



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

**ΔΕΜΕΡΤΖΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες (ROS) σε μυϊκά κύτταρα με τη χρήση
flow cytometry έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων**

**Study of oxidative markers (ROS) in muscle cells using flow cytometry
after administration of grape extract**



ΛΑΡΙΣΑ 2012

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

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

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία μου προσέφερε σημαντικές εμπειρίες και γνώσεις.

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

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που συνεργάστηκαν άψογα μαζί μου κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
2.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	6
2.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	7
2.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ	10
2.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	13
2.5 ΣΤΑΦΥΛΙΑ (ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ)	16
3. ΣΚΟΠΟΣ	19
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
4.1 ΥΛΙΚΑ	19
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	20
4.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ABTS	20
4.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ FLOW CYTOMETRY	22
4.2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ TAC	24
4.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD	26
4.2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	27
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ABTS	28
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FLOW CYTOMETRY	29
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ TAC	39
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

1. Περίληψη

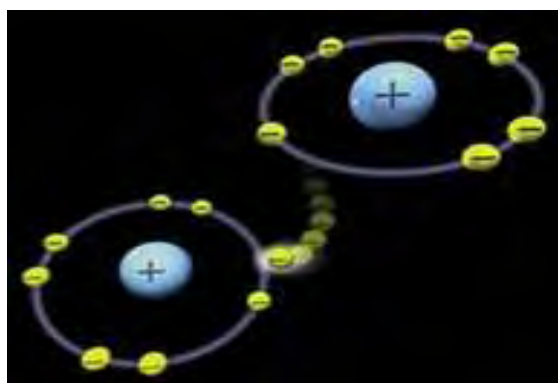
Στις μέρες μας, με στόχο την βελτίωση της προσωπικής υγείας και τη δημιουργία ενός εύρωστου οργανισμού, το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται μεταξύ άλλων και στη δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών. Μια κατηγορία εξ αυτών, αποτελεί αυτή των πολυφαινόλων, των οποίων οι ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες είναι πολύ σημαντικές. 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. Για τη μελέτη λοιπόν της πολυφαινολικής δράσης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από τον καρπό του φυτού και κυρίως από τα στέμφυλα. Το φυτό ανήκει στην ποικιλία σταφυλιού (*Vitis vinifera*) Μπατίκι από την περιοχή του Τυρνάβου.

Κατά τη διάρκεια της έρευνάς μας, εξετάσαμε τις ευεργετικές ιδιότητες της συγκεκριμένης ποικιλίας σε κύτταρα μυός C2C12, με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry), αλλά και άλλων μεθόδων, όπως αυτή της TAC και του ABTS. Μάλιστα, όσον αφορά το αντικείμενο μελέτης, δεν έχει βρεθεί καμία σχετική αναφορά στην βιβλιογραφία. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), ενώ οι μέθοδοι ABTS και TAC, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα μπορεί να αναστείλει σε μικρές συγκεντρώσεις την οξειδωτική κατάσταση που επικρατεί στα κύτταρα. Επομένως, καταλήγουμε στο γεγονός ότι το εκχύλισμα διαθέτει σημαντική χημειοπροστατευτική δράση.

2. Εισαγωγή

2.1. Ελεύθερες ρίζες

Σε κάθε μόριο ή άτομο, τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε συγκεκριμένες τροχιές, που ορίζονται ως τροχιακά (ατομικά ή μοριακά). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις, όπου κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης είναι δυνατόν να περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Τα συγκεκριμένα λοιπόν μόρια ή άτομα, ορίζονται ως ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όπως γίνεται αντιληπτό, η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι αυτή του υδρογόνου.

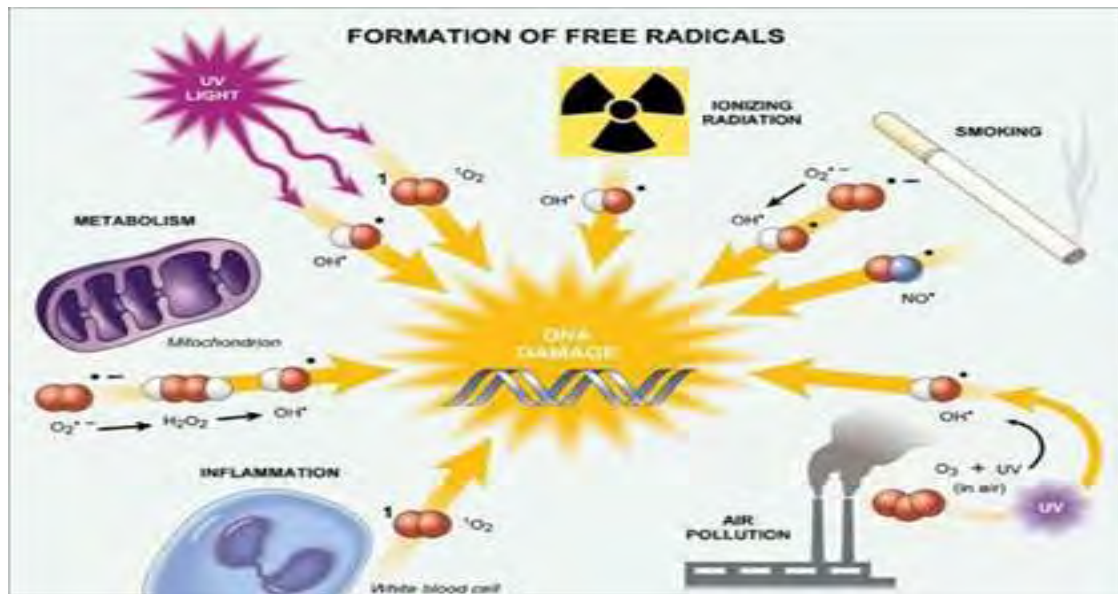


Εικόνα 2.1: Η δραστηκότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

Επιπλέον, οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$), του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$), του αλκοξυλίου ($\text{RO}\cdot$), του υπεροξειδίου ($\text{ROO}\cdot$), του τριχλωρομεθυλίου ($\text{CCl}_3\cdot$) και οι θειούχες ρίζες ($\text{RS}\cdot$). 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 υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell 2001).

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,
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- τη λιπιδική οξείδωση,
- την ακτινοβολία,
- τη φλεγμονή,
- το κάπνισμα
- την μολυσμένη ατμόσφαιρα



Εικόνα 2.2: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

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.

2.2. Αντιοξειδωτικά μόρια

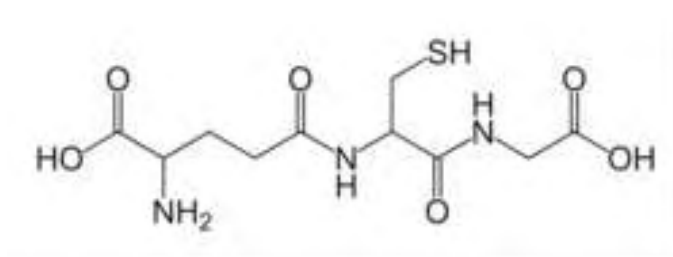
Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001). Ορισμένοι από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες που περιέχονται στον 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
Α-τοκοφερόλη	Λίπη
Συνένζυμο Q10	Λίπη

Πίνακας 2.1: Αντιοξειδωτικά μόρια και οι διαλύτες τους

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



Εικόνα 2.3: Το μόριο της γλουταθειόνης

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.

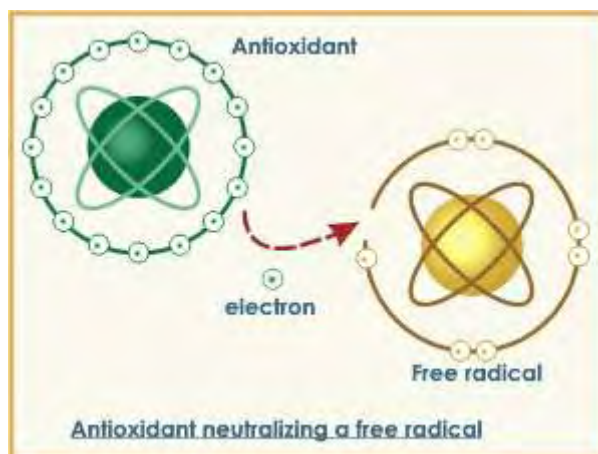
Επιπλέον, ένα μόριο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των καροτενίων, είναι η β-καροτίνη, η οποία είναι λιποδιαλυτή και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Ο κύριος ρόλος της, αφορά την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 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 (Halliwell & 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 A. 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 B, 2001).



Εικόνα 2.4: 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),
- ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR)
- καταλάση (CAT).

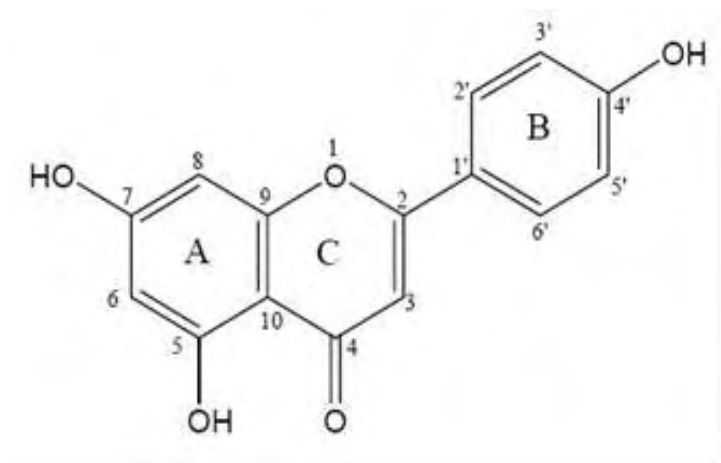
2.3. Πολυφαινόλες και δράση τους

Όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, 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 την συγκεκριμένη ένωση, σε υψηλή περιεκτικότητα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η πολυφαινολική ουσία ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών και έχει σημαντική χημειοπροστατευτική ιδιότητα. 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 σταφυλίου.

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.

