



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης λιποσωμακών  
σκευασμάτων σε κυτταρικές σειρές

Μελέτη Ιωάννα του Γεωργίου

Λάρισα 2020

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης λιποσωμακών  
σκευασμάτων σε κυτταρικές σειρές

Study of the antioxidant activity of liposomal  
formulations in cell lines

***ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ***

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αριστείδης Βεσκούκης: Μεταδιδακτορικός ερευνητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας και Πανεπιστημιακός Υπότροφος, τμήμα Διαιτολογίας & Διατροφολογίας Τρικάλων

Σέρκο Χαρουτουγιάν: Καθηγητής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία έλαβε μέρος από τον Φεβρουάριο του 2020 έως και τον Ιούλιο του 2020 στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών υπό την καθοδήγηση του κύριου Κουρέτα Δημήτριου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του όπως επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστήσω τον Φώτη Τέκο και τον Νίκο Γκουτζουρέλα για την βοήθεια και την συνεχή υποστήριξη σε κάθε βήμα αυτής της πτυχιακής όπως επίσης και όλα τα μέλη του εργαστηρίου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Αριστείδη Βεσκούκη και τον κύριο Σέρκο Χρουτουιάν που συμφώνησαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και στην αδερφή μου για την υποστήριξη σε κάθε βήμα μου.



## Περίληψη

Η σωστή διατροφή τα τελευταία χρόνια έχει πάρει μεγάλες εκτάσεις και έχει γίνει τρόπος ζωής πολλών ανθρώπων. Η Ελλάδα είναι μία χώρα όπου από την αρχαιότητα ακόμα ήταν γνωστή για την ισορροπημένη διατροφή των κατοίκων της. Βέβαια αυτή η διατροφή δεν είναι άλλη από την Μεσογειακή. Η Μεσογειακή διατροφή αποτελεί πρότυπο διατροφής καθώς είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά όπως επίσης και σε καλά λίπη σαν το ελαιόλαδο. Φυσικά δεν θα μπορούσε να λείπει το κρέας. Παρόλα αυτά οι γρήγοροι ρυθμοί ζωής οδήγησαν τον Έλληνα και όχι μόνο στην κατανάλωση τροφών με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη, συντηρτικά κ.α. γνωστών ως γρήγορο φαγητό (fast food). Με την πάροδο του χρόνου όμως έγινε αντιληπτό πως αυτός ο τρόπος ζωής και διατροφής όχι μόνο οδήγησε στην προσθήκη βάρους αλλά και σε σοβαρές ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης τύπου II, καρδιοπάθειες, εγκεφαλικά και πολλά άλλα. Έτσι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία στροφή προς την υγιεινή και ισορροπημένη διατροφή.

Παράλληλα όμως με τη διατροφή εξελίχτηκε και η επιστήμη η οποία δίνει την δυνατότητα στον άνθρωπο που έχει έλλειψη κάποιας ουσίας απαραίτητη για την επιβίωση του να την λάβει μέσω συμπληρωμάτων διατροφής. Τα συμπληρώματα που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν λιποσωμακά συμπληρώματα γλουταθειόνης και βιταμίνης C. Αυτές οι δύο ουσίες αποτελούν σημαντικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού η έλλειψη των οποίων μπορεί να επιφέρει ανεπανόρθωτες βλάβες.

Το πείραμα είχε σαν στόχο τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των λιποσωμακών συμπληρωμάτων διατροφής σε κυτταρικές σειρές. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές: η EA.hy926 και η MNK45. Αρχικά έγινε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των δραστικών ουσιών γλουταθειόνης και βιταμίνης C και στις δύο κυτταρικές σειρές με τη μέθοδο ΧΤΤ. Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία λάβαμε χρησιμοποιήσαμε τις κατάλληλες συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών, τις οποίες εναποθέσαμε σε καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών

που προαναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα έγινε εισαγωγή της δραστικής ουσίας γλουταθειόνης στα κύτταρα EA.hy96 και στα κύτταρα MKN45 και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ποσοστά γλουταθειόνης(GSH) και δραστικών μορφών O (ROS) μέσω κυτταρομετρία ροής. Αντίστοιχα έγινε και για την δραστική ουσία, βιταμίνη C.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατά κοινή ομολογία οι δραστικές ουσίες είχαν αντιοξειδωτική δράση καθώς και στις δύο κυτταρικές σειρές είχαμε αύξηση της GSH. Εξαίρεση αποτέλεσε η βιταμίνης C στα κύτταρα MKN45 που στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσίασαν αύξηση GSH όμως στις πιο υψηλές προκάλεσαν μείωση. Από την άλλη πλευρά τα ROS μειώθηκαν με την χορήγηση των δραστικών ουσιών σε όλες τις κυτταρικές σειρές με εξαίρεση τα κύτταρα EA.hy926 στα οποία μετά την προσθήκη γλουταθειόνης τα ROS αυξήθηκαν.

## Abstract

Healthy diet in recent years has become widespread and a way of life for many people around the world. Greece is a country known for the balanced diet of its inhabitants. This diet is none other than the Mediterranean. This diet is a standard diet as it is rich in vegetables, fruits and good fats as olive oil. The meat could not be missing of Mediterranean kitchen. Nevertheless the fast pace of life leads Greeks and not only to the consumption of foods with high glycemic index, preservatives e.t.c. known as fast food. Over time, however, it became clear that this life style and diet not only lead people to gain weight but also to serious diseases like diabetes II, stroke and many more. So in recent years there has been a shift towards a health and balanced diet.

But along with nutrition has evolved and science which enables the persons who has a deficiency in a substance necessary for his survival to receive it through dietary supplements. The supplements which have been studied in this experiment were glutathione and vitamin C or ascorbic acid. These two substances are important antioxidants in the body, the lack of which can cause irreparable damage.

The aim of the experiment was to study the antioxidant activity of liposomal dietary supplements in cell lines. In this experiment it was used two cell lines: EA.hy926 and MKN45. Initially the cytotoxicity of glutathione and vitamin C in both cell lines was tested by the XTT method. Based on the results we obtained, we used the appropriate concentrations of the active substances in each cell line. Specifically the active substance of glutathione was introduced in EA.hy926 and MKN45 cells and then measured with flow cytometry the percentages of glutathione (GSH) and ROS. The same procedure was done for vitamin C.

The results showed that glutathione and vitamin C had antioxidant activity in both cell lines as we had an increase in GSH levels. An exception was vitamin C in MKN45

cells which in low concentration increased the GSH levels but in high concentrations vitamin decreased GSH levels. On the other hand ROS decreased with the administration of active substances to all cell lines except EA.hy926 in which ROS increased after the addition of glutathione.



## Πίνακας περιεχομένων

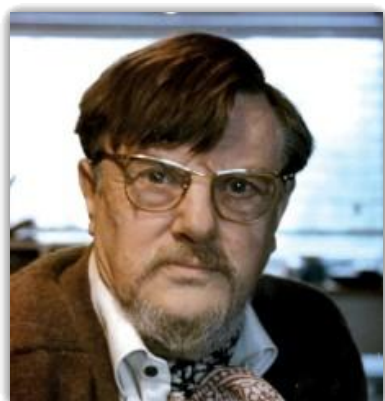
<b>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>4</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>11</b>
<b>ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....</b>	<b>12</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>13</b>
1.1 ΔΟΜΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	13
1.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΩΣ ΦΟΡΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	14
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	16
1.4 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	17
1.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	18
1.6 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	19
1.7 ΒΙΤΑΜΙΝΗ C- ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ.....	21
1.7.1 Ιστορική αναδρομή.....	21
1.7.2 Χαρακτηριστικά ασκορβικού οξέος.....	24
1.7.3 Βιταμίνη C και αντιοξειδωτική δράση.....	26
1.7.4 Βιταμίνη C και παραγωγή σε ανθρώπους.....	26
1.7.5 Διατροφική πηγή βιταμίνης C.....	28
1.7.6 Απορρόφηση βιταμίνης C.....	29
1.7.7 Μεταβολισμός βιταμίνης C.....	30
1.7.8 Νεφροί και βιταμίνη C.....	31
1.7.9 Βιταμίνη C και καρκίνος.....	31
1.7.10 Βιταμίνη C και δέρμα.....	32
1.7.11 Βιταμίνη C και τραυματισμοί.....	33
1.7.12 Βιταμίνη C και ψυχολογία.....	33
1.8 ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ-GSH.....	34
1.8.1 Χαρακτηριστικά γλουταθειόνης.....	34
1.8.2 Δομή και λειτουργίες GSH.....	35
1.8.3 Αντιοξειδωτική λειτουργία της GSH.....	36
1.8.4 GSH και κύκλος γ-γλουταμυλίου.....	37
1.8.5 Σύνθεση GSH.....	38
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>40</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>41</b>
3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	41
3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	41
3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ EA.HY926.....	42
3.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ MKN45.....	43
3.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	43
3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	44
3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΧΤΤ.....	45
3.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ GSH ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	46
3.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	47

<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>48</b>
4.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ .....	48
4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΚΙΤ ΧΤΤ .....	48
4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.....	51
4.3.1 Επίδραση γλουταθειόνης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των EA.hy926.....	51
4.3.2 Επίδραση γλουταθειόνης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων MKN45.....	52
4.3.3 Επίδραση βιταμίνης C στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων EA.hy926.....	54
4.3.4 Επίδραση βιταμίνης C στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων MKN45.....	55
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>57</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>62</b>
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>67</b>
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....</b>	<b>69</b>
<b>9. ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ .....</b>	<b>69</b>

## Πίνακας εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: ALEC D. BANGHAM.....	12
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΛΙΠΟΣΩΜΑ .....	13
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΕΪΔΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΩΝ .....	13
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΔΟΜΗ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	14
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΑΝΆΛΟΓΑ ΜΕΤΗ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ.....	15
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΠΗΓΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ .....	16
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΟΞΕΙΔΩΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ .....	17
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ .....	18
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ .....	19
ΕΙΚΟΝΑ 10: ΑΙΓΥΠΤΙΑΚΑ ΙΕΡΟΓΛΥΦΙΚΑ ΠΟΥ ΠΙΣΤΕΥΕΤΑΙ ΟΤΙ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΣΚΟΡΒΟΥΤΟ .....	21
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΕΡΥΘΡΑ ΣΤΪΓΜΑΤΑ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΑΠΌ ΣΚΟΡΒΟΥΤΟ .....	21
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΑΙΜΟΡΡΑΓΪΑ ΣΤΑ ΟΥΛΑ ΑΠΌ ΣΚΟΡΒΟΥΤΟ .....	21
ΕΙΚΟΝΑ 13: Ο JAMES LIND .....	22
ΕΙΚΟΝΑ 14: ΑΡΙΣΤΕΡΑ: Ο ΟΥΓΓΡΟΣ ALBERT SZENT-GYORGYI (1983-1986, ΒΡΑΒΕΪΟ NOBEL ΦΥΣΙΟΛΟΓΪΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 1937). ΔΕΞΪΑ: Ο ΑΜΕΡΙΚΑΝΟΣ CHARLES GLEN KING (1896-1988) .....	23
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΑΡΙΣΤΕΡΑ: WALTER NORMAN HAWORTH (1883-1950, ΒΡΑΒΕΪΟ NOBEL ΧΗΜΕΪΑΣ 1937). ΔΕΞΪΑ: EDMUND HIRST (1898-1975) .....	23
ΕΙΚΟΝΑ 16: L-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ .....	24
ΕΙΚΟΝΑ 17: ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΪΟΤΗΤΕΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	24
ΕΙΚΟΝΑ 18: ΠΑΡΑΓΩΓΗ L-ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	25
ΕΙΚΟΝΑ 19: ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	25
ΕΙΚΟΝΑ 20: ΔΡΑΣΗ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΑΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ .....	26
ΕΙΚΟΝΑ 21: Η ΈΛΛΕΪΨΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΠΟΥ ΕΜΠΟΔΪΖΕΙ ΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΣΤΟΝ ΆΝΘΡΩΠΟ .....	27
ΕΙΚΟΝΑ 22: ΔΟΜΗ ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΛΪΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΛΪΝΗΣ .....	27
ΕΙΚΟΝΑ 23: ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΑ ΜΕΣΑ ΜΕΓΕΘΗ ΤΩΝ "ΔΕΞΑΜΕΝΩΝ" ΑΑ ΚΑΙ ΟΞΑΛΟΞΙΚΟΥ ΣΤΟΝ ΆΝΘΡΩΠΟ .....	29
ΕΙΚΟΝΑ 24: ΚΥΡΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΑΑ .....	30
ΕΙΚΟΝΑ 25: ΠΈΤΡΑ ΣΕ ΝΕΦΡΑ.....	31
ΕΙΚΟΝΑ 26: ΠΑΪΔΪ ΜΕ ΚΑΡΚΪΝΟ.....	31
ΕΙΚΟΝΑ 27: ΔΟΜΗ ΈΛΙΚΑΣ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ .....	32
ΕΙΚΟΝΑ 28: ΜΙΚΡΟΦΩΤΟΓΡΑΦΪΑ ΪΝΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ .....	32
ΕΙΚΟΝΑ 29: ΠΛΗΓΗ ΣΕ ΠΟΔΪ ΜΙΚΡΟΥ ΠΑΪΔΪΟΥ.....	33
ΕΙΚΟΝΑ 30: ΜΟΡΙΟ ΓΛΟΥΤΑΘΕΪΟΝΗΣ.....	34
ΕΙΚΟΝΑ 31: ΣΥΝΤΑΚΤΪΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΪΟΝΗΣ .....	34
ΕΙΚΟΝΑ 32: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ GSH.....	37
ΕΙΚΟΝΑ 33: ΚΥΚΛΟΣ Γ-ΓΛΟΥΤΑΜΥΛΪΟΥ.....	38
ΕΙΚΟΝΑ 34: ΣΥΝΘΕΣΗ GSH .....	39
ΕΙΚΟΝΑ 35: ΘΆΛΑΜΟΣ ΚΑΘΕΤΟΥ ΝΗΜΑΤΙΚΗΣ ΡΪΗΣ ΑΕΡΑ ΣΤΟΝ ΟΠΪΟ ΕΦΑΡΜΪΣΤΗΚΑΝ ΪΛΕΣ ΟΪ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΆΝΩ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	40
ΕΙΚΟΝΑ 36: ΑΡΧΗ ΛΕΪΤΟΥΡΓΪΑΣ ΚΥΤΤΑΡΪΜΕΤΡΟΥ ΡΪΗΣ .....	41
ΕΙΚΟΝΑ 37: ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΑ.ΗΥ96 ΪΠΩΣ ΦΑΪΝΟΝΤΑΪ ΣΤΟ ΑΝΆΣΤΡΟΦΟ ΜΙΚΡΟΣΚΪΠΪΟ .....	42
ΕΙΚΟΝΑ 38: ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΚΝ45 ΪΠΩΣ ΦΑΪΝΟΝΤΑΪ ΣΤΟ ΑΝΆΣΤΡΟΦΟ ΜΙΚΡΟΣΚΪΠΪΟ .....	43
ΕΙΚΟΝΑ 39: ΑΝΤΪΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΤΡΟΓΪΗΣ ΧΤΤ ΣΕ ΦΟΡΜΑΖΆΝΗ.....	44

## Ιστορική αναδρομή



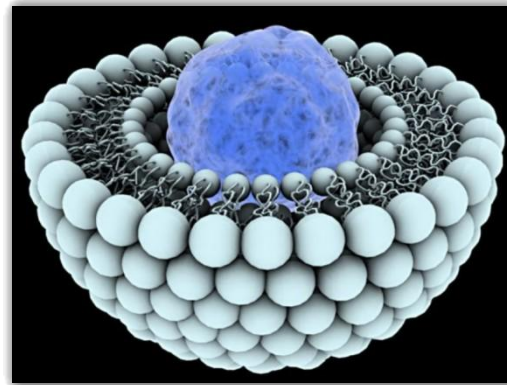
Εικόνα 1: Alec D. Bangham

Η λιπιδιακή διπλοστοιβάδα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1965 από τον Alec D. Bangham [4]. Δύο χρόνια μετά έγινε εισαγωγή του όρου «λιπόσωμα». Το 1972 και το 1974 έγινε η πρώτη χρήση των λιποσωμάτων στη μεταφορά φαρμάκων και η πρώτη ένεση λιποσωμάτων σε ασθενείς αντίστοιχα. Το 1987 έγινε η κατασκευή συνθετικών κατιοντικών λιποσωμάτων για τη μεταφορά γονιδίων σε κύτταρα. Το 1992 αποτέλεσε ένα έτος ορόσημο καθώς έγινε η πρώτη κλινική δοκιμή σε ασθενείς γονιδιακής θεραπείας για την κυστική ίνωση που βασίζεται σε λιποσωμικό μη-ϊικό φορέα. Ένα χρόνο μετά το 1993 διατίθεται στο εμπόριο το πρώτο εμβόλιο κατά του ιού της ηπατίτιδας Α το οποίο ήταν βασισμένο σε λιποσώματα. Το 1995 εγκρίνεται η εισαγωγή σε λιποσώματα των αντικαρκινικών φαρμάκων Doxorubicin και Daunorubicin. Τέλος το 1997 δημιουργείται το πρώτο λιποσωματικό DNA εμβόλιο. Από τότε ως σήμερα έχουν γίνει πολλές μελέτες και τα λιποσώματα αριθμούν πολλές εφαρμογές. Μία από αυτές είναι και η χρήση τους στη μεταφορά και στην απορρόφηση των συμπληρωμάτων διατροφής [1].

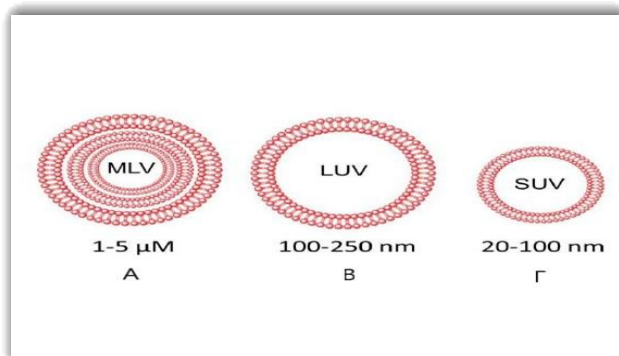
## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Δομή λιποσώματος

Οι βιολογικές μεμβράνες έχουν σαν σκοπό τον διαχωρισμό των κυτταρικών διαμερισμάτων αλλά και του περιβάλλοντος. Επίσης ελέγχουν την είσοδο και την έξοδο διαφόρων ουσιών που σχετίζονται με τη λειτουργία του κυττάρου. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επιτρέπουν συγκεκριμένες ουσίες να εισέρχονται και να εξέρχονται ρυθμίζοντας την ομοιόστασή τους [2]. Συνεπώς, η μεταφορά και η είσοδος εξωγενών ουσιών μέσα στο κύτταρο αποτελεί ένα στοίχημα. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν οι λιποσωμακές φόρμουλες που έχουν σαν σκοπό τη μεταφορά και την στοχευόμενη απελευθέρωση διαφόρων ουσιών [3].



