



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

«ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ  
ΠΟΝΤΙΚΟΥ, ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ  
ΒΟΣΤΡΥΧΟΥΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ»

«EFFECTS ON OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AFTER GRAPE  
STEM EXTRACT TREATMENT IN MOUSE MUSCLE CELLS»



Λιόση Μαρία

3/2/2015



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 🌍 **Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων):** Καθηγητής Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- 🌍 **Στάγκος Δημήτριος:** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- 🌍 **Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή Τοξικολογίας και Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα αποκτώντας νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Στάγκο, Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας για όλη την προσοχή και τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και κυρίως τον υποψήφιο διδάκτωρ Νίκο Γκουτζουρέλα για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια και στήριξή του.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιοξειδωτικά μόρια έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και να τις εξουδετερώνουν. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να προστατεύσουν τα βιομόρια των κυττάρων από οξείδωση και κατ' επέκταση να προφυλάξουν τον οργανισμό από μια πληθώρα ασθενειών που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό καρκίνου καθώς και την πρόκληση και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να εμποδίσουν τις άκρως επιβλαβείς συνέπειες της οξείδωσης. Ουσιαστικά λειτουργούν ως χημειοπροστατευτικά για τον οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά απαντώνται σε μια ευρεία ποικιλία στα τρόφιμα και γι' αυτό το λόγο η πρόσληψή τους είναι ιδιαίτερα εύκολη.

Κύριοι διατροφικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες αποτελούν τόσο ορισμένες βιταμίνες, ιχνοστοιχεία όσο και μερικές φυτοχημικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη E (ή τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ), η νιασίνη, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ουσιών και ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση. Οι πολυφαινόλες είναι μια ετερογενής κατηγορία χημειοπροστατευτικών μορίων που απαντώνται και στα σταφύλια.

Σε εκχυλίσματα από βόστρυχους (κοτσάνια - τσαμπιά) σταφυλιών των ποικιλιών Μοσχόμαυρο, Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο πραγματοποιήθηκε η μελέτη της πολυφαινολικής δράσης. Τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα έχουν μελετηθεί από το εργαστήριό μας και έχουν διαπιστωθεί διάφορες ευεργετικές δράσεις τους.

Η συγκεκριμένη εργασία αφορά την επίδραση των εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών κυττάρων ποντικού (C2C12). Οι πειραματικές μέθοδοι που έγιναν in vitro είναι:

- ⊗ Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο).
- ⊗ Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS, (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid).
- ⊗ Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης των εκχυλισμάτων, Reducing Power, που βασίζεται στην ικανότητά τους για μεταφορά ηλεκτρονίων.
- ⊗ Αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων.
- ⊗ Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS στα κύτταρα.

- Ⓢ Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που αποτελούν ένα γενικό δείκτη της οξείδωσης των πρωτεϊνών των κυττάρων.
- Ⓢ Κυτταρομετρία Ροής, για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες: ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήξαμε είναι ότι όλα τα εκχυλίσματά μας ασκούν αντιοξειδωτική δράση στα μυϊκά κύτταρα του ποντικού (C2C12), με πιο ισχυρά αυτών, την ποικιλία Μανδηλαριά, η οποία αυξάνει τα επίπεδα γλουταθειόνης, ενώ μειώνει εμφανώς τα επίπεδα των ROS. Τέλος, τη μικρότερη συμβολή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου παρουσίασε η ποικιλία Μοσχόμαυρο.



**Εικόνα 1.** Κρασί από ελληνικά σταφύλια

## ABSTRACT

Antioxidants molecules have the ability to interact with free radicals and neutralizing them. In this way can protect the biomolecules of cells from oxidation and thereby to shield the body from a plurality of diseases associated with oxidative stress. Oxidative stress plays a key role in cardiovascular disease and diabetes. Furthermore, is directly associated with tumor formation and other autoimmune diseases. The role of antioxidants is to neutralize free radicals and thus to prevent the highly detrimental effects of oxidation. Essentially acting as chemoprotective for the body. Antioxidants are found in a wide variety of food and for this reason their intake is very easy.

Major dietary antioxidants are so certain vitamins as minerals and certain phytochemical compounds. In particular, vitamin E (tocopherol), vitamin C (or ascorbic acid), niacin, selenium, zinc, carotenoids, polyphenols are typical examples of compounds and substances with antioxidant activity. Polyphenols are a heterogeneous class of chemopreventive molecules found in grapes.

In extracts from Bunches (stalks) of grape varieties Moschomavro, Mandilaria and Mavrotragano conducted the study of polyphenolic action. These extracts have been studied by our laboratory and have been found to have a number of beneficial effects.

This paper concerns the effect of the extracts on the redox state of mouse muscle cells (C2C12). The experimental methods were conducted in vitro are:

- ⊗ Evaluation of antioxidant activity of the extracts, through the root of the binding capacity of DPPH, (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).
- ⊗ Evaluation of antioxidant activity of the extracts, through the root binding capacity ABTS, (2,2-Azino-bis- (3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid).
- ⊗ Determination of Reducing Power of the extracts, based on their ability to transfer electrons.
- ⊗ Method XTT, a colorimetric test to determine the cytotoxicity of the extracts.
- ⊗ Reagent Folin - Ciocalteu to determine the total polyphenol content of the extracts.
- ⊗ Method Bradford, for determination of total protein in muscle cells.
- ⊗ Determination of lipid peroxidation index TBARS cells.
- ⊗ Determination of levels of protein carbonyls, which are a general indicator of the oxidation of cell proteins.
- ⊗ Flow cytometry for determination of oxidative stress indicators: reduced glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS).
















The conclusion reached is that all our extracts exert antioxidant activity in mouse muscle cells (C2C12), with the most powerful of these, the variety of

Mandilaria, which increases glutathione levels, while visibly reduces the levels of ROS. Finally, the smallest contribution to the redox state of the cell showed the variety of Moschomavro.















**Εικόνα 2.** Αμπέλι

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
I. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	12
1. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών	13
2. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	13
2.1 Ταξινόμηση	14
2.2 Κυριότερες Ελεύθερες Ρίζες	14
 Σουπεροξειδίο ή ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet -}$ )	14
 Ρίζα Υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ )	15
 Υπεροξειδικές ρίζες ( $ROO^{\bullet}$ )	15
 Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\bullet}$ )	15
2.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου που δεν είναι Ελεύθερες Ρίζες	16
 Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )	16
 Υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ )	16
 Υποβρωμιώδες Οξύ ( $HOBr$ )	17
 Όζον ( $O_3$ )	17
 Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ )	17
2.4 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου	18
A. Ενδοκυτταρικές πηγές	19
 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	19
 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»	19
 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	21
 Κυτόχρωμα P450	21
 Αυτοοξείδωση μορίων	21
B. Εξωκυτταρικές πηγές	21



3. Βιολογική Δράση Των ROS	23
A. Θετικές επιδράσεις	23
B. Επιβλαβείς επιδράσεις	23
II. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	24
1. Παράγοντες Δημιουργίας Οξειδωτικού Στρες	26
1.1 Εξωγενείς πηγές	26
1.2 Ενδογενείς πηγές	26
2. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	26
2.1 Λιπίδια	27
2.2 Πρωτεΐνες	28
2.3 DNA	28
III. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	29
1. Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών	29
2. Πηγές Αντιοξειδωτικών	30
3. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	31
3.1 Ενζυμικοί Μηχανισμοί	31
● Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	32
● Καταλάση (CAT)	32
● Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	32
● Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)	33
3.2 Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί	33
● Γλουταθειόνη	33
● Βιταμίνες	35
● Βιταμίνη E	36
● Βιταμίνη C	36
● Β-καροτίνη	38
● Ουρικό οξύ	38
● Συνένζυμο Q10	38

 Σελήνιο	38
4. Πολυφαινόλες	38
4.1 Η δράση των Πολυφαινολών	38
4.2 Κατηγορίες Πολυφαινολών	39
 Φλαβονοειδή	39
 Φλαβανόλες	41
 Φλαβόνες	41
 Φλαβονόλες	41
 Φλαβανόνες	41
 Ισοφλαβόνες	41
 Ανθοκυανιδίνες	42
 Πολυφαινολικά οξέα	42
 Στιλβένια	42
 Λιγνάνες	43
IV. ΣΤΑΦΥΛΙΑ	45
1. Συστατικά Μέρη Σταφυλιών	51
2. Μοσχόμαυρο (Κεντρικής & Βορειοδυτικής Ελλάδας)	51
3. Μαυροτράγανο (Σαντορίνης)	52
4. Μανδηλαριά (Νησιά Αιγαίου)	53
V. ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12	55
 <b>ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	56
I. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ C2C12	56
1. Υλικά καλλιέργειας	56
2. Διαδικασία Καλλιέργειας	56
II. ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ	57
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	58

1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH	58
2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+	60
3. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης Reducing Power	63
4. Μέθοδος XTT	65
5. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	67
6. Μέθοδος Bradford	69
7. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS	70
8. Προσδιορισμός Καρβονυλίων	71
9. Κυτταρομετρία Ροής	73
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	76
1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH	76
2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+	78
3. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης Reducing Power	81
4. Μέθοδος XTT	84
5. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	87
6. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS	87
7. Προσδιορισμός Καρβονυλίων	89
8. Κυτταρομετρία Ροής	90

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

97

 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

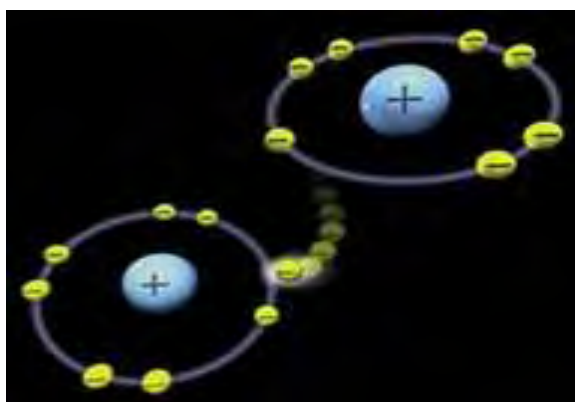
103

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### I. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Σε κάθε μόριο ή άτομο, τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε συγκεκριμένες τροχιές, που ορίζονται ως τροχιακά (ατομικά ή μοριακά). Όταν όμως ένα άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης είναι δυνατόν να περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους τότε αυτά ορίζονται ως ελεύθερες ρίζες. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989; Jenkins et al., 1988; Mylonas & Kouretas, 1999;). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ετερογενής ομάδα μορίων, οι οποίες είναι πολύ ασταθείς και ενεργές καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστικότητά τους προσπαθώντας να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1998).

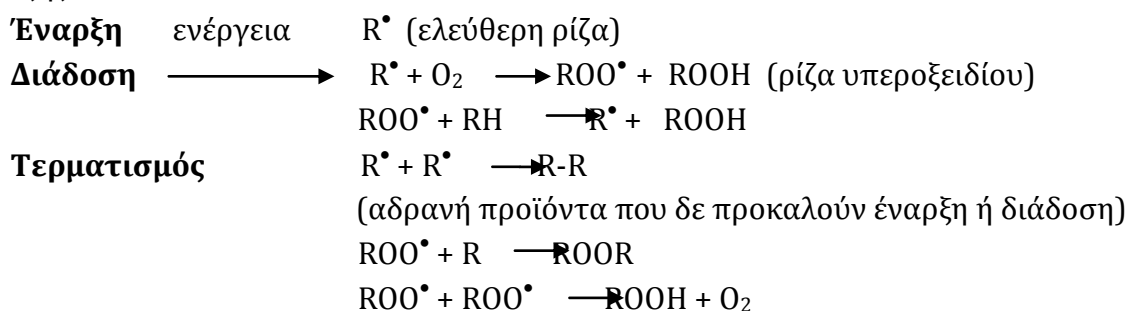
Οι ελεύθερες ρίζες συχνά αναφέρονται ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), περιγράφοντας αυτές που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το  $O_2^{\cdot-}$  και το  $OH^{\cdot}$ . Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι αυτή του υδρογόνου. Συγκαταλέγονται επίσης οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέλθουν από αντίδραση με τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002).



**Εικόνα 3.** Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

## 1. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών

Ο μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών έχει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον 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 δεν παρέχουν νέες ελεύθερες ρίζες. Η αλληλουχία των αντιδράσεων για παράδειγμα κατά την οξείδωση των λιπιδίων από ελεύθερες ρίζες μπορεί να παρασταθεί ως εξής:



## 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες (*radicals*) του οργανισμού είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ), του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^\bullet$ ), του αλκοξυλίου ( $\text{RO}^\bullet$ ), του υπεροξειδίου ( $\text{ROO}^\bullet$ ), του τριχλωρομεθυλίου ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ) και οι θειούχες ρίζες ( $\text{RS}^\bullet$ ). Από αυτές, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). 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 (*non-radicals*), όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $\text{COCl}$ ), αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (**Halliwell, 2001**).

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )	Υπεροξείδιο Υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Ρίζα Υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ )	Υποχλωριώδες Οξύ ( $\text{HOCl}$ )
Ρίζα Υπεροξειδίου ( $\text{RO}_2^\bullet$ )	Υποβρωμιώδες Οξύ ( $\text{HOBr}$ )
Ρίζα Αλκοξειδίου ( $\text{RO}^\bullet$ )	Όζον ( $\text{O}_3$ )
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ( $\text{HO}_2^\bullet$ )	Μονήρες Οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ )

## 2.1 Ταξινόμηση

Οι Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:

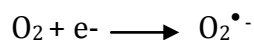
- ⊗ Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ),
- ⊗ Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν ( $\text{ClO}\cdot^-$ ), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος ( $\text{HClO}$ ),
- ⊗ Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

(Halliwell & Gutteridge, 1990)

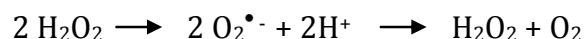
## 2.2 Κυριότερες ελεύθερες ρίζες

### 🌿 Σουπεροξειδίου ή ανιόν του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ )

Το σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα  $e^-$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



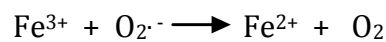
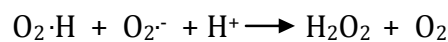
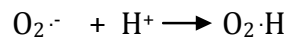
Το σουπεροξειδίου έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων». Ένζυμα που παράγουν σουπεροξειδίου είναι η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Το  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , όπως και όλες οι ρίζες, έχει τη φυσική τάση να ζευγαρώσει το ασύζευκτό του ηλεκτρόνιο. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες  $\text{O}_2^{\bullet -}$  μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH, δύο ρίζες  $\text{O}_2^{\bullet -}$  αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



(Παπαγεωργίου, 2005)

## 🌱 Ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>)

Η ρίζα υδροξυλίου OH<sup>•</sup> είναι πολύ δραστική, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski & Cabelli, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Αυτή προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999). Η αντίδραση καταλύεται ως εξής:



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι:

- 🌀 Η απόσπαση υδρογόνου,
- 🌀 Η προσθήκη ηλεκτρονίου και
- 🌀 Η μεταφορά ηλεκτρονίου

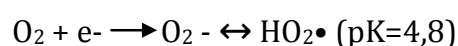
(Halliwell & Gutteridge, 1999)

## 🌱 Υπεροξειδικές ρίζες (ROO<sup>•</sup>)

Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO<sup>•</sup> σχηματίζονται από την προσθήκη μοριακού οξυγόνου (O<sub>2</sub>) σε ελεύθερες οργανικές ρίζες. Είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Παπαγεωργίου, 2005).

## 🌱 Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>)

Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου HO<sub>2</sub><sup>•</sup> προκύπτει από αναγωγή 1 e<sup>-</sup> στο οξυγόνο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:





## 2.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου που δεν είναι ελεύθερες ρίζες

### Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

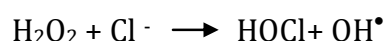
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγεται με αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια, σύμφωνα με την αντίδραση:



Στο μόριο του το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα (HO<sup>•</sup>), που είναι ιδιαιτέρως δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μόλις αυτά παραχθούν **(Παπαγεωργίου, 2005)**.

### Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ HOCl είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το O<sub>2</sub><sup>-</sup> και σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο που βρίσκεται στο κυτόπλασμα των φαγοκύτταρων), καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με το χλώριο (Cl), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, 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, οπότε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών **(Whiteman Matthew, 2005)**.

### 🌍 Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)

Το υποβρωμιώδες οξύ HOBr είναι ασθενές και ασταθές. Σε υδατικό διάλυμα, διίσταται εν μέρει στο ανιόν OBr<sup>-</sup> και το κατιόν H<sup>+</sup>. Όταν καθαρό βρώμιο προστίθεται σε νερό, σχηματίζει υποβρωμιώδες οξύ και υδροβρωμικό οξύ (HBr):



Το HOBr χρησιμοποιείται ως λευκαντικό, οξειδωτικό, αποσμητικό και απολυμαντικό, εξαιτίας της ικανότητάς του να σκοτώνει τα κύτταρα πολλών παθογόνων. Η ένωση παράγεται ιδίως από ηωσινόφιλα, τα οποία το παράγουν από τη δράση της υπεροξειδάσης ηωσινόφιλων, ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί κατά προτίμηση βρωμίδιο. Το βρωμίδιο χρησιμοποιείται επίσης σε υδρομασάζ και ιαματικά λουτρά ως μικροβιοκτόνος παράγοντας, χρησιμοποιώντας τη δράση ενός οξειδωτικού παράγοντα για να παράγουν υποβρωμιώδες με παρόμοιο τρόπο με την υπεροξειδάση των ηωσινόφιλων.

### 🌍 Όζον (O<sub>3</sub>)

Το όζον O<sub>3</sub> 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)**.

### 🌍 Μονήρες οξυγόνο (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

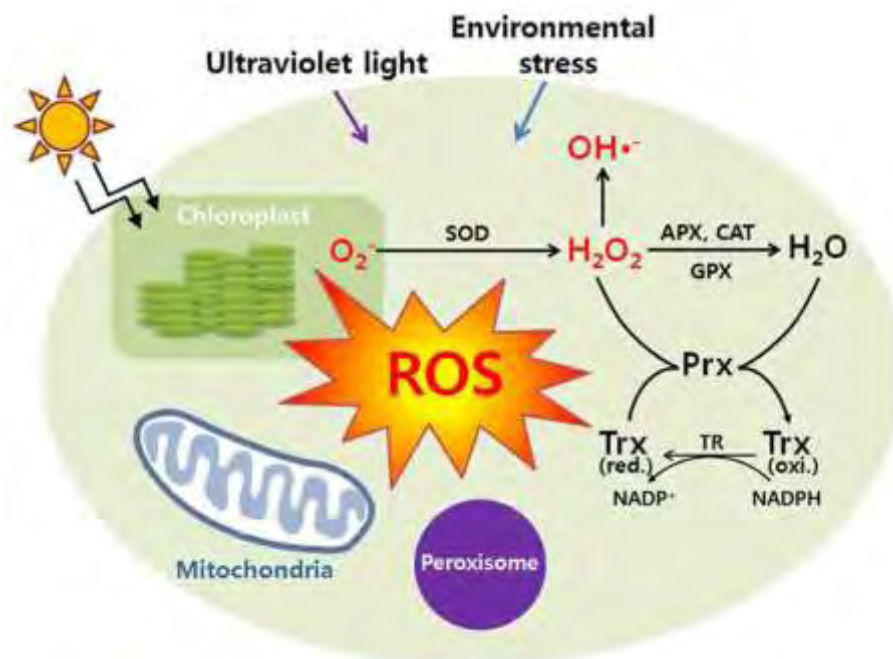
Το μονήρες οξυγόνο <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (singlet oxygen) έχει όλα τα ηλεκτρόνια του συζευγμένα, πράγμα που σημαίνει ότι ουσιαστικά δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του, περισσότερο από το μοριακό οξυγόνο, επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin και παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική ικανότητα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Έχει μικρή διάρκεια ημιζωής και δυνατότητα να διαπερνά τα κύτταρα **(Halliwell, How to characterize an antioxidant: an update 1995)**. Αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδίωσης των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

## 2.4 Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου (ενδοκυτταρικές πηγές). Επίσης παράγονται και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον (εξωκυτταρικές πηγές). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στη μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά.

Σε γενικές γραμμές, δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά:

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



**Εικόνα 4.** Παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

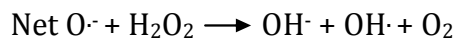
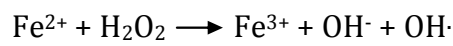
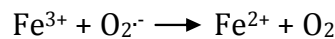
## A. Ενδοκυτταρικές πηγές

### Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979). Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και  $FADH_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\cdot-}$  (Chance et al., 1979). Το  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\cdot-}$  και στο  $H_2O_2$  δημιουργείται  $OH^{\cdot}$ .

#### Αντίδραση Haber-Weiss:



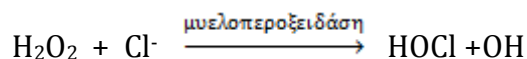
Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^{\cdot-}$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ) (Koppenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $OH^{\cdot}$  και  $NO_2^{\cdot}$ . Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη ( $UQH_2$ ) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης ( $UQH$ ), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Boveris & Cadenas, 1997).

### Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani & Evans, 1979). Στην

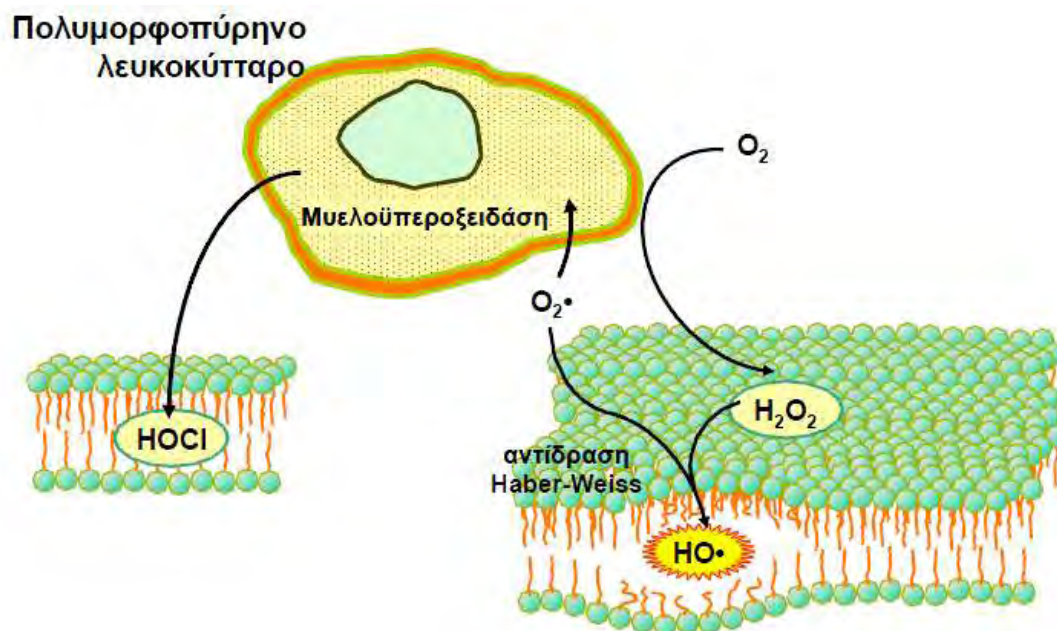
οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το  $O_2^{\cdot-}$  κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες, ενώ το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (**Petrone et al., 1992**).

Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $OH^{\cdot}$  από ιόντα μετάλλων ή σε  $HOCl$ :



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (**Meydani & Evans, 1979; Meydani et al., 1992**).

Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει  $HOCl$  όπως είδαμε.



**Εικόνα 5.** Παραγωγή ελευθέρων ριζών από PMN

## ● Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (**Downey, 1990; Kuppasamy & Zweier, 1989**). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ.

Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^{\cdot-}$ . Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το  $Ca^{2+}$  ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

## ● Κυτόχρωμα P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> (**Yu, 1994**). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας  $O_2^{\cdot-}$  το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε  $H_2O_2$  (**Chance et al., 1979**). Ο ρυθμός παραγωγής του  $H_2O_2$  είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (**Halliwell & Gutteridge, 1989**). Παρουσία ADP και  $Fe^{3+}$  η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο  $O_2$  παράγοντας  $O_2^{\cdot-}$ .

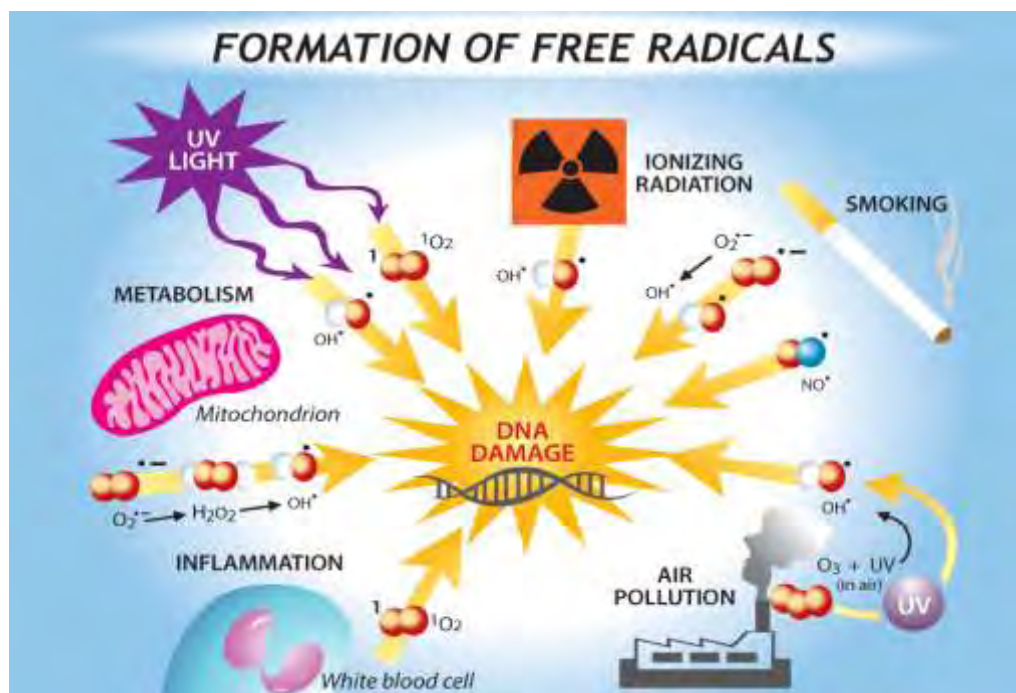
## ● Αυτοοξείδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ).

## B. Εξωκυτταρικές πηγές

Η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες (**Koren, 1995; Victoria, 1994**). Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (**Naito et al., 1998; Rav et al., 2001**) και άλλων ξеноβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (**Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000**). Τέλος, σημαντική

πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 6. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Όσο πιο σταθερή είναι μια ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι και ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ρίζες 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 το σχηματισμό μιας ένωσης που δε θα είναι ελεύθερη ρίζα. Υπάρχουν πολλοί τύποι ελευθέρων ριζών στο σώμα:

- ⊗ 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.
- ⊗ Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.
- ⊗ Η ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί τη λύση του κυττάρου και την ελευθέρωση του περιεχομένου του.
- ⊗ Το μονήρες οξυγόνο δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.

### 3. Βιολογική Δράση Των ROS:

#### A. Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (**Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002**). Για παράδειγμα, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες ή μεθυλάσες ιστονών.

Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (**Finaud et al., 2006**). Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (**Reid, 2001; Linnane et al., 2002**). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για τη στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

#### B. Επιβλαβείς επιδράσεις

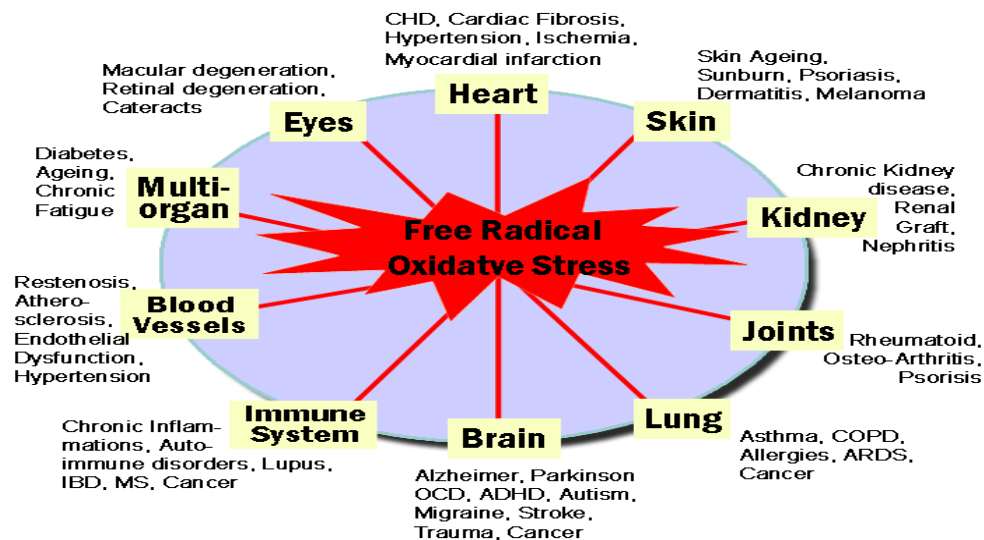
Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson, Alzheimer, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις, πνευμονικές και ηπατικές νόσους, νόσους των νεφρών, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου. Οι επιβλαβείς επιδράσεις που προκαλεί η υπεραγωγή ελεύθερων ριζών ονομάζεται οξειδωτικό στρες.



## II. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία της αναλογίας προοξειδωτικών- αντιοξειδωτικών, υπέρ των πρώτων (Sies et al., 1991). Πρόκειται για διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών, με αποτέλεσμα είτε να υπερπαράγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού της ανηγμένης και οξειδωμένης 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.

Ακόμη αρκετά 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, μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.



Εικόνα 7. Νόσοι που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και ελεύθερες ρίζες

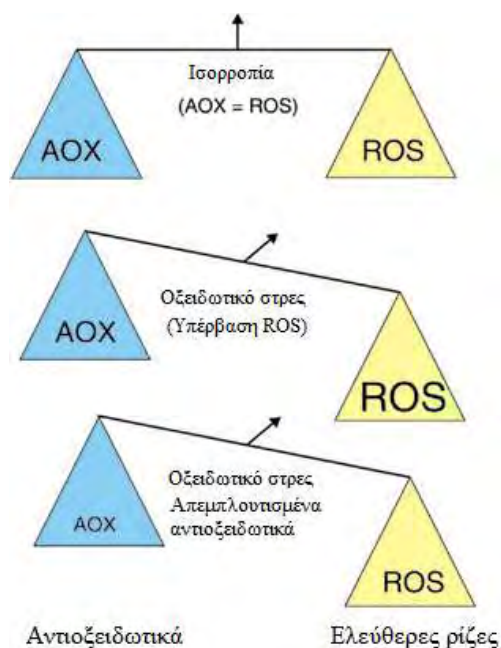
Ο κατάλογος των ασθενειών, που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών συνεχώς αυξάνεται (**Halliwell, 2001**). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

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

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.



**Εικόνα 8.** Τρόπος δημιουργίας Οξειδωτικού στρες

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**).

## **1. Παράγοντες Δημιουργίας Οξειδωτικού Στρες**

Η ανισορροπία στην οποία οφείλεται το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες:

### **1.1 Εξωγενείς πηγές:**

- ⊗ Περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής)
- ⊗ Ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική)
- ⊗ Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
- ⊗ Παθογόνα βακτήρια και ιοί
- ⊗ Βαριά σωματική άσκηση
- ⊗ Κάπνισμα, αλκοόλ, κακή διατροφή
- ⊗ Φάρμακα, τοξικές ουσίες

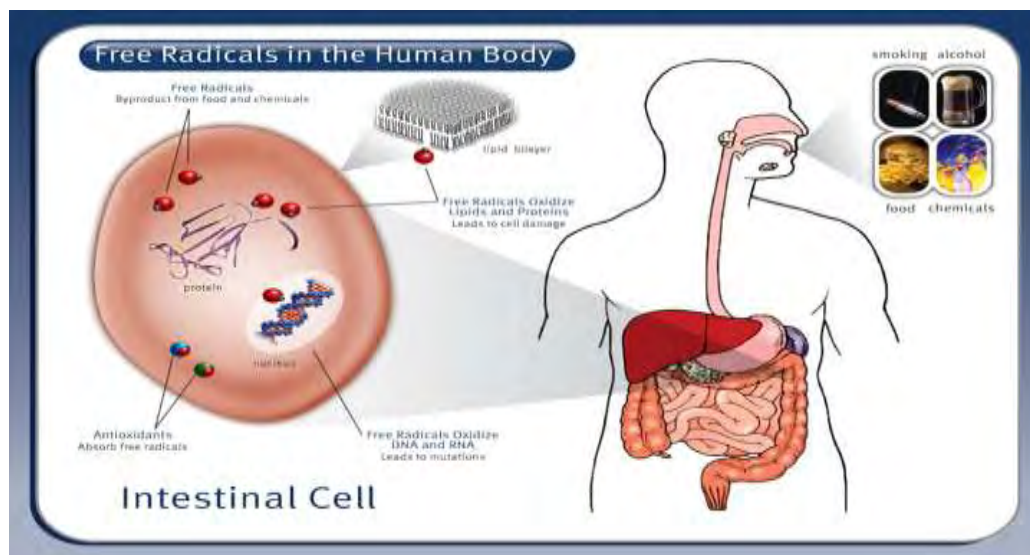
### **1.2 Ενδογενείς πηγές:**

- ⊗ Μιτοχόνδρια, αερόβιος μεταβολισμός
- ⊗ Ενδοπλασματικό δίκτυο
- ⊗ Κυτταρόπλασμα
- ⊗ Βιολογικές μεμβράνες
- ⊗ Λευκοκύτταρα
- ⊗ Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης

## **2. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια**

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου,

αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.



**Εικόνα 9.** Επίδραση ελευθέρων ριζών στον οργανισμό

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

## 2.1 Λιπίδια

Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο.

Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει  $ROO\cdot$  κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο

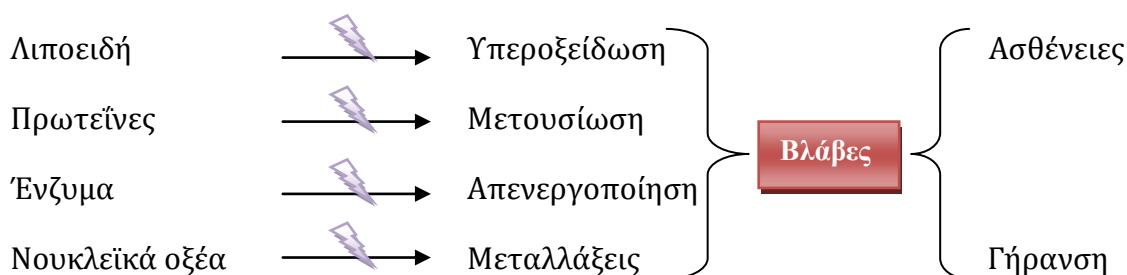
άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (**Halliwell & Gutteridge, 1999**).

## 2.2 Πρωτεΐνες

Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το  $\text{OH}\cdot$ , το  $\text{RO}\cdot$  και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και η καταστροφή τους τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (**Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986**).

## 2.3 DNA

Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (**Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999**).



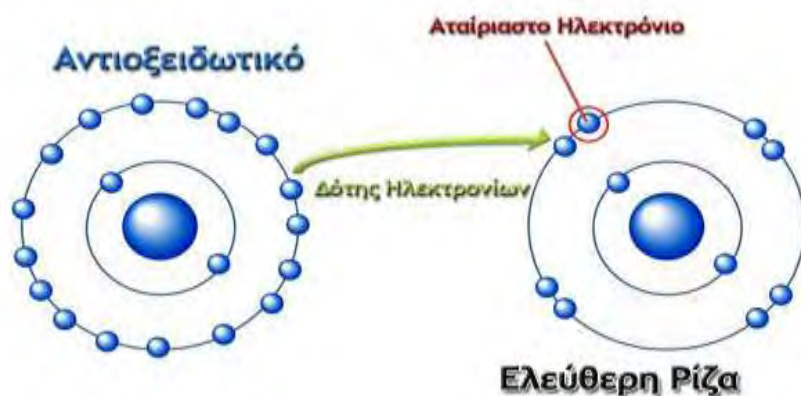
### III. ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

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).

#### 1. Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά παίρνουν μέρος σε μια σειρά από θετικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό, μερικές από τις οποίες αναφέρονται:

- ⊗ Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.
- ⊗ Δρουν καρδιοπροστατευτικά, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των αγγείων, περιορίζοντας τους φλεγμονώδεις παράγοντες, αποτρέποντας την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και συμβάλλοντας στον έλεγχο των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης και της ομοκυστεΐνης.
- ⊗ Ασκούν αντικαρκινική δράση με το να μπλοκάρουν ή να 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.



**Εικόνα 10.** Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων

## 2. Πηγές Αντιοξειδωτικών

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

- ⊗ Βιταμίνη Α: αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαια.
- ⊗ Βιταμίνη C: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, νεράντζια), φραγκοστάφυλα, φράουλες, ακτινίδια, κεράσια, μούρα, πεπόνι, ντομάτα, λάχανο, πράσινη πιπεριά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, σπανάκι), σταυρανθή (μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών) (Χασαπίδου 1996).
- ⊗ Β-καροτένιο: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή, 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, κουμκουάτ, κρεμμύδια, μέλι, μήλα, μπρόκολο, πικρή σοκολάτα, σόγια, σταφύλια, τσάι πράσινο και μαύρο, φασολάκια πράσινα και επίσης στους ανθούς λαχανικών και λουλουδιών και στα φύκια.



**Εικόνα 11.** Τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες

- ⊗ 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 σε μικρότερο βαθμό 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.

### **3. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί**

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

- ⊗ Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών,
- ⊗ Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια και
- ⊗ Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

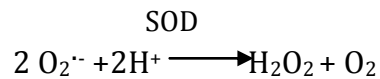
#### **3.1 Ενζυμικοί Μηχανισμοί**

Στους ενζυμικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβάνονται ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).



### 🌍 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

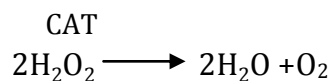
Η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$  :



Το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

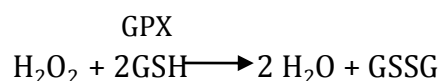
### 🌍 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500 αμινοξέων, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Τα υπεροξειδιοσώματα παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας  $H_2O_2$  (**Antunes et al., 2002**). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$ .



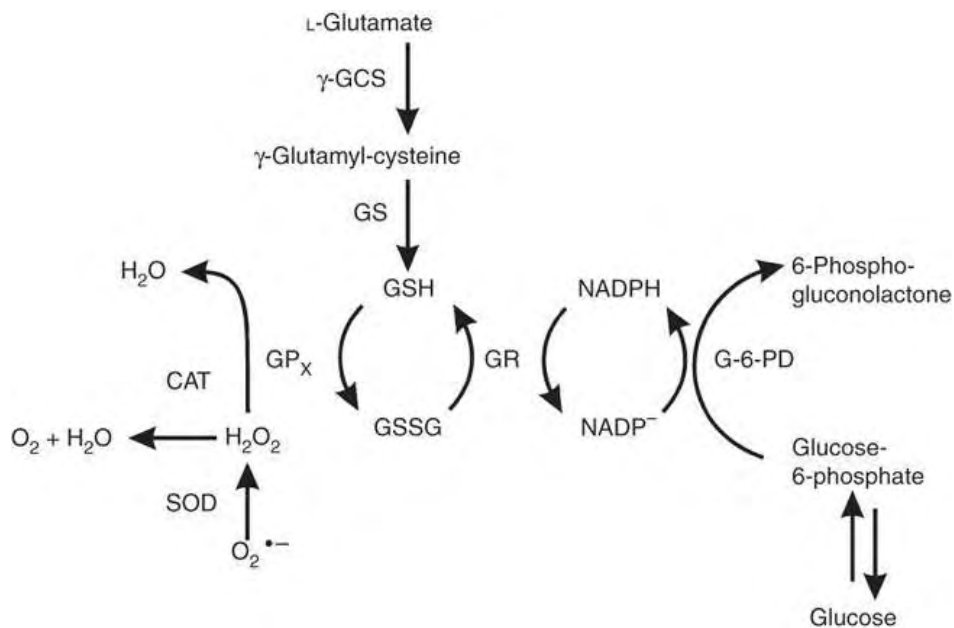
### 🌍 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται: (**Antunes et al., 2002**)



## 🌱 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



Εικόνα 12. Απεικόνιση δράσης των GR, GP<sub>x</sub>, SOD, CAT

## 3.2 Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί

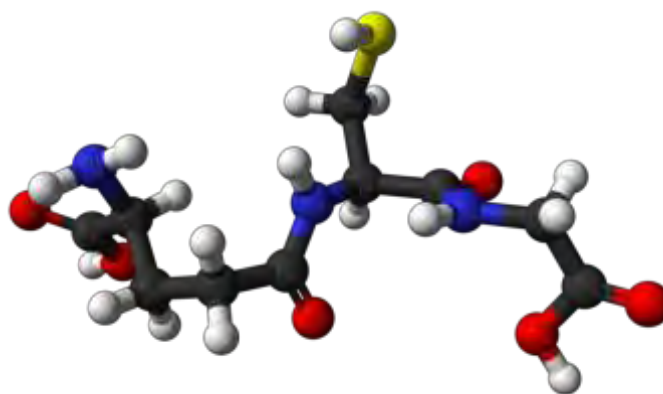
Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, το β-καροτένιο, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

### 🌱 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι

τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος.

Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη. **(Scholz RW et al, 1989)**. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**. 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.



**Εικόνα 13.** Δομή γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ( $\text{ROOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και τις εξωγενείς 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)**.

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 χρησιμοποιείται από πολλά

ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και 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. Σε χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχει 33% μεγαλύτερος κίνδυνος για χρόνια νοσήματα. Στα χρόνια νοσήματα το 77% των ασθενών έχουν ανεπάρκεια γλουταθειόνης. Η κατανάλωση λίπους αυξάνει τις ανάγκες του οργανισμού για γλουταθειόνη. Η αύξηση της γλουταθειόνης με χορήγηση πρόδρομων ουσιών για τη βιοσύνθεση της ή η ενδοφλέβια χορήγηση γλουταθειόνης είναι στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση καταστάσεων όπως ανεπάρκεια του τριπεπτιδίου, υψηλό οξειδωτικό στρες και ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.

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

- ⊗ Μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή.
- ⊗ Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων. Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό, το γαστρεντερικό και οι πνεύμονες.
- ⊗ Παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου.
- ⊗ Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου.
- ⊗ Βοηθά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.
- ⊗ Συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό.
- ⊗ Απομακρύνει υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες.
- ⊗ Βοηθά στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

## Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία. 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 διαίτας. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες κάθε βιταμίνης ποικίλουν όπως ποικίλει και η απαιτούμενη διαιτητική πρόσληψη για κάθε μία. **(Καλογιάννης 2010)**



**Εικόνα 14.** Βιταμίνες στα τρόφιμα

#### ● Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξειδωση **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**.

#### ● Βιταμίνη C

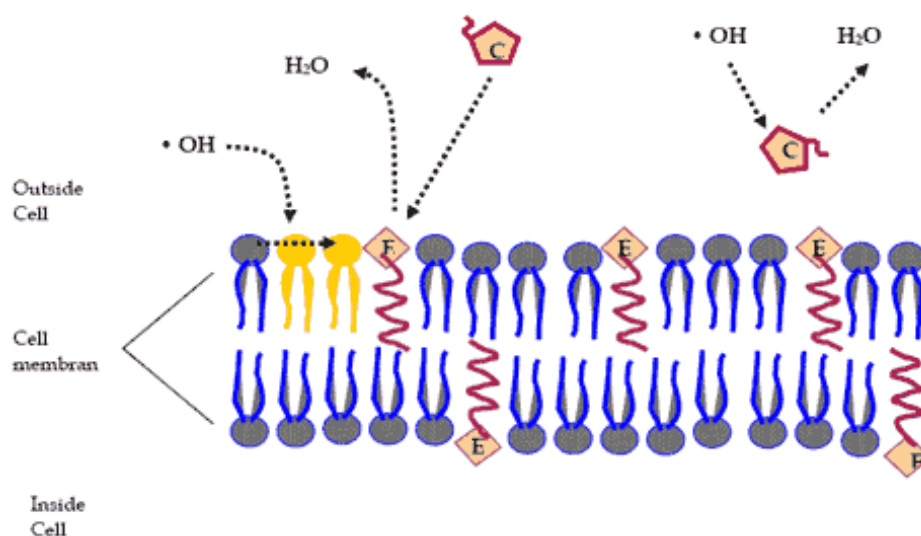
Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**. Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες. Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C. Είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο, ο οποίος δε μπορεί να τη βιοσυνθέσει, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη απουσιάζει.