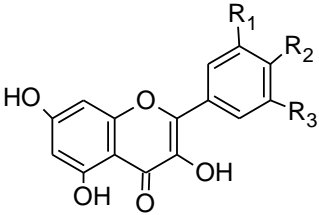
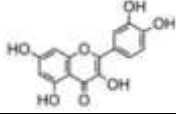
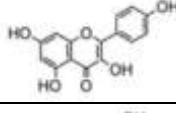
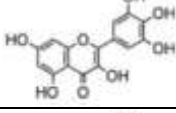
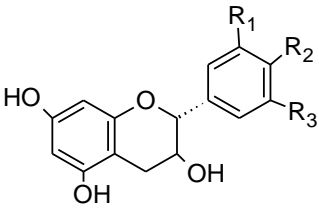
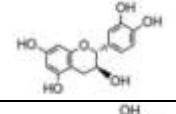
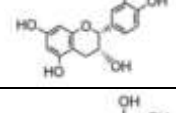
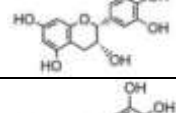
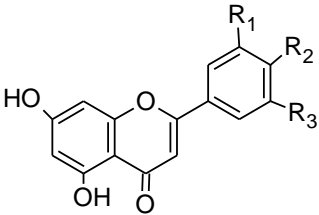
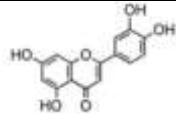
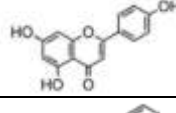
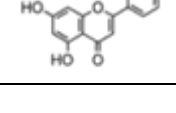
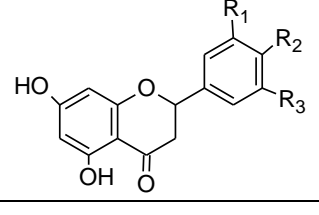
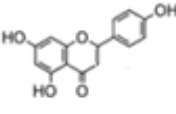
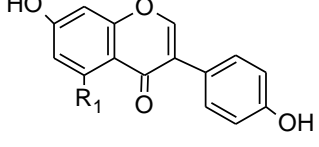
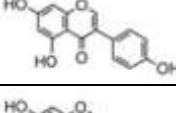
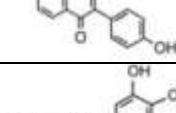
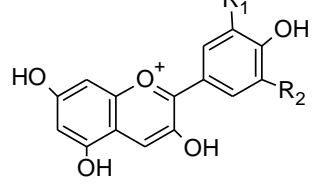
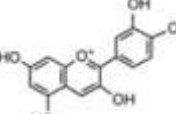
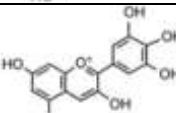


Εικόνα 2.5: Χημική δομή πολυφαινολών (Σπανού 2010)

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:

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R _{1,2,3} : -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	

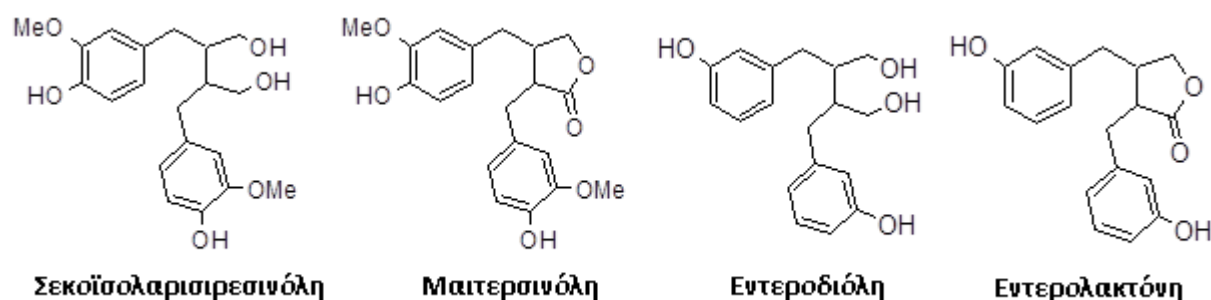
Πίνακας 2.2: Τα φλαβονοειδή (Σπανού 2010)

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

Υδροξυβενζοϊκά οξέα		Υδροξυκινναμικά οξέα		
				
Γαλλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	Κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό οξύ	Φερουλικό οξύ
R ₁	OH	OH	OH	OCH ₃
R ₂	OH	-	OH	OH
R ₃	OH			

Πίνακας 2.3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων (Σπανού 2010)

Ακολουθούν παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των λιγανών:

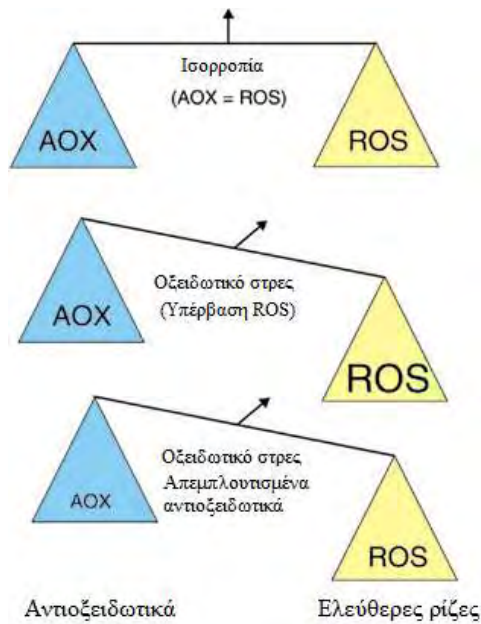


Εικόνα 2.6: Ενώσεις όπως η Εντεροδιόλη και η Εντερολακτόνη, ανήκουν στις λιγάνες (Σπανού 2010)

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.

2.4. Οξειδωτικό στρες

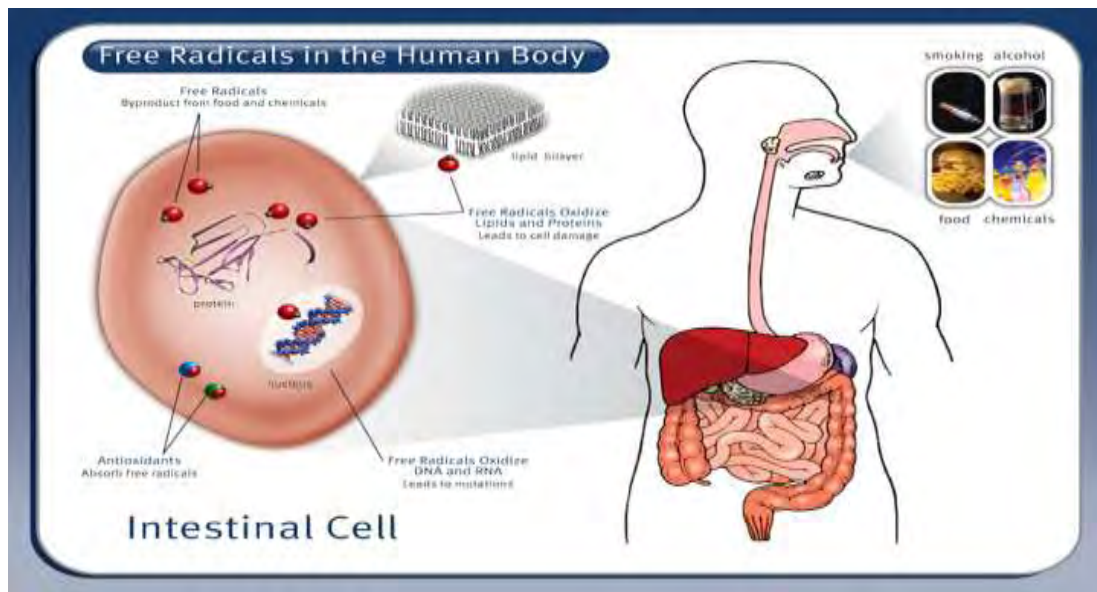
Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Ο όρος αυτός, έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, με συνέπεια την καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).



Εικόνα 2.7: Τρόπος δημιουργίας Οξειδωτικού στρες

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.

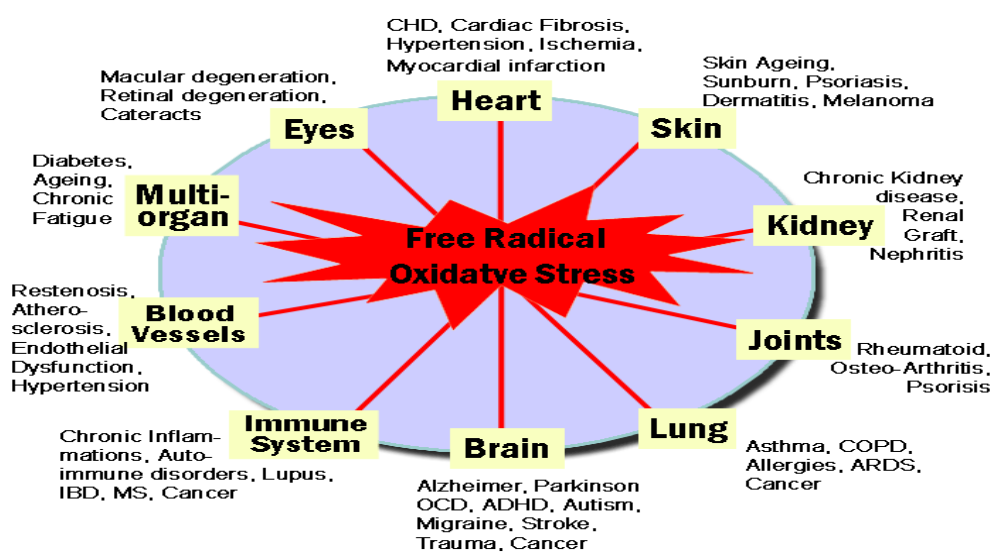
Αναλυτικότερα, στα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες, συγκαταλέγονται η μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και η οξείδωση μορίων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA. Μάλιστα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Lyras et al, 1977). Στην περίπτωση του DNA, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πυρίνες, 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).



Εικόνα 2.8: Επίδραση ελευθέρων ριζών στον οργανισμό

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

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



Εικόνα 2.9: Νόσοι που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και ελεύθερες ρίζες

2.5. Σταφύλια (Γενικές Γνώσεις)

Αρχικά, το σταφύλι (*Vitis vinifera*) αποτελεί τον καρπό του αμπελιού. Ο καρπός αυτός είναι γνωστός στον άνθρωπο από την παλαιολιθική εποχή και πριν την εμφάνιση των παγετώνων, ευδοκμούσε στις περιοχές της Βόρειας Ευρώπης και της Ισλανδίας. Μετά όμως την εμφάνιση των παγετώνων, οι τοποθεσίες καλλιέργειας διαφοροποιήθηκαν και σήμερα, ο καρπός του σταφυλιού αφθονεί στις Μεσογειακές χώρες, την Νότιο Αφρική αλλά και στις περιοχές της Αμερικανικής ηπείρου, όπου το κλίμα είναι εύκρατο.

Το σταφύλι και συγκεκριμένα ο βότρυς του σταφυλιού απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, το οποίο ονομάζεται και βόστρυχα. Άλλες ονομασίες του βόστρυχα είναι το τσαμπί. Το υπόλοιπο μέρος του σταφυλιού ονομάζεται ράγες, οι οποίες και αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Ακόμα, τα στέμφυλα αποτελούν το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιξης / πίεσης τους.



Εικόνα 2.10: Σταφύλι από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου

Όσον αφορά την σύσταση του καρπού, το σταφύλι είναι πλούσιο σε βιταμίνες και οργανικά άλατα που απαιτούνται για την εύρωστη λειτουργία ενός οργανισμού. Η κατανάλωση του καρπού, επομένως, συντελεί στην ανανέωση και αναζωογόνηση των κυττάρων του οργανισμού, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα ανανεωμένα αυτά κύτταρα, με την εναλλαγή της ύλης που πραγματοποιείται, αντικαθιστούν τα γερασμένα και φθαρμένα, αποκτούν νέα ζωτικότητα, ελαστικότητα κι ακμή. Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα την ελευθέρωση των ιστών από τραχύτητα, των αρτηριών και των νεύρων από σκλήρυνση, ενώ επαναφέρεται η ευλυγισία των μυών.

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

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



Εικόνα 2.11: Οι ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού είναι γνωστές από την αρχαιότητα

Παρόλο που έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την εύρεση της ακριβούς σύστασης των σταφυλιών και του κρασιού, αυτή δεν έχει καταστεί πλήρως γνωστή. Για την ακρίβεια, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 χημικές ουσίες, εκ των οποίων οι 150 ανήκουν στην κατηγορία των εστέρων. Ακόμα, μεταξύ αυτών των συστατικών συγκαταλέγονται το νερό, σάκχαρα, οργανικά οξέα και διάφορες

αρωματικές ενώσεις. Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νερού εντός του καρπού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Η πλειοψηφία των ενώσεων, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις με εύρος 10^{-1} - 10^{-6} mg/lit ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση >100mg/Lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson 1993).

