

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΣΤΗΝ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΡΙΣΙΜΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ,  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΞΙΦΤΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ  
ΛΑΡΙΣΑ, 2022

UNIVERSITY OF THESSALY  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY  
MSc TOXICOLOGY

**ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GREEK  
WINE EXTRACTS IN HUMAN CELL LINES**



SUPERVISOR: KOURETAS DIMITRIS,  
PROFESSOR OF PHYSIOLOGY, DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, UNIVERSITY OF  
THESSALY

KIRIAKI XIFTOU  
LARISA, 2022

## **Τριμελής Επιτροπή**

**Δημήτριος Κουρέτας (Επιβλέπων Καθηγητής):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Βεσκούκης Αριστείδης:** Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Χριστίνα Τσιτσιμπίκου:** Τοξικολόγος (ERT), Γενικό Χημείο Κράτους, Εθνικό γραφείο στήριξης REACH & CLP

## Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, θα ήθελα να πω αρχικά ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον κ. Κουρέτα Δημήτριο, καθηγητή της Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενσωματωθώ στην ερευνητική του ομάδα και για τη βοήθεια που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της ερευνητικής μου εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διδακτορικό ερευνητή Φώτιο Τέκο για τις γνώσεις και τη συνολική καθοδήγηση που μου προσέφερε όλους τους μήνες τους οποίους συνεργαστήκαμε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στους μεταδιδακτορικούς ερευνητές του εργαστηρίου Ιωάννη Κυριαζή, Μαρία Κούρτη, Σωτηρία Μακρή, Ζωή Βασιλική Σκαπέρδα για τις καίριες συμβουλές τους και για τον χρόνο που αφιέρωσαν για να με βοηθήσουν σε κάθε στάδιο της έρευνας μου. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά τους Παρασκευή Μαρία Νεχαλιώτη, Αναστασία Πατούνα, Καλλιρρόη Τεριζή, Περικλή Βαρδάκα, Μαρία Γκασδρόγκα και Νίκο Πέρκα, μέλη του εργαστηρίου της Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, οι οποίοι με τις γνώσεις και την εμπειρία τους με βοήθησαν να διεκπεραιώσω την έρευνα μου και για τις πολύ όμορφες στιγμές που πέρασα μαζί τους στο εργαστήριο όλους αυτούς του μήνες. Σας ευχαριστώ πολύ όλους!

## Περίληψη

Το κρασί ανήκει στην κατηγορία των αλκοολούχων ποτών και είναι το αποτέλεσμα της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους των σταφυλιών. Επιδημιολογικά δεδομένα έχουν αποκαλύψει τις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης κρασιού, κυρίως στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, γεγονός που έχει χαρακτηριστεί ως «το γαλλικό παράδοξο». Τα τελευταία χρόνια, με την εντατικοποίηση της έρευνας γύρω από τα φυτοχημικά προϊόντα οι ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού έχουν αποδοθεί στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του, χαρακτηριστικά που έχουν συνδεθεί με την πολυφαινολική του σύσταση. Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης είναι η αξιολόγηση τεσσάρων εμβληματικών ελληνικών οίνων, δύο ερυθρών (Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο) και δύο λευκών (Ασύρτικο και Μαλαγουζιά) ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν την αντιοξειδωτική οδό των κυττάρων NRF2-KEAP1 και την επίδρασή τους στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των λιπιδίων, ένα μονοπάτι που φαίνεται να επηρεάζεται από την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής οδού. Οι συγκεκριμένες ποικιλίες αξιολογήθηκαν σε προηγούμενη μελέτη *in vitro*, όπου εμφάνισαν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι εμπορικών και ενδογενών ελεύθερων ριζών, μια ιδιότητα που συσχετίστηκε θετικά με το πολυφαινολικό τους φορτίο. Για το σκοπό αυτό, 50 μg/ml εκχυλίσματος και από τους τέσσερις οίνους χορηγήθηκαν στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2 και MKN45 και έπειτα από 24 ώρες υπολογίστηκαν διαφορές έκφρασης ανάμεσα σε κύτταρα που δεν δέχτηκαν καμία παρέμβαση και σε κύτταρα που πήραν κάθε μία από τις τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν διφορούμενη δράση των τεσσάρων κρασιών στην έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού NRF2 και GCLC, ενώ παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης ACLY, η οποία συμμετέχει στην σύνθεση των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης. Η σημασία των ευρημάτων αυτών έγκειται στην ανακάλυψη όλου του βιολογικού εύρους των δυνατοτήτων που κατέχουν τα χημικά συστατικά του κρασιού, με σκοπό τη χρήση τους ως συμπληρώματα διατροφής και ως θεραπευτικούς παράγοντες για νόσους σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

**Λέξεις κλειδιά:** κρασί, πολυφαινόλες, αντιοξειδωτικά, ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικό στρες, μονοπάτι NRF2-KEAP1, μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, ACLY

## Abstract

Wine is a popular beverage, produced through alcoholic fermentation of grape must. Epidemiological data has revealed the several benefits of wine consumption, as it has been related to lower prevalence for cardiovascular diseases, a fact that has been described as "the French paradox". In recent years, the extensive research on phytochemicals has revealed that the antioxidant and anti-inflammatory properties of wine have derived from its high polyphenolic content. This study aims to evaluate four emblematic Greek varieties, two red wines (Agiorgitiko and Xinomavro) and two white wines (Asyrtiko and Malagouzia), for their capacity to activate the antioxidant NRF2-KEAP1 pathway in human cell lines and for their effect on cellular lipid biosynthesis. There are studies that suggest an impact of NRF2-KEAP1 pathway activation on lipid metabolism reactions. In a previous study, the four wines were evaluated in vitro for their potent antioxidant capacity, and all the varieties exhibited a strong antioxidant profile, related to their total polyphenolic content. For the purpose of this study, HepG2 and MKN45 human cancer cells lines were incubated with 50 µg/ml of each wine extract for 24 hours and then, changes in the expression level of specific genes were estimated between untreated and treated cells. Results from different wine extracts showed reverse effects on the expression of NRF2 target genes (NRF2 and GCLC) and inhibitory effects on ACLY protein expression. ACLY is a cytosolic enzyme involved in the biosynthetic pathway of fatty acids and cholesterol. Better understanding of the biological range of action of wine polyphenols, is a key reference point of designing novel food supplements and therapeutic agents for oxidative stress related diseases.

**Key words:** wine, polyphenols, antioxidants, reactive species, oxidative stress, NRF2-KEAP1 pathway, fatty acid biosynthetic pathway, ACLY

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	V
Abstract .....	VI
Περιεχόμενα .....	VII
Εισαγωγή .....	1
Ιστορική Αναδρομή .....	1
Κατηγορίες κρασιών.....	2
Διαδικασία παραγωγής κρασιού .....	3
Χημική σύσταση κρασιού .....	4
Οξειδωτική ομοίωση.....	5
Αντιδραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου .....	7
Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών .....	9
Ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών .....	14
Ρόλος των ελεύθερων ριζών σε φυσιολογικές διεργασίες.....	18
Αρνητικές επιδράσεις των ROS.....	20
Αντιοξειδωτικός μηχανισμός .....	23
Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά .....	28
Εξωγενή αντιοξειδωτικά.....	32
Το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2-KEAP1 .....	34
Η μεσολάβηση της οδού NRF2-KEAP1 στο οξειδωτικό στρες και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών.....	36
Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τις μεταβολικές οδούς του κυττάρου .....	38
Η οδός NRF2-KEAP1 και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός του κυττάρου.....	38
Ο ρόλος του NRF2 στο μεταβολισμό των λιπιδίων.....	39
Συστατικά του κρασιού ως ρυθμιστές του συστήματος NRF2-KEAP1.....	40
Στόχοι .....	42
Υλικά και μέθοδοι .....	42
Προετοιμασία Δειγμάτων.....	42
Καλλιεργητικές συνθήκες.....	42
Διαχείριση κυτταρικών σειρών.....	43
Μέτρηση κυττάρων και επίστρωση σε 6-well plate .....	44
Χορήγηση των οίνων στα κύτταρα και απομόνωση ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης .....	44
Ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	45
Ανοσοτύπωμα κατά Western .....	46
Χορήγηση των οίνων στα κύτταρα και απομόνωση ολικού RNA.....	50

Ποσοτικοποίηση του συνολικού RNA των δειγμάτων.....	51
Πέψη με DNAase.....	51
Σύνθεση cDNA.....	52
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	53
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	54
Αποτελέσματα .....	55
Επίδραση των ερυθρών και λευκών ποικιλιών στην έκφραση του μονοπατιού NRF2- KEAP1 .....	55
Επίδραση των τεσσάρων ποικιλιών στην διαδικασία της λιπογένεσης μέσω της έκφρασης της ACLY.....	56
Συζήτηση .....	58
Βιβλιογραφία.....	69



## Εισαγωγή

### Ιστορική Αναδρομή

Η ιστορία του κρασιού ξεκινάει πριν από περίπου 7000 χρόνια στην περιοχή ανάμεσα στην Κασπία και τη Μαύρη Θάλασσα, όπου έκπληκτοι οι αγρότες παρατήρησαν την αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση κατεστραμμένων σταφυλιών μέσα στα δοχεία συγκομιδής τους προς παραγωγή ενός αλκοολούχου χυμού. Το νέο αυτό προϊόν υπερίσχυε σε γεύση από την κατανάλωση των καρπών του σταφυλιού και η ιστορία του κρασιού σφραγίστηκε για τα επόμενα χρόνια.<sup>1</sup> Παρόλου που υπολείμματα τρυγικούς οξέος που βρέθηκαν σε κεραμικά βάζα μαρτυρούν την ύπαρξη οίνου από το 7000 π.Χ, η πρώτη οργανωμένη προσπάθεια αμπελουργίας και οινοποίησης η οποία παραπέμπει στα Δυτικά πρότυπα ξεκίνησε το 5000 π.Χ στην περιοχή του Νότιου Καυκάσου, όπου έγινε η συστηματική καλλιέργεια του *Vitis Vinifera*, του είδους που αποτελεί τη βάση για την παραγωγή της πλειονότητας των κρασιών που κυκλοφορούν στο εμπόριο.<sup>2</sup> Το κρασί ταξίδεψε σε όλα τα μέρη της Γης ανά τις χιλιετίες, από τη Μεσοποταμία και περιοχές τις Ασίας όπως το Ιράν, Ιράκ και την Τουρκία μέχρι την Αίγυπτο, την Ελλάδα, την Ιταλία και τις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου.

Οι διαδρομές που ακολούθησε ο Κολόμβος τον 15<sup>ο</sup> αιώνα ταξίδεψαν την τέχνη της οινοποίησης στις χώρες του σύγχρονου κόσμου και οι μεταναστευτικές ροές των Ευρωπαίων τον 19<sup>ο</sup>-20<sup>ο</sup> αιώνα σε Αμερική, Νέα Ζηλανδία και Αυστραλία εδραίωσαν την καλλιέργεια του *Vitis Vinifera* στις χώρες αυτές με αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιών του Νέου Κόσμου.<sup>3</sup> Οι νέοι αμπελώνες εγκαθιδρύθηκαν σε περιοχές με θερμότερο κλίμα, όπου έλειπε η τεχνογνωσία και η παραδοσιακή γνώση των μικρομεσαίων παραγωγών της Ιταλίας και της Γαλλίας. Η προσκόλληση στον τόπο προέλευσης του αμπελώνα και του *terroir* που χαρακτήριζε την ποιότητα των κρασιών της Δύσης, έδωσε τη θέση της σε καινοτόμες πειραματικές πρακτικές οινοποίησης σε “βιομηχανικού” τύπου μονάδες, με αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιών υψηλότερων αλκοολικών βαθμών, πιο συμπαγούς σώματος και πιο φρουτώδη από αυτά της Ευρώπης και της Μέσης Ανατολής. Η οινολογία ακολούθησε την κουλτούρα της εποχής με καινοτόμες στρατηγικές μάρκετινγκ, μεγαλύτερες μονάδες παραγωγής, προσθήκες χημικών ουσιών και σύγχρονες τεχνολογίες στην διαδικασία μετατροπής του σταφυλιού σε κρασί διαμορφώνοντας, έτσι, μια νέα παγκοσμιοποιημένη και ανταγωνιστική αγορά κρασιού με άμεσο αντίκτυπο στην ποιότητα, στην διάθεση αλλά και στην τιμή του κρασιού.<sup>4</sup>

Σταθμός στην ιστορία του οίνου υπήρξε ο 17<sup>ος</sup> αιώνας όπου διαδόθηκε η θείωση του κρασιού μέσα στα βαρέλια, γεγονός που συντέλεσε στην βελτίωση της ποιότητας των οίνων αλλά και στην αύξηση του χρόνου παλαίωσης και αποθήκευσης τους.<sup>2</sup> Σημαντική χρονολογία στάθηκε το 1860, όταν ένα νέο είδος παρασίτου προερχόμενο από αμπελοκαλλιέργειες της Αμερικής, το *Daktulasphaira vitifoliae*, ή με την κοινή του ονομασία φυλλοξήρα του κρασιού, έφτασε στην Ανατολική Γαλλία και στη συνέχεια έπληξε τους αμπελώνες ολόκληρης της Ευρώπης, με αποτέλεσμα την καταστροφή του 2/3 της σοδειάς μέχρι τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, προκαλώντας σοβαρό οικονομικό και κοινωνικό αντίκτυπο. Καθώς η φυλλοξήρα έπληττε πρώτη φορά τα αμπέλια της Ευρώπης, τα ίδια δεν είχαν αποκτήσει καμία ανθεκτικότητα στο παράσιτο, σε αντίθεση με τα φυτά της Αμερικής. Ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος διαχείρισης της κρίσης χωρίς παράλληλα να υποβαθμιστεί η σημασία της προέλευσης και της ποικιλίας του κρασιού κάθε χώρας στάθηκε ο εμβολιασμός των ποικιλιών *V. Vinifera* σε ανθεκτικά ή μερικώς ανθεκτικά υποκείμενα τα οποία προήλθαν από αμερικανικά υβρίδια διάφορων ειδών από το γένος *Vitis*. Η συγκεκριμένη στρατηγική χρησιμοποιείται ευρέως από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα μέχρι και σήμερα στις αμπελουργικές μονάδες για την διαχείριση του παρασίτου της φυλλοξήρας.<sup>5-7</sup> Από τη γένεση του και μετά το κρασί παρέμεινε αναπόσπαστο στοιχείο της καθημερινότητας του ανθρώπου. Ακολούθησε μεταναστευτικές ροές, ενώθηκε με τον πολιτισμό και τη λαϊκή παράδοση των ανθρώπων, συμμετείχε σε θρησκευτικές τελετές, απέκτησε συμβολικό χαρακτήρα, έγινε αναπόσπαστο κομμάτι των εορτών, απαγορεύτηκε, εξαφανίστηκε έπειτα από φυσικές καταστροφές, επανεμφανίστηκε και σήμερα αποτελεί μία από τις πιο ταχέως εξελισσόμενες αγροτικές επιστήμες.

## Κατηγορίες κρασιών

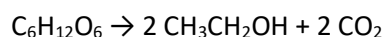
Το κρασί είναι ένα δημοφιλές ποτό που παράγεται ως προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους των σταφυλιών. Τα κρασιά που είναι διαθέσιμα σήμερα στην αγορά, χωρίζονται σε κατηγορίες βάσει χαρακτηριστικών όπως είναι η περιοχή προέλευσης τους, η ποικιλία του σταφυλιού, οι τεχνικές οινοποίησης και η παλαίωσή τους (σε περίπτωση που πραγματοποιείται παλαίωση). Η πρώτη μεγάλη κατηγοριοποίηση αφορά τους Οίνους με Ονομασία Προέλευσης και τους Επιτραπέζιους οίνους. Οι πρώτοι προέρχονται από ποικιλίες που καλλιεργούνται στην περιοχή που αναφέρει η επωνυμία τους και φέρουν όλα αυτά τα οργανοληπτικά στοιχεία που αναπτύσσονται στο ιδιαίτερο οικοσύστημα της περιοχής αυτής. Αντίθετα, οι επιτραπέζιοι οίνοι διακρίνονται στους Τοπικούς Οίνους, οι οποίοι φέρουν ένδειξη της γεωγραφικής τους καταγωγή και πληρούν ορισμένα μόνο από τα κριτήρια

παραγωγής σε σχέση με τους Οίνους Ονομασίας Προέλευσης, στους οίνους με Ονομασία Κατά Παράδοση, οι οποίοι ξεχωρίζουν χάρη στην παραδοσιακή τεχνική παραγωγής τους και στα κοινά Κρασιά Μάρκας που κυκλοφορούν στο εμπόριο με διάφορες ονομασίες, τα οποία ξεχωρίζουν από την ιδιαίτερη τεχνογνωσία και τα υψηλά στάνταρ ποιότητας με τα οποία παρήχθησαν.<sup>8</sup> Η περεταίρω κατηγοριοποίηση των οίνων εξαρτάται από 3 παράγοντες: το χρώμα, την περιεκτικότητα σε σάκχαρα και τη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα που περιέχουν. Στην πρώτη περίπτωση τα κρασιά διακρίνονται σε ερυθρά, λευκά και ροζέ, μια ιδιότητα που καθορίζεται από την ποικιλία του σταφυλιού και την διαδικασία οινοποίησης. Ανάλογα, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα τοποθετεί τα κρασιά στις κατηγορίες ξηρό, ημίξηρο, ημίγλυκο και γλυκό. Τέλος, η περιεκτικότητα του οίνου σε διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) διαχωρίζει τα κρασιά σε ήσυχα, ημιαφρώδη και αφρώδη.<sup>9</sup>

### Διαδικασία παραγωγής κρασιού

Η διαδικασία της παραγωγής οίνου ακολουθεί ορισμένα βήματα, τα οποία συνοψίζονται στα εξής: συγκομιδή των καρπών, σύνθλιψη και πίεση, ζύμωση, διαύγαση και το τελικό στάδιο της ωρίμανσης, πριν την εμφιάλωση. Η χρονική στιγμή που πραγματοποιείται ο τρύγος (η συγκομιδή), ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσης του σταφυλιού, θα καθορίσει την γεύση του οίνου (την οξύτητα και την γλυκύτητά του). Σε ότι αφορά τον τρύγο, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χειρωνακτικά, είτε με την υποστήριξη μηχανημάτων. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των κοτσανιών και η σύνθλιψη των καρπών, διαδικασίες που πλέον πραγματοποιούνται σε σύγχρονους κυλινδρικούς διάτρητους θραυστήρες υψηλών στροφών. Η παλαιότερη μέθοδος σύνθλιψης, η οποία περιλάμβανε το πάτημα των καρπών με τα πόδια, πλέον έχει σχεδόν ολοκληρωτικά εγκαταλειφθεί. Με τη σύνθλιψη παράγεται ο μούστος, ένα μίγμα που αποτελείται από το χυμό και τα στερεά μέρη του σταφυλιού, όπως είναι για παράδειγμα οι φλούδες και οι σπόροι. Στο στάδιο αυτό συναντώνται και οι μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στην ερυθρή και λευκή οινοποίηση, καθώς στην δεύτερη περίπτωση γίνεται διαχωρισμός ανάμεσα στο χυμό του σταφυλιού και τα στερεά συστατικά του κρασιού. Η διαδικασία αυτή θα εμποδίσει την εξαγωγή χημικών συστατικών από την φλούδα στο παραγόμενο κρασί, όπως είναι για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για κόκκινο χρώμα των κρασιών. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαύγαση του λευκού μούστου, η οποία περιλαμβάνει την καθίζηση των σωματιδίων που αιωρούνται στο χυμό μέσω τεχνικών ελάττωσης της θερμοκρασίας και σε πολλές περιπτώσεις μέσω φυγοκέντρησης. Η ελάττωση της θερμοκρασίας θα αναστείλει την αλκοολική ζύμωση έως

όπου να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των στερεών. Σε αντίθεση, ο ερυθρός μούστος παραμένει με μαζί με τα στερεά συστατικά του, ώστε να αποκτήσει τα χημικά στοιχεία που θα του αποδώσουν το χαρακτηριστικό χρώμα, γεύση και υφή. Το επόμενο βήμα της οινοποίησης είναι η αλκοολική ζύμωση, όπου τα σάκχαρα του χυμού ή του μούστου θα μετατραπούν σε αιθανόλη (αλκοόλη) και CO<sub>2</sub>.



όπου C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> η γλυκόζη και CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH η αιθανόλη

Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τις ζύμες, μονοκύτταρους οργανισμούς οι οποίοι βρίσκονται στη φλούδα των σταφυλιών και έχουν εξαχθεί στον χυμό. Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για την αλκοολική ζύμωση ανήκουν κυρίως στο γένος *Saccharomyces*, αλλά συμμετέχουν και τα γένη *Kloeckera*, *Torulopsis* και *Pichia*. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις γίνεται εμβολιασμός της καλλιέργειας με εμπορικές ζύμες για τον καλύτερο έλεγχο του αποτελέσματος. Η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης απαιτεί την εξασφάλιση μιας σειράς παραμέτρων για την παραγωγή υψηλής ποιότητας κρασιών, όπως είναι η θερμοκρασία, η ύπαρξη κατάλληλης συγκέντρωσης ζυμών και υποστρώματος των ζυμών, η αποφυγή επαφής με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας κτλ. Ακόμα, μία δεύτερη φάση ζύμωσης πραγματοποιείται από ένζυμα ορισμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων, κατά την οποία το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Την αλκοολική ζύμωση ακολουθεί η διαδικασία της διαύγασης, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση φίλτρου, όπου αφαιρούνται οι νεκροί ζυμομύκητες, οι ταννίνες και οι πρωτεΐνες του κρασιού, αφού πρώτα το παραγόμενο κρασί μεταφερθεί σε δρύινα βαρέλια ή δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα. Τέλος, το κρασί παραπέμπεται για εμφιάλωση ή παλαίωση.<sup>9</sup>

### Χημική σύσταση κρασιού

Γενικά, το κρασί αποτελείται στο μεγαλύτερο του ποσοστό από νερό (86%) και έπειτα ακολουθούν η αιθανόλη, η γλυκερίνη, οι ανώτερες αλκοόλες και οι πολυσακχαρίτες, τα οργανικά οξέα, οι πολυφαινόλες, τα μέταλλα, καθώς και πτητικές και άλλες ενώσεις. Τα παραπάνω στοιχεία είτε προέρχονται απευθείας από τα σταφύλια, είτε παράγονται κατά τη διαδικασία της οινοποίησης. Η γλυκερίνη, η τρίτη μεγαλύτερη σε ποσότητα ένωση που ανευρίσκεται στο κρασί (4–10 g / L), προσφέρει στη διατήρηση της ποιότητας των οίνων, στην υφή και στη γεύση τους. Αντίστοιχα, τα οξέα των κρασιών, με κυριότερα το τρυγικό το κιτρικό και το μηλικό οξύ, συνεισφέρουν στη γεύση επηρεάζοντας μαζί με τις ταννίνες την τραχύτητα

του τελικού προϊόντος. Μια μεγάλη κατηγορία χημικών συστατικών του κρασιού, η οποία καθορίζει σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (χρώμα, γεύση, αίσθηση στο στόμα) του αλλά και την βιολογική του δράση στον οργανισμό (αντιοξειδωτικές ιδιότητες), είναι οι πολυφαινόλες.<sup>10</sup> Η κύρια διάκριση των πολυφαινολών είναι σε φλαβονοειδή όπως για παράδειγμα οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβανόνες, φλαβόνες οι ταννίνες και άλλες υποκατηγορίες και τα μη φλαβονοειδή, όπως είναι η τυροσόλη, η υδροτυροσόλη, τα στυλβένια και άλλα. Η παρουσία τους στο κρασί εξαρτάται από την ποικιλία των σταφυλιών, από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από όλη τη διαδικασία οινοποίησης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι ερυθροί οίνοι είναι πλουσιότεροι σε πολυφαινόλες από τους λευκούς λόγω της διαρκούς παρουσίας των στεμφύλων στα στάδια της οινοποίησης τους. Ακόμα, κάθε ξεχωριστή κατηγορία πολυφαινολών επηρεάζει μοναδικά τόσο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, όσο και τη βιολογική του δράση.<sup>11</sup>

#### Οξειδωτική ομοιόσταση

Όπως ανέφερε ο Von Bertalanffy, ο πατέρας της γενικής θεωρίας συστημάτων: «Τα ζωντανά συστήματα είναι ανοιχτά συστήματα, που διατηρούνται χάρη στην ανταλλαγή υλικών με το περιβάλλον τους και στη συνεχή δημιουργία και διάσπαση των συστατικών τους». Αυτή η εναλλαγή ενέργειας πραγματοποιείται κάτω από ένα σύστημα εποπτείας, όπου η εισροή και η εκροή ενέργειας συμβάλλουν στην διατήρηση μια σταθερής κατάστασης.<sup>12</sup> Οι ζώντες οργανισμοί αποτελούν ανοιχτά βιολογικά συστήματα τα οποία για να επιτελέσουν τις ζωτικής σημασίας δραστηριότητες τους πραγματοποιούν μια σειρά από αναβολικές και καταβολικές αντιδράσεις με ταυτόχρονη οξείδωση και αναγωγή των συστατικών τους. Στο πεδίο της βιολογίας που ασχολείται με την οξειδοαναγωγή, η παραπάνω σταθερή κατάσταση χαρακτηρίζεται ως οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Πρόκειται για μια δυναμική ισορροπία που απαιτεί ένα καλά οργανωμένο οξειδοαναγωγικό μεταβολικό σύστημα που θα είναι σε θέση να ανιχνεύσει τις αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και να δράσει αναλόγως ώστε να επέλθει ξανά ισορροπία.<sup>13</sup> Το οξειδοαναγωγικό μεταβολικό σύστημα ορίζεται ως ένα σημαντικό κομμάτι του κυτταρικού μεταβολισμού, το οποίο περιλαμβάνει μεταβολίτες, ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες και σηματοδοτικές οδούς και έχει ως σκοπό την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου.<sup>14</sup>

