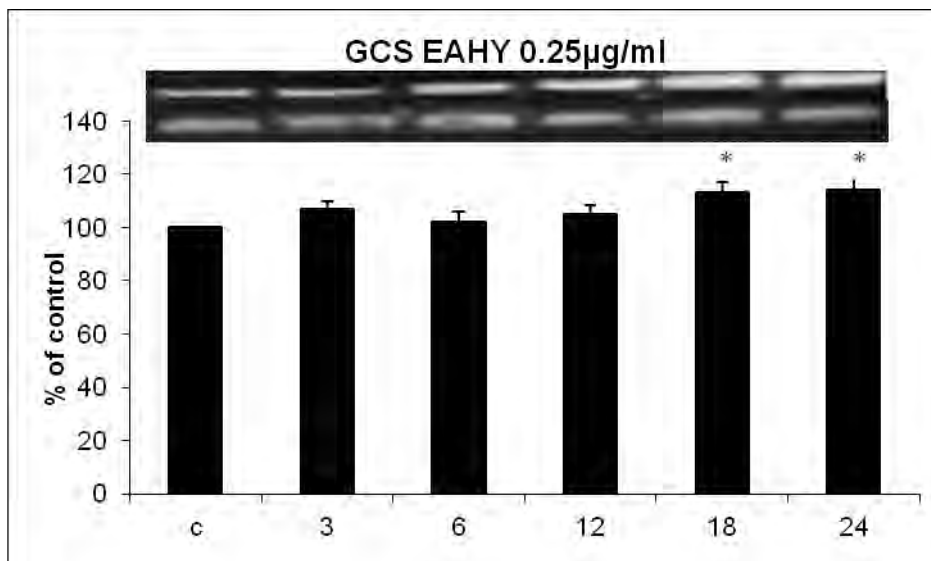
Διάγραμμα 15: Επίπεδα καταλάσης: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.