Εικόνα 2: Λιπόσωμα



Εικόνα 3: Είδη λιποσωμάτων

Στη πτυχιακή αυτή εργασία έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των λιποσωμακών σκευασμάτων σε κυτταρικές σειρές. Με τον όρο λιπόσωμα εννοούμε σφαιρικά κολλοειδή σωματίδια τα οποία αποτελούνται από μία αμφιπαθή λιπιδική

διπλοστοιβάδα στο εσωτερικό της οποίας υπάρχει το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο διασπείρονται τα λιποσώματα [2-4]. Όπως αναφέρθηκε τα λιποσώματα είναι αμφιπαθή μόρια δηλαδή έχουν και υδρόφιλη και υδρόφοβη περιοχή για το λόγο αυτό απομονώνουν τις υδρόφοβες περιοχές σε διπλοστοιβάδες, οι οποίες ονομάζονται lamellae [2]. Η διπλοστοιβάδα αυτή αποτελείται από αυτοσυγκρατούμενα μόρια φωσφολιπιδίων. Το μέγεθος των λιποσωμάτων

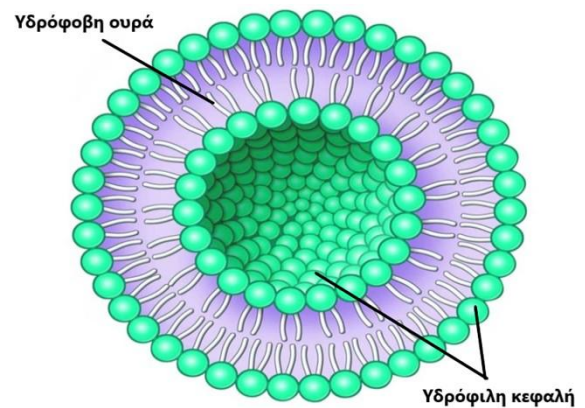
ποικίλλει ανάλογα από μερικά νανόμετρα έως και μερικά μικρόμετρα. Ανάλογα με τον αριθμό των διπλοστοιβάδων και το μέγεθος τα λιποσώματα χωρίζονται σε κάποιες κατηγορίες. Αρχικά υπάρχουν τα πολυελασματώδη κυστίδια MLV (Εικόνα 3Α) και τα μονοστρωματικά. Τα τελευταία διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες: τα μεγάλα μονοστρωματικά LUV (Εικόνα 3Β) και τα μικρά μονοστρωματικά SUV (Εικόνα 3Γ) [4,6].

Η δομική μονάδα των λιποσωμάτων είναι συνήθως τα φωσφολιπίδια (μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά λιπιδίων) των οποίων η δομή έχει ως εξής: αποτελείται από μία υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά. Λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων τα φωσφολιπίδια συντήκονται σε μία διπλοστοιβάδα όπου το υδρόφιλο τμήμα

βρίσκεται εξωτερικά και εσωτερικά (υδρόφιλο πυρήνα)

όπου το λιπόσωμα έρχεται σε επαφή με το νερό ενώ στο

εσωτερικό των υδρόφιλων περιοχών βρίσκονται οι υδρόφοβες ουρές [3-4]. Η δομή φαίνεται στη δίπλα εικόνα.

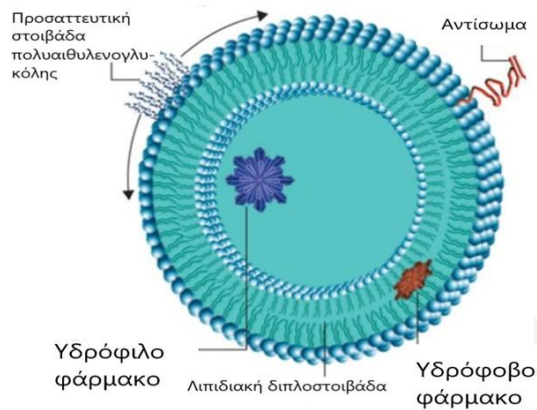


Εικόνα 4: Δομή λιποσώματος

## 1.2 Λιποσώματα ως φορείς φαρμάκων.

Τα τελευταία χρόνια έχει εξελιχθεί ένας νέος τομέας που αφορά τη χρήση λιποσωμάτων για τη χορήγηση φαρμάκων. Αυτό που συμβαίνει στη πραγματικότητα με αυτή τη διαδικασία είναι η ενσωμάτωση του φαρμάκου στο λιπόσωμα ανάλογα με το αν είναι υδρόφιλο ή υδρόφοβο. Πιο συγκεκριμένα στη περίπτωση που το φάρμακο είναι υδρόφιλο εσωκλείεται στον υδρόφιλο πυρήνα το λιποσώματος ενώ αν είναι υδρόφοβο παραμένει στη διπλοστοιβάδα μεταξύ των υδρόφοβων ουρών των φωσφολιπιδίων [5-6].

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται σαν φορείς φαρμάκων καθώς έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως βιοσυμβατότητα, χαμηλή τοξικότητα, υψηλή ικανότητα φόρτωσης, αποφυγή μεταβολισμού πρώτου περάσματος, μείωση σοβαρών παρενεργειών που μπορεί να προκύψουν από υψηλή συστηματική απορρόφηση και τέλος ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου σε επιθυμητές συγκεντρώσεις [5,7].



Εικόνα 5: Περιοχή εναπόθεσης φαρμάκου ανάλογα με τη πολικότητα

Από την άλλη πλευρά τα λιποσώματα που χρησιμοποιούνται σαν φορείς φαρμάκων έχουν να αντιμετωπίσουν κάποια προβλήματα :

- Τα λιποσώματα τείνουν να συντήκονται ή/και να συσσωματώνονται με αποτέλεσμα την ανώριμη απελευθέρωση ωφέλιμου φορτίου.
- Τα λιποσώματα συχνά καταστρέφονται από τα φαγοκύτταρα.
- Δυσκολία χρήσης λιποσωμάτων για τη μεταφορά φαρμάκων με : υψηλή υδροφοβικότητα ή με έλλειψη ιονιζόμενης ομάδας [7].

Όσον αφορά τη καταστροφή των λιποσωμάτων από τα φαγοκύτταρα μία λύση αποτελεί η επιφανειακή τροποποίηση επικαλύπτοντας την επιφάνεια των λιποσωμάτων με αδρανή βιοσυμβατά υδρόφιλα πολυμερή, όπως πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η οποία προκαλεί στερική σταθεροποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται διότι τα μόρια αυτά παρεμποδίζουν στερεοχημικά τη προσκόλληση οψινών ορού στη λιποσωματική επιφάνεια, κάτι που οδηγεί στην επιβράδυνση της φαγοκύτωσης τους. Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης του παραπάνω προβλήματος είναι η χρήση κορεσμένων φωσφολιπιδίων ή/και η ενσωμάτωση χοληστερόλης η οποία αυξάνει τη συσσώρευση φωσφολιπιδίων στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα. Η όλη αυτή διαδικασία οδηγεί στη μείωση πρόσληψης των λιποσωμάτων από τα

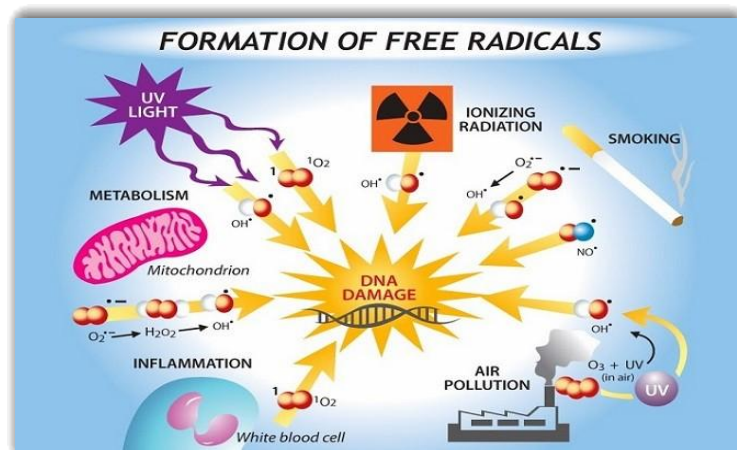


φαγοκύτταρα. Τέλος μία ακόμα λύση είναι να χορηγηθούν μεγάλες <<προ-δόσεις>> λιποσωμάτων για να έρθουν τα μακροφάγα σε κορεσμό [7].

Για τα πολύ υδρόφοβα φάρμακα και αυτά με έλλειψη ιονιζόμενης ομάδας που αντιμετωπίζουν πρόβλημα με την είσοδο τους στα λιποσώματα, λύση αποτελεί η προσθήκη τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών με ιονιζόμενες ομάδες στην επιφάνεια των λιποσωμάτων. Οι κυκλοδεξτρίνες βοηθούν στην εγκόλπωση των φαρμάκων και στη μεταφορά μέσω πλασματικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας διαβάθμισης συγκέντρωσης [7].

### 1.3 Οξειδωτικό stress

Ο πρώτος ορισμός του οξειδωτικού stress δόθηκε από τον Helmut Sies το 1985. Ονομάστηκε, η κατάσταση κατά την οποία τα επίπεδα των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) ξεπερνούν υπερβολικά το απόθεμα των



Εικόνα 6: Πηγές οξειδωτικού στρες

αντιοξειδωτικών, οδηγώντας σε πιθανή καταστροφή των βιολογικών συστημάτων [8]. Ένας δεύτερος ορισμός που χρησιμοποιείται ευρέως μέχρι και σήμερα έχει ως εξής, οξειδωτικό stress αναφέρεται σε μία σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού [9]. Ένας τελευταίος ορισμός που δόθηκε πρόσφατα αναφέρει πως οξειδωτικό stress είναι η διαταραχή οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (Dean P. Jones) [10-11].

Με τον όρο οξειδοαναγωγική σηματοδότηση εννοούμε τη διαδικασία κατά την οποία οι δραστικές ρίζες αλλάζουν τη λειτουργία και τη δράση των μοριακών



στόχων της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης (σηματοδοτικές πρωτεΐνες και μεταβολικά ένζυμα) οδηγώντας σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις. Στη περίπτωση αυτή οι ελεύθερες ρίζες δρουν σαν δεύτεροι διαβιβαστές για να ρυθμίσουν βασικές λειτουργίες του κυττάρου [9].

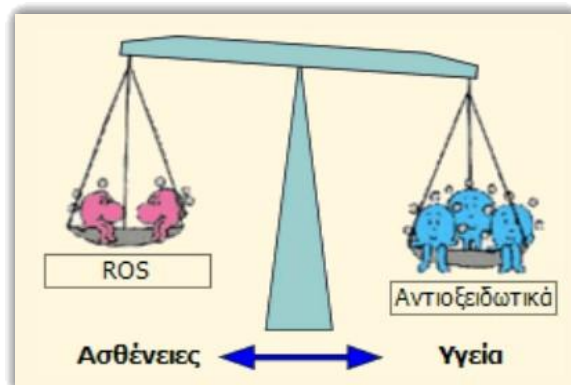
Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι ένας ευρέως διαδεδομένος όρος, όμως υπάρχουν πολλοί ακόμα που χρησιμοποιούνται όπως είναι ενεργοί μεταβολίτες οξυγόνου (ROM), ενεργά ενδιάμεσα οξυγόνου (ROI) και ρίζες οξυγόνου. Μεταξύ των ROS υπάρχουν κάποιες οι οποίες περιέχουν ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων και αυτές ονομάζονται ελεύθερες ρίζες. Με άλλα λόγια ελεύθερες ρίζες ονομάζονται τα χημικά μόρια που υφίστανται αυτόνομα και περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα μόρια ηλεκτρονίων [8].

#### 1.4 Ελεύθερες ρίζες

Βασικός όρος της οξειδοαναγωγικής Βιολογίας είναι οι ελεύθερες ρίζες. Ελεύθερη ρίζα (free radical) είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα και με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης. Ανάλογα με το κεντρικό άτομο διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες όπως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και χλωρίου (RCS) [8].

Οι δραστικές μορφές και οι ελεύθερες ρίζες έχουν διττό ρόλο καθώς δεν εμφανίζουν μόνο μειονεκτήματα όπως όλοι γνωρίζουν αλλά και πλεονεκτήματα.

Στα μειονεκτήματα εμπεριέχονται η προσβολή των μορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA τροποποιώντας τις βασικές λειτουργίες τους. Επίσης



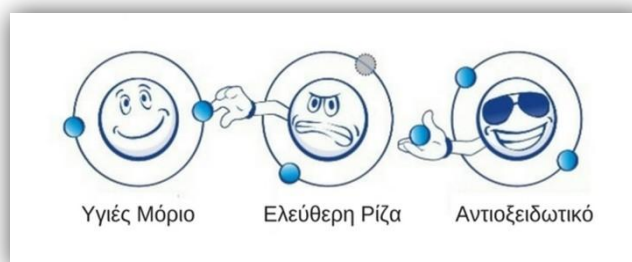
Εικόνα 7: Οξειδοαναγωγική ισορροπία

αποτελούν βασικό μοριακό σύμπτωμα πολλών ασθενειών και άλλων καταστάσεων (καρκίνος, διαβήτης, νευροεκφυλιστικές νόσοι, γήρανση, ασκησιογενές οξειδωτικό stress). Πέρα από αυτά τα μειονεκτήματα εμφανίζουν και πλεονεκτήματα καθώς προάγουν τη κυτταρική σηματοδότηση ενώ επίσης προκαλούν χρήσιμες προσαρμογές μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αυτές [8-9].

## 1.5 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό ονομάζεται η ουσία που προλαμβάνει μειώνει ή επιδιορθώνει τα προβλήματα που προκάλεσαν στον οργανισμό οι ROS. Αλλιώς αντιοξειδωτικά είναι οι ενώσεις που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ανάλογα με το υπόστρωμα τους καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση του υποστρώματος [8-9]. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν τρεις κατηγορίες αντιοξειδωτικών:

- Αντιοξειδωτικά που «καθαρίζουν» αμέσως τις ROS που δημιουργήθηκαν.



- Αντιοξειδωτικά που αναστέλλουν τον σχηματισμό ROS από τις κυτταρικές πηγές τους.

- Αντιοξειδωτικά που επιδιορθώνουν τη ζημία ή τις μετατροπές που προκάλεσαν οι ROS [9].

Εικόνα 8: Δράση αντιοξειδωτικών

Κάποια παραδείγματα αντιοξειδωτικών φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

ΚΥΡΙΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	
Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (Mn, Cu, Zn)	Απομακρύνει τη $O_2^{\cdot -}$
Καταλάση (Fe)	Απομακρύνει το $H_2O_2$ (σε υψηλές συγκεντρώσεις)
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Se)	Απομακρύνει τα υδροϋπεροξειδία και το $H_2O_2$ (σε χαμηλές συγκεντρώσεις)
Αναγωγή της Γλουταθειόνης	Ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη
Τρανσφέρση της Γλουταθειόνης	Απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Οξειδάση του Κυτοχρώματος (Cu)	Παράγει $O_2$ στην αναπνευστική αλυσίδα
Γλουταθειόνη	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες
Ουρικό οξύ	απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Αλβουμίνη	Αδρανοποιεί τη $ROO^{\cdot}$ και τη $OH^{\cdot}$
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	Δεσμεύει Cu, αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες (HClO)
Βιταμίνη E (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες)	Αδρανοποιεί τη $OH^{\cdot}$
β-Καροτένιο	Διασπάει τις αλυσίδες των ελευθέρων ριζών
Ουβικινόλη	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες
Ουβικινόνη (Συνένζυμο Q)	Παράγει $O_2$ στην αναπνευστική αλυσίδα
Χολερυθρίνη	Συμμετέχει στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας
	Αδρανοποιεί τη $ROO^{\cdot}$

Πίνακας 1: Κύρια Αντιοξειδωτικά

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών γίνεται σε δύο φάσεις. Η φάση I συμπεριλαμβάνει αντιδράσεις όπως οξείδωση, αναγωγή και υδρόλυση. Η φάση II περιλαμβάνει αντιδράσεις σύζευξης όπως η σύζευξη με ενδογενής κυτταρικούς προσδέτες [8].

## 1.6 Συμπληρώματα Διατροφής

Συμπλήρωμα διατροφής ονομάζονται οι συμπυκνωμένες πηγές θρεπτικών συστατικών που έχουν συμπληρωματικό ρόλο στη δίαιτα – συμπληρώνουν αλλά δεν υποκαθιστούν τα θρεπτικά συστατικά της διατροφής. Τα συμπληρώματα διατροφής συμπεριλαμβάνουν: βιταμίνες, πρωτεΐνες,



Εικόνα 9: Συμπληρώματα διατροφής

αμινοξέα, υδατάνθρακες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, μεταβολίτες, λιπαρά οξέα και σκευάσματα φυτικών προϊόντων. Τα συμπληρώματα διατροφής διατίθενται στο εμπόριο με διάφορες μορφές όπως κάψουλες, χάπια, παστίλιες, σκόνες και σταγόνες [12]. Σύμφωνα με τον EFSA (European Food Safety Community) δεν θεωρείται φάρμακο και δεν είναι απαραίτητη η συνταγή γιατρού.

Τα συμπληρώματα διατροφής ενδείκνυται σε άτομα που δεν έχουν ισορροπημένη διατροφή, έχουν έλλειψη από κάποια θρεπτικά ή βιταμίνες καθώς και άτομα με αυξημένες ενεργειακές ανάγκες. Πιο συγκεκριμένα απευθύνονται σε άτομα που έχουν έντονους ρυθμούς ζωής, σε άτομα που ακολουθούν συγκεκριμένη διατροφή όπως είναι οι vegetarian ή οι vegan, σε γυναίκες κατά τη περίοδο του θηλασμού ή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τέλος σε όσους λαμβάνουν φάρμακα που εμποδίζουν την απορρόφηση ή την απέκκριση των θρεπτικών συστατικών [12].

## 1.7 Βιταμίνη C- Ασκορβικό οξύ

### 1.7.1 Ιστορική αναδρομή

Η βιταμίνη C ανακαλύφθηκε μέσω της ασθένειας που προκαλούσε που δεν είναι άλλη από το σκορβούτο. Η νόσος σκορβούτο περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη(460-380πΧ). Αργότερα ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος(23-79μΧ) καταγράφει μία ασθένεια που σκότωνε τους στρατιώτες Ρωμαίους με συμπτώματα ίδια με αυτά του σκορβούτου. Σαν θεραπεία είχε χρησιμοποιηθεί το φυτό Herba Britannica. Αργότερα κατέληξαν πως η νόσος αυτή οφείλεται σε έλλειψη του ασκορβικού οξέος.



Εικόνα 10: Αιγυπτιακά ιερογλυφικά που πιστεύεται ότι αναφέρονται στο σκορβούτο

Τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν μυϊκή αδυναμία, πόνοι στις αρθρώσεις, εμφάνιση εξανθημάτων, αιμορραγία στα ούλα και απώλεια δοντιών. Αν δεν αντιμετωπιστεί άμεσα μπορεί να προκληθούν σοβαρότερα προβλήματα όπως ίκτερος, αναιμία, καρδιακή ανεπάρκεια μέχρι και θάνατος.

