



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος

Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο Κυτταρομετρίας Ροής σε μυϊκά Κύτταρα C2C12 έπειτα από χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα tert – butyl και εκχυλίσματος στεμφύλων



Study of oxidative markers in muscle cells C2C12 using flow cytometry after administration of oxidized factor tert - butyl and grape extract

Γεωργαδάκης Στέφανος  
Λάρισα 2013

---

---

Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο Κυτταρομετρίας Ροής σε μυϊκά  
Κύτταρα C2C12 έπειτα από χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα tert – butyl και  
εκχυλίσματος στεμφύλων

Study of oxidative markers in muscle cells C2C12 using flow cytometry after  
administration of oxidant factor tert - butyl and grape extract

---

---

### Τριμελής Επιτροπή

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

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

**Αλέξιος Λεάνδρος Σκαλτσούνης:** Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

## Ευχαριστίες

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

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη καθημερινή βοήθεια του στο εργαστήριο.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω το συνεργάτη μου Νίκο Γκουτζουρέλα για την ενασχόληση του με εμένα και την σωστή καθοδήγηση του, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος: Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος για τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσαν, καθώς επίσης και όλους του συμφοιτητές μου για το άκρως φιλικό περιβάλλον το οποίο επικρατούσε σε όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|   |    |
|---|----|
| Περίληψη.....                                   | 6  |
| <b>1. <u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>                       |    |
| 1.1 –Ελεύθερες ρίζες.....                       | 7  |
| 1.2 – Αντιοξειδωτικά μόρια - ενώσεις.....       | 11 |
| 1.3 –Αντιοξειδωτικό Στρες.....                  | 17 |
| 1.4— Μυϊκά κύτταρα C2C12 .....                  | 24 |
| 1.5 – Σταφύλια ( Vitis Vinifera ).....          | 25 |
| 1.6 – Πολυφαινόλες.....                         | 30 |
| <b>2. <u>ΣΚΟΠΟΣ</u></b> .....                   | 34 |
| <b>3. <u>ΥΛΙΚΑ και ΑΝΑΛΥΣΗ</u></b> .....        | 34 |
| <b>4. <u>ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>                        |    |
| 4.1 –Κυτταρομετρία Ροής.....                    | 37 |
| 4.2– Μέθοδος Bradford.....                      | 40 |
| <b>5. <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</u></b>         |    |
| 5.1- Προσδιορισμός GSH και ROS .....            | 41 |
| 5.2- Προσδιορισμός T-BARS.....                  | 41 |
| <b>6. <u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>                   |    |
| 6.1- Αποτελέσματα Πειραματικής Διαδικασίας..... | 43 |
| 6.2- Συμπεράσματα Πειραματικής Διαδικασίας..... | 50 |
| <b>7. <u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b> .....                 | 50 |
| <b>8. <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b> .....             | 54 |

## Περίληψη

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Συνεπώς το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών εστιάζεται στην εύρεση αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες ασκούν προστατευτική δράση. Μία τέτοια κατηγορία αντιοξειδωτικών ουσιών αποτελούν και οι πολυφαινόλες, ουσίες με ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Πολυφαινόλες υπάρχουν στα σταφύλια και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μία ελληνική ποικιλία σταφυλιών είναι το **Μπατίκι** της περιοχής του Τυρνάβου.

Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι ευεργετικές ιδιότητες της συγκεκριμένης ποικιλίας σταφυλιών σε μυϊκά κύτταρα C2C12 υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tert – butyl. Προσδιορίστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες των ελευθέρων ριζών ( ROS ) και γλουταθειόνης ( GSH ) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής καθώς και ο δείκτης TBARS με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Παρατηρήσαμε ότι το tert – butyl προκαλεί οξειδωτικό στρες καθώς μειώνει τη GSH και αυξάνει τα TBARS, ενώ το πολυφαινολικό εκχύλισμα σταφυλιών έχει προστατευτική δράση και στις τρεις συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ( 2.5 , 5 , 10 µg/ml ).

## Abstract

Oxidative stress is a situation characterized by increased production of free radicals, along with insufficiency of antioxidant mechanisms of organism. Consequently, many researchers focus on finding antioxidant substances, with protective action. Such antioxidant substances are plant polyphenols. Polyphenols are also found in high concentration in grapes. Grapes extracts from Mpatiki variety from Tyrnavos region was used in the current study.

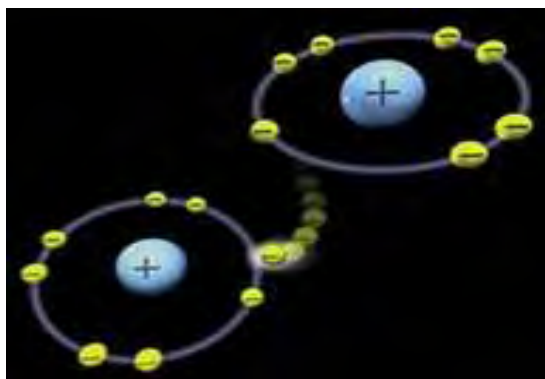
In the present study, we examined the beneficial effects of extracts from a particular grape variety on muscular cells C2C12 under the influence of the oxidized factor tert - butyl. We determined the oxidative levels of free radicals (ROS) and gloytathion (GSH) using flow cytometry as well as the biomarker of lipid peroxidation TBARS using spectrophotometry. We observed that tert - butyl causes oxidant stress and decreases the GSH and increases the TBARS. The grape polyphenolic extract prevented tert-butyl-induced oxidative stress at concentrations of 2.5, 5 and 10 µg/ml.

## 1. Εισαγωγή

---

### 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Σε κάθε μόριο ή άτομο, τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε συγκεκριμένες τροχιές, που ορίζονται ως τροχιακά (ατομικά ή μοριακά). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις, όπου κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης είναι δυνατόν να περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989) Συνεπώς ελεύθερη ρίζα καλούμε το μόριο ή άτομο που φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα μόρια στην εξωτερική στιβάδα σθένους του. Είναι μόρια ασταθή τα οποία έχουν την τάση να συνδέονται με άλλα μόρια για να αυξήσουν την σταθερότητά τους. Παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος καθώς και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες.



**Εικόνα 1:** Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι αυτή του υδρογόνου. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες του οργανισμού είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), του μονοξειδίου

του αζώτου (NO•), του αλκοξυλίου (RO•), του υπεροξειδίου (ROO•), του τριχλωρομεθυλίου (CCl3•) και οι θειούχες ρίζες (RS•) . Από αυτές, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (**Cheeseman et al, 1993**). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (**Halliwell 2001**).

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

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

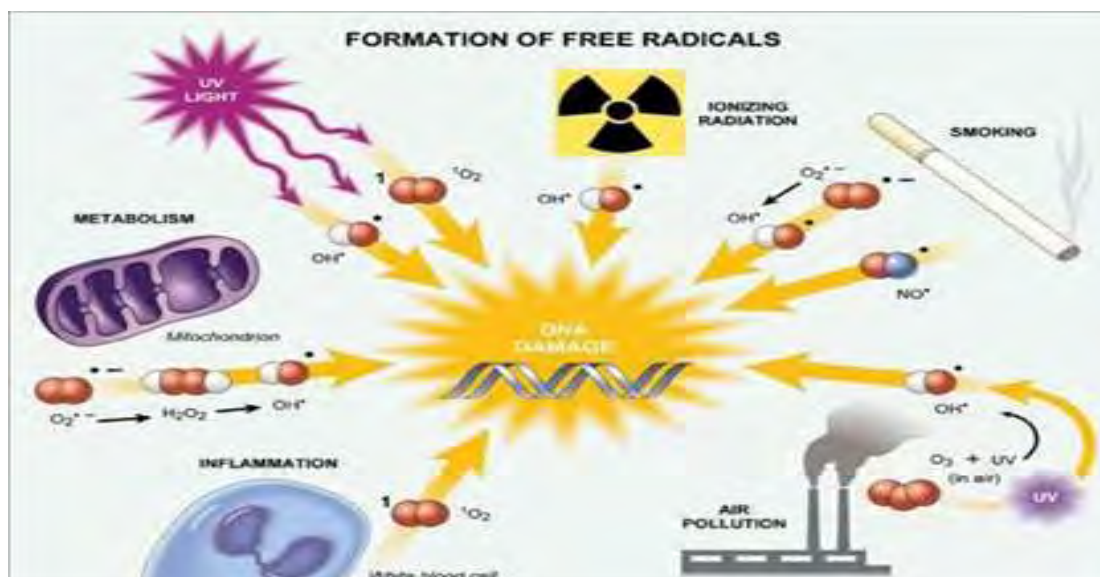




**Εικόνα 2:** Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας από άτομο του οξυγόνου

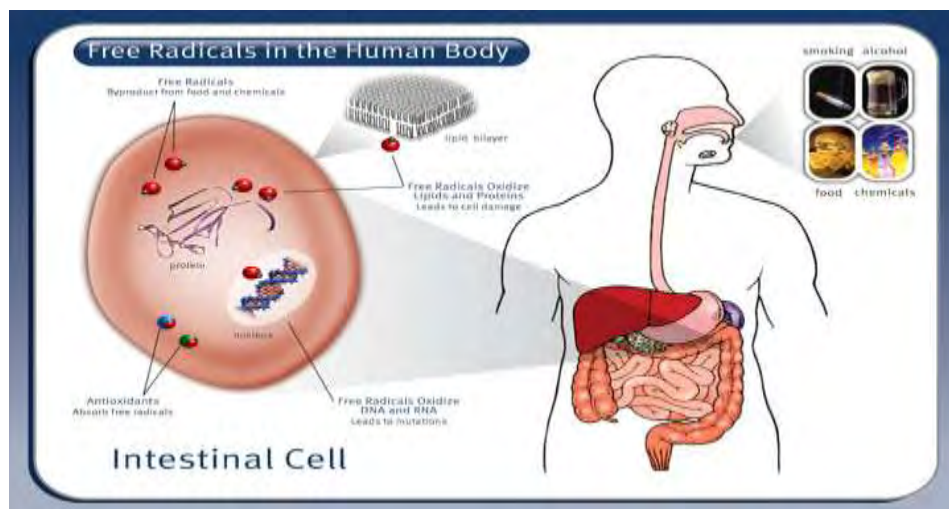
Οι ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να παραχθούν ενδογενώς στους οργανισμούς καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στην μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά. Συγκεκριμένα μπορούν να παραχθούν στους οργανισμούς ως εξής:

- κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας,
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- τη λιπιδική οξείδωση,
- την ακτινοβολία,
- τη φλεγμονή,
- το κάπνισμα
- την μολυσμένη ατμόσφαιρα



Εικόνα 3: Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

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



**Εικόνα 3:** Επίδραση ελευθέρων ριζών στον οργανισμό

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

- ο καρκίνος
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες
- η αθηροσκλήρυνση
- το AIDS
- η ηπατίτιδα
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα

## 1.2 Αντιοξειδωτικά μόρια - ενώσεις

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

| <b>Αντιοξειδωτικό</b> | <b>Διαλυτότητα</b> |
|-----------------------|--------------------|
| Γλουταθειόνη          | Νερό               |
| Ασκορβικό οξύ         | Νερό               |
| Λιποϊκό οξύ           | Νερό               |
| Ουρικό οξύ            | Νερό               |
| Καροτένια             | Λίπη               |
| Α-τοκοφερόλη          | Λίπη               |
| Συνένζυμο Q10         | Λίπη               |

**Αντιοξειδωτικά μόρια και οι διαλύτες τους**

### **Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών**

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

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

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

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

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

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

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

Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών.

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

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες :

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

### **Πηγές Αντιοξειδωτικών**

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

Βιταμίνη Α-αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, σκώτι, ιχθυέλαια.

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

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

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

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

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

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

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

Ελλαγικό οξύ-Βατόμουρα, κεράσια, σταφύλια, φράουλες.

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

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

ΣυνένζυμοQ10-Σαρδέλα,σκουμπρί,σόγια.

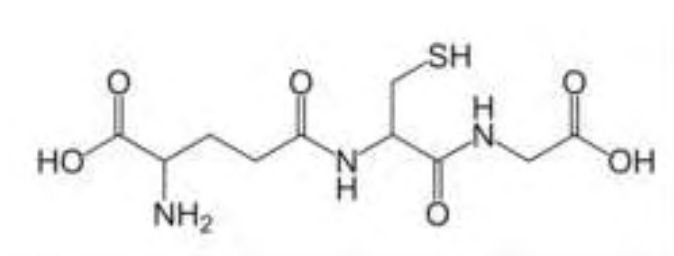
Πυκνογενόλη-φρούτα ,λαχανικά, ξηροί καρποί, κακάο, τσάι, και κρασί.





**Εικόνα 4:** Τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες

Ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια είναι η γλουταθειόνη, η οποία είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται από ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη.



**Εικόνα 5:** Το μόριο της γλουταθειόνης

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της γλουταθειόνης, είναι ότι είναι δυνατόν να

λειτουργήσει ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται τα ένζυμα που η δράση τους απαιτεί την παρουσία της γλουταθειόνης:

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

Η κύρια αποστολή της είναι η διάσπαση και απομάκρυνση από το σώμα όλων των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Είναι ένα αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την οξείδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες στη γαστρεντερική οδό και προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που αυτές μπορεί να προκαλέσουν. Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα ελαττώνονται κατά 17% από την ηλικία των σαράντα μέχρι την ηλικία των εξήντα. Αν έχουμε χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχει 33% μεγαλύτερος κίνδυνος για χρόνια νοσήματα.

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

Συμπληρωματικά η γλουταθειόνη είναι δυνατόν να επιτελεί και τις παρακάτω λειτουργίες:

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

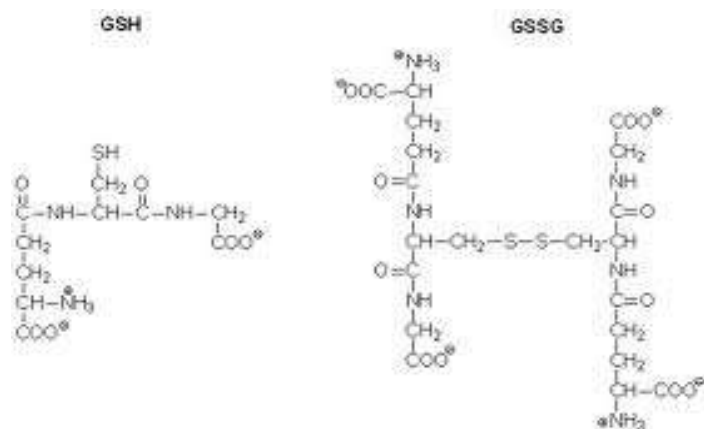
Είναι δυνατόν να συναντήσουμε την γλουταθειόνη σε δυο μορφές. Η πρώτη αφορά την ανηγμένη (GSH), ενώ η δεύτερη την οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.



### 1.3 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν. Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδευδών. Ως αντιοξειδωτικές ενώσεις χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που εν δυνάμει εξουδετερώνουν ελευθέρων ριζών και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

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



**Εικόνα 6:** Χημική δομή της οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών: Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση.



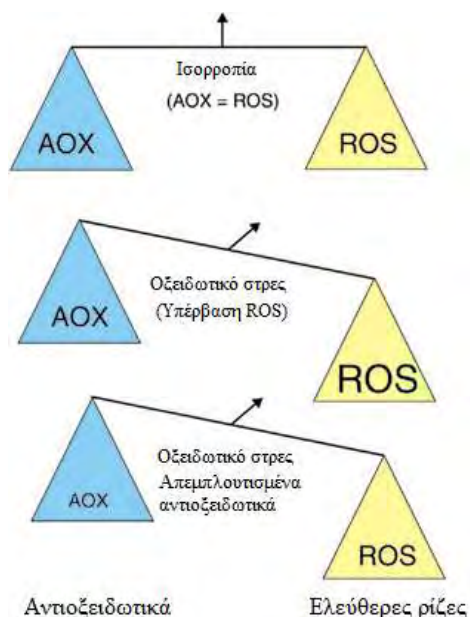
**Εικόνα 7:** Μοριακός μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο κύτταρο από το οξειδωτικό στρες

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:

- (i) Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>),
- (ii) Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO<sup>•-</sup>), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος (HClO<sub>2</sub>),
- (iii) Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)
- (iv) Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**(Halliwell & Gutteridge, 1990)**



**Εικόνα 8:** Τρόπος δημιουργίας Οξειδωτικού στρες

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

Αναλυτικότερα, στα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες, συγκαταλέγονται η μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και η οξείδωση μορίων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA. Μάλιστα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με

ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (**Lyras et al, 1977**). Στην περίπτωση του DNA, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες) , όσο και στην D-ριβόζη του μορίου. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (**Halliwell, 1994**).

## Κλινική Σημασία του Οξειδωτικού Στρες

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress έχει καταστεί πλέον αποδεκτός στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης, της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης, της νόσου Alzheimer, της νόσου του Parkinson, της παγκρεατίτιδας, του συνδρόμου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, της προεκλαμψίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, σχετίζονται με το οξειδωτικό stress. Η φλεγμονή, ορισμένες μορφές καρκίνου και η διεργασία της γήρανσης έχουν αποδοθεί εν μέρει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Τέλος, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων αποδίδονται στο οξειδωτικό stress. Επίσης, η απόκριση στο stress, η οποία εκφράζεται με την επαγωγή των πρωτεϊνών του θερμικού shock (heat shock proteins, HSP), επάγεται ιδιαίτερα σε ασθενείς με σηπτική καταπληξία, τραύμα ή σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας. Ανωμαλίες στην έκφραση των HSP έχουν παρατηρηθεί σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Δεν είναι σαφές εάν αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ειδικές ενδογενείς προσπάθειες κυτταρικής και ιστικής προστασίας ή μη ειδική απόκριση στο stress.

Εντούτοις, δείχνουν ότι η κυτταρική απόκριση στο stress εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της. Η συσχέτιση μιας νοσολογικής κατάστασης με το οξειδωτικό stress προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξείδωσης λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξείδωση αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού

stress στη νόσο. Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών. Επιπλέον, το οξειδωτικό stress πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού stress είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές καταστάσεις.

