



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΣΧΟΛΗ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά  
κύτταρα υπό την επίδραση μίγματος  
πολυφαινολών από στέμφυλα**

*Study of oxidative stress markers in endothelial cells under  
the influence of polyphenolic extract from grape pomace*



**Χρυσαιγή Καρτερολιώτη  
Διατροφολόγος - Διαιτολόγος**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

**Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά  
κύτταρα υπό την επίδραση μίγματος  
πολυφαινολών από στέμφυλα**

***Study of oxidative stress markers in endothelial cells under the  
influence of polyphenolic extract from grape pomace***

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος** (επιβλέπων): Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας**: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Λέανδρος Σκαλτσούνης**: Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ

## *Ευχαριστίες*

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο Λέκτορα Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου διεύρυνε το γνωστικό μου πεδίο καθώς και για την άψογη συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Κουρέτα Δημήτριο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την άριστη συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήταν παράληψη μου αν δεν ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτωρ Νίκο Γκουτζουρέλα για την πραγματικά πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, να ήθελα να εκφράσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που είναι δίπλα μου και μου προσφέρουν ουσιαστική στήριξη.

## Περιεχόμενα

1. Περίληψη	6
2. Εισαγωγή	
2.1 Ελεύθερες ρίζες	9
2.2 Δραστικές μορφές ελευθέρων ριζών	11
2.2.1 Μονήρες οξυγόνο	11
2.2.2 Όζον	11
2.2.3 Μονοξειδίο του αζώτου	11
2.2.4 Σουπεροξειδίο	12
2.2.5 Υπεροξειδίο του υδρογόνου	13
2.2.6 Υδροξυλικές ρίζες	13
2.2.7 Υπεροξειδικές ρίζες	13
2.2.8 Υποχλωριώδες οξύ	13
2.3 Οξειδωτικές βλάβες στα βιομόρια	
2.3.1 Πρωτεΐνες	14
2.3.2 DNA	15
2.3.3 Λίπη	18
2.4 Αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες ενζυμικής φύσης	
2.4.1 Καταλάση	19
2.4.2 DT- διαφοράση	20
2.4.3 Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου	20
2.4.4 Θειορεδοξίνες - Αναγωγή της θειορεδοξίνης	20
2.4.5 Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης	21
2.4.6 Τρανσφεράσες -S της γλουταθειόνης	21
2.4.7 Υπεροξυρεδοξίνες	21
2.5 Αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους	
2.5.1 Γλουταθειόνη	22
2.5.2 Ουβικινόνη	22
2.5.3 Μελατονίνη	23
2.5.4 Οιστρογόνα	23
2.5.5 Ουρικό οξύ	23
2.5.6 Χολερυθρίνη	24
2.5.7 Λιποϊκό οξύ	24
2.5.8 α- κετοξέα	25
2.6 Αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και οι ευεργετική τους επίδραση στην υγεία	
2.6.1 Ασκορβικό οξύ	25
2.6.2 Βιταμίνη E	26
2.6.3 Καροτονοειδή	27
2.6.3.1 Λυκοπένιο	28
2.6.3.2 Λουτεΐνη	29
2.6.4 Βιταμίνη B <sub>3</sub>	30
2.6.5 Σελήνιο	30
2.6.6 Ψευδάργυρος	31
3. Σταφύλια – Κρασί	32
3.1 Πολυφαινόλες	35
3.1.1 Φαινολικά οξέα	36
3.1.2 Φλαβονοειδή	36

3.1.3 Στιλβένια	37
3.1.4 Λιγνάνες	38
4. Ενδοθηλιακά κύτταρα σειράς Ea.hy 926	38
5. Tert- βουτυλο- υδροϋπεροξειδιο (t-BOOH)	40
6. Σκοπός	41
7. Υλικά και Μέθοδοι	41
7.1 Υλικά	41
7.2 Μέθοδοι	
7.2.1 Καλλιέργεια ενδοθηλιακής κυτταρικής σειρά Ea.hy 926	42
7.2.2 Μέθοδος ΧΤΤ	42
7.2.3 Μέθοδος ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	44
7.2.4 Μέθοδος TBARS	47
7.2.5 Μέθοδος BRADFORD	48
7.2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	49
8. Αποτελέσματα	49
9. Συζήτηση	58
10. Βιβλιογραφία	60

## **1. Περίληψη**

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. Επιπλέον, τα προϊόντα του οξειδωτικού στρες κατά τη συσσώρευσή τους προκαλούν φλεγμονή, που σχετίζεται με τη παθογένεια εκφυλιστικών νοσημάτων. Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν τα αμυντικά μέσα του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Ο οργανισμός λαμβάνει αντιοξειδωτικές ουσίες μέσω της τροφής ενώ παράλληλα για τη βέλτιστη προστασία του διαθέτει έναν ενδογενή μηχανισμό από αντιοξειδωτικούς παράγοντες.

Κατά την εξέταση του προσδιορισμού οξειδωτικών δεικτών σε ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926, έγινε χρήση εκχυλίσματος από στέμφυλα, που είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά συστατικά (πολυφαινόλες). Αναλυτικότερα, σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του ΧΤΤ προσδιορισμός της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε τοξική δράση στις συγκεντρώσεις 0,0675, 0,125 και 0,250 μg/ml οι οποίες ήταν αυτές που τελικά χρησιμοποιήθηκαν. Εν συνεχεία, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κύτταρα που επώαστηκαν με τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,0675, 0,125, 0,250μg/ml) εκχυλίσματος για 24h και ύστερα τους χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide 0,3 mM) για 60 λεπτά. Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο παράγοντας t-BOOH μεμονωμένα προκάλεσε μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης σε σχέση με την κατάσταση control. Στη GSH παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 29,5% μετά τη χορήγηση tert-butyl 0.3mM στα κύτταρα. Όταν όμως τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε εκχύλισμα από στέμφυλα δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της GSH, ύστερα από την επώαση με tert-butyl. Εν τούτοις, παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης των επιπέδων της γλουταθειόνης ( $p=0,18$ )

Επιπλέον, για το προσδιορισμό της επίδρασης του καθαυτού εκχυλίσματος στέμφυλων τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν με τη χορήγηση εκχυλίσματος για 24h. Παρατηρήθηκε αύξηση της γλουταθειόνης κατά 14,95% για τη συγκέντρωση 0,0675 μg/ml και για τη συγκέντρωση 0,125 μg/ml το ποσοστό της γλουταθειόνης αυξήθηκε κατά 15,26%. Στην όμοια διαδικασία για το προσδιορισμό των ROS δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Η τελευταία μέθοδος που πραγματοποιήθηκε ήταν ο προσδιορισμός των TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης). Στα TBARS παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της τάξης του 13,3% μετά τη χορήγηση tert-butyl. Ωστόσο όταν προηγήθηκε καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο που περιείχε εκχύλισμα από στέμφυλα τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν μείωση κατά 23.3% (για τη συγκέντρωση 0,0675μg/ml), 20.1%( για τη συγκέντρωση 0,125μg/ml) και 17.7%( για τη συγκέντρωση 0,250μg/ml) σε σχέση με την κατάσταση tert-butyl.

Αναμφίβολα απαιτούνται περισσότερες έρευνες ώστε να αποσαφηνιστούν οι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί που συσχετίζονται με την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος από στέμφυλα.



## Summary

The production of free radicals in combination with a deficient antioxidant defense mechanism leads to oxidative stress. The biomolecules, (DNA, protein, fat) are those that are affected in large degree by the consequences of oxidative stress. Moreover, the products of oxidative stress cause inflammation which associated with the pathogenesis of degenerative diseases. Living organisms have antioxidant mechanisms to counteract oxidative stress. Also, antioxidant compounds are taken through nutrition.

A polyphenolic extract from grape pomace which is rich in antioxidants (polyphenols) was used to examine its effects on antioxidant mechanisms in human endothelial EAhy926 cells. Specifically, in a first stage, the cytotoxic concentration of the extract was evaluated by XTT method. The results showed that the extract did not exert toxicity at concentrations of 0.0675, 0.125 and 0.250  $\mu\text{g/ml}$ . The cells were incubated with 3 different concentrations of (0,0675, 0,125, 0,250  $\mu\text{g/ml}$ ) of the extract for 24h and then the cells were treated with the oxidizing factor t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide 0,3 mM) for 60 minutes. Thereafter, glutathione's levels were determined by the method of flow cytometry. The cell's treatment with t-BOOH decreased significantly by 29.5% the GSH levles in Eahy926 cells. But when cells were also treated with grape pomace extract, there was not significant decrease of GSH after incubation with tert-butyl. The same experiment has been conducted for the determination of ROS, in which there were not statistically significant findings.

The last method, TBARS, was carried out to determine the lipid peroxidation ratio. In TBARS There was a significant increase by 13.3% of TBARS levels when the cells were treated with t-BOOH. However, when the cells were treated with t-BOOH along with grape pomace extract at 0,0675, 0,125, 0,250  $\mu\text{g/ml}$ , the TBARS levels were lower by 23.3, 20.1 and 17.7% respectively.

In addition, the effects of the treatment with the extract alone on the cells' oxidative status were determined. The endothelial cells were treated with extract alone for 24h. The results showed an increase in glutathione's levels by 14.95% at the concentration of 0,0675  $\mu\text{g/ml}$ , while at the concentration of 0,125  $\mu\text{g/ml}$  there was an increase by 15.26%. In the similar procedure for the determination of ROS, there were not statistically significant differences.

More research is needed to clarify the intracellular mechanisms that are associated with the protective activity of the grape pomace extract from oxidative stress.

## 2. Εισαγωγή

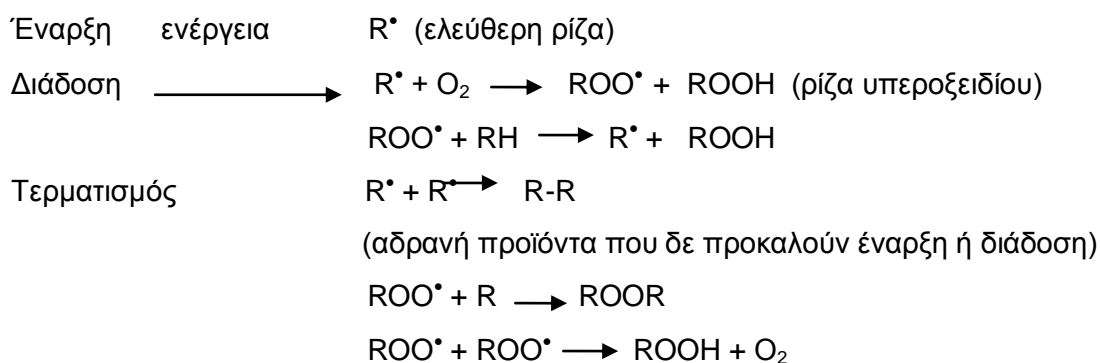
### 2.1 Ελεύθερες ρίζες (ορισμός –σχηματισμός - χαρακτηριστικά)

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)

Οι ελεύθερες ρίζες ουσιαστικά είναι φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων. Πρόκειται για χημικά ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις. Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους:

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

Ο μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και το τερματισμό. Στη διάδοση κάθε σχηματιζόμενη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με ένα ουδέτερο μόριο και να δώσει μια νέα ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα θα αντιδράσει με τη σειρά της με άλλο μόριο και έτσι θα 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:



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

υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με τη σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτατο ρυθμό (Μπόσκου 1997)

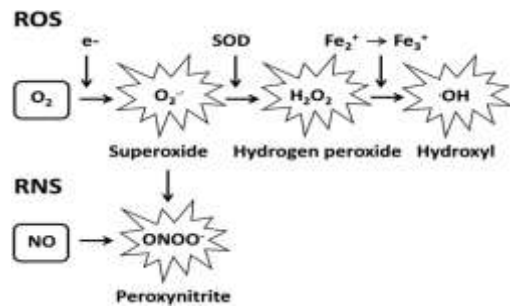
. Το στοιχείο που τους προσδίδει μεγάλη δραστικότητα είναι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο που έχουν στο μόριό τους, γεγονός που μπορεί να τις χαρακτηρίσει τόσο ως αναγωγικά όσο και ως οξειδωτικά μέσα.

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το οξυγόνο το οποίο σε συγκεντρώσεις πάνω από 21% είναι τοξικό. Στη τοξικότητά του αυτή στηρίχθηκαν, οι McCord και Fridovich το 1969, ώστε να επιβεβαιώσουν πως η τοξικότητα των δραστικών μορφών του οξυγόνου οφείλεται σε ακριβώς αυτή του την ιδιότητα. (Παπαγεωργίου 2005)

Αν και κατά βάση οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται επιβλαβείς, εν τούτοις σε μικρές συγκεντρώσεις, αποδεικνύονται χρήσιμες. Οι περιπτώσεις αξιοποίησή τους από τον οργανισμό αφορούν συγκεκριμένες διεργασίες όπως, για παράδειγμα είναι για τη μεταγωγή σήματος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φαγοκυττάρωση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην αναδίπλωση των νεοσυστατων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου η διαδικασία αυτή απαιτεί την ύπαρξη ενός οξειδωμένου περιβάλλοντος.

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 τα β-παγκρεατικά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να ελαττωθεί η παραγωγή ινσουλίνης και έτσι η ινσουλινοευαισθησία.

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 C.S.Seet 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 η 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 (Pilar Codo Ner-Franch 2011).



Δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και (RNS) (Pilar Codo Ner-Franch 2011)

## 2.2 Δραστικές μορφές ελευθέρων ριζών

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν το υπεροξειδίο του οξυγόνου και τις υδροξυλικές ρίζες, οι οποίες έχουν τη μεγαλύτερη τοξικότητα. Εκτός αυτών στις ROS κατατάσσονται και άλλα μόρια, που αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, είναι πολύ δραστικά, για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επιπλέον, μια άλλη άκρως δραστική ομάδα αποτελούν οι δραστικές μορφές του αζώτου (RNS) που περιλαμβάνουν το σουπεροξειδίο και το μονοξειδίο του αζώτου. (Pilar Codo Ner-Franch 2011) (Παπαγεωργίου 2005)

### 2.2.1 Μονήρες οξυγόνο

Το μονήρες οξυγόνο έχει όλα τα ηλεκτρόνιά του συζευγμένα, πράγμα που σημαίνει ότι ουσιαστικά δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Παρ' όλα αυτά, παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική ικανότητα και είναι περισσότερο δραστικό από το μοριακό οξυγόνο. Αυτό συμβαίνει επειδή το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Έχει μικρή διάρκεια ημιζωής και τη δυνατότητα να διαπερνά τα κύτταρα. (Halliwell, How to characterize an antioxidant: an update 1995)

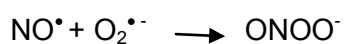
### 2.2.2 Όζον

Το όζον βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και έχει μεγάλη βιολογική σημασία επειδή απορροφά τις βλαβερές για τους ζωντανούς οργανισμούς υπεριώδεις ακτινοβολίες. Σχηματίζεται με φωτοδιάσπαση του O<sub>2</sub> από την υπεριώδη ακτινοβολία σε ατομικό οξυγόνο το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο. Το όζον δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Πρόκειται για οξειδωτικό αέριο στο μόριο του οποίου περιέχονται τρία άτομα οξυγόνου. Είναι διαμαγνητικό, έχει χαρακτηριστική οσμή και ιδιαίτερα περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. (Παπαγεωργίου 2005)

### 2.2.3 Μονοξειδίο του αζώτου

Πρόκειται για άχρωμο αέριο που διαλύεται κυρίως σε οργανικούς διαλύτες και ελάχιστα στο νερό. Στο μόριό του περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, δεν έχει φορτίο

και γι' αυτό το λόγο μετακινείται εύκολα εντός των κυττάρων καθώς και μεταξύ αυτών. Είναι ελεύθερη ρίζα και είναι ιδιαίτερα σταθερό. Η βιοδιαθεσιμότητά του στον οργανισμό είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη παρουσία των ROS. (Suvana Kimnite Wattanapitayakul 2001). Το μονοξειδίο του αζώτου συμμετέχει σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η χάλαση των λείων μυϊκών ινών, η νευροδιαβίβαση σε φλεγμονές. Οι λειτουργίες αυτές ρυθμίζονται από μετα-μεταφραστικές μετατροπές που προκαλεί το NO<sup>•</sup> σε ορισμένες πρωτεΐνες. Η βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου στα κύτταρα γίνεται με την αντίδραση μετατροπής της L- αργινίνης σε L-κιτρουλίνη. Το NO<sup>•</sup> διαθέτει την ικανότητα να συνδέεται με ιόντα σιδήρου και συγκεκριμένα και με το σίδηρο της αιμοσφαιρίνης. Με τον τρόπο αυτό απενεργοποιείται και αποβάλλεται. (Halliwell, Free radicals and antioxidants: a personal review 1994) Το μονοξειδίο του αζώτου (NO<sup>•</sup>) παράγεται σε μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις σε περιπτώσεις φλεγμονής, στα περισσότερα είδη κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των λιποκυττάρων. (Pilar Codo Ner-Franch 2011) Ενώνεται με το O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, που παράγεται παράλληλα με αυτό, και σχηματίζει το υπεροξυ-νιτρώδες που είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό.