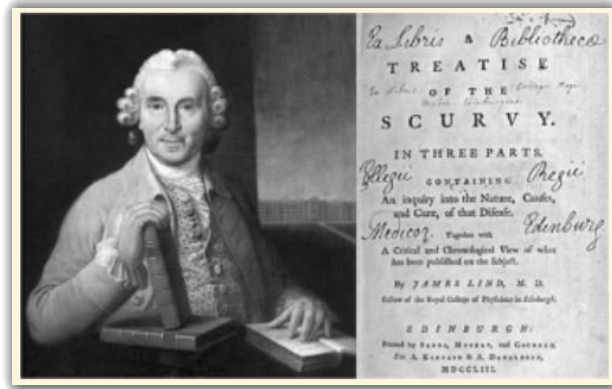


Εικόνα 11: Ερυθρά στίγματα στο δέρμα από σκορβούτο



Εικόνα 12: Αιμορραγία στα ούλα από σκορβούτο

Παλιά θεωρούσαν ότι η νόσος σκορβούτο και συνεπώς έλλειψη βιταμίνης C αφορά τους ναυτικούς στην εποχή των εξερευνησεων. Αυτό οφειλότανε στο γεγονός ότι μετά από κάποιο χρονικό διάστημα τελείωναν τα φρούτα και τα λαχανικά με αποτέλεσμα την



Εικόνα 13: Ο James Lind

έλλειψη βιταμίνης C [14]. Παράδειγμα αποτελεί ότι κατά τον γύρω της γης με τον Μαγγελάνο το 80% του πληρώματος απεβίωσε λόγω του σκορβούτο. Ο Σκώτος ιατρός James Lind (1716-1794) ήταν αυτός που παρατήρησε πρώτος ότι τα εσπεριδοειδή βοηθάνε στην ασθένεια που αντιμετώπιζαν οι ναυτικοί. Ο Lind πίστευε πως η ασθένεια οφείλεται στην αδυναμία των πόρων των ναυτικών να αποβάλλουν τις τοξίνες λόγω του θαλασσινού αέρα. Το 1753 ο Lind κατέγραψε την ασθένεια στο βιβλίο με τίτλο "A TREATISE OF THE SCURVY" (A. Millar, Λονδίνο, 1753) όμως κανένας δεν έδωσε ιδιαίτερη σημασία στις παρατηρήσεις του.

Μέχρι που ο James Cook (1728-1779), εξερευνητής, φρόντιζε να έχει πάντα στα ταξίδια του φρούτα και λαχανικά για αυτόν και το πλήρωμα του καθώς ακολούθησε τις παρατηρήσεις του Lind περί εσπεριδοειδών. Σκορβούτο βέβαια δεν αντιμετώπιζαν μόνο στη θάλασσα αλλά και στη στεριά όπως συνέβη με το «μεγάλο λιμό της πατάτας» στην Ιρλανδία το 1945. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι Εσκιμώοι παρότι κατοικούσαν σε αφιλόξενα κλίματα δεν είχαν προβλήματα με έλλειψη βιταμίνης C γιατί κατανάλωναν ωμά όργανα ζώων όπως ήπαρ από φώκιες, τα οποία πλέον γνωρίζουμε ότι είναι πλούσια σε ασκορβικό οξύ.





Εικόνα 14: Αριστερά: ο Ούγγρος Albert Szent-Gyorgyi (1883-1986, βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής 1937). Δεξιά: ο Αμερικανός Charles Glen King (1896-1988)

Η απομόνωση του ασκορβικού οξέος έγινε για πρώτη φορά από τον χημικό Casimir Funk(1884-1967), το 1912, ο οποίος υπέθεσε ότι το σκορβούτο οφείλεται σε μία υδατοδιαλυτή ουσία την οποία ονόμασε αντισκορβουτικό παράγοντα. Μέχρι που το 1920 ο χημικός Jack Cecil Drummond (1891-1952) την ονόμασε βιταμίνη C. Το

1931 ο Albert Szent Gyorgyi έκανε την έρευνα του στο εξουρονικό οξύ ( ασκορβικό οξύ) ως τον αντισκορβουτικό παράγοντα. Ταυτόχρονα με τον Albert Szent Gyorgyi, ο Charles Glen King επιβεβαίωσε ότι το λεγόμενο εξουρονικό οξύ (αντισκορβουτικός παράγοντας) ήταν η βιταμίνη C.

Τέλος η εξακρίβωση της δομής του ασκορβικού οξέος έγινε από τους χημικούς Walter Norman Hawroth και Edmund Hirst. Αρχικά οι δύο επιστήμονες έδωσαν το όνομα ασκορβικό οξύ στην συγκεκριμένη ένωση και αργότερα την ολοκληρωμένη ονομασία L-ασκορβικό οξύ με βάση την οπτική του ισομέρεια.

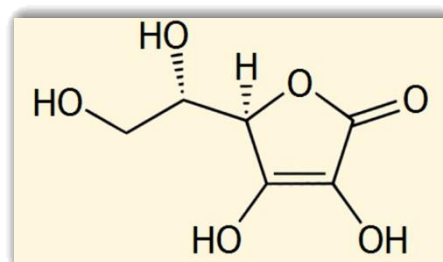


Εικόνα 15: Αριστερά: Walter Norman Haworth (1883-1950, βραβείο Nobel Χημείας 1937). Δεξιά: Edmund Hirst (1898-1975)

Μεγάλη μελέτη για τη βιταμίνη C έγινε στις χελώνες οι οποίες εμφανίζουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της βιταμίνης στον εγκέφαλο. Αυτό φαίνεται ότι συμβαίνει καθώς κατά την βύθιση τους σε μεγάλα βάθη όπου η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλή η βιταμίνη μπορεί να προλάβει τυχόν οξειδωτικές βλάβες στους νευρώνες.

### 1.7.2 Χαρακτηριστικά ασκορβικού οξέος

Η βιταμίνη C γνωστή και ως ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη με λευκούς ή υπόλευκους κρυστάλλους που έχει όξινη γεύση που είναι όμως ευχάριστη [15].



Εικόνα 16: L-ασκορβικό οξύ

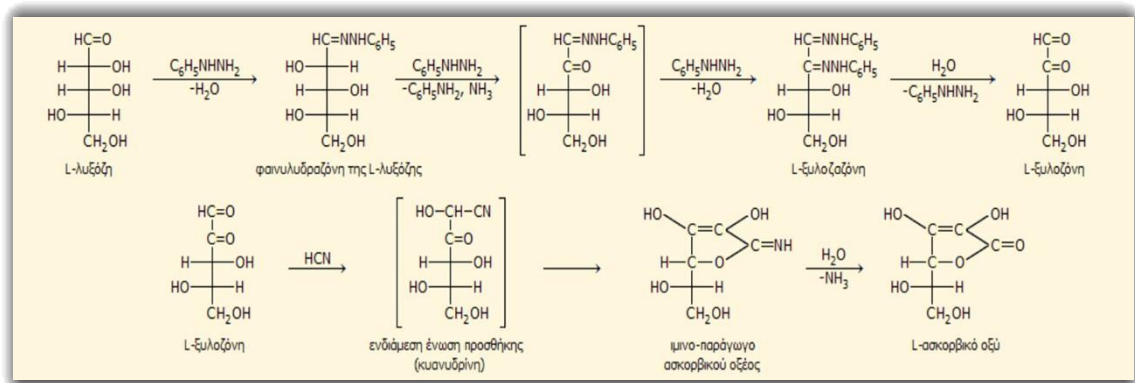
Μερικά χαρακτηριστικά της ένωσης είναι τα εξής:

Μοριακός τύπος:  $C_6H_8O_6$   
Σχετική μοριακή μάζα: 176,12  
Σημείο τήξεως: 190-192°C (υπό αποσύνθεση)  
Σημείο ζέσεως: αποσυντίθεται  
Πυκνότητα: 1,65 g/cm<sup>3</sup>  
Ειδική στροφική ικανότητα,  $[\alpha]_D^{25}$ : +(20,5 έως 21,5°) (c σε ύδωρ)  
Διαλυτότητα: στο νερό: 330 g/L, στη μεθανόλη: 20 g/L  
Αδιάλυτο στον διαιθυλαιθέρα, στο χλωροφόρμιο και στο βενζόλιο.  
Διπρωτικό οξύ,  $pK_1 = 4,17$ ,  $pK_2 = 11,57$ . pH υδατικού διαλύματος 5%: 2,2-2,5  
Τοξικότητα: LD<sub>50</sub> = 11,9 g/kg (επίμυες, δια της στοματικής οδού)  
Σταθερή ένωση όταν είναι ξηρή. Σε διαλύματα οξειδώνεται από τον αέρα και ταχύτερα και κατά την έκθεση στο φως και παρουσία αλάτων σιδήρου και χαλκού. Ταχύτερα οξειδώνεται σε αλκαλικά διαλύματα.

Εικόνα 17: Φυσικοχημικές ιδιότητες ασκορβικού οξέος



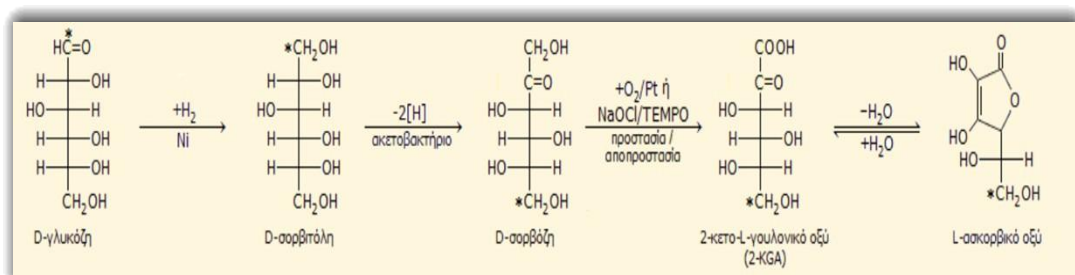
Η παρασκευή του ασκορβικού οξέος από τους Harworth και Hirst φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 18: Παραγωγή L-ασκορβικού οξέος

Ο Haworth για την παραγωγή του ασκορβικού οξέος ξεκίνησε από την L-λυξόζη. Από την L-λυξόζη παράχθηκε η L-ξυλόζη και έτσι έφτασε στην παραγωγή του L-ασκορβικού οξέος.

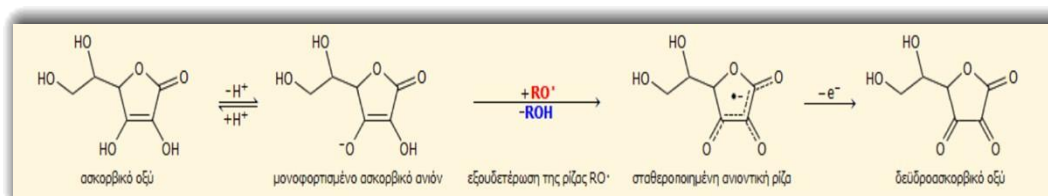
Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή ασκορβικού είναι αυτή του Reichstein η οποία και αποτέλεσε τη βάση της βιομηχανικής παραγωγής της ουσίας. Η μέθοδος είναι βιομηχανική καθώς χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί για την παραγωγή ασκορβικού. Οι αντιδράσεις που έλαβαν μέρος φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 19: Βιομηχανική παραγωγή ασκορβικού οξέος

### 1.7.3 Βιταμίνη C και αντιοξειδωτική δράση

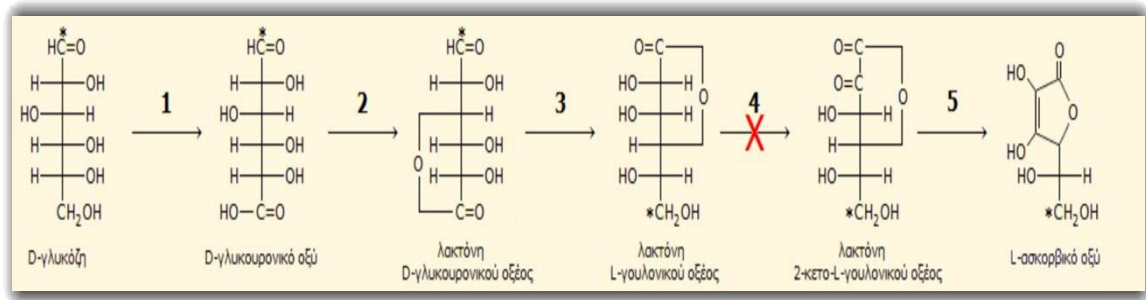
Το ασκορβικό οξύ είναι ένα από τα βασικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού. Σε ουδέτερο pH το ασκορβικό οξύ βρίσκεται στη μορφή μονοφορτισμένου ανιόντος. Το μονοφορτισμένο ανιόν αυτό μπορεί να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες με τη παροχή μιας ρίζας υδρογόνου ή αλλιώς με τη παροχή ενός πρωτονίου. Απώλεια ενός επιπλέον ηλεκτρονίου από την ανιοντική ρίζα είναι ο σχηματισμός του δευδροασκορβικού οξέος [13].



Εικόνα 20: Δράση ασκορβικού οξέος σαν αντιοξειδωτικό

### 1.7.4 Βιταμίνη C και παραγωγή σε ανθρώπους

Η πρώτη αναφορά ότι το ασκορβικό οξύ μετατρέπεται σε οξαλοξικό σε ανθρώπους ήταν το 1958 από τους Hellman και Burns. Οι παραπάνω επιστήμονες ανέφεραν ότι το οξαλοξικό ήταν το κύριο προϊόν της βιταμίνης C που απεκκρίνεται στα ούρα [13]. Οι άνθρωποι όπως και κάποια άλλα πρωτεύοντα όπως ινδικά χοιρίδια, μερικά ψάρια και νυχτερίδες χρειάζεται να προσλαμβάνουν AA (ασκορβικό οξύ) από τη τροφή τους καθώς σε αυτά τα είδη η δραστηριότητα ενός βασικού ενζύμου που εμπλέκεται στη σύνθεση του AA, η οξειδάση της L-γουλόνου-1,4-λακτόνης απουσιάζει. Το γονίδιο που κωδικοποιεί αυτό το ένζυμο εξακολουθεί να υπάρχει στο ανθρώπινο γονιδίωμα αλλά έχει υποστεί αρκετές μεταλλάξεις που το καθιστούν μη λειτουργικό. Αυτή η απώλεια λειτουργίας χρονολογείται 45 εκατομμύρια χρόνια πριν και πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα κάποιας εξελικτικής πίεσης [13-14].

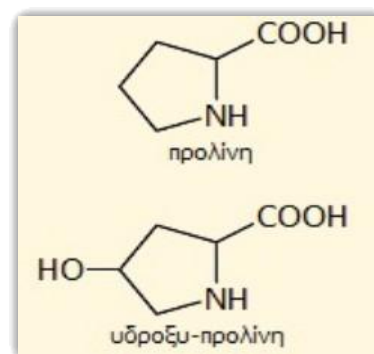


Εικόνα 21: Η έλλειψη του ενζύμου που εμποδίζει τη παρασκευή ασκορβικού στον άνθρωπο

Ο Halliwell πρότεινε ότι η απώλεια αυτού του ενζύμου και της οξειδάσης της ουρίας στους ανθρώπους ήταν εξελικτικά βήματα για τη μείωση παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου. Οι Grano και De Tullio πρότειναν ότι η αδυναμία σύνθεσης AA μπορεί να καταστήσει έναν οξειδωτικό αισθητήρα στρες καθώς απαιτείται η υδροξυλίωση του επαγωγίμου παράγοντα υποξίας HIF για να προκαλέσει υποξική απόκριση.

Ο κύριος λειτουργικός ρόλος που συνήθως αποδίδεται στο AA είναι ο ρόλος του ως υδατοδιαλυτού αντιοξειδωτικού. Το AA έχει την ικανότητα να καθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες σχηματίζοντας μια πιο σταθερή ρίζα ασκορβυλίου. Δύο από αυτές τις ρίζες μπορούν να αντιδράσουν για να σχηματίσουν AA και δευδροασκορβικό οξύ (DHA), την οξειδωμένη μορφή του AA [13].

Τα βασικά συμπτώματα της ανεπάρκειας AA (σκορβούτο) προκύπτουν από μία ανώμαλη σύνθεση κολλαγόνου λόγω μειωμένης υδροξυλιωμένης προλίνης και λυσίνης. Το AA απαιτείται για μια ποικιλία βιοσυνθετικών οδών, ιδιαίτερα εκείνων που περιλαμβάνουν αντιδράσεις υδροξυλίωσης και αμιδίωσης. Αυτές οι αντιδράσεις εκτός από αυτές που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, περιλαμβάνουν την υδροξυλίωση της ντοπαμίνης προς τη νορεπινεφρίνη σε κόκκους χρωφίνης του επνεφριδικού μυελού, την α-αμιδίωση της γλυκίνης στα



Εικόνα 22: Δομή υδροξυπρολίνης και προλίνης

πεπτίδια της υπόφυσης, την υδρξυλίωση προλυλίου σε HIF και την απομεθυλίωση ιστόνης.

### 1.7.5 Διατροφική πηγή βιταμίνης C

Η ημερήσια πρόσληψη AA που συνιστάται σήμερα από το Ινστιτούτο Ιατρικής στις ΗΠΑ είναι 75 mg/ημέρα για τις ενήλικες γυναίκες και 90 mg/ημέρα για ενήλικους άντρες. Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι σημαντικές πηγές βιταμίνης C. Ορισμένα κρέατα όπως το συκώτι μπορούν επίσης να συμβάλουν ουσιαστικά. Το περιεχόμενο σε βιταμίνη C μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη ποικιλία, την ανάπτυξη, τις συνθήκες αποθήκευσης καθώς και τη μέθοδο παρασκευής τροφίμων. Για παράδειγμα το 1/3 του AA χάθηκε κατά την αποθήκευση του σπανακιού στους 4°C για 2 εβδομάδες. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα πηγών βιταμίνης C φαίνονται στο παρακάτω πίνακα [13].

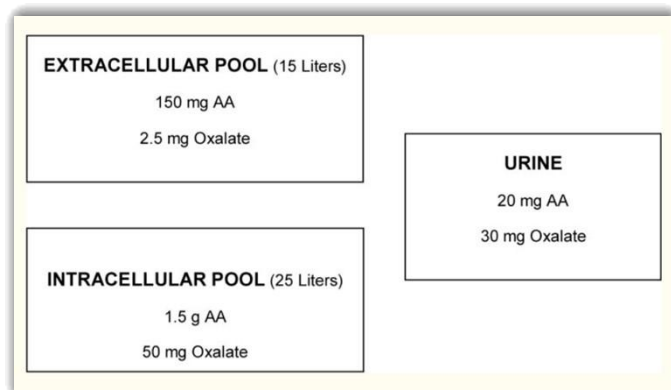
Τροφή	Βιταμίνη C (mg/100g)
Μαϊντανός	133,0
Φράουλα	58,8
Καυτερή πράσινη πιπεριά	242,5
Ακτινίδιο	92,7
Λεμόνι	53
Πορτοκάλι	53,2
Μπρόκολο	89,2
Παπάγια	60
Κόκκινη πιπεριά	127,7
Πεπόνι	40

Πίνακας 2: Πηγές βιταμίνης C

### 1.7.6 Απορρόφηση βιταμίνης C

Η απορρόφηση του AA στο ανθρώπινο έντερο δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως. Ένας εξαρτώμενος από το νάτριο μεταφορέας AA (SVTC1) που κωδικοποιείται από το γονίδιο SLCA23A1 έχει ταυτοποιηθεί στο λεπτό έντερο των θηλαστικών και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του AA. Επίσης οι μεταφορείς γλυκόζης GLUT2 και GLUT8 φαίνεται να παίζουν ρόλο στην απορρόφηση του AA.

