



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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ, ΟΛΙΚΗΣ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ  
ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗ  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ  
ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ**

**ASSESSMENT OF GLUTATHIONE, TOTAL ANTIOXIDANT  
ACTIVITY AND PROTEIN CARBONYLS IN MUSCLE CELLS  
TREATED WITH POLYPHENOLIC EXTRACT FROM GRAPE  
POMACE**

Τσιουτσιουλίτη Αθανασία

Λάρισα 2014

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

## **Ευχαριστίες**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα διευρύνοντας το γνωστικό μου πεδίο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνεργάστηκα για την αποπεράτωση της πτυχιακής μου και κυρίως τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Γκουτζουρέλα για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια και στήριξή του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου πρόθυμοι να βοηθήσουν και να δώσουν την συμβουλή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών σε συνδυασμό με έναν ανεπαρκή μηχανισμό αντιοξειδωτικής άμυνας θα οδηγήσει τον οργανισμό σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Τις δυσμενείς επιδράσεις αυτού, υφίστανται τα βιομόρια, (DNA, πρωτεΐνες, λίπη) μιας και σε αυτά προκαλούνται σημαντικές δυσλειτουργίες. Έτσι καθίσταται αναγκαία η εύρεση νέων αντιοξειδωτικών ουσιών που θα μπορούν να λαμβάνονται ως συμπληρώματα διατροφής ασκώντας προστατευτική δράση.

Σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών ουσιών είναι οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες περιέχονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα σταφύλια (*Vitis vinifera*). Μάλιστα, πολλές είναι οι αναφορές που μας υποδεικνύουν ότι οι πολυφαινόλες είναι ουσίες με υψηλή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα από στέμφυλα της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα έχει μελετηθεί από το εργαστήριό μας και έχουν διαπιστωθεί διάφορες ευεργετικές δράσεις του.

Η παρούσα εργασία αφορά την επίδραση του εκχυλίσματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυικών κυττάρων ποντικών (C2C12) παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε με τη βοήθεια μεθόδων όπου προσδιορίστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες: ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος είχε την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης κατά 25,9% στη συγκέντρωση 10 μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl. Επίσης στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 5 και 10 μg/ml αυξήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 15,1 και 14,8% σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε μείωση κατά 32, 31,2 και 24,8% στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl.

Συμπεραίνουμε ότι εκχύλισμα έχει την ικανότητα να προστατεύει στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις τα κύτταρα της σειράς C2C12 από τον οξειδωτικό παράγοντα tert-butyl. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το εκχύλισμα μπορεί και επηρεάζει θετικά την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων.

## ABSTRACT

Oxidative stress refers to a condition in which the increased production of free radicals overwhelms the organism's antioxidant mechanisms. The adverse effects of this situation, affect mostly the biomolecules (DNA, proteins, fats) in which a significant amount of malfunctions are caused. Apparently, the development of new antioxidants that will be taken as food supplements exerting a protective effect to the organism becomes requisite.

Polyphenols constitute an important class of antioxidants and they present in significant concentrations in grapes (*Vitis vinifera*). Indeed, there are many reports that suggest that polyphenols are compounds with high antioxidant and chemopreventive activity. Indeed, there are several studies showing that polyphenols have high antioxidant and chemopreventive activity. In the present study, it was used a polyphenolic extract from pomace of the Greek grape variety Batiki Tyrnavou. This extracts has been previously studied from our research group and it has been shown to possess important bioactivities.

In particular, the present study concerns the effect of the extract on the redox state of mouse muscle cells (C2C12) in presence of the oxidizing agent tert-butyl. For the assessment of the redox status, oxidative stress biomarkers were used such as reduced glutathione (GSH), protein carbonyls (CARB) and total antioxidant capacity (TAC), were determined. The measurements were performed spectrophotometrically.

The results showed that administration of the extract had the ability to increase the levels of glutathione by 25.9% at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  compared with cells-treated only with tert-butyl. Also extract at concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  increased the total antioxidant capacity by 15.1 and 14.8% compared with the cells-treated only with tert-butyl. Moreover, protein carbonyls reduced by 32, 31.2 and 24.8% at concentrations of 2.5, 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  compared with the cells-treated only with tert-butyl.

In conclusion, the extract at these specific concentrations has the ability to protect the muscle cells C2C12 from the oxidizing agent tert-butyl. Further studies are needed to clarify the molecular mechanisms by which the extract can positively influence the redox status of the cells.

# Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT .....	5
Περιεχόμενα .....	6
Κατάλογος πινάκων .....	7
Κατάλογος εικόνων.....	7
Κατάλογος γραφημάτων.....	7
1. Εισαγωγή .....	8
1.1. Ελεύθερες ρίζες .....	8
1.2. Οξειδωτικό στρές.....	10
1.3. Αντιοξειδωτικά μόρια.....	12
1.4. Σταφύλια .....	18
1.5. Μυικά κύτταρα (C2C12) .....	19
1.6. Σκοπός .....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	21
2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς μωβλαστών επιμόνου C2C12 .....	21
2.2. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford .....	22
2.3. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	23
2.4. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH).....	25
2.5. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	27
2.6. Στατιστική ανάλυση .....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	29
3.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων .....	29
3.1. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH).....	30
3.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) .....	31
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	32
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

## Κατάλογος πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΣΕΛΙΔΑ
Πίνακας 1: Αντιοξειδωτικά μόρια και οι διαλύτες τους	12
Πίνακας 2: Τα φλαβονοειδή	17
Πίνακας 3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων	18
Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διαδικασίας	21
Πίνακας 5: Σύσταση υλικών για τον προσδιορισμό ανηγμένης γλουταθειόνης.	26
Πίνακας 6: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο TAC	27

## Κατάλογος εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών	9
Εικόνα 2: Τρόπος δημιουργίας Οξειδωτικού στρες	10
Εικόνα 3: Χημική δομή της οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).	11
Εικόνα 4: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων	14
Εικόνα 5: Χημική δομή πολυφαινολών	16
Εικόνα 6: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης	19
Εικόνα 7: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο	20
Εικόνα 8: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης	25
Εικόνα 9: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό	27