Διάγραμμα 16: Επίπεδα SOD-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

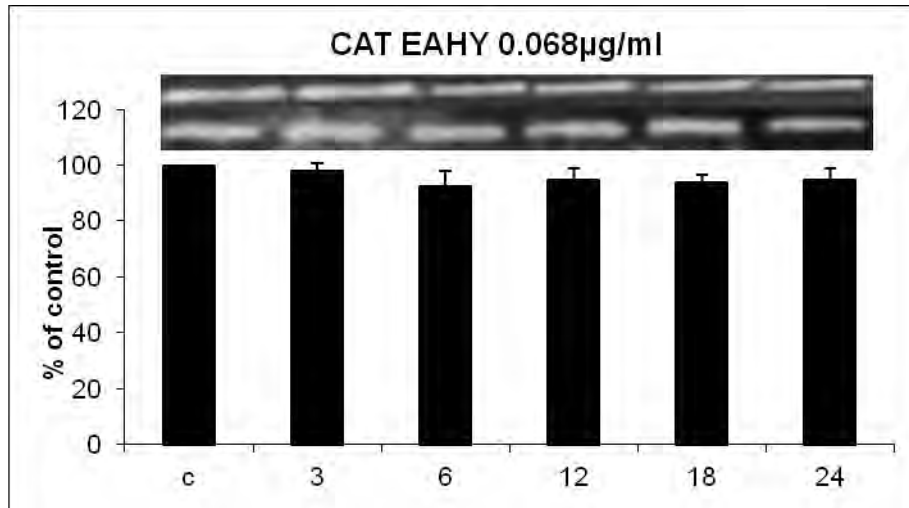


Διάγραμμα 17: Επίπεδα HO-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

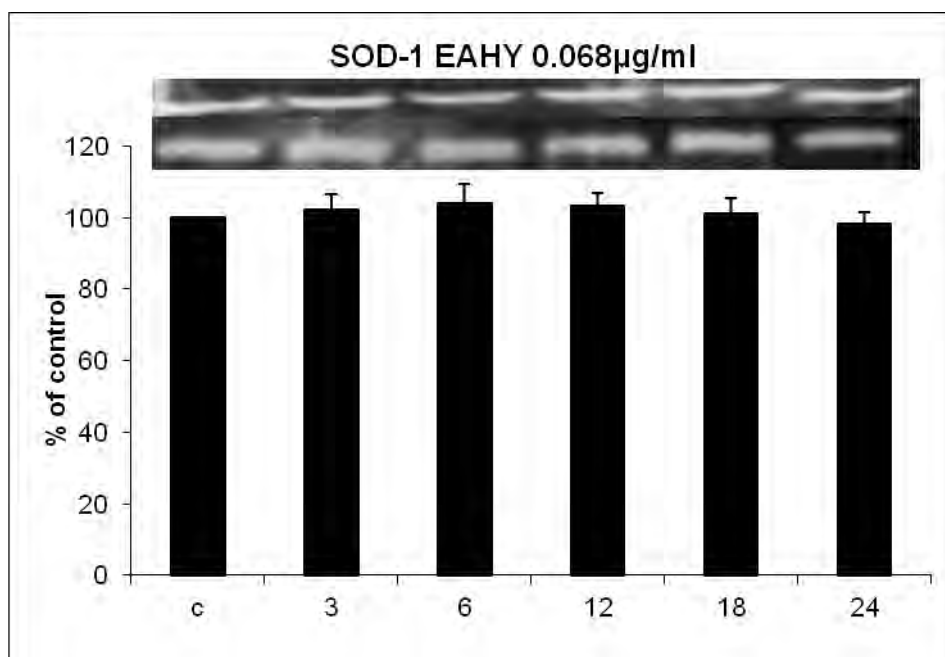


Διάγραμμα 18: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

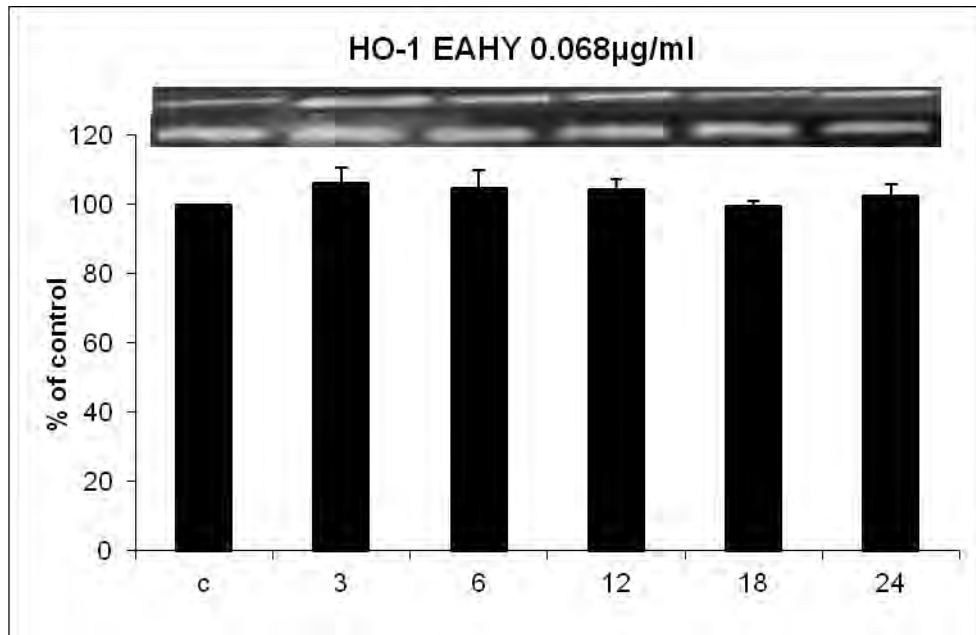
Αποτελέσματα Western επιθηλιακών κυττάρων EAHy926 0.068μg/ml



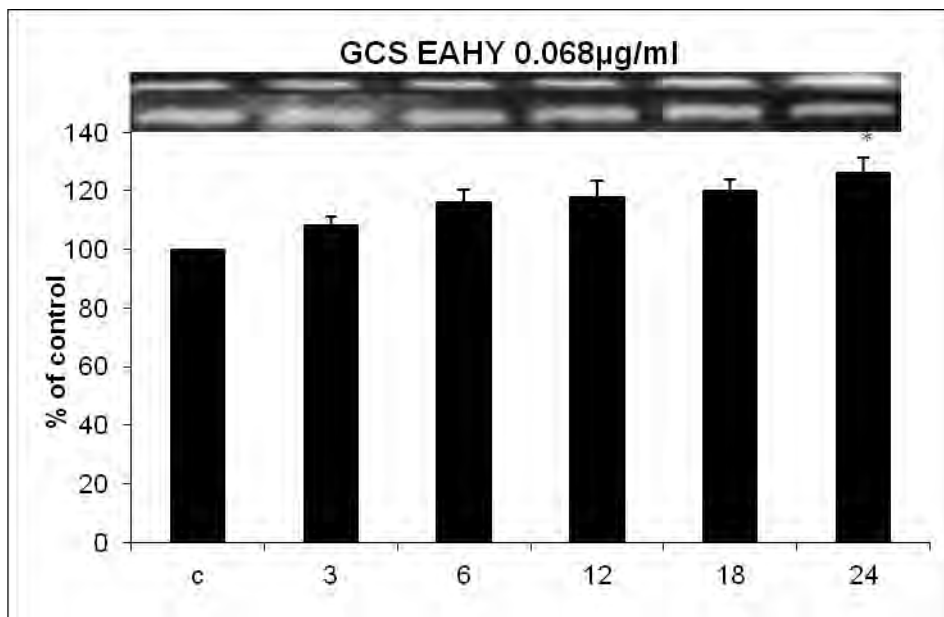
Διάγραμμα 19: Επίπεδα καταλάσης: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.