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα συμπαραγόνα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αυτές αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτινίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι

άκρως απαραίτητες 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 Kimnrite 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 με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από 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 βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται 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 υπεροξείδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (**Παπαγεωργίου 2005**).



**Εικόνα 15.** Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών από τις βιταμίνες E και C

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 **(Suvana Kimnite Wattanapitayakul, 2001)**.

### Β-καροτίνη

Η β-καροτίνη είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Πιστεύεται ακόμα, ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**.

### Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος **(Green & Fraser, 1988)**. Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από τις ROS.

### Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**.

### Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς **(Halliwell & Gutteridge, 1998)**.

## **4. Πολυφαινόλες**

### **4.1 Η δράση των Πολυφαινολών**

Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που συναντάμε ευρέως σε φυτικούς οργανισμούς. Απαντώνται σε όλους τους φυτικούς ιστούς και για αυτό το λόγο τα προσλαμβάνουμε καθημερινά μέσω της διατροφής. Αρκετά φρούτα και λαχανικά είναι πλούσια σε διάφορες πολυφαινόλες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η πολυφαινόλη ρεσβερατρόλη που

βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών και έχει σημαντική χημειοπροστατευτική και αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο ρόλος της αφορά τη μείωση της σύνθεσης των ελεύθερων ριζών, του κινδύνου φλεγμονής και τη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων. Επίδραση ανάλογη της ρεσβερατρόλης, έχουν οι τανίνες και η κερκετίνη που επίσης αποτελούν συστατικά του σταφυλιού.



**Εικόνα 16.** Φρούτα και Λαχανικά πλούσια σε πολυφαινόλες

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

#### 4.2 Κατηγορίες Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες (**Manach et al., 2004**):

- ☉ φλαβονοειδή,
- ☉ πολυφαινολικά οξέα,
- ☉ στιλβένια
- ☉ λιγνάνες

Η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η αποβολή τους διαφέρει μεταξύ των πολυφαινολικών ειδών.

##### ☉ Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των



ενώσεων. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινόλων, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο.



**Εικόνα 17.** Κόκκινο κρασί,πλούσιο σε πολυφαινόλες

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). Τα φλαβονοειδή 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).

Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (**Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cooke and Samman 1996**).

Εν τούτοις, τα φλαβονοειδή δεν είναι αμιγώς αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με βάση την *in vino* 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 αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού **(D. Procházková a 2011)**.

### Φλαβανόλες

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερούκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη.

### Φλαβόνες

Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) **(Shahidi and Naczki 1995)**

### Φλαβονόλες

Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερικίνη, κατατάσσονται επίσης, η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι **(Manach et al., 2004)**.

### Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή **(Tomas-Barberan and Clifford 2000)**.

### Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαΐδζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική 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 ανθοκυανιδίνες οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της 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. 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 φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

## Πολύφαινολικά οξέα

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

## Στιλβένια

Στην 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 την αντιοξειδωτική της δράση, κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Παπαγεωργίου 2005). Τα στιλβένια (π.χ.

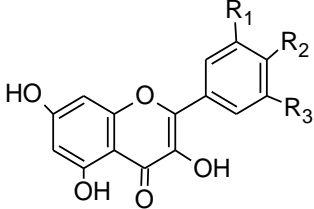
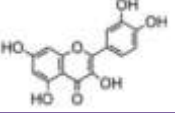
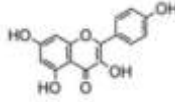
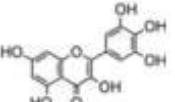
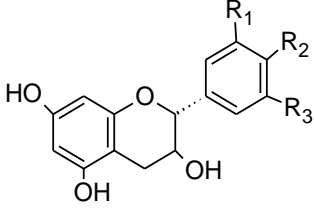
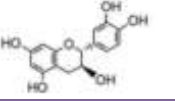
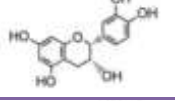
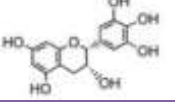
ρεσβερατρόλη, αστριγγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων που προσλαμβάνονται μέσω της δίαιτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (**Bertelli et al., 1998**). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (**Soleas et al., 1997**).

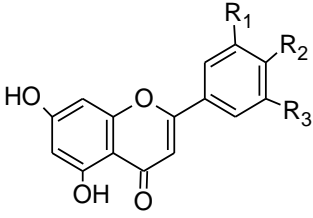
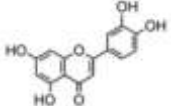
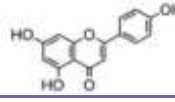
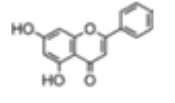
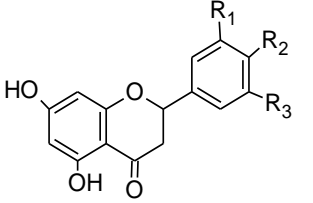
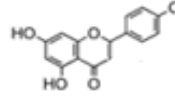
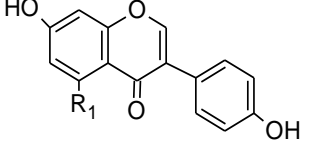
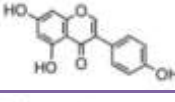
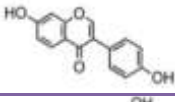
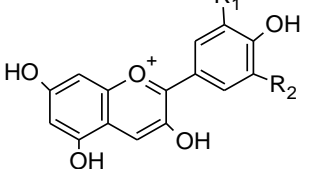
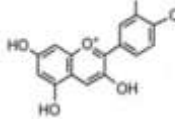
### Λιγνάνες

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, το λινέλαιο και το λιναρόσπορο. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνανών (**Adlercreutz and Mazur 1997**).

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται αναλυτικά η κατηγορία των φλαβονοειδών:

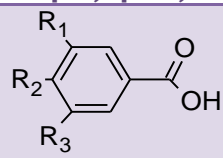
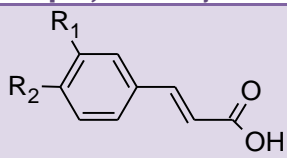
**Πίνακας 2.** Τα φλαβονοειδή

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R <sub>1,2,3</sub> : -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή
<b>Φλαβονόλες</b>		κερκετίνη 
		καιμπφερόλη 
		μυρικετίνη 
<b>Φλαβανόλες</b>		(+)-κατεχίνη 
		(-)-επικατεχίνη 
		επιγαλλοκατεχίνη 

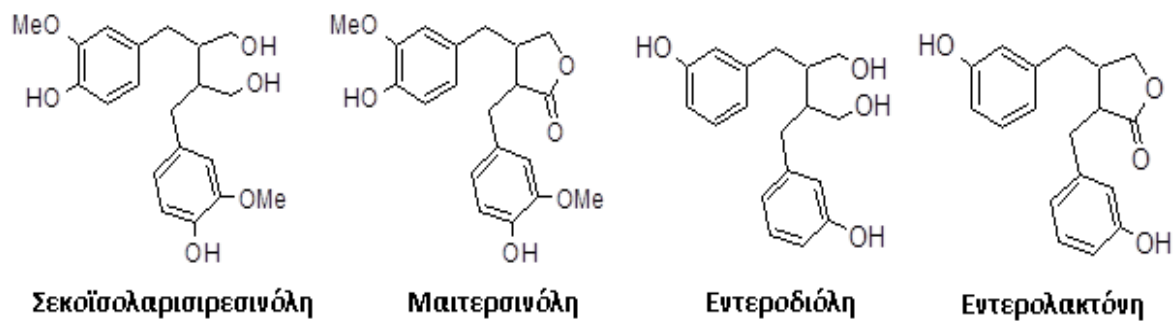
<b>Φλαβόνες</b>		λουτεολίνη	
		απιγενίνη	
		χρυσίνη	
<b>Φλαβανόνες</b>		ναριγενίνη	
<b>Ισοφλαβόνες</b>		γενιστεΐνη	
		ντετζεΐνη	
<b>Ανθοκυανιδίνες</b>		κυανιδίνη	

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

**Πίνακας 3.** Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων

Υδροξυβενζοϊκά οξέα			Υδροξυκινναμικά οξέα		
					
	Γαλλικό οξύ	Πρωτοκατεχοϊκό οξύ		Κουμαρικό οξύ	Καφεϊκό οξύ
<b>R1</b>	OH	OH	<b>R1</b>	OH	OH
<b>R2</b>	OH	OH	<b>R2</b>	-	OH
<b>R3</b>	OH	H			
					<b>Φερουλικό οξύ</b>
					<b>OCH3</b>
					<b>OH</b>

Ακολουθούν παραδείγματα ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των λιγνανών:



**Εικόνα 18.** Ενώσεις όπως η Εντεροδιόλη και η Εντερολακτόνη, ανήκουν στις λιγνάνες

Παρόλο που η σημασία των πολυφαινόλων είναι εξαιρετικά μεγάλη, η αξιολόγηση των φυσιολογικών επιδράσεων συγκεκριμένων φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι εξίσου δύσκολη. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι 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. Αν και έχει διεξαχθεί ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων 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 ομοιοστάση. **(Manach C 2005)**

#### IV. ΣΤΑΦΥΛΙΑ

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 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.

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 στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες, και υπάρχουν κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών, είναι αρμόδιες για το χρώμα των φρούτων και είναι οι σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις στο σπόρο και τη φλούδα των σταφυλιών. Η σάρκα δεν περιέχει ανθοκυανίνες. Τα φλαβονοειδή (π.χ. προ-ανθοκυανίνες) απαντώνται ευρέως στα σταφύλια και ειδικά στις ρόγες σταφυλιού και στους μίσχους. Η ποσότητα, η δομή, και ο βαθμός πολυμερισμού των προ-ανθοκυανινών των σταφυλιών διαφέρει και εξαρτάται κυρίως από τον ιστό του σταφυλιού. Ακόμα, τα σταφύλια είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. **(En-Qin Xia 2010)** Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.



**Εικόνα 19.** Ποικιλίες Σταφυλιών

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

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, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, 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, την παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιπιδίων και την παρεμπόδιση δημιουργίας υπεροξειδίων). Χαρακτηριστικά, ο χυμός του σταφυλιού ασκεί προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον τα εκχυλίσματα σταφυλιού προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες από το οξειδωτικό στρες **(En-Qin Xia 2010)**.

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών 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- και ROO- στο DNA.

Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος μετατοπίστηκε στη διερεύνηση της πιθανής χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από σταφύλια, λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού περιεχομένου τους. Σε παλαιότερα πειράματα ,σε μια σειρά από in vitro και in vivo μελέτες σε διάφορες ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών διερευνήθηκε η δραστικότητα 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 αποτέλεσμα έδειξαν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράση 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 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, 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 τη 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. (Στάγκος Δημήτρης, 2005).



**Εικόνα 20.** Ελληνική ποικιλία σταφυλιών *Vitis vinifera*

Επίσης, *in vivo* και *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών μπορούν να δράσουν αποτρέποντας την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η αντι-μεταλλαξιγόνος 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 και Μανδηλαριά (ποικιλίες με τις οποίες ασχοληθήκαμε και στην παρούσα διπλωματική εργασία), 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. 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 δε μπορεί να αποδοθεί στις πολυφαινόλες, αλλά μάλλον στη συνέργεια πολλών ενώσεων που περιέχονται στα σταφύλια **(Στάγκος Δημήτρης, 2006)**. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί το ευρύτερο νόημα της έννοιας της χημειοπροφύλαξης, η οποία είναι συνιστώσα πολλών παραγόντων που αφορούν και στοχεύουν κυρίως στην πρόληψη με σκοπό την παρεμπόδιση εμφάνισης εκφυλιστικών παθήσεων **(Στάγκος Δημήτρης, 2005)**.

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 Argiris, 2010)**. Οι προανθοκυανιδίνες αναφέρονται ως oligομερείς (μονομερείς, διμερείς, τριμερείς κτλ) 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.

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 μια από τις κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων.



**Εικόνα 21.** Σταφύλια

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, συντελεί στη διούρηση και στην αποβολή τοξινών. Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στο 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 κλασικό 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, τα σάκχαρα, τα 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/Lt ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση  $>100$ mg/Lt 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**).

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.

## **1. Συστατικά Μέρη Σταφυλιών**

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

## 2. **Μοσχόμαυρο** ( Κεντρικής και Βορειοδυτικής Ελλάδας)

Οι ράγες του Μοσχόμαυρου είναι μέσου μεγέθους, σφαιρικές, με φλοιό μέτρια παχύ, ανοικτού ερυθροϊώδους χρωματισμού και σάρκα άχρωμη, μαλακή, γλυκιά και ελαφρά αρωματική, με 2-3 μέτρια γίγαρτα Ξεκινά τη βλάστηση μέσα στο πρώτο δεκαπενθήμερο του Απρίλη και ωριμάζει μετά τα μέσα Σεπτεμβρη. Κάθε καρποφόρα κληματίδα φέρνει 2 σταφύλια, μέτρια ως μεγάλα, 350-400 γρ. κυλινδροκωνικά, πυκνόραγα. .Ποικιλία ζωηρή, παραγωγική, ανθεκτική στην ξηρασία ευαίσθητη στις ασθένειες. Σταφύλια μέτρια φλοιός ερυθροϊώδης. θυμίζει κόκκινα φρούτα, μοσχάτο σταφύλι, φραγκοστάφυλο, ύρτιλα και γαρίφαλο.



**Εικόνα 22.** Ποικιλία Μοσχόμαυρο

Το Μοσχόμαυρο δίνει κρασιά υψηλόβαθμα, καλής οξύτητας, ελαφρά αρωματικά, με μέτριο χρώμα. (η εκτίμηση αυτή στηρίζεται στις παρατηρήσεις σχετικά με την εκχυλισσιμότητα των ανθοκυανών της ποικιλίας από τους φλοιούς η οποία χαρακτηρίζεται από κακή έως μέτρια). Συμμετέχει στην παραγωγή του Τοπικού Οίνου Γρεβενών Τρίκαλα, Καρδίτσα, Κοζάνη Βελβεντού, Θράκης, Καβάλας, Πέλλας καθώς και στην παραγωγή λιαστών κρασιών από τη Σιάτιστα (**Τα βορινά, οίνοι βορείου Ελλάδος «Σεμινάριο γευσιγνωσία γηγενών ποικιλιών που καλλιεργούνται στη Βόρεια Ελλάδα»**).

### 3. Μαυροτράγανο ( Σαντορίνης)

Μέχρι πριν από ελάχιστα χρόνια η ερυθρή ποικιλία με τις μαύρες και τραγανές ρώγες –χαρακτηριστικά από τα οποία παίρνει και το όνομά του το Μαυροτράγανο– συμμετείχε σε γλυκά κρασιά της Σαντορίνης, ενώ παράλληλα κινδύνευε με εξαφάνιση. Σήμερα, έχει γίνει πλέον μια από τις πιο πολυσυζητημένες ποικιλίες για την παραγωγή ερυθρών κρασιών και το μέλλον του Μαυροτράγανου δείχνει πιο ευοίωνα από ποτέ, αφού συνδυάζει εξωτισμό και μοναδικότητα. Χρειάστηκε βέβαια οι οινοπαραγωγοί της Σαντορίνης να ψάξουν κλήμα-κλήμα τα ηφαιστειογενή εδάφη του νησιού, προκειμένου να ξεχωρίσουν και να πολλαπλασιάσουν τα λιγοστά παλαιά φυτά της ποικιλίας Μαυροτράγανο.



**Εικόνα 23.** Ποικιλία Μαυροτράγανο

Το χαρακτηριστικό άρωμα που αναδύεται στα οινοποιεία, θυμίζει ανθώδη εκλεκτό καφέ Λατινικής Αμερικής, καπνό και γλυκά κόκκινα φρούτα. Τέλος, οι ταννίνες του Μαυροτράγανου συμπληρώνουν το πλούσιο, γεμάτο με ορुकτές νότες στόμα των σπάνιων, ασυνήθιστων κρασιών του. **(Τασούλα Επτακοιλη)**

#### 4. Μανδηλαριά (Νησιά Αιγαίου)

Η ποικιλία Μανδηλαριά είναι μια από τις πλέον βαθύχρωμες ελληνικές ποικιλίες αμπέλου. Καλλιεργείται σε Νησιά του Αιγαίου, κυρίως Πάρο, Κρήτη, Εύβοια, λιγότερο στην Αττική και στη Βοιωτία. Είναι ποικιλία ζωηρή, παραγωγική, ευαίσθητη στις ασθένειες και ανθεκτική στην ξηρασία. Τα σταφύλια της είναι μέτρια και ο φλοιός κυανομέλανος. Ο τρύγος πραγματοποιείται στα μέσα Σεπτεμβρίου, ενώ το κρασί που δίνει είναι ερυθρό, σχετικά χαμηλόβαθμο και πλούσιο σε χρώμα και ταννίνες. **(Ελλοίωνων χώρα).**

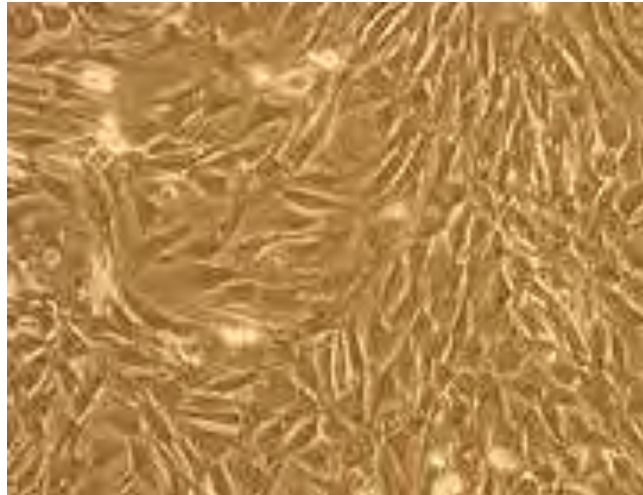


**Εικόνα 24.** Ποικιλία Μανδηλαριά

Από την εποχή του Πausανία, η Μανδηλαριά συμμετείχε ήδη στην παραγωγή του φημισμένου χιώτικου Αριούσιου οίνου. Σήμερα συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό ερυθρών, ροζέ, καθώς και επιδόρπιων κρασιών, αν και τα δείγματα μονοποικιλιακών από Μανδηλαριά είναι σπάνια. Χαρακτηριστικό της ποικιλίας αυτής είναι το βαθύ σκούρο χρώμα, τα αρώματα υπερώριμων φρούτων, τα ζωικά αρώματα (π.χ. δέρματος) και το μέτριο σώμα, με ατίθασες και στιβαρές ταννίνες.

## V. ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ C2C12

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά κύτταρα της μυϊκής κυτταρικής σειράς ποντικού C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ ποντικών μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe και Saxel, 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



**Εικόνα 25.** C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο



## ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### I. Καλλιέργεια Μυϊκής Κυτταρικής Σειράς Ποντικού C2C12

#### 1. Υλικά καλλιέργειας

☉ Θρεπτικό υλικό:

☉ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966), περιέχει βιταμίνες, αμινοξέα, γλυκόζη, σίδηρο και κόκκινο της φαινόλης και είναι κατάλληλο για κύτταρα ποντικού και ανθρώπου.

☉ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed).

☉ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco).

☉ Fetal Bovine Serum, FBS (Biochrom KG Seromed) ορός βοδινού αίματος.

\*Η προσθήκη εκχυλισμάτων στα κύτταρα, έγινε με θρεπτικό υλικό χωρίς FBS.

☉ Τρυψίνη 0.25% (Gibco), χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κυττάρων της καλλιέργειας.

☉ PBS, pH 7,3 (Phosphate Buffer Saline 1x) (Gibco), αλατούχο διάλυμα για τη ρύθμιση φωσφορικών, καθώς περιέχει φωσφορικά και ιόντα καλίου, σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου. Χρησιμοποιείται για ξέπλυμα ύστερα από αφαίρεση παλιού θρεπτικού υλικού κατά τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας (split).

☉ Αιθανόλη 70%, απαραίτητη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για αποστείρωση του χώρου εργασίας και των υλικών.

#### 2. Διαδικασία Καλλιέργειας

Τα μυϊκά κύτταρα ποντικού (C2C12) αναπτύχθηκαν σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό 10 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 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 αυτά. Τότε κάναμε επανακαλλιέργεια των κυττάρων 1:5 (split), με αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με PBS, αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1mL τρυψίνης 0,25%. Ακολούθησε 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 πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow) με φως, αέρα και UV για αποστείρωση του χώρου εργασίας όταν δε χρησιμοποιούταν.