Γενικά οι γνώσεις για την κατανομή του AA στους ιστούς είναι περιορισμένη. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν δύο μεγάλες «δεξαμενές» AA στο σώμα. Η πρώτη δεξαμενή αποτελείται από το πλάσμα και το εξωκυττάριο υγρό που



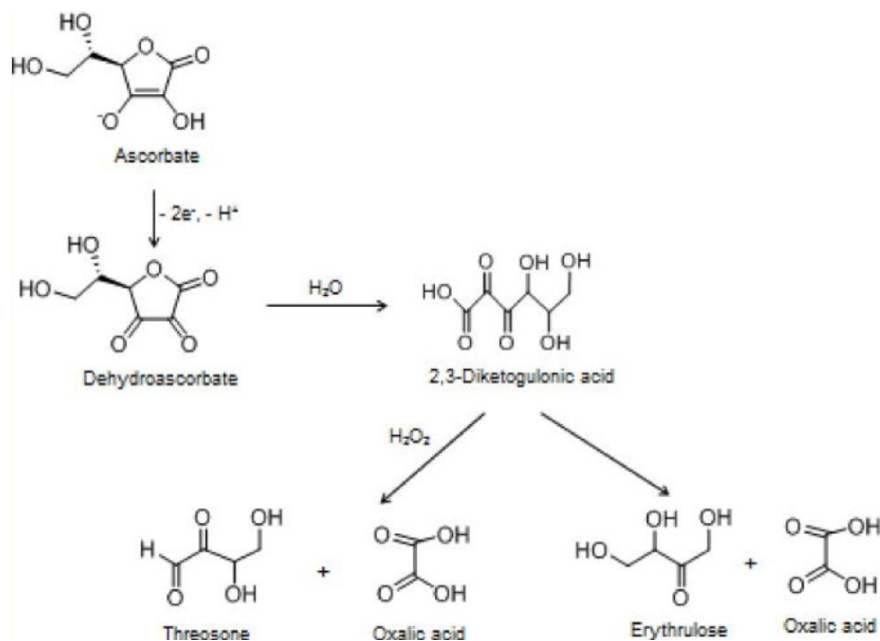
Εικόνα 23: Εκτιμώμενα μέσα μεγέθη των "δεξαμενών" AA και οξαλοξικού στον άνθρωπο

περιέχει 150mg AA. Το δεύτερο διαμέρισμα πιθανώς αντιπροσωπεύει το AA στο εσωτερικό των κυττάρων και είναι περίπου 1-1,5g. Οι μύες φαίνεται να έχουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις AA [13].

Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι η αποβολή του AA από το σώμα πιστεύεται ότι γίνεται εξ ολοκλήρου μέσω των νεφρών. Τα εγγύς σωληνάκια περιέχουν SVTC1 που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην επαναρρόφηση του φιλτραρισμένου AA σε συνδυασμό με τους μεταφορείς GLUT [13].

### 1.7.7 Μεταβολισμός βιταμίνης C

Το AA που κυκλοφορεί στον οργανισμό μπορεί να παραληφθεί και να συγκεντρωθεί σε κύτταρα και ιστούς όπου μπορεί να δράσει σαν αντιοξειδωτικό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ρίζας ασκορβιλίου. Η απώλεια ενός περαιτέρω ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό DHA. Δύο ρίζες ασκορβιλίου μπορούν να δώσουν AA και DHA. Το DHA μπορεί επίσης να μετατραπεί σε AA μέσω αλληλεπίδρασης με ανοιγμένη γλουταθειόνη. Η γλουταρεδοξίνη και πιθανώς άλλα ένζυμα έχουν αναφερθεί ότι παίζουν ρόλο σε αυτήν την αναγωγή. Ο σχηματισμός και η απομάκρυνση του DHA είναι δυνητικά σημαντικός για το σχηματισμό οξαλοξικού από το AA καθώς ένα κλάσμα του DHA σχηματίζει αμετάκλητα το δικετογλουλονικό οξύ ανοιχτής αλυσίδας (DKG), ένα ασταθές μόριο που μπορεί να διαλυθεί σε οξαλοξικό [13].



Εικόνα 24: Κύρια μονοπάτια μεταβολισμού AA

### 1.7.8 Νεφροί και βιταμίνη C

Η συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης AA και σχηματισμού πέτρας στα νεφρά αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Taylor. Οι άνδρες με πρόσληψη >218mg/ημέρα είχαν 31% υψηλότερο κίνδυνο



Εικόνα 25: Πέτρα σε νεφρά

σχηματισμού λίθων από αυτούς που καταναλώνουν <105mg/ημέρα. Τα συμπληρώματα AA αύξησαν επίσης τον κίνδυνο με πρόσληψη >1000mg/ημέρα που σχετίζεται με αύξηση 16% σε σχέση με αυτούς που δε λαμβάνουν συμπληρώματα.

Τέλος η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων απαιτεί τη προσθήκη 200mg AA σε παρασκευάσματα πολυβιταμινών που χρησιμοποιούνται σε παρεντερικά διαλύματα για την κάλυψη των καθημερινών διατροφικών απαιτήσεων [13].

### 1.7.9 Βιταμίνη C και καρκίνος

Σε ασθενείς με καρκίνο τα φαρμακολογικά επίπεδα της βιταμίνης C μπορούν αν επιτευχθούν παρεντερικά με ελάχιστη τοξικότητα και έχουν την δυνατότητα ευρείας αποτελεσματικότητας στη θεραπεία του καρκίνου.

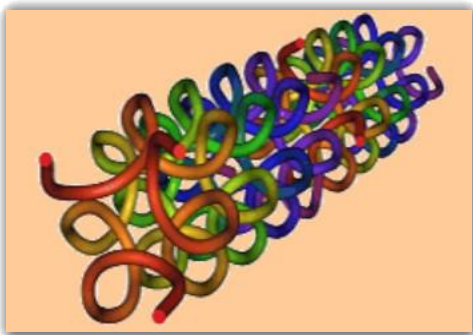


Εικόνα 26: Παιδί με καρκίνο



Η διατήρηση μίας διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C θα μπορούσε να βοηθήσει στην καταστολή της εξέλιξης του καρκίνου και οι φαρμακολογικές δόσεις μπορούν να «συνεργαστούν» με υπομεθυλίωση του DNA ή θεραπείες που καταστρέφουν το DNA για να βελτιώσουν τα αποτελέσματα σε ασθενείς με καρκίνο [15].

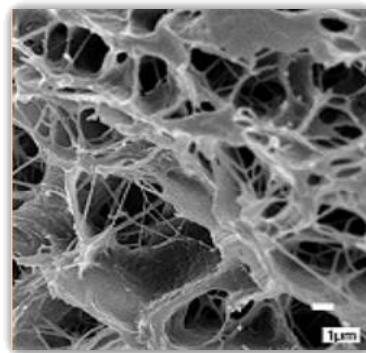
### 1.7.10 Βιταμίνη C και δέρμα



Εικόνα 27: Δομή έλικας κολλαγόνου

Οι ινοβλάστες του δέρματος έχουν απόλυτη εξάρτηση από τη βιταμίνη C για τη σύνθεση του κολλαγόνου και για τη ρύθμιση της ισορροπίας κολλαγόνου/ελαστίνης στο δέρμα. Επιπλέον η συμπλήρωση της βιταμίνης σε ζώα έχει δείξει βελτιωμένη σύνθεση κολλαγόνου. Τα κερατινοκύτταρα του δέρματος έχουν την ικανότητα να

συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης C και σε συνδυασμό με τη βιταμίνη E παρέχουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η ανάλυση των κερατινοκυττάρων σε καλλιέργεια έδειξε ότι η βιταμίνη C επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, την οργάνωση και τη συσσώρευση φωσφολιπιδίων, προάγει το σχηματισμό του κεράτινου στρώματος και τη διαφοροποίηση του επιθηλίου γενικά. Επίσης η απορρόφηση βιταμίνης C στο δέρμα μέσω τοπικής εφαρμογής παραμένει δύσκολη. Τα σημάδια γήρανσης στο ανθρώπινο δέρμα μπορούν να βελτιωθούν μέσω παροχής βιταμίνης C. Συνεχίζοντας είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η παροχή βιταμίνης C στο δέρμα βοηθά σε μεγάλο βαθμό την επούλωση των πληγών και ελαχιστοποιεί τον αυξημένο σχηματισμό ουλών [16].



Εικόνα 28: Μικροφωτογραφία ιών κολλαγόνου



### 1.7.11 Βιταμίνη C και τραυματισμοί

Υπό κανονικές συνθήκες η πρόσληψη βιταμίνης C μέσω της διατροφής είναι επαρκής, όμως σε περιπτώσεις επικίνδυνων ασθενειών η ποσότητα της μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Συνήθως η μεγάλη έλλειψη της βιταμίνης οφείλεται σε βλάβες ζωτικών οργάνων, σημαντικών για την επιβίωση του ανθρώπου. Επειδή η βιταμίνη C έχει πλειοτροπική δράση η έλλειψη της μπορεί να επιδεινώσει μία ασθένεια και να παρεμποδίζει την ανάρρωση. Για τον λόγο αυτό η φαρμακευτική χορήγηση της βιταμίνης αυτής έχει θεραπευτική δράση στο παρατεταμένο οξειδωτικό stress.



Εικόνα 29: Πληγή σε πόδι μικρού παιδιού

Κατά τη διάρκεια κρίσιμων ασθενειών η βιταμίνη C συμμετέχει σε πολλά μονοπάτια καθώς έχει αντιφλεγμονώδη δράση και ανοσολογική υποστήριξη σαν συμπαραγοντας για ένζυμα όπως μονοξυγενάσες και διοξυγενάσες. Όλες αυτές οι κρίσιμες διεργασίες που επιτελεί οφείλονται στην προσφορά ηλεκτρονίων και λόγω αυτής της δράσης μπορεί να μειωθεί η κυτταρική και οργανική καταστροφή [14].

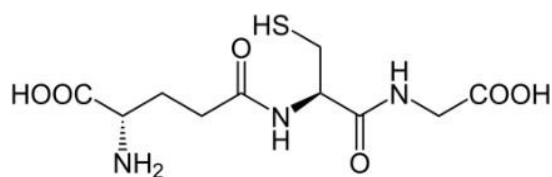
### 1.7.12 Βιταμίνη C και ψυχολογία

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το ασκορβικό οξύ συμμετέχει στη βιοσύνθεση ορμονών όπως ντοπαμίνη και επινεφρίνη, υπεύθυνες για τη ψυχική υγεία του ανθρώπου [17].

## 1.8 Γλουταθειόνη-GSH

### 1.8.1 Χαρακτηριστικά γλουταθειόνης

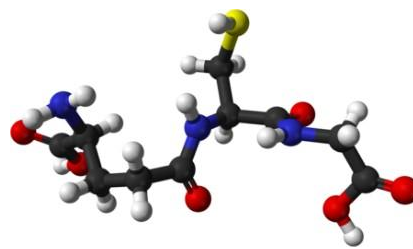
Η γλουταθειόνη (GSH) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1921 από τον Χόπκινς.



Εικόνα 31: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

Ο μοριακός χημικός τύπος της γλουταθειόνης είναι  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$  και η συστηματική χημική της ονομασία κατά IUPAC είναι (2S)-2-αμινο-4-[[[(1R)-

1[(καρβοξυμεθυλ)καρβαμοϋλο]-2-σουλφανυλεθυλ]καρβαμοϋλο}βουτανοϊκό οξύ. Το μοριακό βάρος της είναι 307,32. Η καθαρή γλουταθειόνη είναι στερεό με σημείο τήξεως 195 °C, πολύ ευδιάλυτο στο νερό, αλλά αδιάλυτο στη μεθανόλη και στον διαιθυλαιθέρα. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο, η γ-L-γλουταμυλ-L-κυστεινογλυκίνη (αποτελείται δηλαδή από γλουταμίνη, γλυκίνη και κυστεΐνη), που υπάρχει σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών σε συγκεντρώσεις 1-10mM (η υψηλότερη συγκέντρωση βρίσκεται στο ήπαρ). Αποτελεί την πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη που χρησιμοποιεί ο οργανισμός ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Η περιεκτικότητα στον άνθρωπο σε γλουταθειόνη σε φυσιολογικές συνθήκες είναι 0,35-0,45gr/l. Η γλουταθειόνη είναι επίσης καθοριστικός παράγοντας της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ζωτικής σημασίας όσων αφορά την αποτοξίνωση από ξеноβιοτικά, τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, την απόπτωση, την ανοσολογική λειτουργία και την ινογένεση [18].



Εικόνα 30: Μόριο γλουταθειόνης

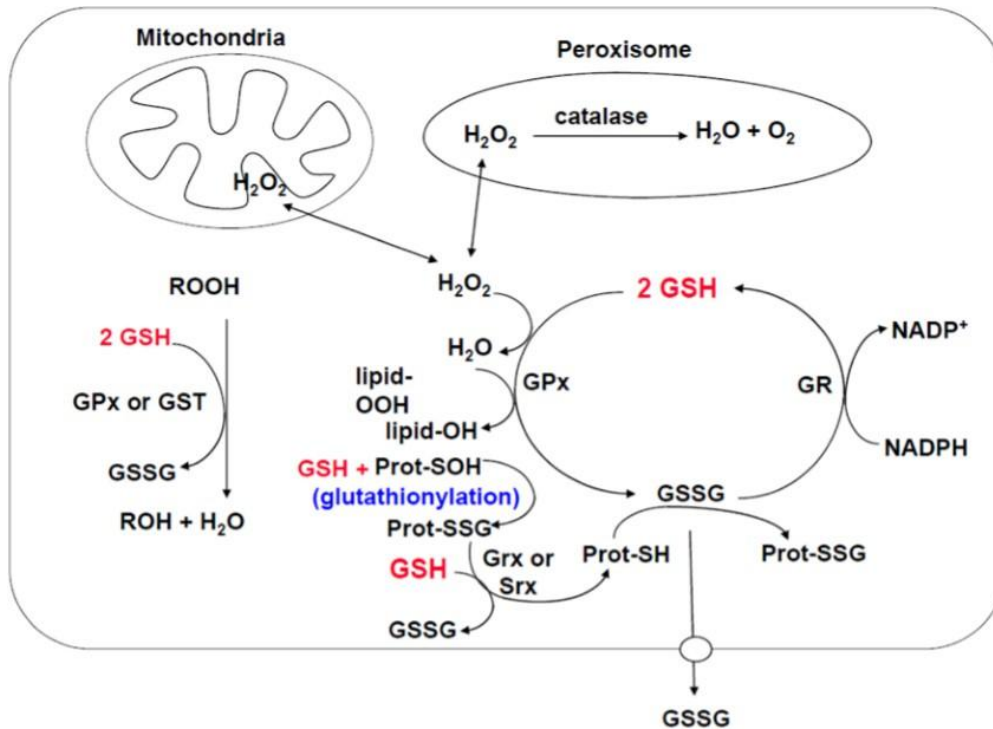
### 1.8.2 Δομή και λειτουργίες GSH

Η GSH υπάρχει σε δύο μορφές, της ανηγμένης θειόλης και της δισουλφιδικής οξειδωμένης (GSSG). Η ανηγμένη μορφή είναι η κυρίαρχη και αντιπροσωπεύει το 98% της συνολικής γλουταθειόνης. Στην ανηγμένη μορφή η υδροθειομάδα της κυστεΐνης μπορεί να δώσει ένα  $H^+$  ή  $e^-$  σε άλλα μόρια που είναι ασταθή (ROS, RNS). Όταν η GSH δίνει ένα ηλεκτρόνιο γίνεται δραστική αλλά αντιδρά με ένα άλλο μόριο δραστικής GSH και σχηματίζεται η οξειδωμένη μορφή (GSSG). Στη συνέχεια η GSH αναγεννάτε από GSSG με την μεσολάβηση του ενζύμου: αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν τρεις αποθήκες GSH. Το μεγαλύτερο ποσοστό γλουταθειόνης βρίσκεται στο κυτοσόλιο (80%), το 10-15% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και ένα μικρό ποσοστό στο ενδοπλασματικό δίκτυο [18].

Η δομή της γλουταθειόνης είναι μοναδική στο ότι ο πεπτιδικός δεσμός που συνδέει το γλουταμινικό και την κυστεΐνη της GSH είναι μεταξύ της γ-καρβοξυλομάδας του γλουταμινικού και όχι της συμβατικής α-καρβοξυλομάδας. Το μόνο ένζυμο που μπορεί να υδρολύσει αυτόν τον ασυνήθιστο δεσμό είναι γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (GGT), η οποία υπάρχει μόνο στις εξωτερικές επιφάνειες ορισμένων κυτταρικών τύπων. Κατά συνέπεια, η GSH είναι ανθεκτική στην ενδοκυτταρική αποικοδόμηση και μεταβολίζεται μόνο εξωκυτταρικά από κύτταρα που εκφράζουν GGT. Αυτό επιτρέπει την διάσπαση της απελευθερωμένης GSH στα αμινοξέα της, τα οποία παραλαμβάνονται από τα κύτταρα και επανενσωματώνονται στην GSH (κύκλος γ-γλουταμυλίου). Το μεγαλύτερο μέρος του GSH του πλάσματος προέρχεται από το συκώτι, το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ομοίωση του GSH εξαγοντας σχεδόν όλο το νεοσυντιθέμενο GSH στο πλάσμα και στη χολή. Έτσι η δυσρύθμιση της ηπατικής GSH έχει επιπτώσεις στην ομοίωση της συνολικής συστημικής GSH [18].

### 1.8.3 Αντιοξειδωτική λειτουργία της GSH

Η GSH ρυθμίζει την οξειδοαναγωγή που εξαρτάται από την κυτταρική σηματοδότηση. Αυτό επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό τροποποιώντας την κατάσταση οξείδωσης κρίσιμων πρωτεϊνικών καταλοίπων κυστεΐνης. Η γλουταθειόνη μπορεί να συνδεθεί αντιστρεπτά στην  $-SH$  των πρωτεϊνικών υπολειμμάτων κυστεΐνιου (prot-SH) μία διαδικασία που ονομάζεται γλουταθειονυλίωση, δημιουργώντας γλουταθειονυλιωμένες πρωτεΐνες (prot-SSG) οι οποίες μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν είτε να απενεργοποιήσουν την πρωτεΐνη. Αυτός είναι ένας μηχανισμός που προστατεύει τις ευαίσθητες πρωτεϊνικές θειόλες από μη αναστρέψιμη οξείδωση και μπορεί να χρησιμεύσει επίσης για την πρόληψη της απώλειας της GSH υπό οξειδωτικές συνθήκες. Η διγλουταθειονυλίωση μπορεί να συμβεί μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από γλουταρεδοξίνη και σουλφερεδοξίνη χρησιμοποιώντας την GSH σαν αναγωγικό. Πολλοί παράγοντες μεταγραφής και μόρια σηματοδότησης έχουν κρίσιμα κατάλοιπα κυστεΐνης, που μπορούν να οξειδωθούν και αυτός είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μέσω του οποίου τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) ρυθμίζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών και τη σηματοδότηση των κυττάρων που μπορούν να ρυθμιστούν από την GSH [18].