Διάγραμμα 20: Επίπεδα SOD-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

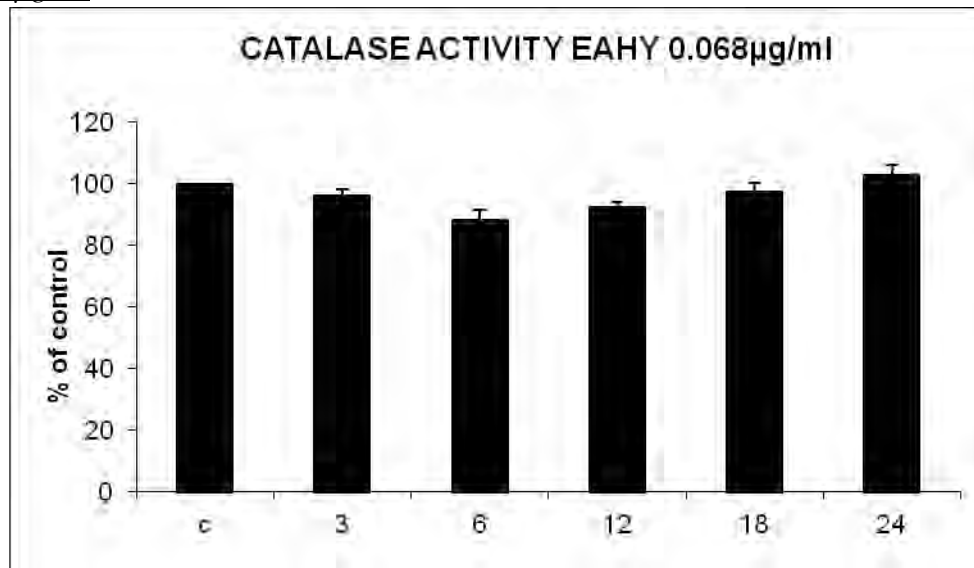


Διάγραμμα 21: Επίπεδα OH-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

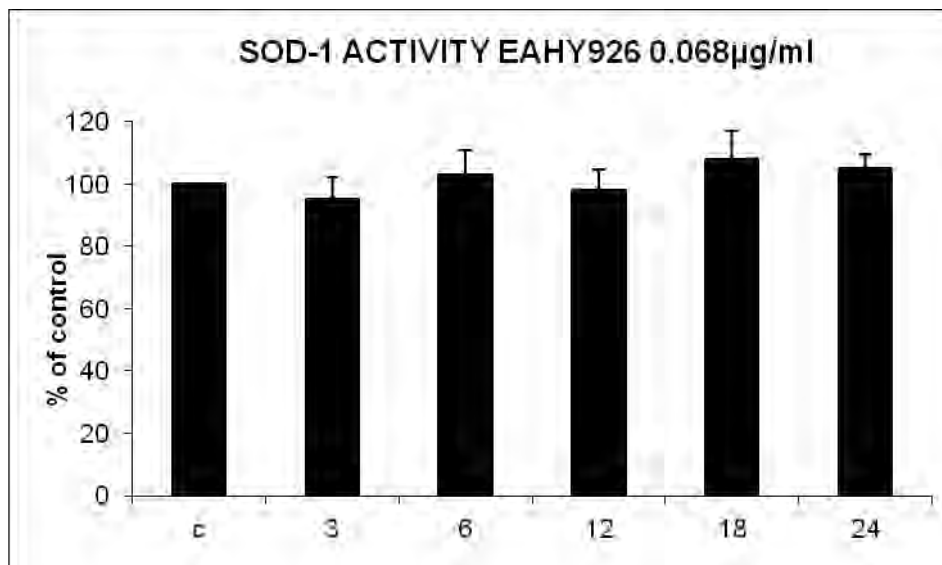


Διάγραμμα 22: Επίπεδα GCS: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GCS κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

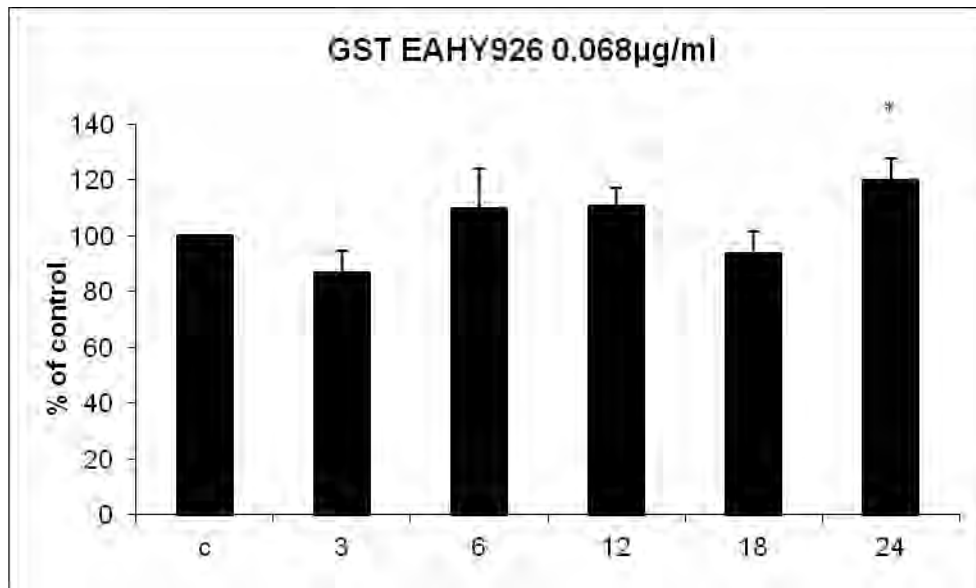
Αποτελέσματα δραστικότητας ενζύμων των επιθηλιακών κυττάρων EAHY926
0.068μg/ml