Η ρύθμιση της οξειδοαναγωγής σε ένα κυτταρικό σύστημα είναι υψίστης σημασία καθώς καθορίζει πολλές βιολογικές διεργασίες του κυττάρου, όπως για παράδειγμα την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τον μεταβολισμό, τον κυτταρικό θάνατο, την γήρανση, τις ανοσολογικές αντιδράσεις, την αυτοφαγία κτλ.<sup>13</sup> Περιφραστικά η οξειδοαναγωγική διαδικασία περιγράφεται ως μια διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων από ένα μόρια-δότη, ή αλλιώς έναν αναγωγικό παράγοντα, σε ένα μόριο δέκτη, ή αλλιώς σε ένα οξειδωτικό παράγοντα.<sup>15</sup> Ο οξειδωτικός παράγοντας (ηλεκτρονιόφιλο) καθώς αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από τον αναγωγικό παράγοντα (πυρηνόφιλο) τον οξειδώνει με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών.<sup>16</sup> Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα άτομα ή μόρια, ιδιαίτερα αντιδραστικά, που υπάρχουν ανεξάρτητα και περιέχουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στα ατομικά τους τροχιακά. Η μη επιλεκτική αντιδραστικότητα τους οφείλεται στο γεγονός πως αντιδρούν με άλλα μόρια, δρώντας είτε ως αναγωγικά, είτε ως οξειδωτικά με σκοπό να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα.<sup>17</sup> Το στοιχειώδες οξυγόνο είναι ένα τέτοιο παράδειγμα ηλεκτρονιόφιλου. Βρίσκεται σε αφθονία στα κύτταρα, αποτελεί βασικό συστατικό του οξειδωτικού μεταβολισμού των κυττάρων και δίνει γένεση σε αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).<sup>18</sup> Οι πηγές παραγωγής και οι μηχανισμοί δράσεις των ROS έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε σχέση με άλλες ελεύθερες ρίζες λόγω του επιπολασμού τους στο κύτταρο και την εμπλοκή τους σε παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, στο κύτταρο συναντώνται και δραστικές μορφές αζώτου, δραστικές μορφές θείου και δραστικές μορφές χλωρίου, κυρίως ως προϊόντα αντίδρασης μορίων με τις ROS.<sup>19</sup>

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, που ορισμένες από αυτές οδηγούν στην παραγωγή ROS, είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού, με τις ίδιες τις ROS να αποτελούν μόρια-μεσολαβητές για διάφορες σηματοδοτικές οδούς, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετάδοση σήματος, την γονιδιακή έκφραση και την άμυνα έναντι παθογόνων. Κλασικό παράδειγμα είναι αυτό του νευροδιαβιβαστή NO, μιας δραστικής μορφής αζώτου απαραίτητη για την αγγειοσύσπαση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "όρμιση" και αποτελεί μια ευεργετική ή διεγερτική απόκριση των κυττάρων ή των οργανισμών σε χαμηλή ή υποτοξική έκθεση σε έναν παράγοντα που σε υψηλότερες δόσεις θα θεωρούνταν τοξικός.<sup>20,21,22</sup> Σε αυτό το δόσοεξαρτώμενο φαινόμενο βρίσκει εφαρμογή το ρητό του Παράκελσου ότι "η δόση κάνει το δηλητήριο" πέντε αιώνες μετά, καθώς μικρή παραγωγή ROS οδηγεί σε μια κατάσταση φυσιολογικού οξειδωτικού ευ-στρες, μια συνθήκη απαραίτητη για την οξειδωτική σηματοδότηση, ενώ μια υπέρμετρη παραγωγή ROS προκαλεί οξειδωτικό

στρες και την καταστροφή κρίσιμων βιομορίων για το κύτταρο, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο ή παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού.<sup>23</sup>

Προηγουμένως, αναφέρθηκε πως οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ αντιδραστικά μόρια, τα οποία δρουν οξειδώνοντας ή ανάγοντας τα υποστρώματα τους. Μέσα στο υποκυτταρικό περιβάλλον οι ROS αλληλοεπιδρούν με μακρομόρια όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, οξειδώνοντας τα, με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών που είναι συνυφασμένες με παθολογικές καταστάσεις του κυττάρου. Η καταστροφή των βιομορίων του κυττάρου και οι αλλαγές που προκύπτουν στις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου από την υπέρμετρη παραγωγή ROS, έχουν εφαρμογή σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων του οργανισμού συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των φλεγμονωδών ασθενειών, των νευρολογικών διαταραχών, των αγγειακών παθήσεων κτλ.<sup>22,24</sup> Λόγω του φυσιολογικού ρόλου των ROS στην κυτταρική λειτουργία θα ήταν αναπόφευκτη η οξειδωτική βλάβη, αν το κύτταρο δεν διέθετε ορισμένους αμυντικούς μηχανισμούς για να προστατευτεί. Το κύτταρο επιστρατεύει μια σειρά από ενζυμικά και μη μόρια, τα αντιοξειδωτικά, τα οποία είτε εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, είτε καθυστερούν τη δημιουργία τους ή απομακρύνουν τις βλάβες που προκάλεσαν οι ελεύθερες ρίζες στα μόρια-στόχους τους.<sup>19</sup> Πρόκειται, λοιπόν, για μια ολοκληρωμένη αντίδραση του κυττάρου προκειμένου να επιστρέψει σε μια οξειδωτική ισορροπία. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει μοριακούς διακόπτες, έτοιμους να αντιληφθούν αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου και να εκκινήσουν την γονιδιακή έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών ενζύμων και να ενεργοποιήσουν οδούς καταστολής του στρες. Μία από τις πλέον σημαντικές αντιοξειδωτικές οδούς, αυτή του Nrf2/Keap1 θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.<sup>12,23,25</sup>

## Αντιδραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

### Ιστορική αναδρομή

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στη στιβάδα σθένους τους, γεγονός που τα κάνει ασταθή και ιδιαιτέρως αντιδραστικά με άλλα συστατικά μέσα στο κύτταρο. Αποτελούν προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν αμφίσημο ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου. Η ιστορία των δραστικών ριζών οξυγόνου ξεκίνησε το 1954, όταν η Rebeca Gerschman απέδωσε τις επιβλαβείς δράσεις του οξυγόνου και της ακτινοβολίας X στην δημιουργία ελεύθερων ριζών<sup>26</sup>. Δύο χρόνια μετά, ο Αμερικανός ιατρός Denham Harman ανέπτυξε την θεωρία του

για τη γήρανση, σύμφωνα με την οποία η γήρανση οφείλεται στη χρόνια συσσώρευση βλαβών που προκύπτουν από τις ελεύθερες ρίζες.<sup>27,28</sup> Το 1969, κάνει την εμφάνιση της στην βιβλιογραφία η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), ένα ενζυμικό αντιοξειδωτικό του κυττάρου που ανακαλύφθηκε από τον Fridovich<sup>29</sup> και είναι σήμερα γνωστό για τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, ο Loschen συνέδεσε την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.<sup>30</sup> Στα τέλη της δεκαετίας του '70, οι Mittal και Murad αναφέρθηκαν στην ρίζα υδροξυλίου ως μία εκ των ενεργοποιητών του ενζύμου της γουανυλικής κυκλάσης για την παραγωγή του αγγελιοφόρου cGMP, μιας σηματοδοτικής οδού που συμμετέχει σε πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, με τη σημαντικότερη αυτή της νευροδιαβίβασης.<sup>31</sup> Στο βιβλίο των Halliwell and Gutteridge που εκδόθηκε για πρώτη φορά το 1989, γίνεται ξεκάθαρη η διάκριση μεταξύ των ριζών οξυγόνου και των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Όπως αναφέρουν και οι συγγραφείς “Όλες οι ρίζες οξυγόνου είναι ROS αλλά όλα τα ROS δεν είναι ρίζες οξυγόνου”.<sup>32</sup> Με αυτήν την φράση υποδηλώνεται ότι στις ROS, εκτός από τις ρίζες υδροξυλίου, σουπεροξειδίου κτλ περιλαμβάνονται και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου, όζον κτλ. Σήμερα, οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν ένα πεδίο εντατικής έρευνα για την εμπλοκή τους σε μια σειρά κυτταρικών λειτουργιών του οργανισμού.

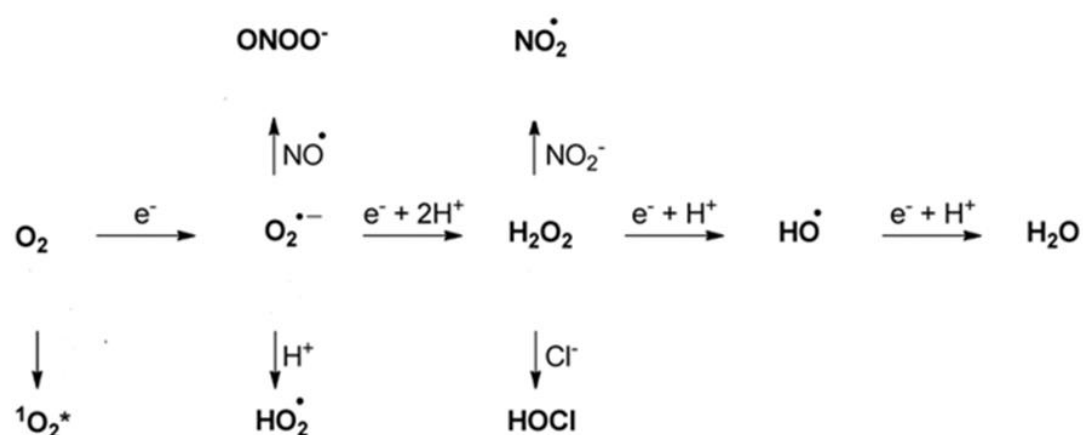
#### Είδη Αντιδραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου

Πριν από 2,5 εκατομμύρια χρόνια ξεκίνησε μια σταδιακή αύξηση του οξυγόνου στη Γη, μια διαδικασία που την τελευταία εικοσαετία συνδέθηκε με τη φωτοσυνθετική ιδιότητα των κυανοβακτηρίων. Μια ακολουθία εξελικτικών βημάτων οδήγησε στη δημιουργία αερόβιων πολυκύτταρων οργανισμών που βασίζουν την επιβίωση τους στην κυτταρική αναπνοή.<sup>33</sup> Ως κυτταρική αναπνοή αναγνωρίζουμε τις διεργασίες σταδιακής διάσπασης υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών που προέρχονται από την τροφή με σκοπό την παραγωγή ενέργειας, η οποία μέσα στο κύτταρο δεσμεύεται με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το οξυγόνο παίζει κυρίαρχο ρόλο στις διαδικασίες κυτταρικής αναπνοής και οι ROS σχηματίζονται ως παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής.<sup>34</sup> Μέσα στα χρόνια χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ονομασίες για να περιγράψουν τις διάφορες δραστικές αναγωγικές μορφές οξυγόνου, όπως για παράδειγμα ο όρος αντιδραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου (Reactive Oxygen Intermediates, ROI). Ως ROI χαρακτηρίζονται οι ατελείς αναγωγικές μορφές οξυγόνου όπως για παράδειγμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το σουπεροξείδιο και η ρίζα υδροξυλίου.<sup>35</sup> Βέβαια, στην βιβλιογραφία έχει επικρατήσει η



ονομασία ROS, η οποία περιλαμβάνει όλα τα δραστικά είδη που προέρχονται από το οξυγόνο, συμπεριλαμβανομένων των ROI, της ανηγμένης μορφής όζοντος (O<sub>3</sub>), του μονήρους οξυγόνου (O<sub>2</sub>), του υποβρωμιώδους, υποχλωριώδους και υποϊώδους οξέος και των ριζών αλκοξυλίου (RO<sup>•</sup>), καρβονικού (CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>) υπεροξυλίου (ROO<sup>•</sup>) και ημικινόνης (SQ<sup>•-</sup>).<sup>36</sup>

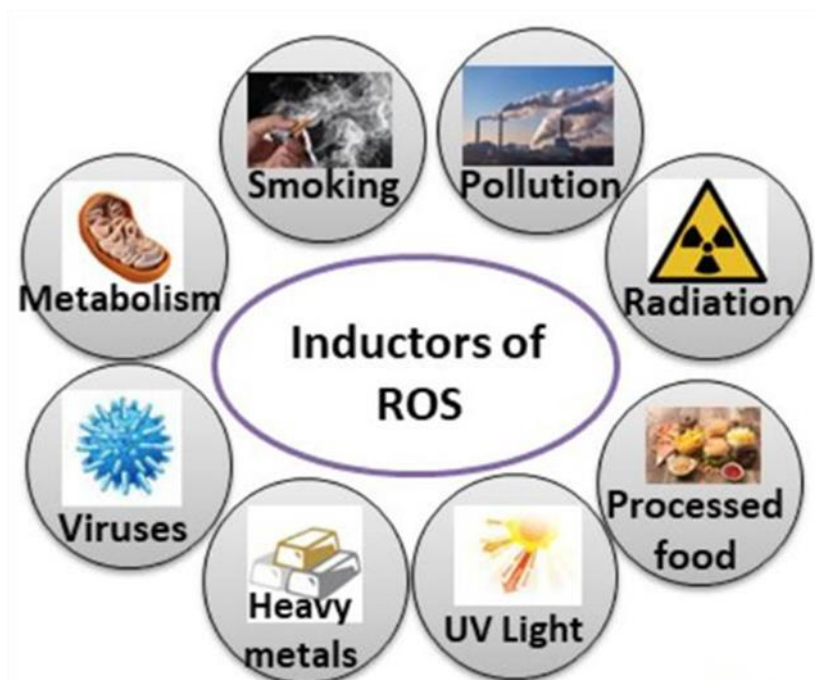
Οι αντιδραστικές μορφές αζώτου είναι επίσης μια μεγάλη κατηγορία ελεύθερων ριζών, παραγώγων του οξυγόνου που περιλαμβάνουν το νιτρικό οξύ (NO<sup>\*</sup>), το ισχυρά αντιδραστικό υπεροξυνιτρώδες (ONOO<sup>-</sup>), το νιτροζύλιο (HNO), τις νιτροσοθειόλες (RSNOs) και άλλα.<sup>37</sup> Το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με άλλες ρίζες ή με ασταθή μόρια (πχ μέταλλα μετάπτωσης) αποσπώντας τους ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται στην ρίζα σουπεροξειδίου, η αναγωγή της οποίας θα δώσει υπεροξείδιο του υδρογόνου και ούτω καθεξής. Η **Εικόνα 1** παρουσιάζει μια σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού των ROS, η οποία προκύπτει είτε από μεταφορά ηλεκτρονίων, είτε από μεταφορά ενέργειας στο μοριακό οξυγόνο.<sup>36</sup>



**Εικόνα 1.** Αναπαράσταση της οδού σχηματισμού των ROS μέσω αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ενέργειας.<sup>36</sup>

### Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών

Οι παράγοντες που οδηγούν στην γένεση των ROS είναι τόσο ενδογενείς, όσο και εξωγενείς. Στους εξωγενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται ο καπνός του τσιγάρου, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορα φάρμακα, τοξίνες, περιβαλλοντικοί ρύποι, ιόντα βαρέων μετάλλων, και τα εντομοκτόνα. Καθένα από τα παραπάνω δρα, είτε προκαλώντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών μέσα στο κύτταρο, είτε αναστέλλοντας την έκφραση ή δράση αντιοξειδωτικών γονιδίων και ενζύμων.<sup>38</sup> (**Εικόνα 1**)



**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση των εξωγενών και ενδογενών πηγών ROS<sup>38</sup>

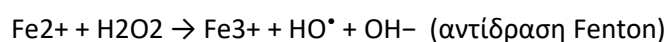
Ιονίζουσα ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Η ιονίζουσα ακτινοβολία, λόγω της υψηλής διεισδυτικής της ικανότητας στον ανθρώπινο οργανισμό, προκαλεί τον ιοντισμό του νερού, ένα συστατικό άφθονο μέσα στα κύτταρα. Ο ιοντισμός του νερού έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, με κυριότερη την ρίζα υδροξυλίου (φαινόμενο ραδιόλυσης του νερού).<sup>39</sup> Τα χημειοθεραπευτικά είναι, επίσης, μια μεγάλη κατηγορία φαρμάκων που ενισχύουν το οξειδωτικό στρες του οργανισμού, καθώς αυξάνουν τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες καταστρέφουν βασικά βιομόρια του κυττάρου, αλλά ταυτόχρονα μειώνουν και τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων στο πλάσμα. Η δοξορουβικίνη, ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος χημειοθεραπευτικός παράγοντας, εμπλέκεται στην διαδικασία της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εκτρέποντας ηλεκτρόνια προς το νερό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της δραστηκής ρίζας σουπεροξειδίου.<sup>40</sup>

Διατροφή και αλκοόλ

Η τροφή είναι επίσης μια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών. Η σύσταση της σε μακροθρεπτικά (πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες), βιταμίνες, μέταλλα και συντηρητικά έχει αποδειχθεί πως παίζει διπλό ρόλο στην οξειδωτική ομοίωση του οργανισμού. Η

υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων και λιπαρών που χαρακτηρίζει τις διατροφικές συνήθειες της Δύσης οδηγεί σε παρατεταμένη φλεγμονή, η οποία προκαλεί οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, αυξάνει τα υποστρώματα που θα διασπαστούν προς παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα την αύξηση των ROS. Σημαντική είναι και αύξηση των ROS μέσω των αντιδράσεων Fenton που προκαλούνται από την υψηλή πρόσληψη του διατροφικού σιδήρου.<sup>41,42</sup> Ως αντίδραση Fenton χαρακτηρίζεται η αναγωγή του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή προς παραγωγή μίας ρίζας υδροξυλίου και ενός ανιόντος υδροξυλίου, έπειτα από αντίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.<sup>43</sup>



Παράλληλα, η δράση της αιθανόλης μέσα στα κύτταρα είναι πλειοτροπική, καθώς αυξάνει το οξειδωτικό στρες σε πολλά επίπεδα. Η αιθανόλη επάγει τη δραστηριότητα ενζύμων του μεταβολισμού προκαλώντας ROS, αλλάζει την αναλογία μετάλλων στον οργανισμό ευνοώντας αντιδράσεις τύπου Fenton και μειώνει τα φυσικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού.<sup>44</sup>

#### Περιβαλλοντικοί ρύποι`

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στη συσσώρευση ατμοσφαιρικών ρύπων, οι οποίοι καταλήγουν μέσω την αναπνοής στον άνθρωπο. Ως περιβαλλοντικοί ρύπο χαρακτηρίζονται τα σωματίδια , τα αέρια που προκαλούν ερεθισμό του αναπνευστικού και το βενζόλιο. Οργανικά και ανόργανα συστατικά καθώς και μικροοργανισμοί, που η διάμετρός του κυμαίνεται στην κλίμακα 100nm-10μm, μπορούν να πλήξουν το αναπνευστικό και το καρδιακό σύστημα του ανθρώπου προκαλώντας χρόνια φλεγμονή και σχετιζόμενο με τη φλεγμονή οξειδωτικό στρες. Οι περιβαλλοντικοί ρύποι λειτουργούν είτε ως οξειδωτικά, οξειδώνοντας βιολογικά μακρομόρια, είτε ως σηματοδοτικά μόρια για την επαγωγή μηχανισμών οξειδωτικού στρες. Το όζον είναι μια αντιδραστική μορφή οξυγόνου, της οποίας τα επίπεδα της στην ατμοσφαιρική σύνθεση αυξάνονται με την πάροδο των χρόνων. Ακόμα, το βενζόλιο, ένα φυσικό συστατικό του αργού πετρελαίου, προκαλεί αυξημένη παραγωγή ROS και βλαβών που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες μέσω των μεταβολιτών του, της υδροκινόνης και της βενζοκινόνης.<sup>45</sup>

### Καπνός του τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου χαρακτηρίζεται ως ένα πορώδες ανθρακούχο αερόλυμα το οποίο περιέχει βαρέα μέταλλα, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, νιτροζαμίνες, αζαρένια και άλλα οργανικά συστατικά, πολλά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως τοξικά και μεταλλαξιγόνα για τον άνθρωπο. Η νέα χιλιετία έφερε στο φως πολλές δημοσιεύσεις που αναλύουν το είδος, το βαθμό και τους μηχανισμούς της βλάβης που οφείλονται στον καπνό του τσιγάρου, καθώς και τις παθήσεις που σχετίζονται με το χρόνιο κάπνισμα. Στην αέρια και στερεή φάση του τσιγάρου έχουν βρεθεί πολυάριθμες σταθερές και μη ρίζες, που μέσα στα βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν βλάβες προερχόμενες από το οξειδωτικό στρες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι ρίζες με επίκεντρο τον άνθρακα ( $-C^*$ ) που βρίσκονται στην πίσσα του τσιγάρου, όπως για παράδειγμα η σταθερή ρίζα ημικινόνης ( $QH^*$ ), η οποία μέσα στον οργανισμό αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο μέσα από μονοπάτια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων σχηματίζοντας σουπεροξειδίου ( $O_2^*$ ), ρίζες περοξυλίου ( $ROO^*$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η επακόλουθη οξειδωτική καταστροφή έχει συσχετιστεί με φαινόμενα αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων που οφείλονται στο τσιγάρο. Πέρα από τις άμεσες βλάβες που προκαλούνται σε σημαντικά του βιομόρια του κυττάρου, οι ελεύθερες ρίζες της αέριας φάσης του καπνού έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν τα ενδογενή επίπεδα του οργανισμού σε αντιοξειδωτικά, κάμπτοντας έτσι την αντιοξειδωτική του άμυνα, ένα πλήγμα που δεν εξισορροπείται πλήρως με διατροφικά συμπληρώματα.<sup>46</sup>

### Φάρμακα και τοξίνες

Διάφορες κατηγορίες φαρμάκων έχουν συσχετιστεί με την επαγωγή ROS στον οργανισμό και με την τοξικότητα συγκεκριμένων ιστών που οφείλεται στο οξειδωτικό στρες. Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, τα αντιφλεγμονώδη, τα αντιψυχωτικά φάρμακα, τα αντιβιοτικά και τα αντιϊκά φάρμακα είναι ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων που προκαλούν ενδογενή παραγωγή ROS. Για παράδειγμα, τα αντιβιοτικά πέρα από την ικανότητά τους να θανατώνουν τα βακτήρια αλληλεπιδρώντας με κυτταρικά μόρια κρίσιμα για την επιβίωσή τους, έχει βρεθεί πως ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση και δευτερογενώς, με μη ειδικό τρόπο, προκαλώντας συσσώρευση ROS. Η γενταμικίνη είναι ένα τέτοιο αντιβιοτικό το οποίο δρα πρωταρχικά στην πρωτεϊνσύνθεση του βακτηρίου με αποτέλεσμα την δημιουργία λανθασμένα μεταφρασμένων πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας σειράς γονιδίων απόκρισης του βακτηρίου στο στρες, τα οποία επάγουν αυξημένη δραστηριότητα κυτταρικής αναπνοής, άρα και αυξημένες ROS, που είναι βλαπτικές για την

επιβίωση του.<sup>47</sup> Το παράδειγμα της γενταμικίνης περιγράφει πως η συσσώρευση ROS μπορεί να αποβεί προστατευτική για τον οργανισμό έναντι παθογόνων.