## Κατάλογος γραφημάτων

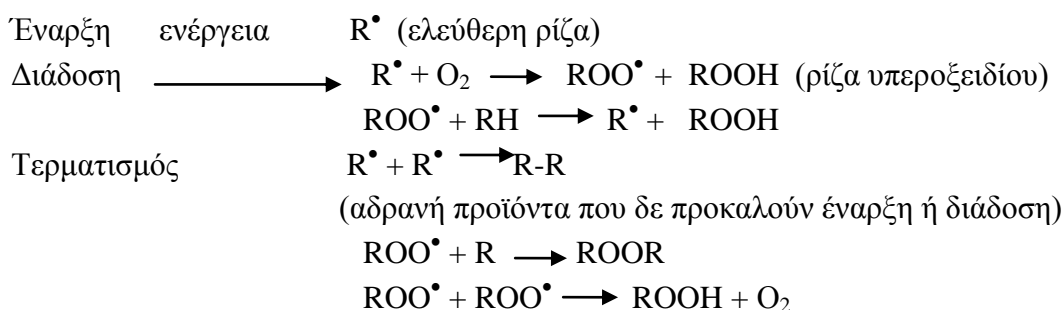
ΓΡΑΦΗΜΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Γράφημα 1: Αποτελέσματα προσδιορισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων	29
Γράφημα 2: Αποτελέσματα προσδιορισμού GSH	30
	31
Γράφημα 3: Αποτελέσματα προσδιορισμού TAC	

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έχει τη δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (**Halliwell, Biochemistry of oxidative stress 2007**). 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. Όπως γίνεται αντιληπτό, η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι αυτή του υδρογόνου.

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 αλληλουχία των αντιδράσεων μπορεί να παρασταθεί ως εξής:



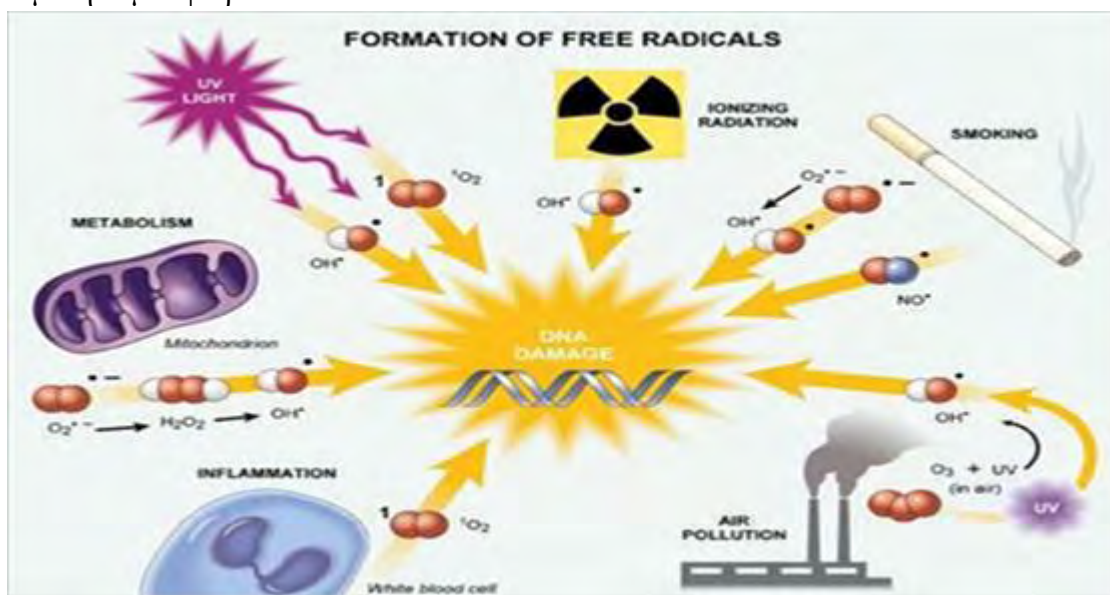
Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες του οργανισμού είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^{\bullet}$ ), του υπεροξειδίου ( $ROO^{\bullet}$ ), του τριχλωρομεθυλίου ( $CCl_3^{\bullet}$ ) και οιθειούχες ρίζες ( $RS^{\bullet}$ ). Από αυτές, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (**Cheeseman et al, 1993**). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου



(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell 2001).

Όσο σταθερότερη είναι μια ρίζα, τόσο ευκολότερος είναι και ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006) και εξουδετερώνονται είτε αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, είτε με άλλες ρίζες, είτε με άλλα συστατικά του κυττάρου. Αν μια ρίζα αλληλεπιδράσει με μια μη ρίζα, τότε το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο θα μεταφερθεί στην δεύτερη, σχηματίζοντας μια νέα ρίζα. Αν όμως αλληλεπιδράσουν δυο ρίζες μεταξύ τους, τότε τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια θα δημιουργήσουν ένα ζεύγος, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ένωσης που δεν θα είναι ελεύθερη ρίζα.

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 ως εξής: κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, τη λιπιδική οξείδωση, την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα, την μολυσμένη ατμόσφαιρα.



Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

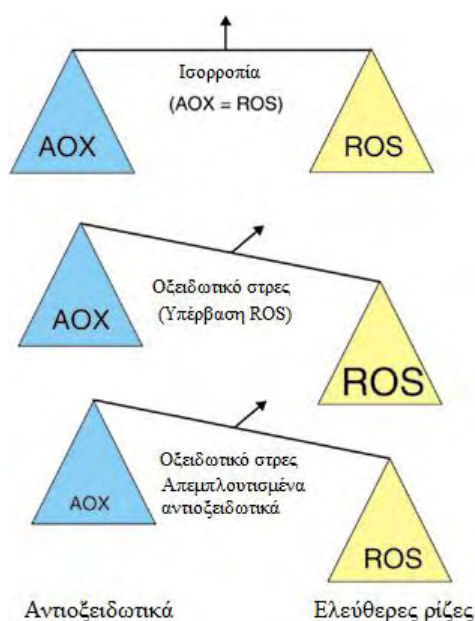
Οι κυριότερες επιπτώσεις που παρατηρούνται από τη δράση των ελευθέρων ριζών είναι σε κυτταρικό επίπεδο και αφορούν σοβαρές βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν στα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λίπη). Μπορούν να επέμβουν στη μιτοχονδριακή αναπνοή αναστέλλοντας έμμεσα το μηχανισμό ενζύμων που τροφοδοτεί ηλεκτρόνια τη κυτταρική μονάδα. Εκτός αυτού, έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν β-παγκρεατικά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να ελαττωθεί η παραγωγή ινσουλίνης και έτσι η ινσουλινοευσαιθησία.