Διάγραμμα 23: Επίπεδα καταλάσης: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

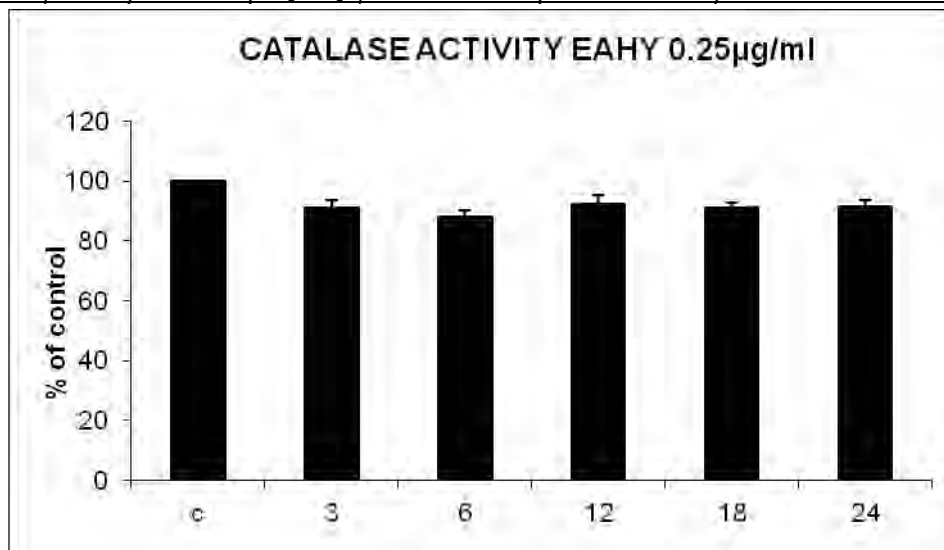


Διάγραμμα 24: Επίπεδα SOD: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

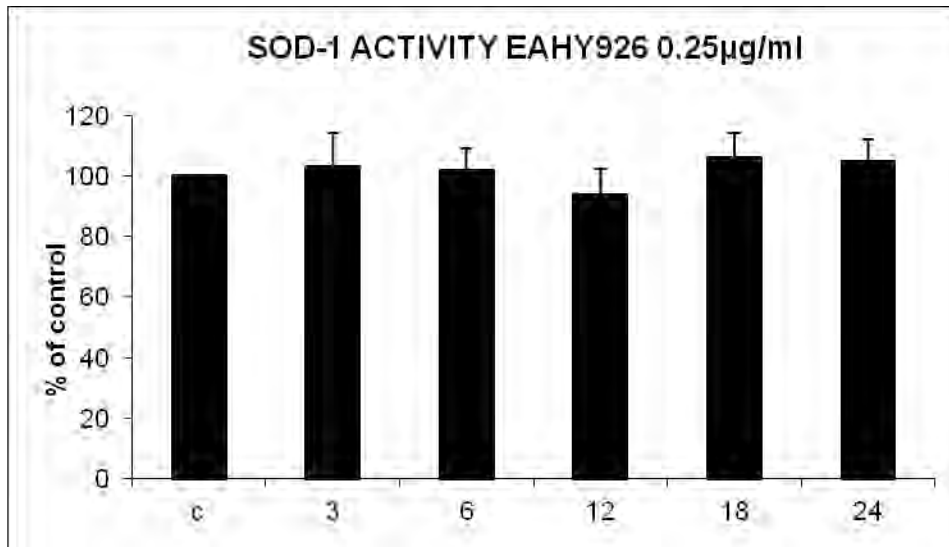


Διάγραμμα 25: Επίπεδα GST: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GST κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

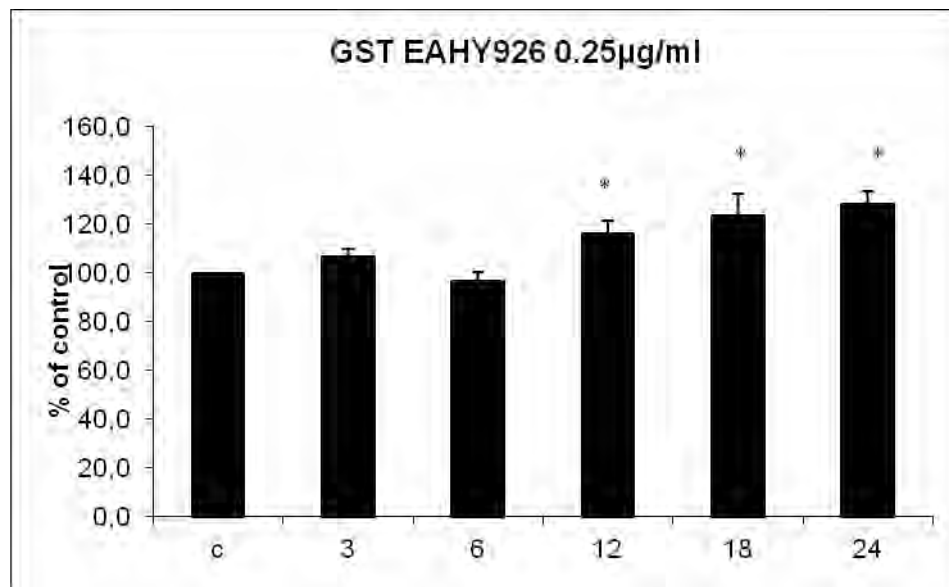
Αποτελέσματα δραστηριότητας ενζύμων των επιθηλιακών κυττάρων EAHY926 0.25μg/ml



Διάγραμμα 26: Επίπεδα καταλάσης: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.