Αντίθετα, στην περίπτωση της δοξορουβικίνης οι επαγόμενες από το φάρμακο ROS επιφέρουν σοβαρές παρενέργειες στον ασθενή. Η δοξορουβικίνη είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας ο οποίος επιδρά στο DNA, αποτρέποντας την αντιγραφή και την πρωτεϊνοσύνθεση για το καρκινικό κύτταρο και αναστέλλοντας τη δράσης τοποϊσομεράσης II άρα και αποτρέποντας την επιδιόρθωση του DNA έπειτα από θραύση. Ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός που υφίσταται η δοξορουβικίνη στα κύτταρα μπορεί να το μετατρέψει σε ελεύθερη ρίζα η οποία είναι ιδιαιτέρως αντιδραστική με το οξυγόνο δημιουργώντας ρίζες σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το επακόλουθο οξειδωτικό στρες στα μυοκύτταρα ενοχοποιείται για πολλές από τις παρενέργειες του φαρμάκου συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής ανεπάρκειας.<sup>48</sup>

#### Παθγόνα

Πίσω από τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών όπως βακτηρίων και μυκήτων που πλήττουν τον άνθρωπο υπάρχει το εξής παράδοξο: τόσο οι ROS όσο και οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου φαίνεται να δρουν προστατευτικά έναντι των παθογόνων. Η επικρατέστερη άποψη υποστηρίζει πως οι ROS συσσωρεύονται μέσα στον ξενιστή και συγκεκριμένα στα φαγοσώματα ως απόκριση στο παθόγονο και εκτελούν άμεσα ή έμμεσα τις προστατευτικές τους δράσεις. Τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται σε τέτοια επίπεδα στον οργανισμό που αδυνατούν να αναστείλουν τις καταστροφικές για τα παθόγονα ROS, αλλά εν αντιθέσει ευνοούν την πρόληψη βλαβών των ROS στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.<sup>49</sup>

Οι σχετιζόμενοι με το οξειδωτικό στρες μηχανισμοί που στρατολογεί ο οργανισμός έπειτα από μια λοίμωξη είναι είτε άμεσοι, είτε πολύπλοκοι. Τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μονοκύτταρα και ηωσινόφιλα) είναι κύτταρα που κατοικούν σε ιστούς και κατατάσσονται στην πρώτη άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων (έμφυτη ανοσία). Η αναγνώριση μικροβίων από τα φαγοκύτταρα μέσω συγκεκριμένων επιφανειακών μοτίβων που διαθέτουν τα μικρόβια συνεπάγεται απορρόφησή τους και ταυτόχρονης αύξησης των επιπέδων σουπεροξειδίου μέσα στα φαγοσώματα, μια διαδικασία που ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη. Ενεργό ρόλο στην αναπνευστική έκρηξη έχει το ένζυμο της NADPH οξειδάσης 2 (NOX2), το οποίο μετακινείται από το κυτοσόλιο και συναρμολογείται στη μεμβράνη παράγοντας υψηλά επίπεδα ROS, τα οποία σκοτώνουν άμεσα τον εισβολέα.<sup>47</sup>

Η παραγωγή ROS δεν περιορίζεται, όμως, μόνο στα φαγοκύτταρα, αλλά επεκτείνεται στα μιτοχόνδρια και σε άλλα σημεία του κυττάρου, όπου οι ROS παίζουν τον ρόλο ενδιάμεσων μορίων σε σημαντικές σηματοδοτικές οδούς. Οι ROS φαίνεται να παίζουν τον ρόλο ρυθμιστή σε πολλές διαδικασίες του έμφυτου και του προσαρμοστικού κλάδου της ανοσίας του οργανισμού, καθώς συμμετέχουν στον σχηματισμό των φαγολυσωσσωμάτων και των εξωκυτταρικών παγίδων ουδετεροφίλων, είναι παράγοντες πρόκλησης φλεγμονής καθώς ενισχύουν την έκφραση ιντερφερονών, ωθούν το κύτταρο σε αυτοφαγία, συμβάλλουν στην αντιγονοπαρουσίαση και ενισχύουν την στρατολόγηση κυττάρων του προσαρμοστικού ανοσολογικού κλάδου.<sup>49,50</sup>

### Ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή των ROS και RNS αποτελεί ενδοκυτταρική υπόθεση, αν αναλογιστούμε την πληθώρα των διαδικασιών στις οποίες μετέχουν φυσιολογικά. Η γένεσή τους μπορεί να είναι αποτέλεσμα ενζυμικής δράσης ή αποτέλεσμα της μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κύριες θέσεις ενδοκυτταρικής παραγωγής ελεύθερων ριζών είναι τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα υπεροξειδοσώματα, το εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, τα λυσοσώματα και το κυτταρόπλασμα.<sup>38</sup>

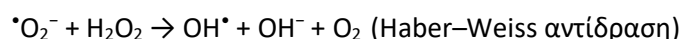
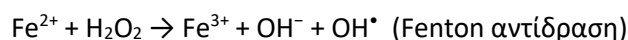
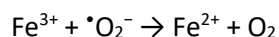
### Μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα

Η μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι η κύρια ενδοκυτταρική πηγή ROS, κυρίως σουπεροξειδίου το οποίο θεωρείται η σημαντικότερη ρίζα οξυγόνου καθώς έχει την δυνατότητα μέσω αντιδράσεων του με άλλα μόρια να σχηματίζει άλλες ROS. Η εσωτερική μιτοχονδριακή αλυσίδα αποτελείται από 4 μεγάλα ενζυμικά σύμπλοκα (I-IV) και από 2 μεταφορείς ηλεκτρονίων που είναι η ουβικινόνη (Q) και το κυτόχρωμα c. Τα σύμπλοκα αυτά συνεργάζονται δημιουργώντας μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, που έχουν ως τελικό προορισμό την μετατροπή του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μέσω της μεταφοράς 4 ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Παράλληλα με τη μεταφορά ηλεκτρονίων, επιτελείται βαθμίδωση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης με σκοπό την μεταγωγή ενέργειας σε ATP από την συνθάση ATP (σύμπλοκο V).<sup>51</sup> Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση και αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το κύτταρο με τη διάσπαση υδατανθράκων και λιπών.<sup>52</sup> Η παραγωγή ROS προκύπτει μέσα από την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και

συγκεκριμένα μέσω της διαρροής ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα και την μείωση του μοριακού οξυγόνου προς σχηματισμό σουπεροξειδίου. Τα σύμπλοκα I-III (σύμπλοκο αναγωγάσης του ζεύγους NADH-Q, ηλεκτρική αφυδρογονάση, σύμπλοκο αναγωγάσης του κυτοχρώματος c) είναι τα κύρια σημεία διαρροής ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, ενώ το σύμπλοκο IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) δεν θεωρείται σημαντική πηγή ROS.<sup>41</sup>

#### Κυτταρόπλασμα

Η οξειδάση της ξανθίνης, είναι ένα καλά διατηρημένο ένζυμο μεταξύ των οργανισμών, που ανήκει στην κατηγορία των φλαβο-μεταλλοπρωτεϊνών.<sup>53</sup> Οι φλαβομεταλλοπρωτεΐνες είναι οξειδωτικά ένζυμα που περιέχουν τουλάχιστον ένα μεταλλικό ιόν και το δινουκλεοτίδιο φλαβίνης-αδενίνης (FAD), το οποίο δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων.<sup>54</sup> Η οξειδάση της ξανθίνης, είναι ένα ομοδιμερές το οποίο αποτελείται από 2 υπομονάδες των 150 kDa. Εδράζει στο κυτταρόπλασμα και διαθέτει ένα τμήμα που περιέχει μολυβδαίνιο, 2 κέντρα θειϊκού σιδήρου και το δινουκλεοτίδιο FAD. Συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών οξειδώνοντας την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την τελευταία σε ουρικό οξύ.<sup>55</sup> Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μία από τις 2 ισομορφές της οξειδοαναγωγάσης της ξανθίνης και είναι η μοναδική που μπορεί να παράγει ROS, καθώς χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το οξυγόνο μεταφέροντας σε αυτό απευθείας ηλεκτρόνια και μετατρέποντας το σε ρίζα σουπεροξειδίου ή σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η αντίδραση του σουπεροξειδίου με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (αντίδραση Haber-Weiss) και η αντίδραση του δισθενούς σιδήρου με το υπεροξειδίο (αντίδραση Fenton) δίνει τη δραστική ρίζα υδροξυλίου και το ανιόν υδροξυλίου.<sup>53</sup>



#### Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι υποκυτταρικά κυστίδια, μεγέθους μέχρι 1 μm, τα οποία χαρακτηρίζονται από μια μονή λιπιδική μεμβράνη, είναι παρόντα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και δεν περιέχουν γενετικό υλικό. Η ονομασία τους προήλθε από τους De Dune και Baudhuin, όταν το 1966, αφού απομόνωσαν για πρώτη φορά υπεροξειδιοσώματα ανακάλυψαν μέσα σε αυτά την ύπαρξη μιας οξειδάσης (που παράγει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και ενός αποτοξινωτικού ενζύμου (που είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), την

καταλάση.<sup>56</sup> Αρχικά, θεωρήθηκε πως τα υπεροξειδιοσώματα λειτουργούν κυρίως ως κυστίδια απομάκρυνσης κατεστραμμένων και βλαβερών για το κύτταρο χημικών ουσιών, όπως για παράδειγμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου.<sup>57</sup> Πλέον είναι γνωστό, πως πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό μεταβολικό οργανίδιο, με χαρακτηριστικό ρόλο στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων, μέσω της β οξειδωσης.<sup>58</sup> Επικουρικοί ρόλοι των υπεροξειδιοσωμάτων, είναι ο καταβολισμός των D-αμινοξέων και πολυαμινών, το οξειδωτικό μέρος της οδού της φωσφορικής πεντόζης, η βιοσύνθεση πλασμαλογόνων, δηλαδή μορίων υπεύθυνων για την προστασία του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες και η αποτοξίνωση του κυττάρου από τα ξενοβιοτικά και τις βλαπτικές ελεύθερες ρίζες.<sup>56 59</sup>

Πολλές από τις παραπάνω διεργασίες που πραγματοποιούνται από τα υπεροξειδιοσώματα, επιτελούνται μέσα από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες γεννούν ως παραπροϊόντα ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Η οξειδάση του acyl-CoA που συμμετέχει στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, η ουρική οξειδάση που συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών αποτρέποντας το σχηματισμό ουρικού οξέος, η προαναφερθείσα οξειδάση της ξανθίνης η οποία εκτός από το κυτταρόπλασμα εντοπίζεται και στα υπεροξειδιοσώματα και η οξειδάση των D-αμινοξέων που συμμετέχει στον καταβολισμό των D-αμινοξέων είναι μερικά από τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>60</sup> Στα υπεροξειδιοσώματα, εδράζει και η επαγωγίμη ισομορφή της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), ενός ενζύμου που συμμετέχει στο σχηματισμό του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide, NO) από την L-αργινίνη. Το iNOS, είναι μια από τις 3 ισομορφές της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου και η έκφραση του έχει συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, καρδιοαγγειακές ασθένειες και παθήσεις του ήπατος.<sup>61</sup> Το NO συμμετέχει σε πολλές διαδικασίες του οργανισμού ως νευροδιαβιβαστής, αλλά και ως ρυθμιστής της έκφρασης σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Η αντίδρασή του με το σουπεροξειδίο, που επίσης παράγεται στα υπεροξειδιοσώματα, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της δραστικής ρίζας ONOO<sup>-</sup>, η οποία αλληλοεπιδρά με τα βιομόρια του κυττάρου οξειδώνοντάς τα και προκαλώντας σοβαρές βλάβες στο κύτταρο.<sup>62</sup>

#### Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ER)

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER) είναι γνωστό για το ρόλο του στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες οι οποίες αδυνατούν να αναδιπλωθούν σωστά σε περιορισμένο χρονικό διάστημα, ουβικιτινώνονται και καταστρέφονται στα πρωτεοσώματα. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών περιλαμβάνει το



σηματισμό δισουλφικών δεσμών μεταξύ γειτονικών αμινοξέων κυστεΐνης, μια οξειδοαναγωγική διαδικασία που συντελεί στην παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα, το ενδοπλασματικό δίκτυο μιμείται την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της μιτοχονδριακής μεμβράνης, πραγματοποιώντας μεταφορά των ηλεκτρονίων που προκύπτουν από το σχηματισμό του δισουλφικού δεσμού, μέσω 2 ενζύμων στο μοριακό οξυγόνο, δίνοντας γένεση στις ROS.<sup>63</sup> Τα 2 αυτά ένζυμα είναι το φλαβοένζυμο οξειδορεδοκτίνη 1 (ER Oxidoreductin, ERO1) και η ισομεράση πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών (Protein Disulfide-isomerase, PDI), τα οποία μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής σουλφιδίων-θειολών επιτελούν το ρόλο τους στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Το ERO1 είναι μια πρωτεΐνη που εδράζεται στη μεμβράνη του ER και μαζί με τον συμπαράγοντα φλαβίνη εκμεταλλεύεται την οξειδωτική ισχύ του μοριακού οξυγόνου για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Οι σουλφιδόμαδες που δημιουργούνται μεταφέρονται στη διαλυτή πρωτεΐνη PDI και από κει στις πρωτεΐνες που πρόκειται να αναδιπλωθούν.<sup>64,65</sup>

Ενεργό ρόλο στην παραγωγή ROS στο ER παίζει και η οικογένεια NADPH οξειδάσης (NOX), μια οικογένεια ενζύμων που καταλύει τη μείωση του μοριακού οξυγόνου σε σουπεροξειδίο, μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH. Το παραγόμενο σουπεροξειδίο έχει πλειοτροπική δράση μέσα στο κύτταρο, συμμετέχοντας σε μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών και μηχανισμών άμυνας έναντι των παθογόνων. Παρόλο που η πλειοψηφία των NOX συναντάται στην πλασματική μεμβράνη, διάφορες ισομορφές έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ισομορφή που συναντάται σε πλειοψηφικό ποσοστό στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι η NOX4, η οποία πέρα από τον σχηματισμό του σουπεροξειδίου, φαίνεται να αλληλοεπιδρά και με την PDI, με την δεύτερη να ρυθμίζει τη δράση της πρώτης στην παραγωγή ROS κατά τη διάρκεια μόλυνσης από το πρωτόζωο *Leishmania*.<sup>63,66</sup>

Ένας ακόμα παίκτης στο πεδίο της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του κυττάρου είναι το ενζυμικό σύστημα της μικροσωμικής μονοοξυγενάσης, μια ομάδα ενζύμων που εδρεύουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έχουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών και στην οξυγόνωση ενδογενών υποστρωμάτων, όπως για παράδειγμα η αίμη και τα λιπαρά οξέα. Το συγκεκριμένο σύστημα αποτελείται από μια NADPH αναγωγάση του κυτοχρώματος P450 και το κυτοχρώμα P450. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο σύστημα μικροσωμικής μονοοξυγενάσης έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου ενισχύοντας τη συσσώρευση ROS μέσα στο κύτταρο.<sup>67</sup>

## Ρόλος των ελεύθερων ριζών σε φυσιολογικές διεργασίες

### ROS και ανοσοποιητικό σύστημα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ύπαρξη των ROS μέσα στον οργανισμό σε συγκεκριμένα επίπεδα, είναι ζωτικής σημασίας για την εκτέλεση βασικών βιολογικών διεργασιών. Τα ROS μεσολαβούν τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία, εκτελώντας σηματοδοτικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού έπειτα από προσβολή από παθογόνο. Η έμφυτη ανοσία αφορά στην αναγνώριση του βακτηρίου από τα φαγοκύτταρα μέσω ειδικών μοριακών μοτίβων και την επακόλουθη ενδοκυττάρωση τους.<sup>68</sup> Την ενδοκυττάρωσή τους, ακολουθεί θανάτωση του εισβολέα με τρόπο εξαρτώμενο ή όχι από το οξυγόνο. Στην πρώτη περίπτωση θανάτωσης που εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου, πραγματοποιείται κατανάλωση οξυγόνου και παραγωγή σουπεροξειδίου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από την υπεροξειδική δισμουτάση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται ως οξειδωτική έκρηξη και διενεργείται υπό τον έλεγχο της NADPH οξειδάσης 2 (NOX2). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με το σουπεροξείδιο προς σχηματισμό της πολύ δραστηκής για τα παθογόνα ρίζας υδροξυλίου.<sup>69</sup>

Εκτός όμως από την εμπλοκή τους στην έμφυτη ανοσία, οι ROS συμμετέχουν και στην προσαρμοστική ανοσία και συγκεκριμένα στην αντιγονοπαρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα. Έπειτα από την φαγοκυττάρωση των μικροβίων από τα δενδριτικά φαγοκύτταρα και την επακόλουθη αποικοδόμησή τους από το πρωτεόσωμα, ακολουθεί απελευθέρωση των μικροβιακών υπολειμμάτων στο κυτοσόλιο των κυττάρων και ενσωμάτωση τους σε μόρια MHC-I. Τα μόρια MHC-I θα αγκυροβολήσουν στην μεμβράνη και θα παρουσιάσουν τα μικροβιακά αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα. Οι ROS διευκολύνουν την αντιγονοπαρουσίαση, καθώς καταστέλλουν το πρωτεόσωμα, με αποτέλεσμα να επιτρέπουν τη μερική αποικοδόμηση των παθογόνων συστατικών, ώστε αυτά να μπορέσουν να φορτωθούν στα MHC-I μόρια και να επιτελέσουν το σκοπό τους. Ακόμη, πλήθος μελετών μιλούν για ανάμειξη των δραστηκών μορφών οξυγόνου στην ρύθμιση της χημειοταξίας των λεμφοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Τέλος, πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν μια ανάλογη σχέση των επιπέδων ROS και του πολλαπλασιασμού των T ρυθμιστικών κυττάρων, γεγονός που αναδεικνύει τον βοηθητικό ρόλο που παίζουν οι ROS στον περιορισμό της φλεγμονής, όταν πλήττονται φυσιολογικοί ιστοί.<sup>70</sup>

Οι ROS ως μεσολαβητές του ΚΝΣ

Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με φαινόμενα μείωσης της πλαστικότητας των νευρώνων του ΚΝΣ που παρατηρούνται με τον πέρασμα των χρόνων στον άνθρωπο. Οι μελέτες όμως δείχνουν ότι η διατήρηση της οξειδωτικής ομοιόστασης στα νευρικά κύτταρα επιτρέπει στις ROS να δρουν ευεργετικά για το ΚΝΣ, παίζοντας σηματοδοτικό ρόλο στα νευρωνικά δίκτυα. Οι ROS δεν λειτουργούν με τον ειδικό τρόπο που δρουν οι νευροδιαβιβαστές στοχεύοντας συγκεκριμένους υποδοχείς. Αντίθετα, εκτελούν χρέη ρυθμιστικού διακόπτη πρωτεϊνών απαραίτητων για την νευρωνική διαβίβαση, οξειδώνοντας κατάλοιπα κυστεΐνης που βρίσκονται σε καταλυτικές περιοχές ενζύμων όπως είναι για παράδειγμα οι πρωτεϊνικές τυροσινικές φωσφατάσες. Η οξείδωση των καταλοίπων κυστεΐνης στις τυροσινικές φωσφατάσες απενεργοποιεί τη κατασταλτική τους δράση, παρατείνοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση μιας σειράς πρωτεϊνών απαραίτητων για την νευρωνική διαβίβαση. Οι ROS πέρα από την νευρωνική διαβίβαση, συμμετέχουν και στην νευρογένεση και στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων επιδρώντας οξειδωτικά σε μεταγραφικούς παράγοντες και επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση των γονιδίων απαραίτητων για τις παραπάνω διαδικασίες. Κρίσιμος είναι και ο ρόλος των ROS στην διατήρηση των γνωστικών λειτουργιών του εγκεφάλου, δρώντας ενισχυτικά στην συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων σε περιοχές όπως ο ιππόκαμπος που είναι βασικές για την συγκράτηση των αποθηκευμένων πληροφοριών.<sup>71</sup>

Γήρανση και ROS

Το 1956, ο Harman διατύπωσε τη θεωρία της γήρανσης, σύμφωνα με την οποία η γήρανση είναι αποτέλεσμα συσσωρευμένων κυτταρικών βλαβών στο κύτταρο που αυξάνονται με την πάροδο των χρόνων και οφείλονται στις ελεύθερες ρίζες. Αργότερα, η υπερπαραγωγή ROS που συνδέεται με την γήρανση αποδόθηκε σε δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αλυσίδας. Πειράματα, όμως, που πραγματοποιήθηκαν σε μοντέλα της *Drosophila Melanogaster* έδειξαν πως παρόλο που παρατηρήθηκε αύξηση των μιτοχονδριακών ROS κατά τη διάρκεια ζωής του οργανισμού, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν συσχετίστηκε με το προσδόκιμο ζωής της.<sup>72</sup> Αποτελέσματα πρόσφατων μελετών έχουν αναθεωρήσει αρκετά την αρχική ιδέα του Harman καθώς δείχνουν πως μέτρια επίπεδα ROS μπορούν να δράσουν θετικά στην διάρκεια ζωής των οργανισμών ενεργοποιώντας σηματοδοτικές οδούς απαραίτητες για την επιβίωση. Ακόμα, μέτρια επίπεδα ROS επάγουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς απόκρισης στο στρες που αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα, πολύ χαμηλά ή πολύ υψηλά επίπεδα ROS έχουν επιζήμια για το κύτταρο αποτελέσματα που οδηγούν σε παθογένεση και θάνατο.<sup>73</sup>

## Άσκηση

Η παραγωγή ROS είναι άμεσα συνδεδεμένη με την μυϊκή δραστηριότητα και συγκεκριμένα με τη μυϊκή συστολή των σκελετικών μυών. Είναι γεγονός, πως ελεγχόμενα επίπεδα ROS δρουν θετικά στην παραγωγής μυϊκής δύναμης, σε αντίθεση με υψηλά επίπεδα ROS που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο μυ, γεγονός που συνδέεται με μυϊκή κόπωση και κάματο. Τα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου είναι άμεσα συνδεδεμένα με τον τύπο, τη διάρκεια και την ένταση της άσκησης. Δεδομένα από μελέτες δείχνουν υψηλότερα επίπεδα σουπεροξειδίου κατά την φάση ηρεμίας του μυ σε σχέση με τη φάση όπου ξεκινάει η μυϊκή συστολή, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από έντονη παραγωγή ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως κατά τη διάρκεια άσκησης ο κύριος σχηματισμός ελεύθερων ριζών είναι αποτέλεσμα άλλων μηχανισμών.<sup>74</sup> Η NADPH οξειδάση, η οξειδάση της ξανθίνης και η φωσφολιπάση A2 είναι ένζυμα τα οποία παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην μυϊκή δραστηριότητα και στην σχετιζόμενη με αυτή παραγωγή ROS. Σημαντικός είναι και ο ρόλος των ROS σε θέσεις παρακείμενες του μυ κατά τη διάρκεια μυϊκού τραυματισμού όπου λειτουργούν σηματοδοτικά για την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, ενισχύοντας ένα κύκλο ανατροφοδότησης για τις κυτοκίνες.<sup>75</sup>

## Αρνητικές επιδράσεις των ROS

### Βλάβες στα λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούν βασικά για το κύτταρο δομικά και λειτουργικά συστατικά, τα οποία υπόκεινται σε βλάβες έπειτα από την έκθεση σε αυξημένα επίπεδα ROS. Η κύρια ταξινόμηση των λιπιδίων γίνεται σε πολικά λιπίδια όπως είναι τα φωσφολιπίδια που συνιστούν την κυτταρική μεμβράνη και σε άπολα όπως είναι τα τριγλυκερίδια που λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας των κυττάρων. Τα λιπίδια μπορούν να δράσουν ως μόρια σηματοδότησης συμμετέχοντας και ρυθμίζοντας μια σειρά από διαδικασίες απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου.<sup>76</sup> Οι δύο ρίζες που φαίνεται να προκαλούν τη μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια, είναι η ρίζα υδροξυλίου και η ρίζα υδροπεροξυλίου. Ο τρόπος δράσης των ελεύθερων ριζών στα λιπίδια περιλαμβάνει την αφαίρεση υδρογόνου από άνθρακες σε σημεία που περιέχουν διπλό δεσμό και την εισαγωγή οξυγόνου δημιουργώντας λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες ή λιπιδικές υδροπεροξυλικές ρίζες. Πιο ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη θεωρούνται τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και στη συνέχεια τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια και η χοληστερόλη. Ο βαθμός οξείδωσης των λιπιδίων, ο οποίος εξαρτάται

από την ποσότητα των ROS, καθορίζει αν το κύτταρο μπορεί να επιδιορθώσει τη βλάβη, ενεργοποιώντας το αντιοξειδωτικό του σπλοστάσιο ή αν η βλάβη είναι τόσο εκτεταμένη όπου θα το οδηγήσει σε θάνατο. Ο ρόλος των λιπιδίων στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και στη σηματοδότηση εξηγεί τις παθογένειες που συνδέονται με την εκτεταμένη λιπιδική υπεροξειδωση.