Το ONOO<sup>•-</sup> είναι αρκετά σταθερό, όταν όμως πρωτονιωθεί σχηματίζει το υπεροξυνιτρώδες οξύ, που αποσυντίθεται γρήγορα και σχηματίζει προϊόντα που έχουν κυτταροτοξική δράση και σοβαρές βλάβες τόσο για το DNA όσο και για τις πρωτεΐνες. (Παπαγεωργίου 2005) Εκτός αυτού, η δράση του για τη πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (όπως η αναστολή βασικών διεργασιών που εμπλέκονται στην αθηρογένεση) είναι ήδη αναγνωρισμένη. Λόγω ότι είναι η πρόδρομη ένωση της L – αργινίνης έχει λάβει τη προσοχή ως θεραπευτικός παράγοντας. (Suvana Kimnite Wattanapitayakul 2001)

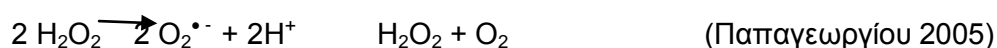
#### **2.2.4 Σουπεροξειδίο ή ανιόν του σουπεροξειδίου**

Αναγωγή του οξυγόνου με ένα ηλεκτρόνιο παράγει ανιόν της ρίζας του οξυγόνου, που ονομάζεται σουπεροξειδίο (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>):

$$\text{O}_2 + e^- \longrightarrow \text{O}_2^{\bullet-}$$

Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου γράφεται ως O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Η τελεία υποδηλώνει ότι έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και η παύλα ότι έχει αρνητικό φορτίο. Έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων». Ένζυμα που παράγουν σουπεροξειδίο είναι η λιποοξυγενάση, η κυκλοοξυγενάση και η NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων

που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής  $O_2^{\bullet-}$ . Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Το  $O_2^{\bullet-}$  όπως και όλες οι ρίζες έχει τη φυσική τάση να ζευγαρώσει το ασύζευκτό του ηλεκτρόνιο. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH δύο ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



### 2.2.5 Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

Αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια παράγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:  $O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$

Στο μόριό του το  $H_2O_2$  δε περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), το υπεροξειδίο του υδρογόνου διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα ( $HO^{\bullet}$ ), που είναι μια ιδιαίτερος δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του  $H_2O_2$  στα κύτταρα διαφέρει γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα για να απομακρύνουν του  $H_2O_2$ . Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια  $H_2O_2$ , μόλις αυτά παραχθούν. (Παπαγεωργίου 2005)

### 2.2.6 Υδροξυλικές ρίζες ( $ROO^{\bullet}$ )

Το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) μπορεί να προστεθεί σε ελεύθερες οργανικές ρίζες και να σχηματίσει υπεροξειδικές ρίζες. Οι ρίζες αυτές είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξειδωση. (Παπαγεωργίου 2005)

### 2.2.7 Υπεροξειδικές ρίζες ( $OH^{\bullet}$ )

Η υδροξυλική ρίζα είναι πολύ δραστική και τοξική σε βαθμό που μπορεί να οξειδώσει όλα τα βιομόρια που βρίσκονται κοντά στο σημείο παραγωγής του. Μπορούν να αφαιρούν υδρογόνο από τις οργανικές ενώσεις, παράγοντας μια ποικιλία από νέες ρίζες.

### 2.2.8 Υποχλωριώδες οξύ ( $HOCL$ )

Το υποχλωριώδες οξύ σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυτάρων. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο

που βρίσκεται στο κυτόπλασμα των φαγοκύτταρων), καταλύει το σχηματισμό από HOCL από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, με βάση την αντίδραση που ακολουθεί:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ένα ασθενές οξύ, εν τούτοις πολύ δραστικό χημικά. Ενοχοποιείται ότι οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, προκαλείται «οίδημα» σ' αυτά, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος c, όποτε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (όπως ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών. (Whiteman Matthew 2005)

### **2.3 Οξειδωτικές βλάβες στα βιομόρια**

Όπως προαναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες, λόγω της δραστηρικής τους ικανότητας προκαλούν σημαντικές μη αντιστρεπτές βλάβες στα βιομόρια (πρωτεΐνες, λίπη, νουκλεοτίδια) του οργανισμού. Αυτό συνεπάγεται τη δημιουργία εμποδίων στην φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού

#### **2.3.1 Πρωτεΐνες**

Η δομική μονάδα των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα. Σε αυτά μπορούν να δράσουν οι υδροξυλικές ρίζες (OH<sup>•</sup>) με συνέπεια να υπάρχει τροποποίηση στη δομή των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες γίνονται πιο ευαίσθητες στη πρωτεόλυση κυρίως όμως, χάνουν τη βασική τους λειτουργικότητα και ουσιαστικά το σκοπό για τον οποίο σχηματίστηκαν. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών στις πρωτεΐνες δεν είναι απαραίτητη αλλά εξαρτάται από τους εξής τρεις βασικούς παράγοντες: Από τη σύσταση των πρωτεϊνικών μορίων σε αμινοξέα, τη σπουδαιότητα αυτών και τέλος τη δυνατότητα να υπάρξει επιδιόρθωση στην οξειδωση από τους αρμόδιους μηχανισμούς. (Halliwell, Biochemistry of oxidative stress 2007) Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε «συναρμολόγηση» και υφίστανται ορισμένες μεταφραστικές τροποποιήσεις. Πρόκειται για διεργασίες που απαιτούνται για τη φυσιολογική βιολογική τους λειτουργία. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών είναι κρίσιμης σημασίας για την κατάλληλη τριτογενή και τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών στο χώρο και εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ενδοπλασματικού δικτύου. Στην ενέργεια που απαιτείται γι' αυτή τη διαδικασία, οφείλεται το 25% της παραγωγής των ROS. Όταν

η απαίτηση για αναδίπλωση πρωτεϊνών είναι αυξημένη τότε αντίστοιχα παρατηρείται αύξηση και στο σχηματισμό ROS. Επιπλέον, η καθ' υπέρβαση αποθήκευση λίπους στα κύτταρα οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας του ενδοπλασματικού δικτύου, ξεπερνώντας με αυτό τον τρόπο τα όρια της λειτουργικής του ικανότητας. Σε τέτοιες περιπτώσεις πιθανώς να οφείλεται το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου όταν υπάρχει αυξημένη ζήτηση για πρωτεϊνσύνθεση. Σαν συνέπεια αυτού είναι η ενεργοποίηση των σημάτων φλεγμονής που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την περαιτέρω παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι σε θέση να οξειδώσουν τα αμινοξέα, συγκεκριμένα στο σημείο της πεπτιδικής αλυσίδας που υπάρχει διαθέσιμο οξύ με συνέπεια το κατακερματισμό του βασικού κορμού της πρωτεΐνης. Οι τροποποιήσεις αυτές συνεπάγονται κατεστραμμένες-αλλοιωμένες πρωτεΐνες, με πλήρη απώλεια ή μειωμένη λειτουργικότητα. Τα αμινοξέα που είναι ευαίσθητα στην οξείδωση είναι η λυσίνη, η αργινίνη, η προλίνη, η θρεονίνη και τα καρβονυλικά παράγωγα. Τα τελευταία αποτελούν δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών και ποσοτικοποίησης της πρωτεϊνικής καταστροφής. Επίσης, η αλβουμίνη, ανευρίσκεται στο πλάσμα, και αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες μιας και δέχεται πολλές διαφορετικές τροποποιήσεις λόγω της οξείδωσης. (Pilar Codo Ner-Franch 2011)

### **2.3.2 DNA**

Κατά την οξείδωσή του DNA του μπορούν να παραχθούν πολλά οξειδωτικά προϊόντα. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιήσουν τη λειτουργία της πολυμεράσης της ριβόζης. Το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην επισκευή, στη μετάφραση, στην αντιγραφή και στον ανασυνδυασμό του DNA. Αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών είναι η πιθανή δυσλειτουργία της πρωτεϊνσύνθεσης και της γενικότερης σύνθεσης νουλεοτιδίων. Επιπροσθέτως, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στη δομή του DNA μιας και επιδρούν στη δεοξυριβόζη, στις βάσεις πυριμιδίνη και πουρίνη. (Halliwell, Biochemistry of oxidative stress 2007). Για την αξιολόγηση των βλαβών που έχει υποστεί το DNA, εξαιτίας των οξειδωτικών προϊόντων, χρησιμοποιούνται τα δύο παράγωγα της γουανίνης, μιας και είναι ιδιαίτερα επιρρεπής στην οξείδωση. Αυτά είναι η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης και της ελεύθερης 8-υδροξυγουανίνης. Ο προσδιορισμός αυτών δεικτών στα λεμφοκύτταρα εκφράζει το υπόβαθρο κυτταρικής βλάβης που έχει προκληθεί από τις ROS. (Pilar Codo Ner-Franch 2011) Όπως προαναφέρθηκε το οξειδωτικό στρες επιδρά στα βιομόρια προκαλώντας τους επιβλαβείς συνέπειες. Η υπεροξείδωση που συμβαίνει στα λιπίδια είναι άκρως σημαντική για τις οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της οξείδωσης, παράγονται



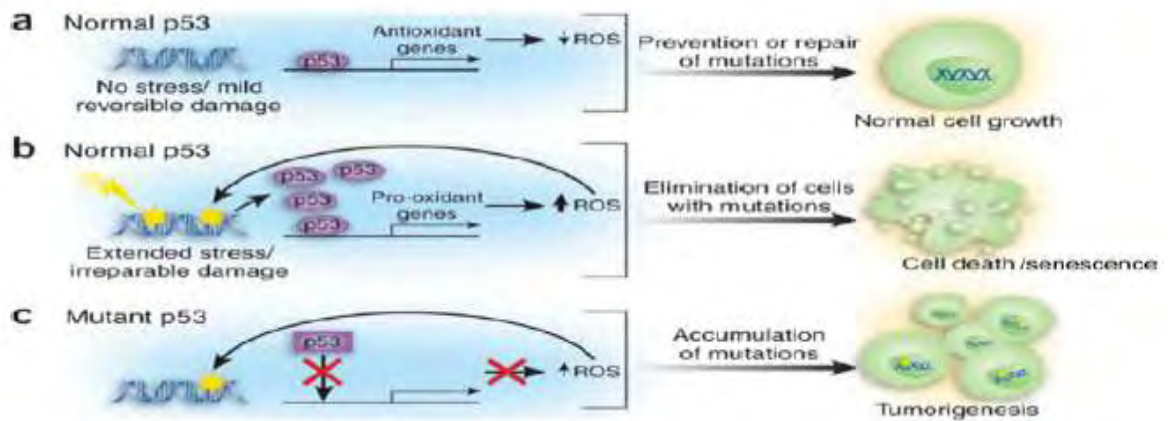
υπεροξειδία και αλδεΐδες. Εν συνεχεία, οι αλδεΐδες, όπως είναι η μαλονδιαλδεΐδη, είναι ενώσεις υψηλής δραστικότητας και μεγάλης διάρκειας ζωής – παραμονής στα μόρια. Το επίσης σημαντικό στοιχείο είναι ότι μπορούν να αντιδράσουν με άλλες βιολογικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου και του DNA. Αυτή η αλυσιδωπή αντίδραση προκαλεί βλάβες στο DNA. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μιτοχονδριακό DNA παρουσιάζει ευαισθησία έναντι του οξειδωτικού στρες, γεγονός που οφείλεται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Έρευνα που εκπονήθηκε από την ομάδα Niklowitz et al έδειξε ότι η λήψη συμπληρωμάτων ουβικινόνης (Q10), για περισσότερο από δύο εβδομάδες, έχει θετική επίδραση στη μείωση των οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Επίσης, η συγκέντρωση Q10 σε αυτούς τους ασθενείς παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με τους δείκτες αξιολόγησης των οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Ακόμα και η χορήγηση ουβικινόνης για 14 ημέρες σε άτομα που είχαν κάποια μιτοχονδριακή νόσο φάνηκε να ελαττώνονται οι οξειδωτικές βλάβες στο γενετικό υλικό. (Constance Schmelzera 2011) Κάθε δραστική μορφή οξειδωσης προκαλεί βλάβη σε διαφορετικές βάσεις του DNA και σε αυτά τα πλαίσια, θα ήταν ενδεχομένως εφικτό, ο προσδιορισμός σχετικά με τι είδους βλάβη προκαλεί κάθε δραστική μορφή στο DNA. Η ταυτοποίηση των οξειδωμένων προϊόντων των βάσεων μπορεί να είναι ενδεικτική σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, εν τούτοις είναι περιορισμένος ο αριθμός των μελετών για την αξιοπιστία τους ως βίο-δείκτες οξειδωσης. (Matthew Whiteman 2002) Τέλος, η αντιοξειδωτική βιταμίνη C συμβάλλει στις δραστηριότητες επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA καθώς και στις διεργασίες επιδιόρθωσης και έκφρασης γονιδίων. Το μέγεθος της συμβολής της εξαρτάται από τη διατροφική κατάσταση του οργανισμού και της συγκέντρωσης της βιταμίνης στο πλάσμα. (Radim J. Sram 2011)

Τα επίπεδα των προϊόντων οξειδωσης των βάσεων του DNA σε ανθρώπινα κύτταρα, διαφοροποιούνται ανάλογα με τη μέθοδο μέτρησης. Εν τούτοις, η μέση τιμή των προϊόντων οξειδωσης που προκαλούν βλάβες, αντιστοιχεί περίπου σε 1 βάση ανά 105 βάσεις DNA ή και περισσότερες. Η δράση της p53 πρωτεΐνης συνδέεται στενά τόσο με τον καρκίνο όσο και με τις ROS. Η p53 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το p53 κατασταλατικό ογκογονίδιο και λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας στην ανάπτυξη και στο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Χαρακτηρίζεται ως μοριακός φύλακας του γονιδιώματος και συμμετέχει ενεργά τόσο στη διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA όσο και στην απόπτωση των κυττάρων με αλλοιωμένο DNA. Τα επίπεδα της p53 συμμετέχουν στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής άμυνας, προωθώντας τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν MnSOD και GPx1. Η παρουσία των ROS αυξάνει τη δραστηριότητα της p53. Ωστόσο, η πολλή αυξημένη παρουσία των ROS αναστέλλει

τη δράση της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η p53 λόγω της αυξημένης δραστηριότητάς της και μέσω διαφόρων μηχανισμών μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ROS. Οι ROS δρουν κυτταροκατασταλτικά και παρουσιάζουν προ-αποπτωτική δράση. Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη p53 προάγει τη φωσφορυλίωση ενώ η έλλειψή της ευθύνεται για τους αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυσης στα κακοήθη κύτταρα. Μια άλλη πρωτεΐνη, η p66Sch αλληλεπιδρά με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, στα μιτοχόνδρια, από όπου προάγεται η παραγωγή ROS. Στα ποντίκια που στερούνταν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρατηρήθηκε ότι ζουν περισσότερο λόγω των μειωμένων επιπέδων οξειδωτικού στρες που παρουσίασαν.

Λάθη κατά την επιδιόρθωση του DNA ή αυξημένη δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA, ενδεχομένως να ενοχοποιούνται για την προέλευση ορισμένων μορφών καρκίνου. Τα υπάρχοντα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί υποστηρίζουν πως η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και η δραστηριότητα επισκευής των λαθών, αυξάνει σε περιπτώσεις κακοήθειας, αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό ώστε να αντιμετωπιστούν οι πλεονάζουσες ROS.

Οι ROS αποτελούν σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης καρκίνου. Ωστόσο, φαίνεται παράδοξο ότι η κατανάλωση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων δε μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο, εκτός αν η χορήγηση αυτών ξεκινά από κατάσταση ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών. Οι κλινικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα δεν έχουν δώσει επαρκή στοιχεία. Σε μελέτη, όπου συμμετείχαν καρκινοπαθείς (με καρκίνο στο κεφάλι ή/και στο λαιμό) κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας και μέχρι τα επόμενα τρία χρόνια, χορηγήθηκε α-τοκοφερόλη (400units/day) και β-καροτένιο (30mg/day). Στην ομάδα των καρκινοπαθών παρατηρήθηκε μια τάση για λιγότερο σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες, κατά τη διάρκεια της θεραπείας, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα λήψης εικονικού φαρμάκου. Το δυσάρεστο εύρημα ήταν ότι στην ομάδα δοκιμής παρουσιάστηκε μια υψηλότερη τάση υποτροπής του καρκίνου. (HALLIWELL 2007)



(Α) Σε περίπτωση απουσίας οξειδωτικού στρες ή μετά από ήπιο στρες, τα χαμηλά επίπεδα της p53 και η έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες μειώνουν τα επίπεδα των ROS. (Β) Μεγαλύτερη ενεργοποίηση της p53 μετά από σοβαρό ή παρατεταμένο οξειδωτικό στρες οδηγεί στο σχηματισμό ακόμη περισσότερων ROS από διάφορους μηχανισμούς, με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα τους να συμβάλουν στην κυτταρική γήρανση και το θάνατο. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να συμβάλουν στην καταστολή του όγκου. (Γ) Η απώλεια λειτουργικότητας της p53 αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, με συνέπεια μεταγενέστερα πιθανώς να προκληθεί κακοήθεια, η οποία θα πηγάζει από βλάβες στο DNA (μετάλλαξη). Η ανικανότητα της p53, που προκαλείται από την απόπτωση, ως αντίλογο θα έχει το σχηματισμό καρκίνου (HALLIWELL 2007)

### 2.3.3 Λίπη

Τα λιπίδια απαντώνται σε ελεύθερες και σε δεσμευμένες μορφές. Περιλαμβάνονται στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση γι' αυτό και παραμένουν άμεσος στόχος των ROS. Ο σχηματισμός των λιπιδικών υπεροξειδίων είναι ικανός να προκαλέσει βλάβη τόσο στη κυτταρική μεμβράνη όσο και στους υποδοχείς πρωτεϊνικής φύσης που διαθέτει το κύτταρο, εμποδίζοντας τις προκαθορισμένες λειτουργίες του. (Halliwell, Biochemistry of oxidative stress 2007). Ειδικότερα, μειώνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών, αποσταθεροποιεί υποδοχείς και επιπλέον προκαλεί ανοσολογική απάντηση με απόρροια τη μετατροπή των λιπιδίων σε φωσφολιπίδια. Οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν κυρίως στα λιπίδια που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη καθώς επίσης και στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες (LDL) προκαλώντας λιπιδική υπεροξείδωση. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ευρεία χρήση των οξειδωμένων λιπιδίων, ως δείκτες οξειδωτικής κυτταρικής βλάβης. Η

