

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ(GSH) ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ
ΡΟΗΣ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΜΥΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ**



**ASSESSMENT OF GLUTATHIONE (GSH) USING FLOW CYTOMETRY IN
MOUSE MUSCLE CELLS AFTER TREATMENT WITH GRAPE EXTRACT**

Μαυρίδου Παρασκευή

Λάρισα 2012

Τριμελής επιτροπή

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

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

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ πολύ τους καθηγητές μου και πρωτίστως τον κ. Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε ένα τέτοιο πείραμα και που μου πρόσφερε παραπάνω γνώσεις στο αντικείμενο που σπούδασα. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνεργάστηκα για την αποπεράτωση της πτυχιακής μου καθώς ήταν πάντα δίπλα μου πρόθυμοι να βοηθήσουν και να δώσουν την συμβουλή τους και κυρίως το συνεργάτη μου Νίκο που με βοήθησαν στην ομαλή ολοκλήρωση του πειράματος και συνεπώς και της πτυχιακής μου εργασίας.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|------------------------------------------|-----------|
| <u>Περίληψη.....</u> | <u>4</u> |
| <u>Εισαγωγή.....</u> | <u>5</u> |
| <u>1.1 –Ελεύθερες ρίζες.....</u> | <u>5</u> |
| <u>1.2 –Οξειδωτικό στρες.....</u> | <u>7</u> |
| <u>1.3 –Αντιοξειδωτικές ενώσεις.....</u> | <u>11</u> |
| <u>1.4— Εκχύλισμα.....</u> | <u>16</u> |
| <u>1.5 –Μυϊκά κύτταρα C2C12.....</u> | <u>23</u> |

2. ΣΚΟΠΟΣ

| | |
|------------------------|-----------|
| <u>2.1-Σκοπός.....</u> | <u>24</u> |
|------------------------|-----------|

3. ΥΛΙΚΑ.....

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|------------------------------------------------------|-----------|
| <u>4.1 –ΧΤΤ: Αρχή της μεθόδου/πρωτόκολλο.....</u> | <u>27</u> |
| <u>4.2–ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΡΟΗΣ.....</u> | <u>28</u> |
| <u>4.3 –T-BARS: Αρχή της μεθόδου/πρωτόκολλο.....</u> | <u>29</u> |

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

| | |
|-----------------------------------------|-----------|
| <u>5.1-ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ.....</u> | <u>34</u> |
| <u>5.2-ΧΤΤ.....</u> | <u>41</u> |
| <u>5.3-T-BARS.....</u> | <u>42</u> |
| <u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u> | <u>43</u> |
| <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u> | <u>45</u> |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες έχουν αποδείξει την αντιοξειδωτική δράση που έχουν στον οργανισμό τα σταφύλια. Η συγκεκριμένη εργασία αφορά την επίδραση ενός εκχυλίσματος ελληνικού σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυικών κυττάρων επιμύου (C2C12). Το συγκεκριμένο εκχύλισμα έχει μελετηθεί από το εργαστήριό μας και έχουν αναλυθεί διάφορες ευεργετικές δράσεις του. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 24 ώρες και αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT για την εύρεση της κρίσιμης τιμής κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος, η οποία ήταν >20 $\mu\text{g/ml}$. Έτσι, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 2,5, 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν ορισμένοι δείκτες οξειδωτικού στρες. Κύρια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κυτταρομετρία ροής με την οποία μετρήθηκε η γλουταθειόνη που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά των κυττάρων. Ωστόσο προσδιορίστηκαν και τα TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) με φασματοφωτομετρία. Οι μετρήσεις με την κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$, τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν κατά 151%, 120% και 168% αντίστοιχα σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Κατά συνέπεια, υπήρξε μια πιθανή αντιοξειδωτική επίδραση του εκχυλίσματος. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται και από την επίδραση που είχε το εκχύλισμα στη συγκέντρωση των TBARS. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ μείωσε κατά 32%, 39% και 50% αντίστοιχα τα επίπεδα των TBARS. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σημαντικά όσον αφορά την επίδραση αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυικών κυττάρων γιατί οι αντίστοιχες μελέτες στη βιβλιογραφία είναι ελάχιστες. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, καθώς και σε περισσότερα χρονικά διαστήματα μικρότερα του 24ώρου ή και μεγαλύτερα, ούτως ώστε να υπάρχει μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη δράση του εκχυλίσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

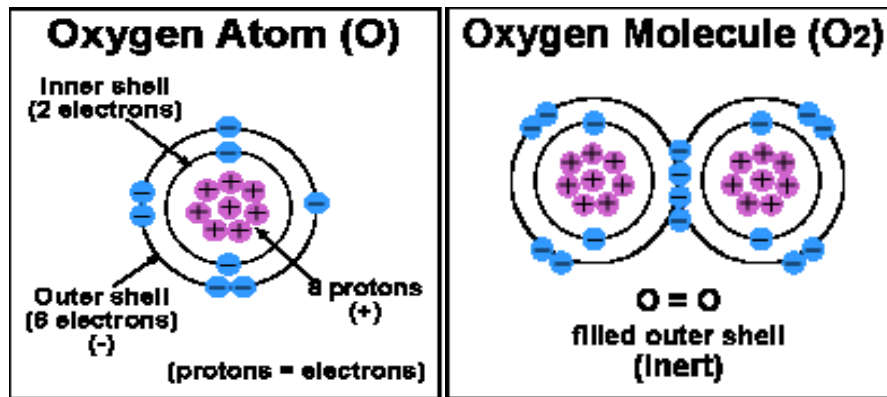
Εισαγωγή

Ανέκαθεν υπήρχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα σταφύλια και τις πλούσιες ιδιότητες τους για την υγεία και τον άνθρωπο. Από την αρχαιότητα το σταφύλι αναμφισβήτητα αποτελούσε ζωτικής σημασίας στοιχείο στη διατροφή αλλά και σε πολλές άλλες εφαρμογές που με την πάροδο των χρόνων εξελίχθηκαν. Πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών και εύκολα διαθέσιμο και καλλιεργήσιμο το σταφύλι έχει κινήσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών καθώς οι επιδράσεις του στον οργανισμό είναι αμέτρητες (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006). Η εμφάνιση συνεχώς νέων ποικιλιών σταφυλιού είτε στη φύση είτε στο εργαστήριο έχει διευρύνει κατά πολύ το εύρος της έρευνας των ιδιοτήτων του προς όφελος του ανθρώπου και όχι μόνο. Στη συγκεκριμένη εργασία παραθέτω όλα τα στοιχεία και τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν στη μελέτη που περατώθηκε πάνω στην ανίχνευση αντιοξειδωτικής ικανότητας συγκεκριμένης ελληνικής ποικιλίας σταφυλιού (Μπατίκι Τυρνάβου, καθώς και όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση του πειράματος. Κύριο στοιχείο του πειράματος αποτελεί η χρήση κυτταρόμετρου ροής και εστιάζει κυρίως στις τιμές της γλουταθειόνης (GSH).

1.1

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Ελεύθερη ρίζα ονομάζεται το μόριο ή άτομο που φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα μόρια στην εξωτερική στιβάδα σθένους του. Είναι μόρια ασταθή τα οποία έχουν την τάση να συνδέονται με άλλα μόρια για να αυξήσουν την σταθερότητά τους. 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. .



Εικόνα 1.1/το άτομο του οξυγόνου και η ηλεκτρονιακή του κατανομή/το μόριο του οξυγόνου έπειτα από σύνδεση δύο ατόμων του.

Υπάρχουν πολλοί τύποι ελεύθερων ριζών στο σώμα. Τα τέσσερα ιδιαίτερα βλαβερά είναι :

1. Η ρίζα του υπεροξειδίου τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει..
2. Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.
3. Η ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί την λύση του κυττάρου και ελευθέρωση του περιεχομένου του.
4. Το μονήρες οξυγόνο δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 1.2/Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας από άτομο του οξυγόνου

1.2

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:

- (i) Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot),
- (ii) Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^\cdot), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος (HClO),
- (iii) Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^\cdot)
- (iv) Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Μερικές από τις λιγότερο δραστικές μορφές, όπως τα υπεροξείδια, είναι δυνατόν να μετατραπούν σε πιο δραστικές μορφές ελευθέρων ριζών, ικανές να προκαλέσουν εκτεταμένες κυτταρικές βλάβες. Οι μακροπρόθεσμες κυτταρικές βλάβες που

προκαλούνται με τον τρόπο αυτό αποδίδονται κυρίως στην προσβολή του DNA. Οι περισσότερες ROS παράγονται σε χαμηλά επίπεδα από τον αερόβιο μεταβολισμό και οι βλάβες που προκαλούν επιδιορθώνονται συνεχώς. Όταν όμως η συγκέντρωσή τους αυξηθεί υπέρμετρα, τότε μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες και νέκρωση του κυττάρου.

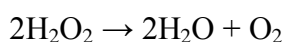
Η κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι από ενεργοποιημένο οξυγόνο από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και σχηματίζει τελικά H₂O. Συνολικά, μέχρι και το 2% του οξυγόνου που εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα σχηματίζει ανιόντα υπεροξειδίου (O₂⁻). Υποστηρίζεται ότι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν φλαβινοπρωτεΐνες, επίσης αποτελούν αιτία για την παραγωγή ROS. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450.

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Οι κυριότεροι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που διαθέτει το κύτταρο είναι:

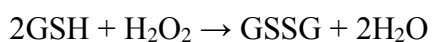
- Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), που καταλύει την αντίδραση:



- Η καταλάση, που καταλύει την αντίδραση:



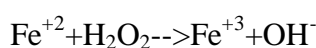
- Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:



Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδευδών. Ως αντιοξειδωτικές ενώσεις χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που εν δυνάμει εξουδετερώνουν

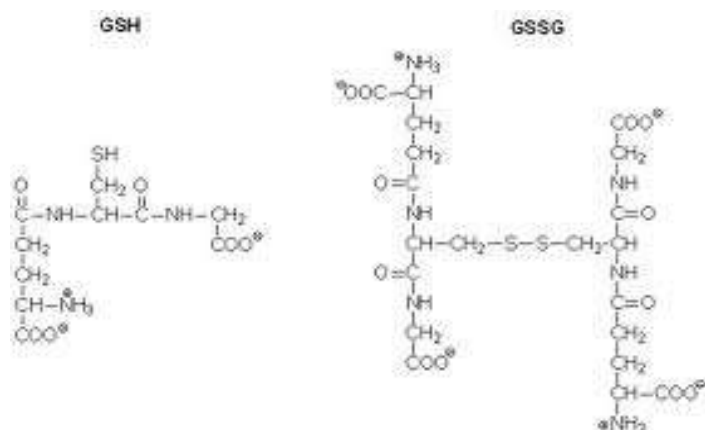
ελευθέρων ριζών και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

Τα στοιχεία μετάπτωσης (κυρίως σίδηρος, χαλκός και χρώμιο) μπορούν να λειτουργήσουν ως οξειδοαναγωγικοί παράγοντες, προσλαμβάνοντας ή προσφέροντας ηλεκτρόνια σε άλλα μόρια. Η δράση αυτή καταλύει το σχηματισμό αντιδραστικών ριζών, στις οποίες ανήκουν και οι ROS. Η πιο σημαντική αντίδραση, γνωστή ως αντίδραση Haber-Weiss, είναι αυτή κατά την οποία η ρίζα υδροξυλίου παράγεται από ανηγμένο σίδηρο και υπεροξειδίου του υδρογόνου:



Τα περισσότερα ένζυμα που παράγουν ROS περιέχουν κάποιο από αυτά τα μέταλλα. Η παρουσία των εν λόγω μετάλλων σε βιολογικά συστήματα σε ελεύθερη μορφή (χωρίς να είναι δεσμευμένα από πρωτεΐνες) αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Ορισμένα οργανικά συμπλέγματα μπορούν επίσης να δράσουν ως καταλύτες για την παραγωγή ROS. Την πιο σημαντική τάξη τους αποτελούν οι κινόνες.

Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται είτε με την αυξημένη παραγωγή ROS είτε με τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).



Εικόνα 1.3/χημική δομή της οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών. Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον

κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση.



Εικόνα 1.4/μοριακός μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο κύτταρο από το οξειδωτικό στρες

Ευεργετικές Δράσεις και Ανοσοποιητικό Σύστημα

Ορισμένες ελεύθερες ρίζες (κυρίως το $\cdot\text{NO}$) χρησιμεύουν για τη μεταφορά μηνυμάτων στο κύτταρο, φαινόμενο που καλείται «οξειδοαναγωγική σηματοδότηση». Είναι γνωστή επίσης η δράση του $\cdot\text{NO}$ ως αγγειοδιασταλτικού παράγοντα καθώς και η χρησιμοποίηση του H_2O_2 κατά τη σύνθεση θυροξίνης. Το οξειδωτικό στρες που έχει μικρή χρονική διάρκεια εκτιμάται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβράδυνση της διαδικασίας της γήρανσης, μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται «όρμηση», σύμφωνα με τον οποίο το φορτίο αυτό κινητοποιεί τους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης, οι οποίοι στη συνέχεια βρίσκονται σε ετοιμότητα για την αντιμετώπιση και άλλων βλαπτικών παραγόντων. Δεν θα πρέπει ωστόσο να παραβλέπεται το γεγονός ότι το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο είναι ένας μείζων παράγοντας πρόκλησης κυτταρικών βλαβών και συνεπώς η παρατεταμένη έκθεση σε αυτό συμβάλλει τα μέγιστα στη διαδικασία της γήρανσης.

Είναι επιβεβαιωμένη η χρησιμοποίηση των ROS από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, το οποίο τις χρησιμοποιεί ως βασικό μηχανισμό προσβολής των παθογόνων. Τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα παράγουν τόσο ROS όσο και αντιδραστικές μορφές του αζώτου, που περιλαμβάνουν το μονοξείδιο του αζώτου ($\cdot\text{NO}$) και τον ιδιαίτερα δραστικό περοξυνιτρίτη. Παρόλο που η χρήση των αντιδραστικών αυτών μορίων κατά την κυτταροτοξική απάντηση των φαγοκυττάρων προκαλεί ως ένα βαθμό βλάβη και στους ιστούς του ίδιου του οργανισμού, η μη-ειδικότητά τους αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα καθώς καταστρέφουν σχεδόν κάθε στοιχείο του κυττάρου-στόχου. Αυτό αποτρέπει τα παθογόνα από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον εν λόγω μηχανισμό με μετάλλαξη ενός κυτταρικού συστατικού τους.

1.3

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η γλουταθειόνη δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό δεδομένου ότι μπορεί να συντεθεί στο σώμα από τα αμινοξέα L-κυστεΐνη, L-γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη. Η sulfhydryl (θειόλη) κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης πρωτονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος. Η κύρια αποστολή της είναι η διάσπαση και απομάκρυνση από το σώμα όλων των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Είναι ένα αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την οξειδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες στη γαστρεντερική οδό και προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που αυτές μπορεί να προκαλέσουν. Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα ελαττώνονται κατά 17% από την ηλικία των σαράντα μέχρι την ηλικία των εξήντα. Αν έχουμε χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχει 33% μεγαλύτερος κίνδυνος για χρόνια νοσήματα.

Στα χρόνια νοσήματα το 77% των ασθενών έχουν ανεπάρκεια γλουταθειόνης. Η κατανάλωση λίπους αυξάνει τις ανάγκες του οργανισμού για γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη έχει πολλαπλές λειτουργίες:

-Είναι από τα σημαντικότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά που παράγονται από τα κύτταρα, που συμμετέχουν άμεσα στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και

βοηθούν στη διατήρηση των εξωγενών αντιοξειδωτικών όπως οι βιταμίνες C και E σε ενεργό μορφή.

-Επίσης μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμο για τη ζωή.

-Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση του ενζύμου. Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το γαστρεντερικό σύστημα και οι πνεύμονες.

-Έχει σημασία για το μεταβολισμό του σιδήρου.

Η αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης μέσω των συμπληρωμάτων είναι δύσκολη. Η έρευνα δείχνει ότι η γλουταθειόνη που λαμβάνεται από το στόμα δεν απορροφάται καλά σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Σε μια μελέτη με χορήγηση από το στόμα μιας πολύ μεγάλης δόσης (3 γραμμάρια) γλουταθειόνης διαπιστώθηκε ότι "δεν είναι δυνατόν να αυξηθεί η κυκλοφορία της γλουταθειόνης σε κλινικά ευεργετικά βαθμό. Η καλσιτριόλη, ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D που συντίθεται στους νεφρούς, αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στον εγκέφαλο και φαίνεται να είναι ένας καταλύτης για την παραγωγή της γλουταθειόνης. Επιπλέον, στο πλάσμα και το ήπαρ η γλουταθειόνη μπορεί να αυξηθεί με ορισμένα συμπληρώματα που χρησιμεύουν ως πρόδρομες ουσίες της γλουταθειόνης όπως η N-ακετυλοκυστεΐνη, η S-adenosylmethionine(SAM) και η πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Το άλφα λιποϊκό οξύ έχει αποδειχθεί επίσης ότι βοηθά για να αποκατασταθεί η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη. Η μελατονίνη έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει ένα ένζυμο, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και το silymarin, το γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum*) έδειξε επίσης την ικανότητα να αναπληρώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης σε αρουραίους στο εργαστήριο. Η γλουταθειόνη είναι ένα αυστηρά ελεγχόμενο ενδοκυττάριο συστατικό και η σύνθεσή της ελέγχεται από επανατροφοδοτική αναστολή(feedback) του ενζύμου που την συνθέτει.(συνθετάση της γάμμα-γλουταμυλοκυστεΐνη) Η αύξηση της γλουταθειόνης με τις πρόδρομες ουσίες της σύνθεσης της γλουταθειόνης ή η ενδοφλέβια γλουταθειόνη είναι στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση της ανεπάρκειας γλουταθειόνης, το υψηλό οξειδωτικό στρες και την ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι καταστάσεις ανεπάρκειας γλουταθειόνης περιλαμβάνουν, το AIDS, την χημική και λοιμώδη ηπατίτιδα, την εγκεφαλομυελίτιδα, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, τον

καρκίνο του προστάτη και άλλες μορφές καρκίνου, τον καταρράκτη, τη νόσο Alzheimer, τη νόσο του Πάρκινσον, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το άσθμα, τη δηλητηρίαση από ακτινοβολία, την σωματική καταπόνηση και τη γήρανση, το διαβήτη τύπου II, την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας οφθαλμών. Χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης επίσης υπάρχουν σε αρνητικό ισοζύγιο αζώτου, όπως γίνεται στον καρκίνο, το AIDS, τη σήψη, το τραύμα, τα εγκαύματα, ακόμη και την υπερβολική αθλητική προπόνηση. Στη σχιζοφρένεια και τη διπολική διαταραχή που σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι ένας παράγοντας που εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της διπολικής διαταραχής (BD), τη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή και τη σχιζοφρένεια. Προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν τη γλουταθειόνη να μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη του καρκίνου. Ωστόσο, όταν ο καρκίνος έχει ήδη αναπτυχθεί, με την ανάπτυξη αντίστασης σε ένα αριθμό χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τα αυξημένα επίπεδα της γλουταθειόνης στα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα στο μυελό των οστών, του μαστού, του παχέος εντέρου, του λάρυγγα και του πνεύμονα. Γενικά, άτομα με υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης είναι πιο υγιή σε σχέση με αυτά που έχουν ανεπάρκεια γλουταθειόνης. Η μείωση της γλουταθειόνης είναι δυνατόν να ανευρεθεί με το αντιδραστήριο του Ellman. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία μετά την εφαρμογή της χρώσης σε ζωντανά κύτταρα. Μια άλλη προσέγγιση, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της γλουταθειόνης είναι η απεικόνιση με φθορίζουσα πρωτεΐνη.

Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών

Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Δρουν καρδιοπροστατευτικά: Αυξάνουν την ανθεκτικότητα των αγγείων, περιορίζουν τους φλεγμονώδεις παράγοντες, αποτρέπουν την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και συμβάλλουν στον έλεγχο των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης και της ομοκυστεΐνης.

Ασκούν αντικαρκινική δράση : Μπλοκάρουν ή εμποδίζουν την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιούν καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα κι επιβραδύνουν τους μηχανισμούς καρκινογένεσης.

Βελτιώνουν τις πνευματικές ικανότητες και την ψυχική διάθεση, προστατεύοντας τους νευροδιαβιβαστές από την οξείδωση και βελτιώνοντας την εγκεφαλική μικροκυκλοφορία.

Διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου.

Προστατεύουν οστά και αρθρώσεις, περιορίζοντας οιδήματα, φλεγμονές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις.

Βελτιώνουν τη λειτουργική κατάσταση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των ματιών και ενισχύουν την όραση.

Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών.