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

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

Εικόνα 2.12: Σύσταση του εκχυλίσματος στέμφυλων

3. Σκοπός

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος στεμφύλων από την ποικιλία *Vitis vinifera*, Μπατίκι Τυρνάβου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε ο δείκτης οξειδωτικού στρες ROS με κυτταρομετρία ροής, καθώς επίσης και οι δείκτες ABTS και TAC με φασματοφωτομετρία.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1. Υλικά

Για την περαίωση της έρευνας, 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 περιεκτικότητά του ανέρχεται στο 10%. 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

Πίνακας 4.1: 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.

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

- Χρωστική DCF (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 αλλά και τον καθαρισμό του κυτταρόμετρου.

Στην συνέχεια, για την μέθοδο ABTS σε υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος, τα υλικά που χρειάστηκαν είναι τα εξής:

- Διάλυμα ρίζας ABTS
- Διάλυμα H₂O₂
- Διάλυμα HRP
- Vitamin C / Ασκορβικό οξύ ως θετικός μάρτυρας
- Απεσταγμένο νερό

Ακόμα, για την μέθοδο TAC σε κυτταρικό αιώρημα, απαιτούνται τα εξής:

- Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4
- DPPH 0.1 mM
- Ασκορβικό Οξύ 10 mM

Για την μέθοδο Bradford, είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια:

- Coomassie Brilliant Blue G250
- Αλβουμίνη για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης

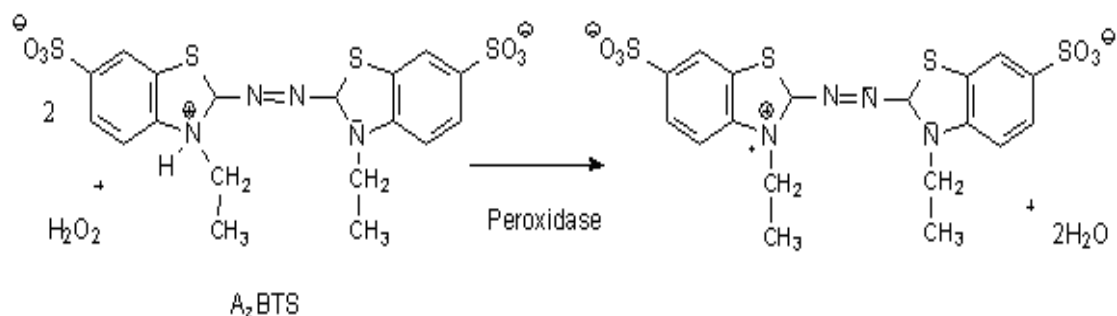
Τέλος, για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα SPSS, η ανάλυση ANOVA.

4.2. Μέθοδοι

4.2.1 Μέθοδος ABTS

Μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας, θα πραγματοποιηθεί εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος μέσω της ικανότητας δέσμευσης των ριζών ABTS^{•+}. Αναλυτικότερα, όσον αφορά την μέθοδο, αυτή βασίζεται στην

ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα $ABTS^{\cdot+}$. Η συγκεκριμένη ρίζα είναι δυνατόν να παραχθεί από τη οξείδωση της ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)], μέσω της δράσης υπεροξειδάσης (HRP), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 4.1: Οξείδωση της ABTS μέσω του ενζύμου της υπεροξειδάσης

Εφόσον έχουμε σχηματίσει την ρίζα μας, μπορούμε να προχωρήσουμε στην πειραματική διαδικασία. Η ουσία αυτή φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά σε μήκος κύματος ίσο με 730 nm. Όταν όμως στο διάλυμα το οποίο περιέχει την ρίζα προσθέσουμε το αντιοξειδωτικό, έχουμε την αναγωγή της ουσίας, δηλαδή την αντιστροφή της παραπάνω αντίδρασης. Αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης της $ABTS^{\cdot+}$ και κατ' επέκταση την μείωση της απορρόφησης της στα 730 nm.

Όσον αφορά την διαδικασία $ABTS^{\cdot+}$, ετοιμάζουμε σε πλαστικά erpendorf 1,5 ml, τα εξής διαλύματα:

	Blank	Control	Εκχύλισμα
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL
HRP	-	50 μL	50 μL
V _{τελικό}	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	-	25 μL

Πίνακας 4.2: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο ABTS

Είναι σημαντικό τα διαλύματα να προστεθούν με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα. Το εκχύλισμα, προστίθεται τελευταίο, εφόσον έχει προηγηθεί επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά, έτσι ώστε να έχει προηγηθεί η δημιουργία ριζών του ABTS. Έπειτα ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα (RSC), η οποία και δίνεται από τον τύπο:

$$\% RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Για την συγκεκριμένη διαδικασία, θα μελετηθεί ένα εύρος συγκεντρώσεων, με στόχο τον εντοπισμό της IC50. Ως IC50, ορίζουμε την συγκέντρωση του εκχυλίσματος, η οποία όταν αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένη ποσότητα της ρίζας, την εξουδετερώνει/αναστέλλει κατά 50%. Για αυτόν το σκοπό, χρησιμοποιούμε την εξίσωση που προκύπτει από την γραμμή τάσης, σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν. Μάλιστα, η IC50, ορίζεται από το σημείο, το οποίο θα ανήκει στην καμπύλη και θα έχει τις συντεταγμένες (x,50).

4.2.2 Μέθοδος Flow Cytometry (Κυτταρομετρία Ροής)

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που θα χρησιμοποιήσουμε για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας είναι η κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry). Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη χρήση laser για την καταμέτρηση και τον διαχωρισμό κυττάρων. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη πολύ-παραμετρική ανάλυση των φυσικών και/ή των χημικών χαρακτηριστικών σε πάνω από χιλιάδες σωματίδια ανά δευτερόλεπτο.

Συνήθως, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την διάγνωση διαταραχών υγείας, ειδικότερα λευχαιμιών, αλλά έχει και πολλές άλλες εφαρμογές στην βασική έρευνα. Μια κοινή χρήση αποτελεί ο διαχωρισμός των κυττάρων σύμφωνα με τις ιδιότητές τους.

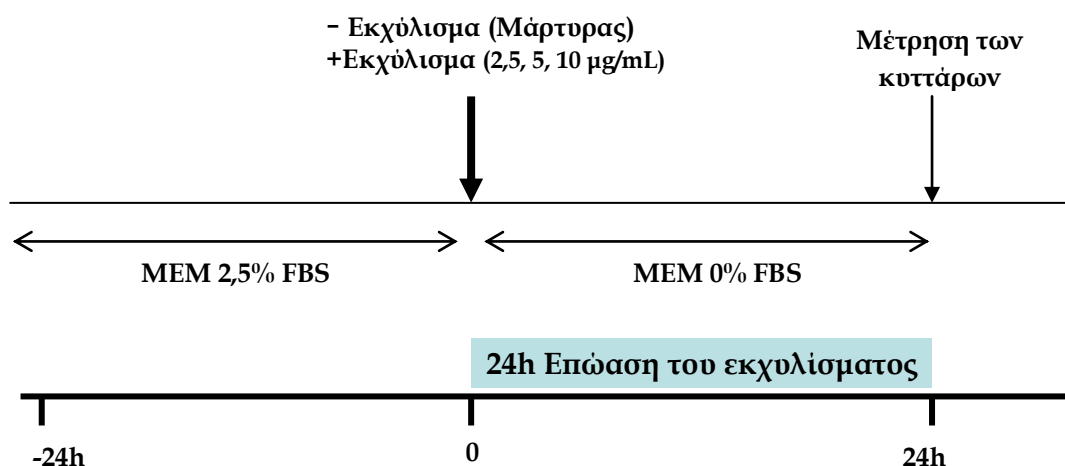


Εικόνα 4.2: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

Όσον αφορά την αρχή της μεθόδου, μια δέσμη φωτός (συνήθως η δέσμη είναι laser) ενός μόνο μήκους κύματος οδηγείται πάνω στο υδροδυναμικό ρεύμα υγρού. Ένα πλήθος από ανιχνευτές στοχεύονται στο σημείο από το οποίο το ρεύμα διέρχεται

μέσα από την δέσμη των ακτίνων. Ο πρώτος ανιχνευτής αφορά τον καθορισμό του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC). Ο δεύτερος αφορά την κοκκίωση του κυττάρου, δηλαδή με άλλα λόγια την πολυπλοκότητά του (Side Scatter or SSC). Όσο πιο κοκκιωμένο είναι ένα κύτταρο, τόσο υψηλότερο θα εμφανίζεται το επίπεδο του SSC. Επιπλέον, εκτός από τις δυο αυτές βασικές παραμέτρους, το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής είναι σε θέση να ανιχνεύσει και φθορίζοντες ανιχνευτές. Ένα κλασσικό παράδειγμα τέτοιου ανιχνευτή αποτελεί η χρωστική DCF.

Η διαδικασία είναι δυνατόν να διαχωριστεί σε δυο μέρη, με το πρώτο να αφορά την καλλιέργεια των κυττάρων και το δεύτερο την ανάλυση. Αρχικά, μεταφέρουμε κύτταρα σε φλάσκες με αραίωση τέτοια ώστε κατά την έναρξη της διάρκειας της ανάλυσης, τα κύτταρα να καλύπτουν τουλάχιστον το 75-80% της φλάσκας. Αναλυτικότερα, ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 4.3: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων C2C12. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό MEM εμπλουτισμένο με 2,5% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού στις 24 h σε MEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη μέτρηση των κυττάρων.

Τα κύτταρα εφόσον τοποθετηθούν στην φλάσκα, επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό MEM (6-7 mL), το οποίο και έχουμε εμπλουτίσει με 2,5% FBS. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούμε πλύσεις με PBS. Εφόσον αφαιρεθεί το PBS, προσθέτουμε MEM ίδιας ποσότητας, χωρίς FBS αυτήν την φορά. Βέβαια, στην περίπτωση που η φλάσκα αποτελεί μάρτυρα, τότε τοποθετούμε ποσότητα θρεπτικού υλικού με FBS. Στις φλάσκες που έχουμε τοποθετήσει MEM χωρίς FBS, προστίθενται και τα εκχυλίσματα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (2,5, 5, 10 µg/mL).

Μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων, τα κύτταρα επωάζονται για 24 h και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε MEM χωρίς FBS. Αυτό συμβαίνει για να

αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με τα εκχυλίσματα και κατά αυτόν τον τρόπο να επηρεαστούν τα αποτελέσματα.

Με το πέρας της επώασης των κυττάρων παρουσία εκχυλίσματος, ακολουθεί η αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας με τη χρήση τρυψίνης. Αναλυτικότερα, αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται έτσι ώστε να αφαιρεθεί εντελώς το θρεπτικό υλικό, για να μην επηρεάσει την διαδικασία. Στην συνέχεια, τοποθετούμε στην φλάσκα 330 μ L από 0,1% διάλυμα τρυψίνης/EDTA και επωάζουμε για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Στην συνέχεια, επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 4 mL θρεπτικού υλικού MEM με 2,5% FBS και τα τοποθετούμε σε erpendorfs των 10 mL.

Η δράση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος εξεταζόταν εις τριπλούν σε ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

Συνεχίζοντας την διαδικασία, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

✓ Τα erpendorfs που έχουμε συλλέξει από κάθε φλάσκα φυγοκεντρώνται κάτω από συνθήκες 300 G στους 5 βαθμούς, για 5 λεπτά.

✓ Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται ίση ποσότητα διαλύματος PBS. Στην συνέχεια επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση.