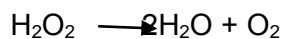
υπερβολική παραγωγή ROS στο λιπώδη ιστό προκαλείται από διάφορους αλληλένδετους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς όπως η θερμιδική υπερπρόσληψη (που καταλήγει σε παχυσαρκία) και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η σημασία των ελευθέρων ριζών για τα λιπίδια και ειδικότερα εκείνων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη ή οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), οδήγησαν στην ευρεία χρήση των συγκεκριμένων μορίων σα δείκτες οξειδωτικής βλάβης. Τα προϊόντα, που παράγονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων εντοπίζονται στο αίμα (στο πλάσμα ή στον ορό) ή στα ούρα. Πρόκειται για προϊόντα εξαιρετικά σύνθετα τα οποία διαχωρίζονται σε πρωτογενή υδροϋπεροξειδία και σε δευτερογενή προϊόντα υπεροξειδωσης (αλδεΐδες και ισοπροστανίων). (Pilar Codo Ner-Franch 2011) Το λυκοπένιο μαζί με το ασκορβικό οξύ και την α-τοκοφερόλη δημιουργούν συνθήκες που επιβραδύνουν χρονικά την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης. (Visioli 2003)

#### **2.4 Αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες (ενζυμικής φύσης)**

Είναι σαφές ότι όλα τα βιολογικά συστήματα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας, για την αντιμετώπιση των δυνητικά επιβλαβών συνεπειών που μπορεί να επιφέρει η οξειδωση. Σε κυτταρικό επίπεδο η αντιοξειδωτική άμυνα διαθέτει, έναντι των οξειδωτικών μορφών, ένα σημαντικό βαθμό ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδωσης καθώς και μόρια μικρότερου μοριακού βάρους που αλληλεπιδρούν υποστηρικτικά στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επιπλέον, στην άμυνα του οργανισμού έναντι της οξειδωσης συμμετέχουν βιταμίνες, φυτοχημικές ουσίες και ιχνοστοιχεία με αντιοξειδωτική συμπεριφορά. (Pilar Codo Ner-Franch 2011)

##### **2.4.1 Καταλάση (CAT)**

Η καταλάση έχει ως κύριο ρόλο να καταλύει τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό και οξυγόνο. Ουσιαστικά γίνεται αναγωγή ενός μορίου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O με παράλληλη οξειδωση ενός άλλου μορίου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε O<sub>2</sub> σύμφωνα με την αντίδραση:



Η κατάλάση εντοπίζεται στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα φυτικά και στα ζωικά κύτταρα. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα ενώ σε αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις υπάρχει στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στο μυϊκό ιστό. Ενδοκυτταρικά απαντάται στα υπεροξυσωμάτια εκτός από την περίπτωση των ερυθρών κυττάρων που ενοπίζεται στο κυτόπλασμα. Ο σίδηρος ως απαραίτητος συμπαραράγοντας συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.2 DT- διαφοράση**

Η DT – διαφοράση ή NAD(P)H ή αναγωγή της κινόνης αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες και στο μόριό ως πρόσθετη ομάδα περιλαμβάνεται ένα μόριο FAD. Η δράση του ενζύμου είναι να λειτουργεί καταλυτικά στη μετατροπή των κινονών ενώσεων σε υδροκινόνες. Με τον τρόπο αυτό, αποτοξινώνει τον οργανισμό εφόσον απομακρύνει τις κιναιδείς ενώσεις. Η δικουμαρόλη και τα αντιπηκτικά αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.3 Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου**

Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου ή SOD. Πρόκειται για ένζυμα τα οποία εντοπίστηκαν κατά την απομόνωση πρωτεΐνης που βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το βιολογικό καταλύτη για την αντίδραση μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η δράση των SODs έγκειται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών του  $O_2^{\bullet -}$ . Οι ρίζες αυτές, παρουσιάζουν μεγάλη τοξική ικανότητα, μιας και συμμετέχουν στο σχηματισμό  $OH^{\bullet}$  καθώς και αντιδρούν με το  $NO^{\bullet}$  προς σχηματισμό  $ONOO^{\bullet -}$ . Γι' αυτό το λόγο, οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου θεωρούνται αντιοξειδωτικά ένζυμα εφόσον δρουν προστατευτικά στα βιομόρια, αποτρέποντας τις βλαβερές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Στη φύση απαντώνται τρία είδη SOD. Καθένα ξεχωριστά απαιτεί ένα τουλάχιστον οξειδοαναγωγικό μέταλλο που θα αποτελέσει το ενεργό του κέντρο ώστε να διεκπεραιώνεται επιτυχώς η καταλυτική τους δράση. Τα είδη αυτά είναι:

SODs χαλκού – ψευδαργύρου που βρίσκεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα στο κυτόπλασμα της πλειοψηφίας των κυττάρων των θηλαστικών. Επιπλέον, υπάρχουν και οι SODs που ανευρίσκονται εξωκυτταρικά γνωστές ως EC – SOD, που η δράση τους αφορά τη μείωση της συγκέντρωσης  $O_2^{\bullet -}$  στο πλάσμα του αίματος.

SODs μαγγανίου που απαντώνται στα προκαρυωτικά κύτταρα και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων

SODs του σιδήρου που υπάρχει μόνο στα προκαρυωτικά κύτταρα (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.4 Θειορεδοξίνες - Αναγωγή της θειορεδοξίνης**

Οι θειορεδοξίνες είναι πρωτεΐνες με οξειδοαναγωγική δράση και βρίσκονται στα κύτταρα των θηλαστικών. Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί τρία ισoenζυμα της θειορεδοξίνης (Trx-1, Trx-2, SpTrx) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι Trx είναι δότες ηλεκτρονίων, με σημαντικό ρόλο για την αναγωγή των

υπεροξειδίων. Η αναγωγή της οξειδωμένης Trx επιτυγχάνεται με την αναγωγή της θειορεδοξίνης. Επιπλέον, βρέθηκε πως οι θειορεδοξίνες που απομονώθηκαν από αδενικά κύτταρα των πνευμόνων και από T- λεμφοκύτταρα, ήταν σεληνοπρωτεΐνες. (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.5 Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης**

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPXs) αποτελούν μια ομάδα ενζύμων που στο μόριό τους περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο το ιχνοστοιχείο σελήνιο. Στο μόριο των GPXs υπάρχει μια σεληνοκουστεΐνη, που ουσιαστικά πρόκειται για μια κυστεΐνη στην οποία το σελήνιο έχει αντικαταστήσει το θείο της σουλφυδρυλικής ομάδας. Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν οργανικά και ανόργανά υπεροξέα προς τις αντίστοιχες αλκοόλες καθώς επίσης και να καταλύουν την αναγωγή του  $H_2O_2$  χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αναγωγικό μέσο (κυρίως το σύνθητες είναι η χρήση γλουταθειόνης ή GSH και σπανιότερα γλουταρεδοξίνης ή GRX και θειορεδοξίνης ή TRX) για δότη ηλεκτρονίων. Έχουν ταχτοποιηθεί πέντε είδη των GPXs. Αυτά είναι τα εξής: η υπεροξειδάση του κυτοδιαλύματος, η γαστροεντερική υπεροξειδάση, η υπεροξειδάση του πλάσματος, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης των φωσφολιπιδικών υδροϋπεροξειδίων και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης του πυρήνα του σπέρματος. (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.6 Τρανσφεράσες -S της γλουταθειόνης**

Οι τρανσφεράσες-S της γλουταθειόνης ή αλλιώς GSTs ανήκουν σε μια κατηγορία ενζύμων η οποία ως στόχο έχει την απομάκρυνση ηλεκτρονιόφιλων ουσιών από τον οργανισμό. Οι ουσίες αυτές δε σχηματίζονται σε ενδοκυτταρικό επίπεδο αλλά εξωγενώς. Τα συγκεκριμένα ένζυμα βρίσκονται στη κυτταρική μεμβράνη του ήπατος, στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυτάρων, στα μιτοχόνδρια καθώς επίσης και στο κυτοδιάλυμα. (Παπαγεωργίου 2005)

#### **2.4.7 Υπεροξυρεδοξίνες( Prxs)**

Οι υπεροξυρεδοξίνες ανακαλύφθηκαν, πιο πρόσφατα σε σχέση με τις υπόλοιπες αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες και πιθανώς ακόμα να μην είναι ικανοποιητικά αποσαφηνισμένη η πραγματική τους αντιοξειδωτική σημασία. Ο ρόλος της είναι να ανάγει τα υδροϋπεροξειδία με θειορεδοξίνη ή και με άλλες ενώσεις που περιέχουν σουλφυδρυλική ομάδα. Απαντώνται σε έξι μορφές στα κύτταρα των θηλαστικών και είναι κατανοημένες σε διαφορετικά σημεία στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα στις εξής παρακάτω μορφές:

Prx-1, Prx-2 και Prx-6 που βρίσκονται στο κυτόπλασμα,

Ptx-3 που υπάρχει στα μιτοχόνδρια,  
Ptx-4 που συναντάται στο εξωκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου και η  
Ptx-5 στα υπεροξυσώματα και στα μιτοχόνδρια. (Παπαγεωργίου 2005)

## **2.5 Αντιοξειδωτικά μικρού μοριακού βάρους**

### **2.5.1 Γλουταθειόνη (GSH)**

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από κύστεϊνη, γλουταμινικό και γλυκίνη. Συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Αν και η συγκέντρωσή της είναι ιδιαίτερα μικρή εν τούτοις παραμένει η κυριότερη σουλφυδρυλική ένωση. Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ( $ROOH, H_2O_2$ ) και τις εξωγενής ηλεκτρόνιοφιλες (πχ κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών. (Παπαγεωργίου 2005)

### **2.5.2 Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q**

Πρόκειται για ένα λιποδιαλυτό παράγωγο της κινόνης που συντίθεται στα κύτταρα και εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η δράση του έγκειται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια με σκοπό τη παραγωγή ATP και επιπροσθέτως λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό μέσο. Η ουβικινόνη μπορεί να αναστείλλει τη πρόοδο της υπεροξειδωσης των λιπιδίων καθώς και να αναγεννήσει τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη της μορφή. Στις μέρες μας, το συνένζυμο Q συνηθίζεται να λαμβάνεται ως συμπλήρωμα διατροφής σε ειδικές περιπτώσεις (πχ καρδιαγγειακά νοσήματα) με σκοπό να αυξηθούν τα επίπεδά της ουβικινόνης στο αίμα. Με αυτό τον τρόπο θα μειωθεί η οξειδωση των LDL λιποπρωτεϊνών και τελικά θα υπάρξει μια προστατευτική δράση ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες. Ενεργή και καθοριστική είναι και η προστατευτική δράση που ασκεί ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες που συμβαίνουν στο DNA. Συγκεκριμένα ως αντιοξειδωτικός συμπαράγοντας διορθώνει τις επιζήμιες βλάβες και διατηρεί τη σταθερότητα του μορίου. Η δράση της ουβικινόνης αφορά διορθώσεις στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA, στις γονιδιακές μεταλλάξεις και στις επιγενετικές τροποποιήσεις. Καθώς επίσης λειτουργεί αποτρέποντας χρωμοσωμικές ανωμαλίες και βράχυνση- φθορά των τελειομερών τμημάτων των χρωμοσωμάτων. (Schmelzer Constance 2011).

### **2.5.3 Μελατονίνη**

Η μελατονίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από την επίφυση του εγκεφάλου και η βιοσύνθεσή της γίνεται από τη σεροτονίνη. Δρα ως γενικό αντιοξειδωτικό. Έχει την ικανότητα να βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία μετά από οξειδωτικές βλάβες και εκτός αυτού ενεργοποιεί μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να επέμβουν ανασταλτικά στη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που παρουσιάζεται με τη πάροδο του χρόνου. (Rodella Fabrizio Luigi 2011). Επιπροσθέτως, η μελατονίνη αποτρέπει τις μιτοχονδριακές βλάβες και τα φαινόμενα απόπτωσης που σχετίζονται με τη νόσο Αλτσχάιμερ. Επίσης, μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και μπορεί να διατηρεί την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών. (Rosales-Corraí Sergio 2011) Εκτός αυτών, η μελατονίνη καθυστερεί την απόπτωση των λευκοκυττάρων στους ηλικιωμένους, γεγονός που επιβεβαιώνει τις ευεργετικές της ιδιότητες. Δεν είναι τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό. Έχει την ικανότητα να διατηρεί την αποτελεσματικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και να διεγείρει τη σύνθεση ATP. Τέλος ασκεί μια προστατευτική δράση στα μιτοχόνδρια έναντι των οξειδωτικών βλαβών. (Barriga 2010)

### **2.5.4 Οιστρογόνα**

Με τον όρο οιστρογόνα συμπεριλαμβάνονται οι ορμόνες οιστραδιόλη, οιστρόνη και οιστριόλη. Θεωρούνται πως έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη λειτουργία του ενδοθηλίου και πιθανώς αυτή τους η δράση να ενεργοποιεί μηχανισμούς, που σχετίζονται με το γεγονός ότι οι γυναίκες στο στάδιο της προ-εμμηνόπαυσης προστατεύονται από καρδιαγγειακά νοσήματα. Η ανεπάρκεια οιστρογόνων ενοχοποιείται για διαταραχές στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Μια πιθανή θεραπεία υποκατάστασης των οιστρογόνων δε θα μπορούσε να ήταν ασφαλής οπότε έρχεται στο προσκήνιο το ενδεχόμενο οι ισοφλαβόνες να αποτελέσουν την εναλλακτική λύση. (Wendy L. Halli 2005)

### **2.5.5 Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ βρίσκεται τόσο στα κύτταρα όσο και σε όλα τα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών για το ανθρώπινο είδος και αντίδραση για το σχηματισμό του καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό μέσο, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες. (Παπαγεωργίου 2005)



### **2.5.6 Χολερυθρίνη**

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της αίμης στα θηλαστικά. Στο ανθρώπινο σώμα παράγονται περίπου 275mg χολερυθρίνης την ημέρα. Για τη μεταφορά της στο ήπαρ συνδέεται στοιχειομετρικά με την αλβουμίνη. Εν συνεχεία, στα ηπατικά κύτταρα, η υδρόφοβη χολερυθρίνη συνδέεται με τις πρωτεΐνες του κυτοπλάσματος και κυρίως με τη τρανσφεράση –S- της γλουταθειόνης. Η σύνθεση της χολερυθρίνης προάγεται σε οξειδωτικό στρες και έχει προταθεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό. Σε μελέτες *in vitro* φαίνεται να αναστέλλει τη παραγωγή του σουπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο και αποτελεί ισχυρό παράγοντα απομάκρυνσης της υπεροξειδικής ρίζας. Συνδεδεμένη η χολερυθρίνη με την αλβουμίνη, προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες τόσο την αλβουμίνη όσο και τα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται από αυτή. Τελικά, τα δεδομένα, αν και λιγοστά, συνηγορούν ότι η χολερυθρίνη είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό.

### **2.5.7 Λιποϊκό οξύ**

Το λιποϊκό οξύ είναι παράγωγο του οκτανοϊκού οξέος και στο μόριό του περιέχει δύο σουλφυδρυλικές ομάδες. Πρόκειται για ένα φυσικό συστατικό που μπορεί πολύ εύκολα να προσληφθεί μέσω της τροφής. Απαντάται σε ιδιαίτερα μικρές ποσότητες στους ζωικούς ιστούς. Μπορεί να αναγεννήσει άλλα αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν υποστεί οξείδωση τέτοια είναι η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη E. (Παπαγεωργίου 2005) Πρόκειται για ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην ανθρώπινη διατροφή και απαντάται σε αφθονία στο σπανάκι, το μπρόκολο και στη ντομάτα. Το α-λιποϊκό οξύ θεωρείται ως μια μέθοδος που συμβάλλει στη μείωση της αύξησης των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), που αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες για την αθηροσκλήρωση και την απορύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, το α-λιποϊκό οξύ ως ισχυρό αντιοξειδωτικό λειτουργεί αποτρέποντας την εμφάνιση επιπλοκών που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη καθώς επίσης παρεμποδίζει δυνητικά την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, μειώνοντας την αθηρογένεση και συνεπώς το κίνδυνο καρδιακής νόσου. Επιπλέον, από κλινικές μελέτες φάνηκε πως το λιποϊκό οξύ σε συνδυασμό με άσκηση, παρουσιάζει ευνοϊκή επίδραση σε παχύσαρκα άτομα με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. (Andrea M McNeilly<sup>1</sup> 2011) Επιπροσθέτως, το α-λιποϊκό οξύ εντοπίζει την ύπαρξη ROS , μπορεί να αναστέλλει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου, να προάγει την αύξηση της γλουταθειόνης και τέλος να απομακρύνει τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (πχ ακρολεΐνη ) (Annette Maczurek b 2008)

### **2.5.8 α –κετοξέα**

Ορισμένα α- κετοξέα, όπως το πυρουβικό και το α-κετογλουταρικό, δρουν ως «εκκαθαριστές» του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτή η ικανότητά τους διαπιστώθηκε όταν τα α- κετοξέα προστέθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων και αντέδρασαν μη ενζυμική με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, απομακρύνοντάς το. (Παπαγεωργίου 2005)

## **2.6 Αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και οι ευεργετική τους επίδραση στην υγεία**

Οι βιταμίνες είναι μη θερμιδικές ουσίες, απαραίτητες για το μεταβολισμό και συνήθως λειτουργούν ως συνένζυμα σε ενζυμικές αντιδράσεις. Ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να τις παράγει γι' αυτό το λόγο και λαμβάνονται μέσω της δίαιτας. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες κάθε βιταμίνης ποικίλουν όπως ποικίλει και η απαιτούμενη διαιτητική πρόσληψη για κάθε μία. (Καλογιάννης 2010)

### **2.6.1 Ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C**

Η χημική δομή του L – ασκορβικού οξέος είναι γνωστή από το 1932. Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες. Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C. Όμως, ο άνθρωπος ανήκει στην κατηγορία των οργανισμών που δε μπορούν να τη βιοσυνθέσουν, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη απουσιάζει.