## **Οξειδωτικό Στρες και νευροεκφυλιστικές νόσοι**

Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη, επειδή χρησιμοποιεί υψηλά επίπεδα οξυγόνου και χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να οξυγονωθούν, καθώς και οξειδοαναγωγικών ενεργών μετάλλων. Το οξειδωτικό stress αυξάνεται με την ηλικία και έτσι μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας νευροεκφυλιστικών παθήσεων, ιδιαίτερα για τα ηλικιωμένα άτομα. Δεν είναι βέβαιο εάν το οξειδωτικό stress αποτελεί το αρχικό γεγονός που οδηγεί στις νευροεκφυλιστικές διεργασίες, είναι βέβαιο όμως ότι συμμετέχει στην εξέλιξη της κυτταρικής βλάβης

## **Οξειδωτικό στρες και υπέρταση**

Το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθογένεια της υπέρτασης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου και μειωμένες αντιοξειδωτικές εφεδρείες. Στις περισσότερες μελέτες, τα υπερτασικά άτομα είχαν κάποιου βαθμού νεφρική δυσλειτουργία. Επίσης, οξειδωτικό stress έχει ανευρεθεί σε ασθενείς με νεφραγγειακή υπέρταση, κακοήθη υπέρταση και προεκλαμψία. Αντίθετα, αύξηση των δεικτών υπεροξειδωσης των λιπιδίων δεν έχει παρατηρηθεί σε άτομα με ήπια υπέρταση που δεν έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή, ένδειξη που πιθανόν

υποδηλώνει ότι το οξειδωτικό stress δεν εμπλέκεται στην παθογένεια της ήπιας υπέρτασης. Τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως βιταμίνης E, γλουταθειόνης και SOD, καθώς και η αυξημένη ενεργοποίηση της αγγειακής NADPH οξειδάσης, φαίνεται να ευθύνονται για το οξειδωτικό stress που παρατηρείται στα υπερτασικά άτομα. Η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης έχει προταθεί ως ο κύριος μεσολαβητής της ενεργοποίησης της αγγειακής NADPH οξειδάσης και της παραγωγής δραστικών ριζών στα υπερτασικά άτομα. Μάλιστα, το θεραπευτικό αποτέλεσμα των αποκλειστών των AT1 υποδοχέων και των ανασταλτών του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης έχει αποδοθεί εν μέρει στην αναστολή της NADPH οξειδάσης και στη μείωση της παραγωγής δραστικών ριζών.

## Οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση

Σήμερα είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό stress συμμετέχει στην έναρξη του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Ο ακριβής μηχανισμός όμως με τον οποίο το οξειδωτικό stress συνεισφέρει στη διεργασία της καρκινογένεσης παραμένει άγνωστος. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη και στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη γονιδιακή έκφραση. Επιγενετικές δράσεις στην έκφραση γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν σε διέγερση του πολλαπλασιασμού. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επιδρούν στις οδούς μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων αναγκαίων για τον πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα με τον άλλο μηχανισμό, οι δραστικές ρίζες επάγουν γενετικές αλλαγές όπως μεταλλάξεις και χρωμοσωμικούς ανασυνδυασμούς που παίζουν ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης.

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες όχι μόνο δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, αλλά και συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η τροποποίηση των οδών μεταγωγής σήματος από τις αντιοξειδωτικές ουσίες θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόληψη του καρκίνου με τους ακόλουθους μηχανισμούς: (α) διατήρηση της φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, (β) αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης, (γ) αναστολή της διήθησης και της αγγειογένεσης, (δ) καταστολή της φλεγμονής. Ο κυτταρικός κύκλος χαρακτηρίζεται από διακυμάνσεις στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου, οι οποίες ρυθμίζονται από τις ενδοκυττάρια μεταβολές στις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης. Κατά κανόνα, ένα

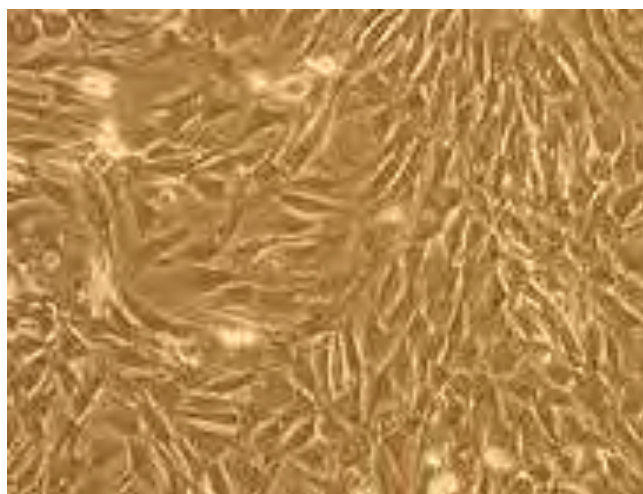


περισσότερο αναγωγικό περιβάλλον διεγείρει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ μετατόπιση προς ήπια οξειδωτικό περιβάλλον αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης. Μετατόπιση προς ένα περισσότερο οξειδωτικό περιβάλλον οδηγεί στην απόπτωση και τη νέκρωση. Συνεπώς, το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον αποτελεί τον κύριο προσδιοριστή για την πυροδότηση της απόπτωσης. Το αντιοξειδωτικό ένζυμο Mn-SOD έχει θεωρηθεί ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, επειδή διέγερση της έκφρασης της Mn-SOD φαίνεται να καταστέλλει τον κακοήθη φαινότυπο σε πειραματικά πρότυπα και χαμηλά επίπεδα αυτής έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, όμως, υπερέκφραση της Mn-SOD έχει αναφερθεί σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα και σε δείγματα αίματος πασχόντων από λευχαιμία. Έτσι, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της Mn-SOD παρατηρείται στα πλαίσια της κυτταρικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στο οξειδωτικό stress. Τα αυξημένα επίπεδα της Mn-SOD μειώνουν τη συγκέντρωση ανιόντος του υπεροξειδίου στα κύτταρα και έτσι μειώνουν την επίδραση των δραστικών ριζών στην κυτταρική αύξηση. Πειραματικές και κλινικές ενδείξεις συσχετίζουν τη θειορεδοξίνη με τον καρκίνο: (α) αυξημένα επίπεδα TRX έχουν αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, των καρκινωμάτων του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, (β) πολλά καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν TRX, (γ) υπερέκφραση της TRX φαίνεται να προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την επαγόμενη από το οξειδωτικό stress απόπτωση, (δ) αυξημένα επίπεδα θειορεδοξίνης σε κακοήθεις όγκους προκαλούν αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες πρέπει να αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία του καρκίνου, γιατί μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Αφού η απόπτωση προκαλείται από αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών, μειωμένα επίπεδα δραστικών ριζών λόγω της χορήγησης περίσσειας αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιβίωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν βλάβες στο γενετικό υλικό και έτσι να προάγει αντί να διακόψει τη διεργασία της καρκινογένεσης. Ακόμη, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και οι προοξειδωτικές δράσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους και από το περιβάλλον στο οποίο δρουν.

Οι επιδημιολογικές μελέτες και τα *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι η καλύτερη προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου είναι η μείωση των ενδογενών και εξωγενών πηγών οξειδωτικού stress και όχι η αύξηση των αντιοξειδωτικών ουσιών.

#### 1.4 ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel (Yaffe και Saxel, 1977) μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ ποντικών μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών.



**Εικόνα 9:** C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο



## 1.5 Σταφύλια ( *Vitis Vinifera* )

Αρχικά, το σταφύλι (*Vitis vinifera*) αποτελεί τον καρπό του αμπελιού. Ο καρπός αυτός είναι γνωστός στον άνθρωπο από την παλαιολιθική εποχή και πριν την εμφάνιση των παγετώνων, ευδοκίμωσε στις περιοχές της Βόρειας Ευρώπης και της Ισλανδίας. Τα συγκεκριμένα σταφύλια έχουν αναφερθεί για την θεραπευτική και θρεπτική αξία τους εδώ και χιλιάδες χρόνια τόσο από τους Αιγύπτιους όσο και από τους Έλληνες. Τόσο οι Αιγύπτιοι όσο και οι Έλληνες στην αρχαιότητα εγκωμιάζαν την θεραπευτική δράση των σταφυλιών και ιδιαίτερα τον χυμό των σταφυλιών που – συνήθως καταναλώνονταν υπό μορφή «οίνου». Μετά όμως την εμφάνιση των παγετώνων, οι τοποθεσίες καλλιέργειας διαφοροποιήθηκαν και σήμερα, ο καρπός του σταφυλιού αφθονεί στις Μεσογειακές χώρες, την Νότιο Αφρική αλλά και στις περιοχές της Αμερικανικής ηπείρου, όπου το κλίμα είναι εύκρατο.

Παραδοσιακοί θεραπευτές στην Ευρώπη χρησιμοποιούσαν τους χυμούς των αμπελιών για να θεραπεύσουν ασθένειες του δέρματος και των ματιών. Τα φύλλα των σταφυλιών έχουν χρησιμοποιηθεί για να σταματήσουν την αιμορραγία, τις φλεγμονές, και τους πόνους των αιμορροΐδων. Τα νωπά σταφύλια χρησιμοποιήθηκαν για να ανακουφίσουν τους πονόλαιμους, ενώ τα αποξηραμένα ξηρά σταφύλια ή οι σταφίδες χρησιμοποιήθηκαν για τη δυσκοιλιότητα και τη δίψα. Τα σταφύλια ως ώριμα φρούτα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά προβλημάτων υγείας συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασιών, της χολέρας, της ευλογιάς, της ναυτίας, των μολύνσεων των ματιών, του δέρματος, του νεφρού, και των ασθενειών του ήπατος.