Διάγραμμα 27: Επίπεδα SOD-1: δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά.



Διάγραμμα 28: Επίπεδα GST: παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GST κατά την επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα για 12,18 και 24 ώρες σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου. * στατιστικά σημαντική διαφορά με $P < 0.05$

Πίνακας 5: Συνολικά αποτελέσματα

Grape extract				
	10μg/ml	0.25μg/ml	2.5μg/ml	0.068μg/ml
	C2C12	EAhY926	C2C12	EAhY926
SOD	-	-	-	-
CAT	↓(6h,20.4%)(12h,21.3%) (18h,30.3%)(24h,32.3%)	-	↓(6h,20.4%)(12h,21.3%) (18h,29.2%)(24h,31.5%)	-
GCS	↑(12h,18%)(18h,20.3%) (24h,26.1%)	↑(18h,16.2%)	↑(18h,24.2%)(24h,16.3%)	↑(24h,14%)
OH-1	-	-	-	-
CAT activity	↓(12h,13.8%)(18h,21%) (24h,26.1%)	-	↓(12h,12.7%)(18h,14.5%) (24h,19.5%)	-
SOD activity	-	-	-	-
GST activity	↑(18h,37.7%)(24h,59%)	↑(18h,23.3%) (24h,28.1%)	↑(18h,27.7%)(24h,36%)	↑(24h,16.3%)

7. Συζήτηση

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν αναμφίβολα την πλέον αποδεδειγμένη άμυνα του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών. Το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για μια

σειρά από δυσλειτουργίες, που μπορεί να οφείλονται στην οξειδωτική βλάβη των βιομορίων του οργανισμού. Ενοχοποιείται για την καθοριστική συμβολή του στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό καρκίνου καθώς και τη πρόκληση και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων.

Τα μυϊκά κύτταρα και γενικά ο μυϊκός ιστός εκτίθενται στο οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση. Ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης μπορεί να εμφανιστεί οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί οξειδωτική βλάβη στα διάφορα βιομόρια των κυττάρων. Επίσης το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, οδηγώντας στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συνεπώς αυξημένο οξειδωτικό στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα συσχετίζεται με μια πληθώρα ασθενειών. Έτσι υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες μέσω τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση πολυφαινολικού εκχυλίσματος από στέμφυλα στην έκφραση και στη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα μυϊκά υπήρξε αύξηση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GCS) καθώς και της συνθετάσης της γλουταθειόνης (GST) και παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της καταλάσης. Επίσης, στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης και της συνθετάσης της γλουταθειόνης και παράλληλα καμία διαφορά στα επίπεδα της καταλάσης. Η οξυγενάση της αίμης καθώς και η υπεροξειδική δισμουτάση δεν επηρεάστηκαν σε καμία σειρά των κυττάρων.

Τα μυϊκά κύτταρα (C2C12) αναπτύσσονταν σε κλίβανο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τους χορηγήθηκε εκχύλισμα από στέμφυλα, και συγκεκριμένα από το Μπατίκι Τυρνάβου, για 3,6,12,18 και 24 ώρες. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μη κυτταροτοξικές και είχαν μελετηθεί από το εργαστήριό μας. Συγκεκριμένα είχε βρεθεί ότι εμφανίζεται κυτταροτοξική δράση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 20μg/ml, οπότε επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 2,5 και 10μg/ml (65). Επίσης, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας με κυτταρομετρία ροής, αποδείχθηκε ότι αυξανόταν η συγκέντρωση της γλουταθειόνης μετά από χορήγηση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος (66). Στην παρούσα έρευνα διαπιστώθηκε ότι, τα επίπεδα της καταλάσης μειώνονταν όσο περισσότερο παρέμεναν τα κύτταρα με το εκχύλισμα και έφτανε η μείωση της συγκέντρωσής της μέχρι και 32,3% στις 24 ώρες σε συγκέντρωση 10μg/ml. Αντίθετα, η συγκέντρωση της συνθετάσης της γλουταθειόνης αυξανόταν μέχρι και 26,1% στις 24 ώρες, καθώς και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης αυξανόταν μέχρι και 59% στις 24 ώρες σε συγκέντρωση 10μg/ml. Επίσης, σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 2.5μg/ml παρατηρήθηκε πάλι μείωση της καταλάσης μέχρι και 31,5% στις 24 ώρες καθώς και αύξηση της συνθετάσης της γλουταθειόνης μέχρι και 24,2% στις 18 ώρες και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης μέχρι και 36% στις 24 ώρες.