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί συμπαραγόνα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτίνινης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι άκρως απαραίτητη στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα επινεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών. (Suvana Kimnite Wattanapitayakul 2001) Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμα όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω απ' τα κύτταρα. Στο κυτόπλασμα το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη

παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. Εκτός του κυττάρου το ασκορβικό οξύ πιθανώς να δρα σε σύζευξη με τη βιταμίνη E, η οποία και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Αξίζει να σημειωθεί πως η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη ενώ το ασκορβικό οξύ ανήκει στη κατηγορία των υδατοδιαλυτών βιταμινών γεγονός που πιθανώς να δημιουργεί πρόβλημα μιας και οι δύο βιταμίνες βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις. Όμως, έχει αποδειχτεί ότι στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται ενδιάμεσα μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξειδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών. (Παπαγεωργίου 2005)

Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει τόσο το  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$  όσο και το  $Cu^{2+}$ . Έτσι μίγμα σιδήρου ή χαλκού με ασκορβικό οξύ παράγει *in vitro* την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Η συγκεκριμένη προ-οξειδωτική δράση, που εμφανίζει το ασκορβικό οξύ *in vitro* έχει μεγάλη σημασία επειδή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του ασκορβικού στα τρόφιμα. Σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις θα παρουσιάζει τοξική δράση. Η περίσσεια της βιταμίνης C αποβάλλεται μέσω των ούρων. Μελέτες σε νέους καπνιστές έδειξε πως μία δόση ασκορβικού οξέος της τάξης των 2gr, μπορεί να βελτιώσει άμεσα τη λειτουργία του ενδοθηλίου. (Suvana Kimnite Wattanapitayakul 2001) Ενώ η χορήγηση της βιταμίνης σε σχήμα 1gr ημερησίως για 8 εβδομάδες, δε παρέχει καμία μακροπρόθεσμη ευεργετική επίδραση. Τα εσπεριδοειδή, τα φρέσκα λαχανικά, οι φράουλες αποτελούν άριστες πηγές βιταμίνης C. (Χασαπίδου 2008)

### **2.6.2 Βιταμίνη E**

Η βιταμίνη E ανήκει στην κατηγορία των λιποδιαλυτών βιταμινών και θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική βιταμίνη για τα βιολογικά συστήματα. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη προστασία της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών από τις οξειδωτικές βλάβες. (Suvana Kimnite Wattanapitayakul 2001) Αποτελείται από 8 δομικά ισομερή τοκοφερολών (α, β, γ, δ) και τοκοτριενολών (α, β, γ, δ). Από τις ενώσεις αυτές, η α- τοκοφερόλη είναι η πλέον διαδεδομένη ένωση στη φύση και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες μορφές.

Η απορρόφηση της βιταμίνης E (τοκοφερόλης), πραγματοποιείται στο βλεννογόνο του εντερικού σωλήνα και μεταβολίζεται στο ήπαρ. Η απορρόφησή της εξαρτάται

από την ικανοποιητική παρουσία των χολικών αλάτων, από τις παγκρεατικές εστεράσες και από τη περιεκτικότητα της τροφής σε λίπος.

Τα συμπτώματα μη λήψης της συνιστώμενης ποσότητας της βιταμίνης, δε θα εμφανιστούν τόσο άμεσα, όπως συμβαίνει γενικότερα με τις βιταμίνες. Αλλά οι συνέπειες της έλλειψης θα παρουσιαστούν μακροπρόθεσμα και συνήθως συνδέονται με εκφυλιστικές ασθένειες (αθηροσκλήρωση, καρκίνος, βλάβες στο νευρικό, αναπαραγωγικό σύστημα).

Η βιταμίνη Ε θεωρείται ως η βιταμίνη με τη περισσότερη αντιοξειδωτική ικανότητα γι' αυτό και έχει θετική συσχέτιση με τη πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Φυσικά αυτή η καρδιοπροστατευτική δράση που παρέχει είναι αποτελεσματικότερη σε συνδυασμό με το β – καροτένιο. (KARAJIBANI MANSOUR 2009)

Η βιοσύνθεση της βιταμίνης Ε γίνεται μόνο σε φυτικούς ιστούς γι' αυτό τα φυτικά προϊόντα και κυρίως τα φυτικά έλαια (ελαιόλαδο, φοινικέλαιο, βαμβακέλαιο) είναι πλούσια σε τοκοφερόλες. Εκτός αυτών καλές πηγές της βιταμίνης Ε αποτελούν οι ξηροί καρποί, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, στα δημητριακά, στο αβοκάντο. Ανεπάρκεια στη συγκεκριμένη βιταμίνη δε συναντάται συχνά έκτος αν συντρέχουν παθολογικοί λόγοι όπως παγκρεατίτιδα, στεατόρροια, ασιτία. Πρόκειται για μια βιταμίνη που περιέχεται σε πλήθος τροφίμων και σε ικανοποιητικές ποσότητες, μπορεί να αποθηκευτεί στον οργανισμό επαρκώς και για σημαντικό χρονικό διάστημα. Υπερκατανάλωση της βιταμίνης Ε, ειδικά μέσω συμπληρωμάτων, δεν έχει ιδιαίτερα τοξική επίδραση, σε σχέση με άλλες βιταμίνες, όμως μπορεί τελικά να μείωση την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών ( Α, D, Ε, Κ) από τον οργανισμό. (Χασαπίδου 2008)

### **2.6.3 Καροτενοειδή**

Τα καροτενοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών χρωστικών που συντίθενται αποκλειστικά σε φυτικούς οργανισμούς, σε πολλούς μικροοργανισμούς και όχι σε ζωικούς. Στη συγκεκριμένη ομάδα φυσικών χρωστικών οφείλεται το κίτρινο, το πορτοκαλί και το κόκκινο χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών.

Στη φύση έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 600 είδη καροτενοειδών. Πολλά εξ αυτών είναι πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης Α ή αλλιώς ρετινόλης. Ωστόσο περίπου 50 καροτενοειδή μπορούν να συνθέσουν τελικά τη βιταμίνη Α. Στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου απαντώνται περίπου 40 ενώσεις καροτενοειδών ενώ στους σε ανθρωπίνους ιστούς έχουν εντοπιστεί γύρω στις 20. Το πιο δημοφιλές και ταυτόχρονα σημαντικό καροτενοειδές είναι το β- καροτένιο. Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, με τη βοήθεια του ενζύμου της β-καροτενοειδής

15,15' διοξυγονάσης, το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε δύο όμοια μόρια βιταμίνης Α. Όμως, όπως προαναφέρθηκε, δεν έχουν όλα τα καροτενοειδή τη δυνατότητα να συνθέσουν ρετινόλη, ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το λυκοπένιο. Τα καροτένια ανήκουν στη κατηγορία των πολυένιων. Ο βασικός τους σκελετός περιέχει 40 άτομα άνθρακα και μέσω διαφοροποίησης της βασικής τους δομής σχηματίζονται δακτύλιοι στις τελικές ομάδες πράγμα που προσδίδουν τα χαρακτηριστικά χρώματα καθώς επίσης και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επιπλέον, τα καροτονοειδή μπορούν να πάρουν trans ή cis διαμόρφωση στο χώρο, εξαιτίας των διπλών δεσμών που περιέχουν στο μόριό τους. Η trans διαμόρφωση είναι η πιο σταθερή δομή και η πλέον διαδεδομένη στη φύση. Όμως, και το β-καροτένιο και πιο συγκεκριμένα η 9-cis-β-καροτένιο δομή είναι εξίσου διαδεδομένη. Με την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως θέρμανση ή έκθεση στο φως διευκολύνεται η μετατροπή της trans μορφής σε cis. Τα καροτενοειδή που στο μόριό τους περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες οξυγόνου ονομάζονται ξανθοφύλλες. Οι κυριότερες ξανθοφύλλες είναι η λουτεΐνη, ζεαξανθίνη και η κρυπτοξανθίνη. Ενώ όσα καροτονοειδή δε περιέχουν ομάδα οξυγόνου καλούνται καροτένια ή υδρογονοανθρακικά καροτενοειδή. Έχουν λιπόφιλο χαρακτήρα και γι' αυτό το λόγο η απορρόφησή τους βελτιώνεται παρουσία λιπών. Όσα καροτονοειδή κατέχουν ενεργότητα της βιταμίνης Α μπορούν να απορροφηθούν χωρίς να διασπαστούν ή να διασπαστούν σχηματίζοντας βιταμίνη Α και στη συνέχεια να απορροφηθούν στα βλεννογόνα κύτταρα του εντέρου. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν το μέσο μεταφοράς των καροτονοειδών στο πλάσμα. Το λυκοπένιο και το β-καροτένιο μεταφέρονται με τις LDL και εντοπίζονται στο πυρήνα των λιποπρωτεϊνών, ενώ η μεταφορά της ζεαξανθίνης γίνεται με τη την HDL.

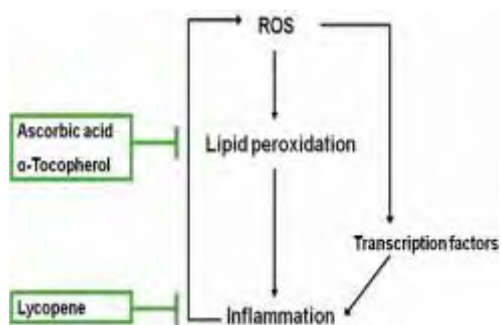
Αντιοξειδωτική δράση:

Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα ισχυροί απενεργοποιητές του μονήρους οξυγόνου ( $^1O_2$ ). Ένας τρόπος είναι η διεγερμένη μορφή του  $^1O_2$  οδηγείται στο καροτονοειδές και εν συνεχεία αποβάλλεται στο περιβάλλον με τη μορφή θερμότητας και ο δεύτερος τρόπος αφορά την χημικά εξουδετέρωση του  $^1O_2$  από το καροτενοειδές με την εισαγωγή του σε διπλό δεσμό. (Παπαγεωργίου 2005)

### **2.6.3.1 Λυκοπένιο**

Το λυκοπένιο περιέχεται στη ντομάτα (συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων της) και ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Από επιδημιολογικές μελέτες θεωρείται ότι το λυκοπένιο παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση στην ανάπτυξη εκφυλιστικών ασθενειών (όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα), στην προαγωγή των βλαβών του DNA και συνεπώς και του καρκίνου. Οι διαπιστώσεις αυτές

οδήγησαν στο προληπτικό ρόλο που διαδραματίζουν τα καροτενοειδή και το λυκοπένιο έναντι των εκφυλιστικών νοσημάτων. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν πως το λυκοπένιο ασκεί προστατευτική δράση από τη φθορά που προκαλείται από  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  και την υπεριώδη ακτινοβολία. Η καθημερινή κατανάλωση πουρέ ντομάτας (7mg λυκοπενίου/ημερησίως) για δύο εβδομάδες, όπως απεδείχθη ήταν ικανή να παρέχει προστασία στο DNA των λεμφοκυττάρων από την οξειδωτική βλάβη *ex vivo* που προκαλεί το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Francesco Visioli 2003) Τέλος, η χρόνια φλεγμονή, που είναι συνυφασμένη με το οξειδωτικό στρες, αποτελεί μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία και περιλαμβάνει διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες όπως η παραγωγή κυτοκινών και ποικίλων άλλων ουσιών. Το λυκοπένιο φαίνεται να μπορεί να αναστείλει του συστήματος καταρράκτη ως προς την παραγωγή ουσιών που ενισχύουν και προάγουν τη φλεγμονή. (Merel Hazewindus 2011)



Το λυκοπένιο δρα υποστηρικτικά στην επίδραση του ασκορβικού οξέος και της α-τοκοφερόλης έναντι των ROS, που στη συνέχεια θα προκαλέσουν

υπεροξειδωση των λιπιδίων και έτσι να δημιουργηθεί φλεγμονή. Η διαδικασία αυτή διακόπτεται από το λυκοπένιο, μέσω αναστολής του σχηματισμού φλεγμονής

### 2.6.3.2 Λουτεΐνη

Η λουτεΐνη ανήκει στα καροτενοειδή και δεν αποτελεί πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό της ρετινόλης. Ανεύρεται στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά όπως είναι το σπανάκι, το λάχανο, το καλαμπόκι, τα λαχανάκια Βρυξελλών. Θεωρείται ως ισχυρό αντιοξειδωτικό και χαρακτηριστικό της δομής του είναι η ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας σε κάθε άκρο. Αυτή η ιδιαιτερότητα στη δομή της λουτεΐνης τη καθιστά πιο υδρόφιλη και πιο ευάλωτη στην αντίδραση με το ελεύθερο οξυγόνο, σε σχέση με τα υπόλοιπα καροτενοειδή. Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να αποδιοργανώσει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (τόσο τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά που διαθέτει ο οργανισμός όσο και τα μη ενζυμικούς μηχανισμούς άμυνας). Μια τέτοια κατάσταση θα οδηγήσει με σαφήνεια σε πρόκληση οξειδωτικών βλαβών. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος, όντας εκ φύσης ευαίσθητο αλλά ταυτόχρονα και ζωτικής σημασίας όργανο, μπορεί να υποστεί τις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες. Η υψηλή συσσώρευση λιπιδίων, τα οποία δεν απομακρύνθηκαν

από τα ποικίλα αντιοξειδωτικά μέσα, πιθανώς να είναι συν- αιτία στην εμφάνιση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Το ισχαιμικό επεισόδιο συνοδεύεται από φλεγμονή, όχι βραχείας διάρκειας, η οποία συνακολουθείται από οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες με τη σειρά του θα αποτελέσει παράγοντα ενεργοποίησης απελευθέρωσης πρωτεϊνικής κινάσης από τα μιτοχόνδρια καθώς επίσης και του πυρηνικού παράγοντα κΒ. Ο συγκεκριμένος παράγοντας αποτελεί παράγοντα μεταγραφής, σχετιζόμενο με τη γονιδιακή ρύθμιση και τη κυτταρική απάντηση κατά το χρονικό διάστημα μετά την εμφάνιση φλεγμονής. Η λουτεΐνη που ασκεί μια αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση θα μπορούσε να ένα μέσο για θεραπεία και κυρίως βελτίωσης προς στους ασθενείς που έχουν υποστεί ισχαιμικό επεισόδιο. Τελικά, η λουτεΐνη φαίνεται να κατέχει νευρο- προστατευτική ικανότητα και εκτός αυτού αποτελεί ένα ασφαλές συμπλήρωμα διατήρησης της οφθαλμικής υγείας. (Suk-Yee Li 2012)

#### **2.6.4 Βιταμίνη B<sub>3</sub> ή νιασίνη ή νικοτικό οξύ**

Αποτελεί μέρος των οξειδοαναγωγικών συνενζύμων NAD και NADP που συμμετέχουν σε μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας και βιοσυνθετικούς μηχανισμούς. Μπορεί να παραχθεί από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Πηγές η μαγιά, τα καρύδια, κοτόπουλο, συκώτι, ξηροί καρποί. 19mg Η έλλειψή της μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδες, διάρροια, άνοια. Από μελέτες έχει αποδειχθεί πως το νικοτικό οξύ μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση αποπρωτεΐνης Β και έχει σημαντική επίδραση στην HDL χοληστερόλη. (Πέτρου Χρήστος 2007) Επιπροσθέτως, η νιασίνη ασκεί ευεργετική δράση ενάντια των υπερλιπιδαιμιών. Μάλιστα, σε κλινικές έρευνες προέκυψε το συμπέρασμα ότι θα μπορούσε η χορήγηση Β3 να χρησιμοποιηθεί ως μονοθεραπεία και/ή να συνδυάζεται με ειδική φαρμακευτική αγωγή (πχ στατίνες) με ικανοποιητικά αποτελέσματα. (Farmer 2009)

#### **2.6.5 Σελήνιο (Se)**

Το σελήνιο είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο και έχει ιδιαίτερη σημασία στην υγεία του ανθρώπου. Περιέχεται στα ψάρια, στα οστρακοειδή, στο κρέας, στους ξηρούς καρπούς και απορροφάται από το λεπτό έντερο. Η περίσσεια του σεληνίου αποθηκεύεται κυρίως στο ήπαρ και στους μύες καθώς επίσης στα νεφρά, στο πλάσμα και σε άλλα όργανα όπως στο θυρεοειδή αδένα, στις ωθήκες, στους όρχεις, στο σπλήνα και στην υπόφυση. Παράγονται 25 διαφορετικές σεληνοπρωτεΐνες στον ανθρώπινο οργανισμό που αφορούν λειτουργίες του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινολογικού συστήματος. Τα έξι είδη της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ή GPx (περιέχουν στο μόριό τους σελήνιο)

παρέχουν σπουδαία αντιοξειδωτική άμυνα στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλουν στην εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου καθιστώντας το αβλαβές. Με αυτό τον τρόπο διατηρείται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι ελαχιστοποιείται η εξάπλωση της οξειδωτικής καταστροφής στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και στο DNA. Ολοένα και αυξάνουν τα στοιχεία που φανερώνουν πόσο σημαντικό ρόλο κατέχει για τη φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Σε πολλές πληθυσμιακές ομάδες η πρόσληψη να μη μπορεί να υποστηρίξει την έκφραση των σεληνοπρωτεϊνών. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει την έλλειψη σεληνίου με αναπαραγωγικές (στεριότητα τόσο σε άντρες όσο και σε γυναίκες) και μαιευτικές επιπλοκές (αποβολές, προεκλαμψία, διαβήτη κυήσεως, μη ικανοποιητική ανάπτυξη εμβρύου, πρόωρος τοκετός) (Hilten D.Mistry PhD 2011)

### **2.6.6 Ψευδάργυρος (Zn)**

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο στη διατροφή. Πλούσιες πηγές ψευδαργύρου είναι τα θαλασσινά και κυρίως τα στρείδια, το κοτόπουλο, τα φασόλια, τα καρύδια και τα γαλακτοκομικά. Ασκήν αντιοξειδωτική δράση και συχνά η επίδρασή του ενάντια στο οξειδωτικό στρες αφορούν παθήσεις όπως σακχαρώδης διαβήτης και καρδιαγγειακά νοσήματα.