## II. Σύσταση Σταφυλιών

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από βόστρυχους σταφυλιών από τις ποικιλίες Μοσχόμαυρο, Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο. Η σύστασή τους, όπως μας στάλθηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 4.** Σύσταση του εκχυλίσματος σταφυλιών

Εκχυλίσματα	ΜαυρB	ΜανδB	ΜοσχB
Γαλλικό οξύ	11,48	26,96	7,39
Συριγγικό οξύ	17,44	13,60	15,98
Καφεϊκό οξύ	0,54	2,32	0,64
Κατεχίνη	12,18	12,49	8,49
Επικατεχίνη	19,13	9,83	12,63
π-κουμαρικό οξύ	0,75	1,31	0,60
Φερουλικό οξύ	3,59	4,10	0,97
Ρουτίνη	15,93	12,06	14,81
trans-ρεσβερατρόλη	9,09	21,43	5,97
Κερκετίνη	3,94	17,33	8,01
Καμφερόλη	0,74	3,63	1,83
Άθροισμα	94,81	125,06	77,32

### III. Πειραματικές Μέθοδοι

Οι πειραματικές μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν in vitro είναι:

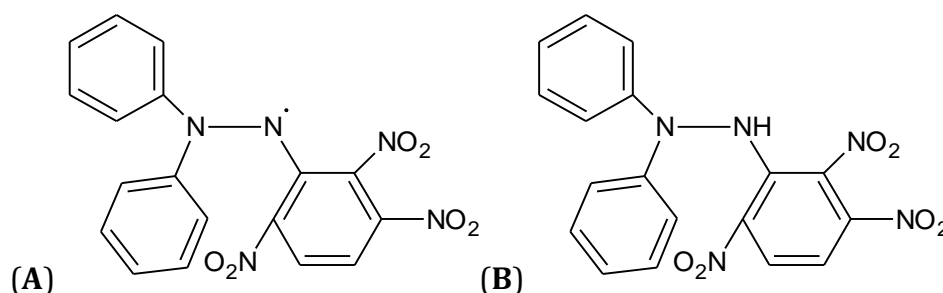
- ☉ Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο).
- ☉ Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS, (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid).
- ☉ Ο προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης των εκχυλισμάτων, Reducing Power, που βασίζεται στην ικανότητά τους για μεταφορά ηλεκτρονίων.
- ☉ Η μέθοδος XTT, μια χρωματομετρική δοκιμή για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων.
- ☉ Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων.
- ☉ Η μέθοδος προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων στα μυϊκά κύτταρα, Bradford.
- ☉ Ο προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS στα κύτταρα.
- ☉ Ο προσδιορισμός των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που αποτελούν ένα γενικό δείκτη της οξείδωσης των πρωτεϊνών.
- ☉ Τέλος, η Κυτταρομετρία Ροής, για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες, της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

#### 1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) **(Εικόνα 26Α)**.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο).

Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστέθηκαν τα εκχυλίσματά μας (ουσίες με αντιοξειδωτική δράση), η ρίζα DPPH ανάχθηκε με την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός ηλεκτρονίου) και μετατράπηκε σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (**Εικόνα 26B**), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα την ελάττωση της οπτικής απορρόφησης. Το ποσοστό αναγωγής της ρίζας DPPH, μας οδήγησε στην εκτίμηση του ποσοστού της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.



**Εικόνα 26 A.** Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•).  
**B.** Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

## Προετοιμασία Διαλυμάτων

### 1. Διάλυμα DPPH (stock 2mM)

- ☉ Σε 3,683mL μεθανόλης προσθέσαμε 2,9mg DPPH σε ποτήρι ζέσεως.
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση με μαγνητάκι για 20 λεπτά.
- ☉ Έπειτα από τη διάλυση, καλύψαμε το ποτήρι ζέσεως με αλουμινόχαρτο διότι το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

### 2. Διαλύματα stock εκχυλισμάτων και αραιώσεών τους

- ☉ Ζυγίζω ποσότητες των εκχυλισμάτων και τα διαλύω σε μεθανόλη για να φτιάξω τα stock
- ☉ Φτιάχνω αραιώσεις συγκεντρώσεων 80, 40, 20, 10, 5 mg/mL.

## Πειραματική Διαδικασία

- ☉ Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

	Blank	Control	C1	C2	C3	C4	C5(mg/mL)
Μεθανόλη	1000	950	900	900	900	900	900 (μL)
Εκχύλισμα		50	50	50	50	50	50(μL)
DPPH		50	50	50	50	50	50(μL)
Βτελικό	1	1	1	1	1	1	1(mL)

\*Τρεις επαναλήψεις για το control (θετικός μάρτυρας) και τις συγκεντρώσεις.

\*Ένα blank (τυφλό).

- ☉ Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη, χωρίς ρίζα DPPH:

	C1=80	C2=40	C3=20	C4=10	C5=5 (mg/mL)
Μεθανόλη	950	950	950	950	950 (μL)
Εκχύλισμα	50	50	50	50	50(μL)
Βτελικό	1	1	1	1	1(mL)

\*Δύο επαναλήψεις.

- ☉ Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex.
- ☉ Επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι στους 25<sup>0</sup>C (DPPH φωτοευαίσθητο).
- ☉ Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex.
- ☉ Τέλος, μετρήσαμε την απορρόφηση φασματοφωτομετρικά στα 517nm σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Μηδενισμός με το Blank.

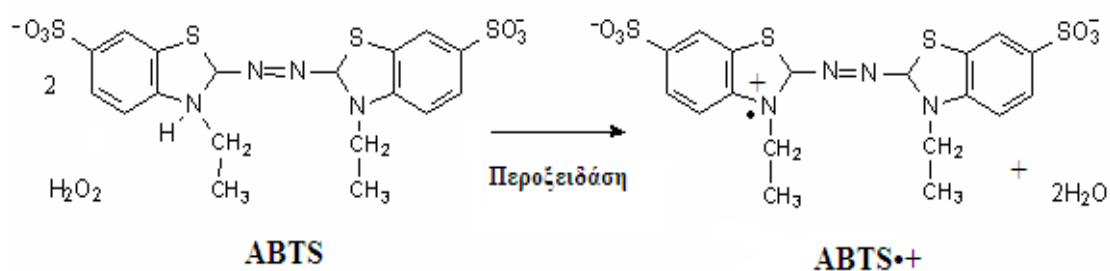
**(Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας, Κουρετας Δ., Σταγκος Δ.)**

## **2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+**

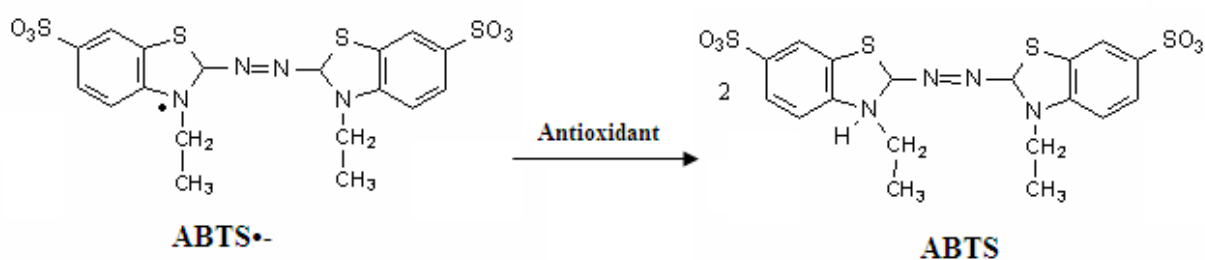
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS•+. Η ρίζα του ABTS•+ παράχθηκε από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, προηγήθηκε ο σχηματισμός της ρίζας (**Εικόνα 27**) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η επώαση τους με αυτή.

Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστέθηκαν τα εκχυλίσματά μας (ουσίες με αντιοξειδωτική δράση), τότε η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> ανάχθηκε με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα την ελάττωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm(**Εικόνα 28**).



**Εικόνα 27:** Παραγωγή της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup> μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Εικόνα 28:** Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με τη ρίζα του ABTS<sup>•+</sup>

## Προετοιμασία Διαλυμάτων

### 1. ABTS (1 mM τελική συγκέντρωση)

ABTS MW: 548.68

- ⊗ Σε 40mL νερού προσθέσαμε 43,88mg ABTS σε ποτήρι ζέσεως.
- ⊗ Ακολούθησε ανάδευση.
- ⊗ Έπειτα από τη διάλυση, καλύψαμε το ποτήρι ζέσεως με αλουμινοχαρτό διότι το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.
- ⊗ Τέλος, το διατηρήσαμε στον πάγο.

## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 μM τελική συγκέντρωση)

- ☉ Από το stock διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% 8.8 M αραιώσαμε με H<sub>2</sub>O ώστε να φτιάξουμε διάλυμα 600 μM.
- ☉ Πρώτη αραιώση 1/100: 10μL stock 30% και 990μL H<sub>2</sub>O.
- ☉ Δεύτερη αραιώση 1/146: 68μL από την πρώτη αραιώση και 9860μL H<sub>2</sub>O.
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση.
- ☉ Έπειτα, το καλύψαμε με αλουμινόχαρτο διότι είναι φωτοευαίσθητο.
- ☉ Τέλος, διατηρήσαμε το διάλυμα στον πάγο.

## 3. HRP (5 μg/ml)

- ☉ Σε διάλυμα HRP 0,1 μg/ml, κάναμε αραιώση 1/20: 200μL stock και 3800μL H<sub>2</sub>O.
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση.
- ☉ Έπειτα, το καλύψαμε με αλουμινόχαρτο διότι είναι φωτοευαίσθητο.
- ☉ Τέλος, διατηρήσαμε το διάλυμα στον πάγο.

## 4. Αραιώσεις εξεταζόμενου εκχυλίσματος από το αντίστοιχο αρχικό διάλυμα σε μεθανόλη

- ☉ Φτιάχνω αραιώσεις συγκεντρώσεων 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL.

## Πειραματική Διαδικασία

- ☉ Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

	Blank	Control	C1=10	C2=5	C3=2,5	C4=1,25	C5=0,625 (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	450	400	400	400	400	400	400 (μL)
ABTS	500	500	500	500	500	500	500(μL)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	50	50	50	50	50	50(μL)
HRP		50	50	50	50	50	50(μL)
Ντελικό	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 (mL)
Εκχύλισμα			10	10	10	10	10(μL)

\*Τρεις επαναλήψεις για το control (θετικός μάρτυρας) και τις συγκεντρώσεις.

\*Ένα blank (τυφλό).

- ☉ Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης, χωρίς την παρουσία ενζύμου HRP:

	Blank	C1=10	C2=5	C3=2,5	C4=1,25	C5=0,625 (mg/mL)
H <sub>2</sub> O	450	450	450	450	450	450 (μL)
ABTS	500	500	500	500	500	500(μL)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	50	50	50	50	50(μL)
Βτελικό	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 (mL)
Εκχύλισμα		10	10	10	10	10(μL)

\*Τρεις επαναλήψεις.

- ☉ Πρώτα προσθέσαμε τα αντιδραστήρια όπως αναγράφονται στους πίνακες, εκτός από τα εκχυλίσματα.
- ☉ Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex.
- ☉ Επώαση για 45 λεπτά στο σκοτάδι στους 25°C, (ABTS φωτοευαίσθητο).
- ☉ Τελευταία προσθέσαμε τα εκχυλίσματα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που αναγράφονται.
- ☉ Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex.
- ☉ Τέλος, μετρήσαμε την απορρόφηση φασματοφωτομετρικά στα 730nm σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml.

**(Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας, Κουρετας Δ., Σταγκος Δ.)**

### 3. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης Reducing Power

Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Yen & Duh (1994). Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων σχετίζεται με την ικανότητά τους για μεταφορά ηλεκτρονίων και αποτέλεσε ένα σημαντικό δείκτη της ενδεχόμενης αντιοξειδωτικής δράσης τους.

Ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα (στην προκειμένη περίπτωση τα εκχυλίσματα σταφυλιών), αντιδρούν με το Fe<sup>3+</sup> και τον ανάγουν σε Fe<sup>2+</sup>, όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

antioxidant

Potassium ferricyanide + Ferric chloride Potassium → ferrocyanide + Ferrous chloride



## Υλικά

Potassium ferricyanide 1% w/v, sodium phosphate buffer (0,2 M, pH 6.6), trichloroacetic acid 10%, ferric chloride 0.1% w/v, ascorbic acid 1%.

## Προετοιμασία Διαλυμάτων

### 1. 0.2M Phosphate buffer pH 6.6

- ⊗ 0.2M Monobasic stock  
Διαλύσαμε 13.90g sodium phosphate monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) σε 500 ml απιονισμένου νερού.
- ⊗ 0.2M Dibasic stock  
Διαλύσαμε 26,825 g sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500 ml απιονισμένου νερού.
- ⊗ Στη συνέχεια προσθέσαμε 62,50 ml 0.2M monobasic stock και 37,50 ml 0.2M dibasic stock σε 100 ml απιονισμένου νερού για τελικό όγκο 200 ml.
- ⊗ Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 6.6.

### 2. Potassium ferricyanide (1% w/v)

- ⊗ Διαλύσαμε 2g σε 200ml απιονισμένου νερού.
- ⊗ Τυλίξαμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

### 3. Ferric chloride (0.1 % w/v)

- ⊗ Διαλύσαμε 0,1 g σε 100 ml απιονισμένου νερού.
- ⊗ Τυλίξαμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

### 4. Trichloroacetic acid (10% w/v)

- ⊗ Διαλύσαμε 50 g TCA σε 500 ml απιονισμένου νερού.

### 5. Ascorbic acid 1%

- ⊗ Ascorbic acid σε 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη καμπύλη.

## Πειραματική Διαδικασία

- ⊗ Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

	Blank	Control	C1=10	C2=5	C3=2,5	C4=1,25 (mg/mL)
<b>Εκχύλισμα Phosphate buffer</b>			2,5	2,5	2,5	2,5 (mL)
<b>Potassium ferricyanide</b>	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5(mL)
		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5(mL)

\*Τρεις επαναλήψεις για το control, τις συγκεντρώσεις και το blank.

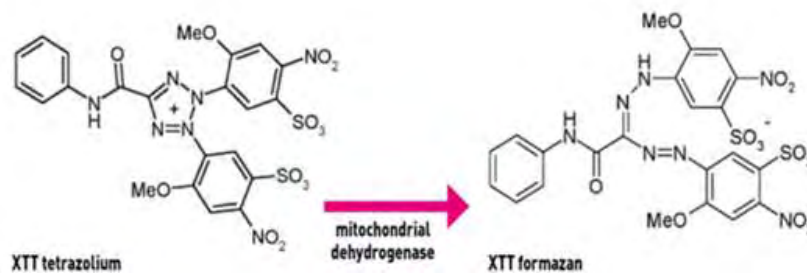
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση.
- ☉ Στη συνέχεια επώασαμε σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.
- ☉ Κρυώσαμε τα δείγματά μας
- ☉ Προσθέσαμε 2.5 ml TCA 10% σε όλα
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση.
- ☉ Έπειτα απομονώσαμε σε νέα eppendorfs 2,5mL από το κάθε διάλυμα και φυγοκεντρήσαμε στα 3000 rpm για 10 λεπτά.
- ☉ Στο υπερκείμενο (2.5 ml) προσθέσαμε 2.5 ml απιονισμένου νερού και 0.5 ml ferric chloride 0.1 %.
- ☉ Ακολούθησε ανάδευση.
- ☉ Τέλος, αφήσαμε για 10 λεπτά και φωτομετρήσαμε στα 700 nm.

Παράλληλα: Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για τον έλεγχο της απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης, με τη διαφορά ότι δεν προστέθηκε Potassium ferricyanide.

#### 4. Μέθοδος XTT

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής επίδρασης των εκχυλισμάτων στα μυϊκά κύτταρα ποντικού (C2C12) χρησιμοποιήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche για να προσδιοριστεί η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων.

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμωνιακού 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 τετραμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



**Εικόνα 29.** Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

### Πειραματική Διαδικασία

- ☉ Τα κύτταρά μας είχαν καλύψει το 70-80% της φλάσκας 75cm<sup>2</sup>. Μετά την αποκόλλησή τους με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS σε falcon, πραγματοποιήθηκε μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.
- ☉ Στη συνέχεια, προσθέσαμε 10.000 κύτταρα/θέση σε «πιάτα» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προσθέταμε 150μL θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C, σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας.
- ☉ Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθούσε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα εκχυλίσματα) και μια στήλη με κύτταρα, με θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, χωρίς όμως εκχύλισμα. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων ή μόνο θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, χωρίς όμως να περιέχουν κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Ο συνολικός όγκος που είχαν τα πηγαδάκια ήταν 100 μl.
- ☉ Επόμενο βήμα ήταν η επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.
- ☉ Ύστερα, προσθέσαμε 50 μl από το αντιδραστήριο ΧΤΤ σε κάθε θέση των 96-well plates και ακολούθησε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο ΧΤΤ πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των

αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του.

- ☉ Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).
- ☉ Η εξέταση των εκχυλισμάτων έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε σε τριπλά δείγματα.



**Εικόνα 30.** 96-well plates για τη μέθοδο XTT

## **5. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu**

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) **(Vermeris & Nicholson, 2006; Singleton & Rossi, 1965)**.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων (P2W18O62-7 → H4P2W18O62-8, H2P2Mo18O62-6 → H6P2Mo18O62-7).

Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου - βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και

αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων ενώ δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

### Πειραματική Διαδικασία

- ☉ Σε σωληνάρια falcon των 15 mL προστίθενται απιονισμένο νερό όγκου 5 mL και 100  $\mu\text{L}$  του προς εξέταση δείγματος, φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος.
- ☉ Στο τυφλό προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  απιονισμένου  $\text{H}_2\text{O}$ . Στην συνέχεια προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου FC.
- ☉ Τα δείγματα ανακινούνται και μετά την πάροδο 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 1,4 mL διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  25% w/v. Το μίγμα ανακινείται.
- ☉ Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου στα 10 mL με απιονισμένο νερό. Το μίγμα ανακινείται ξανά και επώάζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
- ☉ Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάζεται εις τριπλούν.
- ☉ Εξετάζουμε ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

\*Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές σε 3 συγκεντρώσεις.

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα χρειάστηκαν αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης.

### Συλλογή κυττάρων για προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες .

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση των μεθόδων Bradford, TBARS και Καρβονυλίων και περιελάμβανε τα εξής βήματα:

- Ⓜ Προσθήκη θρεπτικού υλικού χωρίς FBS με τα εκχυλίσματα αλλά και χωρίς εκχύλισμα για δημιουργία control, στα κύτταρα και επώση για 24 ώρες στις κατάλληλες συνθήκες.
- Ⓜ Συλλογή των κυττάρων σε falcon για φυγοκέντρηση στα 300g, για 5 λεπτά στους 4°C.
- Ⓜ Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα δυο φορές με PBS.
- Ⓜ Έπειτα προκαλέσαμε διάρρηξη των κυττάρων με sonicator και συλλέξαμε το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το κυτταροπλασματικό ελαιώρημα με το οποίο δουλέψαμε στις επόμενες τρεις μεθόδους.

## 6. Μέθοδος Bradford

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πολυφαινολών των κυτταρικών ελαιωρημάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

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

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

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.

Στο πείραμά μας, για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των κυτταρικών ελαιωρημάτων, προσθέσαμε 20 μL κάθε φορά από τα κυτταρικά ελαιωρήματα και 20 μL PBS για το Blank, σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Στη συνέχεια, κάναμε επώση για 15 λεπτά στο σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 595 nm. Ακολούθησε αντιστοίχιση της τιμής

οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

Η διαδικασία Bradford πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στα κύτταρα, για να ακολουθήσει ο προσδιορισμός TBARS και Καρβονυλίων.

## 7. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

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

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεΰδης 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

- ☉ Σε 400μL κυτταρικού αιωρήματος (με εκχυλίσματα και control) και σε 400μl PBS για το τυφλό
- ☉ Προστέθηκαν 500μL Tris-HCL (200mM, pH 7.4) και 500μL TCA 35%
- ☉ Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ☉ Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M)-TBA (55mM)
- ☉ Τα δείγματα επώαστηκαν στους 90°C για 30 λεπτά.
- ☉ Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά
- ☉ Προστέθηκε 1 mL TCA 70% τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000g για 5 λεπτά, στους 25°C
- ☉ Τέλος, η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου έγινε με αέρα.
- ☉ Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

\*Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

## 8. Προσδιορισμός Καρβονυλίων

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

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

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

### Αντιδραστήρια

#### 1. Διάλυμα HCl 2.5 N

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

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

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

Για την παρασκευή 100 mL 14 mM DNPH διαλύσαμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Μόλις το ετοιμάσαμε το καλύψαμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτήθηκαν 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάξαμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.



### 3. Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

Για την παρασκευή 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίστηκε με 2N HCl), διαλύσαμε 30 g ουρίας in  $\approx$ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέραμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό.

#### Πειραματική Διαδικασία

- Ⓜ Σε 300  $\mu$ L κυτταρικού εναιωρήματος προσθέσαμε 200  $\mu$ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύσαμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του). Το 20% TCA προστέθηκε με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών των κυττάρων. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.
- Ⓜ Επώασαμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρήσαμε στα 16.000 g για 8 λεπτά στους 4 °C και απομακρύναμε το υπερκείμενο.
- Ⓜ Προσθέσαμε στο ίζημα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα και 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά. Χρειάστηκε να διαλύσουμε με την πιπέτα το ίζημα. Αναδεύσαμε και επώασαμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά.
- Ⓜ Φυγοκεντρήσαμε στα 16.000 g για 8 λεπτά στους 4 °C και απομακρύναμε το υπερκείμενο.
- Ⓜ Προσθέσαμε 1 mL του 10% TCA, (ανάδευση και διάλυση του ιζήματος με την πιπέτα όπου χρειάστηκε) και φυγοκεντρήσαμε στα 16.000 g για 8 λεπτά στους 4 °C.
- Ⓜ Απομακρύναμε το υπερκείμενο. Και προσθέσαμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάναμε vortex και φυγοκεντρήσαμε στα 16.000 g για 8 λεπτά στους 4 °C. ( το βήμα αυτό έγινε εις τριπλούν για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει).
- Ⓜ Απομακρύναμε το υπερκείμενο. Προσθέσαμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύσαμε και επώασαμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους, διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς.
- Ⓜ Φυγοκεντρήσαμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.

- ☉ Τέλος, μεταφέραμε με την πιπέτα 900  $\mu\text{L}$  σε μία κυψελίδα και μετρήσαμε την απορρόφηση στα 375 nm.

## 9. Κυτταρομετρία Ροής

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που χρησιμοποιήσαμε για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας είναι η Κυτταρομετρία Ροής (Flow cytometry or 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 κυτταρομετρίας ροής στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητά της να αναλύει πολυπαραμετρικά, με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται (**Shapiro, 2003**).