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



**Εικόνα 10:** Σταφύλι από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου

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

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

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τις ευεργετικές επιδράσεις του σταφυλιού, αυτό συντελεί στην διούρηση και στην αποβολή τοξινών. Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στον κάλιο που περιέχεται στον καρπό. Μάλιστα, οι αποτοξινωτικές ιδιότητες του σταφυλιού είναι

γνωστές από αρχαιοτάτων χρόνων. Στην αρχαία Ελλάδα, οι Έλληνες εφάρμοζαν την σταφυλοθεραπεία, η οποία περιελάμβανε κατανάλωση μόνο σταφυλιού για σύντομο χρονικό διάστημα. Όμως, εκτός από την αρχαιότητα, ένα κλασσικό παράδειγμα της σύγχρονης εποχής που καταδεικνύει την ευεργετική επίδραση του σταφυλιού είναι το λεγόμενο « Γαλλικό παράδοξο». Σύμφωνα λοιπόν με αυτό, οι Γάλλοι εμφανίζουν μειωμένη συχνότητα καρδιοπαθειών, παρόλο που καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε λιπαρά. Σύμφωνα με τους **Renaud και de Lorgeril (1992)**, οι ποσότητες κρασιού που καταναλώνουν οι Γάλλοι, βοηθούν στην αποφυγή εμφάνισης τέτοιων παθήσεων.

Παρόλο που έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την εύρεση της ακριβής σύστασης των σταφυλιών και του κρασιού, αυτή δεν έχει καταστεί πλήρως γνωστή. Για την ακρίβεια, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 χημικές ουσίες, εκ των οποίων οι 150 ανήκουν στην κατηγορία των εστέρων. Ακόμα, μεταξύ αυτών των συστατικών συγκαταλέγονται το νερό, σάκχαρα, οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νερού εντός του καρπού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Η πλειοψηφία των ενώσεων, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις με εύρος  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  mg/lit ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση  $>100$ mg/Lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (**Jackson 2011**).

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

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

**Πίνακας 1:** Σύσταση του εκχυλίσματος στεμφύλων

Το εκχύλισμα σπόρου σταφυλιών περιέχει μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων ουσιών όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν το 8 με 9% του εκχυλίσματος των σπόρων και αυτό εξαρτάται από την ποικιλία. Οι πολυφαινόλες στους σπόρους των σταφυλιών βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή των βιοφλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή αυτά συμπεριλαμβάνουν παράγωγα των φλαβονοτριολών όπως, το γαλλικό οξύ, την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την γαλλοκατεχίνη, την επιγαλοκατεχίνη, την προκυανιδίνη, την πολυμερισμένη, προακυανιδίνη και τις προανθοκυανιδίνες (**Spyrou Argiri,2010**). Οι προανθοκυανιδίνες αναφέρονται ως oligομερείς (μονομερείς, διμερείς, τριμερείς κλπ) προανθοκυανιδίνες και με διεθνή συντομογραφία OPCs. Οι OPCs έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις βιταμίνες E έως 50 φορές και έως 20 φορές από την βιταμίνη C. Τα κυριότερα μυστικά βιοενεργά συστατικά του σταφυλιού είναι οι προανθοκυανιδίνες και η ρεσβερατρόλη.



**Εικόνα 11:** Κόκκινο κρασί, πλούσιο σε πολυφαινόλες (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006).

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

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

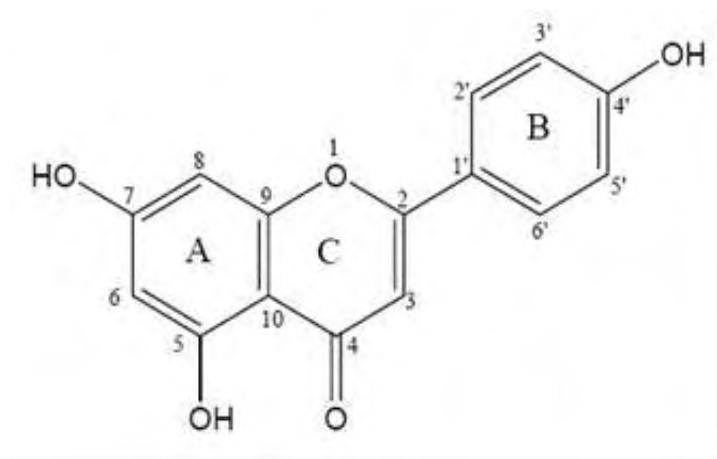
τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες.

## 1.6 Πολυφαινόλες, η δομή και δράση τους

Όταν χρησιμοποιούμε τον όρο πολυφαινόλες αναφερόμαστε σε μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που συναντάμε ευρέως σε φυτικούς οργανισμούς. Μάλιστα, το εκχύλισμα σταφυλιού (*Vitis vinifera*) που διαθέτουμε, περιέχει σε υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινόλες.

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

Όσον αφορά την δομή τους, οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και απαρτίζουν μια μεγάλη και ετερογενή κατηγορία χημικών ενώσεων. Μάλιστα, οι ενώσεις αυτές υπολογίζεται ότι είναι περισσότερες από 8000, όμως λίγες από αυτές είναι αντιοξειδωτικές. Χαρακτηριστικό, αποτελεί η ύπαρξη του αρωματικού δακτυλίου του βενζολίου, στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες.

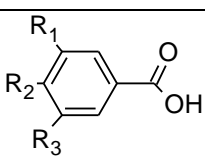
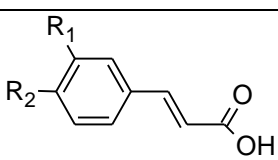


**Εικόνα 12:** Χαρακτηριστικό παράδειγμα δομής πολυφαινολών (Σπανού 2010)

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

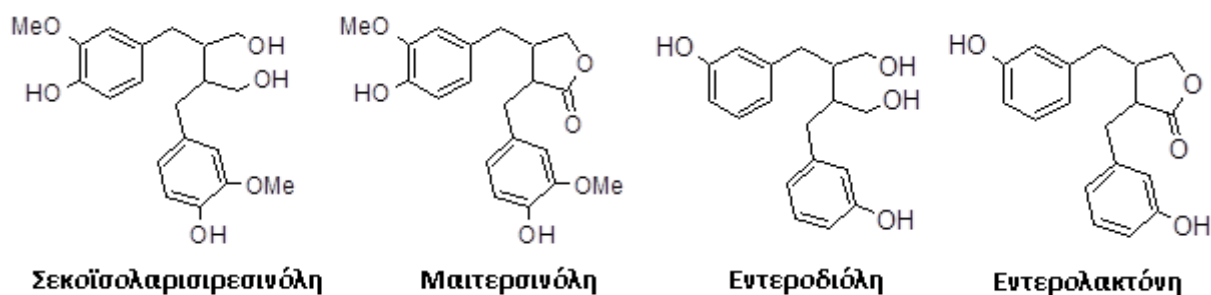
- φλαβονοειδή,
- πολυφαινολικά οξέα,
- στιλβένια
- λιγνάνες

#### Χημικές δομές των πολυφαινολικών οξέων:

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

Εικόνα 13 : Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων (Σπανού 2010)

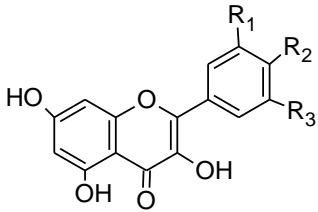
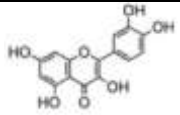
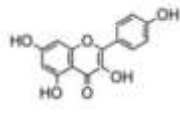
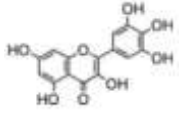
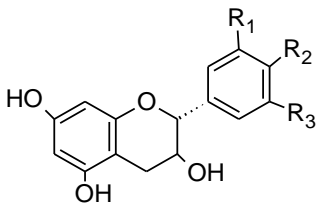
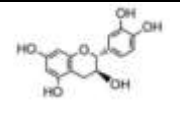
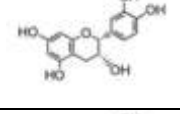
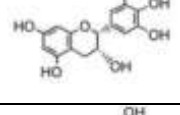
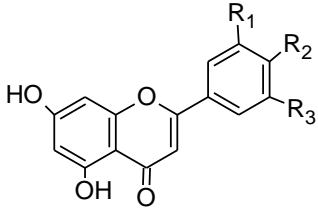
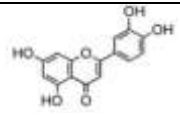
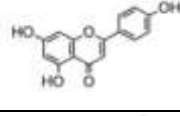
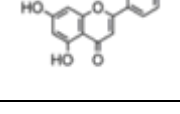
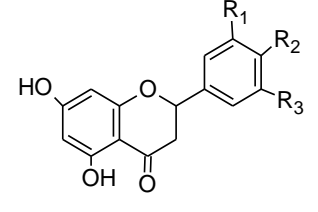
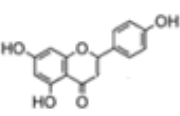
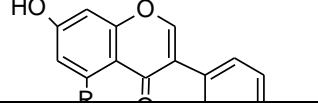
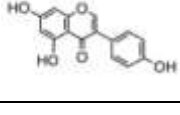
#### Παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των λιγνάνων:



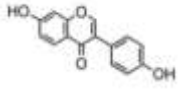
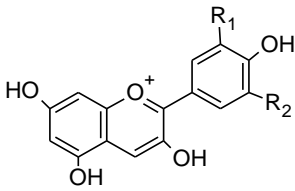
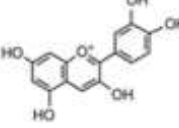
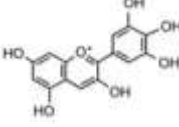
Εικόνα 14: Ενώσεις όπως η Εντεροδιόλη και η Εντερολακτόνη, ανήκουν στις λιγνάνες (Σπανού 2010)



## Κατηγορίες Φλαβονοειδών

| Τάξη των φλαβονοειδών | Γενική χημική δομή<br>$R_{1,2,3}$ : -OH ή -H  | Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή |   |
|-----------------------|---|----------------------------|---|
| Φλαβονόλες            |    | κερκετίνη                  |    |
|                       |   | καιμπερόλη                 |    |
|                       |   | μυρκετίνη                  |    |
| Φλαβανόλες            |   | (+)-κατεχίνη               |    |
|                       |   | (-)-επικατεχίνη            |   |
|                       |   | επιγαλλοκατεχίνη           |  |
| Φλαβόνες              |  | λουτεολίνη                 |  |
|                       |   | απιγενίνη                  |  |
|                       |   | χρυσίνη                    |  |
| Φλαβανόνες            |  | ναριγενίνη                 |  |
| Ισοφλαβόνες           |  | γενιστεΐνη                 |  |



|                |   |             |   |
|----------------|---|-------------|---|
|                |   | ντετζεΐνη   |  |
| Ανθοκυανιδίνες |  | κυανιδίνη   |  |
|                |   | δελφινιδίνη |  |

**Εικόνα 15:** Τα φλαβονοειδή (Σπανού 20120 )

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

## 2. Σκοπός

---

Ο σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος στεμφύλων από την ποικιλία *Vitis vinifera*, Μπατίκι Τυρνάβου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 έπειτα από καλλιέργειά τους υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tert-butyl. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής οι δείκτες οξειδωτικού στρες ROS και γλουταθειόνη GSH, καθώς επίσης και ο δείκτης TBARS με φασματοφωτομετρία.

## 3. Υλικά

---

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

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

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

Στη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούμε θρεπτικό υλικό το οποίο άλλοτε περιέχει FBS ( ένα αυξητικό παράγοντα ) και άλλοτε όχι ανάλογα με την περίπτωση. Μάλιστα στην περίπτωση που το θρεπτικό μέσο περιέχει FBS, τότε η περιεκτικότητα αυτού

ανέρχεται στο 10%. Αναλυτικότερα λοιπόν, οι αναλυτικές συστάσεις των θρεπτικών μέσων αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

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

**Εικόνα 15:** Σύσταση θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διαδικασίας

Σημειώνουμε το γεγονός ότι το θρεπτικό μέσο με 10% FBS, χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, το θρεπτικό χωρίς FBS χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος όπου τοποθετούμε το εκχύλισμα στα κύτταρα.

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

- Χρωστική **DCF (Sigma)**
- FACS Clean (Becton-Dickinson)
- FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- Απεσταγμένο νερό

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

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

Για τη μέτρηση των T-BARS με τη βοήθεια της φασματοφωτομετρίας χρησιμοποιούμε τα εξής αντιδραστήρια:

- PBS (0,01M)
- TCA 35%
- TrisHCl
- TCA 70%
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + TBA

Για την μέθοδο Bradford, είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια:

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

### **Στατιστική Ανάλυση**

Όσο αφορά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τα οποία προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA του προγράμματος SPSS,

## 4.ΜΕΘΟΔΟΙ

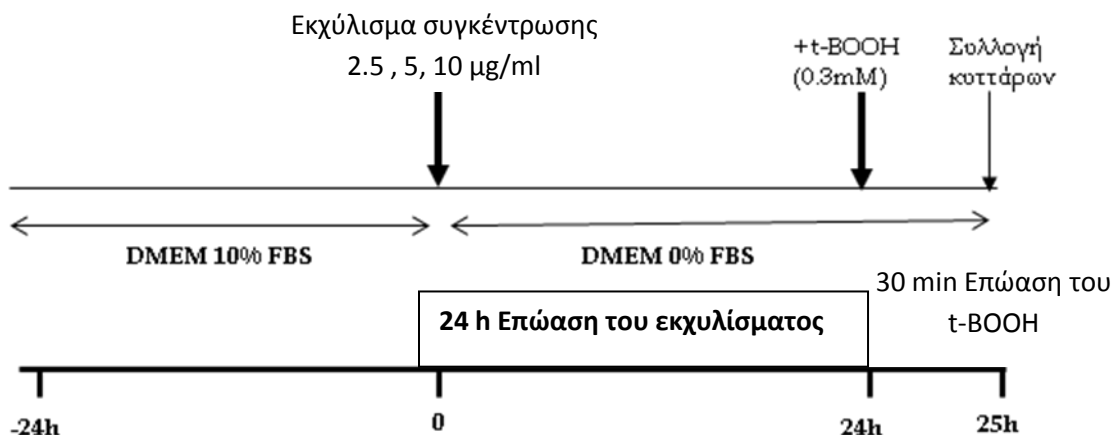
---

### 4.1 Μέθοδος Flow Cytometry (Κυτταρομετρία Ροής)

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

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

Όσον αφορά την αρχή της μεθόδου, μια δέσμη φωτός (συνήθως η δέσμη είναι laser) ενός μόνο μήκους κύματος οδηγείται πάνω στο υδροδυναμικό ρεύμα υγρού. Ένα πλήθος από ανιχνευτές στοχεύονται στο σημείο από το οποίο το ρεύμα διέρχεται μέσα από την δέσμη των ακτινών. Ο πρώτος ανιχνευτής αφορά τον καθορισμό του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC). Ο δεύτερος αφορά την κοκκίωση του κυττάρου, δηλαδή με άλλα λόγια την πολυπλοκότητά του (Side Scatter or SSC). Όσο πιο κοκκιωμένο είναι ένα κύτταρο, τόσο υψηλότερο θα εμφανίζεται το επίπεδο του SSC. Επιπλέον, εκτός από τις δυο αυτές βασικές παραμέτρους, το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής είναι σε θέση να ανιχνεύσει και φθορίζοντες ανιχνευτές. Ένα κλασσικό παράδειγμα τέτοιου ανιχνευτή αποτελεί η χρωστική DCF.



**Εικόνα 16:** Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων C2C12. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό MEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού στις 24 h σε MEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη μέτρηση των κυττάρων.

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

Μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων, τα κύτταρα επωάζονται για 24 h και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε MEM χωρίς FBS. Αυτό συμβαίνει για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με τα εκχυλίσματα και κατά αυτόν τον τρόπο να επηρεαστούν τα αποτελέσματα.

Με το πέρας της επώασης των κυττάρων παρουσία εκχυλίσματος, ακολουθεί η αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάσκας με τη χρήση τρυψίνης. Αναλυτικότερα, αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, ακολουθεί πλύση των

κυττάρων με PBS. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται έτσι ώστε να αφαιρεθεί εντελώς το θρεπτικό υλικό, για να μην επηρεάσει την διαδικασία. Στην συνέχεια, τοποθετούμε στην φλάσκα 330  $\mu\text{L}$  από 0,1% διάλυμα τρυψίνης/EDTA και επωάζουμε για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Στην συνέχεια, επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 4 mL θρεπτικού υλικού MEM με 10% FBS και τα τοποθετούμε σε erpendorfs των 10 mL.

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

Συνεχίζοντας την διαδικασία, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

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

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

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

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

✓ Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

✓ Ακολουθεί η επαναιώρηση σε νερό όγκου 150  $\mu\text{L}$  και 15  $\mu\text{L}$  χρωστικής DCF.

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

✓ Το υπερκείμενο από τα δείγματα απομακρύνεται εκ νέου και προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  PBS.

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

## 4.2 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford, απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Αρχικά, για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων πρέπει να γίνει μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αλβουμίνη, μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Ακόμα, η αρχή της μεθόδου αφορά την αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (**Bradford, 1976**).

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

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 µL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford Εφόσον τοποθετήσουμε την χρωστική, τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ως ότου σταθεροποιηθεί το χρώμα. Το τελευταίο βήμα είναι η φωτομέτρηση στα 505 nm. Ως τυφλό, χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 µL H<sub>2</sub>O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των οπτικών μετρήσεων που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη, με την οποία γίνεται η αντιστοίχιση της τιμής της απορρόφησης με την ποσότητα του δείγματος.



## 5. Πειραματική Διαδικασία

---

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

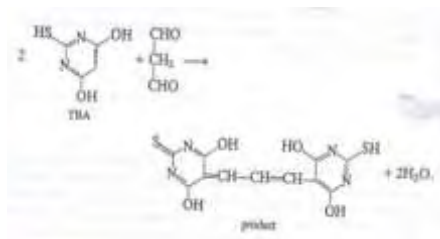
#### Πειραματική διαδικασία

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°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.

### 5.2. 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 διαλδεύδη (MDA). Η μηλονική διαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα.



**Εικόνα 20:** Αντίδραση του TBA με την MDA

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεύδης 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 επώαστηκαν στους 95<sup>0</sup>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.