Στα EAhY926 ενδοθηλιακά κύτταρα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Για τα συγκεκριμένα κύτταρα οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ήταν

0,068-0,25μg/ml. Σε μελέτη που έγινε στο εργαστήριο μας, διαπιστώθηκε ότι αυξανόντουσαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης με τη χορήγηση του εκχυλίσματος στις 24 ώρες (67). Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη μας, διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 0,068μg/ml αυξήθηκε η συνθετάση της γλουταθειόνης μέχρι και 16,2% στις 18 ώρες και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης μέχρι και 28,1% στις 24 ώρες. Αντίστοιχα, με χορήγηση του εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 0,25μg/ml διαπιστώθηκε αύξηση της συνθετάσης της γλουταθειόνης μέχρι και 14% στις 24 ώρες και αύξηση της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης μέχρι και 16,3% στις 24 ώρες.

Από τα αποτελέσματα καταλαβαίνουμε ότι το εκχύλισμα μας λειτουργεί ως ενισχυτικό μέσω για την επαγωγή της παραγωγής της γλουταθειόνης καθώς αυξάνοντα τα επίπεδα της συνθετάσης της γλουταθειόνης και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η συνθετάση της γλουταθειόνης αποτελεί ο βασικό ένζυμο για την παραγωγή γλουταθειόνης οπότε δικαιολογούνται τα υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης στα κύτταρα μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος.

Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Πρόκειται για ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη με σκοπό να προστατέψει το κύτταρο από τοξικά ξενοβιοτικά μόρια. Συγκεκριμένα μέσω της αντίδρασης που καταλύει προσθέτει μόρια γλουταθειόνης σε ξενοβιοτικά μόρια με σκοπό να γίνονται περισσότερο υδρόφιλα με αποτέλεσμα να γίνονται πιο εύκολα απεκκρίσιμα από τον οργανισμό. Με αυτό τον τρόπο το ξενοβιοτικό μπορεί να απενεργοποιηθεί και έτσι υπάρχει προστασία από πιθανές τοξικές δράσης του. Αυξημένη δράση της τρανσφεράση της γλουταθειόνης στα κύτταρα σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης, που οφείλονται στα αυξημένα επίπεδα της σύνθεσής της, προσφέρουν στο κύτταρο προστασία από ελεύθερες ρίζες καθώς και από ουσίες που ευθύνονται για την παραγωγή τους.

Ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων και της δραστηριότητας καταλάσης στα μυϊκά κύτταρα ενώ στα ενδοθηλιακά δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου καθώς μετατρέπει το δραστικό υπεροξειδίο σε νερό και οξυγόνο. Μειωμένα επίπεδα και δραστηριότητα καταλάσης θα μπορούσαν να συσχετιστούν με εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως έχουμε αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης καθώς και αυξημένα επίπεδα και δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της. Έχει δειχτεί ότι η γλουταθειόνη αναστέλλει τη δράση της καταλάσης (37), και αυτό μπορεί να σχετίζεται με την μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης στα μυϊκά κύτταρα όπου τα επίπεδα της γλουταθειόνης εμφανίζονταν σημαντικά αυξημένα.

Όσον αφορά τα επίπεδα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της οξυγενάσης της αίμης δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά σε καμία από της κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Πιθανόν το εκχύλισμα να μην κατάφερε να επηρεάσει την έκφραση των συγκεκριμένων ενζύμων.

Συμπεραίνουμε ότι το εκχύλισμα επηρέασε τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που σχετίζονται με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς της γλουταθειόνης ενώ τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά ένζυμα δεν επηρεάστηκαν με εξαίρεση την καταλάση που μειώθηκε στα μυϊκά κύτταρα. Οι διαφορετικές αποκρίσεις που φάνηκαν στις δύο

κυτταρικές σειρές μπορεί να οφείλονται αρχικά στην διαφορετική ευαισθησία των κυττάρων στον εκχύλισμα. Όπως φαίνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ μικρότερες καθώς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανιζόταν κυτταροτοξική δράση. Τα μυϊκά κύτταρα όμως ήταν περισσότερο ανεκτικά οπότε χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες διαφορές στα επίπεδα και τις δράσεις των ενζύμων.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου επηρέασε τα επίπεδα της γλουταθειόνης και τα ένζυμα που σχετίζονται με αυτή. Θα ήταν σημαντικό να γίνουν περαιτέρω μελέτες και με άλλα ένζυμα που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλουταθειόνης και να αποσαφηνιστεί πως επηρεάζει ολόκληρο το μονοπάτι μέσω του οποίου η γλουταθειόνη ασκεί αντιοξειδωτική δράση. Απώτερος σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων και διατροφικών συμπληρωμάτων με βάση εκχυλίσματα στεμφύλων με σκοπό την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας μέσω του μηχανισμού της γλουταθειόνης σε ανθρώπους.