Το οξειδωτικό στρες περιγράφει την ανισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών (ή οποιονδήποτε άλλων δραστικών μορφών) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες συνεπάγεται παραγωγή και συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων που εμπλέκονται στη παθογένεια, κατά κύριο λόγο εκφυλιστικών νοσημάτων και φλεγμονών. Χαρακτηρίζεται από τις μεταβολές που

προκαλεί στα βιομόρια του οργανισμού (**Raymond 2010**). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ελευθέρων ριζών και γενικότερα όλων των δραστικών οξειδωτικών ειδών εξασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και εξυπηρετούν σε συγκεκριμένες διεργασίες (όπως στη κυτταρική διαφοροποίηση). Σε αντίθετη περίπτωση αν οι περίσσεια τους δεν αδρανοποιηθεί τότε θα αντιδράσει με τα κυτταρικά στοιχεία του οργανισμού, δηλαδή λίπη – πρωτεΐνες - νουκλεϊκά οξέα, με συνέπεια να προκληθούν μη αναστρέψιμες μεταβολές (**Ner-Franch 2011**).

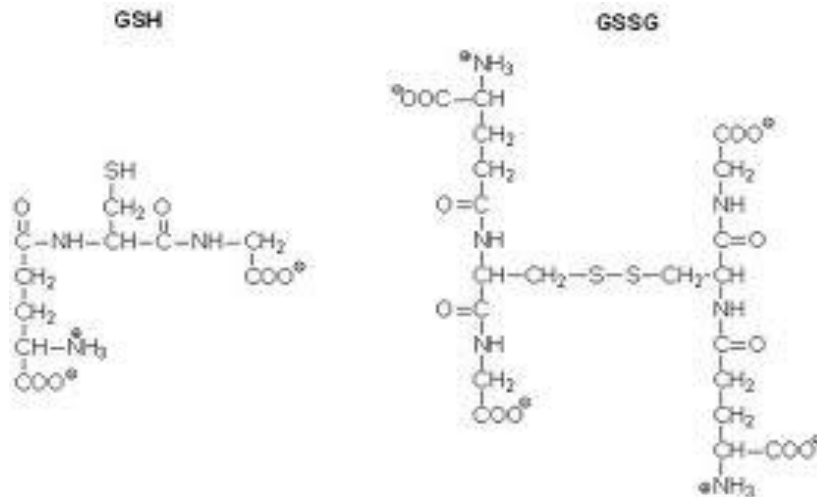
## 1.2. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. 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. Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδεϋδών 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 ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.



**Εικόνα 2: Τρόπος δημιουργίας Οξειδωτικού στρες**

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 3: Χημική δομή της οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).

Συνολικά, μπορούμε να διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις, κατά τις οποίες είναι δυνατόν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η πρώτη αφορά την παρουσία τοξικών ουσιών, οι οποίες κατά την είσοδό τους στον οργανισμό, θα μεταβολιστούν. Αποτέλεσμα του μεταβολισμού, είναι η δημιουργία των ROS. Επιπλέον, ο οργανισμός από μόνος του διαθέτει ένα σύστημα παραγωγής των ROS. Ας μην ξεχνάμε ότι τα ROS διαδραματίζουν υπό φυσιολογικές συνθήκες τον ρόλο του διαβιβαστή σήματος. Επομένως όταν το σύστημα παραγωγής υπερλειτουργεί, τότε έχουμε και την εμφάνιση πολύ μεγαλύτερων επιπέδων ROS, σε σχέση με το φυσιολογικό. Τέλος, ο τρίτος τρόπος σχηματισμού, αφορά όπως είναι λογικό την ανεπάρκεια ή ακόμα και την απουσία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Χωρίς αυτούς, τα επίπεδα των ROS αυξάνονται συνεχώς, δημιουργώντας προβλήματα στον οργανισμό.

Αναλυτικότερα, στα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες, συγκαταλέγονται η μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και η οξείδωση μορίων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA. Μάλιστα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Lyrras et al, 1977). Στην περίπτωση του DNA, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες), όσο και στην D-ριβόζη του μορίου. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell 1994).

### 1.3. Αντιοξειδωτικά μόρια

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (**Halliwell 2001**). Ορισμένοι από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες που περιέχονται στον ορό του αίματος και γενικότερα σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο, παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιοξειδωτικό	Διαλυτότητα
Γλουταθειόνη	Νερό
Ασκορβικό οξύ	Νερό
Λιποϊκό οξύ	Νερό
Ουρικό οξύ	Νερό
Καροτένια	Λίπη
A-τοκοφερόλη	Λίπη
Συνένζυμο Q10	Λίπη

**Πίνακας 1: Αντιοξειδωτικά μόρια και οι διαλύτες τους**

Αναλυτικότερα, η γλουταθειόνη είναι μία ένωση, η οποία κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται από ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της γλουταθειόνης, είναι ότι είναι δυνατόν να λειτουργήσει ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται τα ένζυμα που η δράση τους απαιτεί την παρουσία της γλουταθειόνης:

- η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης,
- η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης

Ακόμα, η γλουταθειόνη είναι δυνατόν να επιτελεί και τις παρακάτω λειτουργίες:

- Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου
- Βοηθά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.
- Συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό,
- Απομακρύνει υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες
- Βοηθά στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

Είναι δυνατόν να συναντήσουμε την γλουταθειόνη σε δυο μορφές. Η πρώτη αφορά την ανηγμένη (GSH), ενώ η δεύτερη την οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο

της γλουταθειόνης, GSSG). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.