Ο σακχαρώδης διαβήτης συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων οξειδωτικών βλαβών που συνοδεύονται από εμφάνιση υπεργλυκαιμίας, αντίστασης στην ινσουλίνη, υπερινσουλιναιμία, υπερχοληστερολαιμία. Οι δύο κύριες και άκρως συχνές μορφές σακχαρώδους διαβήτη είναι: ο διαβήτης τύπου I και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II. Οι ασθενείς με τύπου I διαβήτη έχουν μια βαθμού ανεπάρκεια έκκρισης της ινσουλίνης ενώ εκείνοι με διαβήτη τύπου II έχουν ένα συνδυασμό αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης και ταυτόχρονα παρουσιάζεται ανεπάρκεια στην αντισταθμιστική έκκριση ινσουλίνης. Ο ψευδάργυρος φαίνεται να ασκεί στην ινσουλίνη (βάση αποτελεσμάτων) υποστηρικτική δράση. Ως σήμα μεταγωγής της ινσουλίνης και επίσης συμβάλλει στη μείωση της παραγωγής κυτοκινών. Οι κυτοκίνες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο τα β-παγκρεατικά κύτταρα, όταν στο πάγκρεας υπάρχει κατάσταση φλεγμονής.

Σε ορισμένους διαβητικούς παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου στον ορό, γεγονός που οφείλεται στην Αυξημένη διούρηση των διαβητικών. Για να αντισταθμιστεί η απώλεια ψευδαργύρου δόθηκε συμπλήρωμα του ιχνοστοιχείου. Σε ένα θεωρητικό υπόβαθρο ο ψευδάργυρος θα μπορούσε να μειώσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως εκτοπίζοντας προ-οξειδωτικά μέταλλα (σίδηρο, χαλκό) από τις κυτταρικές μεμβράνες ή από τις λιποπρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μείωση των ελευθέρων ριζών, που



πραγματοποιείται μέσω του ενζύμου της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου και συγκεκριμένα με τη βοήθεια της μορφής SODs - Cu-Zn. Στα ζώα των οποίων η δίαιτα ήταν υψηλή σε χοληστερόλη, η χορήγηση συμπληρωμάτων ψευδαργύρου μειώνει τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα καθώς επίσης ελάττωσε την έκταση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και των αθηρωματικών πλακών, ακόμη κι αν αυτά τα ζώα δεν είχαν ανεπάρκεια ψευδαργύρου.

Σε μετα-ανάλυση στην οποία συμμετείχαν 14.238 άτομα στα οποία είχε χορηγηθεί συμπλήρωμα ψευδαργύρου, δε προέκυψε καμία συσχέτιση μεταξύ ψευδαργύρου και λιποπρωτείνων πλάσματος. Επιπροσθέτως, σε ανασκοπήσεις μελετών φαίνεται ότι τα συμπληρώματα ψευδαργύρου στην πρόληψη του διαβήτη τύπου II δε συσχετίζονται.

Σε άλλη μελέτη, καμία ευεργετική επίδραση στο οξειδωτικό στρες και στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού δεν εντοπίστηκε σε μεσήλικες και ηλικιωμένους ασθενείς που έλαβαν συμπληρώματα ψευδαργύρου. (Raymond C.S. Seet 2011)

### **3. Σταφύλια - Κρασί**

Στο κρασί περιέχονται περισσότερες από 500 ενώσεις, αλλά μόνο μερικές είναι σε συγκέντρωση πάνω από 100 mg/L. (Alberto A.A Bertelli 2009) Στα σταφύλια και ειδικά στις κόκκινες ποικιλίες ανιχνεύονται πολλές χημικές ενώσεις που φαίνεται πως βοηθούν στην προαγωγή της υγείας. Οι φαινολικές αυτές ενώσεις περιλαμβάνουν κυρίως τις ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή, τα σιλιβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες, και υπάρχουν κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών και αρμόδιες για το χρώμα των φρούτων σταφυλιών και είναι οι σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις στο σπόρο σταφυλιών και τη φλούδα του σταφυλιού η σάρκα δεν περιείχε ανθοκυανίνες. Στο κόκκινο κρασί, οι ανθοκυανίνες και τα φλαβονοειδή είναι οι σημαντικότερες δύο ομάδες φαινολικών ενώσεων. Τα φλαβονοειδή (π.χ. προ-ανθοκυανίνες) απαντώνται ευρέως στα σταφύλια και ειδικά στις ρόγες σταφυλιού και στους μίσχους. (En-Qin Xia 2010) Η ποσότητα, η δομή, και ο βαθμός πολυμερισμού των προ-ανθοκυανινών των σταφυλιών διαφέρει και εξαρτάται κυρίως από τον ιστό του σταφυλιού. Το σταφύλι είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις. (En-Qin Xia 2010)

Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών διαφοροποιείται ανάλογα με: την ποικιλία, την εδαφολογική σύνθεση, το κλίμα, τη γεωγραφική προέλευση, τις μεθόδους καλλιέργειας και πιθανές ασθένειες. (En-Qin Xia 2010)

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις, που περιέχονται στα σταφύλια, ολοένα και αυξάνει. Γεγονός που εστιάζεται στις βιολογικές ιδιότητες.

(αντιοξειδωτικές, κάρδιο-προστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδης, αντιγηραντικές και αντιμικροβιακές) που συνδέουν τις φαινολικές ενώσεις με τα πιθανά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου.

Έχει μελετηθεί ευρέως και σε μεγάλο βαθμό η βιοδραστικότητα των φαινολικών ενώσεων όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (δηλαδή τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών, της παρεμπόδισης της οξειδωσης των λιπιδίων, την παρεμπόδιση δημιουργίας υπεροξειδίων). Χαρακτηριστικά, ο χυμός του σταφυλιού ασκεί προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον και το κόκκινο κρασί θεωρείται πως προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από το οξειδωτικό στρες, ιδιότητα που κατέχουν και τα εκχυλίσματα σταφυλιού. (Πίνακας 1) (En-Qin Xia 2010)

Resource	Antioxidant activity
grape seed	decreasing the oxidated LDL in plasma
juice	reducing oxidative stress in serum
red wine	protection against membrane oxidation of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> induced by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
fruit beverage (grape+orange+apricot)	protecting mitochondrial and the antioxidant system against oxidative stress induced by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
grape wine	protecting hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation
defatted milled grape seed	dealing with the oxidant stress induced by chemical anticancer adriamycin; reducing TBAS and elevating the levels of GSH and ATP
grape seed extract	food preservatives for fish flesh and oil
white grape dietary fiber concentrate	antioxidation for polyunsaturated fatty acid in oil

**Πίνακας 1.** Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αποσταγμάτων των σταφυλιών και των προϊόντων του

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών και το κρασί έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που να αφορούν τις θετικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων από τα επιμέρους στελέχη του σταφυλιού. Όλα τα εκχυλίσματα των στελεχών του σταφυλιού μπορούν και αναστέλλουν την επιζήμια δράση των OH<sup>-</sup> και ROO<sup>-</sup> στο DNA. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα από βλαστούς σταφυλιών που προέρχονται από τις ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* αναστέλλουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HepG2 και HeLa. (Apostolou 2013)

Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος μετατοπίστηκε στη διερεύνηση της πιθανής χημειο-προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από σταφύλια, λόγω του υψηλού

αντιοξειδωτικού περιεχομένου τους. Σε μια σειρά από in vitro και in vivo μελέτες σε διάφορες ελληνικές ποικιλίες

σταφυλιών διερευνήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, δηλαδή της οξειδάση της ξανθίνης (XO), της καταλάσης (CAT) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράσης της SOD ενώ η XO και η CAT φαίνεται ότι λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά. Τα εκχυλίσματα φάνηκε να ασκούν προ-οξειδωτική δράση η οποία πιθανώς να εξαρτάται τόσο από τη σύνθεση όσο και από τη συγκέντρωση πολυφαινολικών συστατικών που περιέχουν. (Spanou 2011)

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν υποστηρίξει την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων σταφυλιών και του οίνου έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του στομάχου. Αυτή η ιδιότητα οφείλεται κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που εντοπίζονται στα σταφύλια. Οι πολυφαινόλες οι οποίες απαντώνται σε αφθονία στα εκχυλίσματα ελληνικών ποικιλιών σταφυλιού (*Vitis vinifera*), ήταν ισχυροί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I, (που δείχνει ότι η αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό για την αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα σταφυλιού ανέστειλαν την μιτομυκίνη C (αναστέλλει τη διαίρεση του DNA με το σχηματισμό συμπλόκου με αυτό, ασκώντας έτσι αντικαρκινική δράση) γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να εμποδίζουν βλάβες από τις ROS στο DNA. Οι φυτικές πολυφαινόλες ενισχύουν τη μιτομυκίνη C που δρα ως προοξειδωτικό. (Stagos 2005) Επίσης, in vivo και in vitro μελέτες απέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών μπορούν να δράσουν αποτρέποντας την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Η αντι-μεταλλαξιγόνο δράση των εκχυλισμάτων από τις ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών του είδους *Vitis vinifera*, εκτιμήθηκε ως ένας πιθανός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός, ενάντια στις επιζήμιες βλάβες στο DNA. Οι δύο ποικιλίες σταφυλιών ήταν Ασύρτικο (λευκά σταφύλια) και Μανδηλαριά (κόκκινα σταφύλια), ενώ οι οξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μπλεομυκίνη (BLM) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Σχεδόν όλα τα εκχυλίσματα έδειξαν να έχουν ανασταλτική δραστηριότητα έναντι δύο μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα είτε δεν υποβαθμίζουν είτε δεν ενισχύουν τη δράση των μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η προστασία του DNA από μεταλλάξεις που προκαλούνται από ROS μπορεί να περιλαμβάνονται στους μηχανισμούς χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων σταφυλιών. Ωστόσο, φαίνεται ότι αυτή η προστατευτική δράση δεν μπορεί να αποδοθεί στις πολυφαινόλες, αλλά μάλλον στη συνέργεια πολλών ενώσεων που περιέχονται στα σταφύλια. (Stagos 2006) Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί ότι η έννοια της

χημειοπροφύλαξης έχει ένα ευρύτερο νόημα. Η χημειοπροφύλαξη είναι συνιστώσα πολλών παραγόντων που αφορούν και στοχεύουν κυρίως στην πρόληψη με σκοπό την παρεμπόδιση εμφάνισης εκφυλιστικών παθήσεων (Stagos D. 2005).

Το γαλλικό παράδοξο

Ο όρος "γαλλικό παράδοξο", εντοπίστηκε στη Γαλλία το 1992 οπότε και για πρώτη φορά, επισημάνθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ). Αφορά το χαμηλό ποσοστό της θνησιμότητας των Γάλλων από στεφανιαία νόσο. (Alberto A.A Bertelli 2009) Τα καρδιαγγειακά είναι πολύ-παραγοντικά νοσήματα και οφείλονται στο κάπνισμα, στην αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους, στην παχυσαρκία, στην έλλειψη φυσικής άσκησης. Το παράδοξο που εντοπίστηκε στο γαλλικό πληθυσμό έγκειται στο γεγονός ότι ενώ οι Γάλλοι καταναλώνουν σε καθημερινή βάση σημαντικές ποσότητες λίπους. Εν τούτοις έχουν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σε σχέση με την αναμενόμενη, μιας και στο δυτικό κόσμο, η θνησιμότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις τείνει να αποτελεί μάλιστα της εποχής. Τελικά εντοπίστηκε ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ καρδιαγγειακών και κατανάλωσης κόκκινου κρασιού. Αυτή η διαπίστωση προέκυψε στηριζόμενη στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κρασιού, που οφείλονται στα συστατικά του (όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες, η ρεσβερατρόλη στην οποία και αποδίδονται κυρίως οι ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού). (Alberto A.A Bertelli 2009) (En-Qin Xia 2010) (Michael Bohm 2003).

### **3.1 Πολυφαινόλες**

Οι πολυφαινόλες είναι οργανικές χημικές ενώσεις που περικλείουν μια εκτεταμένη ποικιλία φυσικών αντιοξειδωτικών (τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα σιλιβένια και τις λιγνάνες) καθένα από τα οποία έχει εξατομικευμένα χαρακτηριστικά και δράση. Η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η αποβολή τους διαφέρει μεταξύ των πολυφαινολικών ειδών. Απαντώνται σε όλους τους φυτικούς ιστούς και γι' αυτό το λόγο τα προσλαμβάνουμε καθημερινά μέσω της διατροφής. Αν και έχει διεξαχθεί ένας μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με τα οφέλη των τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, για το οξειδωτικό στρες και τις υπερλιπιδαιμίες εν τούτοις τα αποτελέσματα που προκύπτουν θα χαρακτηρίζονταν ασαφή. Ωστόσο, τα συνεπέστερα ευρήματα ερευνών αφορούν το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες δρουν ευεργετικά στην ενδοθηλιακή λειτουργία και στην ομοιόσταση. (Manach C 2005)

### **3.1.1 Φαινολικά οξέα**

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται ενδεικτικά στα σιτηρά, στο λιναρόσπορο, στα φρούτα, στο ελαιόλαδο, στο κρασί, στα όσπρια, στα καρυκεύματα.

### **3.1.2 Φλαβονοειδή**

Πρόκειται για μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων, που περιλαμβάνει τις φλαβανόλες, τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες. Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε σχεδόν όλα τα τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Ο ρόλος των ενώσεων αυτών, έχει χαρακτήρα προστατευτικό ενάντια των βλαβών που προκαλούνται στα κύτταρα από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να συμβάλλουν στη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, γεγονός που προέκυψε με αφορμή το γαλλικό παράδοξο (υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού, κάπνισμα, μειωμένη φυσική δραστηριότητα, υψηλή κατανάλωση λιπαρών και παραδόξως ο πληθυσμός είχε μικρά ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακών). Εν τούτοις, τα φλαβονοειδή δεν είναι αμιγώς αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με βάση την in vivo τοξικότητα ορισμένων φλαβονοειδών. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση η δράση τους μπορεί να είναι ωφέλιμη, δεδομένου ότι μια ήπιου βαθμού αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. (D. Procházková a 2011)

#### **Φλαβανόλες**

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες που υπάρχουν σε αφθονία στο κόκκινο κρασί, στη σοκολάτα και στο πράσινο τσάι. Μάλιστα κατά τη ζύμωσή του πράσινου τσαγιού θα παραχθούν πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι ταννίνες.

#### **Φλαβόνες**

Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη)

#### **Φλαβονόλες**

Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκιδίνη που βρίσκεται σε πληθώρα φρούτων, λαχανικών, ποτών, στα κρεμμύδια και στο καφέ. Εκτός της κερκιδίνης, στις φλαβονόλες κατατάσσονται η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη.

### **Φλαβανόλες**

Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη.

### **Ισοφλαβόνες**

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιο-προστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>\*</sup>) (Wendy L. Halli 2005)

### **Ανθοκυανιδίνες**

Στις ανθοκυανίδες οφείλεται το κόκκινο, μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος τα επίπεδα της γλυκόζης, τη γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Σε αυτή τη μελέτη, στους διαβητικούς χορηγήθηκαν ολιγομερή των προανθοκυανιδινών και όχι πολυμερή. Τελικά, οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα ολιγομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδης καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012)

### **3.1.3 Στιλβένια**

Στη κατηγορία των στιλβενίων αντιπροσωπευτική χημική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη. Είναι λιγότερο διαδεδομένη στη διατροφή σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες. Βρίσκεται γενικά στο κρασί και ειδικά δε στο κόκκινο. Έρευνες έχουν δείξει τη αντιοξειδωτική της δράση κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. (Παπαγεωργίου 2005)

### **3.1.4 Λιγνάρες**

Λιγότερο δημοφιλής πολυφαινόλης. Απαντώνται μόνο στο λινέλαιο και στο λιναρόσπορο. (Παπαγεωργίου 2005)

## **4. Ενδοθηλιακά κύτταρα σειράς EAhy 926**

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πολυλειτουργικά, πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση, τα οποία έρχονται σε επαφή με το αίμα. Διασυνδέονται με συναπτικά συμπλέγματα και φέρουν πολλά πινοκυτταρικά κυστίδια. Στο κυτταρόπλασμά τους αναγνωρίζονται λίγα οργανίδια (συσσκευή Golgi, ΑΕΔ, μιτοχόνδρια και ελεύθερα ριβοσώματα), ενδιάμεσα νημάτια βιμεντίνης και άφθονα μικρονημάτια(<http://emed.med.uoa.gr/>).

Η κυτταρική σειρά EAhy926 δημιουργήθηκε μέσω υβριδισμού ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου. Από αυτή τη διαδικασία προέκυψε μια κυτταρική σειρά που διαθέτει πολλές ιδιότητες από το αγγειακό ενδοθήλιο, όπως η έκφραση του παράγοντα Von Willebrand, παράγοντα πήξης VIII (αντι-αιμοφιλικός παράγοντας), ενεργοποιητή πλασμινογόνου ιστού, και θρομβομοντουλίνη. Τα κύτταρα EAhy926 αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς σε καλλιέργεια που δεν απαιτεί ιδιαίτερους παράγοντες ανάπτυξης. Έχουν ένα μοναδικό χρωμοσωμικό δείκτη που καθιστά εύκολη την ταυτοποίηση τους. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα κύτταρα αυτά ως ένα ιδανικό πρότυπο σύστημα για ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό και την ανάλυση των ενώσεων για παθήσεις που συνδέονται με το ενδοθηλιακό σύστημα όπως: υψηλή / χαμηλή πίεση του αίματος, την πήξη του αίματος, αρτηριοσκλήρωση, την αγγειογένεση και τη φλεγμονή.