✓ Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται εκ νέου PBS (2 mL).

✓ Στην συνέχεια, τα κύτταρα από κάθε erpendorf, κατανέμονται σε 2 πλαστικά σωληνάκια (tubes), εκ των οποίων το πρώτο θα αναλυθεί χωρίς την προσθήκη χρωστικής.

✓ Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

✓ Ακολουθεί η επαναιώρηση σε νερό όγκου 150 μ L και 15 μ L χρωστικής DCF.

✓ Τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες ανάπτυξης για 30 min και στην συνέχεια φυγοκεντρώνται.

✓ Το υπερκείμενο από τα δείγματα απομακρύνεται εκ νέου και προστίθενται 250 μ L PBS.

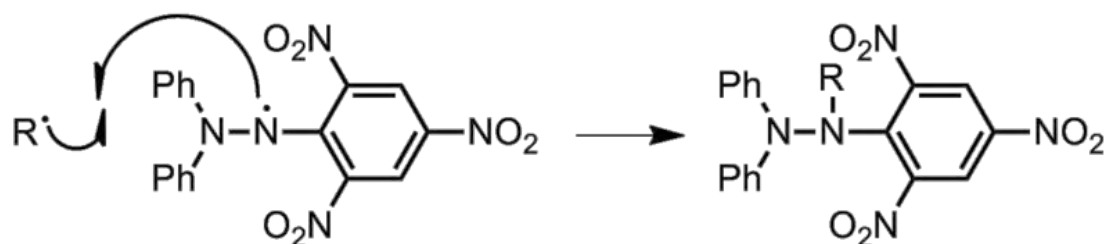
✓ Τα δείγματα είναι έτοιμα προς ανάλυση, εφόσον έχουν οριστεί οι ορθές παραμέτροι με την βοήθεια των unstained κυττάρων.

4.2.3 Μέθοδος TAC

Στο τρίτο σκέλος της έρευνας, θα πραγματοποιηθεί η μέθοδος της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), η οποία ορίζεται ως η ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες. Ακόμα, το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο με τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%), προκαλώντας μεγάλη αύξησή της, όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Η βιταμίνη C είναι το δεύτερο κατά σειρά ισχυρότερο μόριο, με τις

βιταμίνες E και A να την ακολουθούν. Μάλιστα, οι βιταμίνες C και E είναι πιθανό να αποτελούν το 25% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

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



Εικόνα 4.3: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό

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

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

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

Πίνακας 4.3: Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο TAC

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

Το επόμενο μας βήμα είναι η συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση 3000 g για 5 min στους 4°C. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται

και το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) το οποίο είναι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των πλύσεων, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4). Η διάρρηξη των κυττάρων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του μηχανήματος Sonicator για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 15 min στους 4°C και συλλογή του υπερκείμενου που αποτελεί το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Το υπερκείμενο διάλυμα, είναι δυνατόν να αποθηκευτεί -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Έπειτα, το επόμενο βήμα είναι μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η μέτρηση απαιτεί >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, $\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \cdot 100$
- $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL αιωρήματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \cdot 50 \cdot 50] / 1000$

Σημειώνουμε τα εξής:

- α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.
- β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.
- γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 20 διότι η 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.

4.2.4 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford, απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Αρχικά, για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων πρέπει να γίνει μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αλβουμίνη, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Ακόμα, η αρχή της μεθόδου αφορά την 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).

Αναλυτικότερα, για την πρότυπη καμπύλη της αλβουμίνης χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/mL, ενώ για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος προστίθεται 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 µL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford Εφόσον τοποθετήσουμε την χρωστική, τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ως ότου σταθεροποιηθεί το χρώμα. Το τελευταίο βήμα είναι η φωτομέτρηση στα 505 nm. Ως τυφλό, χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 µL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των οπτικών μετρήσεων που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη, με την οποία γίνεται η αντιστοίχιση της τιμής της απορρόφησης με την ποσότητα του δείγματος.

4.2.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια των μεθόδων που παρουσιάστηκαν ανωτέρω, υφίστανται επεξεργασία με την βοήθεια του προγράμματος SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Το SPSS, εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1968 και δημιουργοί του ήταν οι Norman H. Nie και C. Hadlai Hull.

Το SPSS χρησιμοποιείται ευρύτατα για την στατιστική ανάλυση στις κοινωνικές επιστήμες, αλλά και στις επιστήμες υγείας. Οι στατιστικές που περιλαμβάνονται στην βάση δεδομένων του προγράμματος κατανέμονται σε τέσσερις συνολικά κατηγορίες και είναι οι:

- Περιγραφικές Στατιστικές (Cross tabulation, Frequencies, Descriptives, Explore, Descriptive Ratio Statistics)
- Διμεταβλητές στατιστικές [Means, t-test, ANOVA, Correlation (bivariate, partial, distances), Nonparametric tests]
- Πρόβλεψη για αριθμητικό αποτέλεσμα (Linear regression)
- Πρόβλεψη για τον προσδιορισμό των ομάδων [Factor analysis, cluster analysis (two-step, K-means, hierarchical), Discriminant]

Ειδικότερα, στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η διμεταβλητή στατιστική ANOVA. Η συγκεκριμένη ανάλυση αποτελεί σημαντικό εργαλείο, έτσι ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο τα αποτελέσματα που προέκυψαν, είναι στατιστικά σημαντικά, δηλαδή αυτά να μην έχουν προέλθει από τυχαίους παράγοντες.

Τα αποτελέσματα θεωρούνται ως στατιστικά σημαντικά, όταν η πιθανότητα σφάλματος που υπολογίζεται, δεν υπερβαίνει το 0,05 (δηλαδή το 5%). Βέβαια, ανάλογα με την στατιστική ανάλυση που επιλέγεται, υπάρχουν και άλλα επίπεδα σημαντικότητας, όπως το 0,01 (1%) ή το 0,001 (1%)

5. Αποτελέσματα

5.1. Αποτελέσματα Μεθόδου ABTS

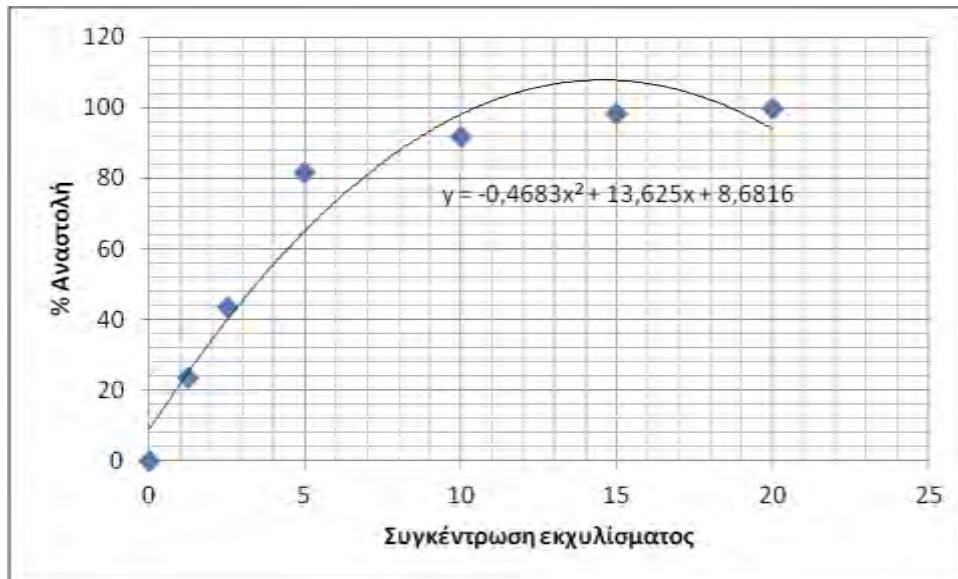
Σύμφωνα με την πορεία της έρευνας, η πρώτη διαδικασία που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της μεθόδου με την ρίζα ABTS. Όπως προαναφέρθηκε, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε υδατικό διάλυμα που περιείχε το εκχύλισμα σε ποικίλες συγκεντρώσεις, όπως αναγράφονται στον πίνακα. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δυο φορές.

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν μετά το πέρας της διαδικασίας παραθέτονται παρακάτω:

A/A	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (μg/mL)	% Αναστολή	Τυπική απόκλιση
1	20	99,75	0,35
2	15	98,20	2,55
3	10	91,55	11,30
4	5	81,56	3,63
5	2,5	43,60	9,76
6	1,25	23,56	5,12
Control	0	0	0

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα της μεθόδου ABTS

Επομένως το γράφημα της αναστολής της ρίζας, ως προς την συγκέντρωση του εκχυλίσματος είναι το ακόλουθο:



Εικόνα 5.1: Γράφημα της αναστολής της ρίζας, ως προς την συγκέντρωση του εκχυλίσματος

Από την εξίσωση που προκύπτει, υπολογίζουμε το IC₅₀, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 3,44 μg/mL.

5.2. Αποτελέσματα Μεθόδου Κυτταρομετρίας Ροής

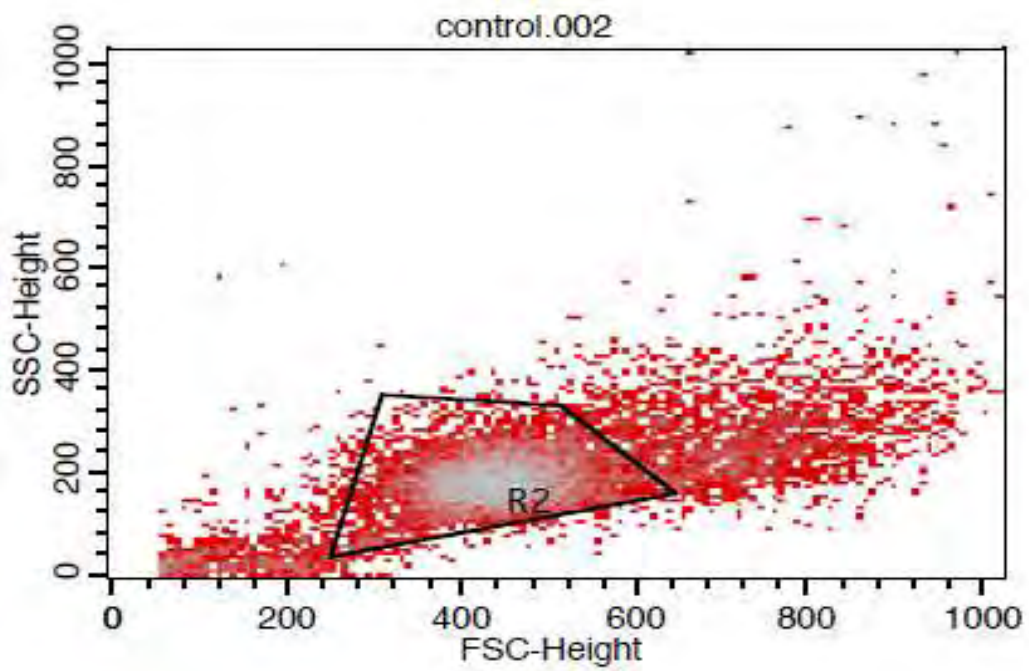
Για την κυτταρομετρία ροής επιλέχθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο XTT σε άλλη εργασία του εργαστηρίου (Μαυρίδου 2012). Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σταφυλιού ήταν 2,5, 5, 10 μg/mL.