Η επόμενη ένωση με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο πλάσμα του αίματος είναι το ουρικό οξύ. Μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αποτελεί το 55-60% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των συστατικών του πλάσματος (TAC). Όπως είναι κατανοητό, πρόκειται για μια υδατοδιαλυτή ουσία. Όσον αφορά τον σχηματισμό του, το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Μάλιστα, κατά την διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα (**Green & Fraser, 1988**). Έπειτα, το ουρικό είναι δυνατόν να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και να τα προστατεύσει από τις ROS.

Το δεύτερο ισχυρότερο μόριο ως προς τον καθορισμό της TAC, αποτελεί το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C). Όπως και το ουρικό, η Βιταμίνη C, είναι υδατοδιαλυτή και έχει την δυνατότητα να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS. Αμέσως μετά από την Βιταμίνη C, όσον αφορά την ισχύ ως προς την αναγωγική ιδιότητα, ακολουθούν οι Βιταμίνες A και E (α-τοκοφερόλη). μάλιστα, μέσα από μελέτες φαίνεται ότι οι Βιταμίνες C και E αποτελούν το 25% της TAC.

Επιπλέον, ένα μόριο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των καροτενίων, είναι η β-καροτίνη, η οποία είναι λιποδιαλυτή και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Ο κύριος ρόλος της, αφορά την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (**Halliwel & Gutteridge 1998**).

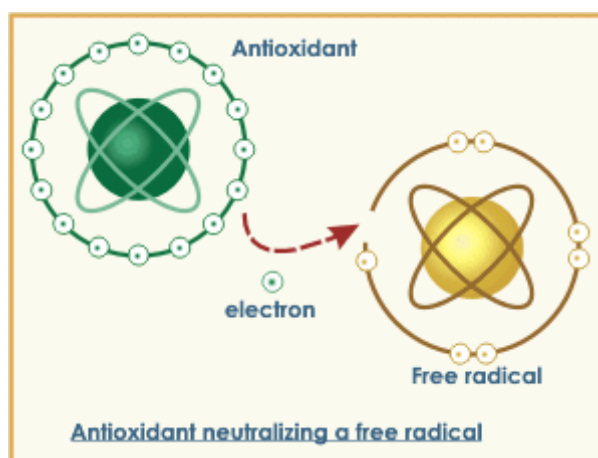
Η δράση του λιποϊκού οξέος αφορά τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου. Παράγεται από το οργανισμό σε μικρές ποσότητες και εξαιτίας της δομής του, το λιποϊκό οξύ αποτελεί και ένα πανίσχυρο αντιοξειδωτικό παράγοντα.

Η αντιοξειδωτική δράση του συνενζύμου Q10 προέρχεται από την λειτουργία του ως μεταφορέας ενέργειας, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, ως δότης ηλεκτρονίων. Το συνένζυμο Q10, αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων, αλλά και αναγεννά την βιταμίνη E (**Halliwel & Gutteridge 1998**).

Εκτός όμως από τα παραπάνω συστατικά, συναντάμε και άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες και το λυκοπένιο. Αυτές, συναντώνται σε φρούτα αλλά και λαχανικά. Φλαβονοειδή απαντώνται σε μήλα, πολυφαινόλες σε σταφύλια, ενώ το λυκοπένιο σε ντομάτες. Όλοι αυτοί οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες συνιστούν την ομάδα των μη ενζυμικών μηχανισμών.

Στην συνέχεια, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με δυο τρόπους. Ο πρώτος αφορά την παρεμπόδιση της οξείδωσης των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, ενώ ο δεύτερος τον περιορισμό του σχηματισμού ελεύθερων ριζών (**Scalbert et al, 2005**). Τόσο κατά τον πρώτο, όσο και κατά τον δεύτερο τρόπο,

οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell 2001).



Εικόνα 4: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

Εκτός όμως από τους μη ενζυμικούς μηχανισμούς, υπάρχουν και οι ενζυμικοί. Σε αυτούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα σημαντικότερα ένζυμα που ανήκουν στην συγκεκριμένη κατηγορία είναι τα εξής:

- υπεροξειδική δισμουτάση (SOD),
- περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx),
- ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR)
- καταλάση (CAT).

Ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι:

-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

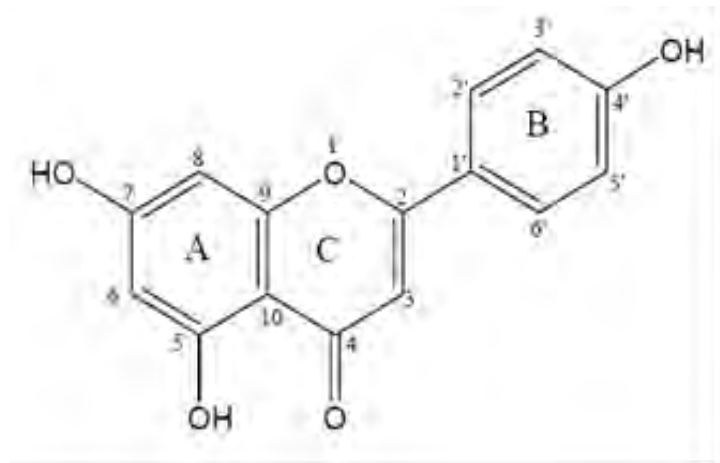
### **1.3.1. Πολυφαινόλες και η δράση τους**

Μερικοί εκ των σημαντικότερων αντιοξειδωτικών παραγόντων αποτελούν οι πολυφαινόλες. Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που συναντάμε ευρέως σε φυτικούς οργανισμούς. Μάλιστα, το εκχύλισμα σταφυλιού (*Vitis vinifera*) που διαθέτουμε, περιέχει τις συγκεκριμένες ενώσεις, σε υψηλή περιεκτικότητα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η πολυφαινολική ουσία ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών. Ο ρόλος της αφορά την μείωση της σύνθεσης των ελεύθερων ριζών, του κινδύνου φλεγμονής και την συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων. Επίδραση ανάλογη της ρεσβερατρόλης, έχουν και οι τανίνες και η κερκετίνη που επίσης αποτελούν συστατικά του σταφυλιού.