Διαφυλάσσουν τα αποθέματα άλλων απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στον οργανισμό, αποτρέπουν την καταστροφή τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενισχύουν τη δράση τους.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες :

1. Ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα π.χ. GSH γλουταθειόνη, καταλάση ή δισμουτάση του ανιόντος υπεροξειδίου (S.O.D.), αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PD)
2. Άλλες ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες π.χ. αλβουμίνη, ουρικό οξύ, χολερυθρίνη
3. Αντιοξειδωτικές βιταμίνες (π.χ. βιταμίνες E, C, καροτενοειδή)
4. Άλλα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται με την διατροφή π.χ. συνένζυμο Q10, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυστεΐνη, σελήνιο, ψευδάργυρος, φλαβονοειδή

Πηγές Αντιοξειδωτικών

Υπάρχουν πολλά τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, τα κυριότερα εκ των οποίων παραθέτονται παρακάτω:

Βιταμίνη Α-αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαια

Βιταμίνη C-Φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή, (πορτοκάλια, μανταρίνια), φραγκοστάφυλα, φράουλες, ακτινίδια, κεράσια, μούρα, πεπόνι, ντομάτα, λάχανο, πράσινη πιπεριά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, σπανάκι), σταυρανθή (μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών)

Β-καροτένιο -Φρούτα κυρίως εσπεριδοειδή, (πορτοκάλια, μανταρίνια), λαχανικά πράσινου, κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος, ντομάτες, και επίσης (σε μικρότερες ποσότητες) βερίκοκα, γλυκοπατάτες, καρπούζι, κολοκύθα

Βιταμίνη Ε-Φυτικά έλαια,(ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο), και κυρίως ελαιόλαδο, δημητριακά ανεπεξέργαστα, σόγια, αμύγδαλα, καρύδια, φουντούκια, λαχανικά σκούρα πράσινα, λαχανικά φυλλώδη, φύτρα σταριού, αυγά

Σελήνιο-Κρέας, συκώτι, θαλασσινά, αβοκάντο, ελιές, ξηροί καρποί, δημητριακά, σπόροι, φρούτα και λαχανικά που φυτρώνουν στο έδαφος

Φλαβονοειδή-Αρακάς, βατόμουρα, εσπεριδοειδή, κόκκινο κρασί, κουμ κουάτ, κρεμμύδια, μέλι, μήλα, μπρόκολο, πικρή σοκολάτα, σόγια, σταφύλια, τσάι πράσινο και μαύρο, φασολάκια πράσινα και επίσης στους ανθούς λαχανικών και λουλουδιών και στα φύκια

Ψευδάργυρος-Δημητριακά, συκώτι, όσπρια, θαλασσινά, σπόροι σιταριού, μαγιά μύρας, αυγά.

Ανθοκυανίνες- Γογγύλια, κάρδαμο, κεράσια, κουνουπίδι, κραμβολάχανο, λάχανο κατσαρό, μούρα, μπρόκολο, μύρτιλλα, σπαράγγια, σταφύλια, φράουλες

Ελλαγικό οξύ-Βατόμουρα, κεράσια, σταφύλια, φράουλες

Λυκοπένιο -Ντομάτες (φρέσκες, λιαστές και επεξεργασμένα προϊόντα ντομάτας) και επίσης (λιγότερο) γκρέιπφρουτ, καρπούζι και πιπεριές

Φαινόλες-Ελαιόλαδο, ελιές, εσπεριδοειδή, κακάο, κρασί, λιναρόσπορος, μπρόκολο, σκόρδο, σοκολάτα πικρή, τσάι πράσινο.

ΣυνένζυμοQ10-Σαρδέλα,σκουμπρί,σόγια

Πυκνογενόλη-φρούτα ,λαχανικά, ξηροί καρποί, κακάο, τσάι, και κρασί.



Εικόνα 1.5/Τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες

1.4

ΑΜΠΕΛΟΣ (VITIS VINIFERA)



Εικόνα 1.6/Vitis vinifera

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera*) έχουν αναφερθεί για την θεραπευτική και θρεπτική αξία τους εδώ και χιλιάδες χρόνια τόσο από τους Αιγύπτιους όσο και από τους Έλληνες. Τόσο οι Αιγύπτιοι όσο και οι Έλληνες στην αρχαιότητα εγκωμιάζαν την θεραπευτική δράση των σταφυλιών και ιδιαίτερα τον χυμό των σταφυλιών που – συνήθως καταναλώνονταν υπό μορφή «οίνου». Παραδοσιακοί θεραπευτές στην Ευρώπη χρησιμοποιούσαν τους χυμούς των αμπελιών για να θεραπεύσουν ασθένειες του δέρματος και των ματιών. Τα φύλλα των σταφυλιών έχουν χρησιμοποιηθεί για να σταματήσουν την αιμορραγία, τις φλεγμονές, και τους πόνους των αιμορροΐδων. Τα νωπά σταφύλια χρησιμοποιήθηκαν για να ανακουφίσουν τους πονόλαιμους, ενώ τα αποξηραμένα ξηρά σταφύλια ή οι σταφίδες χρησιμοποιήθηκαν για τη δυσκοιλιότητα και τη δίψα. Τα σταφύλια ως ώριμα φρούτα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά προβλημάτων υγείας συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασιών, της χολέρας, της ευλογιάς, της ναυτίας, των μολύνσεων των ματιών, του δέρματος, του νεφρού, και των ασθενειών του ήπατος.

Το εκχύλισμα σπόρου σταφυλιών περιέχει μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων ουσιών όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν το 8 με 9% του εκχυλίσματος των σπόρων και αυτό εξαρτάται από την ποικιλία. Οι πολυφαινόλες στους σπόρους των σταφυλιών βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή των βιοφλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή αυτά συμπεριλαμβάνουν παράγωγα των φλαβονοτριολών όπως, το γαλλικό οξύ, την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την γαλλοκατεχίνη, την επιγαλοκατεχίνη, την προκυανιδίνη, την πολυμερισμένη, προακυανιδίνη και τις προανθοκυανιδίνες (Spyrou Argiri, 2010). Οι προανθοκυανιδίνες αναφέρονται ως ολιγομερείς (μονομερείς, διμερείς, τριμερείς κλπ) προανθοκυανιδίνες και με διεθνή συντομογραφία OPCs. Οι OPCs έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική

ικανότητα από τις βιταμίνες E έως 50 φορές και έως 20 φορές από την βιταμίνη C. Τα κυριότερα μυστικά βιοενεργά συστατικά του σταφυλιού είναι οι προανθοκυανιδίνες και η ρεσβερατρόλη.



Εικόνα 1.7/κόκκινο κρασί,πλούσιο σε πολυφαινόλες(Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006).

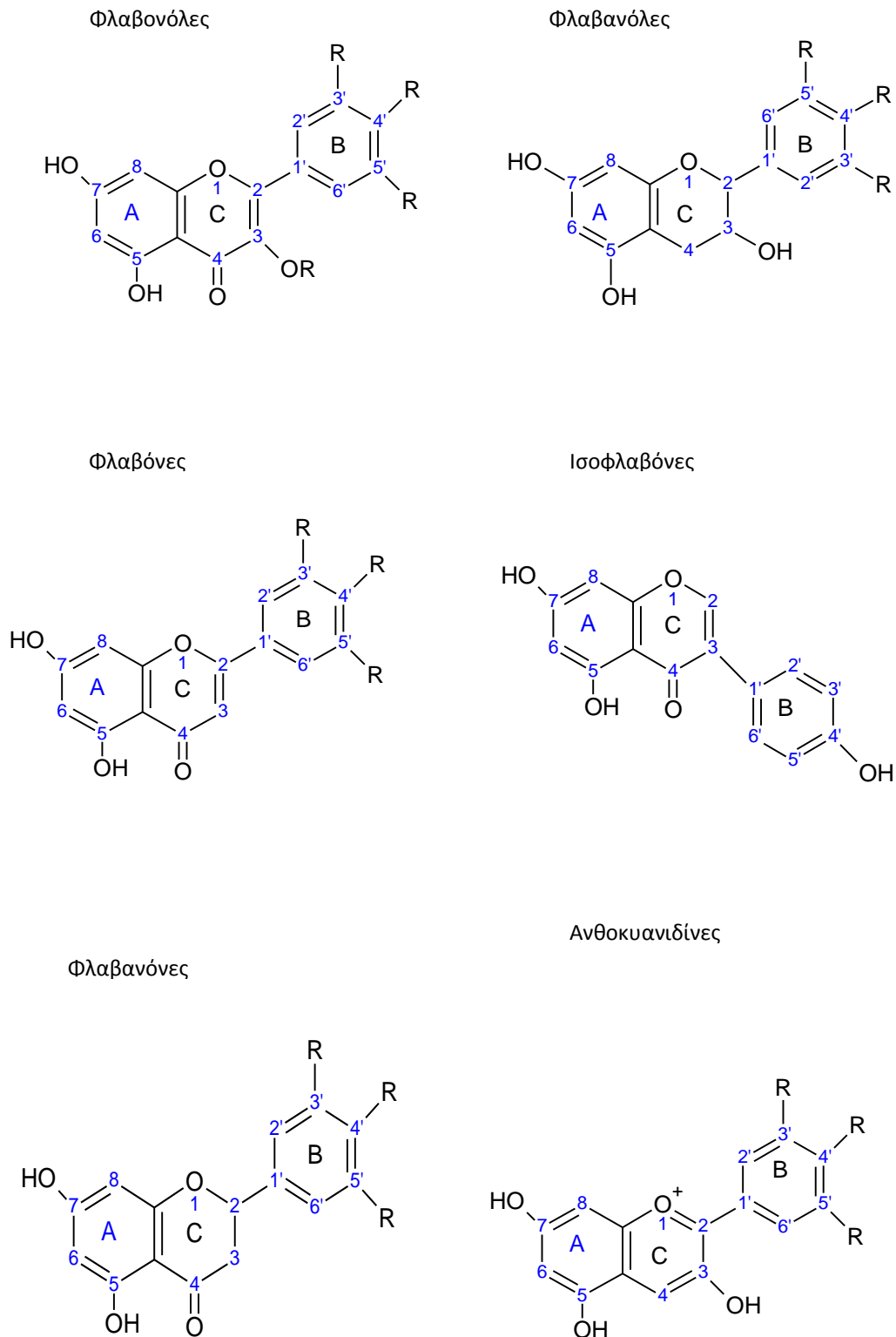
Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός ερευνών σχετίζεται με την ταυτοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων σε τρόφιμα και ποικίλα φυτικά παράγωγα (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006). Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών, είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006). Ιδιαίτερα οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες καθώς αποτελούν από τις κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων.

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι

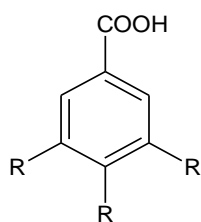
συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα *φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες.*

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις *φλαβονόλες* (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις *φλαβόνες* (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις *ισοφλαβόνες* (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις *φλαβανόνες* (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις *ανθοκυανιδίνες* (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις *φλαβανόλες* (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). Τα φλαβονοειδή μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Σημαντική κατηγορία πολυμερών είναι οι προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες που προκύπτουν από πολυμερισμό των φλαβονολών με τους γαλλικούς εστέρες τους με δεσμούς μεταξύ του C4 και του C6 ή C8. Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cook και Samman 1996). Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004). Οι φλαβόνες βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi και Nacz 1995). Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan και Clifford 2000). Τα ισοφλαβονοειδή βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια, με τη σόγια και τα προϊόντα της να είναι οι κυριότερες πηγές. Χαρακτηριστικό των ισοφλαβονοειδών είναι ότι αν και δεν είναι στεροειδή, η δομή τους παρουσιάζει ομοιότητες με των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδέονται με υποδοχείς οιστρογόνων και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα (Cassidy et al., 2000). Οι φλαβανόλες, είτε ως μονομερή (κατεχίνες) είτε ως πολυμερή (προκυανιδίνες), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερύκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (π.χ.