Η διαδικασία της λιπιδικής υπεροξειδωσης περιλαμβάνει τα στάδια της έναρξης, της διάδοσης και της λήξης. Η έναρξη αφορά την αφαίρεση ενός υδρογόνου συνδεδεμένου με άνθρακα από την υδρογονανθρακική αλυσίδα των λιπαρών οξέων. Τα πολυακόραστα λιπαρά αποτελούν ευκολότερους στόχους για τις ελεύθερες ρίζες, λόγω της αστάθειας του διπλού δεσμού της ανθρακικής τους αλυσίδας. Η αφαίρεση του υδρογόνου σηματοδοτεί την αναδιαμόρφωση των διπλών δεσμών της αλυσίδας και τη μετατροπή του λιπιδίου σε ένα συζευγμένο διένιο, ικανό να προσλάβει οξυγόνο. Η νεοσχηματιζόμενη ρίζα περοξυλίου (LOO•), αντιδρά με ένα άλλο λιπίδιο σχηματίζοντας μια λιπιδική ρίζα (L•) και ένα λιπιδικό υδρουπεροξειδίο (LOOH). Η κατάσταση αυτή που ονομάζεται φάση επιμήκυνσης συνεχίζεται με τη μορφή καταρράκτη με αποτέλεσμα να δημιουργούνται συνεχώς νέες αντιδραστικές μορφές λιπιδίων. Ο τερματισμός της αντίδρασης απαιτεί την παρουσία ενός αντιοξειδωτικού, όπως είναι για παράδειγμα η βιταμίνη E, το οποίο θα οξειδωθεί χαρίζοντας ένα υδρογόνο στην λιπιδική ρίζα περοξυλίου και στη συνέχεια αντιδρώντας ξανά με μια λιπιδική ρίζα περοξυλίου θα δώσει μη αντιδραστικά προϊόντα.<sup>76,77</sup>

#### Βλάβες στις πρωτεΐνες

Το 70% της οξειδωτικής βλάβης που παρατηρείται στα κύτταρα εμφανίζεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών.<sup>78</sup> Η οξείδωση που προκαλείται στις πρωτεΐνες είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης τροποποίησης των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων τους, είτε έμμεσης τροποποίησης που προέρχεται από δραστικά ενδιάμεσα ριζών λιπιδικής προέλευσης.<sup>79</sup> Η οξείδωση οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δευτεροταγούς ή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, στην απώλεια της λειτουργίας τους, στη συσσωμάτωση τους και στην αυξημένη αποικοδόμησή τους. Βέβαια, η παραγωγή οξειδωμένων μορφών πρωτεΐνης δεν είναι πάντα δυνητικά επιβλαβής, καθώς πολλές από τις τροποποιήσεις που δημιουργούνται από τις ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι αναστρέψιμες και σε ορισμένες περιπτώσεις ωφέλιμες για το κύτταρο.<sup>78,80</sup> Ένας από τους βασικούς ρόλους που παίζει η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών είναι η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου.<sup>81</sup> Η πιο συχνή τροποποίηση που πραγματοποιείται είτε με τον άμεσο είτε με τον έμμεσο μηχανισμό

είναι η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, δηλαδή η δημιουργία αντιδραστικών αλδεϋδικών ή κετονικών ομάδων. Αυξημένα επίπεδα καρβονυλίων έχουν συσχετιστεί με πολλές ασθένειες και η ποσότητά τους αποτελεί τον πιο γνωστό δείκτη υπεροξειδωσής των πρωτεϊνών στον οργανισμό.<sup>82</sup>

### Βλάβες στο DNA

Το DNA είναι ένα μακρομόριο ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Η υπονόμηση της σταθερότητάς του και οι αλλοιώσεις που προκαλούνται στο DNA (διασυνδέσεις μεταξύ των κλώνων του DNA, διασυνδέσεις μεταξύ βάσεων του ίδιου κλώνου, κυκλοποίηση των σακχάρων των βάσεων, διασταυρώσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA) μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή να αποτελέσουν παράγοντες παθογένεσης.<sup>83,84</sup> Η ρίζα υδροξυλίου αναγνωρίζεται ως αυτή με την συχνότερη και ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA, καθώς επιδρά τόσο στο σάκχαρο του νουκλεοτιδίου, όσο και στις αζωτούχες βάσεις. Συγκεκριμένα η αντίδραση της ρίζας OH με το σάκχαρο δεοξυριβόζης (κυρίως με το C4 του σακχάρου έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση υδρογόνου και την προσθήκη οξυγόνου. Μετά από μια σειρά αντιδράσεων συντονισμού και την προσθήκη νερού, το νουκλεοτίδιο διασπάται σε θραύσματα.<sup>85,86</sup> Εκτός από τις αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου, ικανές να αλληλοεπιδράσουν με το DNA και να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη, είναι και οι αντιδραστικές μορφές αζώτου, όπως για παράδειγμα το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO<sup>-</sup>), το νιτροϋπεροξυανθρακικό ανιόν (ONOCO 2<sup>-</sup>) και το τριοξειδίο του αζώτου (N2O3). Η αντίδραση των παραπάνω με το DNA έχει ως αποτέλεσμα στο σχηματισμό εσφαλμένων διασυνδέσεων μεταξύ των βάσεων του DNA.<sup>87</sup>

Οι φυσικοχημικές τροποποιήσεις που υφίστανται το πυρηνικό DNA μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα αναδίπλωσης του DNA με τα νουκλεοσώματα. Λανθασμένη περιέλιξη του DNA οδηγεί σε λανθασμένη έκφρασης και μετάδοση της γενετικής πληροφορίας. Το κύτταρο διαθέτει ένα οπλοστάσιο αμυντικών μηχανισμών που αποτελείται κυρίως από επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA. Ακόμα, διαθέτει οδούς απόκρισης στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response, DDR), οι οποίοι περιλαμβάνουν μηχανισμούς εντοπισμού του σημείου βλάβης, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και διακόπτες εισόδου του κυττάρου σε μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Η έκταση, ο τύπος και η διάρκεια των αλλοιώσεων θα κρίνουν τελικά αν η υπάρχει η δυνατότητα αποκατάστασης της βλάβης ή αν το κύτταρο θα οδηγηθεί σε θάνατο.<sup>85</sup>

## Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπάρχει μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην ικανότητα των ελεύθερων ριζών να επιτελούν φυσιολογικές διεργασίες και στη δυνατότητά τους να προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα. Αυτή η ισορροπία κρίνεται μεταξύ παραγόντων που προκαλούν την παραγωγή αντιδραστικών μορίων και αντιοξειδωτικών παραγόντων που ευθύνονται για την απομάκρυνσή τους από τον οργανισμό. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται ενώσεις οι οποίες βρίσκονται σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα και είναι σε θέση είτε να καταστείλουν τη δράση του ή να την καθυστερήσουν.<sup>88</sup>

Τα αντιοξειδωτικά είναι μια ευρεία ομάδα που περιλαμβάνει πολλές υποκατηγορίες ενώσεων υπεύθυνων για τη διατήρηση της οξειδωτικής ομοιόστασης του οργανισμού. Μια πρώτη κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών είναι σε ενδογενή ή εξωγενή. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά, όπως είναι τα καροτενοειδή, οι βιταμίνες (βιταμίνη Α, βιταμίνη C, βιταμίνη E) και τα φλαβονοειδή, προέρχονται από τη διατροφή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, που διακρίνονται σε ενζυμικά και μη, παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό και η έκφρασή τους ρυθμίζεται από συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μονοπάτια, όπως το NRF2-KEAP1 μονοπάτι. Ως αντιοξειδωτικά πρώτης άμυνας ορίζονται αυτά που εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες, διακόπτοντας με αυτόν τον τρόπο την αλυσίδα διάδοσης τους. Εν αντιθέσει, τα αντιοξειδωτικά δεύτερης άμυνας επάγουν μηχανισμούς κυτταρικής επιδιόρθωσης, απομακρύνουν μέταλλα μετάπτωσης μέσω της χηλίωσής τους, καταστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων και επάγουν μεταγραφικούς παραγόντες που ρυθμίζουν μονοπάτια αποτοξίνωσης.<sup>89,90</sup>

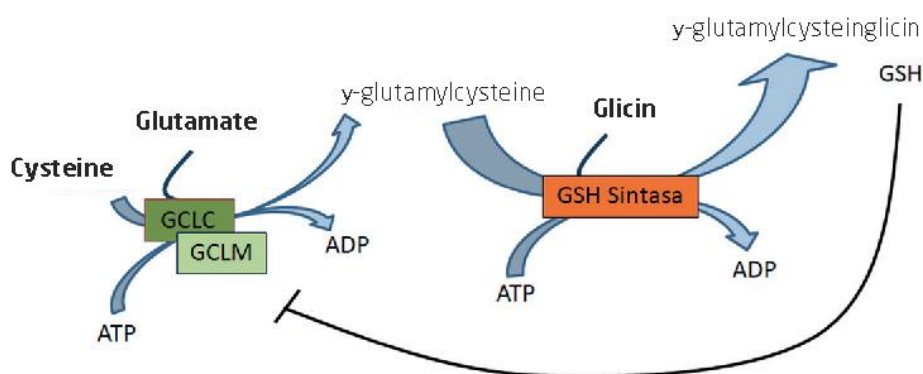
### Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Στη συγκεκριμένη ενότητα θα αναλυθούν χημικές ουσίες που παράγονται από τον οργανισμό και εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω τεσσάρων μηχανισμών δράσεις:

- 1) Σάρωση των ROS/RNS
- 2) Τερματισμός αντιδράσεων καταρράκτη/μετάδοσης των ελεύθερων ριζών
- 3) Επιδιόρθωση των βλαβών που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες
- 4) Χηλίωση μετάλλων μετάπτωσης<sup>91</sup>

## Γλουταθειόνη

Πρόκειται για ένα από τα πιο μελετημένα μόρια στον κλάδο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας. Η γλουταθειόνη αποτελείται από 3 πεπτίδια, την γλυκίνη, την κυστεΐνη και το γλουταμινικό οξύ. Παράγεται ενδογενώς στον οργανισμό και συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Τα υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης απαντώνται στο πλάσμα και είναι ηπατικής προέλευσης. Υπάρχουν 2 διαφορετικοί μηχανισμοί σύνθεσης και διατήρησης των επιπέδων της γλουταθειόνης στον οργανισμό: η de novo σύνθεση και η σύνθεση που εξαρτάται από το μονοπάτι διάσωσης.<sup>92</sup> Το μονοπάτι της de novo σύνθεσης περιλαμβάνει 2 στάδια, τα οποία καταλύονται από ένζυμα και απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας υπό μορφή ATP. Το πρώτο στάδιο καταλύεται από τη λιγάση γλουταμίνης-κυστεΐνης (Glutamate-Cysteine Ligase, GCL), όπου τα αμινοξέα κυστεΐνη και γλουταμίνη συνενώνονται προς σχηματισμό του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-glutamylcysteine). Το GCL είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στην διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, καθώς αναστέλλεται από την ίδια την γλουταθειόνη, όταν τα επίπεδα της είναι επαρκή στον οργανισμό. Στον άνθρωπο η GCL αποτελείται από 2 υπομονάδες, την καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου (Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit, GCLC), η οποία αναστέλλεται από την γλουταθειόνη και έναν τροποποιητή (Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit, GCLM) που ο ρόλος του είναι να κατευθύνει την πορεία της αντίδρασης προς την γ-γλουταμυλοκυστεΐνη. Το δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται με τη μετατροπή του διπεπτιδίου σε γλουταθειόνη (γ-glutamylcysteinylglycine), με την προσθήκη του αμινοξέος γλυκίνη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη συνθάση της γλουταθειόνης (Glutathione synthetase, GS) ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το GCL. (Εικόνα 3)<sup>93,94</sup>



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης<sup>93</sup>

Παράλληλα, υπάρχει και το μονοπάτι διάσωσης της γλουταθειόνης. Πρόκειται για ένα εξωκυτταρικό μονοπάτι καταβολισμού τόσο της γλουταθειόνης, όσο και των συζευγμάτων γλουταθειόνης, το οποίο καταλύεται από την γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση (γ-glutamyl



transpeptidase, GGTP). Συγκεκριμένα, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση αφαιρεί το γ-γλουταμινικό τμήμα από τα παραπάνω υποστρώματα, τα οποία στη συνέχεια υδρολύονται εκ νέου προκειμένου να διασπαστούν σε κυστεΐνη και γλυκίνη και να επαναπροσληφθούν από το κύτταρο μέσω πρωτεϊνών-μεταφορέων. Μέσα στο κύτταρο τα γ-γλουταμινικά παράγωγα μετατρέπονται σε γλουταμινικό οξύ.<sup>95,96</sup>

Η γλουταθειόνη είναι ένα αντιοξειδωτικό με πλειοτροπική δράση μέσα και έξω από κύτταρο. Αρχικά, αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες όπως O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>\*</sup> και NO εξουδετερώνοντάς τις. Ακόμα, ανάγει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O, ενώ η ίδια μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG), μια αντίδραση που καταλύεται ενζυμικά από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx). Επομένως, πρόκειται για μια διαδικασία ανακύκλωσης της γλουταθειόνης που δεν απαιτεί εκ νέου σύνθεση.<sup>94</sup> Κρίσιμος είναι και ο ρόλος της στον μεταβολισμό των ξеноβιοτικών, καθώς η γλουταθειόνη συμμετέχει σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης, οι οποίες καταλύονται από το ένζυμο S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferases, GSTs) στη φάση II του μεταβολισμού. Υπάρχουν πολλές ακόμα σημαντικές λειτουργίες που επιτελεί η γλουταθειόνη, όπως είναι για παράδειγμα η απομάκρυνση της καρκινογόνου φορμαλδεΐδης από τον οργανισμό, η συμμετοχή της στον μεταβολισμό των λευκοτριενίων, των οιστρογόνων και των προσταγλαδινών, η γλουταθειονύλιωση πρωτεϊνών η οποία είναι απαραίτητη για φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου, κ.α.<sup>94,97</sup>

#### Λιποϊκό οξύ (Alpha-lipoic acid, LA)

Το λιποϊκό οξύ είναι μια οργανική ένωση θείου, η οποία συντίθεται ενδογενώς στον οργανισμό και συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια κατά τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Ο κύριος ρόλος του μέσα στα κύτταρα είναι να σχηματίζει συμπλέγματα με ένζυμα που δρουν στα μιτοχόνδρια και να λειτουργεί ως συμπάροντας σε αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας και αντιδράσεις καταβολισμού των αμινοξέων.<sup>98</sup> Η αντιοξειδωτική ικανότητα του λιποϊκού οξέος έγινε γνωστή ήδη από το 1959, όταν οι Rosenberg and Culik παρατήρησαν ότι η χορήγηση λιποϊκού σε ινδικά χοιρίδια με έλλειψη βιταμίνης C κατάφερε να εμποδίσει την εμφάνιση σκορβούτου αλλά και απέτρεψε την εμφάνιση συμπτωμάτων σε αρουραίους με ανεπάρκεια βιταμίνης E. Πλέον είναι γνωστό πως το λιποϊκό οξύ (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, LA) όπως και η ανηγμένη του μορφή το διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA) λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά με πλειοτροπικές δράσεις.<sup>99</sup>

Η σάρωση ελεύθερων ριζών όπως ρίζες υδροξυλίου και περοξυλίου, υποχλωριώδους οξέος και μονού οξυγόνου είναι ένας από τους κύριους ρόλους του ζεύγους LA/DHLA. Πέραν όμως της ιδιότητας του να αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες, το λιποϊκό οξύ εμφανίζει και άλλες αντιοξειδωτικές λειτουργίες. Μερικές από αυτές είναι να δημιουργεί σύμπλοκα με μέταλλα μετάπτωσης εμποδίζοντάς τα να συμμετέχουν σε αντιδράσεις παραγωγής ελεύθερων ριζών και αναστέλλοντας την λιπιδική υπεροξειδωση που παρουσία συγκεκριμένων μετάλλων Cu<sup>2+</sup>. Ακόμα αντιδρά με βαρέα και τοξικά μέταλλα όπως το αρσένιο και ο υδράργυρος τα οποία προσλαμβάνονται μέσω της διατροφή, του αέρα και του νερού, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης του οργανισμού από αυτά. Κρίσιμη για ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού είναι και η ιδιότητα της DHLA να αντιδρά με το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) ανάγοντάς το συμμετέχοντας έτσι στην διαδικασία ανακύκλωσης της γλουταθειόνης.<sup>100</sup> Ακριβώς την ίδια δράση ασκεί το λιποϊκό οξύ στην αναγέννηση άλλων βασικών αντιοξειδωτικών του οργανισμού, όπως είναι για παράδειγμα το συνένζυμο Q10 και η βιταμίνη C. Τέλος, υπάρχει αποδεδειγμένη ικανότητα του LA να επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων μέσω του μονοπατιού NRF2-KEAP1.<sup>98</sup>

#### Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ, τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Παράγεται μέσω της καταλυτικής δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης και στη συνέχεια το ουρικό περνά στην κυκλοφορία και απομακρύνεται μέσω των ούρων από τον οργανισμό. Το ουρικό δεν αποτελεί μόνο παραπροϊόν μιας μεταβολικής διεργασίας, αλλά διαθέτει και σημαντικές ιδιότητες ως αντιοξειδωτικό. Συγκεκριμένα, επιτελεί το 50% της αντιοξειδωτικής ικανότητας των σωματικών υγρών του ανθρώπου.<sup>101</sup> Πρωταρχική δράση του ουρικού οξέος ως αντιοξειδωτικό είναι να αντιδρά με τις αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου του αίματος, οι οποίες συντίθενται μέσω αντιδράσεων αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης ή μέσω της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα μακροφάγα. Με την εξουδετέρωση των ROS του αίματος, το ουρικό αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων. Σημαντικός είναι και ο ρόλος του ουρικού οξέος στην προστασία των νευρώνων από το οξειδωτικό στρες, γεγονός που έχει αποδειχθεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως το οξύ εγκεφαλικό και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Βέβαια, το ουρικό μπορεί να δράσει και ως προ-οξειδωτικός παράγοντας όταν έρθει σε επαφή με οξειδωτικά μόρια, καθώς μετατρέπεται σε διαφορετικές ρίζες, ανάλογα με τον βαθμό διάσπασης του. Οι ρίζες που προέρχονται από το ουρικό επιτίθενται κυρίως σε λιπίδια

είτε αυτά αποτελούν συστατικό των μεμβρανών είτε πρόκειται για λιποπρωτεΐνες όπως η LDL-χοληστερόλη.<sup>102</sup>

### Φερριτίνη

Η φερριτίνη είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο υπεύθυνο για τη συγκράτηση σιδήρου στα κύτταρα. Η αποθήκευση σιδήρου και η σταδιακή απελευθέρωση του είναι ζωτικής σημασίας, καθώς χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών συνδεδεμένων με σίδηρο. Οι πρωτεΐνες αυτές επιτελούν πολλές και σημαντικές διαδικασίες στον οργανισμό όπως για παράδειγμα είναι ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών (κυτοχρώματα), η μεταφορά οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη), η σύνθεση του DNA (ελικάσες, νουκλεάσες) κτλ.<sup>103</sup> Η αντιοξειδωτική δράση της φερριτίνης κρίνεται στην ικανότητα της να δεσμεύει  $Fe^{2+}$ , με αποτέλεσμα να εμποδίζει αντιδράσεις Fenton με το οξυγόνο που θα οδηγήσουν στην παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου.<sup>104</sup>

### Συνένζυμο CoQ-10

Το συνένζυμο CoQ-10 αποτελεί ένα μόριο λιπιδικής προέλευσης που απαντάται σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες, κυρίως ως μεταφορέας ηλεκτρονίων στις μιτοχονδριακές αναπνευστικές αλυσίδες. Λόγω της συμμετοχής του σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις απαντάται μέσα στον οργανισμό σε 2 μορφές (CoQ/CoQH<sub>2</sub>), την οξειδωμένη του μορφή (ουβικινόνη) και την ανηγμένη του μορφή (ουβικινόλη).<sup>105</sup> Πέρα από το ρόλο του ως συμπαραγοντας στην επιτέλεση βασικών μιτοχονδριακών λειτουργιών, το CoQ επιτελεί και άλλους επιτελικούς σκοπούς ως ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης, ως αντιοξειδωτικό του οργανισμού και ως μόριο σηματοδότησης για κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι ο κυτταρικός θάνατος και γήρανση.<sup>106</sup> Κατά την μιτοχονδριακή αναπνοή, η μετατροπή της ουβινινόνης σε ουβικινόλη είναι μια διαδικασία 2 σταδίων, όπου πρώτα η ουβικινόνη μετατρέπεται στην ημικινόνη με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου και στη συνέχεια σε ουβικινόλη με την προσθήκη ενός ακόμα ηλεκτρονίου. Η ιδιότητα του CoQ ως αντιοξειδωτικό μόριο έχει αποδοθεί κυρίως στην ανηγμένη του μορφή, την ουβικινόλη λόγω της ικανότητας της να λειτουργεί ως αδρανοποιητής ελεύθερων ριζών, χωρίς όμως να μπορεί να αμφισβητηθεί και αντιοξειδωτική δράση της οξειδωμένης μορφής. Συγκεκριμένη, η ρίζα ημικινόνης που προκύπτει ως ενδιάμεσο μεταξύ οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής μπορεί να αναγεννά τόσο την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) όσο και την βιταμίνη C, διατηρώντας τις

στην ανηγμένη τους μορφή ώστε να μπορούν να ασκήσουν τον αντιοξειδωτικούς τους ρόλο.<sup>105,107</sup>

### Χολυρεθρίνη

Η χολυρεθρίνη είναι μια τετραπυρρόλη, προϊόν του καταβολισμού της αίμης. Παρόλου που η αίμη βρίσκεται συνδεδεμένη με πολλά ενδοκυτταρικά ένζυμα, το μεγαλύτερο ποσοστό της χολυρεθρίνης αποσπάται από την διάσπαση της αιμοσφαιρίνης. Η οξυγενάση της αίμης είναι το μοναδικό ένζυμο αποικοδόμησης της αίμης στα σπονδυλωτά, δίνοντας ως τελικά προϊόντα, μονοξείδιο του άνθρακα, σίδηρο και μπιλιβερδίνη. Στη συνέχεια η μπιλιβερδίνη θα μετατραπεί σε χολυρεθρίνη από την αναγωγή της μπιλιβερδίνης.<sup>108</sup> Η αίμη είναι μια πολύ σημαντική ένωση η οποία συνδεδεμένη με πρωτεΐνες επιτελεί βασικές λειτουργίες στον οργανισμό όπως είναι η μεταφορά οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη) και η μεταφορά ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα). Ωστόσο, η ελεύθερη αίμη λειτουργεί ως οξειδωτικό αλληλοεπιδρώντας με το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και προκαλώντας τους σοβαρή οξειδωτική βλάβη.<sup>109</sup> Σε αντίθεση με την αίμη, η χολυρεθρίνη, ασκεί πολύ σημαντική αντιοξειδωτική δράση και συμμετέχει στον περιορισμό του οξειδωτικού στρες σε πληθώρα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών, των αυτοάνοσων, των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου. Η χολυρεθρίνη παρέχει ισχυρή προστασία έναντι της δραστικής μορφής του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα κύρια όργανα όπου επιτελεί την αντιοξειδωτική της λειτουργία είναι η καρδιά, ο εγκέφαλος και τα νεφρά και φαίνεται σε αυτά να προλαμβάνει μεγάλο μέρος της λιπιδικής υπεροξειδωσης και καρβονυλίωσης πρωτεϊνών που προκαλείται τόσο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου όσο και από το μονοξείδιο του αζώτου και το υποχλωριώδες οξύ. Τέλος, η χολυρεθρίνη έχει την ικανότητα να αναγεννάτε από την μπιλιβερδίνη μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής.<sup>108,110,111</sup>

### Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

#### Υπεροξειδικές Δισμουτάσες

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες είναι πολύ σημαντικά πρωτεϊνικά μόρια για το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα, που απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς που αξιοποιούν το οξυγόνο και είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της ρίζας σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου.<sup>112</sup> Ανήκουν στην κατηγορία των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς είναι συνδεδεμένες με ένα μέταλλο μεταπτώσεως, το οποίο λειτουργεί ως καταλυτική μονάδα στις

οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που συμμετέχουν. Στα θηλαστικά απαντώνται 3 ισομορφές του ενζύμου, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια: η SOD1 (CuZnSOD) μια κυτταροπλασματική κυρίως πρωτεΐνη συνδεδεμένη με άτομα χαλκού και ψευδαργύρου, η SOD2 (MnSOD) μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη συνδεδεμένη με μαγγάνιο και SOD3 (EC-SOD) μια εξωκυτταρική ισομορφή συνδεδεμένη με χαλκό και ψευδάργυρο. Και οι 3 ισομορφές καταλύουν την ίδια αντίδραση, όμως η διαμερισματοποίηση τους είναι βασική για την οξειδοαναγωγική κατάσταση κάθε κυτταρικού διαμερίσματος.<sup>113</sup>

Η SOD1 αποτελείται από 2 πανομοιότητες υπομονάδες 32 kDa, κάθε μία από τις οποίες διαθέτες ένα καταλυτικό κέντρο χαλκού-ψευδαργύρου.<sup>114</sup> Μέχρι πριν λίγα χρόνια ο ρόλος που της είχε αποδοθεί είναι αυτός του ρυθμιστή των επιπέδων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδωσώματα. Ωστόσο, σήμερα είναι γνωστό ότι επιτελεί επιπρόσθετες και εξίσου σημαντικές διαδικασίες όπως η ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, η πρόσδεση σε συγκεκριμένα τμήματα mRNA και ο καθορισμός της σταθερότητας, της έκφρασης και της λειτουργίας του και η εξαρτώμενη από το οξυγόνο και τη γλυκόζη καταστολή της αναπνοής.<sup>115-117</sup> Από την άλλη, η SOD2 είναι ένα τετραμερές με μοριακό βάρος 96 kDa και είναι συνδεδεμένη με μαγγάνιο. Κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA, παράγεται στο κυτταρόπλασμα αλλά μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια μέσω μια σηματοδοτικής πρωτεΐνης.<sup>113</sup> Η κύρια λειτουργία της είναι η μετατροπή του σουπεροξειδίου που παράγεται ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνοής. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγεται στην συνέχεια μπορεί να διαχυθεί παθητικά από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη προς το κυτταρόπλασμα.<sup>118</sup> Η διαφορά της SOD2 με την SOD1 είναι πως η πρώτη έχει πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (5-6 ώρες) σε σχέση με τη δεύτερη (6-10 λεπτά), καθώς και ότι η δράση της SOD2 δεν αναστέλλεται από το προϊόν της αντίδρασης που καταλύει, δηλαδή το υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της SOD1. Τέλος, η SOD3 είναι ένα ομοτετραμερές μεγέθους 135 kDa, που συναντάται κυρίως στην κυτταρική επιφάνεια και στην εξωκυτταρική μήτρα διάφορων ιστών και σε μικρότερο βαθμό στα εξωκυττάρια υγρά και στο πλάσμα. Η SOD3 εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στους πνεύμονες, την μήτρα και τον αγγειακό ιστό και είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος των συγκεκριμένων ιστών.<sup>113</sup> Μία ακόμα ιδιότητα του ενζύμου η οποία εκδηλώθηκε μέσα πειραματικά μοντέλα υπερέκφρασης της SOD3 είναι η ικανότητα της να αναστέλλει την έκκριση προφλεγμονωδών μορίων από το κύτταρο καθώς και την αγκυροβόληση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης.<sup>119</sup>