Όσον αφορά την δομή τους, οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και απαρτίζουν μια μεγάλη και ετερογενή κατηγορία χημικών ενώσεων. Μάλιστα, οι ενώσεις αυτές υπολογίζεται ότι είναι περισσότερες από 8000, όμως λίγες από αυτές είναι αντιοξειδωτικές. Όσον αφορά την δομή τους, βασικό τους

χαρακτηριστικό, αποτελεί η ύπαρξη του αρωματικού δακτυλίου του βενζολίου, στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες.



Εικόνα 5: Χημική δομή πολυφαινολών (Σπανού 2010)

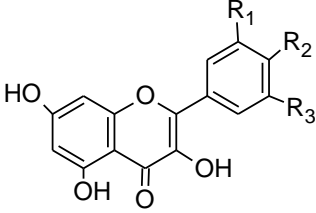
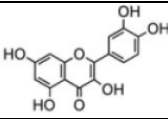
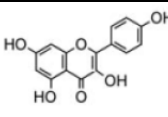
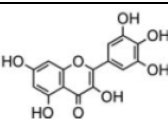
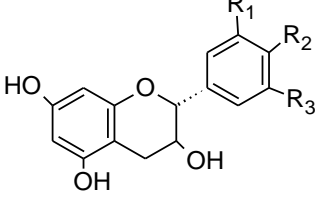
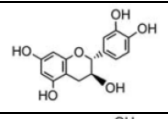
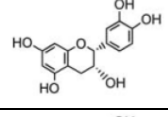
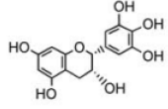
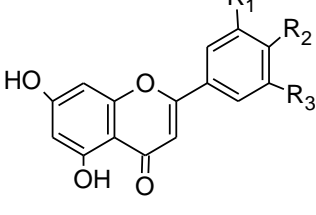
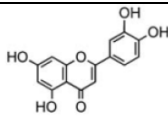
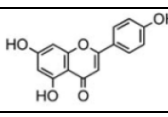
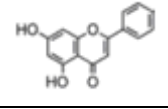
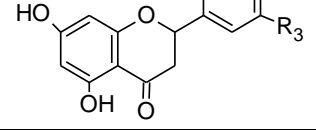
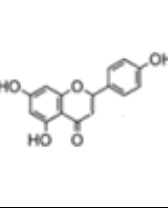
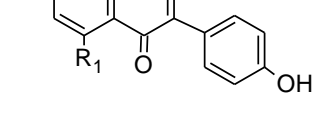
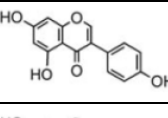
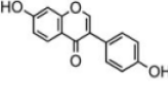
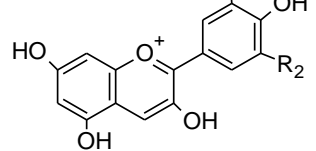
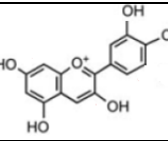
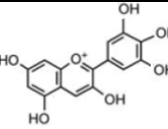
Ανάλογα λοιπόν με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες με αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες (Manach et al., 2004):

- φλαβονοειδή,
- πολυφαινολικά οξέα,
- στιλβένια
- λιγνάνες

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται αναλυτικά η κατηγορία των φλαβονοειδών:

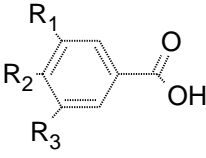
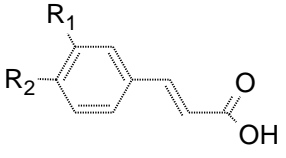


**Πίνακας 2: Τα φλαβονοειδή (Σπανού 2010)**

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

Ενώ στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι χημικές δομές των πολυφαινολικών οξέων:

Πίνακας 3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων (Σπανού 2010)

Υδροξυβενζοϊκά οξέα			Υδροξυκινναμικά οξέα		
					
Γαλλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ		Κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό οξύ	Φερουλικό οξύ
R <sub>1</sub>	OH	OH	R <sub>1</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
R <sub>2</sub>	OH	OH	R <sub>2</sub>	-	OH
R <sub>3</sub>	OH	H			

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

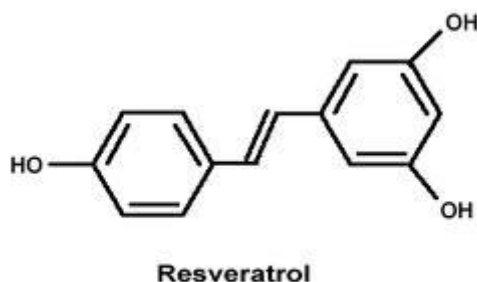
#### 1.4. Σταφύλια

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 αιμορροϊδών. 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 επιγαλλοκατεχίνη, την προκυανιδίνη, την πολυμερισμένη, προακυανιδίνη και τις προανθοκυανιδίνες (Spyrou 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. Τα στίλβενια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων 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).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες (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..

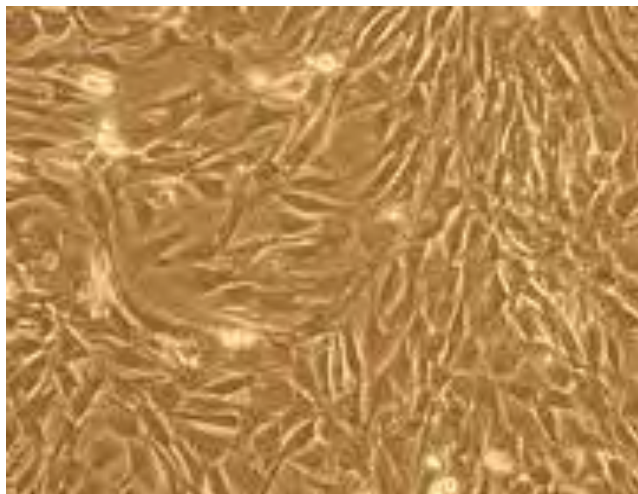


Εικόνα 6: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

### 1.5. Μυικά κύτταρα (C2C12)

Τα μυικά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι 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 ποντικών μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο αλλά είναι και 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.