Η διαδικασία της κυτταρομετρίας πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές. Μετά την διεξαγωγή των εργαστηριακών πειραμάτων, συγκεντρώνονται τα δεδομένα μας σε δυο είδη γραφημάτων. 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 DCF, η οποία αλληλεπιδρά με τα ROS.

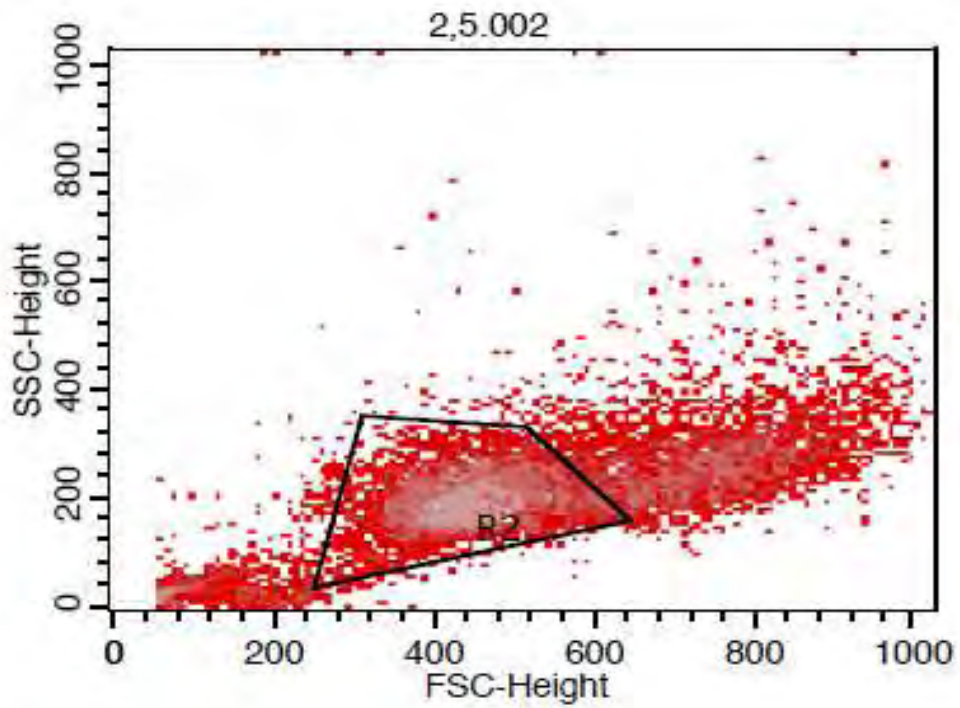
- Πρώτο πείραμα

Αρχικά τα διαγράμματα FSC-SSC τόσο για τον μάρτυρα, όσο και για τα κύτταρα υπό την επίδραση του εκχυλίσματος, παραθέτονται παρακάτω:

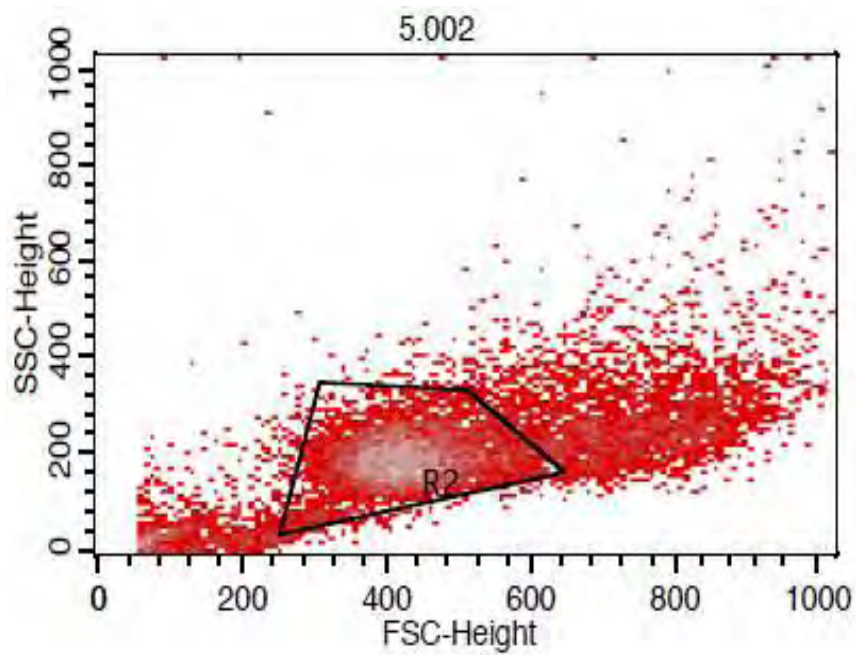
1. Μάρτυρας



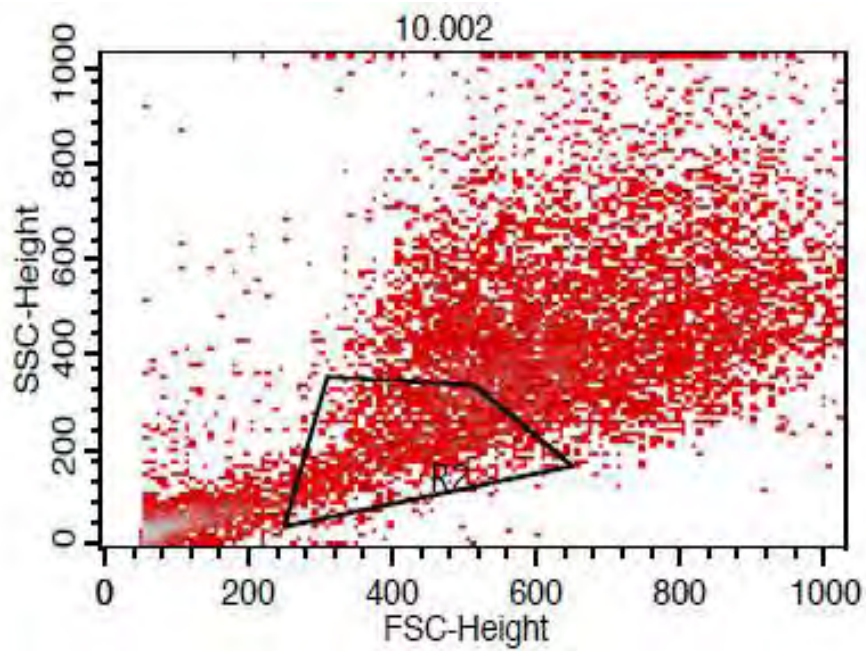
2. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



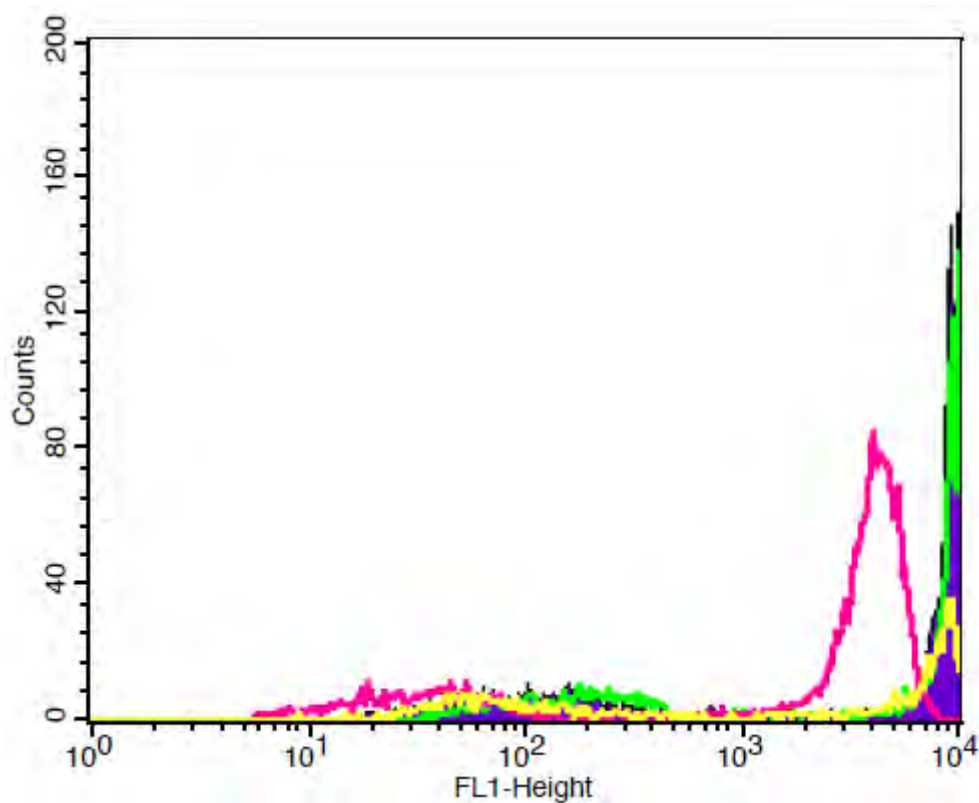
3. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g/mL}$



4. 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 DCF, υποδεικνύοντας τα επίπεδα των ROS:



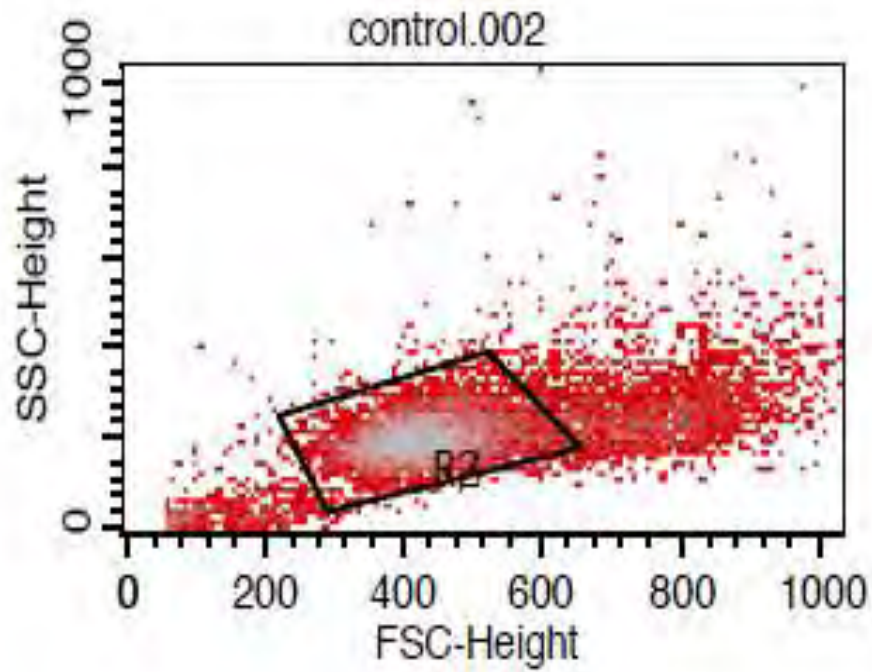
Όπου

- ✓ Μπλε γραμμή: μάρτυρας
- ✓ Πράσινη γραμμή: 2,5 $\mu\text{g/mL}$
- ✓ Κόκκινη γραμμή: 5 $\mu\text{g/mL}$
- ✓ Κίτρινη γραμμή: 10 $\mu\text{g/mL}$