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



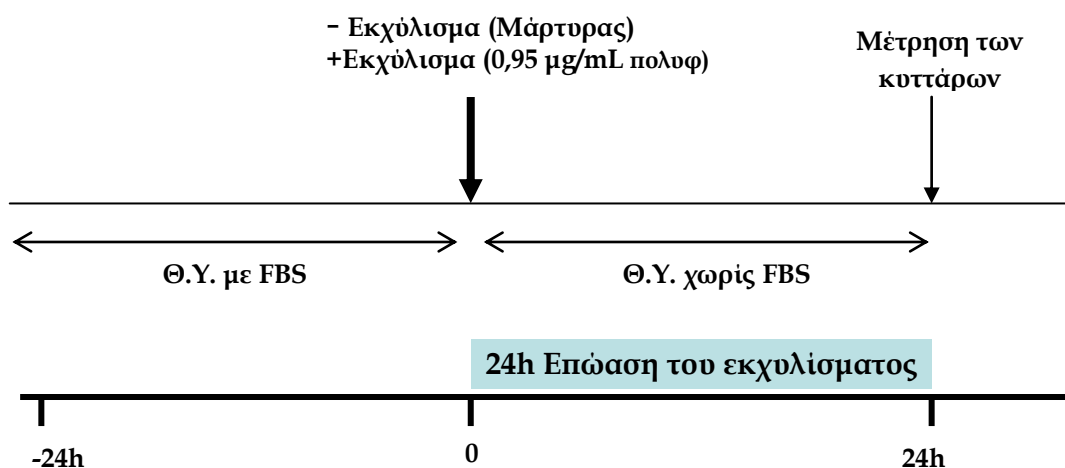
**Εικόνα 31.** Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

Όσον αφορά την αρχή της μεθόδου, μια δέσμη φωτός (συνήθως η δέσμη είναι laser) 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. Ένα

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

### Πειραματική Διαδικασία

Η διαδικασία είναι δυνατόν να διαχωριστεί σε δυο μέρη, με το πρώτο να αφορά την καλλιέργεια των κυττάρων και το δεύτερο την ανάλυση. Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 32.** Πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων C2C12. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό με FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή θρεπτικού υλικού στις 24 h σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS και την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη μέτρηση των κυττάρων.

#### Υλικά

- Ⓢ 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)

## Καλλιέργεια κυττάρων

- ☉ Τα κύτταρα εφόσον τοποθετήθηκαν στις φλάσκες 25cm<sup>2</sup>, επώαστηκαν για 24 h σε θρεπτικό υλικό με FBS (4 mL).
- ☉ Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, αφαιρέσαμε το θρεπτικό υλικό και προσθέσαμε καινούργιο, ίδιας ποσότητας χωρίς FBS αυτήν τη φορά με τα εκχυλίσματά μας διαλυμένα σε αυτό. (Στη φλάσκα μάρτυρα, τοποθετήσαμε απλά το θρεπτικό υλικό χωρίς το FBS). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h
- ☉ Με το πέρας της επώασης των κυττάρων ακολούθησε αποκόλλησή τους και επαναιώρηση τους σε 4 mL θρεπτικού υλικού με FBS σε falcon για φυγοκέντρηση κάτω από συνθήκες 300 g στους 5°C, για 5 λεπτά.
- ☉ Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε ίση ποσότητα διαλύματος PBS και ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- ☉ Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν εκ νέου 2 mL PBS.
- ☉ Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα σωληνάκια και επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 5°C, για 10 λεπτά. και ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- ☉ Έπειτα προσθέσαμε 150 μL PBS και 15 μL χρωστικής DCF, για τον προσδιορισμό των ROS, ενώ για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης, προσθέσαμε 15 μL χρωστικής Mercury Orange. Χρησιμοποιήθηκαν και γυάλινα σωληνάκια χωρίς προσθήκη χρωστικής
- ☉ Τα δείγματα επώαστηκαν σε συνθήκες ανάπτυξης για 30 min και στην συνέχεια προσθέσαμε 250 μL PBS.
- ☉ Τέλος, φυγοκεντρήσαμε στα 300 g, στους 5°C, για 10 λεπτά και απομακρύναμε το υπερκείμενο εκ νέου, για να προσθέσουμε 400 μL PBS και να προχωρήσουμε στη μέτρηση.

\*Η δράση κάθε εκχυλίσματος εξετάστηκε τέσσερις φορές.

## IV. Αποτελέσματα

### 1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH

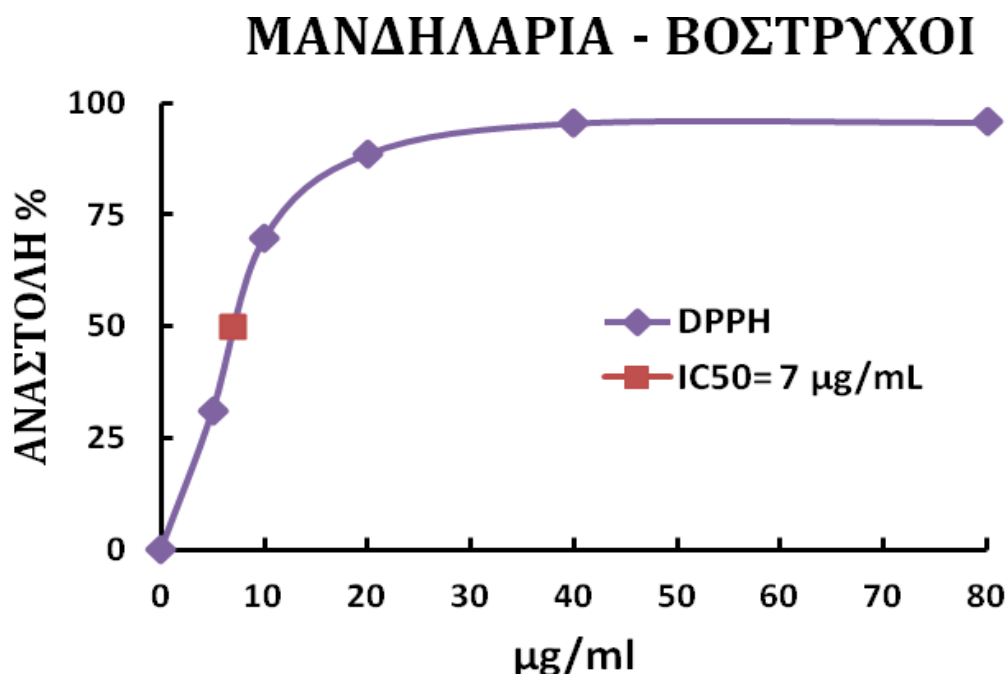
Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

% αναστολή =  $(A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$ , όπου:

$A_0$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

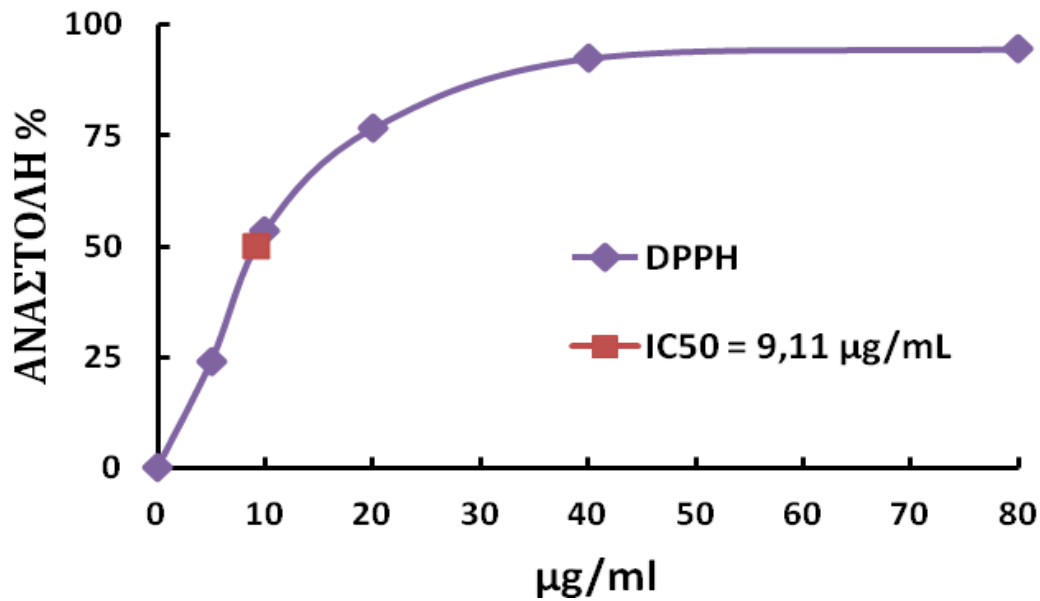
$A_\delta$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, υπολογίσαμε την % αναστολή και φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα εκχυλίσματά μας, με τον άξονα των y να δείχνει την % αναστολή και τον άξονα των x με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:



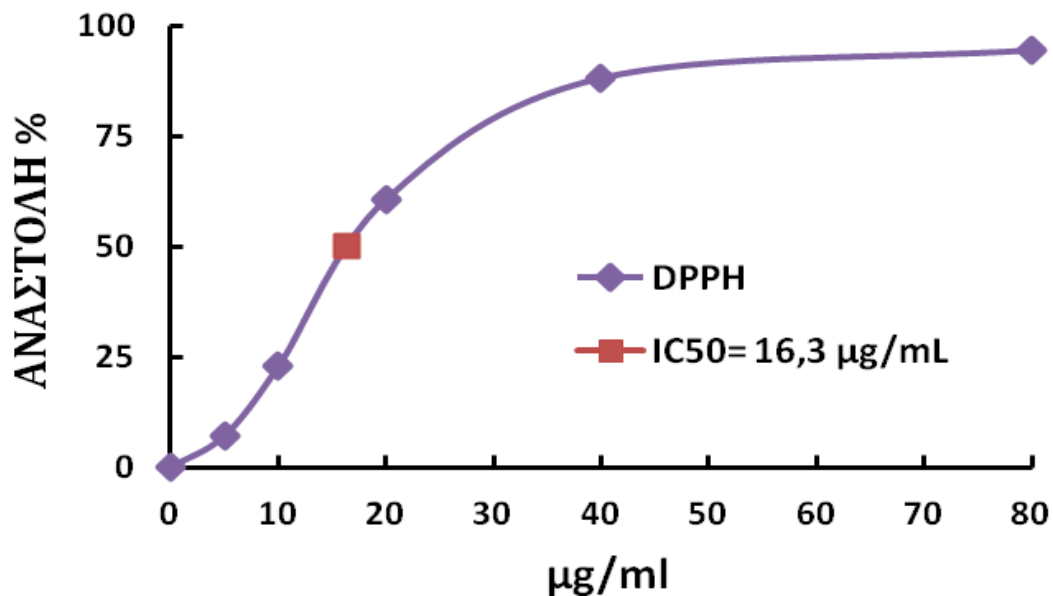
**Διάγραμμα 1.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας DPPH στον άξονα των y με τις διάφορες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 40 και 80 µg/mL) των βόστρυχων Μανδηλαριάς στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα (IC50 = 7 µg/mL).

## ΜΑΥΡΟΤΡΑΓΑΝΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 2.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας DPPH στον άξονα των y με τις διάφορες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 40 και 80 µg/mL) των βόστρυχων Μαυροτράγανου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα (IC50 = 9,11 µg/mL).

## ΜΟΣΧΟΜΑΥΡΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 3.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας DPPH στον άξονα των y με τις διάφορες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 40 και 80  $\mu\text{g/mL}$ ) των βόστρυχων Μοσχόμαυρου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα ( $\text{IC}_{50} = 16,3 \mu\text{g/mL}$ ).

Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα τρία εκχυλίσματά μας. Αυτό που μας ενδιέφερε να βρούμε μέσα από αυτά τα διαγράμματα είναι το  $\text{IC}_{50}$ , δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που ανέστειλε/εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα. Συγκεκριμένα, αυτό προέκυψε από τις καμπύλες μας, με αντικατάσταση του y με 50. Επομένως το  $\text{IC}_{50}$  είναι η τιμή του x στο 50%.

Όσο μεγαλύτερη είναι η μείωση της απορρόφησης, τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Αφού το  $\text{IC}_{50}$  είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει/εξουδετερώνει κατά 50% τη ρίζα, συμπεράναμε ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, (άρα και το  $\text{IC}_{50}$ ), τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, καθώς μπορεί να αναστείλει τη ρίζα στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωσή του.

Εκχύλισμα	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Μοσχόμαυρο Βόστρυχοι	16,3
Μανδηλαριά Βόστρυχοι	7
Μαυροτράγανο Βόστρυχοι	9,11

Κατά συνέπεια, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο πείραμα οι **Βόστρυχοι Μανδηλαριάς** έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Οι **Βόστρυχοι Μοσχόμαυρου** φαίνεται να έχουν την πιο ήπια αντιοξειδωτική δράση.

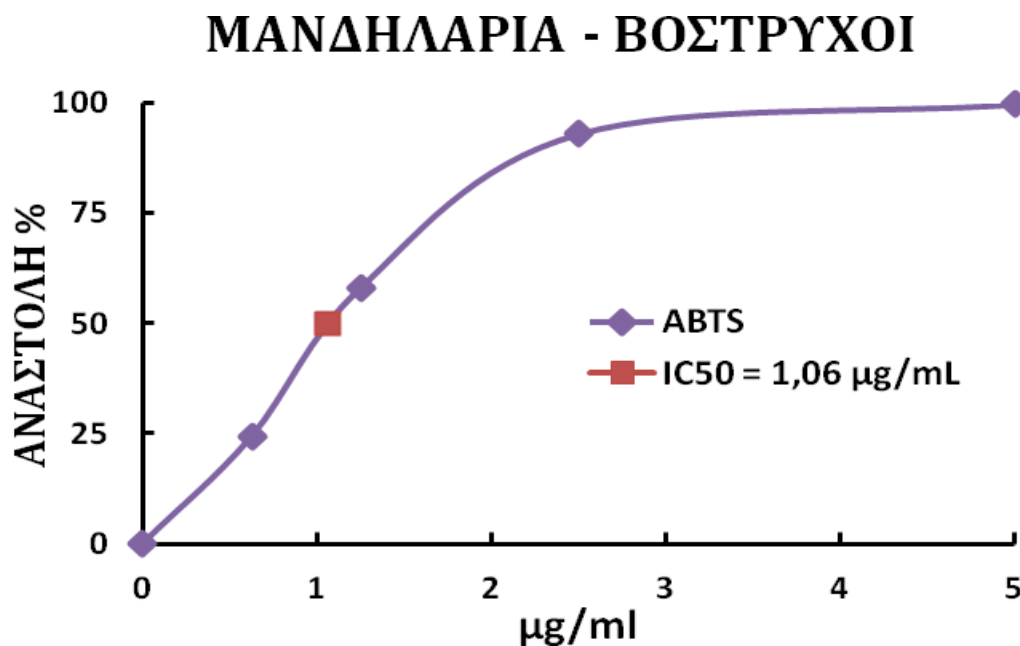
## 2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

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

Με: RSC (radical scavenging capacity) και απορρόφηση control: η απορρόφηση που έχει η ελεύθερη ρίζα από μόνη της.

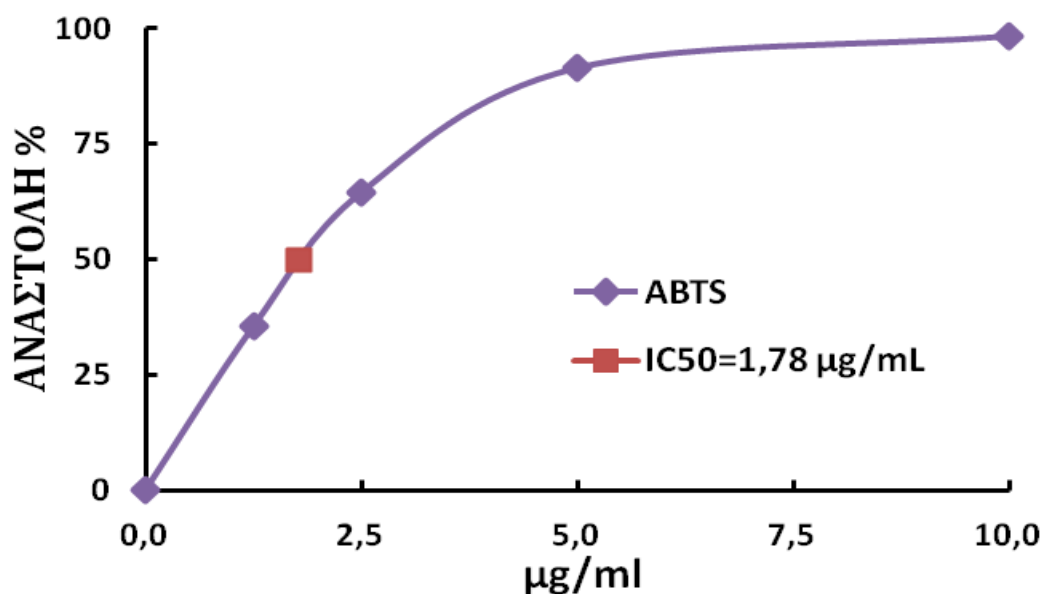
Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, υπολογίσαμε την % αναστολή και φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα τρία εκχυλίσματά μας, με τον άξονα των y να δείχνει την % αναστολή και τον άξονα των x με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:



**Διάγραμμα 4.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας ABTS στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (0.625, 1.25, 2.5 και 5 µg/mL) των βόστρυχων Μανδηλαριάς στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα (IC50 = 1,06 µg/mL).

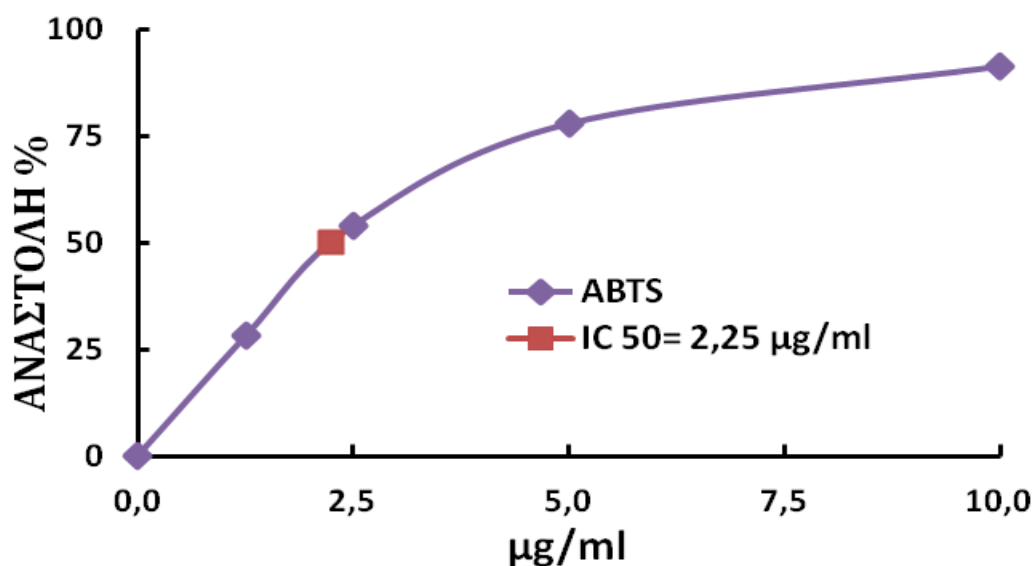


## ΜΑΥΡΟΤΡΑΓΑΝΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 5.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας ABTS στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 µg/mL) των βόστρυχων Μαυροτράγανου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα (IC50 = 1,78 µg/mL).

## ΜΟΣΧΟΜΑΥΡΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 6.** Παρουσιάζεται η % Αναστολή σχηματισμού της ρίζας ABTS στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 µg/mL) των βόστρυχων Μοσχόμαυρου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα (IC50 = 2,25 µg/mL).

Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα τρία εκχυλίσματά μας. Αυτό που μας ενδιέφερε να βρούμε μέσα από αυτά τα διαγράμματα είναι το IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που ανέστειλε/εξουδετέρωσε κατά 50% τη ρίζα. Συγκεκριμένα, αυτό προέκυψε από τις καμπύλες μας, με αντικατάσταση του y με 50. Επομένως το IC50 είναι η τιμή του x στο 50%.

Όσο μεγαλύτερη είναι η μείωση της απορρόφησης, τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Αφού το IC50 είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει/εξουδετερώνει κατά 50% τη ρίζα, συμπεράναμε ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, (άρα και το IC50), τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, καθώς μπορεί να αναστείλει τη ρίζα στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωσή του.

Εκχύλισμα	IC50(μg/mL)
Μοσχόμαυρο Βόστρυχοι	2,25
Μανδηλαριά Βόστρυχοι	1,06
Μαυροτράγανο Βόστρυχοι	1,78

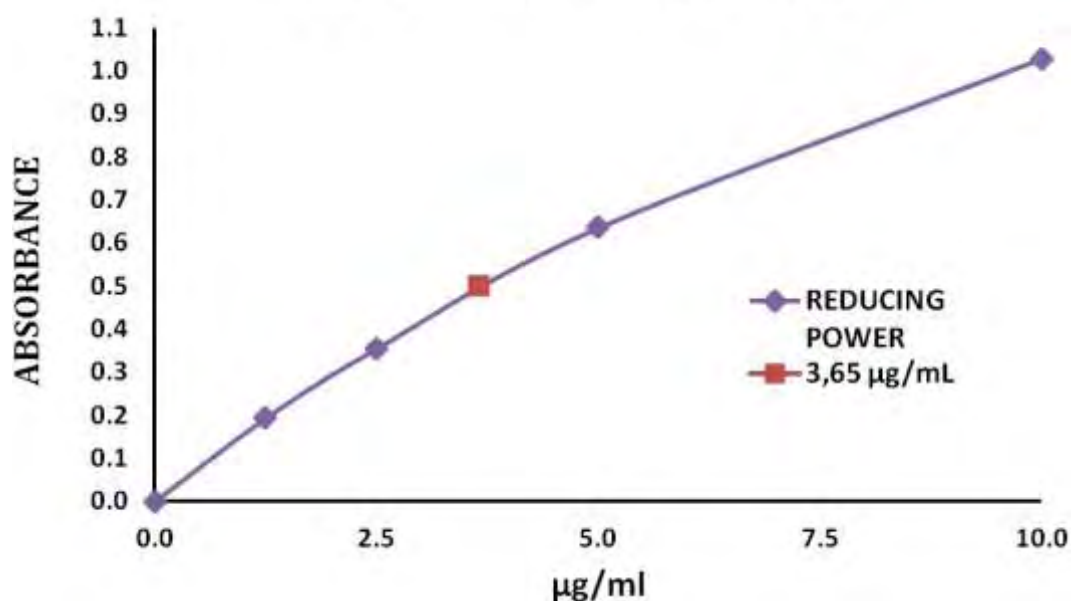
Κατά συνέπεια, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο πείραμα οι **Βόστρυχοι Μανδηλαριάς** έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Οι **Βόστρυχοι Μοσχόμαυρου** φαίνεται να έχουν την πιο ήπια αντιοξειδωτική δράση.