Εικόνα 7: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

## 1.6. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών κύτταρων ποντικών C2C12, ενός εκχυλίσματος από μια ελληνική ποικιλία στεμφύλου (Μπατίκι Τυρνάβου) σε διάφορες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις καθώς και η πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος έναντι του οξειδωτικού παράγοντα *tert-butyl* (t-BHP). Με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες και εν συνεχεία μέσω της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων εξετάστηκε σε ποιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος παρατηρήθηκαν αξιολογες μεταβολές στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε σχέση με την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα *tert-butyl*. Ο κύριος σκοπός ήταν να προσδιοριστεί εάν το εκχύλισμα μπορεί να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων με απώτερο σκοπό την δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής ή τροφίμων εμπλουτισμένων με εκχύλισμα που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο για την βελτίωση της υγείας του

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν των εταιρειών Merck (Γερμανία), Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και Becton-Dickinson (Η.Π.Α.).

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%. Αναλυτικότερα λοιπόν, οι αναλυτικές συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Θρεπτικό μέσο με 10% FBS</b>	<b>Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS</b>
20 mL FBS	
2 mL anti-anti	2 mL anti-anti
2 mL glutamine	2 mL glutamine
200ml DMEM41966	200ml DMEM41966

**Πίνακας 4: Σύσταση θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διαδικασίας**

Σημειώνουμε το γεγονός ότι 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.

### 2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO<sub>2</sub> 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε επανακαλλιέργεια των κυττάρων **1:5** (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1mL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με

10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow).

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

Τα κύτταρα επωάζονται σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (10 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και το εκχύλισμα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (2,5, 5 και 10 μg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού FBS με τον οξειδωτικό παράγοντα tert-butyl συγκέντρωσης 0,3mM για 30 λεπτά. Χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με το εκχύλισμα και τον t-BOOH και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Ακολούθησε ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της γλουταθειόνης (GSH), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) αφού προηγήθηκε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

## **2.2. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford**

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

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μL H<sub>2</sub>O 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.

### **2.3. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

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

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

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

#### Διαλύματα

##### Διάλυμα HCl 2.5 N

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

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

#### DNPH 14 mM (MB: 198.1)

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

#### Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

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

#### Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 200  $\mu$ L κυτταρικού αιωρήματος προσθέτουμε 50  $\mu$ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)\*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4  $^{\circ}$ C.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
4. Προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCl) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCl για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4  $^{\circ}$ C.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. Προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4  $^{\circ}$ C.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4  $^{\circ}$ C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 μια ακόμα φορά.
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37  $^{\circ}$ C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιολογικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4  $^{\circ}$ C.
13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

\*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCl 2.5 N).



### Υπολογισμοί

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

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm<sup>-1</sup>.

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

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

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

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

### Υπολογισμοί

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

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm<sup>-1</sup>.

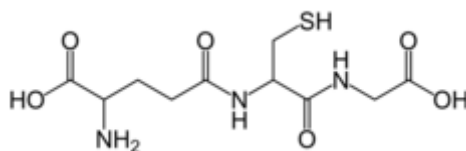
Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυβελίδα /50 μL δείγματος).

Πολλαπλασιάζουμε με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 10 για να συνυπολογίσουμε την 1:10 αραίωση του δείγματος.

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

## **2.4. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)**

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



**Εικόνα 8: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης**

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του

ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

### Πειραματικό πρωτόκολλο

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

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε Eppendorf 1,5ml:

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

**Πίνακας 5: Σύσταση υλικών για τον προσδιορισμό ανηγμένης γλουταθειόνης.**

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

### Υπολογισμοί

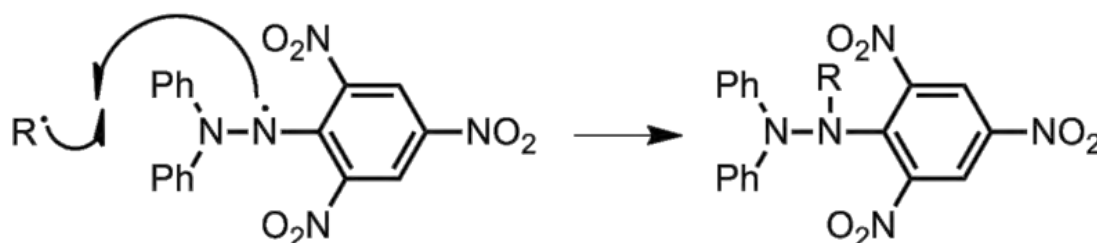
Ποσότητα της GSH (mmol/L) =  $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 20$ , όπου το 20 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000 μL) με τον όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (50 μL, >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης) ( $1000 / 50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

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

## 2.5. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

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

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



Εικόνα 9: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό

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

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

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

Πίνακας 6: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο TAC

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

Το επόμενο βήμα είναι η συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση 3000 g για 5 min στους 4oC. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) το οποίο είναι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των πλύσεων, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Η

διάρρηξη των κυττάρων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του μηχανήματος Sonicator για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000 g για 15 min στους 4°C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Το υπερκείμενο διάλυμα, είναι δυνατόν να αποθηκευτεί -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Έπειτα, το επόμενο βήμα είναι μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

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

% μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % Abs μείωση  
= (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού ´ 100

μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL αιωρήματος = [(% Abs μείωση / 100) ´ 50 ´ 50] / 1000

Σημειώνουμε τα εξής:

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 20 διότι η αραίωση του αιωρήματος στην κυψελίδα είναι 20-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 20).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