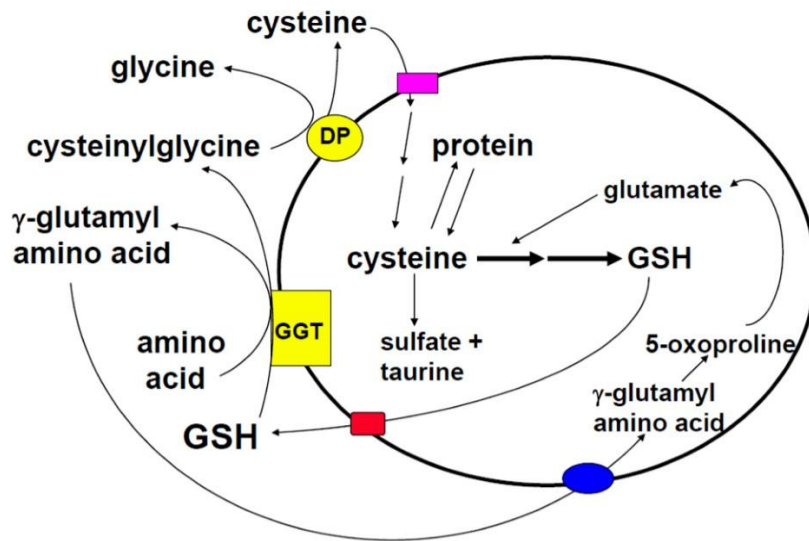


Εικόνα 32: Αντιοξειδωτική δράση GSH

#### 1.8.4 GSH και κύκλος γ-γλουταμυλίου

Ο Alton Meister περιέγραψε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας το κύκλο του γ-γλουταμυλίου, ο οποίος κύκλος επιτρέπει στη GSH να χρησιμεύει ως συνεχής πηγή κυστεΐνης. Αυτή είναι μία σημαντική λειτουργία καθώς η κυστεΐνη είναι εξαιρετικά ασταθής και οξειδώνεται ταχέως σε κυστίνη εξωκυτταρικά, η οποία μπορεί δυνητικά να δημιουργήσει τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Στον κύκλο του γ-γλουταμυλίου η GSH απελευθερώνεται από το κύτταρο και το ένζυμο GGT μεταφέρει το γ-γλουταμύλ της GSH σε ένα αμινοξύ (ο καλύτερος δέκτης είναι η κυστίνη) σχηματίζοντας το αμινοξύ γ-γλουταμυλίου και κυστεϊνυλογλυκίνη. Το γ-γλουταμυλο αμινοξύ μπορεί να μεταφερθεί πίσω στο κύτταρο και να μεταβολιστεί περαιτέρω για να απελευθερώσει το αμινοξύ και την 5-οξοπρολίνη, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε γλουταμινικό και να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση GSH. Η κυστεΐνυλογλυκίνη διασπάται από διπεπτιδάση για την παραγωγή κυστεΐνης και γλυκίνης. Τα περισσότερα κύτταρα προσλαμβάνουν εύκολα κυστεΐνη. Μόλις ληφθεί η πλειοψηφία της κυστεΐνης ενσωματώνεται στην GSH, κάποια

ενσωματώνονται στην πρωτεΐνη και κάποια αποικοδομούνται σε ταυρίνη καιθεικό άλας [18].



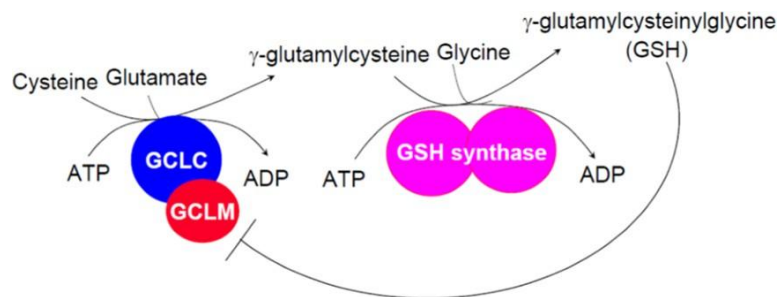
Εικόνα 33: Κύκλος γ-γλουταμιλίου

### 1.8.5 Σύνθεση GSH

Η σύνθεση της γλουταθειόνης από τα συστατικά της αμινοξέα περιλαμβάνει δύο ενζυματικά στάδια που απαιτούν ATP: σχηματισμό γ-γλουταμυλκυστεΐνης από γλουταμινικό και κυστεΐνη και σχηματισμός GSH από γ-γλουταμυλκυστεΐνη και γλυκίνη. Το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης GSH είναι ο ρυθμός περιορισμού και καταλύεται από την GCL (πρώην συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης) η οποία αποτελείται από μία βαριά ή καταλυτική υπομονάδα (GCLC) και μία ρυθμιστική υπομονάδα (GCLM) οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια στους ανθρώπους. Η GCLC εμφανίζει όλη τη καταλυτική δραστηριότητα του απομονωμένου ενζύμου και αναστολή ανάδρασης από την GSH. Το GCLM είναι ενζυματικά ανενεργό, αλλά παίζει μία σημαντική ρυθμιστική λειτουργία μειώνοντας το Km του GCL για το γλουταμικό και αυξάνοντας το Ki για τη GSH. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να ενισχύσει τον σχηματισμό ολοενζύμων καθώς αυξάνει τη δραστηριότητα της GCL απουσία αλλαγής στην έκφραση της υπομονάδας GCL [18].

Το δεύτερο βήμα στη σύνθεση γλουταθειόνης καταλύεται από την GS συνθετάση (GS). Η GS αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες και δεν

υπόκειται σε  
 αναστολή  
 ανάδρασης από την  
 GSH. Δεδομένου ότι  
 το προϊόν της GCL, η  
 γλουταμυλκυστεΐνη,  
 υπάρχει σε



Εικόνα 34: Σύνθεση GSH

εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις όταν υπάρχει το GS, το GCL θεωρείται περιοριστικό του ρυθμού. Έτσι η υπερέκφραση του GS απέτυχε να αυξήσει το επίπεδο GSH ενώ η υπερέκφραση του GCL αύξησε τα επίπεδα GSH. Αν και η GS θεωρείται γενικά ότι δεν είναι σημαντική στη ρύθμιση της σύνθεσης της GSH υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η GS είναι σημαντική στον προσδιορισμό της συνολικής συνθετικής ικανότητας της GSH σε ορισμένους ιστούς και/ή κάτω από καταστάσεις στρες. Μετά από ένα χειρουργικό τραύμα μειώθηκαν τα επίπεδα GSH και η δραστηριότητα GS στον σκελετικό μυ ενώ η δραστηριότητα GCL ήταν αμετάβλητη [18].

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η δυσλειτουργία της σύνθεσης GSH εμπλέκεται σε πολλαπλές καταστάσεις όπως γήρανση, διαβήτης, πνευμονική και ηπατική ίνωση, αλκοολικές και χολοστατικές ηπατικές βλάβες. Οι πολυμορφισμοί των GCLC και GCLM αποτελούν καθοριστικό παράγοντα χρόνιας οξειδωτικής βλάβης [18].

## 2. Σκοπός

Τα λιποσωμακά σκευάσματα αποτελούν ένα νέο κύμα ανάπτυξης καθώς τα τελευταία χρόνια βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της υγείας. Από εμβόλια που έχουν ως στόχο την καταπολέμηση κάποιας ανίατης ασθένειας, την αντιμετώπιση του καρκίνου έως και την συμπλήρωση διατροφής.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η εξακρίβωση της λειτουργικότητας ενός λιποσωμακού συμπληρώματος διατροφής σε κυτταρικές σειρές.

Στο πείραμα αυτό τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη (GSH). Οι δύο αυτές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν ενσωματωμένες σε λιποσώματα. Τα δείγματα χορηγήθηκαν σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες ήταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και τα κύτταρα γαστρικού σωλήνα MKN45.

Τέλος μετρήθηκε η γλουταθειόνη (GSH) και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) στις παραπάνω κυτταρικές σειρές με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 35: Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής αέρα στον οποίο εφαρμόστηκαν όλες οι τεχνικές πάνω στα κύτταρα



### 3. Υλικά & Μέθοδοι

#### 3.1 Δείγματα

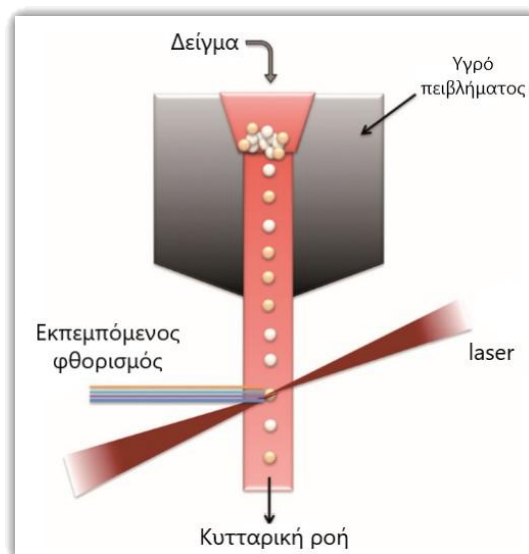
Μία από τις δραστικές μορφές που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν συμπλήρωμα διατροφής βιταμίνης C σε μορφή κάψουλας με περιεκτικότητα 950mg βιταμίνης C, 9,4mg ασβέστιο, 50mg κάμου κάμου, 10mg νεράτζι, 1,2mg μαύρο πιπέρι και 50mg αστερόλα ανά δίσκιο.

Η δεύτερη δραστική ουσία ήταν το συμπλήρωμα διατροφής γλουταθειόνης το οποίο είχε περιεκτικότητα 450mg γλουταθειόνης ανά δόση και 500mg λιποσωμακό μίγμα: σύμπλεγμα φωσφατιδυλοχολίνης (από μη γενετικά τροποποιημένη λεκιθίνη ηλιάνθου)

#### 3.2 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κυττάρων. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται καθώς τα

κύτταρα περνάνε με τη μορφή εναιωρήματος μέσα από μία δέσμη laser. Με τη κυτταρομετρία ροής δίνεται η δυνατότητα μέτρησης του μεγέθους ενός κυττάρου, η εσωτερική πολυπλοκότητα του, η ένταση του φθορισμού του και ο αριθμός των κυττάρων. Ένα κυτταρόμετρο αποτελείται από τρία μέρη: το ρευστό σύστημα, το

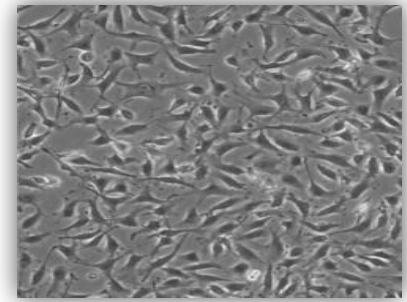


Εικόνα 36: Αρχή λειτουργίας κυτταρόμετρου ροής

οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα. Συγκεκριμένα το ρευστό σύστημα είναι αυτό που «οδηγεί» τα κύτταρα ώστε να περάσουν μέσα από την ακτίνα laser. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύστημα οπτικής διέγερσης και το σύστημα οπτικής συλλογής. Το σύστημα οπτικής διέγερσης περιλαμβάνει τόσο από το laser όσο και από τα εξαρτήματα που κατευθύνουν τη δέσμη φωτός στα κύτταρα έτσι ώστε να εκπέμπουν φθορίζουσα ακτινοβολία. Από την άλλη το σύστημα οπτικής συλλογής είναι αυτό που κατευθύνει τη σκεδάζουσα και τη φθορίζουσα ακτινοβολία σε ανιχνευτές. Το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους ανιχνευτές, τους ενισχυτές σήματος, τους επεξεργαστές σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το ηλεκτρονικό σύστημα είναι αυτό που θα μετατρέψει το σήμα σε αριθμητικά δεδομένα [19-20].

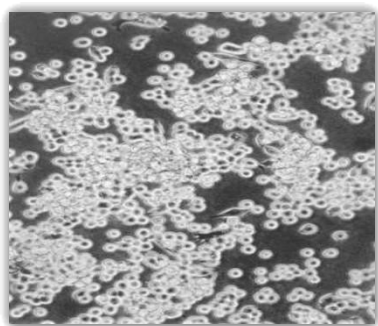
### 3.3 Κυτταρική σειρά EA.hy926

Η κυτταρική σειρά EA.hy926 αποτελεί στην πραγματικότητα την σύντηξη δύο διαφορετικών τύπων κυττάρων. Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVECs) και τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά φαίνεται να έχει πολλαπλές εφαρμογές πάνω στην έρευνα και στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων και τεχνολογιών [21-22].



Εικόνα 37: Κύτταρα EA.hy96 όπως φαίνονται στο ανάστροφο μικροσκόπιο

### 3.4 Κυτταρική σειρά MKN45



Εικόνα 38: Κύτταρα MKN45 όπως φαίνονται στο ανάστροφο μικροσκόπιο

Η κυτταρική σειρά MKN45 προέρχεται από καρκινικά κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου. Πρόκειται επίσης για μία κυτταρική σειρά με πολυάριθμες εφαρμογές στον χώρο της έρευνας [23].

### 3.5 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με βάση τον παρακάτω πίνακα:

	MKN45	EA.hy926
<b>ΦΛΑΣΚΕΣ</b>	25cm <sup>2</sup>	25cm <sup>2</sup>
<b>ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</b>	DMEM*	DMEM* + HEPES
<b>FBS</b>	10%	10%
<b>L-ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ</b>	1%	1%
<b>ΔΙΑΛ. ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ (100units/ml) ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ (100mg/ml)</b>	1%	1%
<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ</b>	37°C	37°C
<b>CO<sub>2</sub></b>	5%	5%

\*DMEM ( Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Πίνακας 3: Υλικά καλλιέργειας κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες οι οποίες εφαρμόστηκαν στα κύτταρα έγιναν στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρα, ενώ οι επώσεις γινόνταν σε κλίβανο με 5% CO<sub>2</sub> [24].

Η διαδικασία επανακαλλιέργειας ήταν η εξής:

	MKN45	EA.hy926
<b>Κάλυψη φιάσκας με κύτταρα για επανακαλλιέργεια</b>	~80%	~80%
<b>Θρυψίνη 0,25%</b>	0,5mL	0,5mL
<b>Επώαση στον κλίβανο</b>	5 λεπτά	3 λεπτά

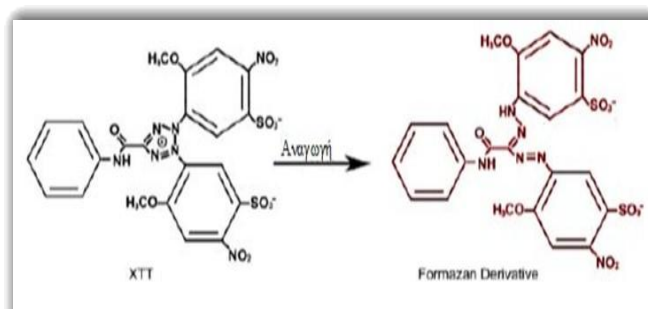
Πίνακας 4: Συνθήκες επανακαλλιέργειας

### 3.6 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης

Αρχικά για τη μελέτη της δράσης του συμπληρώματος στις κυτταρικές σειρές ήταν πρώτα απαραίτητος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης κάθε δείγματος που προκαλεί κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα EA.hy926 και στα MKN45,

τα οποία και μελετήθηκαν. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου ήταν η ΧΤΤ. Πρόκειται για μία χρωματογραφική μέθοδο η οποία ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο.

Η μέθοδος ΧΤΤ στηρίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος ΧΤΤ προς την αντίστοιχη φορμαζάνη από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες μόνο των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη είναι μία ένωση πορτοκαλί χρώματος που



Εικόνα 39: Αντίδραση μετατροπής ΧΤΤ σε φορμαζάνη

απορροφά στα 450nm. Μείωση της απορρόφησης του δείγματος συνεπάγεται με τοξική δράση [24].

### 3.7 Προσδιορισμός των κατάλληλων συγκεντρώσεων δραστικών ουσιών με τη βοήθεια του ΧΤΤ

Τα κύτταρα αφού καλλιεργηθούν με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων που είναι κατάλληλες για το συγκεκριμένο πείραμα. Για τον λόγο αυτόν ακολουθούμε την εξής διαδικασία. Αρχικά τα κύτταρα απομακρύνονται από την φλάσκα με τη χρήση της θρυψίνης και γίνεται μέτρηση αυτών σε πλάκα Neubauer όπου  $10^4$  κύτταρα τοποθετούνται σε κάθε πηγαδάκι του wellplate96. Γίνεται συμπλήρωση με DMEM+FBS και επωάζονται σε κλίβανο για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού και προσθήκη DMEM χωρίς FBS αλλά με τις δραστικές ουσίες των συμπληρωμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η μη χρήση του FBS γίνεται διότι θέλουμε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση τις δραστικές ουσίες. Τέλος γίνεται προσθήκη του ΧΤΤ και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

Για την μέτρηση ακολουθείται η εξής διαδικασία. Γίνεται φωτομέτρηση στα 630nm και στα 450nm σε ELISA PLATE READER με τη βοήθεια του λογισμικού Gen5. Η μέτρηση που πραγματοποιείται στα 630 nm γίνεται με σκοπό την κανονικοποίηση των τιμών μεταξύ των πηγαδιών του τρυβλίου, ενώ δεν απορροφά η φορμαζάνη σε αυτό το μήκος κύματος. Οι τιμές που εξήχθησαν στα 630 nm αφαιρέθηκαν από τις απορροφήσεις των τιμών στα 450 nm.

Σε κάθε πλάκα 96-θέσεων υπήρχαν και μάρτυρες όπου δεν προστέθηκε η δραστική ουσία των συμπληρωμάτων στα κύτταρα, ενώ σε κάθε συγκέντρωση συμπληρώματος περιλαμβανόταν και το αντίστοιχο τυφλό, το οποίο δεν περιείχε κύτταρα αλλά μόνο θρεπτικό προκειμένου να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που οφείλεται στη δραστική ουσία και στο θρεπτικό.