## 6. Αποτελέσματα

---

### 6.1 Αποτελέσματα Πειραματικής Διαδικασίας

Τα κύτταρα μελετήθηκαν σε 5 διαφορετικές καταστάσεις:

α) Την κατάσταση control

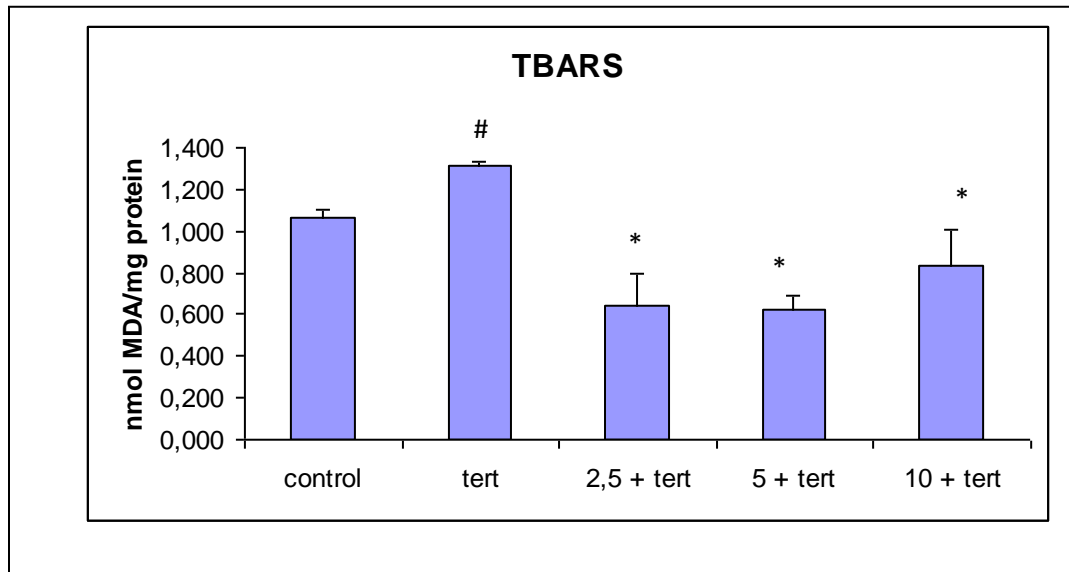
β) Την κατάσταση tert όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM.

γ) Την κατάσταση 2,5 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5μg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

δ) Την κατάσταση 5 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 5μg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

ε) Την κατάσταση 10 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 5μg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

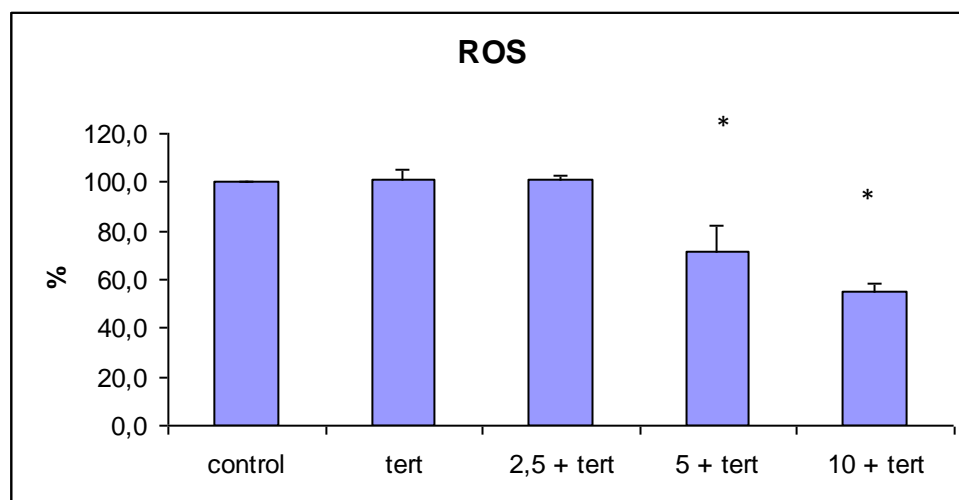
TBARS:



Διάγραμμα 1: Τα επίπεδα των TBARS

Στα TBARS παρατηρούμε ότι το tert τα αυξάνει σημαντικά κατά 23,5% σε σχέση με την κατάσταση control. Στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρείται σημαντική μείωση των TBARS κατά 39, 41,2 και 21,3 % μείωση σε σχέση με την κατάσταση control.

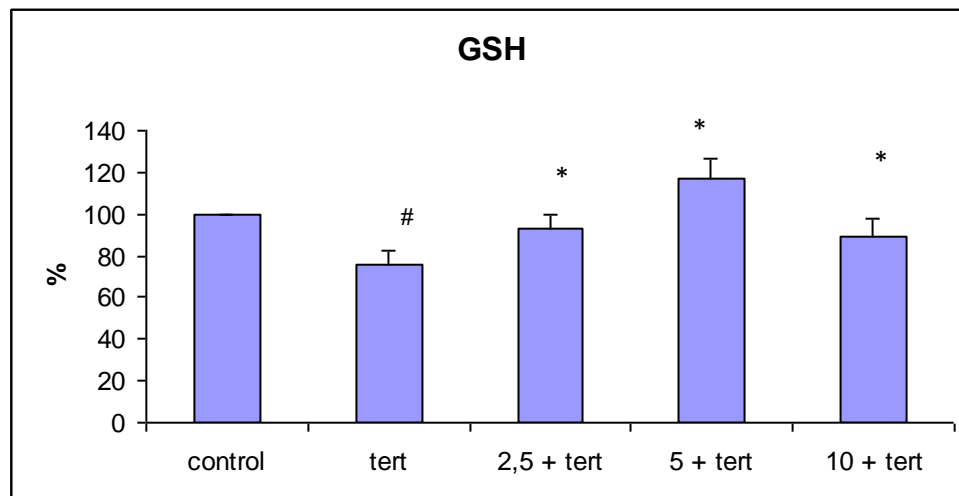
ROS:



Διάγραμμα 2: Τα επίπεδα των ROS

Όσον αφορά τα ROS παρατηρούμε ότι τα ROS μειώνονται σημαντικά στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  κατά 28,5 και 44,9% αντίστοιχα.

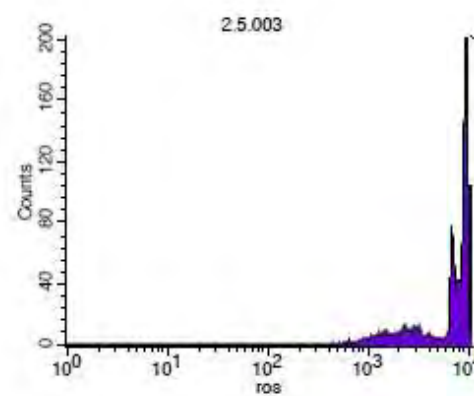
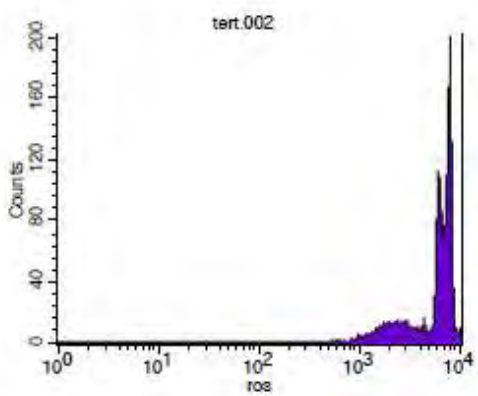
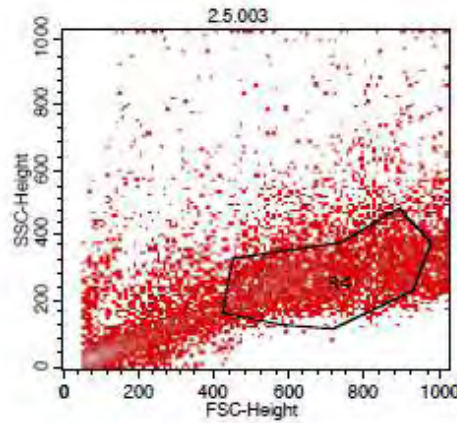
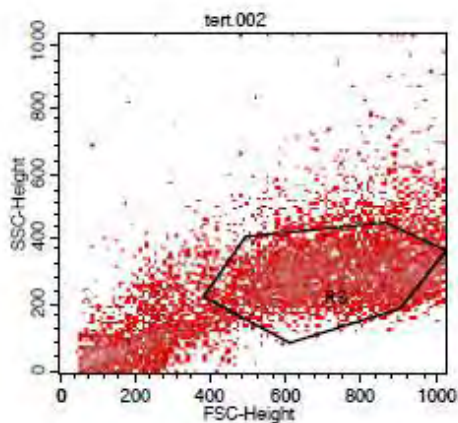
GSH



Διάγραμμα 3: Τα επίπεδα της GSH

Στη GSH παρατηρείται σημαντική μείωση κατά 24% στη κατάσταση tert και στις συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10μg/ml τα επίπεδα της GSH εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl κατά 22, 54 και 17% αντίστοιχα.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 καθώς και τη μεταβολή της GSH και των ROS