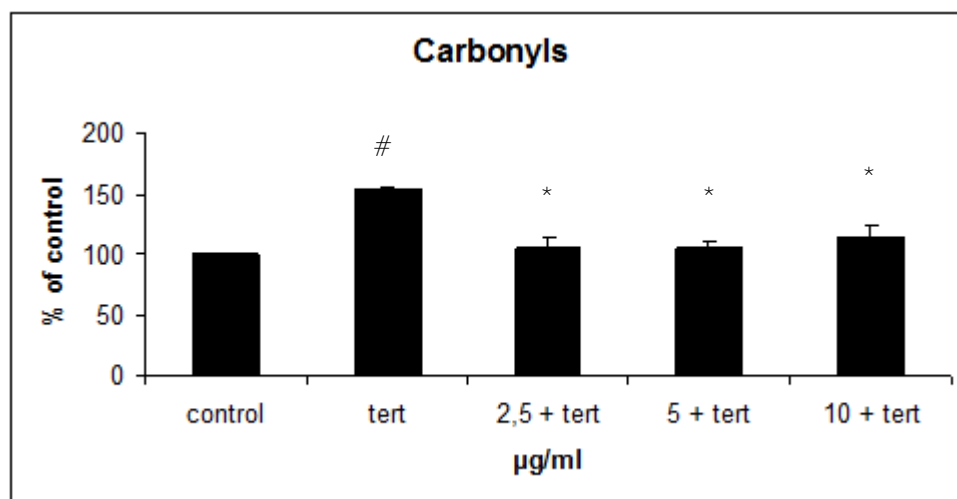
## 2.6. Στατιστική ανάλυση

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

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

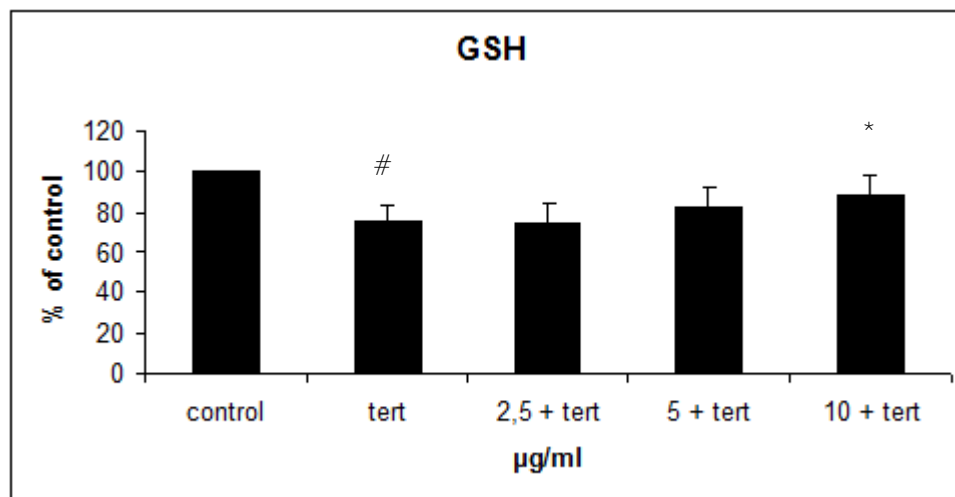
Ο πρώτος δείκτης οξειδωτικού στρες που μελετήσαμε ήταν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αποτελέσματα της μέτρησης έδειξαν ότι η προσθήκη tert αύξησε τα καρβονύλια σε σύγκριση με το control κατά 53,7%. Ενώ σε σχέση με το tert –Butyl παρατηρήθηκε μείωση κατά 32% στα κύτταρα που είχε χορηγηθεί εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5 μg/ml, στα κύτταρα που είχε χορηγηθεί εκχύλισμα συγκέντρωσης 5μg/ml μειώθηκε κατά 31,2% και τέλος στη συγκέντρωση 10μg/ml παρατηρήθηκε μείωση της τάξεως 24,8%



**Γράφημα 1: Αποτελέσματα προσδιορισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων.** (Το # υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά αυξημένο σε σύγκριση με το control. Το \* υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά μειωμένο σε σύγκριση με το tert-Butyl.)

### 3.1. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)

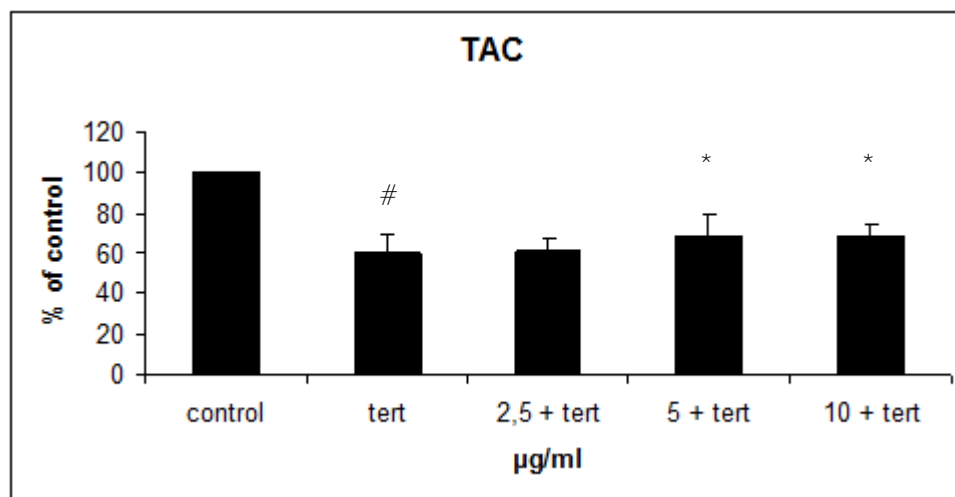
Στη 2<sup>η</sup> μέτρηση ο δείκτης οξειδωτικού στρες που μελετήσαμε ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) κατά την οποία τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν τα εξής: Το tert από μόνο του μείωσε τη γλουταθειόνη κατά 24% .Στη συγκέντρωση 2,5 μg/ml η γλουταθειόνη παρέμεινε σταθερή στο 24% ,ενώ στις συγκεντρώσεις 5μg/ml και 10μg/ml παρατηρήσαμε αύξηση κατά 8,6% και 25,9% αντίστοιχα.



**Γράφημα 2: Αποτελέσματα προσδιορισμού GSH** (Το # υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά αυξημένο σε σύγκριση με το control. Το \* υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά μειωμένο σε σύγκριση με το tert-Butyl.)

### 3.2. Αποτελέσματα προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στην κατάσταση tert σε σχέση με την κατάσταση control κατά 40,4%. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στις καταστάσεις 2,5mg/ml δεν παρατηρήσαμε αλλαγή ενώ στις συγκεντρώσεις 5μg/ml και 10μg/ml σε σχέση με την κατάσταση tert κατά 15,1% και 14.8% αντίστοιχα.



**Γράφημα 3: Αποτελέσματα προσδιορισμού TAC** (Το # υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά αυξημένο σε σύγκριση με το control. Το \* υποδηλώνει ότι είναι στατιστικά μειωμένο σε σύγκριση με το tert-Butyl.)