Για τον υπολογισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{(\text{Abs μάρτυρα} - \text{Abs δείγματος})}{\text{Abs μάρτυρα}} \times 100\%$$

### 3.8 Προσδιορισμός των επιπέδων GSH με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση των επιπέδων GSH στα κύτταρα ύστερα από χορήγηση των συμπληρωμάτων έγινε με τη χρήση της χρωστικής Mercury Orange. Πρόκειται για μία χρωστική η οποία συνδέεται απευθείας με τη γλουταθειόνη. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια. Αρχικά, τα κύτταρα αφού απομακρυνθούν από τη φλάσκα δέχονται μια σειρά φυγοκεντρήσεων και πλύσεων πριν επαναδιαλυτοποιηθούν σε PBS. Στη συνέχεια χορηγούνται 10μM mercury orange και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο στους 37°C για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών γίνεται νέα πλύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση (300g, 5min, 4°C) και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε PBS. Τέλος η μέτρηση έγινε με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης στα 488 και εκπομπής 580nm. Τα FSC, SSC προσδιορίστηκαν και καθόρισαν το μέγεθος και τη πολυπλοκότητα των κυττάρων αντίστοιχα. Στο σύνολο μετρήθηκαν 10000 κύτταρα για κάθε δείγμα, ενώ η ένταση του φθορισμού της χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση λογισμικού BD Cell Quest [22,24].

### 3.9 Προσδιορισμός των επιπέδων ROS με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση των επιπέδων ROS στα κύτταρα ύστερα από χορήγηση των συμπληρωμάτων έγινε με τη χρήση της χρωστικής DCF-DA η οποία αποακετυλιώνεται με τη βοήθεια ενδογενών εστερασών και μετέπειτα οξειδώνεται από τις ROS στην φορίζουσα DCF.

Αρχικά, τα κύτταρα αφού απομακρυνθούν από τη φλάσκα δέχονται μια σειρά φυγοκεντρήσεων και πλύσεων πριν επαναδιαλυτοποιηθούν σε PBS. Στη συνέχεια χορηγούνται 10μM DCF-DA και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο στους 37°C για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών γίνεται νέα πλύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση (300g, 5min, 4°C) και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε PBS. Τέλος η μέτρηση έγινε με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης στα 488 και εκπομπής 530nm. Τα FSC, SSC προσδιορίστηκαν και καθόρισαν το μέγεθος και τη πολυπλοκότητα των κυττάρων αντίστοιχα. Στο σύνολο μετρήθηκαν 10000 κύτταρα για κάθε δείγμα, ενώ η ένταση του φθορισμού της χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση λογισμικού BD Cell Quest [22,24].

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Η δράση της βιταμίνης C και γλουταθειόνης εκτιμήθηκε με επίδραση τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και τα γαστρικά κύτταρα MKN45.

### 4.2 Μέτρηση κυτταροτοξικότητας με τη βοήθεια του kit XTT

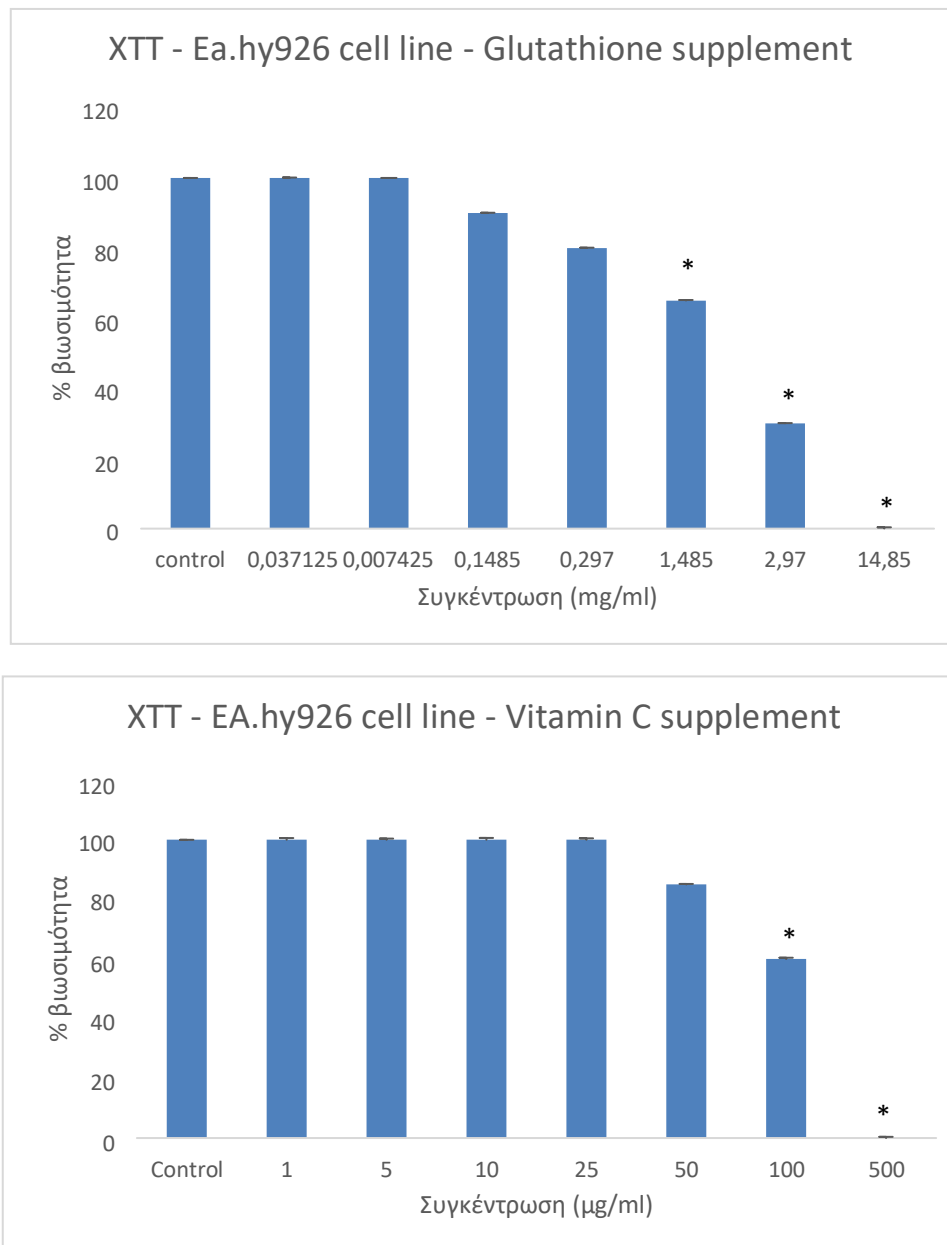
Για την αποφυγή του θανάτου των κυττάρων λόγω υψηλής τοξικότητας, ελέγχθηκαν με την βοήθεια του XTT ποιες συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών ήταν κατάλληλες να συμπεριληφθούν στο πείραμα. Έτσι, χορηγήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών και στις δύο κυτταρικές σειρές για 24 ώρες και έπειτα μετρήθηκε η βιωσιμότητα τους.

Κυτταρικές σειρές	Δραστική ουσία συμπληρώματος	Κυτταροτοξικότητα (μg δραστικής ουσίας)
EA.hy926	Γλουταθειόνη	>1.485
	Βιταμίνη C	>100
MKN45	Γλουταθειόνη	>1.485
	Βιταμίνη C	>10

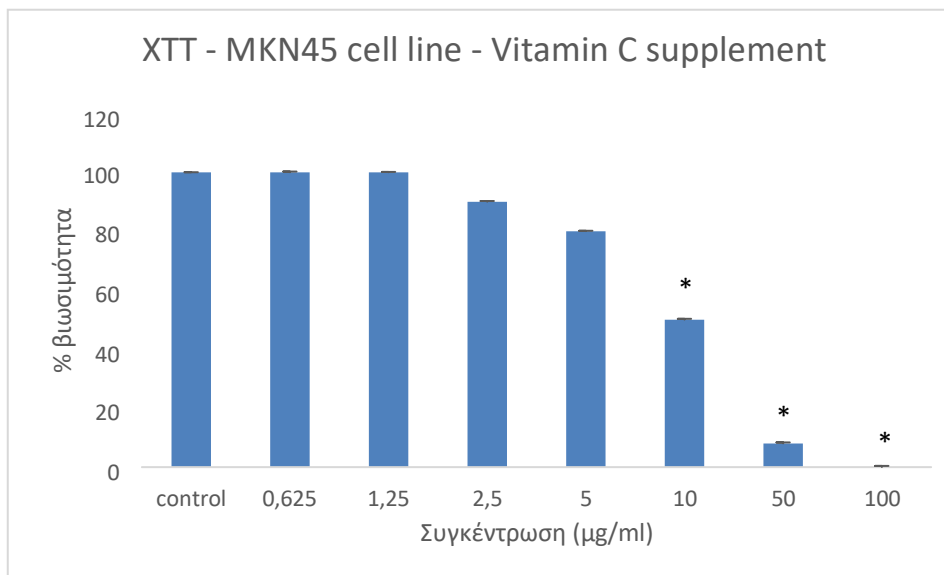
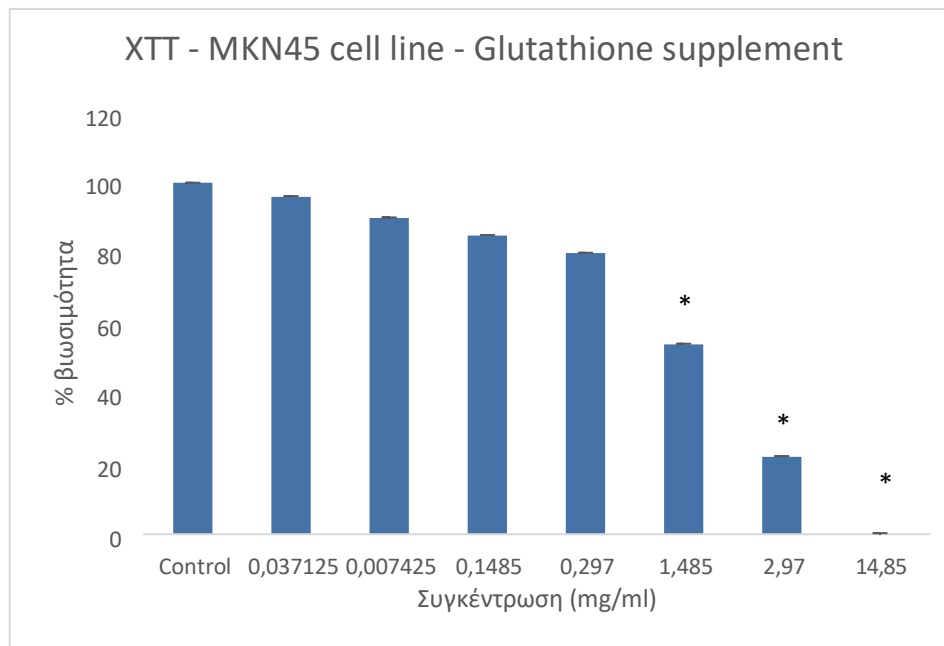
Πίνακας 5: Συγκέντρωση στην οποία τα κύτταρα εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα αφού επώαστηκαν με τις δραστικές ουσίες για 24 ώρες

Παρακάτω στα διαγράμματα παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του XTT.





**Διάγραμμα 1:** Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας της γλουταθειόνης και βιταμίνης C στην κυτταρική σειρά EA.hy926, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των δραστικών ουσιών, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). \*p



Διάγραμμα 2: Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας της γλουταθειόνης και βιταμίνης C στην κυτταρική σειρά MKN45, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των δραστικών ουσιών, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=6). \*p

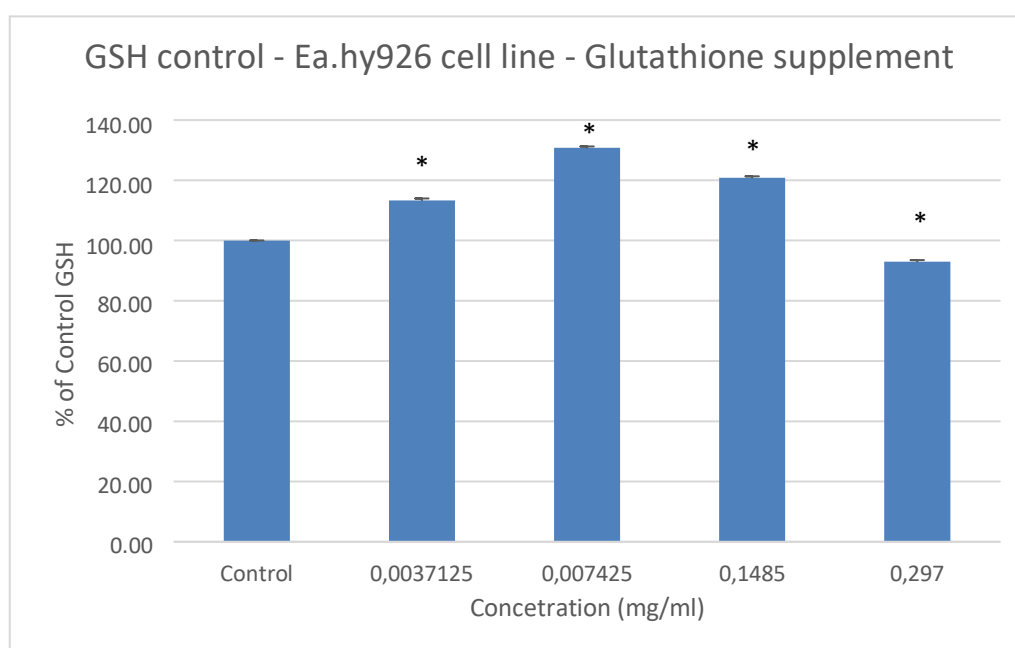
Σε όλα τα αποτελέσματα έγινε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS 19.0.

### 4.3 Επίδραση των δραστικών ουσιών των συμπληρωμάτων διατροφής στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων μέσω της κυτταρομετρίας ροής

#### 4.3.1 Επίδραση γλουταθειόνης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των EA.hy926

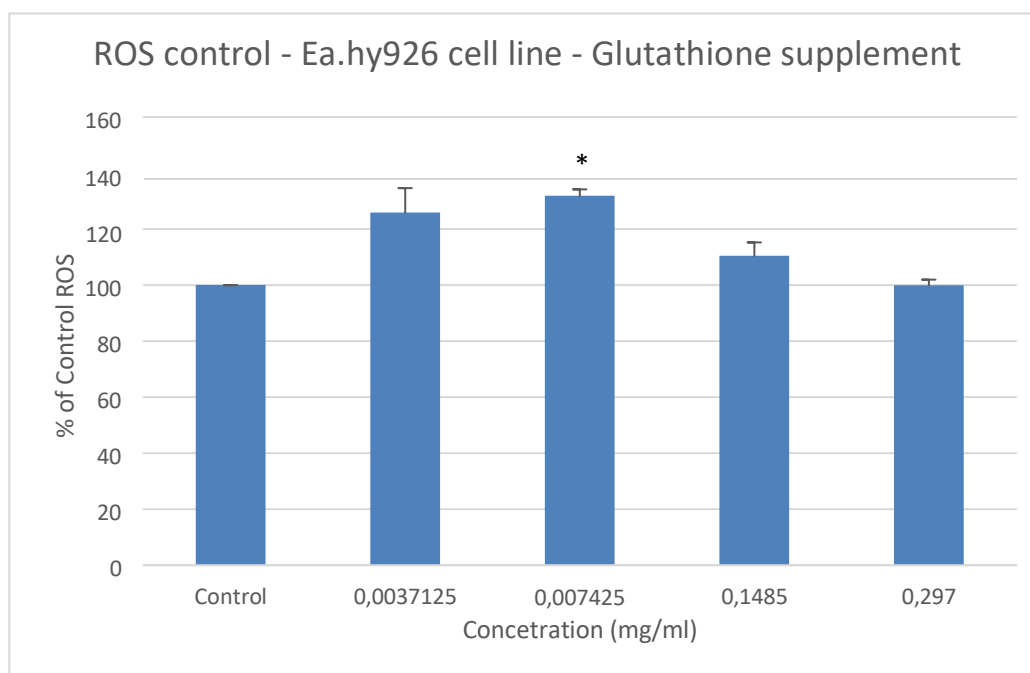
Η γλουταθειόνη ήταν τοξική σε συγκεντρώσεις άνω του 0,297mg/ml με τη βοήθεια του ΧΤΤ για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0,297mg/ml, 0,1485mg/ml, 0,007425mg/ml, 0,0037125mg/ml.

Ύστερα από κυτταρομετρία ροής τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της GSH σε σχέση με το control που δεν περιείχε γλουταθειόνη.



Διάγραμμα 3: Επίδραση της γλουταθειόνης στην παραγωγή GSH στα κύτταρα EA.hy926

Από την άλλη πλευρά όσον αφορά την παραγωγή ROS από τα κύτταρα EA.hy926 παρατηρήθηκε τάση αύξηση των ROS

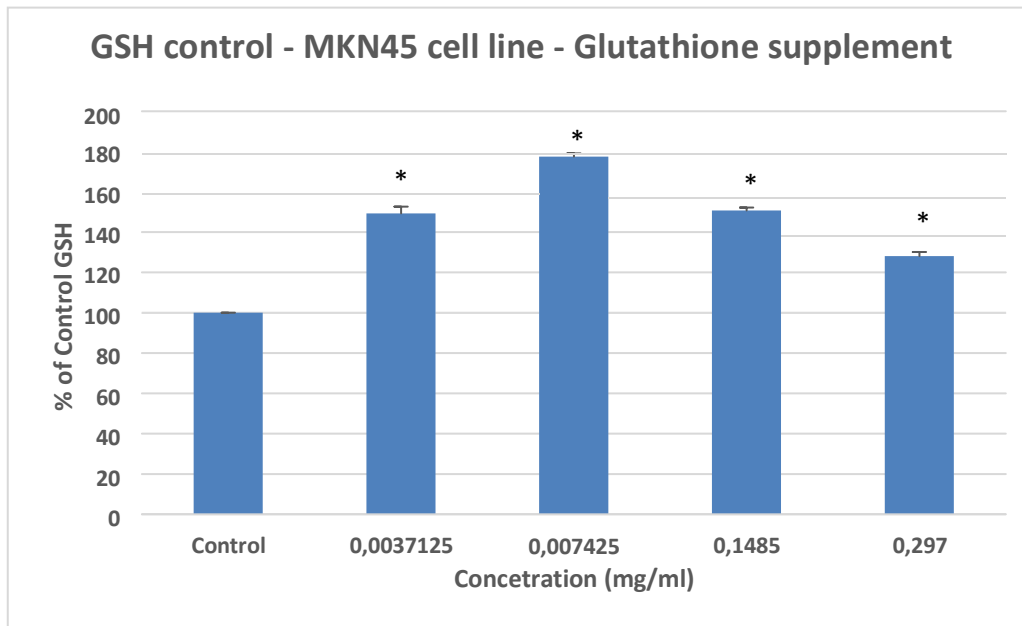


Διάγραμμα 4: Επίδραση της γλουταθειόνης στην παραγωγή ROS στα κύτταρα EA.hy926

#### 4.3.2 Επίδραση γλουταθειόνης στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων MKN45

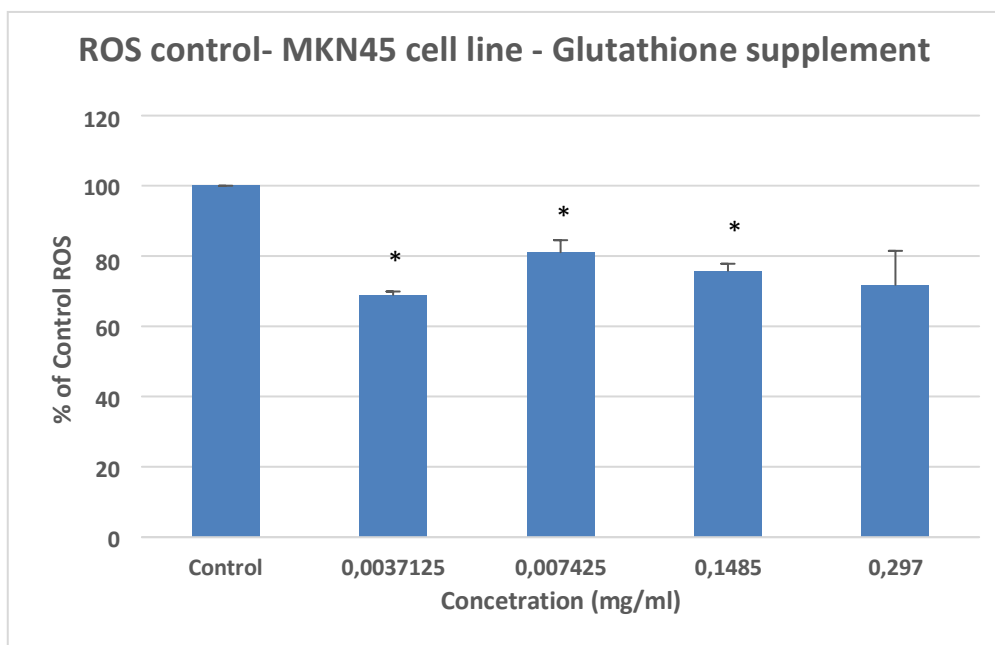
Η γλουταθειόνη ήταν τοξική σε συγκεντρώσεις άνω του 0,297mg/ml με τη βοήθεια του ΧΤΤ για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0,297mg/ml, 0,1485mg/ml, 0,007425mg/ml, 0,0037125mg/ml.