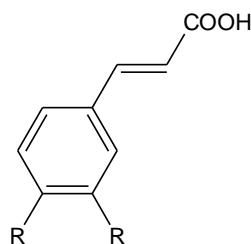
στο λάχανο, στα φασόλια, στη μελιτζάνα) αλλά είναι περισσότερο άφθονα στα φρούτα (Clifford 2000).



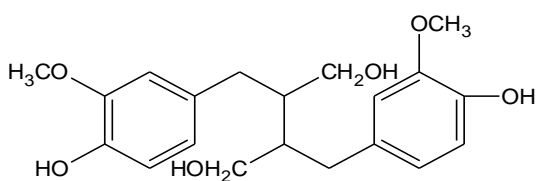
Εικόνα 1.8/ Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.



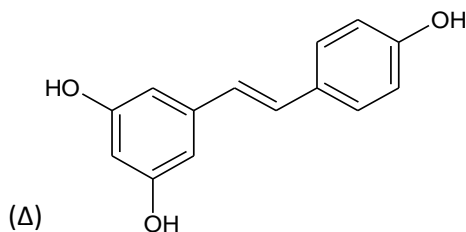
(A)



(B)



(Γ)












(Δ)

Εικόνα 1.9/ Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (A) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (B) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολαρισρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

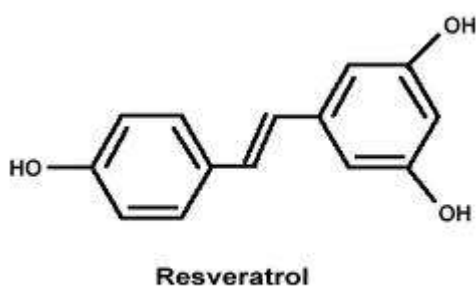
Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού

και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur et al., 1997). Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

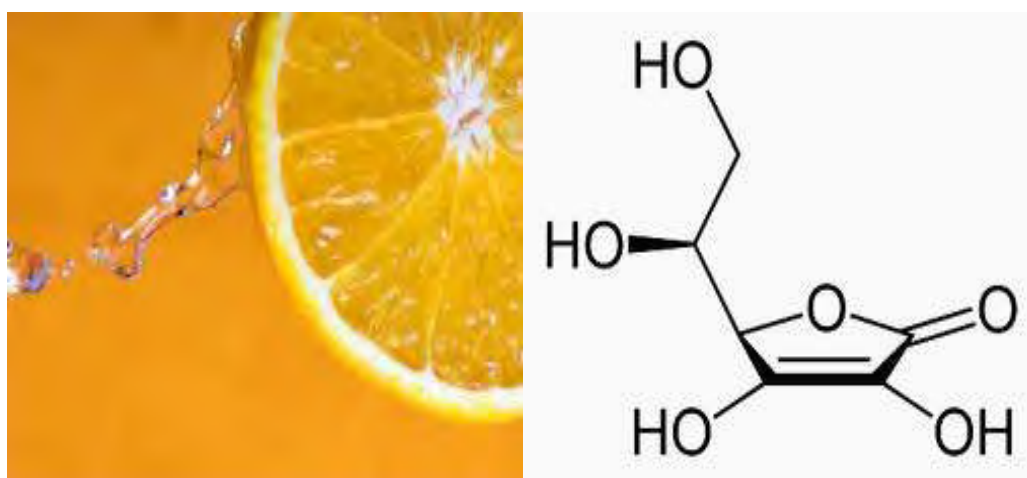
| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|  | p-Coumaric acid |
|  | Caffeic acid |
|  | Ferulic acid |
|  | Sinapic acid |
|  | Benzoic acid |
|  | p-Hydroxybenzoic acid |
|  | Protocatechuic acid |
|  | Vanillic acid |
|  | Gallic acid |

Εικόνα 1.10/Τα κυριότερα πολυφαινολικά οξέα

Τα στυλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997). Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ άλλα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητές τους (Adlercreutz και Mazur 1997).



Εικόνα 1.11/χημική δομή της ρεσβερατρόλης

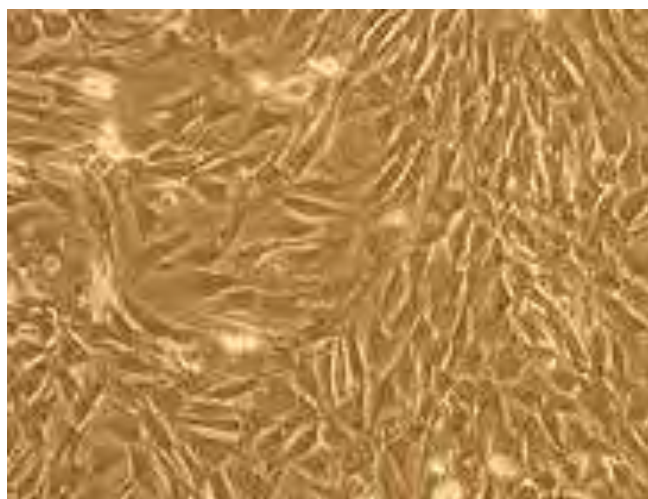


Εικόνα 1.12/πορτοκάλι και ασκορβικό οξύ-χημικός τύπος

1.5

ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12

Τα μυικά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και SaxeI μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ επιμύων 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 (Yaffe και SaxeI, 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 1.13/C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2.1

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της επίδρασης στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών κύτταρων επιμύου, ενός εκχυλίσματος από μια ελληνική ποικιλία σταφυλιού (Μπατίκι Τυρνάβου). Χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορίσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες για να εξετάσουμε εάν υπάρχει μια αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος αυτού και αν υφίσταται, σε ποια τιμή συγκεντρώσεως του εκχυλίσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΥΛΙΚΑ

Χρησιμοποιήθηκαν :

- Φυγόκεντρος
- Απεσταγμένο νερό
- Κύτταρα C2C12
- Αιθανόλη για αποστείρωση των συνθηκών
- Πιπέτες εργαστηρίου
- Γάντια
- Μικροσκόπιο
- Πλάκα Neubauer για την καταμέτρηση των κυττάρων

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων παραθέτονται παρακάτω και είναι τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)
- Τρυψίνη
- PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)

Ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας, παρασκευάζουμε διαλύματα με ή χωρίς FBS. Μάλιστα στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιέχει FBS, τότε η περιεκτικότητα αυτού ανέρχεται στο 10%. Το θρεπτικό μέσο με 10% FBS, χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, το θρεπτικό χωρίς FBS χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος όπου τοποθετούμε το εκχύλισμα στα κύτταρα. Αναλυτικότερα λοιπόν, οι αναλυτικές συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

| Θρεπτικό μέσο με 10% FBS | Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 20 mL FBS | |
| 2 mL anti-anti | 2 mL anti-anti |
| 2 mL glutamine | 2 mL glutamine |
| 200ml DMEM41966 | 200ml DMEM41966 |

Για την μέτρηση της GSH με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιούμε τα εξής αντιδραστήρια:

- Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- FACS Clean (Becton-Dickinson)
- FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- Απεσταγμένο νερό

Εκτός από την χρωστική, τα υπόλοιπα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία της κυτταρομέτρησης αλλά και τον καθαρισμό του οργάνου. Στην συνέχεια, για την μέθοδο XTT σε υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος, τα υλικά που χρειάστηκαν είναι τα εξής:

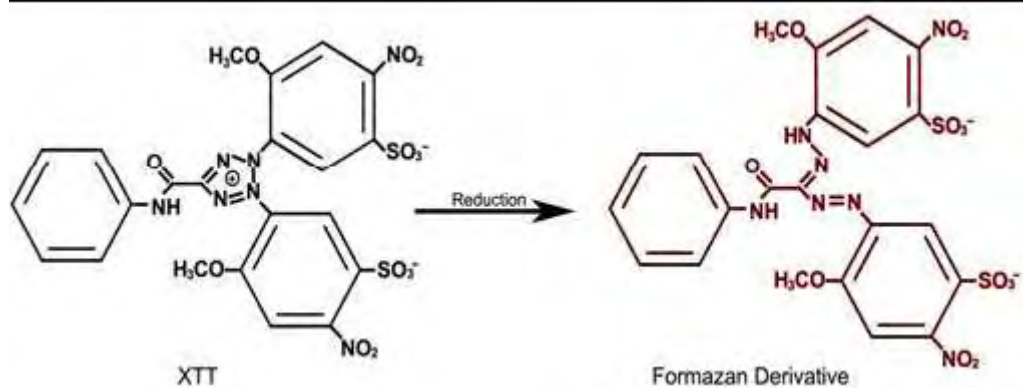
- FBS 10%
- Trypsin
- Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS
- XTT –reagent
- Πλάκα Neubauer
- φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek)
- λογισμικό Gen5 (Biotek).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Μέθοδοι

➤ XTT (Αρχή της Μεθόδου)

Πρόκειται για μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη, ως εκ τούτου, αυτή η μετατροπή εμφανίζεται μόνο σε βιώσιμα κύτταρα. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση. Η χρωστική ουσία φορμαζάνη που σχηματίζεται λόγω της υδατοδιαλυτότητάς της ποσοτικοποιείται άμεσα με την χρήση ELISA reader. Αυτό εξασφαλίζει ένα υψηλό επίπεδο ευαισθησίας δίνοντας τη δυνατότητα μηχανογραφικής επεξεργασίας των δεδομένων και, ως εκ τούτου, επιτρέπει τον ταχύ και εύκολο χειρισμό ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση σχηματισμού του πορτοκαλί formazan παραγώγου:



Πειραματικό πρωτόκολλο

Μετά την αποκόλληση των C2C12 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂ προκειμένου να

προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχύλισματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. (Το μείγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν μόνο κύτταρα και το XTT/reagent, καθώς και δείγματα μάρτυρες που περιέχουν τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των ουσιών επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 490 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

➤ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (Αρχή της μεθόδου)

Η Κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να περιλαμβάνεται και η ταξινόμηση των συστατικών βάσει φυσικών παραμέτρων. Μία δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις

είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Πραγματοποιούμε τρυψινοποίηση στα κύτταρα μας και έπειτα τα τοποθετούμε σε ένα σωλήνα falcon. Φυγοκεντρούμε (για 10min, στους 5 και 300g). Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε PBS και χωρίζουμε σε σωληνάκια τα κύτταρα μας και για άλλη μια φορά φυγοκεντρούμε με τις ίδιες ρυθμίσεις. Στη συνέχεια, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 150μl PBS και 15 μl χρωστικής ανάλογα με τον τύπο προσδιορισμού μας. Αναδεύουμε και επωάζουμε στον κλίβανο για μισή ώρα ακριβώς. Ξεπλένουμε με 250μl PBS και φυγοκεντρούμε. Τέλος, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 250μl PBS και προχωρούμε στην ανάλυση με το κυτταρόμετρο.