### 3. Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης Reducing Power

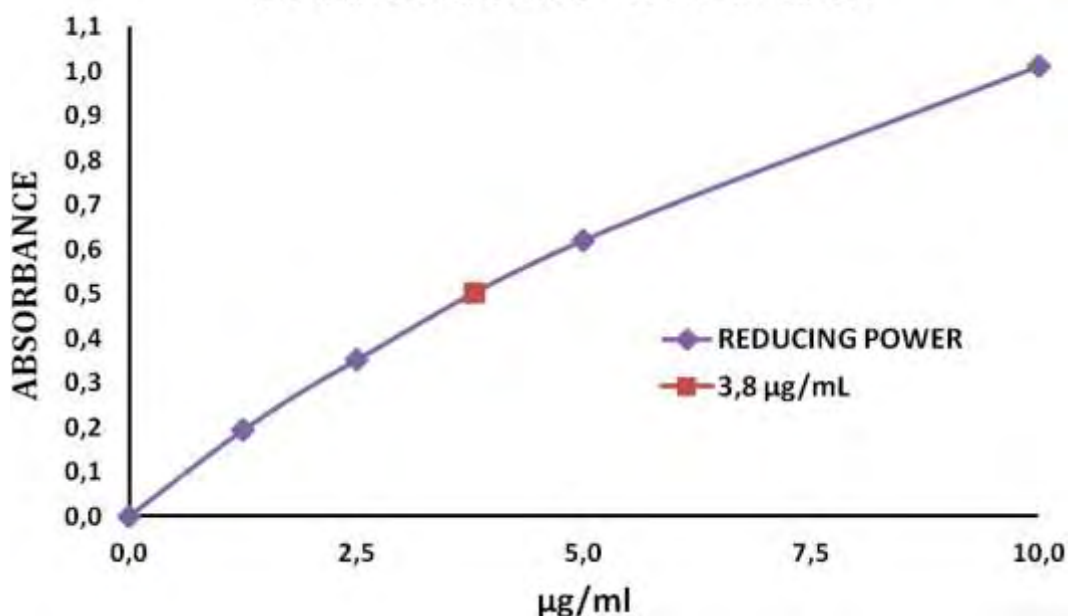
Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα εκχυλίσματά μας, με τον άξονα των y να δείχνει την απορρόφηση στα 700nm και τον άξονα των x με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

## ΜΑΝΔΗΛΑΡΙΑ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



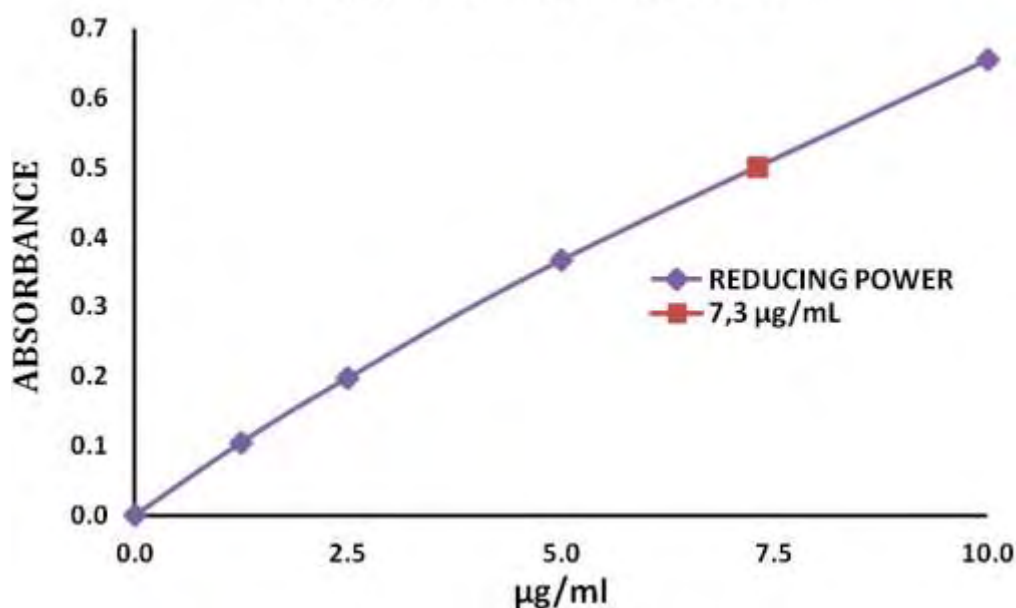
**Διάγραμμα 7.** Παρουσιάζεται η Απορρόφηση στα 700nm στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 µg/mL) των βόστρυχων Μανδηλαριάς στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που έδινε απορρόφηση 0,5 (AU 0,5 = 3,65 µg/mL).

## ΜΑΥΡΟΤΡΑΓΑΝΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 8.** Παρουσιάζεται η Απορρόφηση στα 700nm στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 µg/mL) των βόστρυχων Μαυροτράγανου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που έδινε απορρόφηση 0,5 (AU 0,5 = 3,8 µg/mL).

## ΜΟΣΧΟΜΑΥΡΟ - ΒΟΣΤΡΥΧΟΙ



**Διάγραμμα 9.** Παρουσιάζεται η Απορρόφηση στα 700nm στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 µg/mL) των βόστρυχων Μοσχόμαυρου στον άξονα των x. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που έδινε απορρόφηση 0,5 (AU 0,5 = 7,3 µg/mL).

Από τα διαγράμματα υπολογίστηκε το σημείο (0,5 AU) που δείχνει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε απορρόφηση 0,5.

Αφού το 0,5 AU είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε απορρόφηση 0,5, συμπεράναμε ότι όσο μικρότερη είναι αυτή η τιμή, τόσο πιο ισχυρή είναι η αναγωγική δύναμη του εκχυλίσματος και άρα η αντιοξειδωτική του δράση, καθώς μπορεί να έχει απορρόφηση 0,5 στη χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωσή του.

Εκχύλισμα	RP 0,5 AU(µg/mL)
Μοσχόμαυρο Βόστρυχοι	7,3
Μανδηλαριά Βόστρυχοι	3,65
Μαυροτράγανο Βόστρυχοι	3,8

Κατά συνέπεια, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο πείραμα οι **Βόστρυχοι Μανδηλαριάς** έχουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

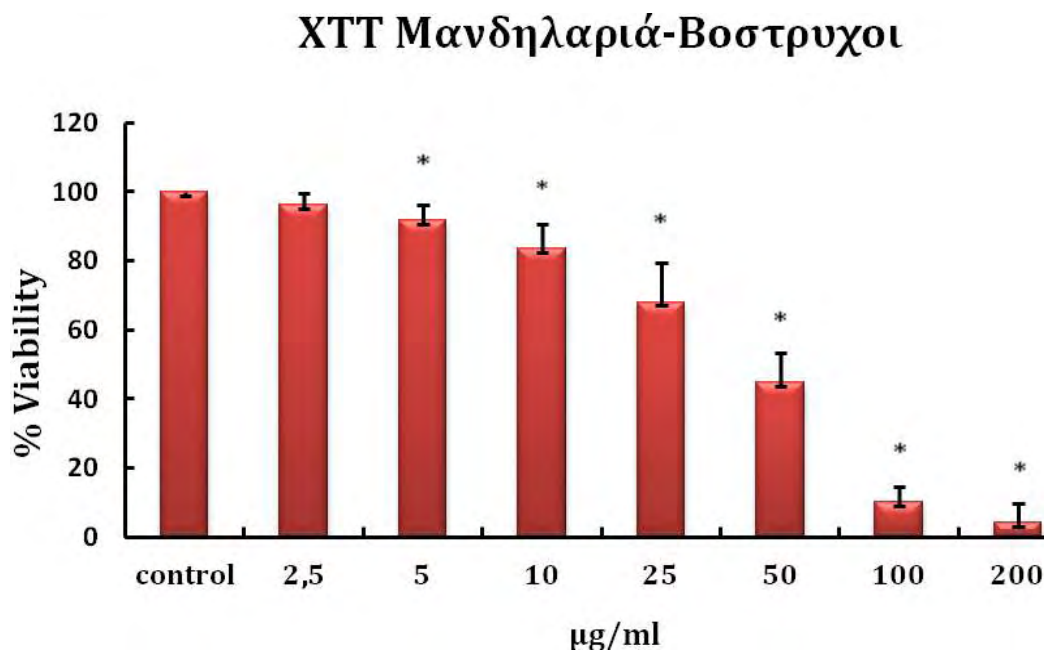
Οι **Βόστρυχοι Μοσχόμαυρου** φαίνεται να έχουν την πιο ήπια αντιοξειδωτική δράση.

#### 4. Μέθοδος XTT

Η % αναστολή στην κυτταρική αύξηση των μυϊκών κυττάρων του ποντικού (C2C12) που προκλήθηκε από τα εκχυλίσματα, υπολογίστηκε από τον τύπο:

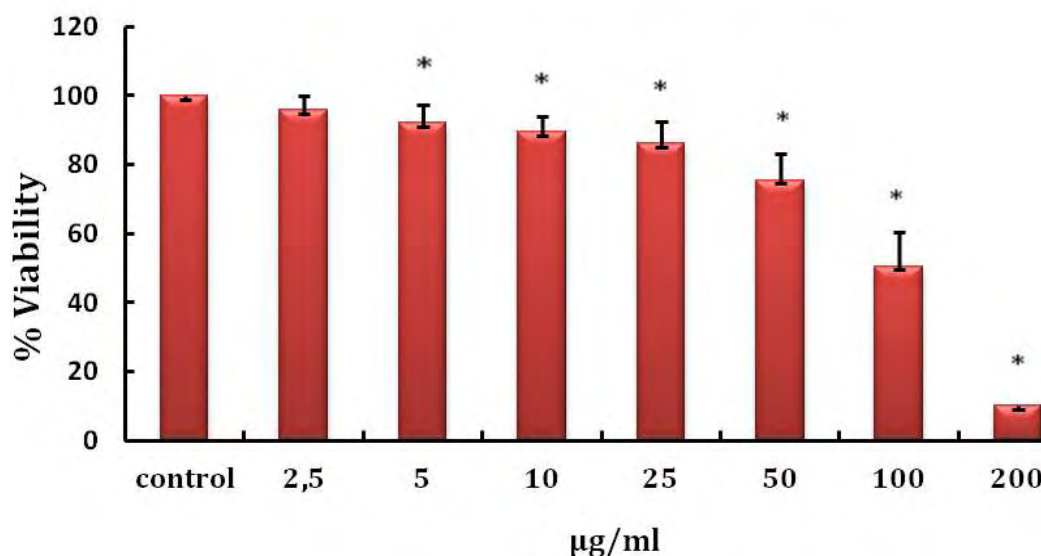
$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε στα 450nm, υπολογίσαμε την % αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Η % βιωσιμότητα, αποτελεί την αντίθετη τιμή της % αναστολής. Με βάση τις τιμές της % βιωσιμότητας που βρήκαμε, φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα τρία εκχυλίσματά μας, με τον άξονα των y να δείχνει την % βιωσιμότητα και τον άξονα των x με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:



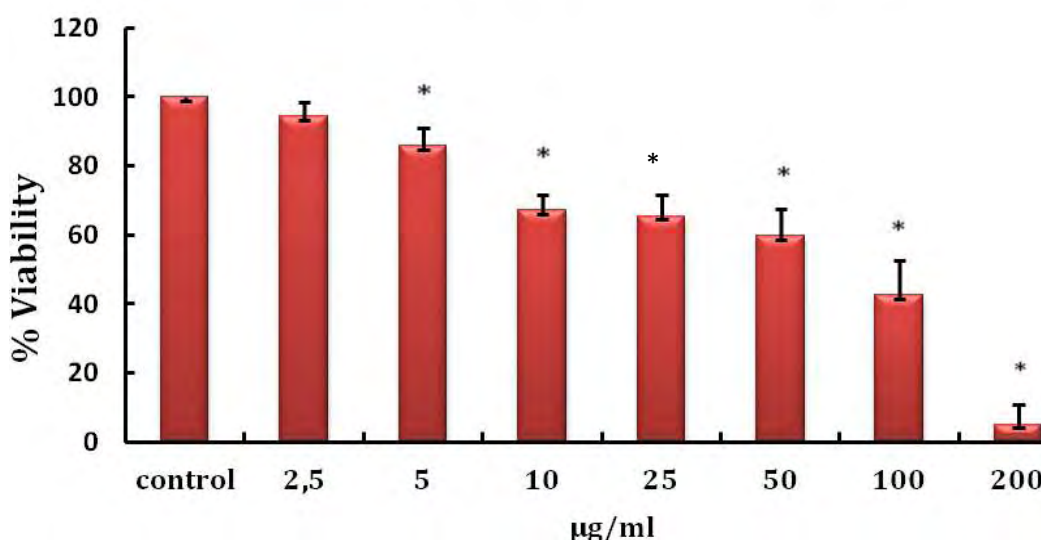
**Διάγραμμα 10.** Παρουσιάζεται η %βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (2.5, 5, 10, 25, 50, 100 και 200 μg/mL) των βόστρυχων Μανδηλαριάς στον άξονα των x (επιπλέον χρήση control ως μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος). \*Στατιστικά σημαντική διαφορά διαφαίνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5μg/mL.

### ΧΤΤ Μαυροτράγανο-Βόστρυχοι



**Διάγραμμα 11.** Παρουσιάζεται η %Βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (2.5, 5, 10, 25, 50, 100 και 200 µg/mL) των βόστρυχων Μαυροτράγανου στον άξονα των x (επιπλέον χρήση control ως μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος). \*Στατιστικά σημαντική διαφορά διαφαίνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5µg/mL.

### ΧΤΤ Μοσχόμαυρο-Βόστρυχοι



**Διάγραμμα 12.** Παρουσιάζεται η %Βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 στον άξονα των y, με τις διάφορες συγκεντρώσεις (2.5, 5, 10, 25, 50, 100 και 200 µg/mL) των βόστρυχων Μοσχόμαυρου στον άξονα των x

(επιπλέον χρήση control ως μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος).  
\*Στατιστικά σημαντική διαφορά διαφαίνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5μg/mL.

Από τις απορροφήσεις που συλλέξαμε, φτιάξαμε τα αντίστοιχα διαγράμματα για κάθε ένα από τα εκχυλίσματά μας. Αυτό που μας ενδιέφερε να προσδιορίσουμε με τη μέθοδο του ΧΤΤ, είναι οι συγκεντρώσεις στις οποίες τα εκχυλίσματα έχουν μη κυτταροτοξική δράση.

Παρατηρήσαμε λοιπόν, ότι σε όλα τα εκχυλίσματα όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις τους, τόσο μειώνεται η % βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, λίγα κύτταρα επιβίωσαν.

Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μειωμένη κυτταροτοξική δράση στα μυϊκά κύτταρα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 5 μg/ml. Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα σε υψηλές δόσεις εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και αποτελούσαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις είναι γύρω στα 2,5 μg/ml.

## 5. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin - Ciocalteu

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος.

Τα αποτελέσματα από τη διαδικασία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Εκχύλισμα	TPC mg gallic/g εκχυλίσματος
Μοσχόμαυρο Βόστρυχοι	373,5
Μανδηλαριά Βόστρυχοι	378,5
Μαυροτράγανο Βόστρυχοι	317

Κατά συνέπεια, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο πείραμα οι **Βόστρυχοι Μανδηλαριάς** έχουν τις περισσότερες πολυφαινόλες.

Οι **Βόστρυχοι Μαυροτράγανου** έχουν τις λιγότερες πολυφαινόλες.

## 6. Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

Χρησιμοποιήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων 2,5μg/mL για το Μαυροτράγανο και τη Μανδηλαριά, και συγκέντρωση 2,9μg/mL για το Μοσχόμαυρο, έτσι ώστε να αντιστοιχούν αναλογικά 0,95μg/ml πολυφαινολών.

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [((A\delta - A0) / 0,156) \times 7,5] / C\delta$$

Aδ: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

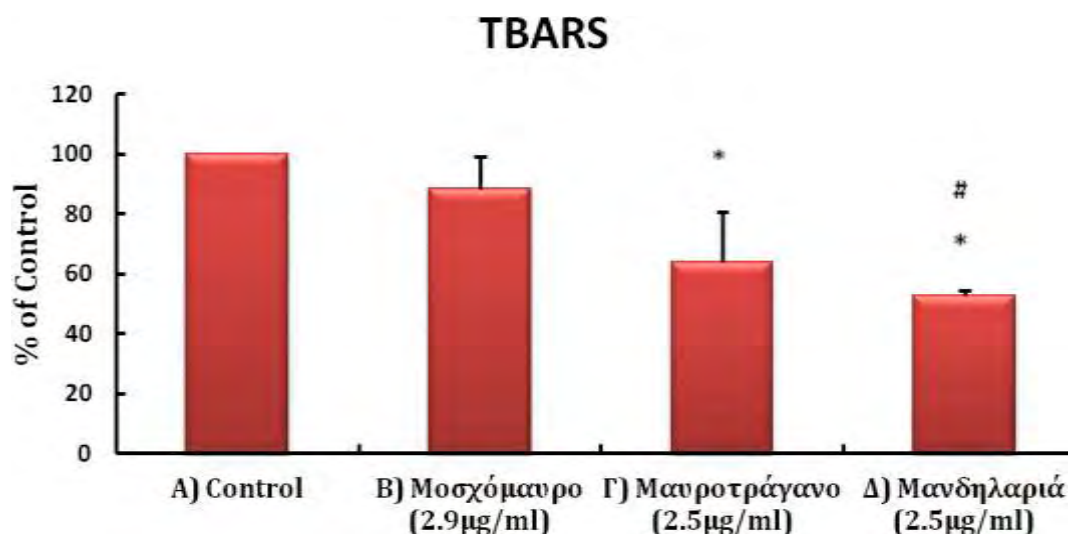
A0: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ε530MDA (μM-1cm-1): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μηλονικής διαλδεΰδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Υτελ.αντίδρασης/ μL αιωρήματος [3000 μL /400 μL]).

Cδ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

C2C12	TBARS	SD
Control	100	0
Μοσχόμαυρο (2.9μg/ml)	88.3	11.1
Μαυροτράγανο (2.5μg/ml)	63.8	16.7
Μανδηλαριά (2.5μg/ml)	52.7	1.9





**Διάγραμμα 13.** Σε μορφή στηλών παρουσιάζεται η %μείωση του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS στα μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 ύστερα από την προσθήκη Β) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μοσχόμαυρου σε συγκέντρωση 2,9 μg/mL, (11,7% μείωση) Γ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μαυροτράγανου σε συγκέντρωση 2,5μg/mL (36,2% μείωση) και Δ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 2,5μg/mL (47,3% μείωση). Αυτά, σε σύγκριση με το Α) Control που αποτελεί τον μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος.

\*Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Α και Γ, Α και Δ.

#Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Β και Δ.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμπεράναμε ότι η **Μανδηλαριά** έχει την πιο ισχυρή δράση για μείωση του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS, δηλαδή προστατεύει περισσότερο τα λιπίδια των κυττάρων από υπεροξειδωση.

## 7. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών Καρβονυλίων

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος - Ατυφλού /  $0.022 \times 1000/50$ .

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι  $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

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

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

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

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

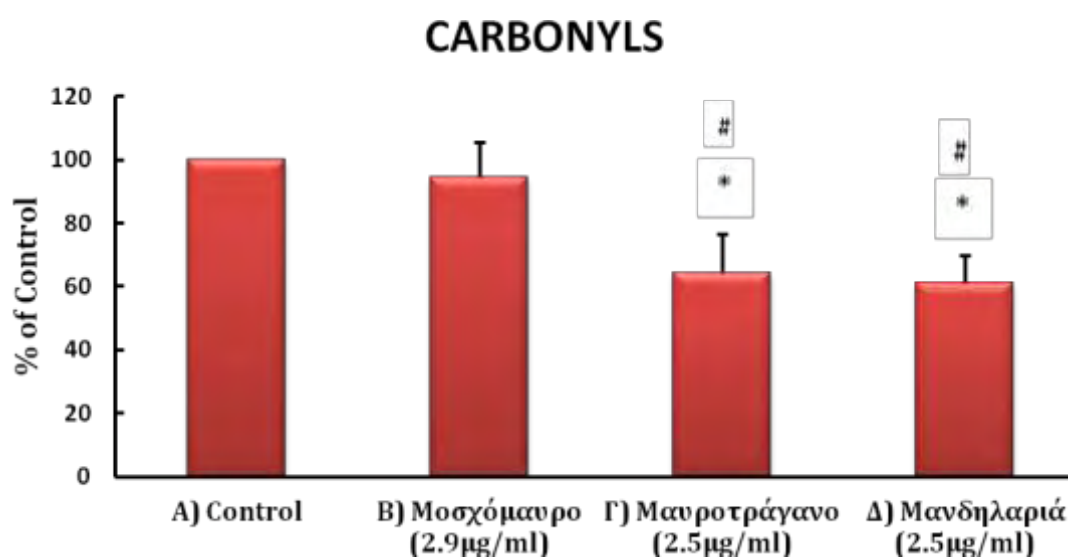
Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος - Ατυφλού /  $0.022 \times 1000/50 \times 2 \times 10$ .

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι  $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Το  $1000/50$  είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μL στην κυψελίδα /50 μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 10 για να συνυπολογίσουμε την 1:10 αραίωση του δείγματος.

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

C2C12	CARB	SD
Control	100.000	0.0
Μοσχόμαυρο (2.9μg/ml)	94.658	10.8
Μαυροτράγανο (2.5μg/ml)	64.129	12.3
Μανδηλαριά (2.5μg/ml)	60.960	8.8



**Διάγραμμα 14.** Σε μορφή στηλών παρουσιάζεται η %μείωση των Πρωτεϊνικών Καρβονυλίων στα μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 ύστερα από την προσθήκη Β) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μοσχόμαυρου σε συγκέντρωση 2,9 μg/mL, (5,34% μείωση) Γ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μαυροτράγανου σε συγκέντρωση 2,5μg/mL (35,87% μείωση) και Δ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 2,5μg/mL (39,04% μείωση). Αυτά, σε σύγκριση με το Α) Control που αποτελεί τον μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος.

\*Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Α και Γ, Α και Δ.