Histogram Statistics

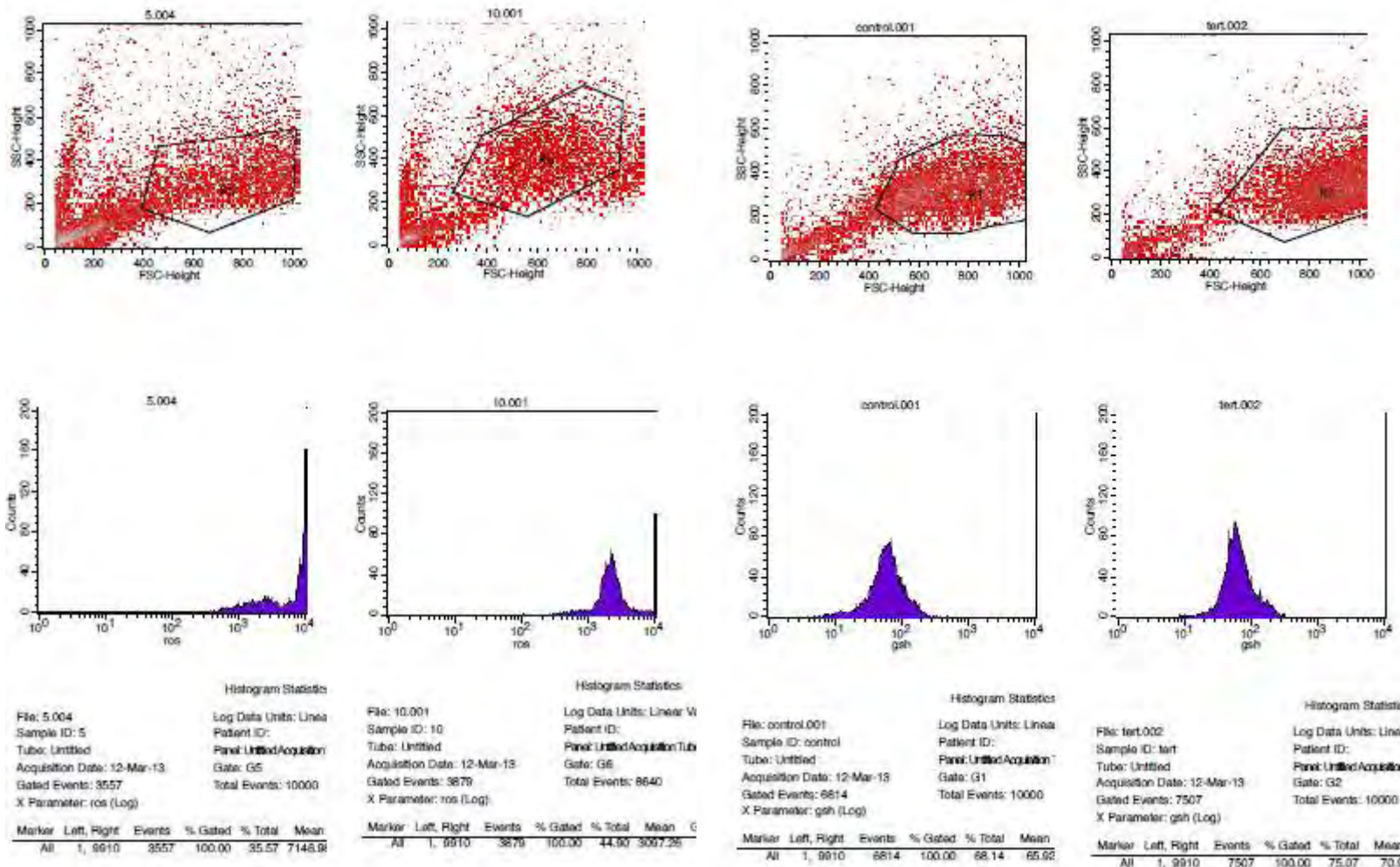
File: tert.002  
 Sample ID: tert  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 12-Mar-13  
 Gated Events: 5200  
 X Parameter: ros (Log)  
 Log Data Units: Linear  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition T  
 Gate: G3  
 Total Events: 10000

| Marker | Left, Right | Events | % Gated | % Total | Mean    |
|--------|-------------|--------|---------|---------|---------|
| All    | 1, 9910     | 5200   | 100.00  | 52.00   | 5754.21 |

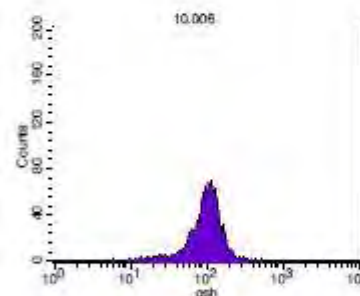
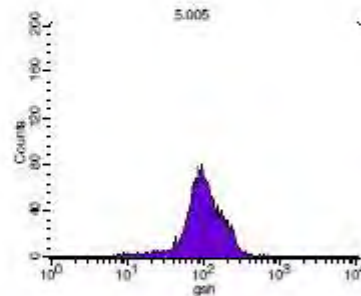
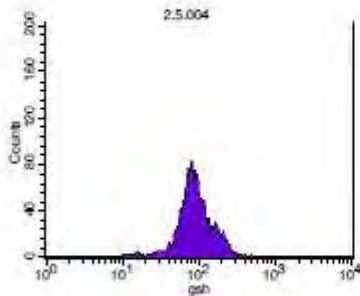
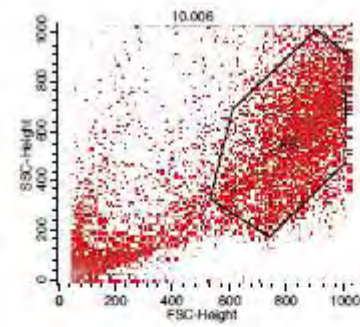
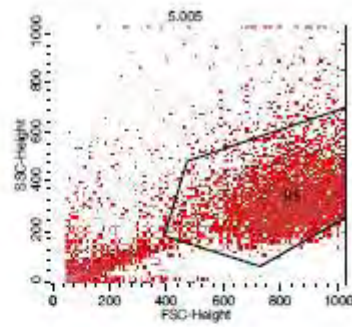
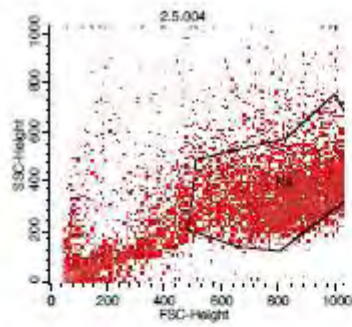
Histogram Statistics

File: 2.5.003  
 Sample ID: 2.5  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 12-Mar-13  
 Gated Events: 4082  
 X Parameter: ros (Log)  
 Log Data Units: Linea  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

| Marker | Left, Right | Events | % Gated | % Total | Mean    |
|--------|-------------|--------|---------|---------|---------|
| All    | 1, 9910     | 4082   | 100.00  | 40.82   | 6725.91 |







File: 2.5.004  
Sample ID: 2.5  
Tube: Untitled  
Acquisition Date: 12-Mar-13  
Gated Events: 6039  
X Parameter: gsh (Log)

Histogram Statistics  
Log Data Units: Linear Vt  
Patient ID:  
Panel: Untitled Acquisition Tube  
Gate: G4  
Total Events: 10000

| Marker | Left | Right | Events | % Gated | % Total | Mean  | C |
|--------|------|-------|--------|---------|---------|-------|---|
| All    | 1    | 9910  | 6039   | 100.00  | 60.39   | 97.81 |   |

File: 5.005  
Sample ID: 5  
Tube: Untitled  
Acquisition Date: 12-Mar-13  
Gated Events: 6980  
X Parameter: gsh (Log)

Histogram Statistics  
Log Data Units: Linear  
Patient ID:  
Panel: Untitled Acquisition Tube  
Gate: G5  
Total Events: 10000

| Marker | Left | Right | Events | % Gated | % Total | Mean   |
|--------|------|-------|--------|---------|---------|--------|
| All    | 1    | 9910  | 6980   | 100.00  | 69.80   | 110.12 |

File: 10.008  
Sample ID: 10  
Tube: Untitled  
Acquisition Date: 12-Mar-13  
Gated Events: 4795  
X Parameter: gsh (Log)

Histogram Statistics  
Log Data Units: Linear Vt  
Patient ID:  
Panel: Untitled Acquisition Tube  
Gate: G6  
Total Events: 10000

| Marker | Left | Right | Events | % Gated | % Total | Mean   |
|--------|------|-------|--------|---------|---------|--------|
| All    | 1    | 9910  | 4795   | 100.00  | 47.95   | 103.39 |

## 6.2 Συμπεράσματα Πειραματικής Διαδικασίας

Τα αποτελέσματα στα μυϊκά κύτταρα C2C12 δείχνουν ότι το εκχύλισμα παρουσιάζει προστατευτική δράση όσον αφορά το οξειδωτικό στρες η οποία ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα των ROS εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα στις συγκεντρώσεις των 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  σε σχέση με την κατάσταση control καθώς και σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl. Το tert-butyl μόνο του μείωσε τα επίπεδα της GSH κατά 24%. Ωστόσο στα κύτταρα που χορηγήθηκε εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5, 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$  τα επίπεδα της GSH εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl κατά 22, 54 και 17% αντίστοιχα. Στα TBARS παρατηρούμε μια αύξησή τους όταν χορηγούμε μόνο tert-butyl κατά 23,6% σε σχέση με το control. Στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  παρατηρείται σημαντική μείωση των TBARS κατά 51, 52,4 και 36,7% σε σχέση με την κατάσταση tert-butyl. Παρατηρείται λοιπόν μια προστατευτική δράση του εκχυλίσματος στα μυϊκά κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί ο οξειδωτικός παράγοντας tert-butyl