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

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

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η πιθανή ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του εκχυλίσματος στεμφύλων που ήταν πλούσιο σε πολυφαινόλες σε κύτταρα της σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12 παρουσία οξειδωτικού στρες λόγω του οξειδωτικού παράγοντα *tert-butyl* (t-BHP). Το εκχύλισμα των στέμφυλων απομονώθηκε από την ελληνική ποικιλία *Vitis vinifera* Μπατίκι Τυρνάβου. Σε προηγούμενη μελέτη, είχε προσδιοριστεί η πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος και είχε δεχθεί *in vitro* ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Veskoukis et al., 2012).

Για την μελέτη τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν αρχικά σε μια κατάσταση ελέγχου και σε μια κατάσταση όπου τους χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας *tert-butyl* (t-BHP) συγκέντρωσης 0,3mM για μια ώρα, με σκοπό την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Η πρόκληση οξειδωτικού στρες επιτεύχθηκε καθώς οι τρεις δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν επηρεάστηκαν αρνητικά. Συγκεκριμένα η ανηγμένη γλουταθειόνη μειώθηκε κατά 24%, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν κατά 53,6 % και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε κατά 40,4%.

Στην συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο που περιείχε τρεις διαφορετικές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ . Η καλλιέργεια διήρκεσε 24 ώρες και έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν με τον οξειδωτικό παράγοντα *tert-butyl* (t-BHP) συγκέντρωσης 0,3mM για 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλλιέργεια με



το εκχύλισμα είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μειωμένου οξειδωτικού στρες σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν μόνο με τον παράγοντα tert-butyl (t-BHP). Συγκεκριμένα στην ανηγμένη γλουταθειόνη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 10 µg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 35.9%. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 2,5, 5 και 10µg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 32, 31.2 και 24.8% αντίστοιχα. Τέλος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 5 και 10 µg/ml σε σχέση με την κατάσταση tBHP κατά 15.1 και 14.8% αντίστοιχα. Παρατηρούμε λοιπόν ότι το εκχύλισμα άσκησε μια αντιοξειδωτική δράση καθώς αύξησε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενώ παράλληλα μείωσε τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής κατάστασης των μυϊκών κυττάρων από το εκχύλισμα στεφύλου ήταν αποτελεσματική για την προστασία τους από δυσμενείς επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από παράγοντα tert-Butyl. Έτσι, όταν το tert-Butyl προστέθηκε σε κύτταρα μυών C2C12 μετά από επώαση με εκχύλισμα στεφύλου, υπήρχε σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σύγκριση με την προσθήκη μόνο του tert-Butyl. Μελέτες in vivo έχουν δείξει ότι η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων έχει μειώσει το οξειδωτικό στρες σε σκελετικούς μύες. Για παράδειγμα, η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων σε σκελετικούς μύες ποντικών (**Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, et al 2012**). Μια άλλη μελέτη in vivo έδειξε επίσης ότι η χορήγηση εκχυλίσματος από σπόρους σταφυλιών αύξησε την αντιοξειδωτική ενζυμική δράση στους σκελετικούς μύες διαβητικών ποντικών. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της GSH ήταν σημαντικά υψηλότερα σε μυϊκά κύτταρα που επώασθηκαν με εκχύλισμα σταφυλιού πριν από τη χορήγηση tert-Butyl, συγκριτικά με κύτταρα που έλαβαν μόνο tert-Butyl. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι στα μυϊκά κύτταρα που επώασθηκαν με εκχύλισμα στεμφύλων τα επίπεδα GSH, πριν την χορήγηση tert-Butyl, ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν είχαν επεξεργαστεί. Η διαπίστωση αυτή τονίζει τον κρίσιμο ρόλο των επιπέδων GSH στην παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος των στεμφύλων στα μυϊκά κύτταρα. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιών προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες λόγω της αύξησης της GSH σε καρδιακούς μύες και άλλους ιστούς (**Ding Y, Dai X, Jiang Y, et al 2013, Orhan N, Aslan M, Orhan DD, et al 2006**).

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος σταφυλιού οφείλεται πιθανώς και στο υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο του. Η σύνθεση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος σταφυλιού αξιολογήθηκε και διαφορετικές κατηγορίες πολυφαινολών ανιχνεύθηκαν όπως φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες, ανθοκυάνες και

φαινολικά οξέα. Όλες αυτές οι πολυφαινόλες έχει δειχτεί ότι παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (**Hosu et al., 2013** και **Hribar et al., 2013**).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
- 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
- Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2004; 170:1179-1184.
- Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Chao CL, Chang NC, Weng CS, et al. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr* 2011; 50(6): 401-419.
- Conti V, Russomanno G, Corbi G, Guerra G, Grasso C, Filippelli W, Paribello V, Ferrara N, Filippelli A. Aerobic training workload affects human endothelial cells redox homeostasis. *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Apr;45(4):644-53.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
- Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.
- Ding Y, Dai X, Jiang Y, et al Grape seed proanthocyanidin extracts alleviate oxidative stress and ER stress in skeletal muscle of low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(2): 365-369
- Felice F, Zambito Y, Di Colo G, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80(1): 176-184.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000 48:3597-3604.
- Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.
- Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzyme* 186, 1990.

- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.
- 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.
- Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
- Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 89-95.
- Hosu A, Cristea VM, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem* 2013; 150: 113–118.
- Hribar U, Ulrich NP. The metabolism of anthocyanins. *Curr Drug Metab* 2014; 15(1): 3–13.
- Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
- Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
- Kar P, Laight D, Rooprai HK, et al. Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med* 2009; 26(5): 526–531.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976 24:117–191.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
- Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233-9.
- Manach, C., A. Mazur, and A. Scalbert. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology* 16, no. 1: 77-84. Database on-line. Available from Scopus.
- Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13: 295-309.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.
- Orhan N, Aslan M, Orhan DD, et al In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 108(2): 280–286
- Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, et al Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br J Nutr* 2012; 107(2): 170–178.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.* 2004; 357: 83-86.

- Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004; 213-218.
- Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.
- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
- Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716 8.
- Veskokoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, et al. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 185867.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.