Τα EAhy926 κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί και σε μελέτες που αφορούν τη διερεύνηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Για παράδειγμα, σε δύο ομάδες αθλητών τριάθλου έγινε προσδιορισμός οξειδωτικών δεικτών στον ορό αίματος τους. Ο βασικός διαχωρισμός των δύο αυτών ομάδων έγινε με βάση την ένταση της άσκησης. Η πρώτη ομάδα (T1) περιελάμβανε αθλητές που ασκούσαν με μέτριας έντασης αερόβια άσκηση σε σχέση με τη δεύτερη όπου ο τρόπος εκτέλεσης των ασκήσεων ήταν πιο έντονος (T2). Τα επίπεδα θειοβαρβιτουρικού οξέος και υπεροξειδίου της δισμουτάσης ήταν παρόμοια και για τις δύο ομάδες. Η ομάδα T1 παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου και χαμηλότερη δραστικότητα της καταλάσης σε σχέση με τους αθλητές της ομάδας T2. Για τη

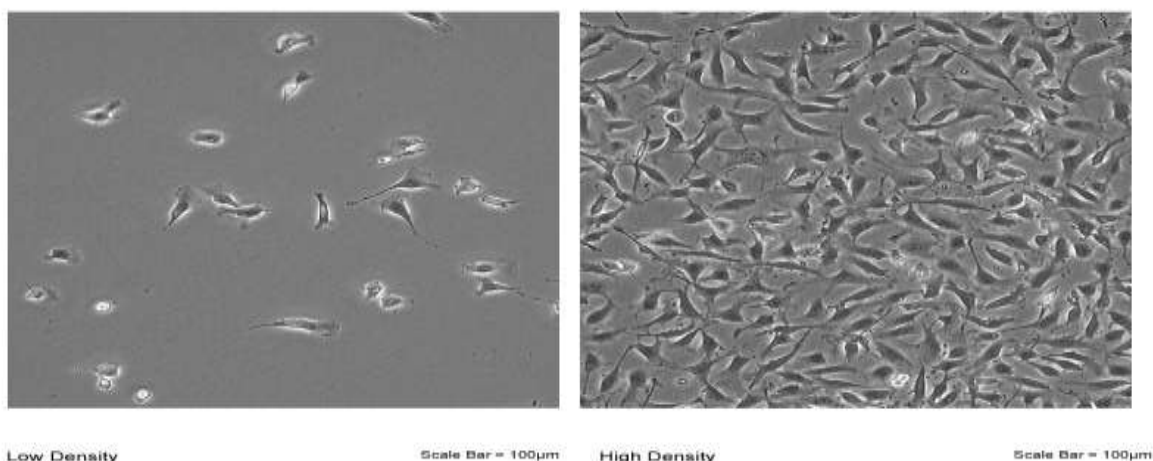
πειραματική διαδικασία της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926 τα οποία εκτέθηκαν στους ορούς των δύο διαφορετικών ομάδων. Η T1 ομάδα συσχετιζόμενη με τη T2 παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τα χαμηλότερα επίπεδα γήρανσης, τόσο πριν όσο και μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες. Μόνο για την ομάδα T1 παρατηρήθηκε αύξηση στους ρυθμιστικούς παράγοντες έναντι στο οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η T1 ομάδα απαιτεί μικρότερη ποσότητα καταλάσης για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τη T2 ομάδα, για ίση ποσότητα οξειδωτικού μέσου ( $H_2O_2$ ). Η καταλάση έχει προταθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες για τον προσδιορισμό των αλλαγών που συμβαίνουν σε σχέση με την ένταση της άσκησης. Πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι η απόκριση των ανθρώπινων κυττάρων στα διαφορετικά είδη άσκησης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της αερόβιας άσκησης παρατηρούνται να υπάρχουν στους αθλητές που εκτελούν μέτριας έντασης αερόβιες ασκήσεις (Conti 2013).

Επιπλέον, η κυτταρική σειρά EA.hy έχει χρησιμοποιηθεί για τη γονιδιακή έκφραση διαφόρων τύπων κολλαγόνου σε σχέση με την αγγειογένεση σε διαβητικούς ασθενείς.

Η κυτταρική σειρά EAhy926 παρουσιάζει εξαιρετικά διαφοροποιημένες λειτουργίες στο αγγειακό ενδοθήλιο. Ειδικό υποδοχείς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό καταβολισμού λιποπρωτεϊνών. Μια HDL θέση δέσμευσης είναι παρούσα στη πλασματική μεμβράνη πολλών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μυϊκών κυττάρων, των μακροφάγων και των ηπατικών κυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη διεργασία της μεταφοράς της χοληστερόλης στους περιφερικούς ιστούς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αυτούς τους υποδοχείς. Η κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων τύπου EAhy926 πιθανώς να αποτελεί ένα έγκυρο μοντέλο για τη μελέτη της "in vitro" αλληλεπίδρασης της HDL με ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Bern 1991).

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926 μελετήθηκαν και οι μηχανισμοί που υπάρχουν σε αυτά και επιφέρουν το τερματισμό της μιτογόνο-πρωτεϊνικής (MAP κινάση). Η MAP κινάση ενεργοποιείται ως απόκριση στο σχηματισμό της UTP. Η παύση της δραστηριότητας της MAP κινάσης ως απόκριση της UTP συνεπάγεται μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα για τη παύση της ευαισθητοποίησης και την επαγωγή μιας φωσφατάσης. (Graham 1996).

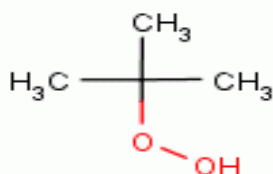




Εικόνα : Κύτταρα Ea.hy 926 σε οπτικό μικροσκόπιο

### 5. Tert-βούτυλο υδροξυπεροξειδίο (t-BOOH)

Το tert-Βούτυλο υδροξυπεροξειδίο είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ώστε να προκαλέσει οξειδωτικό στρες στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy 926.



Δομή του t-BOOH

Το t-BOOH χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα  $\text{Fe}^{2+}$  οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών  $\text{tBOO}^\bullet$  (Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες  $\text{tBOO}^\bullet$  (tert-butyl-hydroperoxy) όσο και η αλληλεπίδραση του t-BOOH με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξειδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA ( Latour et al., 1995).

## 7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικού εκχυλίσματος από στέμφυλα της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ενδοθηλιακών κυττάρων τύπου EAhy926. Για να διερευνηθεί η επίδραση στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικές μέθοδοι καθώς και κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες.

## 8 .Υλικά και μέθοδοι

### 4.1. Υλικά

Χημικά αντιδραστήρια

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

Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων τύπου EAhy 926 περιείχε:

Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l

Glucose, 1mM sodium pyruvate, 25mM HEPES, Gibco BRL 41966)

L-γλουταμίνη 2mM (Biochrom KG Seromed)

Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)

Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δύο θρεπτικά μέσα:

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

250ml DMEM41966

25mlFBS

2.5ml pen/str

2.5ml Γλουταμίνη

2) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS,

στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων από στέμφυλα που περιείχε:

250ml DMEM41966

2.5ml pen/str

2.5ml Γλουταμίνη

Καθώς επίσης,

Τρυψίνη 0.25% (Gibco)

PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)

Χρωστική Orange mercury (Sigma)

Χρωστική DCF (Sigma)

FACS Clean (Becton-Dickinson)

FACS Sheath (Becton-Dickinson)

FACS Rinse (Becton-Dickinson)

Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

## **7.2. Μέθοδοι**

### **7.2.1. Καλλιέργεια ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς EAhy926**

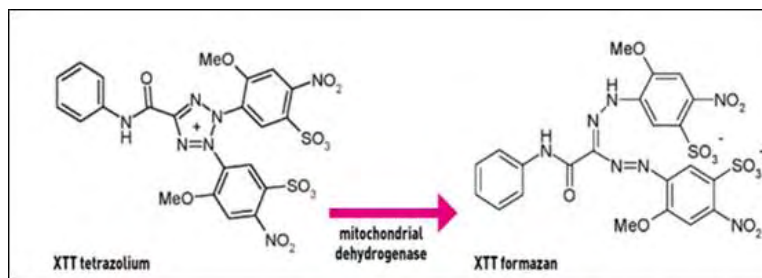
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C 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 (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow).

### **7.2.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος από στέμφυλα με τη μέθοδο XTT**

Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος στέμφυλων χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί

μια χρωματομετρική δοκιμή για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 15: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

#### Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθονταν 5000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του τριβλίου καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος από στέμφυλα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με το εκχύλισμα) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο ΧΤΤ σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο ΧΤΤ πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων Α και Β από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των Α και Β, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι ΧΤΤ reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το

εκχύλισμα και ΧΤΤ, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν με τριπλές επαναλήψεις. Η επί της % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων Ea.hy 926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

### **7.2.3 Κυτταρομετρία Ροής**

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του

πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φώς (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φώς (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

## **Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στα επίπεδα της γλουταθειόνης, των ελευθέρων ριζών και των TBARS μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.**

Τα κύτταρα επωάζονται σε 25cm<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 (5 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και το εκχύλισμα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0.0675, 0.125 και 0.250 µg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού FBS(4,5 ml) με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH (500µL) για 1 h. Χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με την πρωτεΐνη 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 προσδιορισμός των ελευθέρων ριζών και της γλουταθειόνης με κυτταρομετρία ροής και των επιπέδων TBARS φασματοφωτομετρικά αφού προηγήθηκε προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

*Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)*

Πειραματική διαδικασία

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 µL PBS και 15 µL χρωστικής mercury orange ή 15 µL χρωστικής DCF για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250 µL PBS και

φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 μL PBS και προχωράμε στην ανάλυση.

#### **7.2.4 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS**

##### Αρχή μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεΐδη (MDA). Η μηλονική διαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα.

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

##### Πειραματική διαδικασία

Τετρακόσια μL κυτταρικού αιωρήματος (80-100μg/ml πρωτεΐνη) για τα δείγματα ή 400μl απεσταγμένο νερό για το τυφλό προστέθηκαν σε 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCL (200mM, pH 7.4) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M)-TBA (55mM) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 95°C για 45 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και έπειτα αφού προστέθηκε 1 mL TCA 70% τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

##### Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times 7,5 / C_{\delta}$$

A<sub>δ</sub>: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A<sub>0</sub>: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.



$\epsilon_{530} \text{MDA}$  ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μηλονικής διαλδεΐδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L}$  αιωρήματος [3000  $\mu\text{L}$  /400  $\mu\text{L}$ ]).

$C_0$ : Η συγκέντρωση  $\text{mg/mL}$  της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

### **7.2.5 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  $\text{mg/mL}$  ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400  $\mu\text{g/mL}$ . Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{L}$  προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

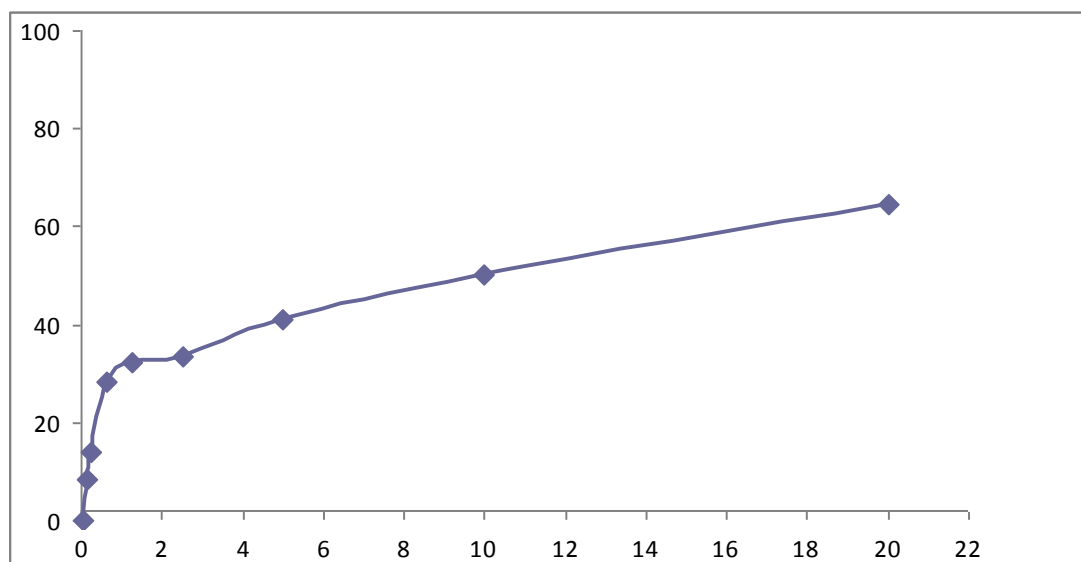
### 7.2.6 Στατιστική ανάλυση

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  $\pm$  SEM.

## 8. Αποτελέσματα

### Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος από στέμφυλα με τη μέθοδο του ΧΤΤ.

Το εκχύλισμα σε υψηλές δόσεις εμφάνισε κυτταροτοξική δράση. Οι συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία αποτελούσαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (0.0675, 0.125 και 0.250  $\mu\text{g/ml}$ ) όπως φαίνεται και παρακάτω στο γράφημα 1 που δείχνει την καμπύλη του ΧΤΤ για το εκχύλισμα. Ο άξονας y παριστάνει την % βιωσιμότητα των κυττάρων και ο άξονας x τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε  $\mu\text{g/ml}$ .

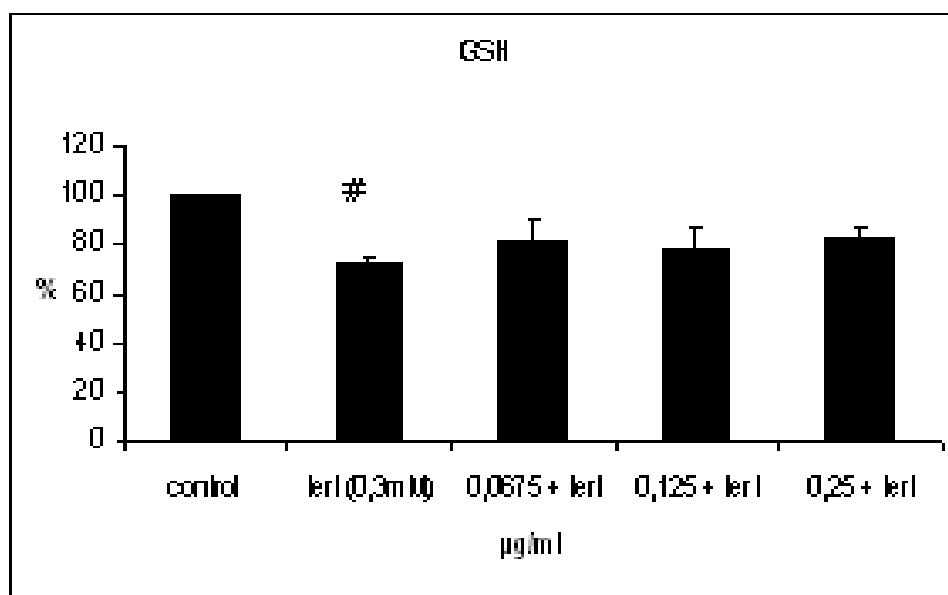


Γράφημα 1: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των EAhy 926 κυττάρων από το εκχύλισμα.

### Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής

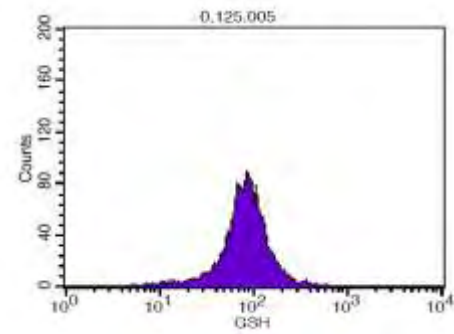
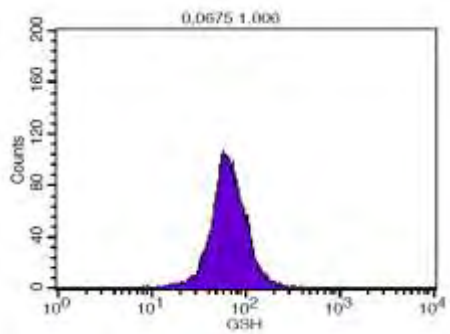
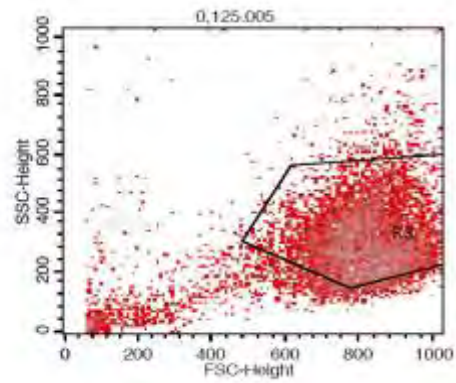
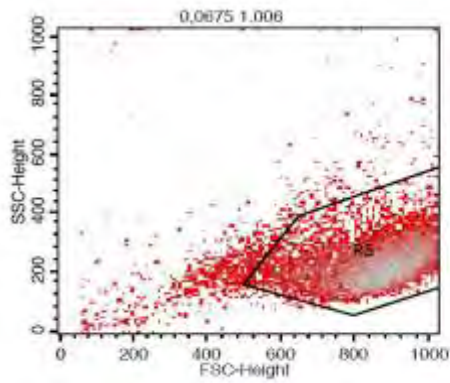
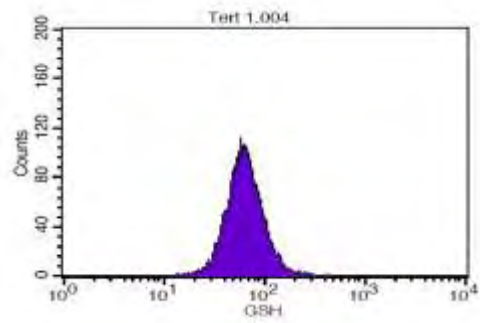
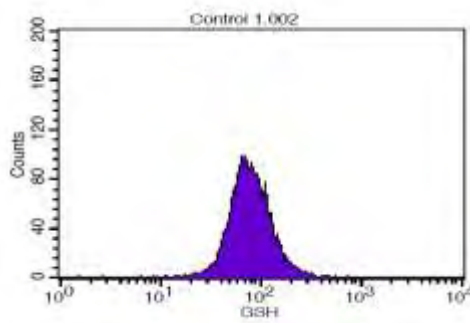
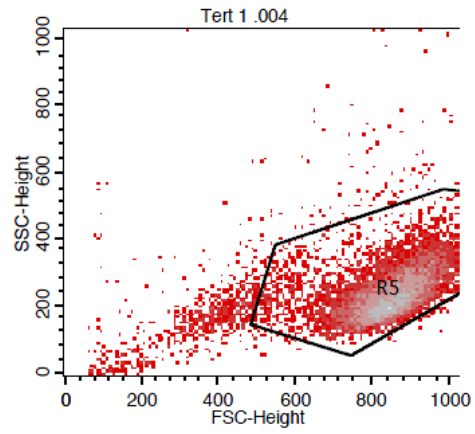
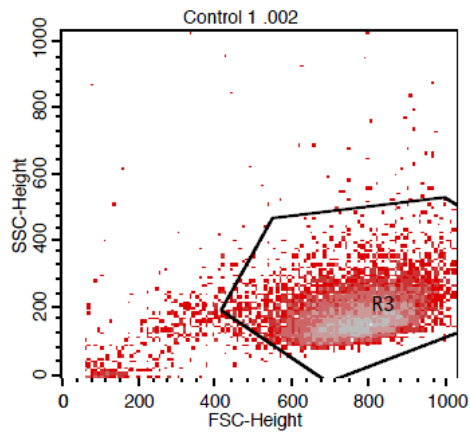
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926 ύστερα από επώαση με το εκχύλισμα από στέμφυλα (0,0675, 0,125, 0,250  $\mu\text{g/ml}$ ) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 60 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη του εκχυλίσματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