## 7. Συζήτηση

---

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Εμφανίζεται μετά από υπερβολική κατανάλωση οξυγόνου (για παράδειγμα στους μύες κατά την έντονη άσκηση) ή ακτινοβολία των ιστών (η αλληλεπίδραση της ionίζουσας ακτινοβολίας με μόρια  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{O}_2$  παράγει ελεύθερες ρίζες) και συμβάλλει στην ιστική βλάβη. Πιθανολογείται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους συμπεριλαμβανομένων αυτών του Alzheimer, του Parkinson και του Huntington. Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται επίσης ότι σχετίζεται με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι αιτιολογικός παράγοντας της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών. Συνεπώς, εάν ένα σκεύασμα έχει τη δυνατότητα μείωσης των επιπέδων των ελευθέρων ριζών, θα

μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη αρκετών παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Οι πολυφαινόλες του σταφυλιού περιλαμβάνουν μία πληθώρα μορίων, όπως φλαβονοειδή, τανίνες, προανθοκυανιδίνες, ουσίες που δρουν προστατευτικά, προάγοντας την καλή κατάσταση της υγείας και παρατείνοντας τον μέσο όρο ζωής. Αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων του αίματος, αυξάνουν τα επίπεδα της (προστατευτικής για την υγεία) HDL και μειώνουν τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης LDL, η οποία ευθύνεται για την δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Ακόμη, μειώνουν την πιθανότητα δημιουργίας θρόμβων, εμφανίζουν γενικότερη αντιφλεγμονώδη δράση και περιορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις οξειδωτικές βλάβες στους ιστούς, με απώτερο αποτέλεσμα την ελάττωση εμφάνισης καρκίνου.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ερευνήθηκε εάν ένα εκχύλισμα σταφυλιού από την ποικιλία (*Vitis vinifera*) Μπατίκι της περιοχής του Τυρνάβου έχει αντιοξειδωτική δράση σε μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12. Η συγκέντρωση πάνω από 20 µg/ml είναι αυτή στην οποία το εκχύλισμα εμφανίζει κυτταροτοξική δράση. Ως αποτέλεσμα αυτού επιλέχθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις: 2.5 , 5, 10 µg/ml. Κατόπιν χρειάστηκε να επώασουμε τα κύτταρα για 24 ώρες και να προβούμε στον προσδιορισμό ορισμένων δεικτών οξειδωτικού στρες. Αναλυτικότερα προσδιορίστηκαν η γλουταθειόνη ( GSH ) και οι ελεύθερες ρίζες ( ROS ) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και η οξείδωση λιπιδίων ( T-Bars ) με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.

Αναλυτικότερα και περνώντας στα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης αρχικά άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα μελετήθηκαν σε πέντε διαφορετικές καταστάσεις:

α) Την κατάσταση control

β) Την κατάσταση tert όπου τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM.

γ) Την κατάσταση 2,5 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5µg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

δ) Την κατάσταση 5 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 5μg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

ε) Την κατάσταση 10 + tert όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα συγκέντρωσης 5μg/ml και έπειτα επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό υλικό που περιέχει tert-butyl συγκέντρωσης 0.3mM

Το tert-butyl μόνο του μείωσε τα επίπεδα της GSH κατά 24%. Στα κύτταρα που χορηγήθηκε εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5, 5 και 10μg/ml τα επίπεδα της GSH εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl κατά 22, 54 και 17% αντίστοιχα.

Επίσης, η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος σταφυλιών επιβεβαιώνεται και από την φασματοφωτομετρική μέτρηση του δείκτη TBARS (δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης) σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Μαυρίδου 2012). Στα TBARS παρατηρούμε μια αύξησή τους όταν χορηγούμε μόνο tert-butyl κατά 23,6% σε σχέση με το control. Στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 2,5, 5 και 10 μg/ml παρατηρείται σημαντική μείωση των TBARS κατά 51, 52.4 και 36.7% σε σχέση με την κατάσταση tert-butyl.

Παράλληλα, το εκχύλισμα πολυφαινολών ασκεί προστατευτική δράση και στα επίπεδα των ROS τα οπο εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα στις συγκεντρώσεις των 5 και 10 μg/ml σε σχέση με την κατάσταση control καθώς και σε σχέση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tert-butyl

Όσον αφορά την επίδραση αντιοξειδωτικών ουσιών στα κύτταρα C2C12 μία έρευνα η οποία δημοσιεύτηκε το Νοέμβριο του 2005 από τον Piero Sestili et al, έδειξε ότι η κρεατίνη ασκεί μία ήπια μεν αλλά σημαντική αντιοξειδωτική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα (U937) και ενδοθηλιακά (HUVEC) κύτταρα, όπως επίσης και σε κύτταρα ποντικίου C2C12 τα οποία εκτίθενται σε tert – butyl. Σε μία άλλη μελέτη του 2012 η οποία πραγματοποιήθηκε σε μυϊκά κύτταρα C2C12, έδειξε ότι η PRX-2 υπερεκφράζεται μέσω της PI3K/NF- $\kappa$ B οδού και μειώνει το οξειδωτικό στρες των μυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίηση και την αναγέννησής τους.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως το συγκεκριμένο εκχύλισμα σταφυλιού προστατεύει από τη δράση οξειδωτικού παράγοντα τα μυϊκά κύτταρα C2C12 σε μικρές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, σε μία άλλη έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε το 2012 στο εργαστήριο (Veskoukis et all 2011) βρέθηκε ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος σταφυλιού, σε σχετικά όμως μεγάλη συγκέντρωση, σε αρουραίους προκάλεσε γενικά οξειδωτικό στρες σε μύες κατά την ηρεμία και μετά την άσκηση, ενώ η αθλητική απόδοση τους παρέμεινε αμετάβλητη. Αναμφίβολα, απαιτούνται περισσότερες έρευνες σχετικά με την προστατευτική δράση του εκχυλίσματος από στέμφυλα προς τους οργανισμούς, καθώς όπως γίνεται αντιληπτό το εκχύλισμα μπορεί να συμπεριφέρεται διαφορετικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες που προκαλούνται από διαφορετικούς παράγοντες.

## 8. Βιβλιογραφία

---

- BUTTERFIELD DA, BOYD-KMBALL D. The critical role of methionine 35 in Alzheimer’s amyloid beta peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2005,1703:149–156
- Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93, 1993.
- DICKINSON D, FORMAN H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002, 64:1019–1026
- Ελληνική Διαβητολογική Εταιρία, Απρίλιος 2013
- Garcia-Cohen EC Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA  
Source Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, Ann NY Acad Sci, 899:1, 2000
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Encyclopedia of Life Science
- Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN , Methods in Enzyme bgy 186, 1990
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.
- Hyeran Won, Sangbin Lim, Miran Jang, Yeonghwan Kim, Md Abdur Rashid, K.R. Jyothi, Amarjargal Dashdorj, Insug Kang, Joohun Ha, and Sung Soo Kim  
ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 2012
- Jackson Malcolm J., (2011), Control of Reactive Oxygen Species production in contracting skeletal muscle, Antioxidants & Redox Signaling, Volume 15, Number 9



- Keles, I., S. Deger, N. Altug, M. Karaca and C. Akdemir, 2001. Tick-borne disease in cattle: Clinical and haematological findings, diagnosis, treatment, seasonal distribution, breed, sex and age factors and the transmitters of the diseases. *YYU. Vet. Fak. Derg.*, 12: 26-32.
- KOJODA G, HARRISON DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999, 43:562–567
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47
- Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006
- Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006
- Μαυρίδου Παρασκευή, (2012), «Προσδιορισμός Γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής σε μυϊκά κύτταρα επιμύου μετά από επίδραση εκχυλίσματος σταφυλιού»
- Piero Sestili , Chiara Martinelli , Giorgio Bravi , Giovanni Piccoli, Rosa Curci d, Michela Battistell , Elisabetta Falcieri, Deborah Agostini, Anna Maria Gioacchini, Vilberto Stocchi November 2005
- REITER RJ, TAN DX, PAPPOLA MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementia. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1035:179–196
- TOUYZ RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: Role of angiotensin II: Editorial review. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005, 14:125–131
- Valavanidis A, “Free radicals in organic chemistry”, University of Athens, 2006.
- VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39:44–84

- VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004, 266:37–56
- Veskoukis Aristeidis, Kyparos Antonios, Michalis Nikolaidis, Stagkos Dimitrios, Chronis Konstantinos, Gkoutzourelas Nikolaos, Kouretas Dimitrios, (2011), The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape seed extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2012, Article ID 185867
- VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ, TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004, 266:37–56
- WITZTUM JL, HORKKO S. The role of oxidized LDL in atherogenesis: Immunological response and antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 8
- Yaffe και Saxel, 1977
- Σπύρου Αργύρης, (2010), «Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*vitis vinifera*) και φυτικών πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα ήπατος HEPG2»

#### Διαδίκτυο

[www.iatronet.gr](http://www.iatronet.gr)

[www.pubmed.gr](http://www.pubmed.gr)