Σημείωση: Η χρωστική που χρησιμοποιείται για την γλουταθειόνη ονομάζεται orange mercury (Hg) και διαλύεται σε ακετόνη, η οποία τον μετατρέπει σε πιο τοξική μορφή για αυτό και χρειάζεται προσοχή στην επαφή με το διάλυμα .Επίσης, να αναφερθεί ότι η χρωστική εκπέμπει στο FL-2.

➤ T-BARS

(ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΑΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΩΡΗΜΑ)

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα συλλέγονται, γίνεται διάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε PBS 0,01M και ακολουθεί μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης. Τα αντιδραστήρια προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 400 μL κυτταρικού αιωρήματος (80-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ πρωτεΐνη) για τα δείγματα ή 400 μl απεσταγμένο νερό, για το τυφλό.
2. Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 100 μL Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ για 45 min στο υδατόλουτρο.
5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 mL σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε σε 10.000 rpm στους 25 $^\circ\text{C}$ για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Προσθήκη αντιδραστηρίων:

| 3x | Blank | Δείγμα |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| PBS (0,01M) | 400 μl | - |
| Αιώρημα | - | 400 μl |
| TCA 35% | 500 μl | 500 μl |
| TrisHCl | 100 μl | 100 μl |
| Na_2SO_4 + TBA | 1000 μl | 1000 μl |
| TCA 70% | 1000 μl | 1000 μl |
| Ντελ | 3ml | 3ml |

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol}/\text{L}$) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0.156 \times 7.5$, όπου το 7.5 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3000 μL) με τον όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (400 μL) (3000 / 400 = 7.5). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το $\mu\text{mol}/\text{L}$. Μετά τον υπολογισμό των $\mu\text{mol}/\text{L}$ MDA στα δείγματα, τα αποτελέσματα ανάγονται σε $\text{nmol MDA}/\text{mg}$ πρωτεΐνης στα αντίστοιχα δείγματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

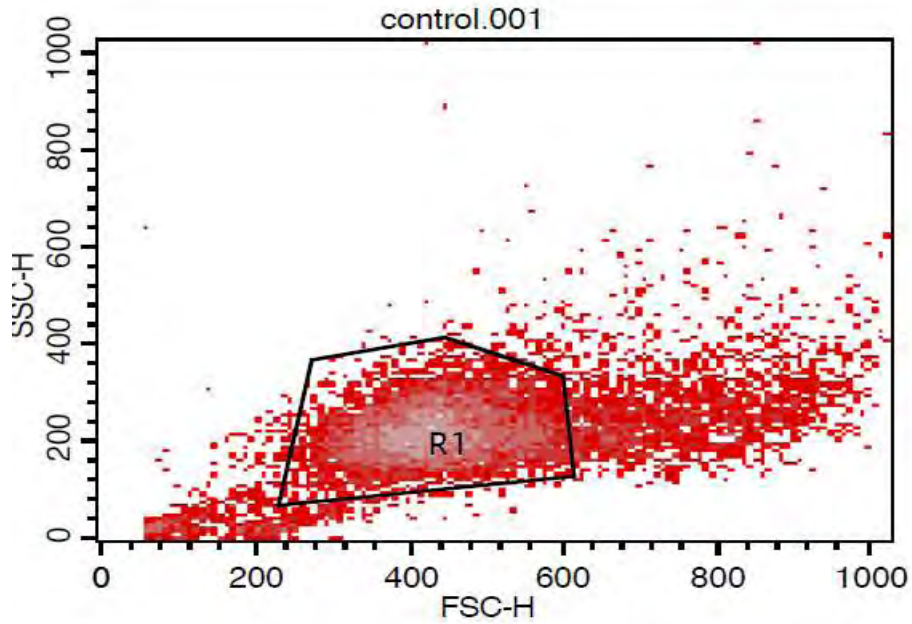
Αποτελέσματα

Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πείραμα δημιουργήθηκαν γραφήματα με συγκεκριμένες παραμέτρους τα οποία και αναλύθηκαν για να μας δώσουν τα συμπεράσματα του πειράματος. Οι μετρήσεις μας πραγματοποιήθηκαν βάσει σχεδιασμού του πειράματος τρεις φορές μετά από επώαση των κυττάρων με το εκχυλίσμα για 24 ώρες, ώστε να έχουμε την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας και την ορθότητα των συμπερασμάτων.

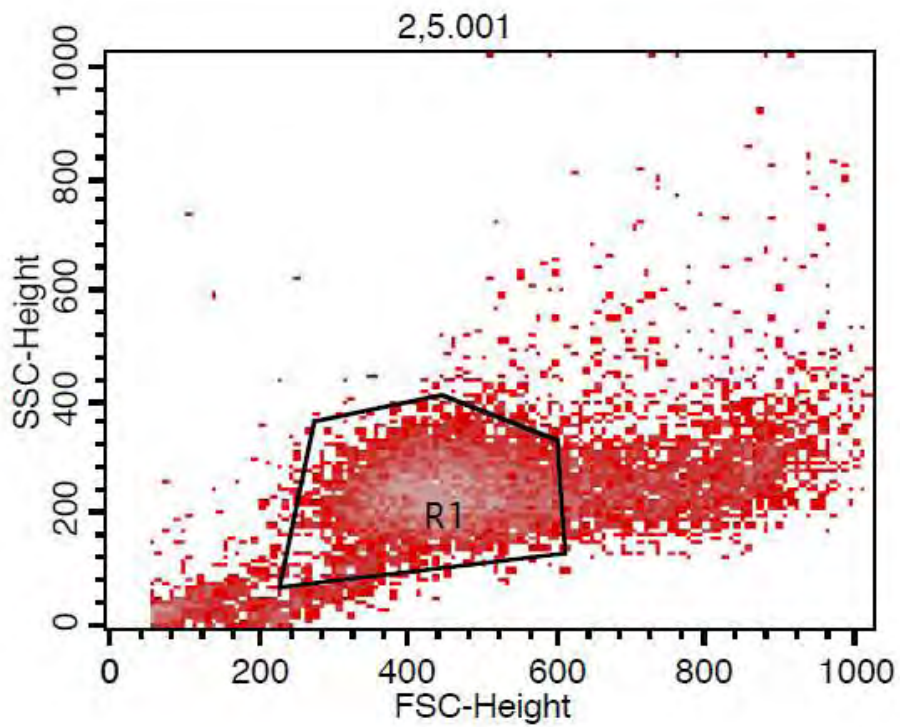
Η διαδικασία της κυτταρομετρίας πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές. Μετά την διεξαγωγή των εργαστηριακών πειραμάτων, συγκεντρώνονται τα δεδομένα μας σε δυο είδη γραφημάτων. Ο μηδενισμός του αυτοφθορισμού των κυττάρων ως προς τους δείκτες που χρησιμοποιήσαμε κρίθηκε απαραίτητος, όπως και έγινε. Για αυτόν τον λόγο γίνεται χρήση των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί χρώση (unstained). Επιπλέον, τα unstained κύτταρα (κυτταρικό διάλυμα χωρίς χορήγηση χρωστικής) χρησιμοποιούνται και για την επιλογή του πληθυσμού που θα μελετηθεί. Ο πληθυσμός που δίνει την μεγαλύτερη πυκνότητα στο γράφημα είναι αυτός που επιλέγεται και έχει ίδιες ιδιότητες ως προς το μέγεθος και την κοκκίωση. Έτσι λοιπόν δημιουργείται ένα όριο, που αποδέχεται αποκλειστικά τις επιλεγμένες συντεταγμένες, οι οποίες θέτουν και τον πληθυσμό που θα μελετήσουμε από τα κύτταρα που υπέστησαν την χρώση. Έτσι έχουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του εκχυλίσματος στα κυτταρικά μας διαλύματα. Το πρώτο διάγραμμα αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα δεδομένα που καταγράφονται, κατανέμονται ανάλογα με το FSC και το SSC. Το δεύτερο διάγραμμα, αφορά το πλήθος των δεδομένων που δίνουν συγκεκριμένο ποσό οπτικής πυκνότητας ως προς την χρωστική orange mercury, η οποία αλληλεπιδρά με την GSH. Παρατηρείται ότι η GSH αυξήθηκε στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10μg/ml κατά 151%, 120% και 168% αντίστοιχα σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου.(γράφημα 1). Επιπλέον, παρατηρούμε μείωση των επιπέδων των TBARS στις συγκεντρώσεις κατά 32% ,39% και 50%.(γράφημα 3).