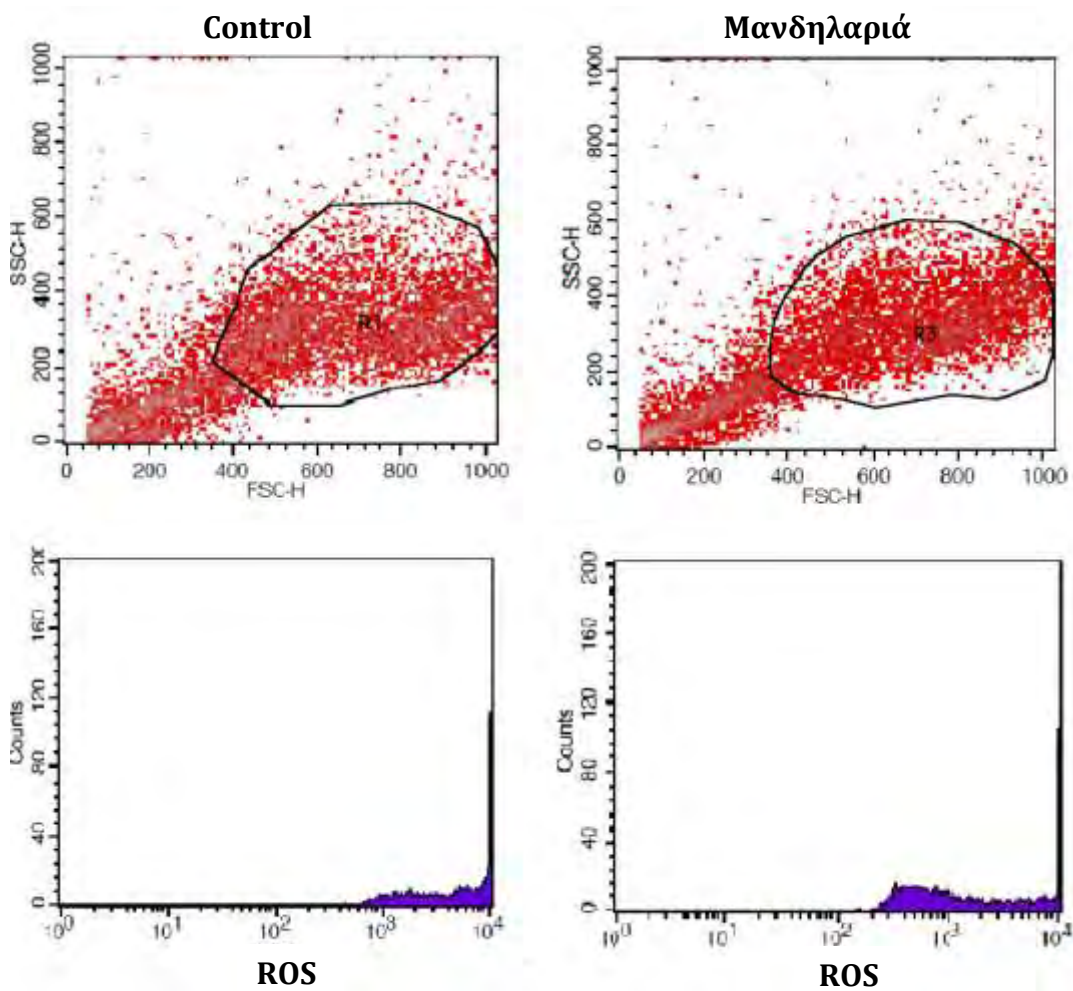
#Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Β και Γ, Β και Δ.

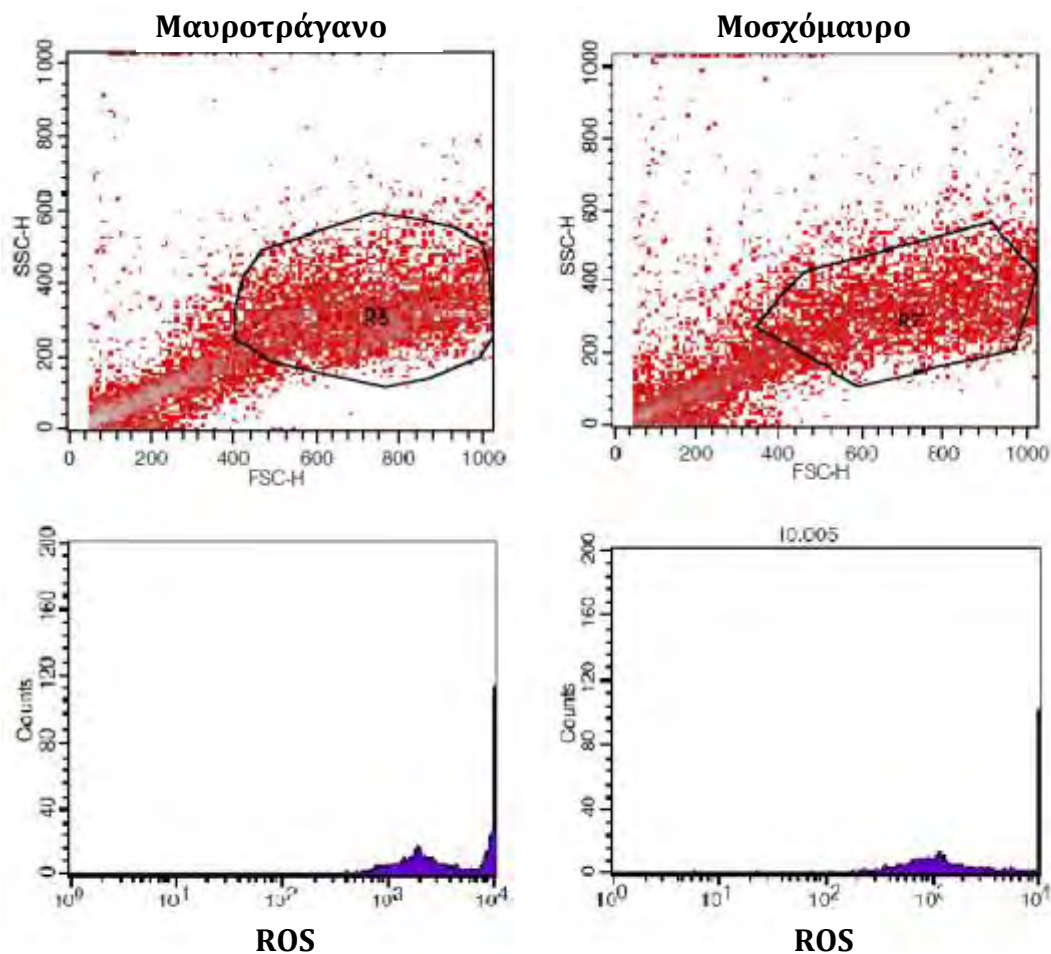
Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμπεράναμε ότι η **Μανδηλαριά** έχει την πιο ισχυρή δράση για εξουδετέρωση των Καρβονυλίων, μειώνει δηλαδή το ποσοστό των οξειδωμένων πρωτεϊνών των κυττάρων σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου.

## 8. Κυτταρομετρία Ροής

### Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS

Τα διαγράμματα που πήραμε από το κυτταρόμετρο παραθέτονται παρακάτω, παρουσιάζοντας, στον άξονα των x, τον ανιχνευτή καθορισμού του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC) και στον y, το δεύτερο ανιχνευτή της κοκκίωσης 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 :

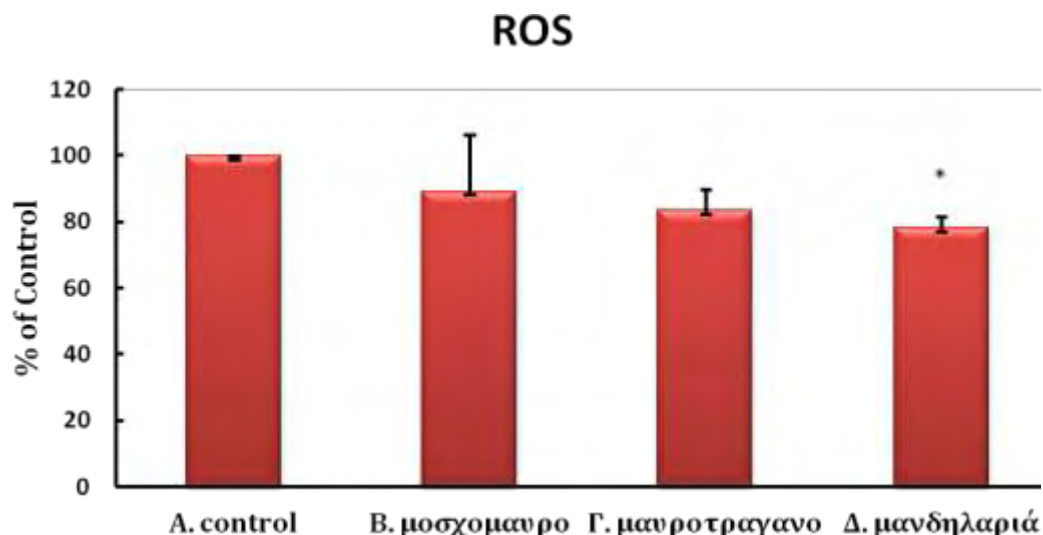




**Διάγραμμα 15.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 καθώς και τη μεταβολή των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα C2C12. Τα ιστογράμματα δείχνουν τα επίπεδα των ROS μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό τη χορήγηση εκχυλίσματος βόστρυχων Μανδηλαριάς, Μαυροτράγανου και Μοσχόμαυρου εν σειρά.

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των επιπέδων των ROS με τη μέθοδο Κυτταρομετρίας Ροής συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

C2C12	ROS	SD
<b>Control</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>Μοσχόμαυρο</b>	<b>89.2</b>	<b>17</b>
<b>Μαυροτράγανο</b>	<b>83.5</b>	<b>6.38</b>
<b>Μανδηλαριά</b>	<b>78.2</b>	<b>3.55</b>



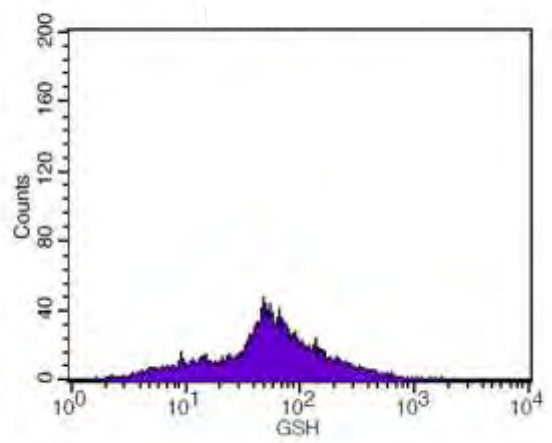
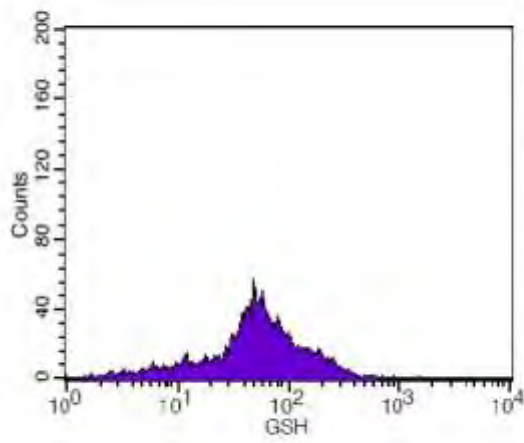
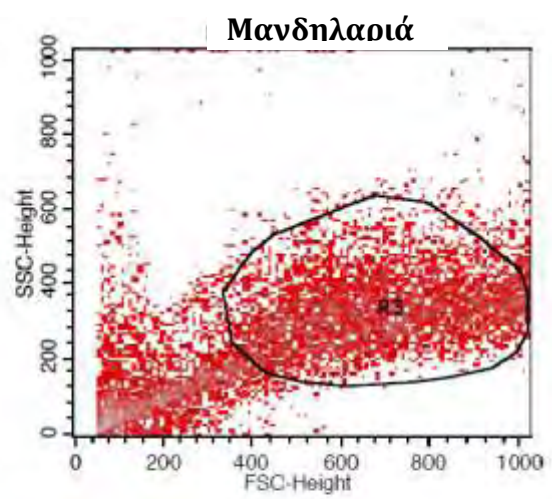
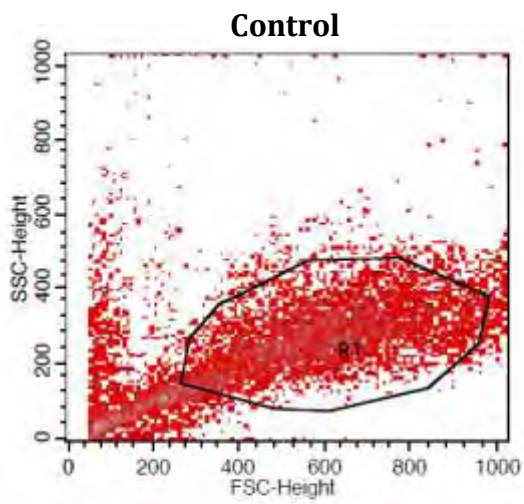
**Διάγραμμα 16.** Σε μορφή στηλών παρουσιάζεται η %μείωση των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) στα μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 ύστερα από την προσθήκη Β) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μοσχόμαυρου σε συγκέντρωση 2,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (10,8% μείωση) Γ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μαυροτραγανού σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (16,5% μείωση) και Δ) εκχυλίσματος Βόστρυχων Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (21,8% μείωση). Αυτά, σε σύγκριση με το Α) Control που αποτελεί τον μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος.

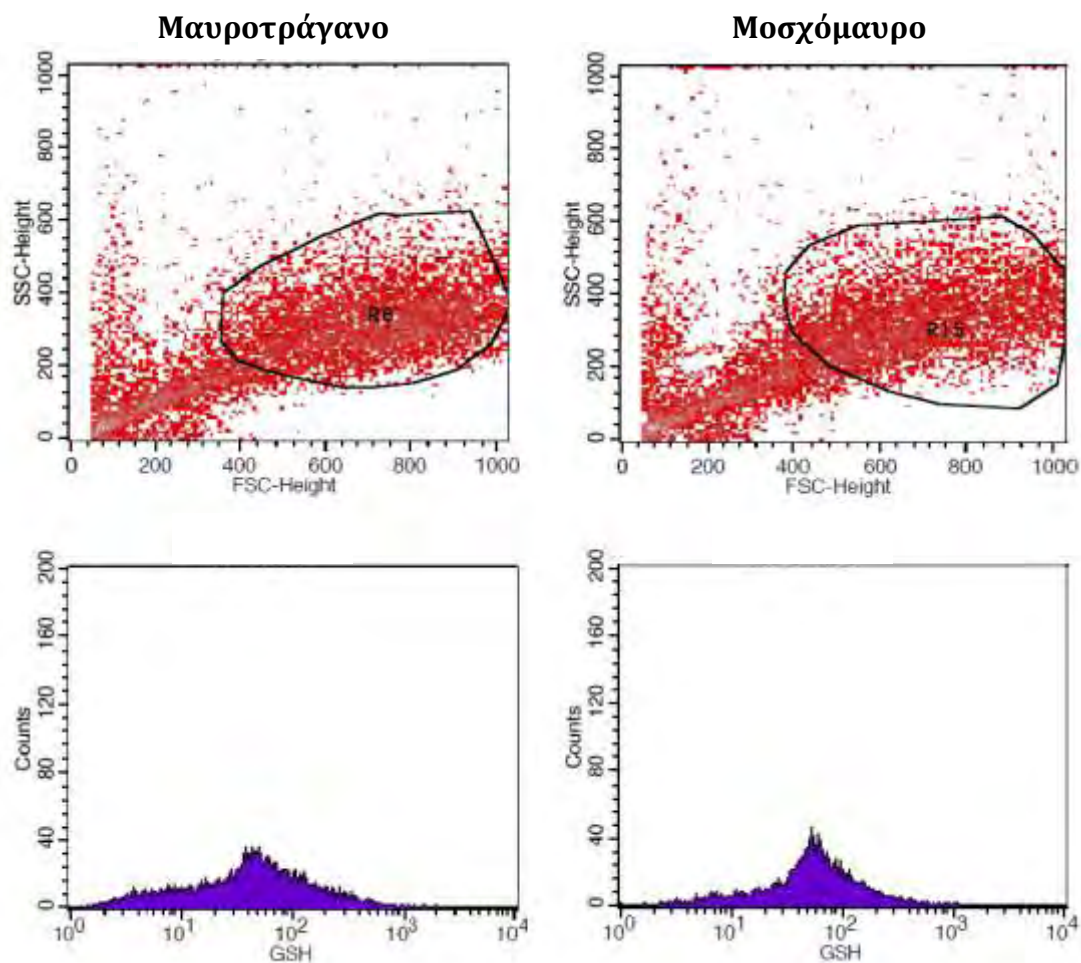
\*Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Α και Δ.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμπεράναμε ότι η **Μανδηλαριά** έχει την πιο ισχυρή δράση για εξουδετέρωση των ROS.

### Προσδιορισμός των επιπέδων της Γλουταθειόνης

Τα διαγράμματα που πήραμε από το κυτταρόμετρο παραθέτονται παρακάτω, παρουσιάζοντας, στον άξονα των x, τον ανιχνευτή καθορισμού του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC) και στον y, το δεύτερο ανιχνευτή της κοκκίωσης 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 :

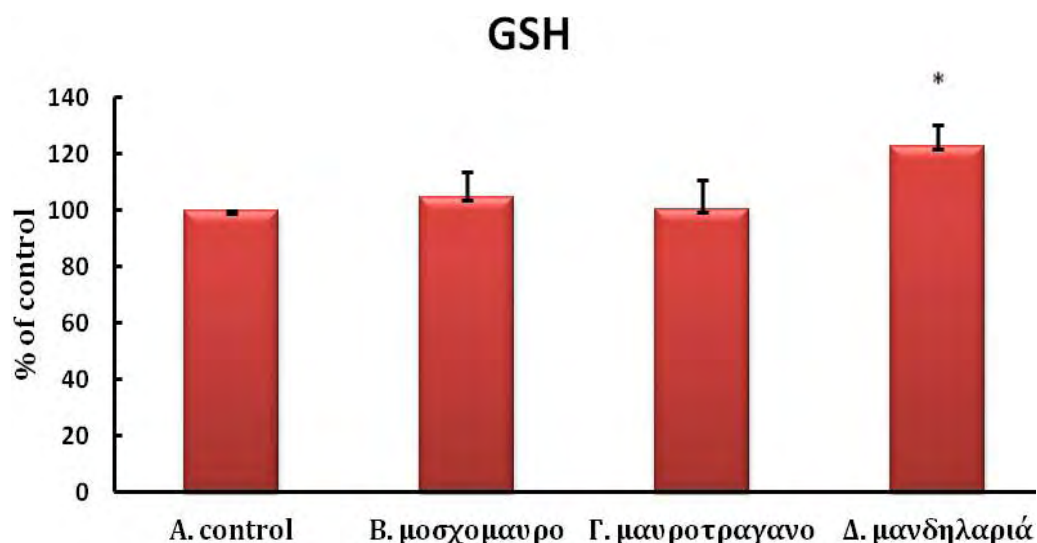




**Διάγραμμα 17.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα C2C12. Τα ιστογράμματα δείχνουν τα επίπεδα της GSH μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό τη χορήγηση εκχυλίσματος βόστρυχων Μανδηλαριάς, Μαυροτράγανου και Μοσχόμαυρου εν σειρά.

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των επιπέδων των επιπέδων της Γλουταθειόνης με τη μέθοδο Κυτταρομετρίας Ροής συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

C2C12	GSH	SD
Control	100	0
Μοσχόμαυρο	104.7	9
Μαυροτράγανο	100.2	10.8
Μανδηλαριά	122.6	7.8



**Διάγραμμα 18.** Σε μορφή στηλών παρουσιάζεται η %αύξηση της Γλουταθειόνης (GSH) στα μυϊκά κύτταρα ποντικού C2C12 ύστερα από την προσθήκη Β) Βόστρυχων Μοσχόμαυρου σε συγκέντρωση 2,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (4,7% αύξηση με απόκλιση 9) Γ) Βόστρυχων Μαυροτράγανου σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0,2% αύξηση με απόκλιση 10,8) και Δ) Βόστρυχων Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (22,6% αύξηση με απόκλιση 7,8). Αυτά, σε σύγκριση με το Α) Control που αποτελεί τον μάρτυρα, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος.

\*Στατιστικά σημαντική διαφορά με  $p < 0.05$  μεταξύ Α και Δ.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμπεράναμε ότι η **Μανδηλαριά** αυξάνει κατά πολύ τα επίπεδα της Γλουταθειόνης στα κύτταρα.



## V. 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 καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη. Επιπλέον, σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό καρκίνου καθώς και τη πρόκληση και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων (**Halliwell B, 2001**).

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες και έτσι να εμποδίσουν τις άκρως επιβλαβείς συνέπειες της οξείδωσης. 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. Κύριοι διατροφικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες αποτελούν τόσο ορισμένες βιταμίνες, ιχνοστοιχεία όσο και μερικές φυτοχημικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη E (ή τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ), η νιασίνη, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, τα καροτενοειδή. Οι πολυφαινόλες είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ουσιών και ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση.

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 του 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.

Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος στην παρούσα μελέτη ήταν η διερεύνηση της πιθανής χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων από σταφύλια, λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού περιεχομένου τους. Στα σταφύλια ανιχνεύονται σε πολλές χημικές ενώσεις που φαίνεται πως βοηθούν στην προαγωγή της υγείας. Τα σταφύλια είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, κάλιο, φλαβονοειδή, πολυφαινολικά οξέα και βιταμίνες. Τα φλαβονοειδή (π.χ. προ-ανθοκυανίνες) απαντώνται ευρέως στα σταφύλια και ειδικά στις ρόγες σταφυλιού και στους μίσχους. Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών είναι κυρίως οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες. Ακόμα, τα

πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις, που περιέχονται στα σταφύλια, ολοένα και αυξάνει. Γεγονός που εστιάζεται στις βιολογικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές και αντιμικροβιακές) που συνδέουν τις φαινολικές ενώσεις με τα πιθανά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου.