8.Βιβλιογραφία

1. **RR, Jenkins.** Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med.* 1988.
2. **Mylonas C, Kouretas D.** Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo.* 1999, 13.
3. **Salway, J.G.** *Ιατρική Βιοχημεία με μια ματιά.* s.l. : Blackwell Publishing, 2006. 2η.
4. *Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress.* **Giles GI, Jacob C.** s.l. : Biol Chem, 2002. 383.
5. **Γεώργιος, Μπόσκου.** Χημεία Τροφίμων. Θεσσαλονίκη : Γαρταγάνη, 1997.
6. **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.* 1981, 78.
7. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and chemistry. Oxford Science Publications, 1998.
8. *Glutathione and its role in cellular functions.* **H., Sies.** 1999, Τόμ. Free Radic. Biol. Med. 27.
9. **Hou Y, Guo Z, Li J, Wang PG.** *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1996, Τόμ. 228, 88-93.
10. *Protein oxidation and aging.* **R., Stadtman Earl.** 12, s.l. : Free Radical Research, 2006, Τόμ. 40. 1250-1258.
11. *Minireview_ Oxidized proteins: Intracellular Distribution and recognition by the proteasome .* **Jung T, Bader N, Grune T,.** 231-237, s.l. : Archives of Biochemistry and Biophysics , 2007, Τόμ. 462.
12. **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free Radicals, Antioxidants in Diseases and Health. *Int J Biomed Sci.* 4, 2008, Τόμ. 2, 89-96.
13. *Antioxidant enzyme levels in cancer.* **Oberley TD, Oberey LW.** 12, 1997, Τόμ. Histol Histopathol. 525-35.
14. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stree-induced cancer.* **Valko M, Rhodes Cj, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** 160, 2006, Τόμ. Chem Biol Interact. 1-40.
15. **Choi AM, Alam J.** Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 1, 1996.
16. **Akihiro Yachie, Yo Niida, Taizo Wada, Noboru Igarashi, Hisashi Kaneda,.** Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *Journal of Clinical Investigation .* 1999.
17. *Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes.* **KT, Douglas.** 59, Τόμ. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.

18. *Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.* **Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA.** *Biochem J*, 2001. 360.
19. *Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease.* **Dalton TP, et al.** 37, s.l. : *Free Radic Biol Med*, 2004, Τόμ. 10. 1511-26.
20. *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase.* **Franklin CC, et al.** s.l. : *Mol Aspects Med*, 2009. 30(1-2):86-98.
21. *Physiological and pathological aspects of GSH metabolism.* **Njålsson R, Norgren S.** s.l. : *Acta Paediatr*, 2005. 94(2):132-137.
22. *Regulation of glutathione synthesis.* **SC, Lu.** s.l. : *Mol Aspects Med*, 2009. 30(1-2):42–59.
23. *Glycation of glutamate cysteine ligase by 2-deoxy-d-ribose and its potential impact on chemoresistance in glioblastoma.* **Backos DS, et al.** s.l. : *Neurochem Res*, 2013. 38(9):1838-49.
24. *"Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine).* **Griffith OW, Meister A.** s.l. : *J Biol Chem*, 1979. 254(16):7558-60.
25. *Role of oxygen radicals in DNA damage.* **Valko M, Izakovic I, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** *Mol Cell Biochem.*, 2004, Τόμ. 1-2. 37-56.
26. *Βιοχημεία ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση.* **Γεώργιος, Παπαγεωργίου.** Θεσσαλονίκη : University studio press, 2005.
27. *Plant Polyphenols and Tumors: From Mechanisms to Therapies, Prevention and Protection Against Toxicity of Anti-Cancer Treatments.* **Korkina LG, De Luca C. Kostyuk VA, Pastore S.** 30, s.l. : *Curr Med Chem.*, 2009, Τόμ. 16. 3943-65.
28. *Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols.* **Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA.** 72, s.l. : *Biochem Pharmacol*, 2006, Τόμ. 11. 1439-52.
29. *Plant polyphenols: are they the new magic bullet?* **Duthie G, Gardner P, Kyle J.** 62, s.l. : *Proceedings of the Nutrition Society.*, 2003. 599-603.
30. *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress:a review.* **Blokhina O, Virolainen E, Facerstedt KV.** 91, s.l. : *Ann Bot*, 2003, Τόμ. 2. 179-194.
31. *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.* **Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N.** 82, s.l. : *Fitoterapia*, 2011, Τόμ. 4. 513-23.
32. *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?* **B., Halliwell.** 479, s.l. : *Arch Biochem Biophys.*, 2008, Τόμ. 2. 107-12.