Ύστερα από κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της GSH με μεγαλύτερη στην συγκέντρωση 0,007425mg/ml.



Διάγραμμα 5: Επίδραση της γλουταθειόνης στην παραγωγή GSH στα κύτταρα MKN45

Αντιστοίχως παρατηρήθηκε όπως ήταν αναμενόμενο μείωση των επιπέδων των ROS και μάλιστα στατιστικώς σημαντική. Η συγκέντρωση στην οποία παρατηρήθηκε σημαντική μείωση ήταν η 0,0037125mg/ml.

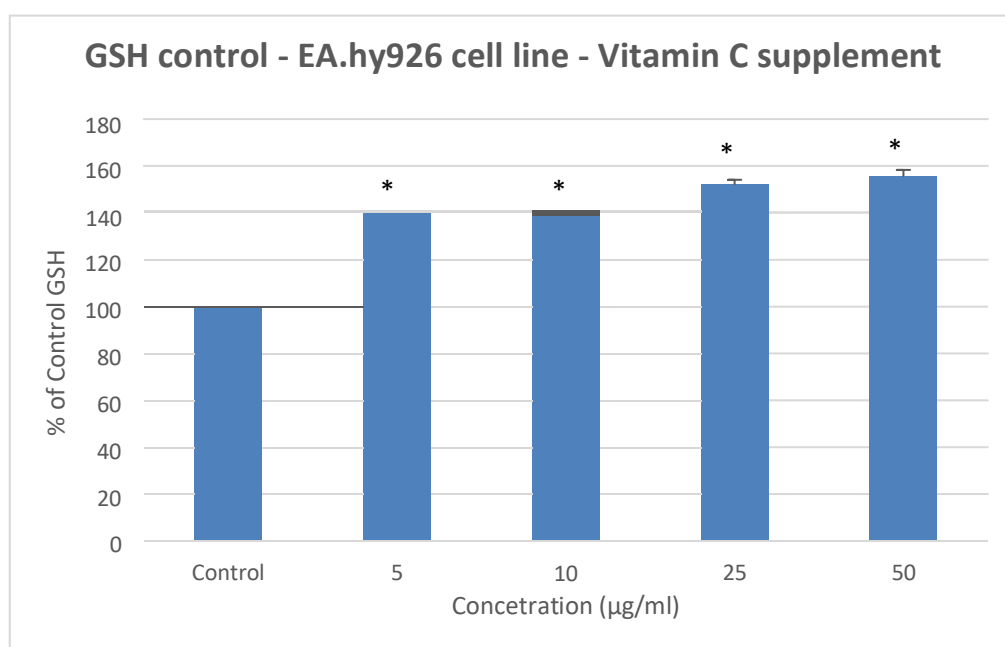


Διάγραμμα 6: Επίδραση της γλουταθειόνης στην παραγωγή ROS στα κύτταρα MKN45

### 4.3.3 Επίδραση βιταμίνης C στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων EA.hy926

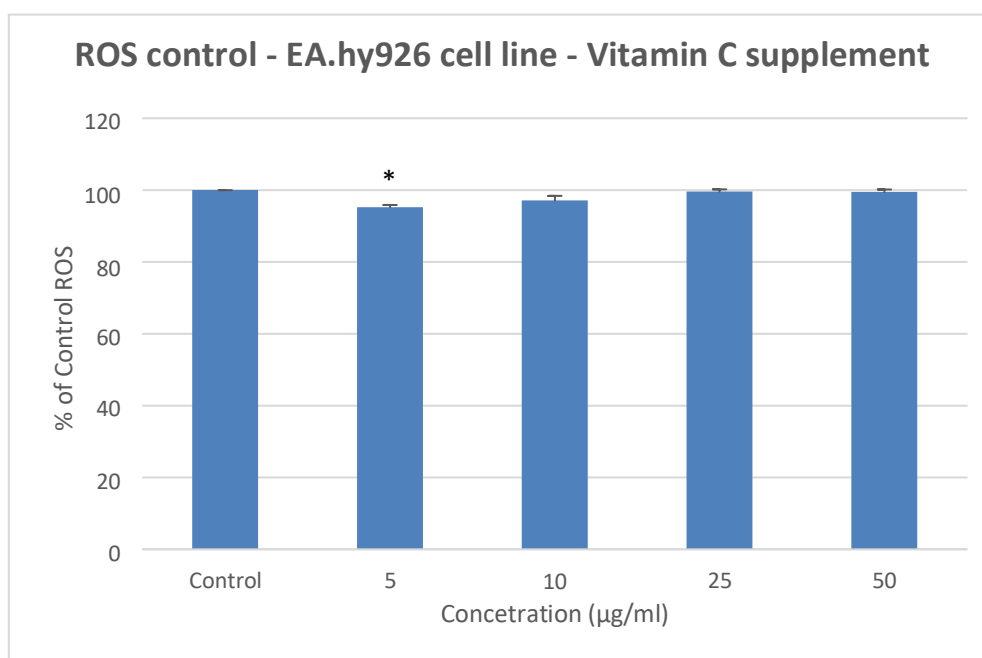
Η βιταμίνη C ήταν τοξική σε συγκεντρώσεις άνω του 100μg/ml με τη βοήθεια του ΧΤΤ για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 50μg/ml, 25μg/ml, 10μg/ml, 5μg/ml.

Ύστερα από κυτταρομετρία ροής τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης στα κύτταρα που έλαβαν την βιταμίνη σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 7: Επίδραση βιταμίνης C στην παραγωγή GSH στα κύτταρα EA.hy926

Αντίστοιχα παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής ROS από τα κύτταρα που έλαβαν την βιταμίνη σε σχέση με εκείνα που δεν την έλαβαν (control). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

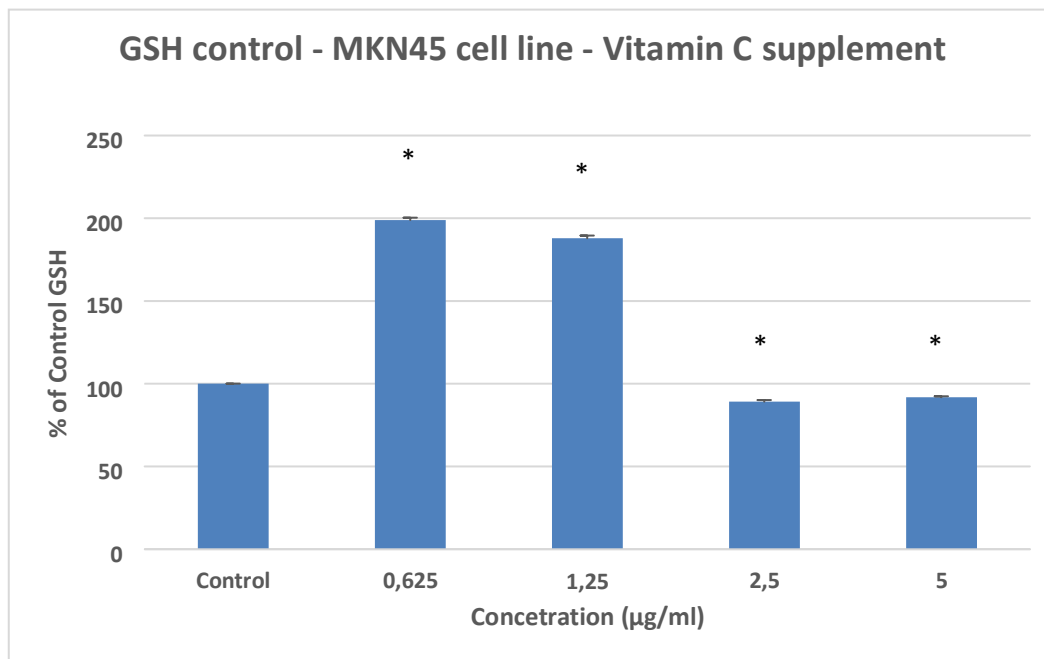


Διάγραμμα 8: Επίδραση της βιταμίνης C στην παραγωγή ROS στα κύτταρα EA.hy926

#### 4.3.4 Επίδραση βιταμίνης C στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων MKN45

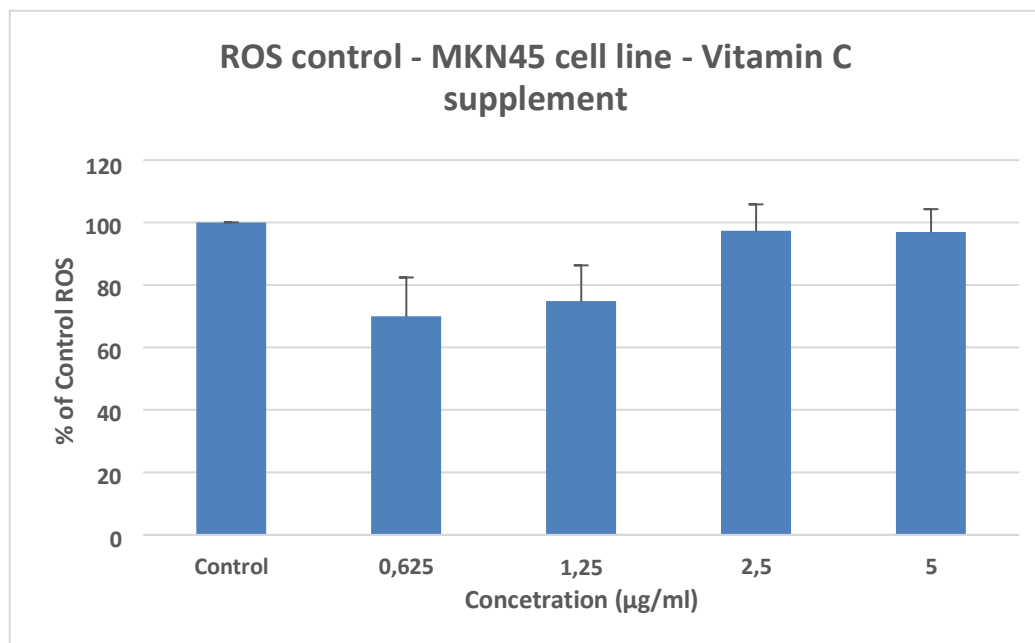
Η βιταμίνη C ήταν τοξική σε συγκεντρώσεις άνω του 10µg/ml με τη βοήθεια του ΧΤΤ για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml, 0,625µg/ml.

Ύστερα από κυτταρομετρία ροής τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης στα κύτταρα που έλαβαν την βιταμίνη σε σχέση με το control στις συγκεντρώσεις 0,625µg/ml και 1,25µg/ml. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις 2,5µg/ml και 5µg/ml παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της GSH σε σχέση με το control. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 9: Επίδραση της βιταμίνης C στην παραγωγή GSH στα κύτταρα MKN45

Όσον αφορά τα επίπεδα ROS παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης τους στα κύτταρα που έλαβαν βιταμίνη C. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 10: Επίδραση της βιταμίνης C στην παραγωγή ROS στα κύτταρα MKN45

Σε όλα τα αποτελέσματα έγινε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS 19.0.



## 5. Συζήτηση

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν να γίνει έλεγχος των δράσεων που έχουν τα συμπληρώματα διατροφής της γλουταθειόνης και της βιταμίνης C σε κυτταρικές σειρές. Οι κυτταρικές σειρές αποτελούν ένα από τα καλύτερα μοντέλα για τους επιστήμονες γιατί παρουσιάζουν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν σε έναν οργανισμό καθώς μελετάμε ανθρώπινα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αρχικά γίνεται έλεγχος για την τοξικότητα που μπορεί να προκληθεί από μια ουσία στα κύτταρα, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Στη συνέχεια γίνεται διαπίστωση μέσω της κυτταρομετρίας ροής των επιπέδων ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων όπως η γλουταθειόνη ενώ συγχρόνως μπορούν να προσδιοριστούν και οι δραστικές μορφές οξυγόνου.

Σε πρώτη φάση έγινε έλεγχος των συγκεντρώσεων των δραστικών ουσιών που προκαλούν από μόνες τους βλάβες στα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή έγινε με σκοπό να καθοριστούν οι συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών που δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ΧΤΤ. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές και για τις δύο δραστικές ουσίες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχαν διαφορές στο ποιές συγκεντρώσεις ήταν τοξικές τόσο ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές όσο και στις δραστικές ουσίες. Συγκεκριμένα η δραστική ουσία της γλουταθειόνης φαίνεται να έχει διαφορετική συμπεριφορά σε σχέση με την βιταμίνη C καθώς χρησιμοποιήθηκαν όμοιες συγκεντρώσεις και στις δύο κυτταρικές σειρές (EA.hy926, MNK45) όπου ήταν αρκετά χαμηλές (0,0037125mg/ml – 0,297mg/ml). Από την άλλη πλευρά η βιταμίνη C είχε εντελώς διαφορετική συμπεριφορά ανάμεσα στους δύο τύπους κυττάρων. Συγκεκριμένα για τα κύτταρα EA.hy926 οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 5-50μg/ml. Αντίθετα για τα κύτταρα MNK45 οι συγκεντρώσεις ήταν

διαφορετικές παρόλο που είχαμε την ίδια ουσία. Το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν 0,625-5μg/ml.

Συμπερασματικά φαίνεται πως καμία κυτταρική σειρά δεν εμφανίζει μεγαλύτερη αντοχή σε σχέση με την άλλη. Αξιοσημείωτο, όμως, είναι το γεγονός ότι η γλουταθειόνη εμφάνισε την ίδια τοξικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές. Από την άλλη πλευρά η βιταμίνη C εμφανίζει διαφορετική τοξικότητα ανάμεσα στα κύτταρα EA.hy926 και στα MKN45 με τα MNK45 να είναι πιο ευαίσθητα στην δραστική ουσία. Η διαφορετική αυτή δράση μπορεί να οφείλεται στον διαφορετική ικανότητα που έχουν κυτταρικές σειρές στην απορρόφηση και στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών όπως και στους διαφορετικούς τύπους κυτταρικών μεμβρανών που διαθέτει το κάθε κύτταρο [25,26]. Επίσης θα πρέπει να τονίσουμε πως τα κύτταρα MKN45 είναι καρκινικά αυτό συνεπάγεται με το γεγονός ότι έχουν χάσει πολλές βασικές λειτουργίες τους και έτσι να εμφανίζονται πιο ευαίσθητα [27].

Σε επόμενο στάδιο αφού επιλέχτηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για το πείραμα ακολούθησε η κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων GSH και ROS. Στην κυτταρική σειρά EA.hy926 μετά την προσθήκη της γλουταθειόνης τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των συγκεντρώσεων GSH. Η αύξηση αυτή είναι λογική καθώς φαίνεται πως υπάρχει αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα τα επίπεδα των ROS παρουσίασαν αύξηση στις περισσότερες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά αποκλίνουν από τα αναμενόμενα καθώς θα περιμέναμε μείωση των ROS. Η αντίδραση αυτή δικαιολογείται αν λάβουμε υπόψη ότι σε πολλές περιπτώσεις τα αντιοξειδωτικά μπορεί να μην έχουν αποκλειστικά ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού [45].

Στη συνέχεια εξετάστηκαν τα κύτταρα EA.hy926 μετά την προσθήκη της βιταμίνης C. Όπως και προηγουμένως μετρήθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής τα επίπεδα GSH και ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης, κάτι αναμενόμενο καθώς η βιταμίνη C αποτελεί αντιοξειδωτικό με αποτέλεσμα να επιφέρει αύξηση παραγωγής γλουταθειόνης. Αντίστοιχα τα ROS είχαν μία τάση μείωσης. Ένα αποτέλεσμα που επίσης επιβεβαιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα της βιταμίνης.

Σε επόμενη φάση μετρήθηκε η αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης στην κυτταρική σειρά MKN45. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητική αύξηση της γλουταθειόνης στα κύτταρα που χορηγήθηκε δραστική ουσία σε σχέση με εκείνα που δεν το έλαβαν. Τα ROS επίσης φαίνεται ότι μειώθηκαν με τη δράση της γλουταθειόνης.

Τέλος έγινε μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της βιταμίνης C σε κύτταρα MKN45. Αρχικά μετρήθηκαν τα ποσοστά γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση GSH στις 0,625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , όμως παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων GSH στις συγκεντρώσεις 2,5 και 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται στην κυτταροτοξική δράση που μπορεί να έχει η βιταμίνη C στα κύτταρα αυτά. Επίσης σημαντικό είναι να αναφερθεί πως τα κύτταρα MKN45 είναι κύτταρα γαστρικού σωλήνα που λόγω της φύσης τους να καθίστανται πιο ευάλωτα σε αντιοξειδωτικά. Αντιθέτως τα ROS μας δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς η συγκέντρωσή τους μειώνεται ιδιαίτερα στις μικρότερες συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας.

Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει πως το pH του κυττάρου παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα του λιποσωμακού σκευάσματος. Συγκεκριμένα σε πείραμα που έγινε σε πανεπιστήμιο της Πολωνίας και της Γερμανίας έδειξε πως τα λιποσώματα με εσωτερικό pH 2,4 είχαν ελαφρώς καλύτερη αποδοτικότητα ενθυλάκωσης σε σχέση με λιποσώματα που είχαν εσωτερικό pH 4,0 όταν το αντίστοιχο εξωτερικό ήταν 5,5. Όταν το pH ήταν 6,5 ή και μεγαλύτερο δεν υπήρξε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στην αποδοτικότητα ενθυλάκωσης. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι καλύτερη η χρήση λιποσωμάτων για την μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων με τη βοήθεια της βιταμίνης C [28.29]. Μία άλλη έρευνα έδειξε επίσης πως τα λιποσώματα είναι pH-ευαίσθητα καθώς το 30% του φαρμάκου (αντινεοπλασματικό) απελευθερώνεται σε pH 5,5 μετά από 24 ώρες [30]. Κάτι αντίστοιχο μπορεί να συμβαίνει και με τα λιποσωμακά σκευάσματα τα οποία μελετήθηκαν και έδωσαν χαμηλή έως ελάχιστη μείωση των ROS ή ακόμα και αύξηση. Αυτό, λοιπόν, ίσως να οφείλεται στο pH που επικρατεί μέσα στα λιποσώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Για παράδειγμα στην κυτταρική σειρά Ea.hg926 παρατηρήθηκε τάση αύξησης των ROS μετά την

χορήγηση γλουταθειόνης. Στο pH βέβαια μπορεί να οφείλεται και η μη αύξηση της GSH μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών καθώς ίσως λόγω pH να μην έγινε καλή απορρόφηση του λιποσωμακού σκευάσματος ( π.χ. στα κύτταρα MKN45 μετά την χορήγηση βιταμίνης C.

Όπως προαναφέρθηκε σε κάποιες δοκιμασίες παρατηρήθηκαν μείωση της GSH (MKN45-Vitamin C) παρόλο που περιμέναμε αύξηση ενώ σε άλλη περίπτωση παρατηρήθηκε αύξηση των ROS (Ea.hy926-glutathione) ενώ το αναμενόμενο ήταν η μείωση. Η παράλογη αυτή συμπεριφορά μπορεί να αιτιολογηθεί με παλαιότερες έρευνες που έδειξαν πως μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών μειώθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετιζόταν με τον αμυντικό μηχανισμό και την παραγωγή ROS. Η απλούστερη εξήγηση γι'αυτό είναι ότι ο μηχανισμός ανατροφοδότησης των κυττάρων ρυθμίζει αρνητικά τον αμυντικό μηχανισμό και την παραγωγή των ROS όταν οι ποσότητες των παραγόμενων ROS «απομακρύνονται» από τα αντιοξειδωτικά [31-34].

Η ανισσοροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό stress με καταστροφή πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων και βλάβες στο DNA οδηγώντας σε διάφορες ασθένειες. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου έχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που τους προστατεύουν από κυτταρικές βλάβες καθώς επίσης διορθώνουν τυχόν βλάβες[35,36]. Ωστόσο πολλές φορές οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι επαρκείς για να προστατέψουν τον οργανισμό. Γι αυτό τον λόγω συχνά γίνεται η χρήση αντιοξειδωτικών με τη μορφή συμπληρωμάτων. Η GSH είναι το πιο άφθονο αντιοξειδωτικό σε αερόβια κύτταρα όπου υπάρχει σε μικρογραμμομοριακές συγκεντρώσεις στα σωματικά υγρά και σε χιλιοστογραμμομοριακές συγκεντρώσεις στους ιστούς. Λόγω των καταλοίπων κυστεΐνης η GSH οξειδώνεται εύκολα ενζυματικά σε δισουλφίδιο GSSG από ηλεκτρονιόφιλες ουσίες (ROS). Έτσι η μείωση του λόγου GSH:GSSG θεωρείται δείκτης οξειδωτικού στρες. Σε πείραμα όπου έγινε η χρήση whey protein σε ενδοθυλιακά κύτταρα Ea.hy926 για να εξακριβωθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα της βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα GSH [35,37-41].

Τα λιποσωμακά σκευάσματα και η χρήση τους για την μεταφορά φαρμάκων μέσα στα κύτταρα έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να ερευνάται για τον λόγο αυτό η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Βέβαια έχουν γίνει αξιοσημείωτες έρευνες πάνω σε αυτόν τον τομέα. Μια από αυτές είναι των Jainy Sachaniya et.al. όπου τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως η λιποσωμακή χορήγηση της βιταμίνης Α για την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης είχε καλύτερη απορροφητικότητα από την μη λιποσωμακή μορφή [42].

Σε παρόμοια έρευνα που είχε σαν σκοπό την μελέτη της λιποσωμακής μορφής του ασκορβικού οξέος και την δράση του στην αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων και την σύνθεση κολλαγόνου τύπου Ι έδειξε ότι τα λιποσώματα βοήθησαν τόσο στην καλύτερη απορρόφηση του ασκορβικού οξέος όπως επίσης και αύξηση της παραγωγής του κολλαγόνου με την βοήθεια της βιταμίνης C [43-44].

Με το πέρας αυτής της διπλωματικής μελέτης κατανοήσαμε πως τα λιποσωμακά συμπληρώματα διατροφής μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική δράση σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές όμως χρίζει περαιτέρω έρευνα. Η σύγκριση των λιποσωμακών σκευασμάτων με τα μη λιποσωμακά, όπως επίσης και η μελέτη και άλλων δραστικών ουσιών που μπορεί να περιέχονται σε συμπληρώματα, σε περισσότερες κυτταρικές σειρές θα ήταν απαραίτητη για μία πιο ολοκληρωμένη άποψη γύρω από τα λιποσωμακά σκευάσματα.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Μελέτη επίδρασης των παραγόντων διαλυτοποίησης και άλλων εκδοχών στις κινητικές απελευθέρωσης των λιποσωμικών φαρμάκων όταν τα λιποσώματα διασπείρονται σε υδρογέλες. Επίδραση εκδοχών μορφοποίησης στη σταθερότητα των λιποσωμάτων, Διπλωματική μελέτη, Στέλα Ντουράϊ, Πάτρα, 2006.
2. Sherwood Lauralee, 2016, Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου, Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μοάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 8<sup>η</sup> έκδοση
3. Yunes Panahi, Masoud Farshbaf, Majid Mohammadhosseini, Mozhdah Mirahadi, Rovshan Khalilov, Siamak Saghfi and Abolfazl Akbarzadeh, 2017, Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications, VOL. 45, NO. 4, 788–799
4. Haisheng He, Yi Lu, Jianping Qi, Quangang Zhu, Zhongjian Chen, Wei Wu, 2018, Adapting Liposomes for oral drug delivery, Acta Pharmaceutica Sinica 9(1):36-48
5. Claudia Zylberberg and Sandro Matosevic, 2016, Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, 23(9): 3319–3329
6. Theresa M. Allen, Pieter R. Cullis, 2015, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, Advanced Drug Delivery Reviews 65 (2013) 36–48
7. Amr Selim Abu Lila and Tatsuhiro Ishida, 2017, Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications, Biol. Pharm. Bull. Vol. 40 N. 1
8. Robert Li, Zhenquan Jia, and Michael A. Trush, 2018, Defining ROS in Biology and Medicine, React Oxyg Species (Apex). 2016 ; 1(1): 9–21
9. V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, Kalyan – 421 304
10. Sies H, Jones DP, 2007, Oxidative stress. In: Fink G (ed) Encyclopaedia of stress. Elsevier, San Diego

11. Aristidis S. Veskoukis, Aristidis M. Tsatsakis, Dimitrios Kouretas, 2011, Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration, *Cell Stress and Chaperones* (2012) 17:11–21
12. Johanna T. Dwyer, Paul M. Coates and Michael J. Smith, 2017, Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources, *Nutrients* 2018, 10, 41
13. John Knight, Kumudu Madduma-Liyanage, James A. Mobley, Dean G. Assimos, and Ross P. Holmes, 2017, Ascorbic Acid Intake and Oxalate Synthesis, *Urolithiasis* . 2016 August ; 44(4): 289–297
14. Angelique M.E. Spoolstra-de Man, Paul W.G. Elberts and Heleen M. Oudemans-Van Staaten, 2018, Vitamin C: should we supplement?, *Curr Opin Crit Care* 2018, 24:248–255
15. Luisa Cimmino, Benjamin G. Neel, and Iannis Aifantis, 2019, Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer, *Trends Cell Biol* . 2018 September ; 28(9): 698–708
16. Juliet M. Pullar, Anitra C. Carr and Margreet C. M. Vissers, 2017, The Roles of Vitamin C in Skin Health, *Nutrients* 2017, 9, 866
17. Sebastian J Padayatty, Ffarcs, and Mark Levine, 2016, Vitamin C physiology: the known and the unknown and Goldilock, *Oral Dis* . 2016 September ; 22(6): 463–493
18. Shelly C. Lu, M.D., 2013, Glutathione Synthesis, *Biochim Biophys Acta* . 2013 May ; 1830(5): 3143–3153
19. Aysun Adan, Günel Alizada, Yağmur Kiraz, Yusuf Baran & Ayten Nalbant, 2016, Flow cytometry: basic principles and applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37:2, 163-176
20. Katherine M. McKinnon, 2019, Flow Cytometry: An Overview, *Curr Protoc Immunol* . ; 120: 5.1.1–5.1.11
21. By, J. J. (2015). From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) by guest on June 30, 2015. For personal use only. *Fibrinolytic Properties of a Human*, 71(6), 1669-1675.
22. Alexandros Priftis, Eleftheria-Maria Panagiotou, Konstantinos Lakisa, Christina Plikaa, Maria Halabalakib, Georgia Ntasic, Aristidis S. Veskoukisa, Dimitrios Stagosa, Leandros A. Skaltsounisb, Dimitrios Kouretas, 2018, Roasted and

- green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner, *Food and Chemical Toxicology* 114 (2018) 119–127
23. Ryutaro Mori, Kazuhiro Yoshida, ☒Manabu Futamura, Tomonari Suetsugu, Kaoru Shizu, Toshiyuki Tanahashi, Yoshihiro Tanaka, Nobuhisha Matsubishi και Kazuya Yamaguchi, 2019, The inhibition of thymidine phosphorylase can reverse acquired 5FU-resistance in gastric cancer cells, *Gastric Cancer*. 2019; 22(3): 497–505.
24. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής & αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων ανθέων ελίας και αγριελιάς. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Τέκος Φώτης, Λάρισα 2019.
25. Garcia-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., & Meredith, C. (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1719–1727. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.001>
26. Garcia-Canton C, Minet E, Anadon A, Meredith C (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol In Vitro*. 2013 Sep;27(6):1719-27. doi: 10.1016/j.tiv.2013.05.001. Epub 2013 May 10.
27. Jonathan J. M. Landry, Paul Theodor Pyl, Tobias Rausch, Thomas Zichner, Manu M. Tekkedil, Adrian M. Stütz, Anna Jauch,† Raeka S. Aiyar, Gregoire Pau, Nicolas Delhomme, Julien Gagneur, Jan O. Korbel, Wolfgang Huber, and Lars M. Steinmetz. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3 (Bethesda)*. 2013 Aug; 3(8): 1213–1224. Published online 2013 Mar 11. doi: 10.1534/g3.113.005777
28. Dominik Lipka, Jerzy Gubernator, Nina Filipczak, Sabine Barnert, eagine Süß, Mateusz Legut, Arkadiusz Kozubek, 2013, Vitamin C-driven epirubicin loading into liposomes, *International Journal of Nanomedicine* 2013;8 3573–3585
29. Li C, Cui J, Li Y, et al. Copper ion-mediated liposomal encapsulation of mitoxantrone: the role of anions in drug loading, retention and release. *Eur J Pharm Sci*. 2008;34(4–5):333–344.



30. Mateusz Legut, Dominik Lipka, Nina Filipczak, Adriana Piwoni, Arkadiusz Kozubek, Jerzy Gubernator, 2014, *International Journal of Nanomedicine* 2014:9 653–668
31. A. Singh, S. Boldin-Adamsky, R. K. Thimmulappa, S. K. Rath, H. Ashush, J. Coulter, A. Blackford, S. N. Goodman, F. Bunz, W. H. Watson, E. Gabrielson, E. Feinstein, S. Biswal, 2008, RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res.* 68, 7975–7984
32. G. M. DeNicola, F. A. Karreth, T. J. Humpton, A. Gopinathan, C. Wei, K. Frese, D. Mangal, K. H. Yu, C. J. Yeo, E. S. Calhoun, F. Scrimieri, J. M. Winter, R. H. Hruban, C. Iacobuzio-Donahue, S. E. Kern, I. A. Blair, D. A. Tuveson, 2011 Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475, 106–109
33. A. K. Bauer, H. Y. Cho, L. Miller-Degraff, C. Walker, K. Helms, J. Fostel, M. Yamamoto, S. R. Kleeberger, 2011, Targeted deletion of Nrf2 reduces urethane-induced lung tumor development in mice. *PLOS One* 6, e26590
34. Volkan I. Sayin, Mohamed X. Ibrahim, Erik Larsson, Jonas A. Nilsson, Per Lindahl, Martin O. Bergo, 2014, Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice, *Science Traditional Medicine*, Vol 6 Issue 221 221ra15
35. Efthalia Kerasioti, Dimitrios Stagos, Vasiliki Georgatzi, Erinda Bregou, Alexandros Priftis, Ioannis Kafantaris, and Dimitrios Kouretas, 2016, Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6585737, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6585737>
36. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur and J. Telser, 2007, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84
37. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, 2004, “Glutathione metabolism and its implications for health,” *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492

38. J. B. Owen and D. A. Butterfield, 2002, "Measurement of oxidized/ reduced glutathione ratio," *Methods in Molecular Biology*, vol.648, pp. 269–277, 2010
39. Y.-Z. Fang, S. Yang, and G.Wu, "Free radicals, antioxidants, and nutrition," *Nutrition*, vol. 18, no. 10, pp. 872–879
40. K. Aquilano, S. Baldelli, and M. R. Ciriolo, 2014, "Glutathione: new roles in redox signalling for an old antioxidant," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 5, p. 196,
41. C. F. Lima, M. Fernandes-Ferreira, and C. Pereira-Wilson, 2006, "Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels," *Life Sciences*, vol. 79, no. 21, pp.2056–2068
42. Jainy Sachaniya, Reema Savaliya, Ramesh Goyal, Sanjay Singh, 2018, Liposomal formulation of vitamin A for the potential treatment of osteoporosis *International Journal of Nanomedicine* 2018:13 (T-NANO 2014 Abstracts) 51–53
43. Fisher, G. J., Varani, J. & Voorhees, J. J. ,2008, Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Archives of dermatology* 144, 666–672, <https://doi.org/10.1001/archderm.144.5.666>
44. Lorena Maione-Silva, Elisandra Gava de Castro, Thais Leite Nascimento, Emílio Ramos Cintra, Larissa Cleres Moreira, Bertilha Alves Santana Cintra, Marize Campos Valadares, Eliana Martins Lima, 2019, Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts, DOI:10.1038/s41598-018-36682-9
45. Ypatios Spanidis, Aristidis S. Veskoukis, Christina Papanikolaou, Dimitrios Stagos, Alexandros Priftis, Chariklia K. Deli , Athanasios Z. Jamurtas and Demetrios Kouretas, 2018, Exercise-Induced Reductive Stress Is a Protective Mechanism against Oxidative Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Article ID 3053704, <https://doi.org/10.1155/2018/3053704>

## 7. Βιβλιογραφία εικόνων

- ❖ Εικόνα 1: <https://www.demetzoslab.gr/content/51/liposomal-technology-/>
- ❖ Εικόνα 2: <https://www.tovima.gr/2015/11/07/science/antikarkinikes-xeirobombides/>
- ❖ Εικόνα 3: Himanshu Pandey, Radha Rani, Vishnu Agarwal, 2016, Liposome and Their Applications in Cancer Therapy, Braz. Arch. Biol. Technol. Vol.59
- ❖ Εικόνα 4: <http://spacanada.ca/liposomes-good-skin/>
- ❖ Εικόνα 5: <https://gr.dreamstime.com/>
- ❖ Εικόνα 6: <https://orametamorphosis.com/>
- ❖ Εικόνα 7: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 8: <https://art-therapy.center/>
- ❖ Εικόνα 9: <https://www.protothema.gr/ugeia/article/855948/>
- ❖ Εικόνα 10: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 11: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 12: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 13: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 14: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 15: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 16: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 17: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 18: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 19: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 20: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 21: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 22: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 23: John Knight, Kumudu Madduma-Liyanage, James A. Mobley, Dean G. Assimos, and Ross P. Holmes, 2017, Ascorbic Acid Intake and Oxalate Synthesis, Urolithiasis . 2016 August ; 44(4): 289–297

- ❖ Εικόνα 24: John Knight, Kumudu Madduma-Liyanage, James A. Mobley, Dean G. Assimos, and Ross P. Holmes, 2017, Ascorbic Acid Intake and Oxalate Synthesis, Urolithiasis . 2016 August ; 44(4): 289–297
- ❖ Εικόνα 25: <https://www.thessnews.gr/article/106212/etsi-feygoun-oi-petres-apo-ta-nefra-video>
- ❖ Εικόνα 26: <https://intermed.com.gr/el/articles/paidikos-karkinos-to-80-ton-paidion-therapeyetai-pleon>
- ❖ Εικόνα 27: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 28: [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ Εικόνα 29: <https://www.onmed.gr/ygeia/story/348765/pos-tha-katalavete-otimia-pligi-exei-molynthei>
- ❖ Εικόνα 30: <https://www.wikiwand.com/>
- ❖ Εικόνα 31: <https://www.wikiwand.com/>
- ❖ Εικόνα 32: Shelly C. Lu, M.D., 2013, Glutathione Synthesis, Biochim Biophys Acta . 2013 May ; 1830(5): 3143–3153
- ❖ Εικόνα 33: Shelly C. Lu, M.D., 2013, Glutathione Synthesis, Biochim Biophys Acta . 2013 May ; 1830(5): 3143–3153
- ❖ Εικόνα 34: Shelly C. Lu, M.D., 2013, Glutathione Synthesis, Biochim Biophys Acta . 2013 May ; 1830(5): 3143–3153
- ❖ Εικόνα 36: Aysun Adan, Günel Alizada, Yağmur Kiraz, Yusuf Baran & Ayten Nalbant, 2016, Flow cytometry: basic principles and applications, Critical Reviews in Biotechnology, 37:2, 163-176
- ❖ Εικόνα 37: By, J. J. (2015). From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) by guest on June 30, 2015. For personal use only. Fibrinolytic Properties of a Human, 71(6), 1669-1675.
- ❖ Εικόνα 38: <https://cellbank.nibiohn.go.jp/legacy/pictures/clp00714.jpg>
- ❖ Εικόνα 39: Εκτίμηση αντιοξειδωτικής & αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων ανθέων ελίας και αγριελιάς. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Τέκος Φώτης, Λάρισα 2019

## 8. Βιβλιογραφία πινάκων

- ❖ Πίνακας 1: V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, Kalyan – 421 304
- ❖ Πίνακας 2: John Knight, Kumudu Madduma-Liyanage, James A. Mobley, Dean G. Assimos, and Ross P. Holmes, 2017, Ascorbic Acid Intake and Oxalate Synthesis, Urolithiasis . 2016 August ; 44(4): 289–297 , [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)

## 9. Ιστοσελίδες

- ❖ [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
- ❖ [https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/efsa\\_el](https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/efsa_el)