Πείραμα 1^ο

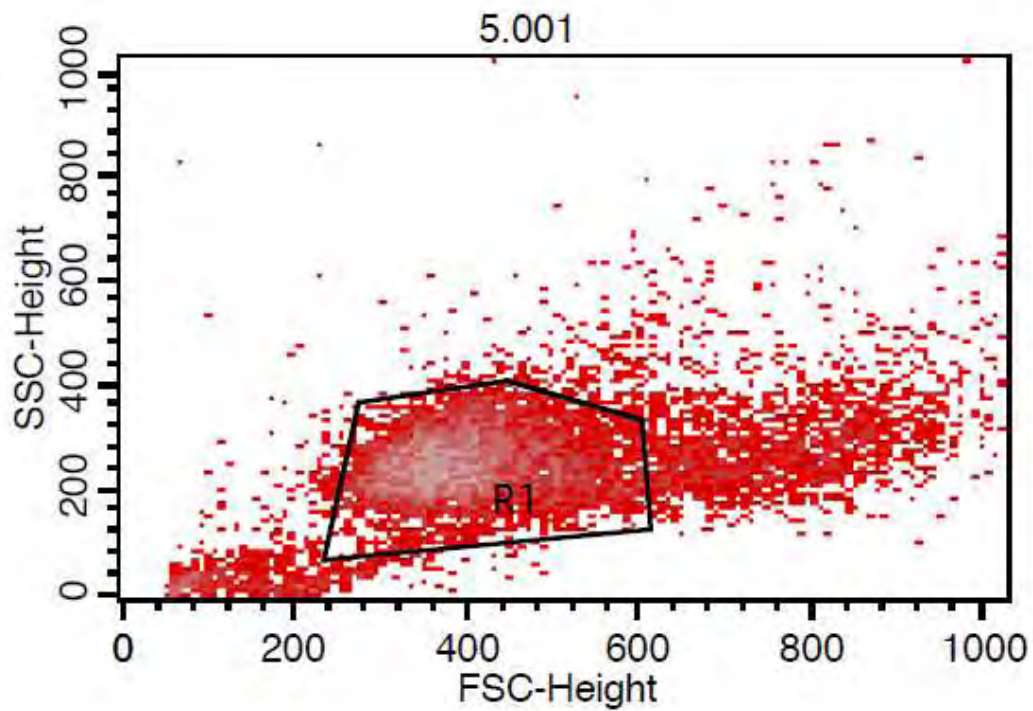
Κύτταρα χωρίς την επίδραση εκχυλίσματος



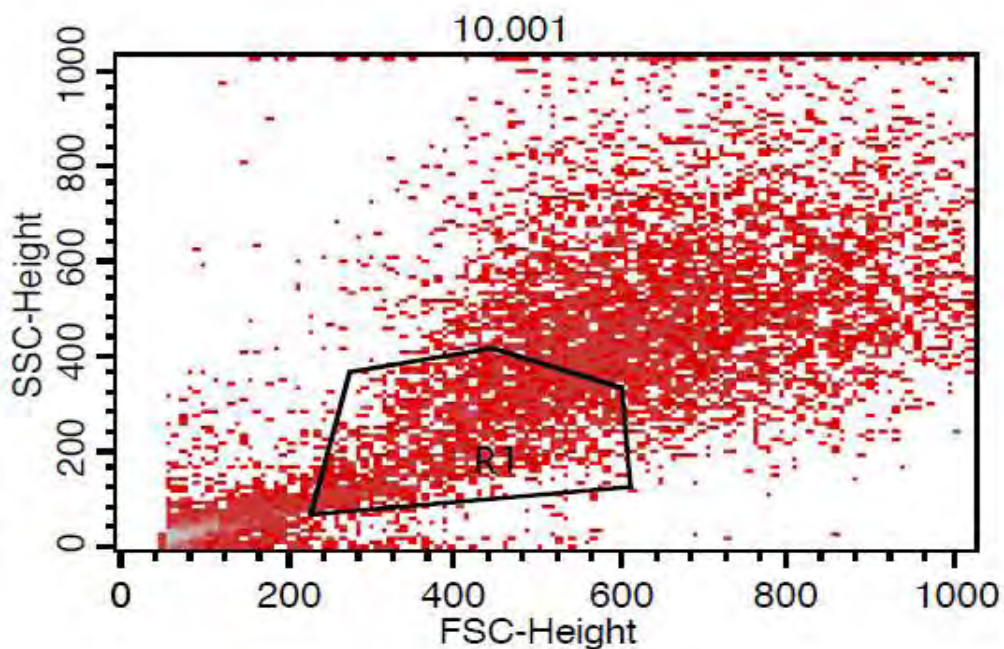
Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



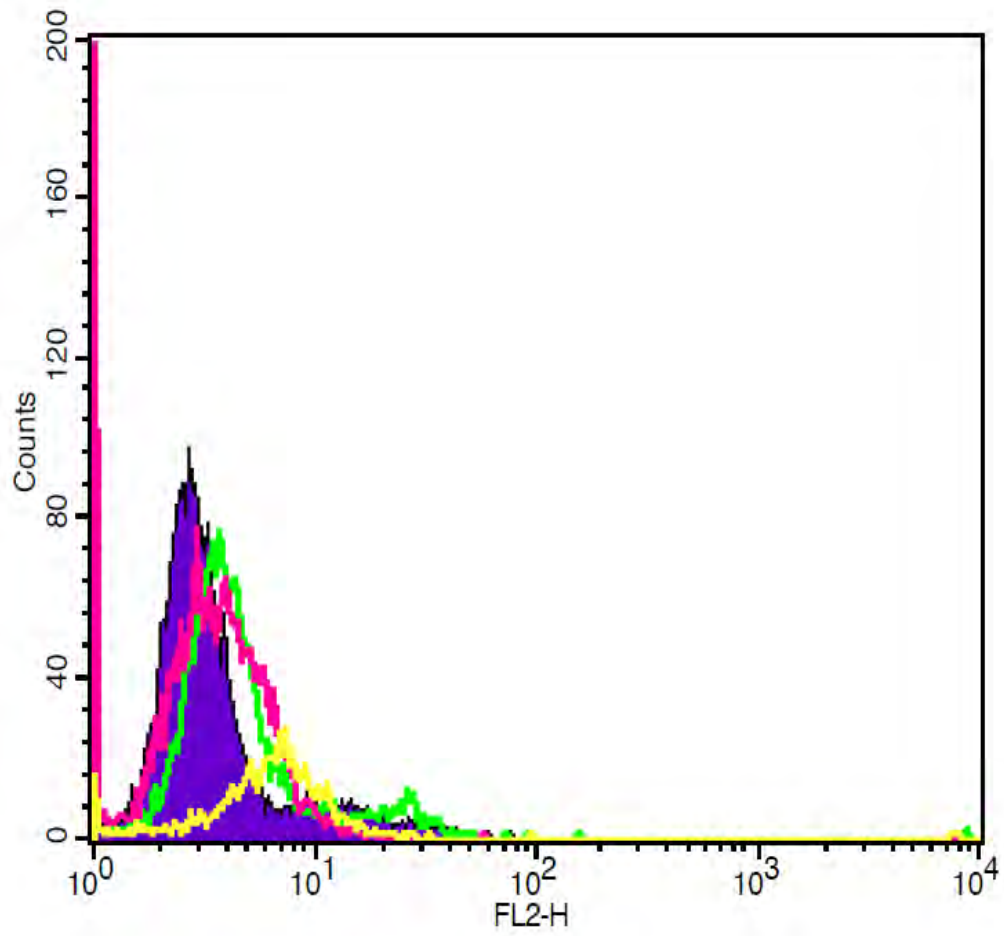
Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Έπειτα, παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό γράφημα με την κατανομή των δεδομένων, ως προς την οπτική απορρόφηση της χρωστικής Orange mercury, υποδεικνύοντας τα επίπεδα της GSH

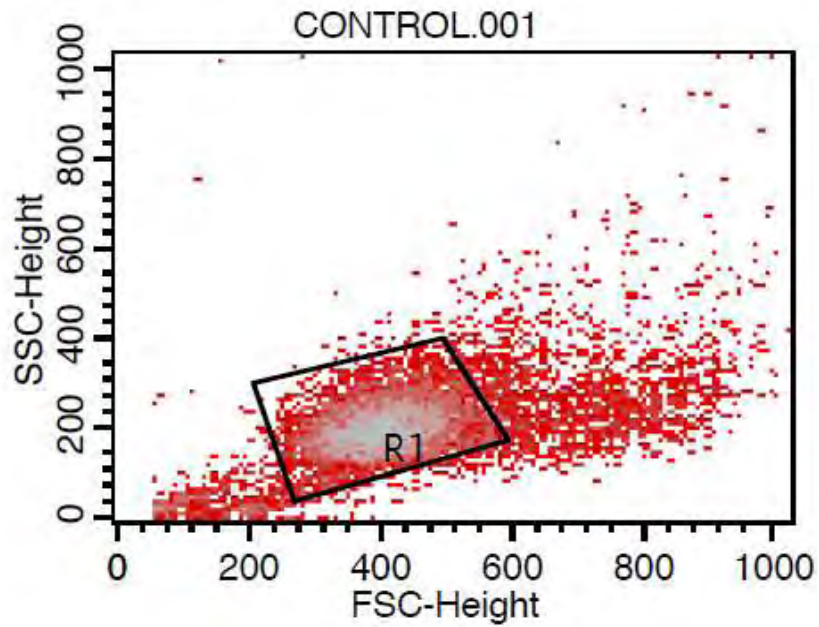


- Μπλε γραμμή: μάρτυρας
- Πράσινη γραμμή: 2,5 µg/mL
- Κόκκινη γραμμή: 5 µg/mL
- Κίτρινη γραμμή: 10 µg/mL

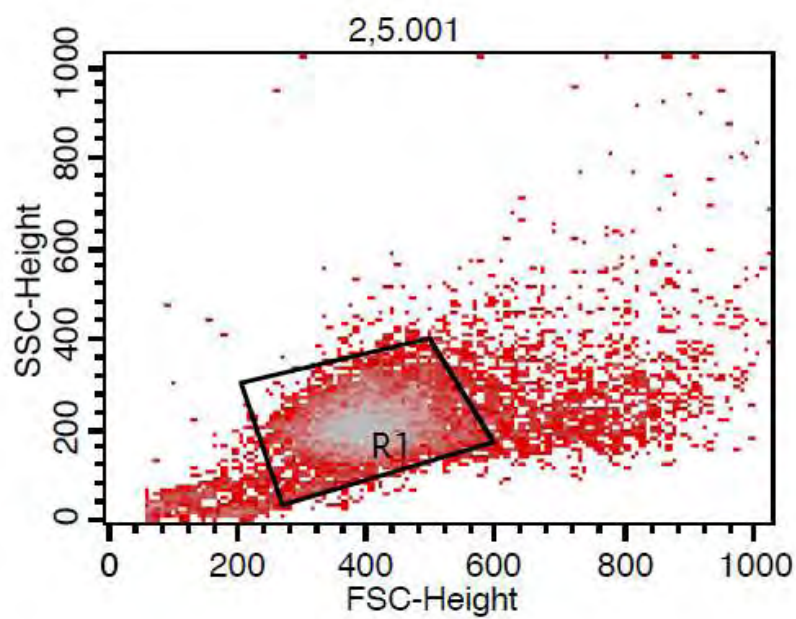
Πείραμα 2ο

Αρχικά, όπως και στο πρώτο πείραμα, θα παρουσιαστεί το γράφημα FSC-SSC για κάθε κατηγορία:

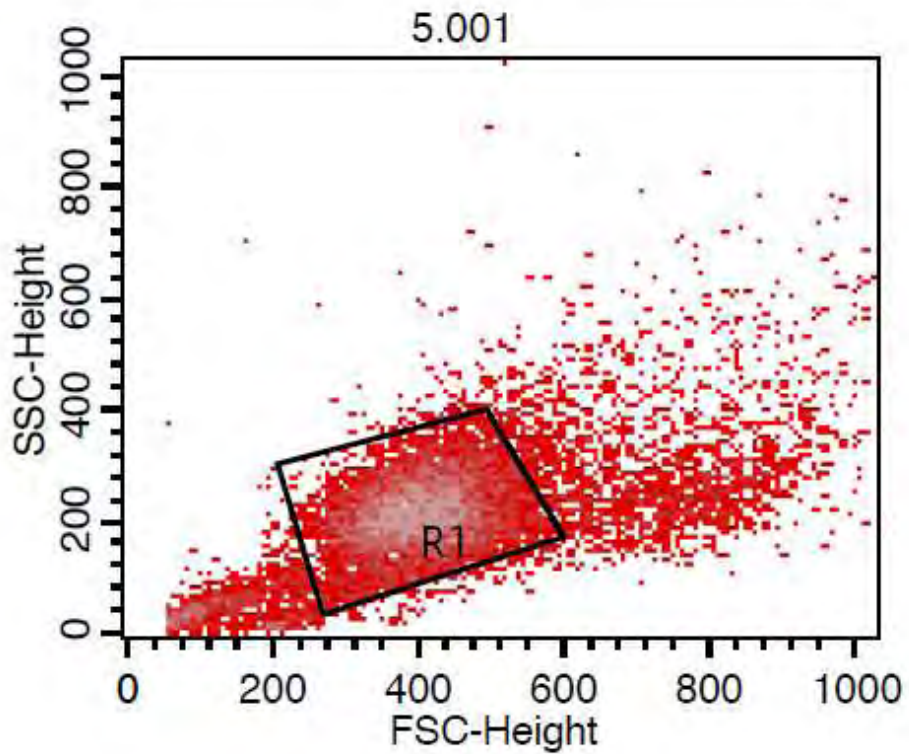
Κύτταρα χωρίς την επίδραση εκχυλίσματος



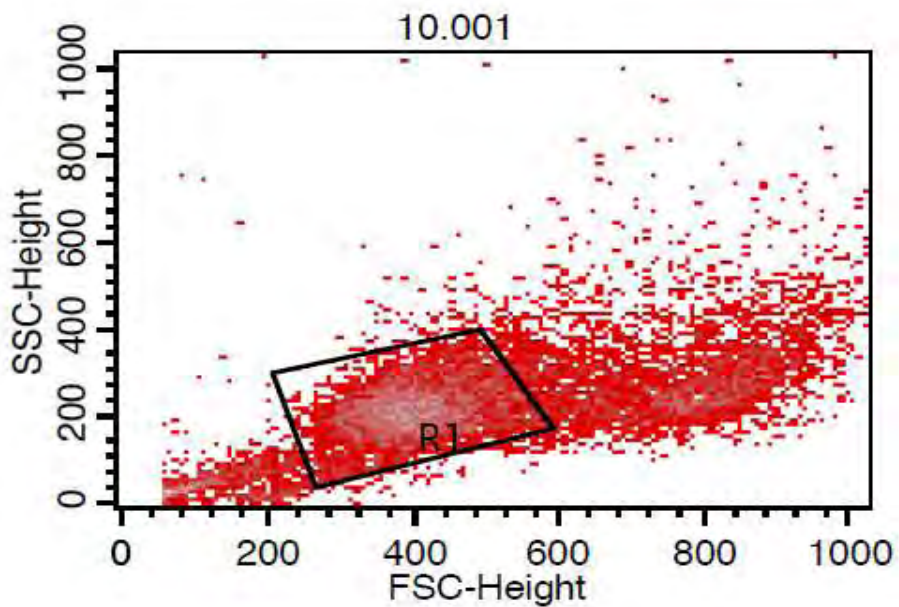
Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5μg/mL



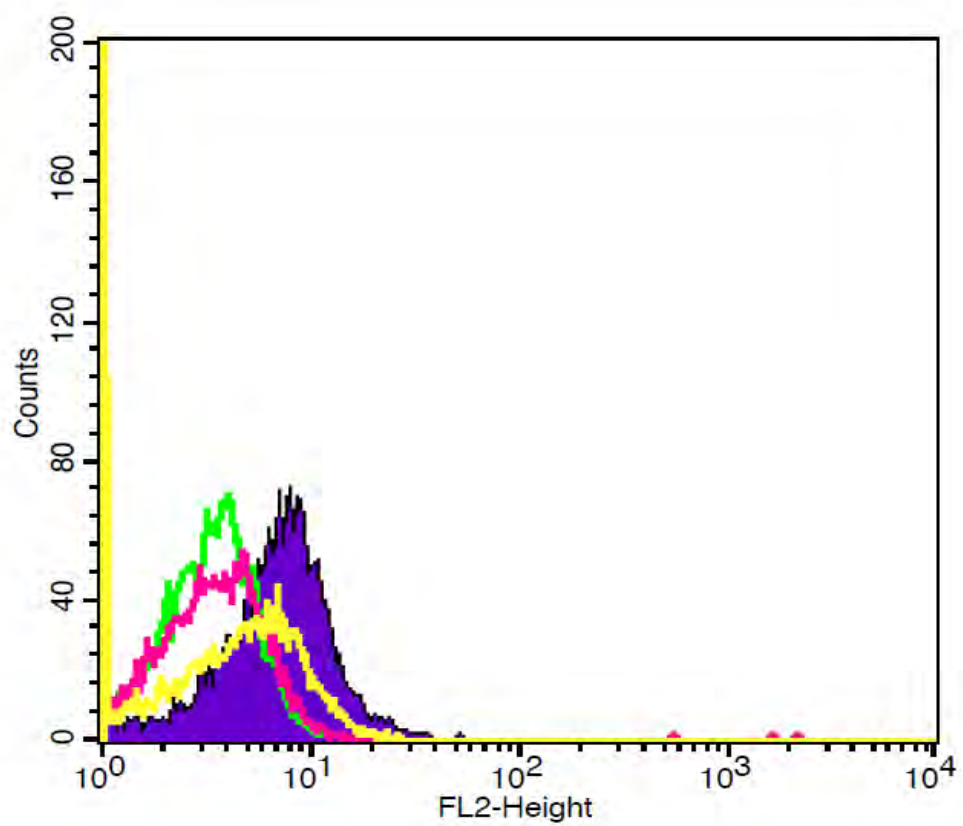
Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g/mL}$



Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$



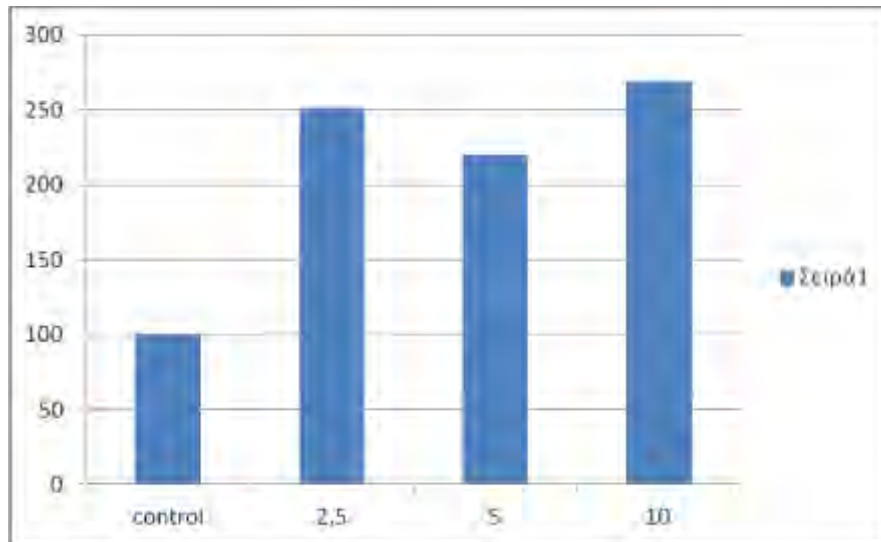
Έπειτα, παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό γράφημα με την κατανομή των δεδομένων, ως προς την οπτική απορρόφηση της χρωστικής Orange mercury, υποδεικνύοντας τα επίπεδα της GSH.



- Μπλε γραμμή: μάρτυρας
- Πράσινη γραμμή: 2,5 µg/mL
- Κόκκινη γραμμή: 5 µg/mL
- Κίτρινη γραμμή: 10 µg/ml

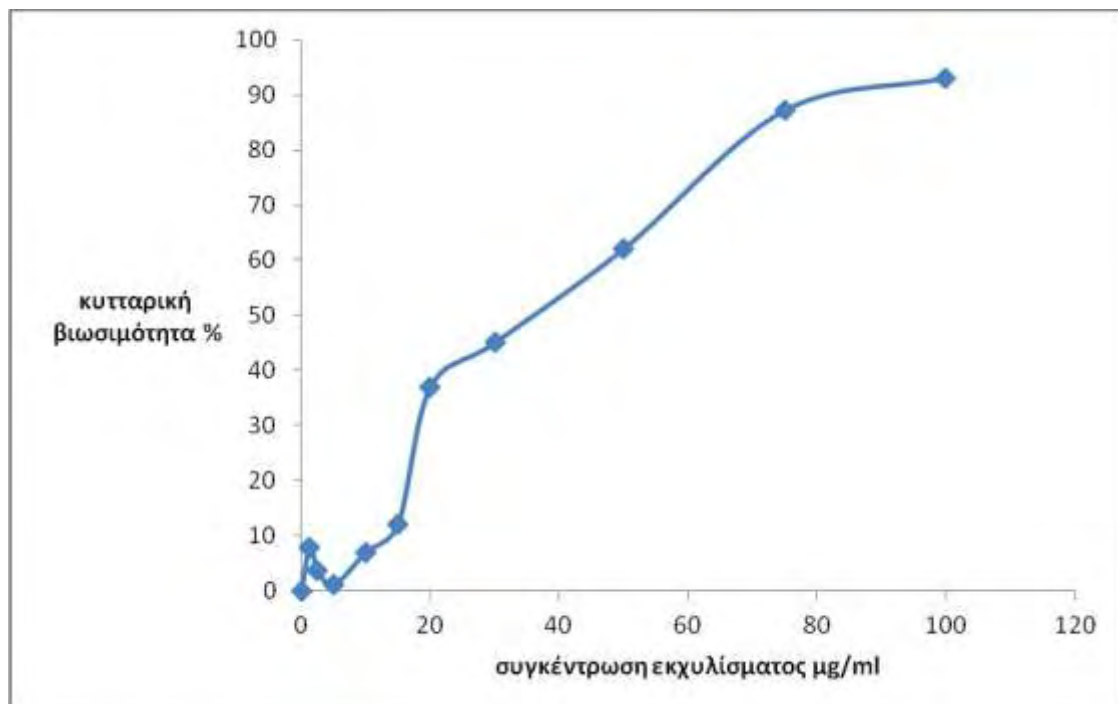
Άξονας y: το ποσοστό μέσου όρου των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης

Άξονας x: οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και ο μάρτυρας

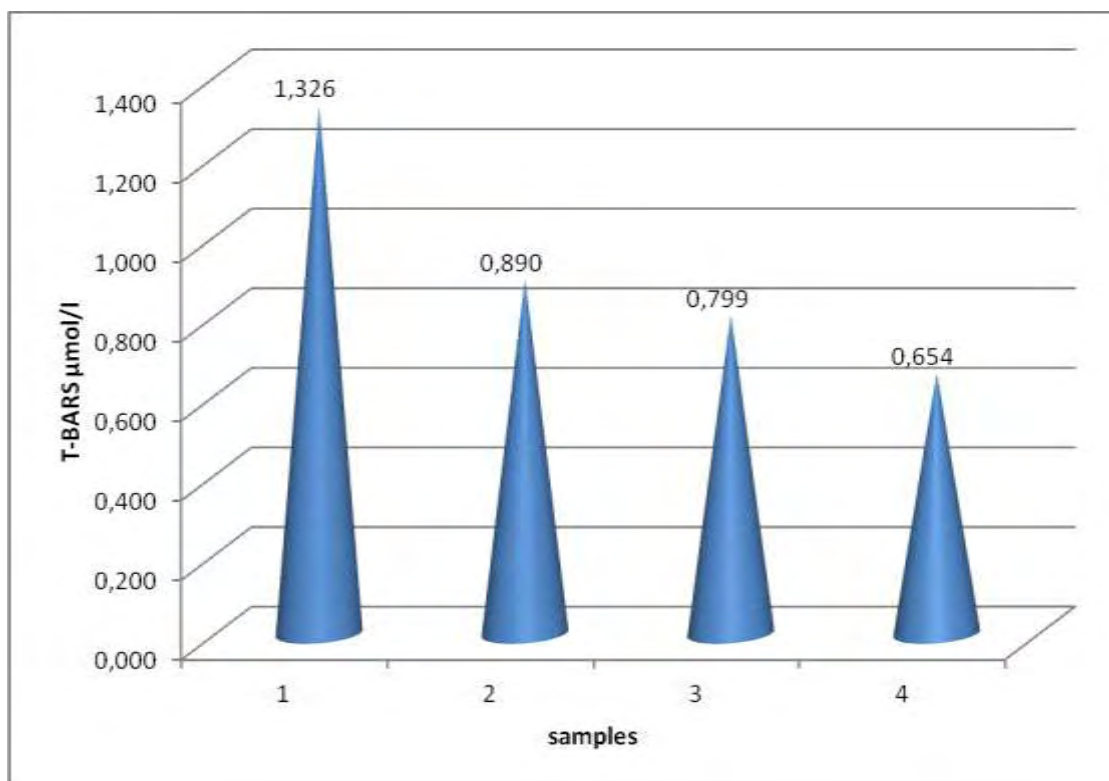


(Γράφημα 1)

Η ανάλυση της κυτταρικής βιωσιμότητας με XTT ως προς της διάφορες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που δοκιμάστηκαν



Αποτελέσματα T-BARS σε μάρτυρα και συγκεντρώσεις 2,5-5-10 $\mu\text{g/ml}$ κατά σειρά στο γράφημα



(Γράφημα 3)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη το αρχικό ερώτημα προς απάντηση ήταν η ύπαρξη ή όχι αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλίσματος σταφυλιού από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου σε μυικά κύτταρα C2C12 επιμούου. Αρχικά, έγινε ο προσδιορισμός της κρίσιμης συγκέντρωσης στην οποία το εκχύλισμα εμφανίζει κυτταροτοξική δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των $20\mu\text{g/ml}$ εμφανίζεται κυτταροτοξική δράση, οπότε και επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 2,5 , 5 και 10 ($\mu\text{g/ml}$).

Στη συνέχεια, μετά από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες προσδιορίστηκαν ορισμένοι δείκτες οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν η

γλουταθειόνη (GSH) με κυτταρομετρία ροής και τα TBARS, που είναι δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης με φασματοφωτομετρία. Οι μετρήσεις με την κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι στις συγκεντρώσεις των 2,5 , 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$, τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξήθηκαν κατά 151%, 120% και 168% αντίστοιχα σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Σε αυτό συμβάλλει και το γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή της. Τα μυϊκά κύτταρα διαθέτουν πολλούς περίπλοκους μηχανισμούς ενάντια στα ROS, έτσι ώστε να αποφύγουν τον κίνδυνο του τραυματισμού τους. Υπό συνθήκες άσκησης αυξάνεται ο κίνδυνος οξειδωτικού τραυματισμού των μυϊκών κυττάρων το οποίο επιβεβαιώνεται από πολλές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά την γλουταθειόνη και τα μυϊκά κύτταρα, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ποικίλει ανάλογα με το είδος της μυϊκής ίνας καθώς και το είδος του οργανισμού. Για παράδειγμα, μυϊκές ίνες τύπου 1 περιέχουν 600% υψηλότερο ποσοστό γλουταθειόνης σε σχέση με μυϊκές ίνες τύπου 2 (Scott ,Lennon 1999)

Εφόσον γνωρίζουμε ότι η γλουταθειόνη είναι από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια στον οργανισμό, συμπεραίνουμε ότι το εκχύλισμα αυξάνει πιθανώς την αντιοξειδωτική ικανότητα των μυϊκών κυττάρων. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται και από την επίδραση που είχε το εκχύλισμα στη συγκέντρωση των TBARS. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα στις συγκεντρώσεις των 2,5 , 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ μείωσε κατά 32% ,39% και 50% αντίστοιχα τα επίπεδα των TBARS, τα οποία είναι δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων. Τα λιπίδια υπεροξειδώνονται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Συνεπώς, η μείωση του επιπέδου της λιπιδιακής υπεροξειδωσης αποτελεί άλλον έναν παράγοντα που επιβεβαιώνει το συμπέρασμά μας για την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων.

Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι ολοκληρωμένο συμπέρασμα λήφθηκε με τον έλεγχο συμπεριφοράς των ROS στο κυτταρικό μας διάλυμα, καθώς η σχέση τους με την γλουταθειόνη είναι άμεσα εμπλεκόμενη με την έννοια της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας. Μειωμένα επίπεδα ROS αντανακλούν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος σταφυλιού στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα αποτελέσματα μιας άλλης εργασίας που έγινε στο εργαστήριο Φυσιολογίας

Ζωϊκών οργανισμών έδειξαν ότι το εκχύλισμα μείωσε τα επίπεδα των ROS (Δεμερτζής, 2012). Η συγκεκριμένη μέτρηση έγινε με κυτταρομετρία ροής και πραγματοποιήθηκε με τις ίδιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος.

Επίσης, στην ίδια εργασία (Δεμερτζής, 2012), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) μειώθηκε και στις τρεις συγκεντρώσεις σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Η μείωση ήταν 32,52%, 35,48%, και 33,33% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των 2,5, 5 και 10μg/ml. Παρατηρούμε λοιπόν και σε αυτήν την περίπτωση, δοσοεξαρτώμενη μείωση. Η εξήγηση στην περίπτωση αυτή είναι ότι η TAC μειώνεται καθώς το εκχύλισμα έχει ασκήσει την αντιοξειδωτική του δράση με αποτέλεσμα μια υψηλή TAC να μην είναι απαραίτητη.

Αναμφίβολα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σημαντικά όσον αφορά την επίδραση αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών κυττάρων, ωστόσο χρειάζονται παραπέρα μελέτες με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, καθώς και σε περισσότερα χρονικά διαστήματα μικρότερα του 24ώρου ή και μεγαλύτερα, ούτως ώστε να υπάρχει μια ολοκληρωμένη εικόνα για τη δράση του εκχυλίσματος. .

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Σημειώσεις τοξικολογίας, Δημήτριος Κουρέτας,2003
- Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου(vitis vinifera) και φυτικών πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα ήπατος HEPG2,πτυχιακή εργασία από Σπύρου Αργυρή,2010
- Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες (ROS) σε μυϊκά κύτταρα με τη χρήση flow cytometry έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων,Νικόλαος Δεμερτζής(2012)

• ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM., (1993), Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:7915–22
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000 148:187-197.
- Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol*. 2002 40:717-726.
- Barreiro Esther, Hussain Sabah N.A., (2010), Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 12, Number 3
- Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res*. 1998 24:133–138.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Food Science and Technology*, 28, 25–30, 1995.
- Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 48:3597-3604.
- Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000 Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, 41/12,1819-1828.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “The antioxidants of human extracellular fluids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.

- Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: Plant flavonoids in biology and medicine. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997 51:305–310.
- Jackson Malcolm J., (2011), Control of Reactive Oxygen Species production in contracting skeletal muscle, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 15, Number 9
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976 24:117–191.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47
- Miao-Lin Hu, (2011), Dietary Polyphenols as Antioxidants and Anticancer Agents: More Questions than Answers
- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential gynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25
- Perron Nathan, Carla R. García, Julio R. Pinzón, Manuel N. Chaur, Julia L. Brumaghim, (2011), Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage, *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 745–753
- Powers Scott K., Lennon Shannon L., (1999), Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle, *Proceedings of the Nutrition Society* (1999),58, 1025-1033

- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N., (2011), Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* 82 (2011) 513–523
- Prior R, Xianli W, Schaich K, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005
- Renaud S. and Lorgeril M., (1992), Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet* 339:1523–1526
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1988 40:451-458.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002 177:67-80.
- Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, 130:20735-855
- Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., (1997), Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313
- Sudgen Peter H., Clerck Angela, (2006), Oxidative stress and growth regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes, *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 8, Numbers 11 & 12
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555
- Valavanidis A, “Free radicals in organic chemistry”, University of Athens, 2006.
- Veskokoukis Aristeidis, Kyparos Antonios, Michalis Nikolaidis, Stagkos Dimitrios, Chronis Konstantinos, Gkoutzourelas Nikolaos, Kouretas

Dimitrios, (2011), The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape seed extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012, Article ID 185867

- Antioxidant Activity of Essential Oils from *Wedelia chinensis* (Osbeck) in vitro and in vivo Lung Cancer Bearing C57BL/6 Mice. Manjamalai A, Grace VB.
- Antioxidant Profile and in Vitro Cardiac Radical-Scavenging versus Pro-oxidant Effects of Commercial Red Grape Juices (*Vitis vinifera* L. cv. Aglianico N.). Tenore GC, Manfra M, Stiuso P, Coppola L, Russo M, Gomez Monterrey IM, Campiglia P.
- Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. (Bunea CI, Pop N, Babeş AC, Matea C, Dulf FV, Bunea A).
- Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. Bunea CI, Pop N, Babeş AC, Matea C, Dulf FV, Bunea A.
- Design and optimization of a semicontinuous hot-cold extraction of polyphenols from grape pomace. (Monrad JK, Srinivas K, Howard LR, King JW).
- Targeting of mitochondrial reactive oxygen species production does not avert lipid-induced insulin resistance in muscle tissue from mice. Paglalunga S, van Bree B, Bosma M, Valdecantos MP, Amengual-Cladera E, Jørgensen JA, van Beurden D, den Hartog GJ, Ouwens DM, Briedé JJ, Schrauwen P, Hoeks
- Yaffe και Saxel, 1977
- Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006