33. *Potential health impacts of excessive flavonoid intake.* **Skibola CF, Smith MT.** s.l. : Free Radic Biol Med., 2000, Τόμ. 3-4. 375-83.
34. *Neurotoxicity of cysteine : interaction with glutamate.* **Puka-Sundvall, M., Eriksson, P., Nilsson, M., Sandberg, M. and Lehman, A.** 705, s.l. : Brain Res, 1995. 65-70.
35. *Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast protists and plants.* **Mendoza-Cozatl D., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A., Moreno-Sanchez R.** 29, s.l. : FEMS Microbiol. Rev., 2005. 653-671.
36. *Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells.* **May M.J., Qu C. Z., Neel R. D.** s.l. : Biochim. Bioph. Acta., 2003. 1640:153-161.
37. *The inhibition of catalase by glutathione.* **Sun Y., Oberley L. W.** s.l. : Free Radic. Biol. Med., 1989. 595-602.
38. *One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? .* **Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ.** s.l. : J Pineal Res, 2007. 42:28-42.
39. *Η αντιοξειδωτική δράση της μελατονίνης.* **Κώστογλου, Αθανασίου.** s.l. : Ιατρική, 1997. 72:496-498.
40. *Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination.* **Galano A, Tan DX, Reiter RJ.** s.l. : J.Pineal Res, 2011. 51:1-16.
41. *Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period.* **Aversa S, Pellegrino S, Barberi I, Reiter RJ, Gitto E.** s.l. : J Matern Fetal Neonatal Med, 2011.
42. *Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration .* **Green HJ, Fraser IG.** 2, s.l. : Med Sci Sports Exerc, 1988. 20:55-9.
43.
<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CE%BF%CE%BB%CE%B5%CF%81%CF%85%CE%B8%CF%81%CE%AF%CE%BD%CE%B7>.
44. *Ελιά και Ελαιόλαδο .* **Κυριτσάκας.** Θεσσαλονίκη : Απόστολος Κυριτσάκης, 2007.
45. *World review of nutrition and dietetics.* **D., Boskou.** Thessaloniki : Olive oil Chemistry and Technology, 2007.
46. *“Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying.* **Gómez-Alonso, Sergio, Giuseppe Fregapane, M Desamparados Salvador, Michael H Gordon.** 51, s.l. : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, Τόμ. 3. 667-72.
47. *Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality.* **El Riachy, Milad, Feliciano Priego-Capote, Lorenzo León, Luis Rallo, María Dolores Luque de Castro.** 113, s.l. : European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, Τόμ. 6. 678-691.

48. *"Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece.* **Trichopoulou, Antonia, Christina Bamia, and Dimitrios Trichopoulos.** 165, s.l. : Archives of Internal Medicine, 2005, Τόμ. 8. 929-35.
49. http://alttherapy.blogspot.gr/2012/07/blog-post_3192.html#axzz31yB078SA.
50. *Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa.* **Verstraeten SV, Hammerstone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI.** 53, s.l. : Agric Food Chem, 2005, Τόμ. 12. 5041-8.
51. <http://www.newsbeast.gr/health/arthro/620412/mathete-tin-alitheia-gia-tin-bira/>.
[Ηλεκτρονικό]
52. *Nuts, hypertension and endothelial dysfunction.* *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* **Casas-Agustench P, Lopez-Uriarte E, Ros M, Bullo, Salas-Salvado J.** 2011.
53. <http://www.news.gr/ygeia/ta-nea-ths-ygeias/article-wide/92939/o-kafesdiavathrio-ygeias.html>.
54. *Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease.* **Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, Carlson DA, Munch G.** s.l. : Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. 13-14:1463-1470.
55. *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich .* **Floegel A, Kim D, Chung S, Koo SI, Chun K.** s.l. : Journal of food Composition and Analysis, 2011. 7:1043-1048.
56. *Targets of red grapes: oxidative damage of DNA and leukaemia cells.* **Anter J, de Abreu-Abreu N, Fernandez-Bedmar Z et al.** s.l. : Nat Prod Commun., 2011. 6(1):59-64.
57. *Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases.* **Chuang CC, McIntosh MK.** s.l. : Annu Rev Nutr., 2011. 21:31:155-76.
58. *Grapes and cardiovascular disease.* **Dohadwala MM, Vita JA.** s.l. : J Nutr., 2009. 139(9):1788-93.
59. *Effects of Concord Grape Juice on Appetite, Diet, Body Weight, Lipid Profile, and Antioxidant Status of Adults.* **Hollis JH, Houchins JA, Blumberg JB et al.** s.l. : J. Am. Coll. Nutr., 2009. 28:574-582.
60. *Grape antioxidant dietary fibre reduced apoptosis and induced a pro-reducing shift in the glutathione redox state of the rat proximal colonic mucosa.* **Lopez-Oliva ME, Agis-Torres A, Goni I et al.** Cambridge : The British Journal of Nutrition., 2010. 1110-1117.
61. **Yaffe, Saxel.** 1977.
62. *Aerobic training workload affects human endothelial cells redox homeostasis.* **Conti V, Russomanno G, Corbi G, Guerra G, Grasso C, Filippelli W, Paribello V, Ferrara N, Filippelli A.** s.l. : Med Sci Sports Exerc, 2013. 45(6):Q644-53.

63. *Effects of glucose on collagen mRNA levels and collagen secretion in EAhy926 endothelial cell line.* **Kössi J, Muona P, Tuukkanen J, Ylä-Outinen H, Kalliomäki M, Risteli J, Oikarinen A, Laato M, Peltonen J.** s.l. : Ann Chir Gynaecol Suppl, 2001. (215): 39-44.

64. *Role of receptor desensitization, phosphatase induction and intracellular cyclic AMP in the termination of mitogen-activated protein kinase activity in UTP-stimulated EAhy 926 endothelial cells.* **Graham A, McLees A, Malarkey K, Gould GW, PLevin R.** s.l. : Biochem J, 1999. 315:563-9.

65. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ(GSH) ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΜΥΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ. **Παρασκευη, Μαυρίδου.** 2012.

66. Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο Κυτταρομετρίας Ροής σε μυϊκά Κύτταρα C2C12 έπειτα από χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα tert – butyl και εκχυλίσματος στεμφύλων . **Στέφανος, Γεωργαδάκης.** 2013.

67. Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση μίγματος πολυφαινολών από στέμφυλα. **Χρυσουγή, Καρτελιώτη.** 2013.