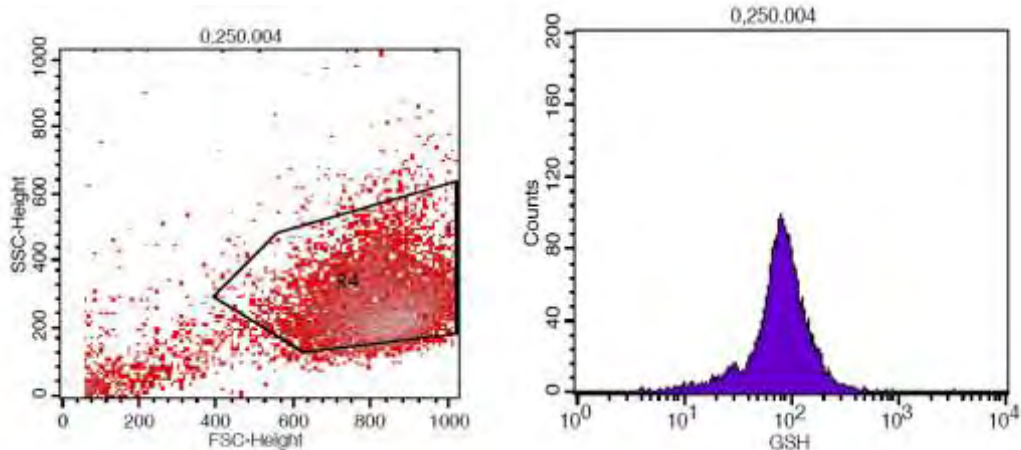
Στη GSH παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH κατά 29,5%. έπειτα από χορήγηση tert-butyl 0.3mM στα κύτταρα. Όταν όμως τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε εκχύλισμα στέμφυλων δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων GSH, ύστερα από την επώαση με tert-butyl. Εν τούτοις, παρατηρείται μια τάση αύξησης των επιπέδων της γλουταθειόνης ( $p = 0,18$ )



**Γράφημα 2:** Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EAhy926 υπό την φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3 $\mu\text{M}$ ) για 60 min.

Στο παρακάτω συγκεντρωτικό γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης από το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής



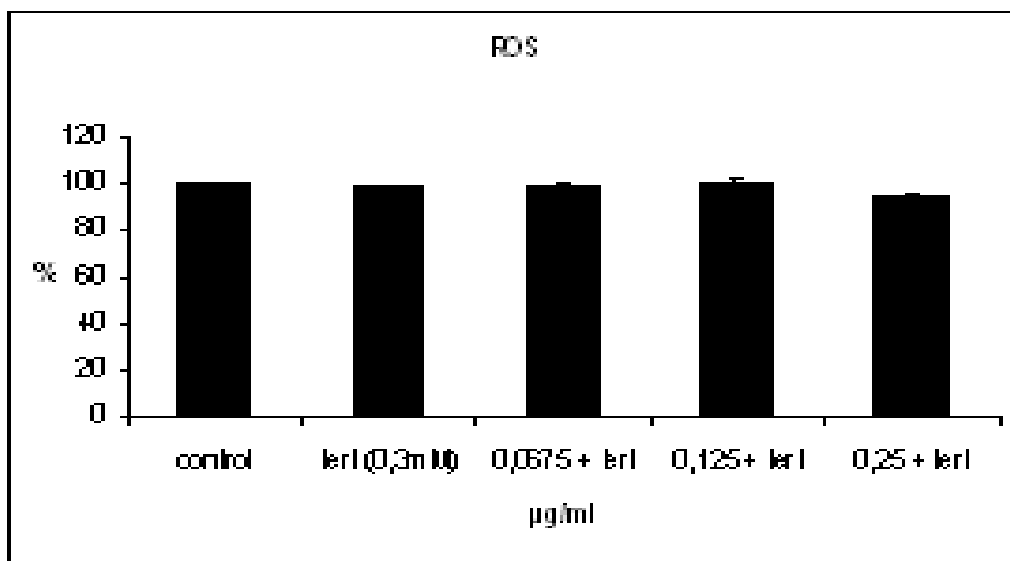


**Γράφημα 3:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EAhy 926 καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα EAhy 926. Τα ιστογράμματα δείχνουν τα επίπεδα της GSH μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης εκχυλίσματος από στέμφυλα και t-BOOH.

### Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

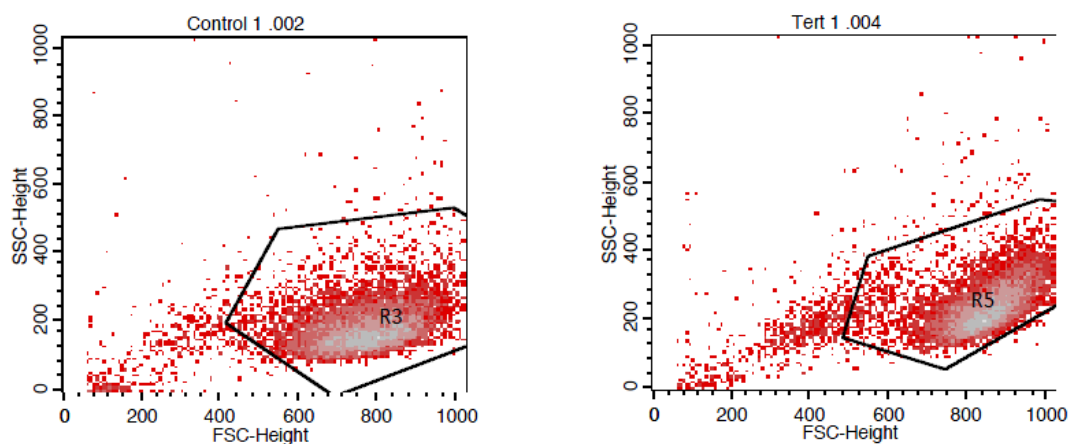
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου Ea.hy 926 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα από στέμφυλα (0,0675, 0,125, 0,250 μg/ml) για 24 ώρες. Ύστερα ακολούθησε προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 60 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη του εκχυλίσματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

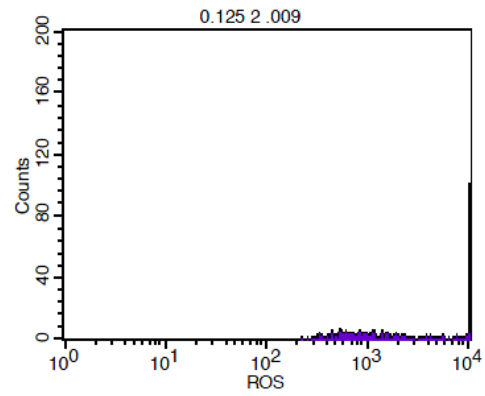
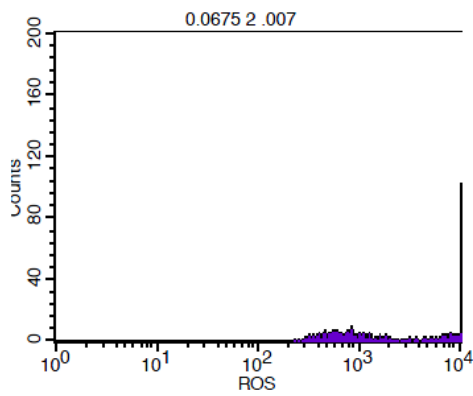
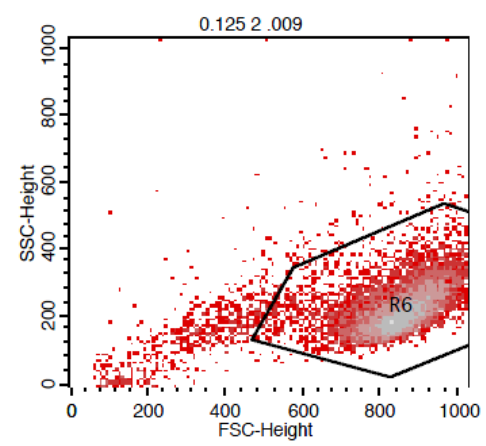
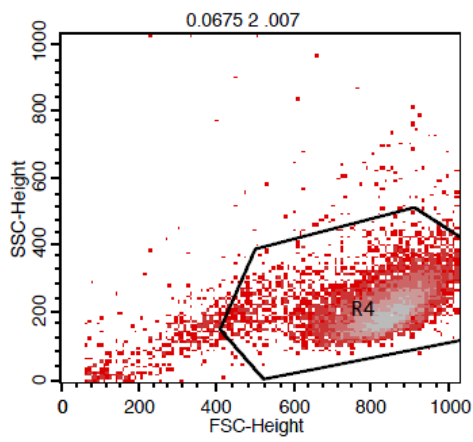
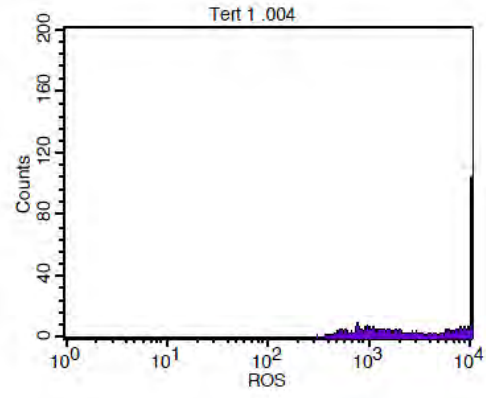
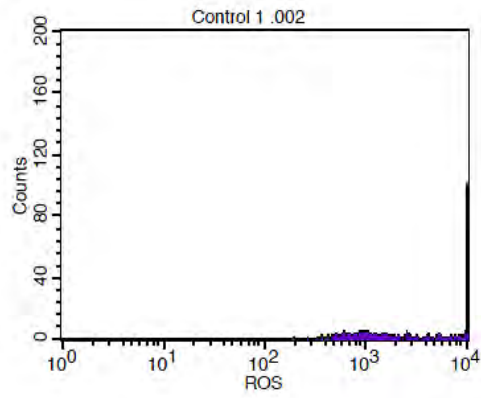
Όπως φαίνεται στο γράφημα 4 τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά για τις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος.

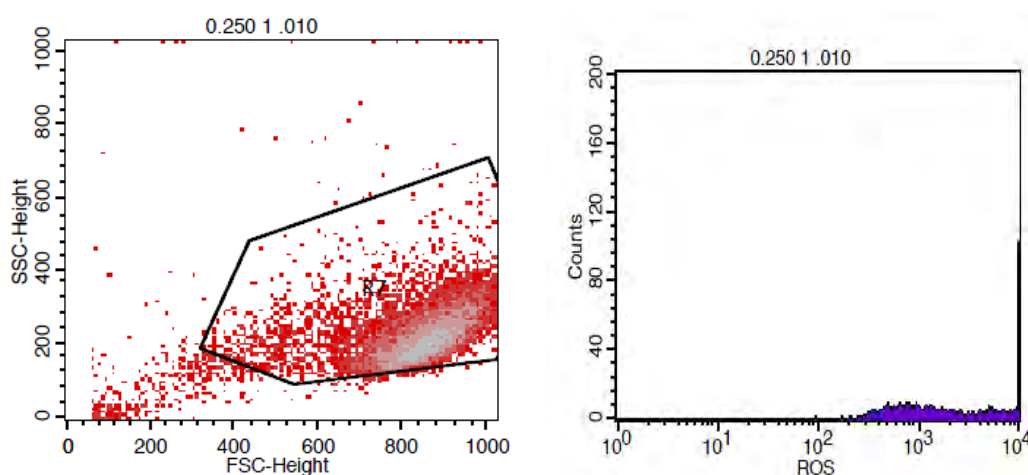


Γράφημα 4: Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3µM) για 60 min και υπό τον συνδυασμό εκχυλίσματος από στέμφυλα (0,0675, 0,125, 0,250 mg/ml) για 24 ώρες + tBOOH (0,3 mM) για 60 min.

Στο συγκεντρωτικό γράφημα 5 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS από το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής.







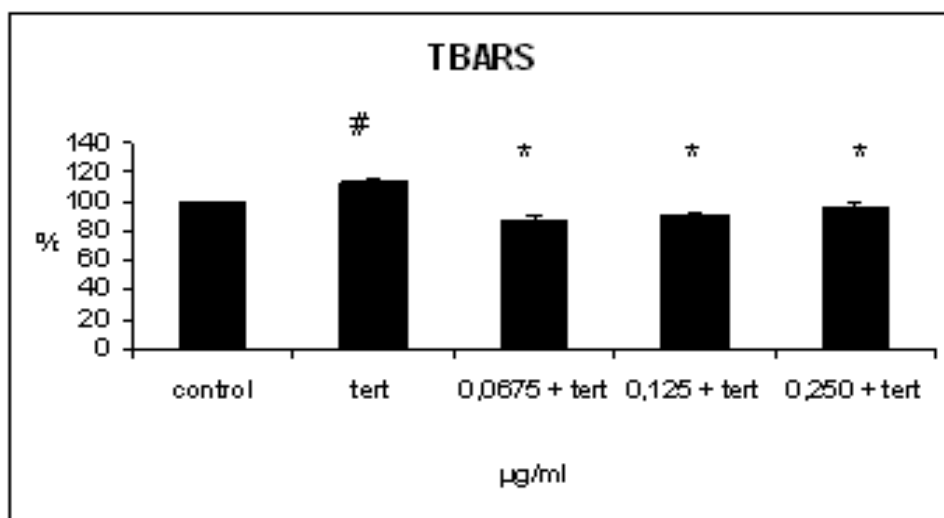
**Γράφημα 5:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EAhy 926 καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα EAhy 926. Τα ιστογράμματα δείχνουν τα επίπεδα των ROS μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο του t-BOOH και υπό το συνδυασμό χορήγησης εκχυλίσματος από στέμφυλα και t-BOOH.

#### 5.4 Προσδιορισμός των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)

Ο προσδιορισμός των TBARS έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σειράς EAhy 926 επωάστηκαν με το εκχύλισμα από στέμφυλα (0,0675, 0,125, 0,250 μg/ml) για 24 ώρες, η οποία στα δείγματα μας ακολουθούνταν από προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (0,3mM) για 60 min. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα των TBARS υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) αλλά και η επίδραση της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) χωρίς την προσθήκη του εκχυλίσματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Στα TBARS παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της τάξης του 13,3% όταν χορηγήθηκε tert-butyl. Ωστόσο όταν έχει προηγηθεί καλλιέργεια με εκχύλισμα στέμφυλων τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα κατά 23.3% (για τη συγκέντρωση 0,0675μg/ml), 20.1% (για τη συγκέντρωση 0,125μg/ml) και 17.7% (για τη συγκέντρωση 0,250μg/ml) συγκρινόμενα με την κατάσταση tert-butyl.





**Γράφημα 6:** Εκατοστιαία επίπεδα των TBARS στην κυτταρική σειρά EA.hy 926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο tBOOH (0,3μM) για 60 min και υπό τον συνδυασμό εκχυλίσματος (0,0675, 0,125, 0,250 μg/ml) για 24 ώρες και tBOOH (0,3 mM) για 60 min.