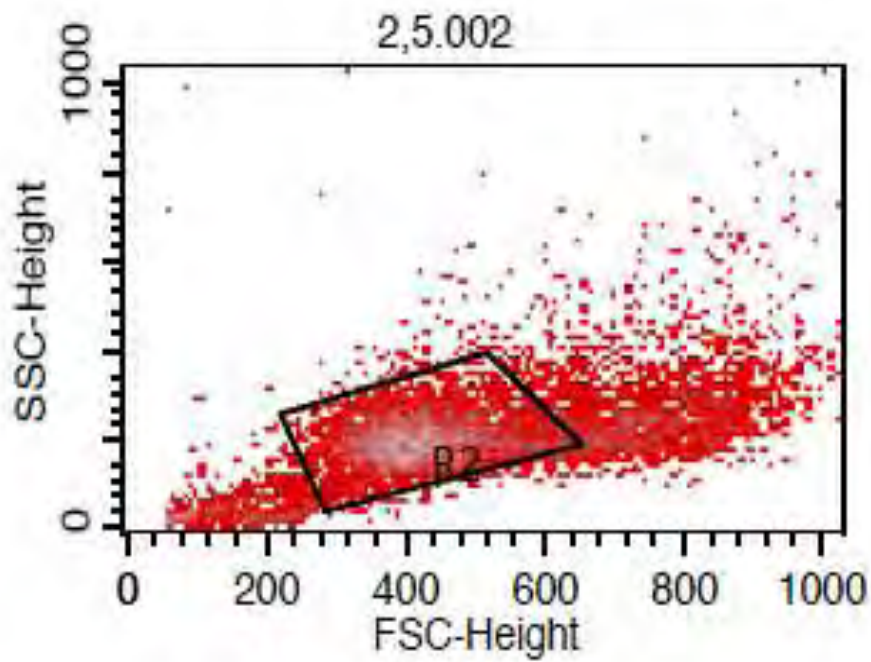
- Δεύτερο πείραμα

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

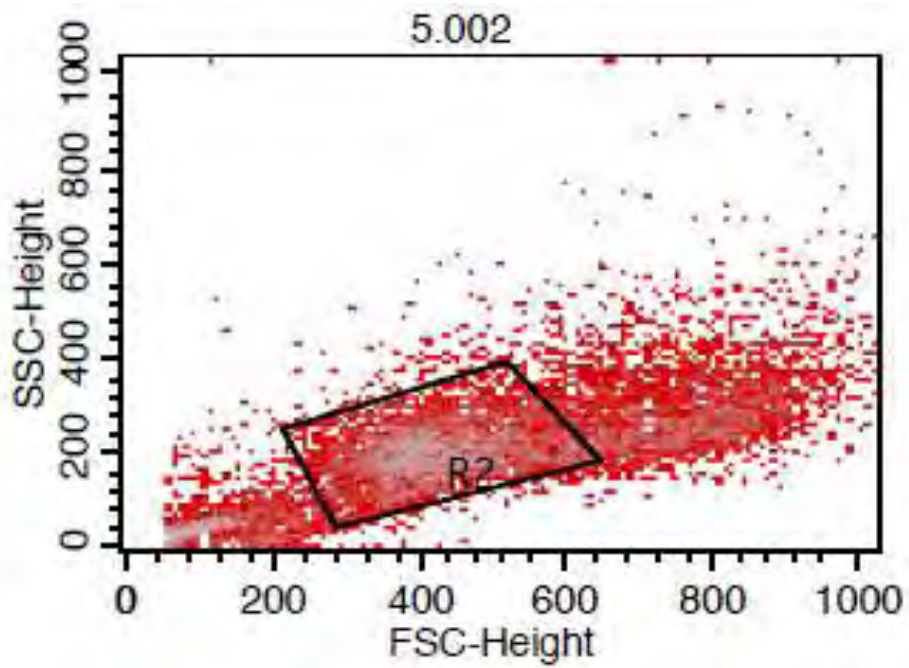
1. Μάρτυρας



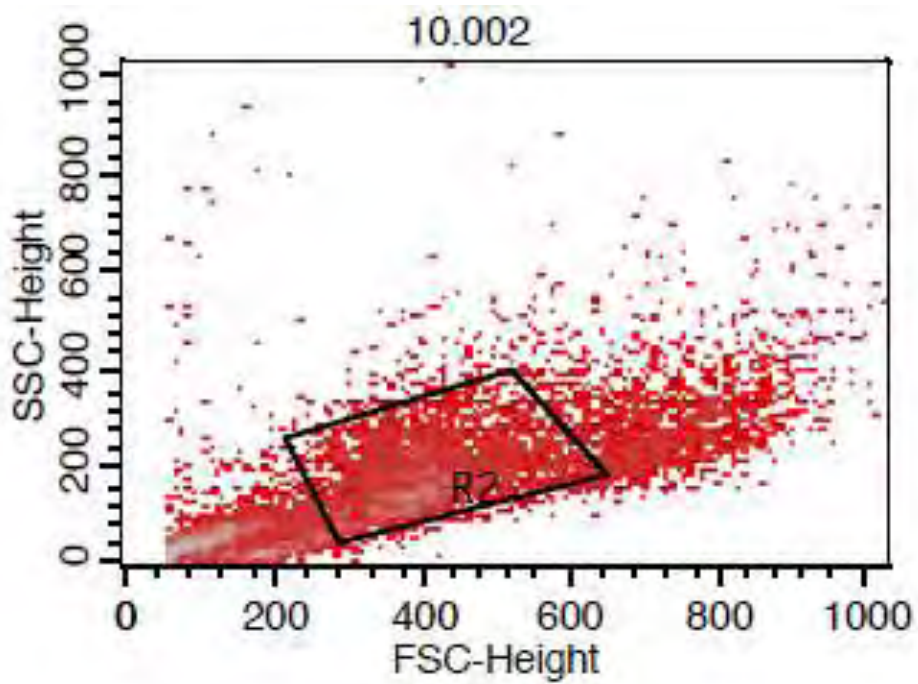
2. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



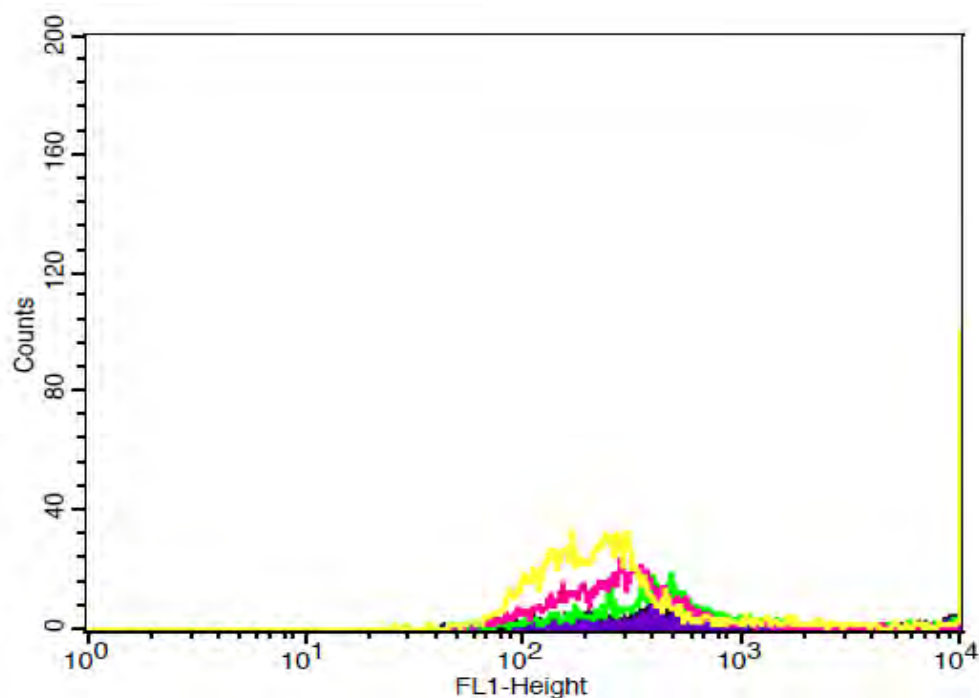
3. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g/mL}$



4. 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 DCF:



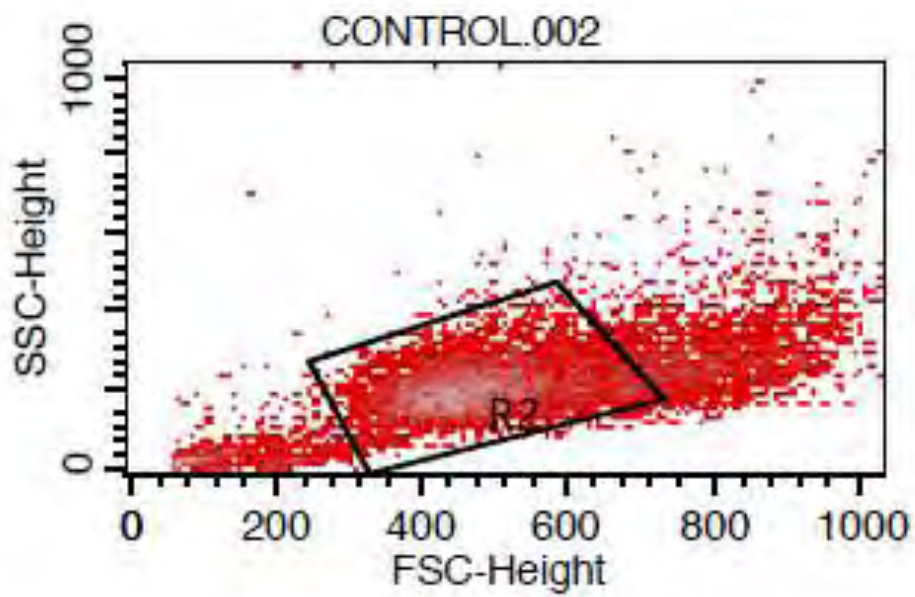
Όπου

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

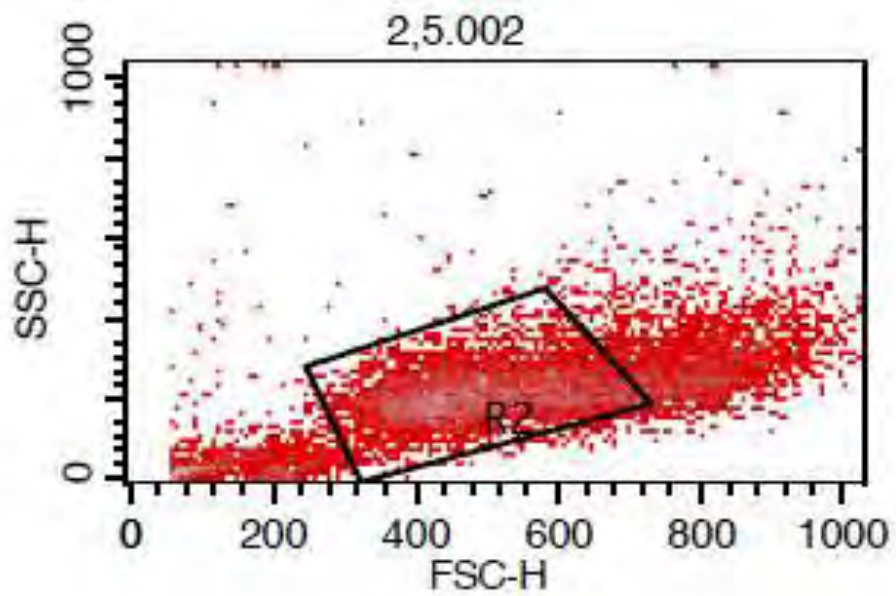
- Τρίτο πείραμα

Όπως και προηγουμένως, αρχικά παραθέτουμε τα διαγράμματα FSC-SSC, των εξεταζόμενων δειγμάτων:

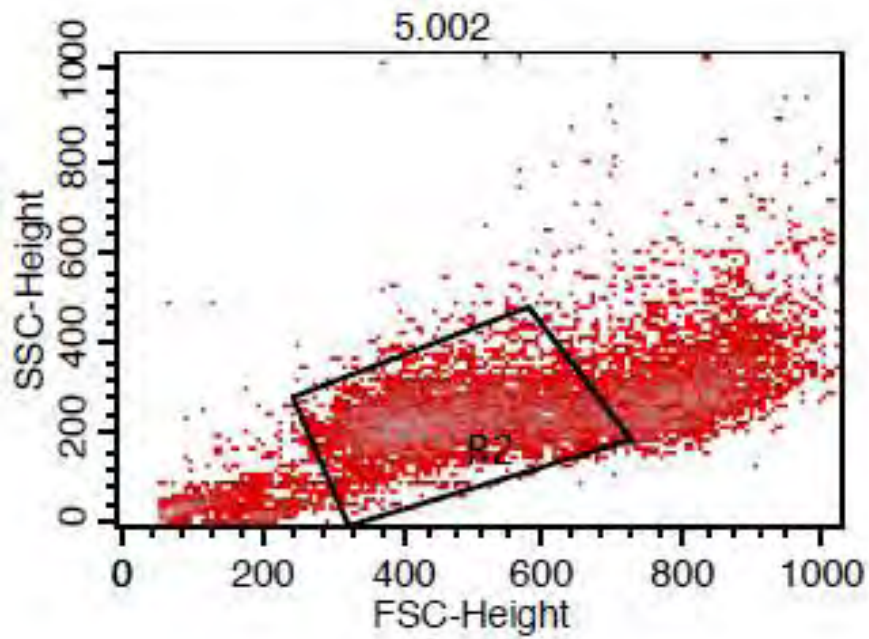
1. Μάρτυρας



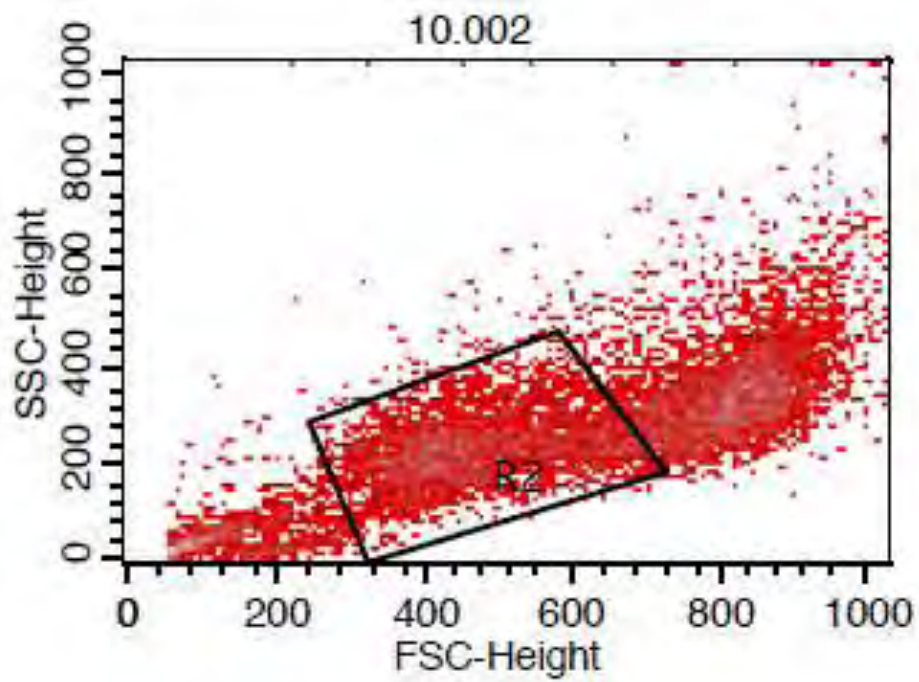
2. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



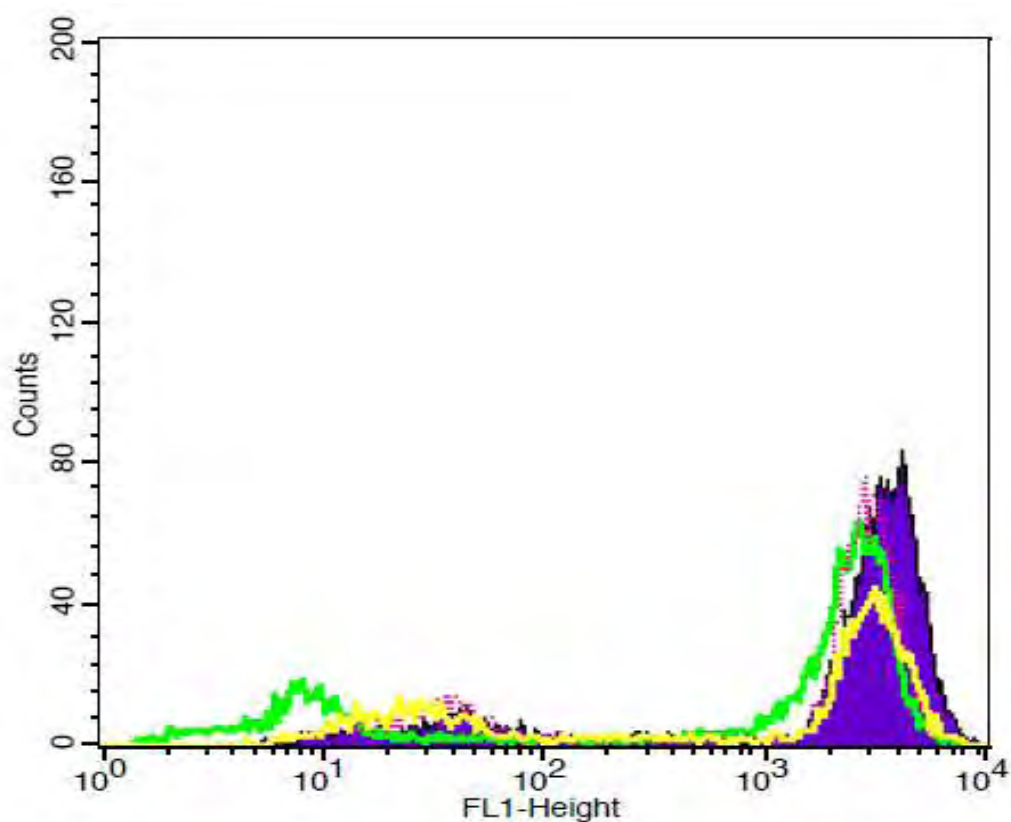
3. Κύτταρα υπό την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g/mL}$



4. 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 DCF:



Όπου

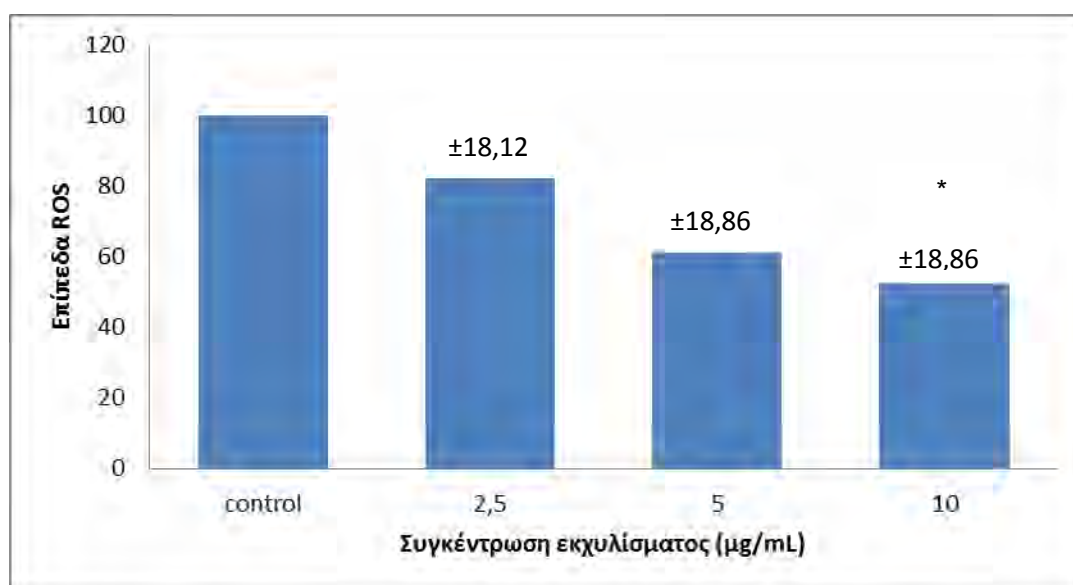
- ✓ Μπλε γραμμή: μάρτυρας
- ✓ Πράσινη γραμμή: 2,5 µg/mL
- ✓ Κόκκινη γραμμή: 5 µg/mL
- ✓ Κίτρινη γραμμή: 10 µg/mL

Ο μέσος όρος των επιπέδων των ROS, που ανιχνεύθηκε στις υπό μελέτη συνθήκες, παραθέτεται στον παρακάτω πίνακα:

Συγκέντρωση εκχυλισματος (µg/mL)	Απορρόφηση	Ποσοστιαία σχέση με control (%)	Τυπική απόκλιση
control	6665,94	100	-
2,5	5848,8	82,42	18,12
5	3814,57	61,24	18,86
10	3104,377	52,41	24,82

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα Flow cytometry

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει το εξής γράφημα, προσφέροντας μας σημαντικές πληροφορίες για την επίδραση κάθε συγκέντρωσης στα ενδογενή ROS:



Εικόνα 12: Επίπεδα των ROS σε σχέση με την συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Μεταξύ του control και της συγκέντρωσης 10 µg/mL ισχύει ότι $P < 0,05$ (μέσω ανάλυσης στο SPSS)

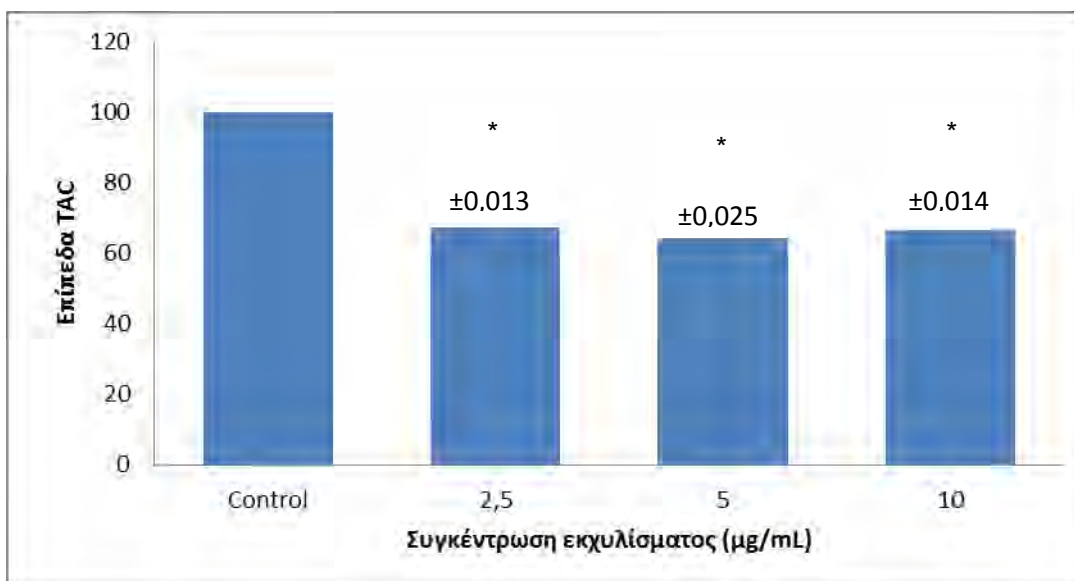
5.3. Αποτελέσματα Μεθόδου TAC

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέθοδο TAC.