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 και περιέχουν κάλιο Το σταφύλι αποτελείται από τις ράγες, το φλοιό, το βόστρυχα που απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, το οποίο ονομάζεται και τσαμπί και από τα γίγαρτα ή αλλιώς κουκούτσια.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές εργασίες που μελέτησαν την επίδραση εκχυλισμάτων στεμφύλων σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τον εκφυλισμό του ενδοθηλίου. Μια κλινική μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού αύξησε τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο **(Kar et al, 2009)**. Έτσι, με βάση τα αποτελέσματα μπορεί να προταθεί η χρήση των εκχυλισμάτων στέμφυλων με σκοπό την προστασία από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς στο καρδιαγγειακό σύστημα. Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού ανέστειλε παράγοντα νέκρωσης όγκων από επαγόμενη οξείδωση του DNA σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς HUVEC, ενώ οι φλούδες σταφυλιών και εκχυλίσματα σπόρων ανέστειλαν την αύξηση των ελευθέρων ριζών που προκαλείται από τη γλυκόζη σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα **(Chao et al, 2011 και Felice et al., 2012)**.

Σε παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, 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 δράση 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 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, 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 τη 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. **(Στάγκος Δημήτρης, 2005).**

Επίσης, *in vivo* και *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών μπορούν να δράσουν αποτρέποντας την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η αντι-μεταλλαξιγόνος 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 και Μανδηλαριά (ποικιλίες με τις οποίες ασχοληθήκαμε και στην παρούσα διπλωματική εργασία), 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. 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 δε μπορεί να αποδοθεί στις πολυφαινόλες, αλλά μάλλον στη συνέργεια πολλών ενώσεων που περιέχονται στα σταφύλια **(Στάγκος Δημήτρης, 2006)**. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί το ευρύτερο νόημα της έννοιας της χημειοπροφύλαξης, η οποία είναι συνιστώσα πολλών παραγόντων που αφορούν και στοχεύουν κυρίως στην πρόληψη με σκοπό την παρεμπόδιση εμφάνισης εκφυλιστικών παθήσεων **(Στάγκος Δημήτρης, 2005)**.

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη αποτελεί η εκτίμηση σε βλαστικά εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera* της συνολικής πολυφαινολικής περιεκτικότητας (TPC), της ταυτοποίηση των πολυφαινολών που υπήρχαν σε αυτές, καθώς και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης, την προστασία από ROS- επαγόμενη βλάβη του DNA και αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων στο ήπαρ (HepG2) και στον τράχηλο της μήτρας (HeLa). Εκτιμήθηκε το εύρος του TPC στα εκχυλίσματα σε 345-584 mg GAE / g ξηρού βάρους, καθώς τα εκχυλίσματα περιείχαν διαφορετικές κατηγορίες πολυφαινολών όπως φλαβονόλες, φλαβανόλες, προκυανιδίνες, φαινολικά οξέα

και στυλβένια. Σε προσδιορισμούς DPPH και ABTS, οι τιμές IC50 των βλαστικών εκχυλισμάτων εκτιμήθηκαν κατά μέσο όρο  $7,8 \pm 2,8$  και  $5,4 \pm 2,6$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ , αντίστοιχα. Επίσης, όλα ανέστειλαν OH και ROO σε δόσεις που προκαλούν βλάβη του DNA, εξαρτώμενη από μέση τιμή IC50 που κυμαίνεται στα  $478 \pm 217$  και στα  $1,15 \pm 0,85$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ , αντίστοιχα. Τα βλαστικά εκχυλίσματα ανέστειλαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, την αύξηση των HepG2 και HeLa καρκινικών κύτταρων με μέσες τιμές IC50  $50 \pm 12$  και  $32 \pm 16$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ , αντίστοιχα. Οι παραπάνω δραστηριότητες των σταφυλιών βλαστικών εκχυλίσματα ήταν συγκρίσιμα με εκείνα των εκχυλισμάτων σπόρων (**Apostolou A., Stagkos D., 2013**).

Η παρούσα έρευνα στόχευσε στην ανίχνευση πιθανής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε μυϊκά κύτταρα πολυφαινολικών εκχυλισμάτων βόστρυχων των ποικιλιών Μοσχόμαυρο, Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο, που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες.

Τα αποτελέσματα που συλλέξαμε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, προσφέρουν πλούσιες πληροφορίες σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αυτών των ποικιλιών. Αρχικά, χρήσιμο είναι να αναφέρουμε τις υψηλές ποσότητες πολυφαινολών που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Follin – Ciocalteau και φτάνουν τα  $378,5$   $\text{mg gallic/g}$  εκχυλίσματος για τους βόστρυχους Μανδηλαριάς. Ακολουθούν οι βόστρυχοι Μαυροτράγανου με  $\text{TPC } 317$   $\text{mg gallic/g}$  εκχυλίσματος ενώ οι βόστρυχοι Μοσχόμαυρου με τη μικρότερη τιμή σε σχέση με τα υπόλοιπα, έχουν  $373,5$   $\text{mg gallic/g}$  εκχυλίσματος. Από τη σύσταση των εκχυλισμάτων που διαθέτουμε, διαφαίνεται ότι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλλικού οξέος, καφεϊνικού οξέος, trans-ρεσβερατρόλης, φερουλικού οξέος, κατεχίνης, κερκετίνης και καμφερόλης διαθέτουν οι βόστρυχοι Μανδηλαριάς, γεγονός που εξηγεί την υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση. Οι βόστρυχοι Μαυροτράγανου διαθέτουν στη σύσταση τους τις υψηλότερες τιμές συριγγικού οξέος, επικατεχίνης και ρουτίνης, ενώ το Μοσχόμαυρο έχει τις χαμηλότερες τιμές, πράγμα που εξηγεί την χαμηλή αντιοξειδωτική του δράση.

Αρχικά, διεξάχθηκαν τα πειράματα με τις μεθόδους DPPH, ABTS και Reducing Power για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης για καθένα από τα τρία εκχυλίσματα, έτσι ώστε να λάβουμε μια αρχική εικόνα για την ισχύ των εκχυλισμάτων ξεχωριστά. Η Μανδηλαριά παρουσίασε τη μικρότερη τιμή IC50,  $7$   $\mu\text{g/mL}$  στη μέθοδο DPPH και  $1,06$   $\mu\text{g/mL}$  στη μέθοδο ABTS καθώς και τη μικρότερη τιμή Reducing Power  $0,5$   $\text{AU} = 3,65$   $\mu\text{g/mL}$ . Το Μαυροτράγανο παρουσίασε ενδιάμεσες τιμές,  $9,11$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $1,78$   $\mu\text{g/mL}$  και  $3,8$   $\mu\text{g/mL}$  στις μεθόδους DPPH, ABTS και Reducing Power αντίστοιχα. Τέλος, το Μοσχόμαυρο έδωσε το μεγαλύτερο IC50  $16,3$   $\mu\text{g/mL}$  (DPPH) και  $2,25$   $\mu\text{g/mL}$  (ABTS) και τη μεγαλύτερη τιμή RP  $7,3$   $\mu\text{g/mL}$ . Τα αποτελέσματα αυτά, μας οδηγούν στο

συμπέρασμα ότι η ποικιλία Μανδηλαριά έχει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Έπειτα, με τη μέθοδο XTT προσδιορίσαμε τις συγκεντρώσεις του κάθε εκχυλίσματος στις οποίες είναι κυτταροτοξικό, με σκοπό να εκτιμήσουμε τις κατάλληλες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, που θα χρησιμοποιήσουμε στα C2C12 κύτταρα. Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μειωμένη κυτταροτοξική δράση στα μυϊκά κύτταρα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 5  $\mu\text{g/ml}$ . Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα σε υψηλές δόσεις εμφάνισαν υψηλή κυτταροτοξική δράση. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και αποτελούσαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις είναι στα 2,5  $\mu\text{g/ml}$  σε Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο, ενώ για το Μοσχόμαυρο αντιστοιχεί η συγκέντρωση 2,9  $\mu\text{g/ml}$ , η οποία και χρησιμοποιήθηκε. Τα εκχυλίσματα στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις είχαν ολική συγκέντρωση πολυφαινόλων 0,95 $\mu\text{g/ml}$ .

Η δεύτερη ενότητα των πειραμάτων αφορά την εφαρμογή των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων στα κύτταρα μυϊκής κυτταρικής σειράς ποντικού C2C12 και περιλάμβανε τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες. Οι δείκτες που προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά ήταν τα TBARS (λιπιδική υπεροξειδωση) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος των βόστρυχων Μανδηλαριάς επιβεβαιώνεται και από τη μέτρηση του δείκτη TBARS, που αποτελεί ένα δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης των κυττάρων. Η μέθοδος αυτή φανέρωσε τη δράση που έχει το εκχύλισμα Μανδηλαριά να μειώνει κατά 47,3%, σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου, τη λιπιδική υπεροξειδωση των κυττάρων. Ακολουθεί το Μαυροτράγανο με μείωση κατά 36,2% των TBARS, ενώ τη μικρότερη επίδραση στο δείκτη προκαλεί η ποικιλία Μοσχόμαυρου με μείωση κατά 11,7% σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου.

Ακολούθως, προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, όπου συμπεράναμε ότι για ακόμη μια φορά η Μανδηλαριά έχει την πιο ισχυρή δράση για μείωση των καρβονυλίων, μειώνει δηλαδή το ποσοστό των οξειδωμένων πρωτεϊνών των κυττάρων κατά 39,04% σε σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου. Τα εκχυλίσματα Μαυροτράγανο και Μοσχόμαυρο έπονται με ποσοστά μείωσης 35,87% και 5,34% αντίστοιχα. Παρατηρούμε λοιπόν τη μεγάλη μείωση των δεικτών που προκάλεσε η Μανδηλαριά και την ελάχιστη του Μοσχόμαυρου.

Σύμφωνα λοιπόν με τα στοιχεία που παραθέτονται μέχρι στιγμής, παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα από Βόστρυχους Μανδηλαριάς έχει την πιο σημαντική επίδραση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυϊκών κυττάρων του ποντικού C2C12. Το συμπέρασμα αυτό έρχονται να επιβεβαιώσουν δύο ακόμη πειράματα μέσω της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής. Συγκεκριμένα,

προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS, καθώς και της ανηγμένης γλουταθειόνης, GSH. Το αποτέλεσμα λοιπόν, έδειξε ότι το εκχύλισμα ασκεί άμεση αντιοξειδωτική δράση με το να μειώνει τα επίπεδα των ROS κατά 21,8% σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Κατά συνέπεια λοιπόν, μειώνει και το οξειδωτικό στρες. Το Μαυροτράγανο παρουσιάζει μείωση 16,5% και το Μοσχόμαυρο 10,8%. Εκτός όμως από τη μείωση των ROS, το εκχύλισμα συμβάλει και στην αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού δείκτη, εντός των μυϊκών κυττάρων. Μάλιστα, η GSH αυξήθηκε στους Βόστρυχους Μανδηλαριάς κατά 22,6% σε σχέση με την καλλιέργεια ελέγχου. Αντίθετα, οι άλλες δύο ποικιλίες δεν παρουσίασαν αύξηση.

Τα δεδομένα που προκύπτουν δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα από βόστρυχους σταφυλιών έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση σε μυϊκά κύτταρα. Έτσι, χρειάζεται η διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας στοχεύοντας στο σαφή προσδιορισμό των ενδογενών μηχανισμών με τους οποίους τα εκχυλίσματα βόστρυχων προστατεύουν τα μυϊκά κύτταρα από οξειδωτικό στρες. Με αυτό τον τρόπο θα διευκρινιστεί η χημειοπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος από σταφύλια και θα καταστεί δυνατή η καταλληλότερη προσέγγιση για την πιθανή χρήση του ως χημειοπροστατευτικό μέσο.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ⓢ *Adlercreutz H, Mazur W. Ann Med. 1997 Apr;. Phyto-oestrogens and Western diseases.*
- Ⓢ *Ames BN 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. Prog Clin Biol Res 206: 3-32.*
- Ⓢ *Antunes F, Derick H, Cadenas E, 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 33 (9): 1260-7.*
- Ⓢ *Apostolou A<sup>1</sup>, 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 Nov;61:60-8. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.029. Epub 2013 Feb 1.*
- Ⓢ *Beckman JS, Koppenol WH. Am J Physiol. 1996 Nov; Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.*
- Ⓢ *Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. Drugs Exp Clin Res. 24:133–138.*
- Ⓢ *Bielski BHJ and Cabelli DE 1995. Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: Active Oxygen in Chemistry.*
- Ⓢ *Cadenas E. Biofactors. 1997; Basic mechanisms of antioxidant activity.*
- Ⓢ *Chance B, Sies H, Boveris A 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605.*
- Ⓢ *Chao CL, Chang NC, Weng CS, et al. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. Eur J Nutr 2011; 50(6): 401–419.*

- ⊗ *Cheeseman KH, Slater TF, 1993. "An introduction to free radical biochemistry" : Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93.*
- ⊗ *Davis KJ, 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem 262:9895-9901.*
- ⊗ *Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H, 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med 32: 1102-1115.*
- ⊗ *Downey JM, 1990. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. Annu Rev Physiol 52: 487-504.*
- ⊗ *Ελλοίωνων Χώρα, ηλεκτρονική σελίδα.*
- ⊗ *Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr, 1992. Free radical-mediated iung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. Toxicology 72:153-165.*
- ⊗ *Felice F, Zambito Y, Di Colo G, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. Eur J Pharm Biopharm 2012; 80(1): 176–184.*
- ⊗ *Finaud J, Lac G, Filaire E. Sports Med. 2006; Oxidative stress: relationship with exercise and training.*
- ⊗ *Gilbert D.L, Ann NY Acad Sci, 899:1 2000, Fifty years of radical ideas.*
- ⊗ *Gilbert D.L, 1995, "Fifty years of radical ideas", Ann NY Acad Sci, 899:1, 2000, Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, Clinical Chemistry, 41/12,1819-1828.*
- ⊗ *Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. Biol Chem 2002; 383: 375-88.*
- ⊗ *Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. J Physiol 567:113-120; 2005.*



- ⊗ *Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. Med Sci Sports Exerc 1988; 20(2): 55-9.*
- ⊗ *Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radical Biology and Medicine 27 (9-10), 922-935.*
- ⊗ *Grune T, Reinhecker T, Davies KJA 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEBJ 11:526-534.*
- ⊗ *Halliwell B and Gutteridge JMC, 1989. Free radicals in biology and medicine (2<sup>nd</sup> ed.) Oxford: Clarendon Press, pp 136-158.*
- ⊗ *Halliwell B, Gutteridge JMC, 1990. "The antioxidants of human extracellular fluids", Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 1-8.*
- ⊗ *Halliwell B and Gutteridge JMC 1990, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzymology 186.*
- ⊗ *Halliwell B., Cross CE 1994. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect. 102.*
- ⊗ *Halliwell, B. 1995. How to characterize an antioxidant: an update. Biochemical Society symposium 61: 73-101. Database on-line. Available from Scopus.*
- ⊗ *Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.*
- ⊗ *Halliwell B and Gutteridge JM, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.*
- ⊗ *Halliwell B 2000. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? Am J Clin Nutr 72:1082-1087.*
- ⊗ *Halliwell B., 2001, Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, Encyclopedia of Life Science.*

- Ⓢ *Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN, 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol 300:156-166.*
- Ⓢ *Jackson Malcolm J., (2011), Control of Reactive Oxygen Species production in contracting skeletal muscle, Antioxidants & Redox Signaling, Volume 15, Number 9.*
- Ⓢ *Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med 1988; 5: 156-70.*
- Ⓢ *Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P, 2000. Redox state of glutathione in human plasma. Free Radic Biol Med 28: 625-635.*
- Ⓢ *Καλογιάννης, Σταύρος, 2010. Αρχές Βιοχημείας. Θεσσαλονίκη: ΤΕΙ-Θ.*
- Ⓢ *Κουρέτας Δημήτριος, Στάγκος Δημήτριος, Εργαστηριακός Οδηγός Βιοχημικής Τοξικολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα 2003.*
- Ⓢ *Kanner J and Lapidot T, 2001. The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. Free Radic Biol Med 31: 1388-1395.*
- Ⓢ *Kar P, Laight D, Rooprai HK, et al. Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. Diabet Med 2009; 26(5): 526-531.*
- Ⓢ *Kim SH, Park KS, Chang MJ, Sung JH. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. J Sports Med Phys Fitness. 2005 Jun;45(2):178-82.*
- Ⓢ *Komulainen J, Takala TE, Vihko V. Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? Int. J. Sports Med 1995; 16: 150-154.*
- Ⓢ *Koppenol WH. Free Radic Biol Med. 1998 Sep; The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy-nitrite.*

- ⊗ *Kössi J, Muona P, Tuukkanen J, Ylä-Outinen H, Kalliomäki M, Risteli J, Oikarinen A, Laato M, Peltonen J. 2001. Effects of glucose on collagen mRNA levels and collagen secretion in EAhy 926 endothelial cell line. Ann Chir Gynaecol Suppl.:(215):39-44.*
- ⊗ *Kuppasamy P and Zweier JL, 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. J Biol Chem 264: 9880-9884.*
- ⊗ *Levine RL and Stadtman ER, 2001. Oxidative modification of proteins during aging. Exp. Gerontol 36: 1495-1502.*
- ⊗ *Lijinsky W, 1999. N-Nitroso compounds in the diet. Mutat Res 443: 129-138.*
- ⊗ *Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M. Ann N Y Acad Sci. 2002 Apr; Human aging and global function of coenzyme Q10.*
- ⊗ *Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, 1977 "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer's Disease", J Neurochem, 68 (5), 2061-69.*
- ⊗ *Μαυρίδου Παρασκευή, 2012, «Προσδιορισμός Γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής σε μυϊκά κύτταρα επιμύου μετά από επίδραση εκχυλίσματος σταφυλιού».*
- ⊗ *Mylonas C, and Kouretas D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo. 13: 295-309.*
- ⊗ *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, 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.*
- ⊗ *Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG. Ann N Y Acad Sci. 1992 Sep; Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E.*

- Ⓢ Νικόλαος Δεμερτζής 2012. Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες (ROS) σε μυϊκά κύτταρα με τη χρήση flow cytometry έπειτα από χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων.
- Ⓢ Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M, 1998. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
- Ⓢ Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L, 2001. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906:170-175.
- Ⓢ Παπαγεωργίου, Γεώργιος, 2005. Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση. Θεσσαλονίκη: university studio press.
- Ⓢ Πρίφτης Αλέξανδρος 2012. Μελέτη επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης τυρογάλακτος σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε μυοβλάστες ποντικού (C2C12).
- Ⓢ Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme bgy* 186, 1990 “Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview”.
- Ⓢ Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM 1980. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma.
- Ⓢ Powers Scott K, Lennon Shannon L., (1999), *Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle, Proceedings of the Nutrition Society* (1999),58, 1025-1033
- Ⓢ Procházková, D., I. Boušová, and N. Wilhelmová. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, no. 4: 513-523. Database on-line. Available from Scopus.
- Ⓢ Pyne DB .*Sports Med.* 1994 Apr; Regulation of neutrophil function during exercise.

- Ⓢ Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK 2001. *Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. Drug Chem Toxicol 24: 191-200.*
- Ⓢ Reid MB, 2001. *Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. J Appl Physiol; 90: 724-31.*
- Ⓢ Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. *Arch Tierernahr. 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems.*
- Ⓢ Σπύρου Αργύρης, (2010), «Επίδραση εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*vitis vinifera*) και φυτικών πολυφαινολών σε καρκινικά κύτταρα ήπατος HEPG2».
- Ⓢ Samman S, Soto C, Cooke L, Ahmad Z, Farmakalidis E. *Biol Trace Elem Res. 1996 Mar; Is erythrocyte alkaline phosphatase activity a marker of zinc status in humans?*
- Ⓢ Scalbert A. and Williamson G., 2000, *Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, J.Nutrition, 130:20735-855*
- Ⓢ Scholz RW. Graham KS. Gumpricht E. Reddy CC, 1989. *Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. Ann NY Acad Sci:570:514-7.*
- Ⓢ Sen' VD, Golubev VA, Volkova LM, Konovalova NP. *J Inorg Biochem. 1996. Synthesis and antitumor activity of platinum(II) complexes with trans-3,4-diamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl.*
- Ⓢ Sies, H. 1991. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York: Academic Press.*
- Ⓢ Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E. *The influence of supplementation with Rhodiola rosea L. extract on selected redox parameters in professional rowers. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2009 Apr;19(2):186-99.*

- ☉ Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., 1997, *Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention*, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313.
- ☉ Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D., 2011 Jul-Aug. *Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. In Vivo.*;25(4):657-62.
- ☉ Stadtman ER 1986. *Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. Trends Biochem Sci* 11: 11-12.
- ☉ 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.
- ☉ Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D., 2005 Ju;. *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.* 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.
- ☉ Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., 1997, *Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention*, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*,11:287-313.
- ☉ Τασούλα Επτακοιλη, κείμενο Ασύρτικο, ηλεκτρονική σελίδα.
- ☉ Τα βορεινά, οίνοι βορείου Ελλάδος «Σεμινάριο γευσιγνωσία γηγενών ποικιλιών που καλλιεργούνται στη Βόρεια Ελλάδα», ηλεκτρονική σελίδα.
- ☉ Τσιουτσιουλίτη Αθανασία 2014 Προσδιορισμός γλουταθειόνης, ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε μυϊκά

κύτταρα έπειτα από τη χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος στέμφυλων.

- Ⓢ Valavanidis A, 2006. "Free radicals in organic chemistry", University of Athens.
- Ⓢ Victoria CR. *Arq Gastroenterol.* 1994. *Jejunal electrogenic transport of glucose in rats with niacin deficiency.*
- Ⓢ Von Sonntag C 1987. *The Chemical Basis of radiation Biology.* Taylor & Francis, London.
- Ⓢ 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.
- Ⓢ Wormser U, Brodsky B, Green BS, Arad-Yellin R, Nyska A. *J Appl Toxicol.* 2000 Dec; *Protective effect of povidone iodine ointment against skin lesions induced by chemical and thermal stimuli.*
- Ⓢ Χρυσουγή Καρτερολιώτη 2013. *Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση μίγματος πολυφαινολών από στέμφυλα.*
- Ⓢ 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.
- Ⓢ Yaffe D, Saxel O. *Differentiation.* 1977. *A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation.*
- Ⓢ 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.*

- ④ *Yu BP 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 74: 139-162.*