### 5.5 Προσδιορισμός οξειδωτικών δεικτών ύστερα από τη χορήγηση μόνο του εκχυλίσματος (GSH, ROS, TBARS)

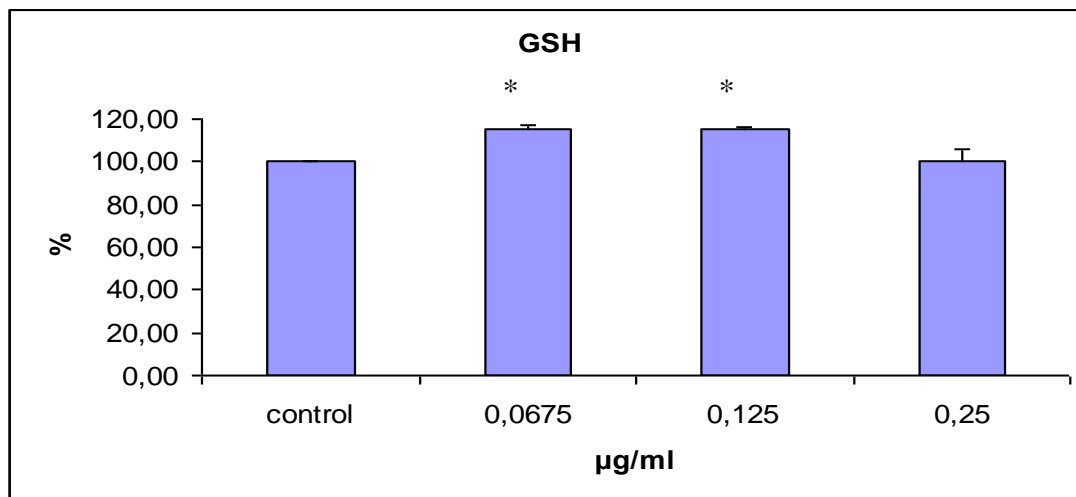
Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για το προσδιορισμό μόνο του εκχυλίσματος από τα στέμφυλα χωρίς παρουσία οξειδωτικού μέσου.

Για το προσδιορισμό λοιπόν της γλουταθειόνης και των ROS υπό την επίδραση του εκχυλίσματος από στέμφυλα (χωρίς τη χορήγηση οξειδωτικού μέσου) τα κύτταρα μελετήθηκαν σε 4 διαφορετικές καταστάσεις:

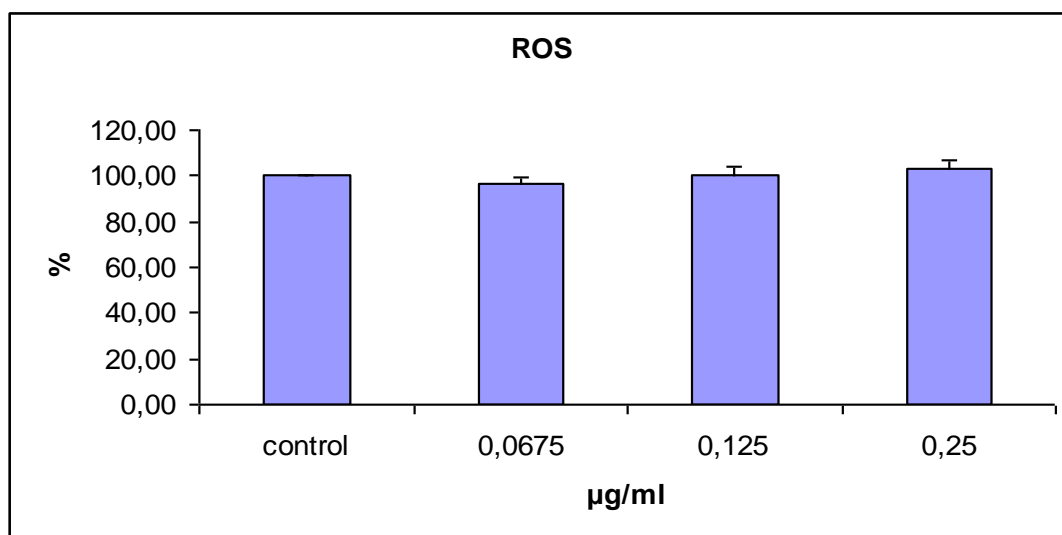
- α) Την κατάσταση control
- β) την κατάσταση 0,0675 όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 0.0675
- δ) Την κατάσταση 0,125 όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 0,125μg/ml
- ε) Την κατάσταση 0,250 όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 0,250μg/ml

Στο γράφημα 7 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης κατά 14,95% για τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος 0,0675 μg/ml και 15,26% για τη συγκέντρωση των 0,125 μg/

Ενώ στο γράφημα 8 απεικονίζονται τα επίπεδα των ROS υπό την επίδραση μόνο του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 4 διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης.



**Γράφημα 7:** Επίπεδα γλουταθειόνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy 926 υπό την επίδραση μόνο του εκχυλίσματος από τα στέμφυλα χωρίς οξειδωτικό μέσο. Η επώαση με το εκχύλισμα διήρκεσε 24h. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις 0,0675 µg/ml και 0,125 µg/ml της τάξης του 14,95% και 15,26%.



**Γράφημα 8:** Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EA.hy 926 υπό την επίδραση μόνο του εκχυλίσματος από τα στέμφυλα χωρίς οξειδωτικό μέσο. Η επώαση με το εκχύλισμα διήρκεσε 24h. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 4 διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης.

## **9. Συζήτηση**

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν αναμφίβολα την πλέον αποδεδειγμένη άμυνα του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών. Το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για μια σειρά από δυσλειτουργίες, που μπορεί να προκληθούν στα βιομόρια του οργανισμού. Ενοχοποιείται για την καθοριστική συμβολή του στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό καρκίνου καθώς και τη πρόκληση και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να εμποδίσουν τις άκρως επιβλαβείς συνέπειες της οξειδωσης. Ουσιαστικά λειτουργούν ως προστατευτικές ασπίδες για τον οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά απαντώνται σε μια ευρεία ποικιλία στα τρόφιμα και γι' 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 Ε (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. Στην καθημερινή διατροφή, τα αντιοξειδωτικά περιέχονται κατά κύριο λόγο στα φρούτα, στα λαχανικά, στους ξηρούς καρπούς και στο κόκκινο κρασί. Προφανώς, μια ισορροπημένη διατροφή μπορεί να προσφέρει στον οργανισμό τα αντιοξειδωτικά που απαιτούνται εφόσον πολλές τροφές είναι πλούσιες σ' αυτά. Όμως, και ο οργανισμός αυτόνομα διαθέτει ορισμένα συστήματα άμυνας ενάντια των ελευθέρων ριζών. Η δράση τους κατά της οξειδωσης – οξειδωτικού στρες είναι τεκμηριωμένη και πολύτιμη. Ορισμένες ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες, πρωτεϊνικής φύσης είναι η καταλάση, οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου ενώ σημαντικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους είναι η γλουταθειόνη, η ουβικινόνη, το λιποϊκό οξύ.

Η παρούσα έρευνα στόχευε στην διερεύνηση της επίδρασης εκχυλίσματος στεμφύλων στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ανθρώπινων κυττάρων. Κύριο βιοδραστικό συστατικό του εκχυλίσματος είναι οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι αντιοξειδωτικά που επιδρούν προστατευτικά και ευεργετικά στο ενδοθήλιο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EAhy926. Τα κύτταρα EAhy926 αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς χωρίς να απαιτείται η προσθήκη αυξητικών παραγόντων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση παθογένειας ασθενειών που είναι συνδεδεμένες με το ενδοθηλιακό σύστημα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα η φλεγμονή που ουσιαστικά είναι συνέπεια του οξειδωτικού στρες. Με τη χρήση των ενδοθηλιακών κυττάρων της σειράς EAhy926 μελετήθηκαν σε αθλητές δείκτες οξειδωσης (όπως TBARS, υπεροξειδίο της δισμουτάσης, μονοξειδίου του αζώτου, καταλάσης) συσχετιζόμενοι με το είδος της έντασης της άσκησης. Δηλαδή, η σύγκριση έγινε μεταξύ αερόβιας άσκησης υψηλής έντασης και μέτριας σε αθλητές τριάθλου. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι στην κατηγορία των αθλητών που εκτελούν αερόβιες ασκήσεις μέτριας έντασης είχαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τα χαμηλότερα επίπεδα γήρανσης, τόσο πριν όσο και μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες. Καθώς και αύξηση στους ρυθμιστικούς παράγοντες έναντι στο οξειδωτικού στρες.

Αρχικά, κατά την πειραματική διαδικασία έγινε ο απαιτούμενος προσδιορισμός της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ. Με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκαν οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που δεν είναι τοξικές και δε θα είναι δυσμενής για τις κυτταροκαλλιέργειες. Από αυτό το προσδιορισμό οι συγκεντρώσεις 0,0675, 0,125 και 0,250  $\mu\text{g/ml}$  ήταν οι κατάλληλες για χρήση.

Στη συνέχεια, ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων γλουταθειόνης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 24 ώρες σύμφωνα με τις τρεις συγκεντρώσεις που προέκυψαν από τη μέθοδο ΧΤΤ συν μία ομάδα ελέγχου. Ύστερα, έγινε χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide, 0,3 mM) για 60 λεπτά. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH κατά 29,5%. όταν είχε χορηγηθεί tert-butyl 0.3mM στα κύτταρα. Όμως όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε εκχύλισμα από στέμφυλα και t-BOOH, παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της γλουταθειόνης ( $p=0,18$ ) σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε μόνο t-BOOH, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα γλουταθειόνης σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη για το προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος στέμφυλων καθεαυτού, στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Για το λόγο αυτό τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24h έχοντας γίνει χορήγηση εκχυλίσματος από στέμφυλα. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα, για τη συγκέντρωση 0,0675  $\text{mg/ml}$  η αύξηση ήταν της τάξης του 14,95% και για τη συγκέντρωση 0,125  $\text{mg/ml}$  το ποσοστό της γλουταθειόνης αυξήθηκε κατά 15,26%. Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν πως σε χαμηλές συγκεντρώσεις πιθανώς το εκχύλισμα να λειτουργεί ως ενισχυτικό μέσο στην επαγωγή της παραγωγής γλουταθειόνης. Η ίδια διαδικασία προσδιορισμού εκτελέστηκε και για τον προσδιορισμό των ROS. Όμως, δεν προέκυψαν στατιστικώς

σημαντικές διαφορές, που πιθανώς να σημαίνει ότι το εκχύλισμα δεν επηρέασε τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των TBARS παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της τάξης του 13,3% όταν χορηγήθηκε *tert-butyl*. Ωστόσο, τα κύτταρα επώαστηκαν με *tert-butyl* και εκχύλισμα στέμφυλων τα επίπεδα των TBARS παρουσίασαν μείωση κατά 23,3% (για τη συγκέντρωση 0,0675μg/ml), 20.1% (για τη συγκέντρωση 0,125μg/ml) και 17.7% (για τη συγκέντρωση 0,250μg/ml) σε σχέση με την κατάσταση της επίδρασης μόνο του οξειδωτικού παράγοντα (*tert-butyl*).

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα στέμφυλων τόσο μόνο του όσο και παρουσία οξειδωτικού παράγοντα ενίσχυσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων EAhy926. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και μελέτη για να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος από στέμφυλα.

## **10. Βιβλιογραφία**

Bertelli, A. A. A., D. K. Das. 2009. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of cardiovascular pharmacology* 54, no. 6: 468-476. Database on-line. Available from Scopus.

McNeilly, A. M., G. W. Davison, M. H. Murphy, N. Nadeem, T. Trinick, E. Duly, A. Novials, and J. McEneny. 2011. Effect of alpha-lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance. *Lipids in Health and Disease* : 217. Database on-line. Available from Scopus.

Maczurek, A., K. Hager, M. Kenkies, M. Sharman, R. Martins, J. Engel, D. A. Carlson, and G. Münch. 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, no. 13-14: 1463-1470. Database on-line. Available from Scopus.

Espino, J., I. Bejarano, S. D. Paredes, C. Barriga, R. J. Reiter, J. A. Pariente, and A. B. Rodríguez. 2011. Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age* 33, no. 4: 497-507. Database on-line. Available from Scopus.

Schmelzer, C., F. Döring. 2011. Micronutrient special issue: Coenzyme Q10 requirements for DNA damage prevention. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Database on-line*. Available from Scopus.

Procházková, D., I. Boušová, and N. Wilhelmová. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, no. 4: 513-523. Database on-line. Available from Scopus.

Halliwell, B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular research* 73, no. 2: 341-347. Database on-line. Available from Scopus.

Xia, E. -, G. -. Deng, Y. -. Guo, and H. -. Li. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 11, no. 2: 622-646. Database on-line. Available from Scopus.

Farmer, J. A. 2009. Nicotinic acid: A new look at an old drug. *Current atherosclerosis reports* 11, no. 2: 87-92. Database on-line. Available from Scopus.

Visioli, F., P. Riso, S. Grande, C. Galli, and M. Porrini. 2003. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *European journal of nutrition* 42, no. 4: 201-206. Database on-line. Available from Scopus.

Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 35, no. 5: 1147-1150. Database on-line. Available from Scopus.

Halliwell, B. 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium* 61: 73-101. Database on-line. Available from Scopus.

Halliwell, B. 2007. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochemical Journal* 401, no. 1: 1-11. Database on-line. Available from Scopus.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39, no. 1: 44-84. Database on-line. Available from Scopus.

Whiteman, M., H. S. Hong, A. Jenner, and B. Halliwell. 2002. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: Implications for assessment of oxidative damage in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 296, no. 4: 883-889. Database on-line. Available from Scopus.

Hazewindus, M., G. R. M. M. Haenen, A. R. Weseler, and A. Bast. 2012. The anti-inflammatory effect of lycopene complements the antioxidant action of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chemistry* 132, no. 2: 954-958. Database on-line. Available from Scopus.

Böhm, M., S. Rosenkranz, and U. Laufs. 2004. Alcohol and red wine: Impact on cardiovascular risk. *Nephrology Dialysis Transplantation* 19, no. 1: 11-16. Database on-line. Available from Scopus

Sram, R. J., B. Binkova, and P. Rossner Jr. 2011. Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Database on-line. Available from Scopus.

Seet, R. C. S., C. Y. J. Lee, E. C. H. Lim, A. M. L. Quek, H. Huang, S. H. Huang, W. F. Looi, L. H. Long, and B. Halliwell. 2011. Oral zinc supplementation does not improve oxidative stress or vascular function in patients with type 2 diabetes with normal zinc levels. *Atherosclerosis* 219, no. 1: 231-239. Database on-line. Available from Scopus.

Rosales-Corral, S. A., D. Acuña-Castroviejo, A. Coto-Montes, J. A. Boga, L. C. Manchester, L. Fuentes-Broto, A. Korkmaz, S. Ma, D. -. Tan, and R. J. Reiter. 2011. Schmelzer, C., F. Döring. 2011. Micronutrient special issue: Coenzyme Q10 requirements for DNA damage prevention. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Database on-line. Available from Scopus.

Li, S. -, D. Yang, Z. J. Fu, T. Woo, D. Wong, and A. C. Y. Lo. 2012. Lutein enhances survival and reduces neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 45, no. 1: 624-632. Database on-line. Available from Scopus.

Wattanapitayakul, S. K., J. A. Bauer. 2001. Oxidative pathways in cardiovascular disease: Roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacology and Therapeutics* 89, no. 2: 187-206. Database on-line. Available from Scopus.

Whiteman, M., P. Rose, L. S. Jia, S. C. Nam, S. T. Gek, B. Halliwell, and J. S. Armstrong. 2005. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: Role of mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine* 38, no. 12: 1571-1584. Database on-line. Available from Scopus.

PILAR CODO~NER-FRANCH, VICTORIA VALLS-BELL\_ES, ANGELA ARILLA-CODO~NER, and EULALIA ALONSO-IGLESIAS. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. 2011 Database on-line. Available from Scopus

Mistry, H. D., F. Broughton Pipkin, C. W. G. Redman, and L. Poston. 2012. Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 206, no. 1: 21-30. Database on-line. Available from Scopus.

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.

Yokozawa, T., E. J. Cho, C. H. Park, and J. H. Kim. 2012. Protective effect of proanthocyanidin against diabetic oxidative stress. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012 Database on-line. Available from Scopus.

Latour I., Demoulin J.B., Buc-Calderon P. 1995 Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters* 373: 299-302

Alia M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. 2006 Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharm* 212: 110-118.



Hix S., Kadisiska M.B., Mason R.P., Augusto O. 2000 In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol* 13: 1056-1064.

Lima C.F. 2006 Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79; 2056-2068

Sies H., Summer K.H. 1975 Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur J Biochem* 57: 503-512.

Μ. Χασαπίδου, Συμπληρωματικές Σημειώσεις για το μάθημα Σχεδιασμός Διαιτολογίου Φυσιολογικών Καταστάσεων ΙΙ, Θεσσαλονίκη: 2008

Καλογιάννης, Σταύρος. Αρχές Βιοχημείας. Θεσσαλονίκη: ΤΕΙ-Θ, 2010.

Μπόσκου, Γεώργιος. Χημεία Τροφίμων. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γαρταγάνη, 1997.

Παπαγεωργίου, Γεώργιος. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ: UNIVERSITY STUDIO PRESS, 2005.

Bernini F., Bellosta S., Corsini A., Maggi F.M., Fumagalli R., and Catapano A.L. 1991 Cholesterol stimulation of HDL binding to human endothelial cells EAhy 926 and skin fibroblasts: evidence for a mechanism independent of cellular metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1083(1991) 94-100.

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.

Graham A, McLees A, Malarkey K, Gould GW, Plevin R..Role of receptor desensitization, phosphatase induction and intracellular cyclic AMP in the termination of mitogen-activated protein kinase activity in UTP-stimulated EAhy 926 endothelial cells. *Biochem J.* 1996 Apr 15;315 ( Pt 2):563-9.

Kössi J, Muona P, Tuukkanen J, Ylä-Outinen H, Kalliomäki M, Risteli J, Oikarinen A, Laato M, Peltonen J.. Effects of glucose on collagen mRNA levels and collagen secretion in EAhy 926 endothelial cell line. *Ann Chir Gynaecol Suppl.* 2001;(215):39-44.

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D.. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol.* 2013 Feb 1. pii: S0278-6915(13)00067-7.

Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltsounis L, Tsatsakis AM, Kouretas D. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol.* 2012 Nov;50(11):4115-24. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.033.

Spanou C, Veskokoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo.* 2011 Jul-Aug;25(4):657-62.

Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D.. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med.* 2005 Jun;15(6):1013-22.

Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S, Kouretas D.. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res.* 2006 Oct 30;609(2):165-75.

Stagos D, Karaberis E, Kouretas D.. Assessment of antioxidant / anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods. *In Vivo.* 2005 Jul-Aug;19(4):741-7.

<http://emed.med.uoa.gr>  
[/www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)