Συγκέντρωση εκχυλίσματος (µg/mL)	Επίπεδα TAC	Ποσοστιαία σχέση με control (%)	Τυπική απόκλιση
Control	0,210	100	-
2,5	0,142	67,48	0,013
5	0,136	64,52	0,025
10	0,140	66,67	0,014

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα μεθόδου TAC

Επομένως προκύπτει και το εξής γράφημα:



Εικόνα 13: Επίπεδα της TAC σε σχέση με την συγκέντρωση εκχυλίσματος. Για όλες τις συγκεντρώσεις ισχύει $P < 0,05$ (μέσω ανάλυσης στο SPSS)

6. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα που συλλέξαμε κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, προσφέρουν πλούσιες πληροφορίες σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου. Επίσης, εγείρονται και σημαντικά ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο δράσης του εκχυλίσματος. Τα δεδομένα που προκύπτουν, προσθέτουν περισσότερο ενδιαφέρον και δίνουν την κατευθυντήρια γραμμή για την διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας.

Αρχικά, υπολογίζουμε την IC50 του εκχυλίσματος, όσον αφορά την μέθοδο ABTS, η οποία αντιστοιχεί στα 3,44 µg/mL. Όμως το εύρος των τιμών που θα χρησιμοποιηθούν κατά την διάρκεια της έρευνας, καθορίζεται από την μέθοδο XTT (Μαυρίδου 2012). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα αποκτά σημαντική κυτταροτοξική δράση κοντά στα 20 µg/mL, καταστρέφοντας το 20% των κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, αποφασίζουμε να μελετήσουμε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις όπου η κυτταροτοξικότητα είναι αμελητέα, καταλήγοντας τελικά στις 2,5, 5 και 10 µg/mL. Οι συγκεκριμένες τιμές βρίσκονται πολύ κοντά και στην IC50 που υπολογίστηκε με την βοήθεια της μεθόδου ABTS.

Υπό συνθήκες άσκησης, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ριζών αλλά και άλλων μορφών ROS. Αναλυτικότερα, έρευνες δείχνουν τα κυτταροτοξικά ROS, ως έναν σημαντικό παράγοντα στις βλάβες που προκαλούνται από την άσκηση στα μυϊκά κύτταρα. Αυτές οι αλλαγές, είναι δυνατόν να έχουν σαν αποτέλεσμα στην

κόπωση του μυός και κατά αυτόν τον τρόπο να συνεισφέρουν στον μυϊκό τραυματισμό.

Τα μυϊκά κύτταρα για να αμυνθούν έναντι των ROS, διαθέτουν περίπλοκους μηχανισμούς, με στόχο την μείωση του κινδύνου ενός οξειδωτικού τραυματισμού. Αυτοί, όπως προαναφέραμε στην ενότητα 2.2, είναι δυνατόν να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και η δεύτερη τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα. Στην πρώτη κατηγορία, τα σημαντικότερα ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) και η καταλάση (CAT). Όσον αφορά τα συγκεκριμένα ένζυμα, έρευνες έχουν δείξει ότι η συχνή άσκηση διαρκείας, αυξάνει τα επίπεδα της SOD και της GSHPx, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα της CAT, παραμένουν αμετάβλητα.

Έτσι λοιπόν, εστιάζουμε στην βιολογική επίδραση του εκχυλίσματος στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων C2C12, αλλά και στις ROS που δημιουργούνται από αυτά. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούμε την κυτταρομετρία ροής.

Προτού πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε μέτρηση, πρέπει να μηδενιστεί ο αυτοφθορισμός των κυττάρων ως προς τους δείκτες που. Για αυτόν τον λόγο γίνεται χρήση των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί χρώση (unstained). Επιπλέον, τα unstained κύτταρα χρησιμοποιούνται και για την επιλογή του πληθυσμού που θα μελετηθεί. Σε κάθε περίπτωση, επιλέγεται από το γράφημα ο πληθυσμός που δίνει την μεγαλύτερη πυκνότητα και έχει ίδιες ιδιότητες ως προς το μέγεθος και την κοκκίωση. Έτσι λοιπόν δημιουργείται ένα όριο, το οποίο και αποδέχεται αποκλειστικά τις επιλεγμένες συντεταγμένες, οι οποίες θέτουν και τον πληθυσμό που θα μελετήσουμε από τα κύτταρα που υπέστησαν την χρώση. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του εκχυλίσματος.

Σύμφωνα λοιπόν με τα στοιχεία που παραθέτονται, παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα από το Μπατίκι Τυρνάβου έχει σημαντική επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυϊκών κυττάρων. Αρχικά, όλες οι συγκεντρώσεις μειώνουν τα επίπεδα των ROS, και κατά συνέπεια μειώνουν το οξειδωτικό στρες. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στα κύτταρα, τόσο περισσότερο μειώνονται τα επίπεδα των ROS. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το εκχύλισμα ασκεί άμεση αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτήν την περίπτωση, το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα δίνεται από την συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/mL}$. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι πιθανό να μην δίνει την μέγιστη δράση του εκχυλίσματος και για αυτόν τον λόγο, πρέπει να γίνει διεξαγωγή του ίδιου πειράματος σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Επιπλέον, παρατηρούμε ότι ο κυτταρικός πληθυσμός σε σχέση με τα unstained, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, μετακινείται προς τα δεξιά του γραφήματος, δημιουργώντας ένα νέο υποπληθυσμό. Τα αποτελέσματα όμως δείχνουν ότι ο

συγκεκριμένος υποπληθυσμός έχει τα ίδια επίπεδα κατά μέσο όρο με τον αντίστοιχο που βρίσκεται υπό μελέτη. Αυτό μπορεί να ισχύει εξαιτίας του γεγονότος ότι η χρωστική διαλύεται σε μεθανόλη. Το μικρό μέγεθος της μεθανόλης, της δίνει την ικανότητα να διαχέεται εύκολα εντός του κυττάρου αυξάνοντας τον όγκο του και κατά επέκταση να αλλάζει η κατανομή του στο γράφημα.

Εκτός όμως από την μείωση των ROS, το εκχύλισμα συμβάλει και στην αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, εντός των μυϊκών κυττάρων (Μαυρίδου 2012). Η συγκεκριμένη μέτρηση γίνεται με κυτταρομετρία ροής και πραγματοποιείται με τις ίδιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Μάλιστα, η GSH αυξήθηκε στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10μg/ml κατά 151%, 120% και 168% αντίστοιχα σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι εκτός από την μείωση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών, το εκχύλισμα αυξάνει σημαντικά ένα εκ των σημαντικότερων αντιοξειδωτικών μορίων. Έτσι λοιπόν, η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς μας δίνει ένα διπλό θετικό αποτέλεσμα, στην αποφυγή του κινδύνου τραυματισμού του μυός.

Επιπλέον, η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος επιβεβαιώνεται και από την φασματοφωτομετρική μέτρηση του δείκτη TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) (Μαυρίδου 2012). Η μεγαλύτερη μείωση (66,07%) παρατηρήθηκε στα 10μg/ml ενώ στις συγκεντρώσεις 2,5 και 5μg/ml η μείωση ήταν μικρότερη (29,29% και 37,66% αντίστοιχα). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών μειώνονται, οπότε αυτά αντιδρούν σε μικρότερο βαθμό με τα λιπίδια. Έτσι, αυτά διατηρούνται στην φυσιολογική του κατάσταση και δεν αποτελούν κίνδυνο για την επιβίωση του κυττάρου. Επιπλέον, εκτός από την μείωση των ROS, η γλουταθειόνη αυξάνεται, οπότε μπορεί να αντιδράσει σε περισσότερες ρίζες. Έτσι λοιπόν, σε πρώτο βαθμό το εκχύλισμα μπορεί να αναστείλει άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και έμμεσα με την αύξηση των επιπέδων της GSH.

Παρόμοια πορεία με τα TBARS, ακολουθεί η TAC η οποία μειώθηκε με παρόμοιο τρόπο 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. Επομένως και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούμε δοσοεξαρτώμενη μείωση. Η TAC μειώνεται για τον λόγο ότι το εκχύλισμα έχει ασκήσει την αντιοξειδωτική του δράση, μειώνοντας τα επίπεδα των ριζών, ενώ παράλληλα, αυξάνονται τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα μια υψηλή TAC να μην είναι απαραίτητη για το κύτταρο την συγκεκριμένη χρονική στιγμή, εφόσον τα επίπεδα της οξειδωτικής κατάστασης είναι εμφανώς μειωμένα.

Εκτός όμως από την ανεύρεση της μέγιστης δυνατής δράσης από το εκχύλισμα, έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο τρόπος με τον οποίο δρα το εκχύλισμα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, που θα επάγουν μια αντιοξειδωτική ή προοξειδωτική κατάσταση. Έτσι λοιπόν, τόσο με τον προσδιορισμό των ROS, όσο και με την χρήση άλλων βιοδεικτών, όπως αυτός της γλουταθειόνης, θα ληφθούν χρήσιμες

πληροφορίες για τις αλλαγές που υφίστανται σε βιοχημικό επίπεδο τα κύτταρα. Παράλληλα, επειδή η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος με υψηλή ευαισθησία, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί και για την διερεύνηση του ακριβή μηχανισμού δράσης των πολυφαινολών. Για αυτόν τον λόγο, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η ίδια πειραματική διαδικασία, με μικρότερο χρόνο επώασης. Έτσι, σε κάθε φάση επίδρασης του εκχυλίσματος, θα έχουμε σημαντικές πληροφορίες και για τα επίπεδα των ROS. Σε περίπτωση που ισχύει η θεωρία ότι οι πολυφαινόλες ασκούν στην αρχή μια προ-οξειδωτική κατάσταση, τότε αναμένουμε τα επίπεδα των ROS να είναι ανεβασμένα σε σχέση με τα αποτελέσματα των 24 hr που παρατηρήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

7. Βιβλιογραφία

- 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, Pruess 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, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.
- Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
- Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme* bgy 186, 1990.

- Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “The antioxidants of human extracellular fluids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.
- 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.
- Veskoukis 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
- www.wikipedia.com

- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.
- Γκαλίτσιου Ελισάβετ, (2011), «Μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (*vitis vinifera*).
- Γκουτζουρέλας Νικόλαος, (2010), «Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος από σταφύλι σε δείκτες οξειδωτικού στρες στον καρδιακό και τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ των επιμυών.»
- Κουρέτας Δημήτριος Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Λάρισα 2003.
- Μαυρίδου Παρασκευή, (2012), «Προσδιορισμός Γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής σε μυϊκά κύτταρα επιμύου μετά από επίδραση εκχυλίσματος σταφυλιού»
- Σπανού Χρύσα, «Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα 2010
- Σπύρου Αργύρης, (2010), «Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*vitis vinifera*) και φυτικών πολυφαινόλων σε καρκινικά κύτταρα ήπατος HEPG2»
- Σουφλερός Ε. (2000), Οινολογία, τόμος Ι, Εκδόσεις Παπαγεωργίου