Λόγω της ιδιότητας των σουπεροξειδικών δισμουτασών ως αντιοξειδωτικά πρώτης άμυνας για τον οργανισμό, έχουν χαρακτηριστεί πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για μια πληθώρα ασθενειών.<sup>112</sup> Σε πολλές κατηγορίες καρκίνου έχει παρατηρηθεί αύξηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων με σκοπό την προστασία του κυττάρου από την υπερβολική παραγωγή ROS που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η καταστολή της έκφρασης του ενζύμου και η επαγόμενη από σουπεροξειδίο καταστροφή της μιτοχονδριακής μεμβράνης, θα μπορούσε να δράσει ως πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας.<sup>120</sup> Αντίθετα, σε παθολογικές καταστάσεις που είναι συνδεδεμένες με την πρόοδο της φλεγμονής στις οποίες μεσολαβούν οι ROS, όπως για παράδειγμα η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αύξηση των επιπέδων των SOD θα οδηγούσε σε μείωση του σουπεροξειδίου άρα και περιορισμό της φλεγμονής. Με την ίδια λογική, η ενίσχυση της συγκέντρωσης των SOD στον οργανισμό θα μπορούσε να λειτουργήσει θεραπευτικά και σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών διαταραχών, μειώνοντας τα επίπεδα της οξειδωτικής βλάβης που υφίστανται οι νευρώνες από τις ελεύθερες ρίζες. Παρόλου που οι SODs θεωρούνται πολλά υποσχόμενοι θεραπευτικοί παράγοντες για πολλές ασθένειες, η αστάθεια, η ανοσογονικότητα που προκαλούν, η μικρή βιοδιαθεσιμότητά τους σε θέσεις φλεγμονής και ο μικρός χρόνος ημιζωής τους είναι μερικές παράμετροι που περιορίζουν την εφαρμογή τους. Ωστόσο, μελλοντικές προσεγγίσεις γύρω από την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής προστασίας του οργανισμού θα περιλαμβάνουν τόσο εγκόλπωση των SODs σε νανοσωματίδια, όσο και ενίσχυση της έκφρασής τους με γονιδιακή θεραπεία.<sup>121</sup>

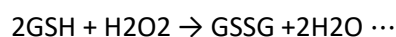
#### Καταλάση

Η καταλάση είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη 240 kDa, η οποία αποτελείται από 4 πανομοιότυπες υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα μόριο πρωτοπορφυρίνης σιδήρου (ομάδα αίμης). Στους ανθρώπους η καταλάση εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα όλων των κυττάρων και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο και νερό. Η αντίδραση περιλαμβάνει 2 στάδια: την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την αίμη σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο FeIVO (ρίζα πορφυρίνης) και στην συνέχεια την αναγωγή ενός δεύτερου μορίου υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ενδιάμεσο, προς σχηματισμό του ελεύθερου ενζύμου καταλάσης, μοριακού οξυγόνου και νερού.<sup>122</sup> Η καταλάση προκειμένου να διασπάσει το υπεροξειδίου του υδρογόνου αλληλεπιδρά με δότες ηλεκτρονίων όπως είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, το μυρμιγικό οξύ και οι πολυφαινόλες. Πρόκειται για ένα ολύ παραγωγικό ένζυμο, ικανό να διασπάσει σε ελάχιστα δευτερόλεπτα χιλιάδες μόρια υπεροξειδίου του

υδρογόνου.<sup>123</sup> Διαταραχές στην έκφραση και στη λειτουργία του μορίου είναι συνδεδεμένες με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις.<sup>123,124</sup> Μεταλλάξεις του γονιδίου της καταλάσης, οι οποίες οδηγούν σε ανεπάρκειες ή μη λειτουργικό ένζυμο είναι σε θέση να αυξήσουν το ρίσκο για μια πληθώρα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, των μεταβολικών διαταραχών αλλά και ορισμένων τύπων καρκίνου.<sup>122</sup>

#### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx), μαζί με την καταλάση είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τα κύτταρα. Ακόμα, συμμετέχει σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης του κυττάρου από τα ξενοβιοτικά. Βρίσκεται σχεδόν σε όλους του ζώντες οργανισμούς και αποτελείται από 4 υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες είναι συνδεδεμένη με ένα άτομο σεληνίου, με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης. Η πιο ισχυρή παρουσία του ενζύμου βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 60-75%, ενώ στα μιτοχόνδρια εδράζει σε ποσοστό 25-40%. Παρόλου που βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, αυξημένη έκφραση παρουσιάζει κυρίως στο συκώτι και στα ερυθροκύτταρα.<sup>125</sup> Η GPx χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα, με σκοπό να αποτοξινώσει τον οργανισμό από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και από τα λιπιδικά υπεροξείδια με τις εξής αντιδράσεις: <sup>126</sup>



Στον άνθρωπο απαντώνται 8 ισομορφές του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Σε μεγαλύτερη αφθονία στα κύτταρα βρίσκεται η GPx1 και είναι σε θέση να αποτρέψει την υπεροξείδιο λιπιδίων, την οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών και την απόπτωση που οφείλεται στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 2 και διάφορους τύπους καρκίνου.<sup>127</sup> Τη δεύτερη μεγαλύτερη εκπροσώπηση της οικογένεια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης την έχει η GPx4 η οποία ευθύνεται για την αναγωγή πιο σύνθετων λιπιδίων της μεμβράνης με αποτέλεσμα της προστασία τους από το οξειδωτικό στρες. Τέτοια παραδείγματα οξειδωμένων λιπιδίων είναι τα υδροϋπεροξείδια φωσφατιδυλοχολίνης, η χοληστερόλη και τα υδροϋπεροξείδια λιπαρών οξέων. Προβλήματα στην έκφραση ή στην λειτουργικότητα της μπορεί να οδηγήσουν σε φερρόπτωση, μια μορφή κυτταρικού θανάτου που εξαρτάται από την διαθεσιμότητα σιδήρου και από τη συσσώρευση

υπεροξειδικών λιπιδίων στο κύτταρο. Ακόμα, δεδομένα από μελέτες υποδεικνύουν πως έλλειψη GPx4 από T κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ανικανότητα των κυττάρων αυτών να ασκήσουν τον ανοσολογικό τους ρόλο απέναντι σε μια βακτηριακή λοίμωξη.<sup>137</sup> Ανεπάρκειες και δυσλειτουργίες του ενζύμου GPx παρουσιάζονται συχνά σε πληθώρα παθολογιών στις οποίες εμπλέκονται οι ROS, όπως είναι για παράδειγμα ο διαβήτης τύπου 2, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, προβλήματα γονιμότητα στους άνδρες, καρδιαγγειακά και άλλα νοσήματα. Η έλλειψη των GPx είναι σε θέση να ενεργοποιήσει φλεγμονώδεις αντιδράσεις που σχετίζονται με τη ηλικία μέσω της οδού NF-κΒ.<sup>127</sup>

## Εξωγενή αντιοξειδωτικά

### Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)

Το ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη και πρώτης γραμμής εξωγενές αντιοξειδωτικό για τον οργανισμό. Σε πολλά είδη μπορεί να παραχθεί ενδογενώς καθώς προέρχεται από τη διάσπαση της γλυκόζης, σε αντίθεση με τον άνθρωπο που πρέπει να το προσλάβει μέσω της διατροφής. Λόγω της διαλυτότητάς του στο νερό, μπορεί να δράσει εντός και εκτός κυττάρου. Η βιταμίνη C είναι ένας ισχυρός δότης ηλεκτρονίων, γεγονός που της επιτρέπει να αλληλοεπιδρά με ROS και RNS αδρανοποιώντας τους. Οι πιο γνωστοί δέκτες ηλεκτρονίων στο κύτταρο για τη βιταμίνη C είναι το οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), το ανιόν σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το μονήρες οξυγόνο, οι ρίζες αλκοξυλίου ( $\text{LO}^{\bullet}$ ) και οι ρίζες περοξυλίου ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύει τα βασικά βιομόρια του κυττάρου από την οξειδωτική καταστροφή, δηλαδή την υπεροξειδωση λιπιδίων, τον κατακερματισμό του DNA και την οξείδωση των πρωτεϊνών. Εκτός από την άμεση δράση της στον περιορισμό του οξειδωτικού στρες, το ασκορβικό οξύ συμμετέχει και στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών του οργανισμού, όπως για παράδειγμα η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και η γλουταθειόνη, μετατρέποντας τους στην ανηγμένη τους μορφή.<sup>126</sup> Μετά την αλληλεπίδραση του ασκορβικού με τις ελεύθερες ρίζες, το ασκορβικό οξειδώνεται σε δεϋδρ-ασκορβικό οξύ, το οποίο είτε μετατρέπεται πάλι στην ανηγμένη του μορφή ή μεταβολίζεται περαιτέρω από τα κύτταρα

### A-τοκοφερόλη (Βιταμίνη E)

Η α-τοκοφερόλη αποτελεί την πιο συχνά απαντώμενη μορφή βιταμίνης E στη διατροφή του ανθρώπου. Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή χημική ουσία και ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό για



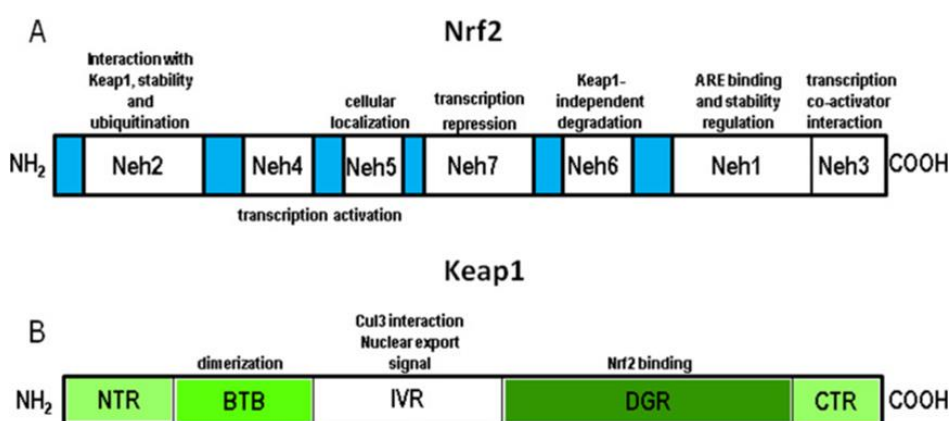
τον οργανισμό καθώς είναι σε θέση να αντιδράσει με λιπιδικά υπεροξειδία, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την ακεραιότητα μεμβρανών και ιστών. Απορροφάται γρήγορα από τον εντερικό αυλό και μπορεί να διαχυθεί εύκολα στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες των μεμβρανών, ασκώντας τον αντιοξειδωτικό της ρόλο. Η α-τοκοφερόλη διακόπτει την αλυσίδα μετάδοσης της λιπιδικής υπεροξείδωσης, καθώς αντιδρά με τις περοξυλικές ομάδες με μεγαλύτερη ταχύτητα από την ταχύτητα διάδοσης των λιπιδικών ριζών περοξυλίου. Μετά την αντίδραση με τα οξειδωμένα λιπίδια, η βιταμίνη Ε μετατρέπεται στην α-τοκοφεροξυλική ρίζα η οποία ανακυκλώνεται μέσα στα κύτταρα σε τοκοφερόλη με τη δράση της βιταμίνης C και της ουβικινόλης 10.<sup>129,130</sup> Τέλος, η α-τοκοφερόλη μπορεί να δράσει και ως προοξειδωτικός παράγοντας σε υψηλά επίπεδα και σε οξειδωτικές συνθήκες κυττάρου, επιταχύνοντας την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins, LDL). Ακόμα, σημαντικό ρόλο παίζει και η παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών στο περιβάλλον όπως είναι για παράδειγμα η βιταμίνη C η οποία μπορεί να αντιδράσει με την βλαβερή ρίζα τοκοφερόλης ανάγοντας την και μετατρέποντας την στην αντιοξειδωτική της μορφή.<sup>131</sup>

#### Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια πολύ μεγάλη οικογένεια φυσικών χρωστικών, που συντίθενται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς με σκοπό να μετατρέψουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική ενέργεια. Ο άνθρωπος, όπως και τα υπόλοιπα ζώα, λαμβάνει την ποσότητα καροτενοειδών που του χρειάζεται από τη διατροφή. Τα καροτενοειδή που απαντώνται συνήθως στο ανθρώπινο πλάσμα είναι το α,β,γ,ζ καροτένιο, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη, η λουτεΐνη, η β-κρυπτοξανθίνη κ.α. Ο ρόλος τους υπόκειται στην αδρανοποίηση των ROS, κυρίως του μονήρους οξυγόνου. Ακριβώς επειδή ορισμένα καροτενοειδή έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και η οξείδωση τους κατά τη διάρκεια των ROS μπορεί να οδηγήσει σε πολλές αντιδραστικές ρίζες καροτενοειδών, πολλές φορές η δράση τους μπορεί να γίνει προοξειδωτική. Ακόμα, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα μπορεί να περιοριστεί σημαντικά σε περιβάλλον όπου υπάρχει παρουσία αλάτων.<sup>132</sup>

## Το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2-KEAP1

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η διατήρηση της οξειδωτικής ομοιόστασης είναι κρίσιμη διαδικασία για την επιβίωση του κύτταρου στην οποία εμπλέκονται πολλές σηματοδοτικές οδοί. Όλοι οι οργανισμοί, ευκαρυωτικοί και προκαρυωτικοί διαθέτουν μια σειρά από γονίδια υπεύθυνα για την απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες. Πρόκειται λοιπόν για μια καλοδιατηρημένη στην πορεία της εξέλιξης ομάδα γονιδίων υπεύθυνη για την διαχείριση του οξειδωτικού στρες και την αποτοξίνωση των οργανισμών. Στους ευκαρυώτες, η πιο σημαντική οδός απόκρισης στο οξειδωτικό στρες είναι η NRF2-KEAP1.<sup>133</sup> Πρόκειται για ένα σύστημα αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού ενεργοποιητή NRF2 και της κυτοσολικής πρωτεΐνης καταστολέα του NRF2, την KEAP1. Στόχος του μεταγραφικού παράγοντα είναι η έκφραση μιας σειράς γονιδίων που ευθύνονται για την αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου, για την αποτοξίνωση του από ξеноβιοτικούς παράγοντες και γονιδίων που συμμετέχουν στην οδό της φωσφορικής πεντόζης. Αποτελέσματα από μοντέλα ασθενειών που χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με αποσιώπηση του γονιδίου της NRF2 πρωτεΐνης, έδειξαν συσχέτιση της πρωτεΐνης με την πορεία της νόσου, σε ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος Αλτσχάιμερ, η διαβητική νευροπάθεια και το μεταβολικό σύνδρομο.<sup>134</sup>



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και της πρωτεΐνης καταστολέας του, KEAP1<sup>135</sup>

Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 ανήκει στην οικογένεια των Cap-n-Collar πρωτεϊνών, μια οικογένεια καλά συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στα μετόζωα και διαθέτουν την χαρακτηριστική περιοχή “φερμουάρ λευκίνης”. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ενεργοποιητή της μεταγραφής σε συγκεκριμένες περιοχές των υποκινητών των γονιδίων-στόχων. Οι πρωτεΐνες

της οικογένειας Cap-n-Collar συμμετέχουν σε διαδικασίες ανάπτυξης του οργανισμού ή/και απόκρισης σε περιβαλλοντικό στρες.<sup>135</sup> Δεδομένα που προκύπτουν από ανάλυση με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR) και με κρυσταλλογραφία X-ray αποκαλύπτουν τις λειτουργικές επικράτειες του NRF2, όπως απεικονίζονται στην εικόνα X. Κάθε μία από τις 7 επικράτειες του παίζει βασικό ρόλο στη διατήρηση της δομικής του ακεραιότητας και στην ιδιότητά του ως ρυθμιστής της μεταγραφής.<sup>136</sup>

Ξεκινώντας από το αμινοτελικό του άκρο, η περιοχή Neh2 καθορίζει την αλληλεπίδραση του ενεργοποιητή με την πρωτεΐνη καταστολής του, την KEAP1, όταν οι 2 πρωτεΐνες βρίσκονται σε χαμηλές νανομοριακές συγκεντρώσεις. Ακόμα, είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της σταθερότητας του NRF2 και την αποικοδόμησή του, μέσω της εξαρτώμενης από την ουβικιτινίωση πρωτεασωμικής οδού. Οι επικράτειες Neh4 και Neh5 λειτουργούν ως συν-ενεργοποιητές του NRF2, καθώς συνδέονται με άλλους συμπαράγοντες για να εκκινήσουν την μεταγραφή, όπως είναι η πρωτεΐνη απόκρισης στο cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate-Responsive Element-Binding Protein, CREB) και οι συμπαράγοντες RAC3/AIB1/SRC-3, που ενισχύουν τη μεταγραφική απόδοση.<sup>136-138</sup> Η Neh5 περιοχή διασφαλίζει και τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του πυρηνικού παράγοντα. Αντίθετα με τη δράση των Neh4 και Neh5 επικρατειών, η Neh7 λειτουργεί κατασταλτικά για την λειτουργία του NRF2 μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον ρετοϊνικό υποδοχέα  $\alpha$  Retinoic X Receptor alpha (RXR $\alpha$ ). Η Neh6 περιοχή μεσολαβεί στην ανεξάρτητη από την KEAP1 αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση του NRF2 μέσα στον πυρήνα κάτω από οξειδωτικές συνθήκες. Περιλαμβάνει 2 ανεξάρτητες περιοχές που προσδέονται με την πρωτεΐνη  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase,  $\beta$ -TrCP), λειτουργώντας με αυτό τον τρόπο ως υπόστρωμα για την E3 λιγάση ουβικουιτίνης (Skp1-Cullin1-F-box protein E3 ubiquitin ligase), άρα και ως υπόστρωμα για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Πλησιάζοντας προς το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται η Neh1 επικράτεια, η οποία χαρακτηρίζεται από την βασική δομή φερμουάρ λευκίνης (Basic Leucine Zipper Domain, bZIP) και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση περιοχών ARE (Antioxidant Response Elements, ARE) στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων του NRF2. Η Neh1 προκειμένου να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες MAF και τις πρωτεΐνες bZIP. Ακόμα, μπορεί να ενωθεί με το ένζυμο UbcM2, το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα για την E2 λιγάση, καθορίζοντας έτσι την σταθερότητα του μεταγραφικού παράγοντα. Τέλος, στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται η περιοχή Neh3, η οποία μαζί με τις Neh4 και Neh5 περιοχές λειτουργεί ως συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής. **(Εικόνα 4A)**<sup>136,138,139</sup>

Η πρωτεΐνη KEAP1 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του NRF2. Ανήκει στην οικογένεια των BTB-Kelch πρωτεϊνών και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες συγκρατεί τον μεταγραφικό παράγοντα στο κυτταρόπλασμα, μετατρέποντάς τον σε στόχο πρωτεασωματικής αποικοδόμησης. Η BTB-Kelch οικογένεια είναι μια διατηρημένη οικογένεια γονιδίων, η οποία εντοπίζεται και στην *Drosophila melanogaster*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας συμμετέχουν σε μια σειρά από διαδικασίες, όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας και η ουβικουιτινίωση πρωτεϊνών στόχων μέσω των λιγασών E3 (cullin E3 ligases).<sup>140</sup> Η KEAP1 λειτουργεί ως προσαρμογέα, μετατρέποντας τον NRF2 παράγοντα σε υπόστρωμα για ουβικουιτινίωση από τις E3 λιγάσες. Χρησιμοποιεί την BTB περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο και την κεντρική περιοχή IVR ώστε να προσδεθεί στην Cullin 3 πρωτεϊνική λιγάση και αντίστοιχα την DGR επικράτεια η οποία περιέχει Kelch μοτίβα με σκοπό να δεσμεύσει την Neh2 περιοχή του NRF2. Η Keap1 δρα ως ομοδιμερές με τη μεσολάβηση της BTB περιοχής και οι περιοχές DGR του ομοδιμερούς προσδένονται στην αλληλουχία Neh2 του NRF2 κάτω από συνθήκες οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. **(Εικόνα 4B)**<sup>136,141,142</sup> Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, γίνεται αποδέσμευση του παράγοντα από την πρωτεΐνη καταστολέα του με τρόπο εξαρτώμενο από την ποσότητα των ROS και ο NRF2 μετατοπίζεται στον πυρήνα, ώστε να επάγει τη μεταγραφή των κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων του κυττάρου. Η αποδέσμευση του NRF2 οφείλεται στην τροποποίηση συγκεκριμένων καταλοίπων κυστεΐνης της πρωτεΐνης καταστολέας, έπειτα από την αλληλεπίδρασή της με ηλεκτρόφιλα συστατικά ή ROS.<sup>143</sup> Μέσα στον πυρήνα, ο NRF2 ετεροδιμερίζεται με μέλη της οικογένειας SMAD συμπαραγόντων και έπειτα αναγνωρίζει τις περιοχές ARE στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του.<sup>136</sup>

Η μεσολάβηση της οδού NRF2-KEAP1 στο οξειδωτικό στρες και στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο NRF2 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Cap-n-Collar, μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-E2 p45, NRF1, NRF2, NRF3, BACH1, BACH2. Παρά την ομολογία που παρουσιάζει με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-E2 (nuclear factor-erythroid 2 p45), δεδομένα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με σίγαση του γονιδίου NRF2 έδειξαν έλλειψη αναιμίας στα πειραματικά μοντέλο, γεγονός που υποδεικνύει πως ο παράγοντας δεν εμπλέκεται σε διαδικασίες αιμοποίησης στον οργανισμό. Αντίθετα, αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα συσχέτισαν την έλλειψη NRF2 με μειωμένα επίπεδα μεταβολικών ενζύμων φάσης II.<sup>136</sup>

Μετάπειτα μελέτες που πραγματοποιήθηκαν απέδειξαν πως το σύστημα NRF2-KEAP1 κωδικοποιεί μια σειρά ενζύμων που εμπλέκονται σε αντιδράσεις όλων των φάσεων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών πραγματοποιείται σε 3 στάδια από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει αντιδράσεις οξειδωσης, υδρόλυσης και αναγωγής των χημικών ουσιών από μια πληθώρα ενζύμων όπως η αλδεϋδοαφυδρογονάση 1 (ALDH1), οι καρβονυλοαναγωγάσες (CBRs), οι οξειδοαναγωγάσες του κυτοχρώματος P450 (CYPs) κτλ. Από τις παραπάνω αντιδράσεις προκύπτουν τοξικοί για τον οργανισμό ενδιάμεσοι μεταβολίτες και ελεύθερες ρίζες, τις οποίες αδρανοποιούν ένζυμα της μεταβολικής φάσης II του οργανισμού. Τα ένζυμα αυτά πραγματοποιούν αντιδράσεις σύζευξης των μεταβολιτών με συστατικά όπως η κυστεΐνη, η γλυκίνη ή η γλουταθειόνη, με σκοπό την μετατροπή τους σε αβλαβή προϊόντα. Στη φάση αυτή συμμετέχουν ένζυμα όπως η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-Transferase, GST), η UDP γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση (UDP-glucuronosyltransferase, UGT), η NAD(P)H αφυδρογονάση της κινόνης (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1, NGO1) κ.α. Και τέλος, τα ένζυμα τα φάσης III, τα οποία αναλαμβάνουν την εκροή των ξενοβιοτικών όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες που ευθύνεται για την αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (Multidrug Resistance-Associated Proteins, MDR) και η πρωτεΐνη αντίστασης στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Breast Cancer Resistant Protein, BCRP).<sup>134,136,139</sup>

Η NRF2-KEAP1 οδός ευθύνεται για την έκφραση μιας σειράς γονιδίων τα αποτελούν το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού. Ορισμένα από αυτά είναι τα GCLC, GCLM και GSS, που απαρτίζουν το μονοπάτι σύνθεσης της γλουταθειόνης, αλλά και πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα την γλουταθειόνη για την εξάλειψη των ROS (S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης). Ακόμα, ένζυμα-στόχοι του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (SOD1), η οξυγενάση της αίμης (OH), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).<sup>144,145</sup> Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης του μονοπατιού και της προστασίας που προσφέρει έναντι στις βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως θεραπευτικός παράγοντας για πληθώρα ασθενειών-σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες, όπως είναι για παράδειγμα οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, το εγκεφαλικό, ο διαβήτης, στα καρδιαγγειακά και άλλα νοσήματα. Στον καρκίνο η εμπλοκή του συστήματος NRF2-KEAP1 είναι πιο πολύπλοκη. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει πως η οδός που επάγεται από τον NRF2 δρα προστατεύοντας τα φυσιολογικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και την χρόνια φλεγμονή, που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση. Ταυτόχρονα, όμως η ιδιοστατική ενεργοποίηση του NRF2 που παρατηρείται σε ορισμένους τύπους καρκίνου έχει ως

αποτέλεσμα την εξέλιξη του όγκου μέσω της αποφυγής της απόπτωσης, του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού του κυττάρου και της αυτό-ανανέωσης των καρκινικών βλαστοκυττάρων.<sup>146,147</sup>

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τις μεταβολικές οδούς του κυττάρου

Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει μια σειρά αλλαγών στις μεταβολικές οδούς του κυττάρου, οδηγώντας σε μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Αυτό έχει ως σκοπό, τα κατεστραμμένα κυτταρικά συστατικά που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες, να αντικατασταθούν από νέα. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, έκθεση του κυττάρου σε υψηλή συγκέντρωση  $H_2O_2$  οδηγεί σε αυξημένη οξείδωση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH), γεγονός που οδηγεί στην ενίσχυση της παραγωγής NADPH μέσω της οδού της φωσφορικής πεντόζης (Pentose Phosphate Pathway, PPP). Το NADPH, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως παίζει βασικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Η μείωση που προκαλείται ενδοκυτταρικά στο NADPH μέσω της κατανάλωσής του από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα οδηγεί σε αύξηση της λειτουργίας της αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PD), με σκοπό την αποκατάσταση των επιπέδων του. Ακόμα, ακολουθεί συσσώρευση των ενδιάμεσων της γλυκόλυσης, συστατικά τα οποία συμμετέχουν και σε άλλες μεταβολικές διεργασίες, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας και δομικών συστατικών για το κύτταρο. Ο κύκλος του TCA, η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και η οξείδωση των β-λιπαρών οξέων είναι διαδικασίες που επηρεάζονται από τις οξειδωτικές συνθήκες, καθώς ένζυμα που συμμετέχουν στις παραπάνω διεργασίες υφίστανται αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις, όπως είναι η S-γλουταθεινυλίωση των πρωτεϊνών αυτών. Η αλλοίωση αυτή τα προστατεύει μεν από τις μόνιμες βλάβες των ελεύθερων ριζών, αλλά μειώνει παράλληλα τα επίπεδα ROS, περιορίζοντας τη λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας.<sup>148</sup>

Η οδός NRF2-KEAP1 και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός του κυττάρου

Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NRF2 επηρεάζει αρνητικά ή θετικά πολλές σηματοδοτικές μεταβολικές οδούς, με σκοπό την αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου. Ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός, που ακολουθεί την ενεργοποίηση του

NRF2, πραγματοποιείται με την μεταγραφή γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκονται στην γλυκόλυση, στην οδό της φωσφορικής πεντόζης, στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης και της γλουταμίνης και στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Στην γλυκόλυση, η μεταγραφική δραστηριότητα του NRF2 δρα ενισχυτικά επάγοντας την έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης 1 στα κύτταρα, μαζί με την έκφραση ενζύμων που συμμετέχουν στο γλυκολυτικό μονοπάτι, όπως για παράδειγμα των εξοκινασών 1 και 2 (Hexokinase 1/2, HK1/2), της 6-φωσφοφρουκτο-2-κινάσης (6-phosphofructo-2-kinase, PFK2) και άλλων ενζυμικών ενδιάμεσων της οδού. Σκοπός της αύξησης είναι η συσσώρευση ενδιάμεσων μεταβολιτών, οι οποίοι θα χρησιμεύσουν σε πολλές αναβολικές διαδικασίες του κυττάρου. Ταυτόχρονα ο NRF2 δρα ανασταλτικά στην γλυκονεογένεση καταστέλλοντας την 6-φωσφορική γλυκόζη (Glucose-6-Phosphatase, G6PC) και άλλων κατάντη συστατικών της οδού, ενώ λειτουργεί θετικά στην σύνθεση γλυκογόνου και στη μετατροπή της G6PC σε 1-φωσφορική γλυκόζη (Glucose-1-phosphatase, G1PC), μέσω επαγωγή της έκφρασης αντίστοιχων γονιδίων. Ο NRF2 λειτουργεί ενισχυτικά και για ένζυμα που εμπλέκονται στην οδό της φωσφορικής πεντόζης, όπως για παράδειγμα η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και η φωσφογλυκονική αφυδρογονάση. Η αυξημένη έκφραση της οδού οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή NADPH, ενός αναγωγικού παράγοντα που συμμετέχει σε αντιδράσεις αναβολισμού νουκλεοτιδίων και λιπιδίων του κυττάρου. Τα τελικά προϊόντα της οδού της φωσφορικής πεντόζης θα χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων καθώς και αρωματικών δακτυλίων για τα αμινοξέα. Ακόμα, η ρύθμιση της έκφρασης ενζύμων-συστατικών της οδού PPP, καθώς και ενζύμων για την αναπλήρωση συστατικών του TCA κύκλου θα δράσουν θετικά στην παραγωγή νουκλεοτιδίων και αμινοξικών καταλοίπων. Ο NRF2 προάγει την μεταγραφή μιας σειράς γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φωσfolιπιδίων/τριγλυκεριδίων, την οξειδωση των β λιπαρών οξέων και την μεταφορά/πρόσληψη λιπιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και συμμετέχει στη βιοσύνθεση και στον καταβολισμό της αίμης, ενός μορίου που παίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του κυττάρου.<sup>139</sup>

### Ο ρόλος του NRF2 στο μεταβολισμό των λιπιδίων

Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει αρνητικά τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στα κύτταρα. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης-καταστολέα Kcp1 και σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν τριπεπτόνια ως επαγωγείς του NRF2, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα οδήγησε

σε μειωμένη έκφραση τριών γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε ηπατικά κύτταρα: της ATP-κιτρικής λυάσης (ATP-Citrate Lyase, ACLY), της συνθάσης λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase, FAT) και της στεαροϋλο-CoA δεσατουράσης-1 (stearoyl CoA desaturase, SCD-1).<sup>149</sup> Η ACLY συμμετέχει στο πρώτο βήμα της σύνθεσης λιπαρών οξέων και χοληστερόλης. Δρα στο κυτταρόπλασμα και σε συνθήκες αφθονίας υδατανθράκων αξιοποιεί το κιτρικό που παράγεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος στα μιτοχόνδρια μετατρέποντάς το σε ακετυλο-CoA. Στη συνέχεια η οδός σύνθεσης των λιπαρών οξέων περιλαμβάνει την μετατροπή του ακετυλο-CoA σε μηλονυλο-CoA. Μετά την πραγματοποίηση μια σειράς βιοχημικών αντιδράσεων επτά μόρια μηλονυλο-CoA και ένα μόριο ακετυλο-CoA συνθέτουν το παλμιτικό οξύ (κορεσμένο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας), με τη μεσολάβηση του ενζύμου της συνθάσης των λιπαρών οξέων.<sup>150</sup> Τέλος, ένζυμο της στεαροϋλο-CoA δεσατουράσης-1 καταλύει την μετατροπή των κορεσμένων λιπαρών οξέων σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated Fatty Acids, MUFAs)<sup>151</sup> Σε υποστήριξη των παραπάνω, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, παρατηρήθηκε λιπιδική συσσώρευση στο ήπαρ, κυρίως σε μοντέλα ποντικών που έπασχαν από μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Αντίθετα, η διαδικασία μιτοχονδριακής οξειδωσης λιπαρών οξέων υποστηρίζεται από την ενεργοποίηση του NRF2, όπως υποδεικνύουν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, σε ιστούς και σε ποντικίστους εμβρυονικούς ινοβλάστες (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs). Παρόλο που η συσχέτιση του NRF2 με τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα και της οδού. Μία πιθανή αιτιολογία για την μείωση της λιπιδικής σύνθεσης από την ενεργοποίηση της οδού NRF2-KEAP1, είναι η διατήρηση των επιπέδων του NADPH, ώστε να συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου.<sup>152,153</sup>

## Συστατικά του κρασιού ως ρυθμιστές του συστήματος NRF2-KEAP1

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη ενασχόληση γύρω από τα φυσικά συστατικά για τη θεραπεία ασθενειών που επάγονται από το οξειδωτικό στρες, όπως για παράδειγμα οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Διάφορα φυσικά συστατικά τα οποία βρίσκονται στη διατροφή, στα συμπληρώματα αλλά και φυσικά συστατικά που προέρχονται από φυτά μπορούν να δράσουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά είτε μέσω της άμεσης εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, είτε επάγοντας την έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών ενζύμων μέσω του μονοπατιού NRF2-KEAP1. Τέτοιου είδους συστατικά συναντώνται στα μπαχαρικά, όπως για



παράδειγμα η κινναμαλδεΐδη της κανέλας, η κουρκουμίνη του κουρκουμά και το καρνοσικό οξύ του δεντρολίβανου, στα λαχανικά όπως η κερσετίνη του κόκκινου κρεμμυδιού, στα ποτά όπως η κερσετίνη του κρασιού, καθώς και σε πολλά ακόμα φυσικά προϊόντα.<sup>154</sup> Αν και οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των φυσικών συστατικών με το σύστημα NRF2-KEAP1 δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως μέχρι αυτή τη στιγμή, ωστόσο με τα τωρινά δεδομένα φαίνεται η ρύθμιση του συστήματος να οφείλεται στην χημική τροποποίηση της πρωτεΐνης KEAP1. Η KEAP1 ως αισθητήρας της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου αλληλοεπιδρά με τα φυσικά συστατικά μέσω των κυστεϊνικών καταλοίπων της. Η αλληλοεπίδραση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της πρωτεΐνης και στην αδρανοποίηση της λειτουργίας της ως καταστολέα του NRF2.<sup>155</sup>

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το κρασί είναι το προϊόν ζύμωσης του μούστου ή του χυμού που προέρχεται από σταφύλια. Ανήκει στην κατηγορία των αλκοολούχων ποτών καθώς περιέχει αιθανόλη σε ποσοστό που κυμαίνεται από 8-15%, περιέχει νερό σε ποσοστό 80-90% και περιλαμβάνει ακόμα διοξείδιο του άνθρακα, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, γλυκερίνη, οξέα, ανώτερες αλκοόλες και φαινολικά συστατικά. Οι πολυφαινόλες είναι το πιο άφθονο μη αλκοολούχο-συστατικό του κρασιού, στις οποίες έχουν αποδοθεί αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στο φυτό της αμπέλου, κυρίως στο σπόρο, στη φλούδα και στη σάρκα του, αλλά παράγονται και κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η ρεσβερατρόλη, μια πολυφαινόλη της αμπέλου που εξάγεται στο κρασί, φαίνεται να έχει τα σημαντικότερα θεραπευτικά αποτελέσματα σε σχέση με άλλα μέλη της ομάδας των φαινολικών σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καρδιαγγειακών νοσημάτων και στην εγκεφαλική ισχαιμία. Η προστατευτική δράση που ασκεί απέναντι στο οξειδωτικό στρες, οφείλεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 που οδηγεί στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων. Επιπλέον αποτελέσματα μελετών έδειξαν πως πολυφαινολικά συστατικά του κρασιού όπως για παράδειγμα η κερσετίνη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η πικεατανόλη, η σιλιβινίνη και η προκυανιδίνη B2 ασκούν επίσης αντιοξειδωτική δράση στο κύτταρο μέσω της εξαρτώμενης από τον NRF2 παραγωγής SOD, GST, HO-1, GSH, NQO-1 και των μεταλλοθειονινών 1 και 2 (MT-1/2).<sup>154,156</sup>

## Στόχοι

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη αξιοποιεί τις υπάρχουσες γνώσεις γύρω από τον τομέα της οξειδοαναγωγικής βιολογίας, των αντιοξειδωτικών και των φυτικών πολυφαινολών, με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης τεσσάρων ελληνικών εμβληματικών οίνων στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η έκφραση του μονοπατιού NRF2-KEAP1, εικοσιτέσσερις ώρες μετά την χορήγηση των εκχυλισμάτων σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενός μονοπατιού που οδηγεί στην έκφραση κρίσιμων για τον οργανισμό αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων. Τέλος, μελετάται η επίδραση των ποικιλιών στον βιοσύνθεση λιπαρών οξέων του κυττάρου, ενός μονοπατιού που φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από το οξειδωτικό στρες, όσο και από την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

## Υλικά και μέθοδοι

### Προετοιμασία εκχυλισμάτων οίνων

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν τέσσερις εμβληματικές ελληνικές ποικιλίες κρασιού, με χρονολογία παραγωγής το 2020. Οι δύο ερυθρές ποικιλίες είναι το Ξινόμαυρο και το Αγιωργίτικο και οι δύο λευκές είναι το Ασύρτικο και η Μαλαγουζιά. Η ζύμωση και η διήθηση όλων των ποικιλιών έλαβε χώρα σε ανοξείδωτα δοχεία inox, ενώ δεν ακολούθησε παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια. Η μετατροπή των κρασιών σε σκόνη ακολούθησε ορισμένα στάδια, με πρωταρχικό αυτό της απομάκρυνσης της αιθανόλης στον περιστροφικό εξατμιστήρα (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) στους 40 °C, έως ότου να μειωθεί ο όγκος τους στο μισό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των δειγμάτων σε πολυμερές ρητίνης (Amberlite® XAD-4, Supelco, Bellefonte, PA, USA) και η ανάκτηση των οίνων με ισοπροπανόλη (Fischer Scientific, Pittsburg, PA, USA). Τέλος, για την απομάκρυνση όλης της περίσσειας διαλύτη, τα δείγματα πέρασαν ξανά από τον περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλοποιήθηκαν, πριν αποθηκευτούν στους -20°C.

### Καλλιεργητικές συνθήκες

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ερυθρών και λευκών οίνων πραγματοποιήθηκε στην καρκινική κυτταρική σειρά ήπατος HepG2 και στην γαστρική καρκινική κυτταρική σειρά MKN45. Για τη συνολική διατήρηση και διαχείριση των κυτταρικών σειρών ακολουθήθηκαν άσηπτες διαδικασίες και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε περιβαλλοντικές συνθήκες παρόμοιες με αυτές του ανθρώπινου οργανισμού: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% υγρασία. Για την κυτταρική σειρά HepG2 χρησιμοποιήθηκε το καλλιεργητικό μέσο υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη DMEM High Glucose (11965-092; Gibco, MD, USA), ενώ η σειρά MKN45 καλλιεργήθηκε σε RPMI 1640 (11875-093; Gibco, MD, USA) καλλιεργητικό μέσο. Και τα δύο καλλιεργητικά μέσα εμπλουτίστηκαν με 10% αυξητικό παράγοντα εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) και με 100 U/ml κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

#### Διαχείριση κυτταρικών σειρών

Η αλλαγή καλλιεργητικού πραγματοποιούνταν ανά 2 ημέρες, με σκοπό την απομάκρυνση των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων από το καλλιεργητικό μέσο. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τρυψινοποίησης. Όταν τα κύτταρα ξεπερνούσαν σε πληρότητα το 70-80% της επιφάνειας της καλλιεργητικής φλάσκας T-75, το καλλιεργητικό απομακρυνόταν. Μετά από μια σύντομη πλύση με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PSB, τα κύτταρα επώαζονταν για 3 λεπτά με 1ml διαλύματος τρυψίνης 1x, ώστε να σπάσουν οι προσκολλητικοί δεσμοί μεταξύ κυττάρων και επιφάνειας φλάσκας. Ακολουθούσε η αδρανοποίηση του ενζύμου της τρυψίνης με την τετραπλάσια ποσότητα καλλιεργητικού και η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων μεταφερόταν σε νέα φλάσκα, μαζί με την κατάλληλη ποσότητα καλλιεργητικού για τελικό όγκο 10 ml. Η διατήρηση των κυττάρων εκτός της περιόδου της πειραματικής διαδικασίας γινόταν μέσα σε υγρό άζωτο, εφόσον τα κύτταρα είχαν πρώτα διαλυθεί σε μέσο κρυσσοσυντήρησης (80% DMEM ή RPMI 1640, 10%FBS και 10% DMSO) και μεταφερθεί σε ειδικό φιαλίδιο cryovial. Η διαδικασία της κατάψυξης περιλάμβανε την αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με τρυψινοποίηση, φυγοκέντριση 5 λεπτών στα 1200 rpm, την επαναδιαλυτοποίηση του κυτταρικού ιζήματος σε 1 ml κρυσσοσυντηρικού και τέλος την διατήρησή του φιαλιδίου στους -80 °C για 2 ώρες πριν από τη μεταφορά του στο υγρό άζωτο. Αντίθετα, η διαδικασία της απόψυξης περιλάμβανε την αφαίρεση του cryovial από το υγρό άζωτο και την υγροποίηση του στο υδατόλουτρο για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφερόταν σε φλάσκα T-25 μαζί με 5 ml

καλλιεργητικού. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνταν αλλαγή καλλιεργητικού μέσου στα κύτταρα, ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του βλαπτικού για τα κύτταρα DMSO.

#### Μέτρηση κυττάρων και επίστρωση σε 6-well plate

Προκειμένου να γίνει η επίστρωση σε 6-well plate, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την καλλιεργητική φλάσκα και μετρήθηκαν με την πλάκα Neubauer. Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer είναι μια ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα που χρησιμοποιείται τον υπολογισμό του αριθμού των στερεών συστατικών του αίματος όπως είναι τα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ερυθροκύτταρα. Ταυτόχρονα, η χρήση της επεκτείνεται και στην καταμέτρηση κυττάρων εναιωρήματος. Η ειδική διαμόρφωσή της περιλαμβάνει τη δημιουργία 2 σταυρών, καθένας από τους οποίους χωρίζει 4 τεταρτημόρια, τα οποία υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 16 τετράγωνα το κάθε τεταρτημόριο. Τα κύτταρα καταμετρώνται σε έναν από τους 2 σταυρούς. Για τον υπολογισμό της ποσότητας του εναιωρήματος που επιστρώθηκε σε 6-well plate, 10 μl κυτταρικού δείγματος τοποθετήθηκαν στο διάκενο που σχηματίζεται ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο και την καλυπτρίδα και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται σε 1 ml εναιωρήματος με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου σύμφωνα με τον εξής υπολογισμό:  **$N$  (αριθμός των λεμφοκυττάρων και στα 4 τετράγωνα) / 4 (τετράγωνα) \*  $10^4$  (όγκος αιματοκυτταρόμετρου)**. Έπειτα, συγκεκριμένη ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε 300.000 κύτταρα μεταφέρθηκε σε κάθε θέση του 6-well plate, μαζί με κατάλληλη ποσότητα καλλιεργητικού, ώστε ο τελικός όγκος κάθε θέσης του πιάτου να προσεγγίζει τα 2 ml.

#### Χορήγηση των εκχυλισμάτων στα κύτταρα και απομόνωση ολικού κλάσματος πρωτεΐνης

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα που έλαβαν τα εκχυλίσματα και σε κύτταρα που δεν δέχτηκαν καμία παρέμβαση, κύτταρα HepG2 και MKN45 επιστρώθηκαν σε 6-well plate και αφέθηκαν να αναπτυχθούν. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση των 4 ποικιλιών στο καλλιεργητικό μέσο των κυττάρων σε συγκέντρωση 50 μg/ml, και έπειτα από το πέρας 24 ωρών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν για απομόνωση ολικού κλάσματος πρωτεΐνης. Για της συνολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα control, δηλαδή αυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε κρασί, και από τα κύτταρα τα οποία

αναπτύχθηκαν σε καλλιεργητικό με κάθε μία από τις 4 διαφορετικές ποικιλίες, αφαιρέθηκε το καλλιεργητικό μέσο από τις θέσεις του πιάτου και έπειτα από μια σύντομη πλύση με PBS, έγινε λύση των κυττάρων πάνω στην επιφάνεια του πιάτου με τη χρήση 300 μl κρύου διαλύματος λύσης RIPA (0.15M NaCl, 0.05M Tris-HCl, 0.1% w/v SDS, 1% Nonidet P-40, 0,5%w/v Sodium deoxycholate). Στη συνέχεια, το κυτταρόλυμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 1.5 ml (erpedorf) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 5 λεπτά, ώστε να καθιζάνουν ως ίζημα τα κυτταρικά θραύσματα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέα erpedorf και η διατήρησή τους στους -80°C μέχρι την ημέρα του πειράματος. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο προκειμένου να παραμείνουν ακέραιες οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος κατά τη διάρκεια της λύσης και να μην καταστραφούν από ένζυμα του κυτταρολύματος, με πρωτεολυτικές ή άλλες δράσεις.

#### Ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Bradford. Η μέθοδος Bradford είναι μια γρήγορη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός διαλύματος με τη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Στην ελεύθερη μορφή της, η χρωστική παρουσιάζει καφέ χρώμα, ενώ αν έρθει σε επαφή με τις πρωτεΐνες ενός διαλύματος κάτω από όξινες συνθήκες σχηματίζει σύμπλοκα με τις καρβοξυλικές ομάδες των αμινοξέων, αποκτώντας τελικά μπλε χρώμα, με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση την εξίσωση που προέκυψε από την κατασκευή μια πρότυπης καμπύλης. Για το σκοπό αυτό 4 mg αλβουμίνης ζυγίστηκαν και αραιώθηκαν σε διάλυμα RIPA, ώστε να δημιουργηθεί ένα εύρος 8 συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από 0.025 mg/ml μέχρι 0.4 mg/ml. Στη συνέχεια, 20 μl από τα δείγματα αραιωμένης αλβουμίνης αναμείχθηκαν με 1 ml διαλύματος Bradford μέσα σε erpedorf 1.5 ml και ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων στα 595 nm, έπειτα από 20 λεπτά επώασης υπό σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων και οι οπτικές απορροφήσεις τους τοποθετήθηκαν σε άξονες xy όπου στον άξονα y βρίσκονταν οι οπτικές απορροφήσεις και στον άξονα x οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Από την νεοσχηματισθείσα πρότυπη καμπύλη προέκυψε μια εξίσωση της μορφής  $y = ax + b$ , η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον μετέπειτα υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων. Επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία ανάμειξης με τη χρωστική

και μέτρησης για τα υπό μελέτη δείγματα, προσδιορίστηκαν οι οπτικές τους απορροφήσεις και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις για καθένα από αυτά.

## Ανοσοτύπωμα κατά Western

### Παρασκευή Διαλυμάτων

#### Running Buffer 10x

- Tris (0.25M)
- Γλυκίνη (1.92M)
- SDS (0.035M)
- ddH<sub>2</sub>O

Transfer Buffer 10x ( Η αραιώση από 10x σε 1x πραγματοποιείται με την προσθήκη 20% μεθανόλης)

- Tris (0.25M)
- Γλυκίνη (1.92M)
- ddH<sub>2</sub>O

#### 5% Blocking Buffer

- non fat dry milk (5%)
- 1x TBST

#### TBST 10x (pH 7.6)

- Tris (0.13M)
- NaCl (1.49M)
- Tween 20 διαλυμένο σε ddH<sub>2</sub>O (2% v/v)

#### Laemmli buffer(pH 6.8)

- Tris (100mM)
- glycerol (20%)
- β-mercaptoethanol (2% v/v)
- SDS (2% v/v)
- BromophenolBlue (0.001% v/v)
- ddH<sub>2</sub>O

#### Developer

- Αντιδραστήριο A (27.6% v/v)
- Αντιδραστήριο B (2.9% v/v)
- Αντιδραστήριο C (2.5% v/v)
- dH<sub>2</sub>O

#### Fixer

- Αντιδραστήριο A (26.3% v/v)
- Αντιδραστήριο B (4.21% v/v)
- dH<sub>2</sub>O

Για την μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος σε κύτταρα control και σε κύτταρα που έλαβαν τα εκχυλίσματα οίνων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανοσοτυπώματος κατά Western. Πρόκειται για μια ημιποσοτική μέθοδο πολλών βημάτων. Η ανάλυση των διαφορών έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών στηρίζεται στη χρήση κατάλληλων γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes), δηλαδή γονιδίων που εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές και τα επίπεδα τους μένουν ανεπηρέαστα από παρεμβάσεις που δέχονται τα κύτταρα. Η τεχνική περιλαμβάνει τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πάνω σε τζελ πολυακρυλαμίδης, τη μεταφορά τους σε στερεό υπόστρωμα, την υβριδοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με τη χρήση αντισωμάτων και τέλος την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών υπό μορφή μπαντών πάνω σε φιλμ.

#### Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα ολικής πρωτεΐνης που συλλέχθηκαν προετοιμάστηκαν κατάλληλα προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν. Κατά την διαδικασία αυτή, κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 30 μg, αναμείχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer). Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι ένα μίγμα αποτελούμενο από τους αποδιατακτικούς παράγοντες β-μερκαπτοαιθανόλη και SDS, τον ρυθμιστή του ιζώδους των πρωτεϊνών γλυκίνη, την χρωστική παρατήρησης των πρωτεϊνών Bromophenol Blue και τον ρυθμιστή του pH Tris . Το SDS, εκτός από την ιδιότητα ως απορρυπαντικό, φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες ώστε αυτές διαχωριστούν μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους, υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Η ανάμειξη των δειγμάτων με το loading buffer πραγματοποιήθηκε σε αναλογία 4:1 και τα ομογενοποιημένα θερμάνθηκαν στους 95 °C ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποδιάταξής τους.

#### Κατασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μια πηκτή πολυακρυλαμίδης, ένα πολυμερές που σχηματίζει ένα τρισδιάστατο δίκτυο πόρων αποτελούμενο από τα μονομερή ακρυλαμίδα και bis-ακρυλαμίδα. Το τζελ στερεοποιείται έπειτα από την ταυτόχρονη προσθήκη των 2 πηκτικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium persulfate, APS) και του TEMED (Tetramethylethylenediamine). Αποτελείται από 2 μέρη διαφορετικής συγκέντρωσης του πολυμερούς και διαφορετικού pH τα οποία συντελούν στον αποτελεσματικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Το πήκτωμα επιστοιβάξεως (stacking gel) είναι

αυτό το οποίο θα διασχίσουν πρώτο οι πρωτεΐνες και αποτελείται από μεγαλύτερους πόρους που διευκολύνουν την μετακίνηση όλων των πρωτεϊνών ανεξαρτήτως μεγέθους, ώστε να φθάσουν ταυτόχρονα στο τέλος του stacking τζελ και το πήκτωμα διαχωρισμό (separating gel) που αποτελείται από μικρότερους πόρους και επιτρέπει τη μετακίνηση πρωτεϊνών διαφορετικού μεγέθους με διαφορετική ταχύτητα, ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός τους. Ανάμεσα στα τζελ διαφορετικών συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αυτό που διαφοροποιείται είναι η συγκέντρωση του τζελ διαχωρισμού ενώ το τζελ επιστοιβάξεως παραμένει σε συγκέντρωση 6%. Η πηκτή σχηματίζεται ανάμεσα σε 2 υποστηρικτικές γυάλινες πλάκες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του τζελ πολυακρυλαμίδης (8%) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

8% Separating gel		6% Stacking gel	
ddH <sub>2</sub> O	4.6 ml	ddH <sub>2</sub> O	3 ml
Acryl-Bis mix	2.7 ml	Acryl-Bis mix	0.65 ml
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml	Tris 0.5M pH 6.8	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	SDS 10%	0.05 ml
APS	0.1 ml	APS	0.05 ml
TEMED	0.006 ml	TEMED	0.005 ml

*Πίνακας 1. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την κατασκευή ενός τζελ πολυακρυλαμίδης 8%*

### Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης παρουσία του δωδεκυλο-θεικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) χρησιμοποιείται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα σε ένα κλειστό κύκλωμα όπου οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μετακινούνται πάνω στην πηκτή με βάση το MB τους, υπό συγκεκριμένες συνθήκες ηλεκτρικής ισχύος, θερμοκρασίας και pH. Στο πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, 30 μg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα φορτώθηκαν στα νεοσχηματισμένα πηγάδια του τζελ πολυακρυλαμίδης σε συγκεκριμένη σειρά. Σε ένα από τα πηγαδάκια του τζελ φορτώθηκαν και 5 μl από τον μάρτυρα (ladder), δηλαδή ενός μίγματος από σημασμένες με χρωστικές πρωτεΐνες διαφορετικού και γνωστού μοριακού βάρους, οι οποίες διευκολύνουν την παρακολούθηση της πορείας και του διαχωρισμού των πρωτεϊνών πάνω στη πηκτή. Εφόσον στήθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (1X Running Buffer) μέχρι την ένδειξη της συσκευής, τα δείγματα αφέθηκαν να «τρέξουν» πάνω στο τζελ για 2 περίπου ώρες. Η τάση που ασκήθηκε ήταν 60 V, μέχρι οι πρωτεΐνες να ευθυγραμμιστούν στη γραμμή



που ενώνει τα τζελ επιστοιβάξεως και διαχωρισμού και στη συνέχεια η τάση ανέβηκε στα 90 V, έως ότου οι σημασμένες πρωτεΐνες του μάρτυρα να διαχωριστούν επαρκώς.

#### Μεταφορά σε μεμβράνη

Όταν ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφορητική διαδικασία το τζελ πολυακρυλαμίδης, με τις διαχωρισμένες πλέον πρωτεΐνες, αποσπάστηκε από την συσκευή ηλεκτροφόρησης και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF, ακολουθώντας τη ροή ενός ρυθμιστικού διαλύτη με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε μέσα σε μία κασέτα μεταφοράς. Εκατέρωθεν της μεμβράνης και του τζελ τοποθετήθηκαν πορώδη επιθέματα και τα διηθητικά χαρτιά Wattman, τα οποία διευκόλυναν την ροή του διαλύματος μεταφοράς (Transfer Buffer) μέσα στην κασέτα και στη μέση της δομής η μεμβράνη PVDF και το τζελ με τις πρωτεΐνες. Πριν την κατασκευή της κασέτας, όλα τα παραπάνω υλικά εμβαμπίστηκαν στο διάλυμα μεταφοράς και η υδρόφοβη μεμβράνη ενεργοποίησε τις θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών, καθώς ενυδατώθηκε για 1' σε μεθανόλη. Εφόσον απομακρύνθηκε κάθε φυσαλίδα στην περιοχή ανάμεσα στο τζελ και στη μεμβράνη που θα εμπόδιζε τη μεταφορά, η κασέτα σφραγίστηκε, τοποθετήθηκε στη συσκευή μεταφοράς και εφαρμόστηκε σταθερή τάση 30 V ολονυκτίως για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών.

#### Ανοσοανίχνευση στη μεμβράνη

Μετά το πέρας της διαδικασίας μεταφοράς, η μεμβράνη αφαιρέθηκε από την κασέτα και επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα 5x μη λιπαρού ξηρού γάλακτος (non fat dry milk), ώστε να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης με τα μόρια του γάλακτος. Έπειτα, η μεμβράνη ξεπλύθηκε από την περίσσεια του γάλακτος με μια σύντομη πλύση με TBST και επώαστηκε ολονύκτια στους 4°C με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αντίσωμα για γ-GCLc (Rabbit polyclonal IgG, #H2905, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), το αντίσωμα για την ACLY (Rabbit monoclonal, #ab40793, Abcam, 1:2000) και το αντίσωμα για το γονίδιο αναφοράς GAPDH (Mouse monoclonal HRP conjugate, #G9295, Thermo Scientific, 1:2000). Η δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος είναι αντιγο-ειδική, καθώς προσδένεται σε επιτόπους της πρωτεΐνης-στόχου. Την ολονύκτια επώαση ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST και στη συνέχεια η μεμβράνη υβριδοποιήθηκε με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα έχει την ικανότητα να

αναγνωρίζει και να συνδέεται με μη ειδικό τρόπο με το Fc τμήμα του πρωτογενούς αντισώματος. Ταυτόχρονα είναι συζευγμένο με το ένζυμο σήμανσης HRP (Horseradish Peroxidase), το οποίο αλληλοεπιδρώντας με το υπόστρωμά του προκαλεί αντιδράσεις χημειοφωταύγειας και επιτρέπει την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος στο φιλμ. Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε το δευτερογενές αντίσωμα Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (#31462, Thermo Scientific, 1:2000).

#### Εμφάνιση

Το τελικό βήμα της διαδικασίας Western Blot περιλαμβάνει την εμφάνιση του σήματος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος πάνω σε μπλε φιλμ ακτίνων X (Fuji Medical Film, X-ray Film, Jurus RX-N, Fujifilm Corporation, Minato-Ku, Tokyo, Japan). Για το σκοπό αυτό οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν από την περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος με 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST και έπειτα διατηρήθηκαν στο μίγμα ανίχνευσης ECL (Enhanced ChemiLuminescence) για 5' προκειμένου να αντιδράσει το ένζυμο HRP με το υπόστρωμα του. Το μίγμα ανίχνευσης (ECL 170-5060; BIO-RAD, United States) παρασκευάστηκε με τη χρήση 2 αντιδραστηρίων του κιτ σε ίση αναλογία, του υποστρώματος του HRP (Clarity Western Peroxide Reagent) και του ενισχυτή σήματος της αντίδρασης (Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent). Μετά το πέρας των 5' επώασης με το διάλυμα ECL, η μεμβράνη τοποθετήθηκε στην κασέτα εμφάνισης, μαζί με ένα ειδικό φιλμ που εφαρμόστηκε πάνω στη μεμβράνη και η κασέτα σφραγίστηκε για τον προβλεπόμενο χρόνο έκθεσης. Η διαδικασία έλαβε χώρα σε σκοτεινό θάλαμο και με τη χρήση ειδικής κασέτας που προστατεύει την έκθεση του φιλμ σε φως. Για να πραγματοποιηθεί η οπτικοποίηση του αποτελέσματος το φιλμ επώαστηκε υπό ανάδευση στα εξής διαλύματα για 10'' στο καθένα: διάλυμα εμφάνισης (Developer solution) - dH<sub>2</sub>O - μονιμοποιητής (Fixer solution) - dH<sub>2</sub>O. Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή των διαλυμάτων Developer και Fixer αγοράστηκαν από την εταιρεία Fujifilm Corporation. Τέλος, πραγματοποιήθηκε λήψη φωτογραφιών πάνω σε φωτεινή εστία.

#### Χορήγηση των οίνων στα κύτταρα και απομόνωση ολικού RNA

Για την μεταγραφική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με την τεχνική RT-PCR πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA με το PureLink™ RNA Mini Kit (12183018A; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) από κύτταρα Control και κύτταρα που έλαβαν τα εκχυλίσματα κρασιών σε συγκέντρωση 50 µg/ml έπειτα

από 24 ώρες επώασης. Το συνολικό RNA των κυττάρων απομονώθηκε από κύτταρα που είχαν προηγουμένως επιστρωθεί σε 6 well plate και για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 300 μl από το διάλυμα λύσης του kit, εμπλουτισμένα με 1% β-μερκαπτοαιθανόλη. Η διαδικασία απομόνωσης με κολώνες πραγματοποιήθηκε στον πάγο, σύμφωνα με τις οδηγίες του kit και το ολικό RNA αποθηκεύτηκε στους -80°C, μέσα σε νερό ελεύθερο από ένζυμα αποικοδόμησης του RNA.

### Ποσοτικοποίηση του συνολικού RNA των δειγμάτων

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop της Thermo Scientific. Ταυτόχρονα αξιολογήθηκε η καθαρότητα του RNA με τον υπολογισμό του OD260/280, ώστε να διαπιστωθεί η έλλειψη πρωτεϊνικής επιμόλυνσης. Η συγκέντρωση μετρήθηκε σε ng/μl και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο όγκος που απαιτείται από κάθε δείγμα, ώστε η τελική ποσότητα του RNA να είναι 1μg RNA για την κατασκευή του cDNA.

### Πέψη με DNAase

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα DNA που επηρεάζουν την καθαρότητα των δειγμάτων RNA, απαραίτητο προεκτελεστικό στάδιο πριν τη σύνθεση του cDNA είναι η πέψη με την ενδονουκλεάση DNase I. Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit (M6101; Promega Corporation, Madison, WI, USA). Εφόσον υπολογίστηκαν στα δείγματα τα μl που απαιτούνται για 1 μg ολικού RNA, προστέθηκε κατάλληλος όγκος ddH<sub>2</sub>O ώστε τα δείγματα να έχουν τελικό όγκο 8 μl. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το μίγμα της αντίδρασης πέψης (Mastermix), αποτελούμενο από ίση ποσότητα του ενζύμου της DNAase (RQ1 RNase-Free Dnase 1 x 1000U) και του διαλύματος της αντίδρασης (RQ1 DNase 10X Reaction Buffer 1 x 1mL). Η ποσότητα που προστέθηκε από το mastermix της αντίδρασης στα δείγματα ήταν 2 μl. Ακολούθησε επώαση 30' στους 37°C και στη συνέχεια προστέθηκε 1 μl από διάλυμα απενεργοποίησης της DNase (RQ1 DNase Stop Solution 1 x 1mL), ώστε να τερματιστεί η αντίδραση πέψης. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο.

## Σύνθεση cDNA

Το ολικό RNA μετατράπηκε σε cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του cDNA αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen της Thermo Fisher Scientific. Αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα για όλες τις αντιδράσεις, το οποίο περιείχε τυχαία εξαμερή (Random Primers, #48190-011) και μείγμα dNTP. Το μείγμα dNTP παρασκευάστηκε σε αναλογία 1:1:1 από το σετ αντιδραστηρίων των 4 νουκλεοτιδίων (dNTP Set 100 mM Solutions). Εφόσον το διάλυμα προστέθηκε στα δείγματα RNA, ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε και προστέθηκε στα δείγματα μείγμα αποτελούμενο από το 5x First Strand Buffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>] και το διάλυμα (DDT Dithiothreitol) και αντίστοιχα ακολούθησε επώαση για 2' στους 42 °C. Τέλος, προστέθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (SuperScript™ II Reverse Transcriptase) και τα δείγματα αφέθηκαν στους 42 °C για 50' ώστε να δράσει το ένζυμο και να κατασκευαστεί το ολικό cDNA και έπειτα διατηρήθηκαν για 15' στους 70 °C ώστε να πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση του ενζύμου. Τα αντιδραστήρια 5x First Strand Buffer, SuperScript™ II Reverse Transcriptase και DDT που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στο SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit (#18064-014) της Invitrogen. Μετά την τελευταία επώαση σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 40 μl ddH<sub>2</sub>O (τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων 17 ng/μl). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο και το νεοσυντιθέμενο cDNA φυλάχθηκε στους -20 °C. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Random Primers	1
dNTP mix (25 mM to καθένα)	1
5x First Strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 units)	1
total RNA	*
RNase Free dH <sub>2</sub> O	**

*Πίνακας 2. Τελικοί όγκοι και συγκεντρώσεις για μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με τις οδηγίες του kit \*Κατάλληλη ποσότητα RNA ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 1 μg \*\* Ποσότητα RNase Free dH<sub>2</sub>O για κάθε αντίδραση. Υπολογίστηκε για κάθε δείγμα με βάση τον τύπο VdH<sub>2</sub>O=8μl-VRNA*

Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Μετά το προκαταρκτικό βήμα της κατασκευής του cDNA, ακολούθησε η μεταγραφική ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων με τη ποσοτική μέθοδο RT-PCR. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης προετοιμάστηκε μίγμα για κάθε γονίδιο το οποίο περιείχε τους forward και reverse εκκινητές του υπό μελέτη γονιδίου, ddH<sub>2</sub>O και το μίγμα που περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική SYBR® Green I (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; A25742; Applied Biosystems™). Οι εκκινητές για τα γονίδια NFE2L2, GCLC και GAPDH χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0.25 μM, σε αντίθεση με το γονίδιο της ACLY που χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 0.12 μM. Οι εκκινητές για τα γονίδια NFE2L2, GCLC και GAPDH παραγγέλθηκαν από την εταιρεία Invitrogen ενώ οι εκκινητές για το γονίδιο της ACLY παραγγέλθηκαν από την εταιρεία VWR International. Η αλληλουχία των εκκινητών παρατίθεται στον **Πίνακα 3**. Ποσότητα ίση με 9 μl από το μίγμα κάθε γονιδίου διαμοιράστηκε στις θέσεις του πιάτο 96 θέσεων (96-well plate) και έπειτα προστέθηκε 1μl cDNA των δειγμάτων. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl. Οι συγκεντρώσεις κάθε συστατικού της αντίδρασης παρατίθενται στον **Πίνακα 4** και **Πίνακα 5**. Εφόσον απομακρύνθηκαν οι φυσαλίδες και το δείγμα περιορίστηκε στον πάτο των πηγαδιών του πιάτου με σύντομη φυγοκέντρηση, στη συνέχεια το πιάτο τοποθετήθηκε στο μηχάνημα CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System της Bio-rad, ώστε να λάβει χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το κυκλικό πρόγραμμα ενίσχυσης που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει έναν κύκλο αποδιάταξη της δίκλωνης μορφής του DNA και ενεργοποίησης της DNA πολυμεράσης στους 95 °C για 5' και στη συνέχεια 40 κύκλους ενίσχυσης του γονιδίου ενδιαφέροντος στους 95 °C για 15'' (αποδιάταξη), στους 60 °C για 30'' (υβριδοποίηση εκκινητών σε γονίδια στόχους) και στους 72 °C για 30'' (επέκταση εκκινητών από την DNA πολυμεράση για την σύνθεση θυγατρικών κλώνων). Το τελικό στάδιο διάστασης περιλαμβάνει την επώαση στους 95 °C για 1', στους 55 °C για 1' και πάλι στους 95 °C για 30'' για τον προσδιορισμό της καμπύλης τήξης. Οι σχετικές διαφορές στην έκφραση κάθε γονιδίου μεταξύ κυττάρων control και κυττάρων που έλαβαν κάθε ένα από τα 4 εκχυλίσματα κρασιού υπολογίστηκαν με τη συγκριτική μέθοδο Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), βάσει του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

## Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη στατιστική ανάλυση T-test για ανεξάρτητα δείγματα και με τη μέθοδο Mann-Whitney U. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και η παρουσίαση τους σε διαγράμματα πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.0. Για κάθε μία από τις διαφορετικές ποικιλίες, δεδομένα που συλλέχθηκαν από την στατιστική επεξεργασία μεταξύ 2 πληθυσμών (κυττάρων control και κυττάρων που έλαβαν το εκχύλισμα κρασιού), αναπαραστάθηκαν ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου όρου) και οι διαφορές που βρέθηκαν μεταξύ των πληθυσμών με  $P < 0.05$ , θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Γονίδια	Εκκινητές Forward/Reverse (5'-3')
NFE2L2	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
GCLC	ATCTGCCAAGGCGGCAAC ACTCCTCTGCAGCTGGCTC
ACLY	TGAGGAAGCATCCGGAGGTA TCCGATGATGGTCACTCCCT
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC TCCACGACATACTCAGCAC

Πίνακας 3 Forward και Reverse εκκινητές για τα γονίδια NFE2L2, GCLC, ACLY, GAPDH

Συστατικά για κάθε αντίδραση	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
2x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5	1x
Forward Primer 25 μM	0.1	0.25 μM
Reverse Primer 25 μM	0.1	0.25 Mμ
dH2O	3.8	
cDNA μήτρα (17ng/μl)	1	17 ng

Πίνακας 4 Υπολογισμένες ποσότητες και συγκεντρώσεις για μια αντίδραση RT-qPCR τελικού όγκου 10μl για τα γονίδια NFE2L2 και GCLC

Συστατικά για κάθε αντίδραση	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
2x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5	1x
Forward Primer 10 μM	0.12	0.12 μM
Reverse Primer 10 μM	0.12	0.12 μM
dH2O	3.76	
cDNA μήτρα (17ng/μl)	1	17 ng

Πίνακας 5 Υπολογισμένες ποσότητες και συγκεντρώσεις για μια αντίδραση RT-qPCR τελικού όγκου 10μl για το γονίδιο ACLY

## Αποτελέσματα

Επίδραση των ερυθρών και λευκών ποικιλιών στην έκφραση του μονοπατιού NRF2-KEAP1

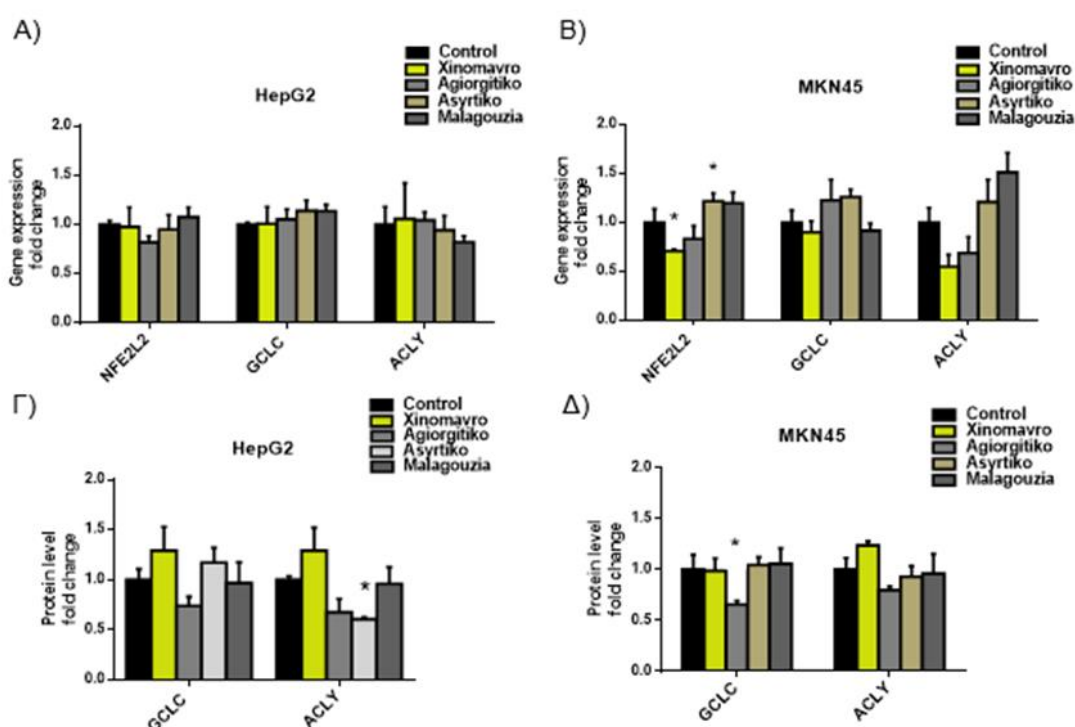
Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν από την μεταγραφική ανάλυση του NRF2 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές MKN45 και HepG2, παρουσιάζουν διαφορετική δράση των 4 ποικιλιών στις κυτταρικές σειρές. Στην καρκινική κυτταρική σειρά του ήπατος (HepG2), η επίδραση όλων των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  φαίνεται να άφησε ανεπηρέαστα τα μεταγραφικά επίπεδα του NRF2, εικοσιτέσσερις ώρες μετά την χορήγηση των οίνων. **(Εικόνα 5A)** Παράλληλα, στην κυτταρική σειρά MKN45 τα 2 από τα 4 εκχυλίσματα κρασιών έδειξαν ισχυρότερη δράση επηρεάζοντας τη μεταγραφή του NRF2 σε σχέση με τα κύτταρα Control, δηλαδή κύτταρα τα οποία δεν δέχθηκαν καμία παρέμβαση. Συγκεκριμένα, το γονίδιο NFE2L2, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NRF2 μειώνει τη μεταγραφική του δραστηριότητα ( $P < 0.05$ ) κατά περίπου 30%, έπειτα από τη χορήγηση της ερυθρής ποικιλίας Ξινόμαυρο. Εν αντιθέσει, η λευκή ποικιλία Ασύρτικο φαίνεται να δρα ενισχυτικά στο μονοπάτι NRF2-KEAP1, καθώς αυξάνει, αν και σε μικρό βαθμό, τη μεταγραφή του NRF2 ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με τα Control κύτταρα. Παρόλο που κόκκινες και λευκές ποικιλίες φαίνεται να ασκούν αντίστροφη δράση στα επίπεδα mRNA του NRF2 σε κύτταρα MKN-45, καθώς από το διάγραμμα παρατηρείται τα ερυθρά (Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο) να προκαλούν μείωση και τα λευκά (Ασύρτικο και Μαλαγουζιά) αύξηση, ωστόσο οι διαφορές που παρουσιάζουν οι ποικιλίες Αγιωργίτικο και Μαλαγουζιά είναι μη στατιστικά σημαντικές. **(Εικόνα 5B)**

Παράλληλα, η μεταγραφική έκφραση του GCLC ενός γονιδίου στόχου του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 δεν εμφανίζει μεταβολές στα κύτταρα HepG2, **(Εικόνα 5A)** έπειτα από την χορήγηση των 4 ποικιλιών. Η εικόνα αυτή διαφοροποιείται σε μικρό βαθμό μεταφραστικά, καθώς το Αγιωργίτικο προβάλλει ισχυρή τάση μείωσης της πρωτεΐνης GCLC ( $P = 0,06$ ) σε βαθμό περίπου 30% της συνολικής της έκφρασης των κυττάρων control. **(Εικόνα 5Γ)** Τα υπόλοιπα 3 κρασιά δεν έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα πρωτεΐνης του GCLC. **(Εικόνα 5Γ)** Στα MKN45, μικρές διακυμάνσεις στα μεταγραφικά επίπεδα του GCLC υπό την επίδραση των 4 οίνων είναι μη στατιστικά σημαντικές, **(Εικόνα 5B)** ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης GCLC μετά την χορήγηση Ξινόμαυρου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς είναι παρόμοια με αυτά του Control. **(Εικόνα 5Δ)** Το Αγιωργίτικο είναι η μοναδική ποικιλία που καταστέλλει μερικώς την έκφραση της πρωτεΐνης GCLC ( $P < 0.05$ ), με μια μείωση της τάξης

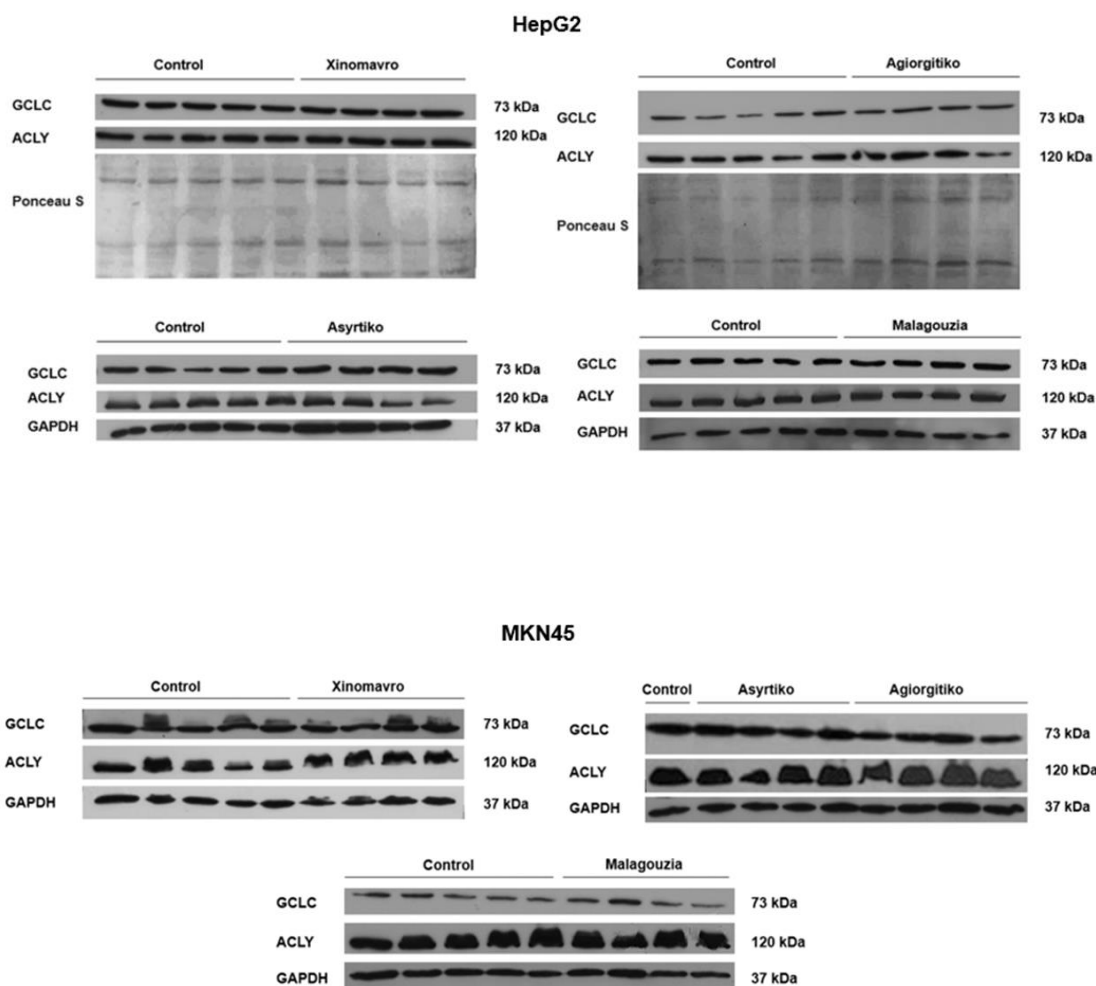
του 40%, **(Εικόνα 5Δ)** μια εικόνα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από κύτταρα HepG2 στα οποία είχε χορηγηθεί Αγιωργίτικο. **(Εικόνα 5Γ)**

Επίδραση των τεσσάρων ποικιλιών στην διαδικασία σύνθεσης λιπιδίων

Σε δεύτερη φάση, μελετήθηκε η έκφραση ενός εκ των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, της ATP-κιτρικής λυάσης (ATP-Citrate Lyase, ACLY) στις 2 κυτταρικές σειρές. Η μεταγραφική ανάλυση των επιπέδων της ACLY, 24 ώρες έπειτα από την χορήγηση των οίνων, έδειξε ισχυρή τάση μείωσης ( $P= 0,08$ ), της τάξεως του 40%, σε κύτταρα MKN45 τα οποία έλαβαν την ποικιλία Ξινόμαυρο σε σχέση με τα κύτταρα Control. **(Εικόνα 5B)** Ωστόσο, το Ξινόμαυρο δεν φάνηκε να είχε την ίδια επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της ACLY. **(Εικόνα 5Δ)** Οι μεταβολές της έκφρασης που προκάλεσαν οι υπόλοιπες 3 ποικιλίες σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές. **(Εικόνα 5B και 5Δ)** Ταυτόχρονα, στην καρκινική κυτταρική σειρά HepG2, ο μεταγραφικός ρυθμός του γονιδίου της ACLY δεν σημείωσε διαφορές ανάμεσα σε κύτταρα Control και στις 4 διαφορετικές ποικιλίες κρασιού **(Εικόνα 5A)**, μια εικόνα που διαφοροποιείται μεταφραστικά καθώς η πρωτεΐνη ACLY υποδιπλασιάζεται σε κύτταρα που έλαβαν την ποικιλία Ασύρτικο ( $P<0.05$ ). Εν αντιθέσει, οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν κατάφεραν να επηρεάσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης ACLY. **(Εικόνα 5Γ)**







**Εικόνα 5.** Επίδραση των εκχυλισμάτων κρασιού στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων και στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των λιπιδίων σε 2 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, στην καρκινική σειρά ήπατος HepG2 και στην γαστρική καρκινική σειρά MKN45. Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων-ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο mRNA (Α και Β) και πρωτεΐνης (Γ και Δ) σε κύτταρα που δεν έλαβαν εκχύλισμα (Control) και σε αυτά στα οποία χορηγήθηκε καθεμία από τις 4 διαφορετικές ποικιλίες (σε συγκεντρώσεις 50 µg/ml), μετά το πέρας 24 ωρών. Για την μελέτη διαφορών στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν 6 βιολογικές επαναλήψεις για τα Control κύτταρα και 5 για τα κύτταρα που πήραν εκχύλισμα από κάθε κρασί, κάθε μία από τις οποίες αναλύθηκε σε 2 πειραματικές επαναλήψεις. Αντίστοιχα, για τη μελέτη διαφορών στην πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις για τα control και 4 για τα κύτταρα που έλαβαν εκχύλισμα. Και στα 2 πειράματα τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Ο αστερίσκος (\*) δηλώνει στατιστική σημαντικότητα ( $P < 0.05$ ).

## Συζήτηση

Συνοψίζοντας, το οξειδωτικό στρες είναι το αποτέλεσμα της ανισορροπίας που προκαλείται όταν τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών ξεπερνούν κατά πολύ την ικανότητα του κυττάρου να τις εξουδετερώνει, προκαλώντας σοβαρές και σε πολλές περιπτώσεις μη επανορθώσιμες βλάβες που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο ή στην παθογένεση. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) αποτελούν την σημαντικότερη κατηγορία ελεύθερων ριζών και σχηματίζονται κυρίως ως παραπροϊόντα κρίσιμων μεταβολικών διαδικασιών του κυττάρου. Πρόκειται για μόρια ή άτομα ιδιαιτέρως ασταθή και ικανά να αντιδράσουν τόσο με άλλα μόρια προκαλώντας τον σχηματισμό περαιτέρω ελεύθερων ριζών είτε με βασικά μακρομόρια του κυττάρου όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες απειλώντας τόσο την ακεραιότητά τους, όσο και την λειτουργία τους. Το σουπεροξειδίο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο αποτελούν μερικές από τις πιο σημαντικές ROS που βρίσκονται στον οργανισμό.<sup>157</sup> Η προέλευση των ROS μπορεί να είναι τόσο ενδογενής όσο και εξωγενής. Εξωτερικοί παράγοντες όπως τα φάρμακα, οι τοξίνες, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, ο καπνός του τσιγάρου, η ιονίζουσα ακτινοβολία και άλλα όταν εισαχθούν στον οργανισμό μπορούν να δράσουν είτε λειτουργώντας τα ίδια ως ελεύθερες ρίζες, είτε γεννώντας ελεύθερες ρίζες μέσα στον οργανισμό. Ταυτόχρονα, μέσα στον οργανισμό υπάρχουν πολλά μεταβολικά μονοπάτια όπου οι ROS εμφανίζονται είτε ως παραπροϊόντα, είτε ως σηματοδότες κυτταρικών λειτουργιών.<sup>38</sup> Το πιο γνωστό από αυτά είναι κυτταρική αναπνοή που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια όπου οι ROS προκύπτουν από τη διαρροή ηλεκτρονίων της μιτοχονδριακής αλυσίδας.<sup>51</sup> Μπορεί τα μιτοχόνδρια να αποτελούν την κυριότερη πηγή ROS, ωστόσο το κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα υπεροξειδοσώματα αποτελούν επίσης κυτταρικά διαμερίσματα όπου οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια κρίσιμων κυτταρικών λειτουργιών, όπως για παράδειγμα ο καταβολισμός των πουρινών ή η αναδίπλωση πρωτεϊνών. Σε μικρές ποσότητες οι ROS είναι απαραίτητα για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού καθώς εμπλέκονται σε κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες.<sup>91</sup> Συγκεκριμένα, στο ανοσοποιητικό σύστημα δρουν ενισχυτικά έπειτα από την εισβολή από παθογόνο μεσολαβώντας στην εξαρτώμενη από οξυγόνο θανάτωσή του μέσα στα φαγοκύτταρα, μια διαδικασία που ονομάζεται οξειδωτική έκρηξη<sup>49</sup>. Ταυτόχρονα, οι ROS συμμετέχουν στην διαδικασία «φόρτωσης» των μικροβιακών θραυσμάτων σε μόρια MHC I με σκοπό την αντιγονοπαρουσίαση τους στα T κυτταροτοξικά κύτταρα.<sup>70</sup> Η δράση τους στο ΚΝΣ είναι επίσης πλειοτροπική καθώς αφενός οξειδώνουν μόρια διακόπτες της νευρωνικής διαβίβασης ενισχύοντας τη διάρκεια της αλλά αφετέρου συμμετέχουν στην νευρογένεση και

στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και στην ενίσχυση της πλαστικότητας των νευρώνων σε περιοχές του εγκεφάλου σημαντικές για την αποθήκευση πληροφοριών, όπως ο υπόκαμπος. Επιπρόσθετα, άμεσα συνδεδεμένη με την παραγωγή ROS είναι η διαδικασία της γήρανσης, η οποία αποδίδεται στη σταδιακή αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών λόγω σταδιακής δυσλειτουργίας της μιτοχονδριακής λειτουργίας που προκαλείται με την πάροδο των χρόνων.<sup>27</sup> Η παρουσία χαμηλών επιπέδων ROS, ακόμα, δρα ενισχυτικά στην συστολή των σκελετικών μυών και στην παραγωγή μυϊκής δύναμης. Εν αντιθέσει, η υπέρμετρη παραγωγή ROS και οι υποκείμενες βλάβες σε βασικά βιολογικά μακρομόρια έχουν συσχετιστεί με πληθώρα ασθενειών όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης τύπου 2, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και ο καρκίνος. Ο οργανισμός προκειμένου να αμυνθεί απέναντι στις ελεύθερες ρίζες έχει ένα οπλοστάσιο ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών καθώς και συστατικών με αντιοξειδωτικές ικανότητες που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής του. Τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται σε πολύ μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τα οξειδωτικά μόρια και δρουν καταστέλλοντας την δράση τους είτε περιορίζοντάς την. Μία από τις πιο γνωστές αντιοξειδωτικές οδούς του κυττάρου είναι το μονοπάτι NRF2-KEAP1. Ο NRF2 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος συγκρατείται κυτταροπλασματικά από την πρωτεΐνη καταστολέα KEAP1 και απελευθερώνεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες με σκοπό την μεταγραφή κρίσιμων για το κύτταρο αντιοξειδωτικών γονιδίων. Μερικά γονίδια-στόχοι που υποστηρίζουν άμεσα ή έμμεσα τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό είναι η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (SOD1), η οξυγενάση της αίμης (OH), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και γονίδια τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης (GCLC, GCLM, GSS), ενός μη ενζυμικού ενδογενούς αντιοξειδωτικού μορίου.<sup>74</sup>

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στο πεδίο της οξειδοαναγωγικής βιολογίας έχει στραφεί γύρω από τα φυσικά προϊόντα και τον προστατευτικό τους ρόλο σε ασθένειες, λόγω της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού.<sup>90</sup> Συστατικά που προέρχονται από φυσικά προϊόντα μπορούν να δράσουν είτε άμεσα εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες μέσα στον οργανισμό, είτε έμμεσα επάγοντας την έκφραση του μονοπατιού NRF2-KEAP1 και τη μεταγραφή του αντιοξειδωτικού ρεπερτορίου του κυττάρου.<sup>158</sup> Οι πολυφαινόλες είναι μια κατηγορία φυσικών συστατικών γνωστή για τον αντιοξειδωτικό τους ρόλο και για την προστασία που παρέχουν έναντι πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά, ο διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Βρίσκονται σε πολλά είδη λαχανικών, φρούτων, δημητριακών και ποτών και διεκπεραιώνουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή επαγωγή της απόπτωσης,

ρύθμιση της δράσης των οιστρογόνων, η ρύθμιση της φλεγμονής, ενίσχυση του ανοσοποιητικού, πρόληψη των βλαβών του οξειδωτικού στρες μέσω της εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών και επαγωγή της έκφρασης κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων του οργανισμού.<sup>159</sup>

Τα κρασιά θεωρούνται σημαντική πηγή πολυφαινολών με κυριότερες από αυτές τις φλαβονόλες (π.χ κερκετίνη), τις φλαβονόλες (π.χ κατεχίνη, γαλλική επικατεχίνη, επικατεχίνη) και τις ανθοκυανίνες οι οποίες βρίσκονται στα κόκκινα κρασιά και τους δίνουν το χαρακτηριστικό τους χρώμα.<sup>160</sup> Η σύνθεση και η ποσότητα των πολυφαινολικών συστατικών στα κρασιά εξαρτάται από την ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευση, τον τρύγο, την ωρίμανση του σταφυλιού, και τις συνθήκες οινοποίησης και αποθήκευσης του κρασιού.<sup>159</sup> Στην βιβλιογραφία υπάρχουν εκατοντάδες μελέτες που αναδεικνύουν την ικανότητα κρασιών διάφορων ποικιλιών, να ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση *in vitro*, μια ιδιότητα που συσχετίστηκε με θετικά με το πολυφαινολικό τους φορτίο.<sup>160-164</sup> Μερικές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της ικανότητας των κρασιών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να λειτουργούν ως αναγωγικοί παράγοντες είναι οι μέθοδοι DDPH2 (2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Superoxide και FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Οι πρώτες 3 τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα των δειγμάτων κρασιών να εξουδετερώνουν τις εμπορικές και ενδογενείς ελεύθερες ρίζες, ενώ η τελευταία μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα των δειγμάτων να ανάγουν τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ .<sup>165,166</sup> Ως επί το πλείστον, οι παραπάνω μέθοδοι συνοδεύονται από ανάλυση του ολικού πολυφαινολικού φορτίου των κρασιών με την διαδεδομένη μέθοδο Folin-Ciocalteu's, με το μεγαλύτερο ποσοστό να βρίσκεται στους κόκκινους οίνους, έπειτα στους ροζέ και τέλος στους λευκούς.<sup>167</sup>

Η παρούσα μελέτη βασισμένη σε δεδομένα από προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας πάνω στην αντιοξειδωτική ικανότητα των 4 ποικιλιών κρασιού *in vitro* (Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά), καθώς και στην σύγχρονη βιβλιογραφία επεκτείνει την υπάρχουσα γνώση εκτιμώντας την επίδραση των 4 ποικιλιών στην επαγωγή της έκφρασης κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με δημοσιευμένη μελέτη του εργαστηρίου μας και οι 4 ποικιλίες έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro*. Συγκεκριμένα, η ερυθρή ποικιλία Αγιωργίτικο η οποία παρουσίασε και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο έδειξε ισχυρότερη δράση έναντι των τεσσάρων στην εξουδετέρωση της ενδογενούς ρίζας σουπεροξειδίου και στην πρόληψη βλαβών που προκαλούνται από τη ρίζα περοξυλίου ( $ROO^*$ ). Ταυτόχρονα, η ερυθρή ποικιλία Ξινόμαυρο με το αμέσως υψηλότερο πολυφαινολικό φορτίο εμφάνισε παρόμοια ικανότητα

εξουδετέρωσης των ριζών ABTS και DPPH\* με το Αγιωργίτικο, αλλά αυξημένη ικανότητα αναγωγικής ισχύος από το προηγούμενο. Οι 2 λευκές ποικιλίες έδειξαν χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλες τις μεθόδους από τις ερυθρές ποικιλίες, με την Μαλαγουζιά να εμφανίζεται ως λιγότερο δραστική σε σχέση με το Ασύρτικο. Παραδόξως, τα αποτελέσματα από την τεχνική σάρωσης της ρίζας OH\* έδειξαν το Ασύρτικο ως ισχυρότερο σαρωτή όλων, με τις ποικιλίες Ξινόμαυρο, Μαλαγουζιά και Αγιωργίτικο να ακολουθούν με φθίνουσα σειρά δραστικότητας. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί πως πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών και των 4 ποικιλιών με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με φασματοσκοπία μάζας (UHPLC-ESI-TripleTOF-HRMS).<sup>161</sup>

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω αποτελέσματα και τα αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου μας που προέκυψαν από μελέτες κυτταροτοξικότητας με τη χρήση της μεθόδου ΧΤΤ και από μελέτες εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου με την μέτρηση των επιπέδων ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής, επιλέχθηκε η μη κυτταροτοξική δόση των 50μg/ml για όλους του οίνους ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητά τους να επάγουν την έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2-KEAP1 και να επάγουν την έκφραση ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της γλουταθειόνης. Ο τρόπος δράσης των πολυφαινολών με βάση αυτά που γνωρίζουμε μέχρι τώρα, έγκειται στη δυνατότητά τους να αλληλοεπιδρούν, όταν βρίσκονται στην οξειδωμένη τους μορφή, με κυστεϊνικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης KEAP1, μια πρωτεΐνη καταστολέα του μεταγραφικού παράγοντα NRF2. Η οξείδωση των κυστεϊνικών καταλοίπων συνεπάγεται αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της KEAP1, αποδέσμευσης του παράγοντα, μετακίνησής του στον πυρήνα και μεταγραφής των κατάντη γονιδίων-στόχων.

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης έρευνας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά του ήπατος HepG2 και η γαστρική καρκινική κυτταρική σειρά MKN45, στις οποίες χορηγήθηκαν οι 4 διαφορετικές ποικιλίες. Έπειτα, υπολογίστηκε η διαφορά της έκφρασης των γονιδίων NFE2L2 (NRF2) και GCLC σε επίπεδο μεταγραφής, ανάμεσα σε κύτταρα που δεν υπέστησαν καμία παρέμβαση και σε κύτταρα που έλαβαν 50 μg/ml από κάθε μία από τις 4 ποικιλίες. Αρχικά, αξιολογήθηκε η επίδραση των οίνων στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των αντιοξειδωτικών γονιδίων, και στη GCLC, μια πρωτεΐνη-στόχο του NRF2 που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, 24 ώρες μετά την χορήγηση των εκχυλισμάτων στο

καλλιεργητικό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν πως στην κυτταρική σειρά HepG2 η δόση των 50 µg/ml ήταν ανίκανη να προκαλέσει μεταβολές στη μεταγραφή, καθώς τα επίπεδα mRNA των παραπάνω γονιδίων παρέμειναν ανεπηρέαστα και από τις 4 ποικιλίες. Αντίθετα, η κυτταρική σειρά MKN45 φαίνεται να επηρεάστηκε περισσότερο από τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα κρασιών που της χορηγήθηκαν, καθώς το Χινόμαυρο και το Ασύρτικο κατάφεραν να επηρεάσουν την έκφραση του γονιδίου NFE2L2. Συγκεκριμένα, η ερυθρή ποικιλία Ξινόμαυρο, η οποία υπερτερεί σε πολυφαινολικό φορτίο σε σχέση με τη λευκή ποικιλία Ασύρτικο, κατάφερε να μειώσει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα σε μεταγραφικό επίπεδο κατά περίπου 30%, ενώ αντίστοιχα το Ασύρτικο λειτούργησε ενισχυτικά αυξάνοντας σε μικρό βαθμό τα επίπεδα της μεταγραφής του NFE2L2. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μεταγραφική ανάλυση του NRF2, ακολούθησε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου GCLC μεταγραφικά και μεταφραστικά για τα 4 κρασιά, διατηρώντας ίδιες τις συγκεντρώσεις και το χρόνο επώασης των κυττάρων με τα εκχυλίσματα κρασιών. Μεταγραφικά οι ερυθροί και οι λευκοί οίνοι δεν κατάφεραν να επηρεάσουν το γονίδιο GCLC και στις 2 κυτταρικές σειρές. Η μόνη μεταβολή που παρατηρήθηκε προκλήθηκε στην ποσότητα της πρωτεΐνης GCLC από την ερυθρή ποικιλία Αγιωργίτικο, η οποία παραδόξως μείωσε την GCLC στα κύτταρα MKN45 και έδειξε και μια ισχυρή τάση μείωσης της ίδιας πρωτεΐνης ( $P=0.06$ ) στα HepG2 κύτταρα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη δεν δίνουν την αναμενόμενη εικόνα που προκύπτει από άλλες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν την δράση των πολυφαινολών στην έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων σε καρκινικές και μη σειρές μέσω του μονοπατιού NRF2-KEAP1. Σύμφωνα με τη μελέτη της Nunes και των συνεργατών της πάνω στην επίδραση ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού στην ενεργοποίηση του μονοπατιού NRF2 και τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του στην καρκινική κυτταρική σειρά του κόλονος HT-29, παρατηρείται αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων τόσο του GCLC όσο και της HO-1, 18 και 24 ώρες αντίστοιχα μετά την χορήγηση του κρασιού στην μη κυτταροτοξική συγκέντρωση των 600 µg/ml. Αύξηση, επίσης, παρατηρείται και στα επίπεδα της πρωτεΐνης της HO-1 και στα ενδογενή ποσοστά GSH στα κύτταρα που έλαβαν κρασί σε σχέση με τα Control κύτταρα, μετά από 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα στην ίδια συγκέντρωση. Όσο αφορά την έκφραση της αρχικής πρωτεΐνης του μονοπατιού, του παράγοντα NRF2, εκεί αναλύθηκε το πυρηνικό κλάσμα του NRF2 στις 8 ώρες επώασης με το εκχύλισμα, όπου παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα της πυρηνικής πρωτεΐνης σε σχέση με κύτταρα Control. Αξίζει να σημειωθεί πως στη συγκεκριμένη μελέτη έρευνα δεν εξετάστηκαν διαφορές στα επίπεδα μεταγραφής του NRF2, αλλά μελετήθηκε ο

κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, ο οποίος βρέθηκε αυξημένος στον πυρήνα έπειτα από τη δράση του οίνου.<sup>168</sup>

Σε παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το Πανεπιστήμιο της Κορέας, χρησιμοποιήθηκαν 50 μg/ml εκχυλίσματος κίτρινου κρασιού, μια ποικιλία που παράγεται από το κίτρινο ρύζι, τα οποία χορηγήθηκαν σε κυτταρική σειρά μυοβλαστών (H9C2) για 24 ώρες με και χωρίς την προκατεργασία των κυττάρων με δοξορουβικίνη, έναν χημειοθεραπευτικό παράγοντα που προκαλεί τοξικότητα μέσω ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ίδια επίπεδα πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εντοπισμού της πρωτεΐνης NRF2 μεταξύ Control κυττάρων και κυττάρων που τους χορηγήθηκε το πολυφαινολικό εκχύλισμα κρασιού. Αντιθέτως, η υψηλότερη πυρηνική μετατόπιση και ταυτόχρονη κυτταροπλασματική μείωση παρατηρήθηκε στα κύτταρα τα οποία έλαβαν τον προοξειδωτικό παράγοντα, γεγονός που υποδηλώνει οι ROS είναι ισχυρότερος επαγωγέας του μονοπατιού σε σχέση με τα φυτοχημικά συστατικά.<sup>169</sup> Ίσως αυτή η εκτίμηση να εξηγούσε το μικρό μέγεθος των μεταβολών που προκάλεσαν οι πολυφαινόλες κρασιού στα κύτταρα, ελλείψει προοξειδωτικού παράγοντα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της βιβλιογραφίας που αφορά την ενεργοποίηση της NRF2 σηματοδότησης από τις πολυφαινόλες εξετάζει την πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα, ενώ λίγες είναι οι αναφορές που μελετούν τα επίπεδα έκφρασης του ολικού κλάσματος της πρωτεΐνης του NRF2. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια τα οποία λάμβαναν για 30 μέρες πολυφαινολικά πολυμερή μαύρου τσαγιού διαλυμένα μέσα στο πόσιμο νερό τους, παρατηρήθηκε πως τα συνολικά επίπεδα πρωτεΐνης του παράγοντα NRF2 αυξήθηκαν σημαντικά στους πνευμονικούς και ηπατικούς ιστούς των ζώων, σε αντίθεση με τα μεταγραφικά επίπεδα της πρωτεΐνης, τα οποία έμειναν ανεπηρέαστα. Ταυτόχρονα, στην ίδια μελέτη εκτιμήθηκε και η ικανότητα του πολυφαινολικού σκευάσματος να προκαλεί μεταφραστικές τροποποιήσεις στον μεταγραφικό παράγοντα οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την σταθερότητά του. Όντως, παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων του παράγοντα σε ιστούς ήπατος και πνεύμονα, μια τροποποίηση που βοηθά στην σταθερότητα του NRF2 και στην απελευθέρωσή του από την Keap1. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η φωσφορυλίωση του παράγοντα είναι αποτέλεσμα της δράσης συγκεκριμένων κινασών του κυττάρου όπως για παράδειγμα η PI3 κινάση η οποία ενεργοποιήθηκε στους πνευμονικούς ιστούς σε ζώα τα οποία έλαβαν το πολυφαινολικό σκεύασμα μαύρου τσαγιού.<sup>170</sup>

Με βάση λοιπόν, τις υπάρχουσες έρευνες και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έχουν προταθεί δύο πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες επιδρούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού NRF2-KEAP1. Και στους 2 προτεινόμενους μηχανισμούς η

ενεργοποίηση του μονοπατιού από τις πολυφαινόλες δεν σχετίζεται με αύξηση του μεταγραφικού ρυθμού του NRF2 αλλά στην αύξηση της σταθερότητάς του και της μετατόπισής του στον πυρήνα. Ο πρωταρχικός και πιο μελετημένος μηχανισμός ο οποίος έχει ήδη αναφερθεί είναι η αποδέσμευση του από την KEAP1 μέσω της οξειδωτικής τροποποίησης των καταλοίπων της πρωτεΐνης καταστολέα από τις πολυφαινόλες. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του NRF2, με πιο γνωστή την φωσφορυλίωση του παράγοντα, οι οποίες ενισχύουν την αποδέσμευσή του από την KEAP1, την αποφυγή της αποικοδόμησής του και την μετατόπισή του στον πυρήνα. Φυσικά, πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω πειραματικές μελέτες που να υποστηρίζουν την συσχέτιση συγκεκριμένων κινασών και άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου με τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις του NRF2, με τρόπο εξαρτώμενο από τις πολυφαινόλες. Για να συμβεί αυτό πρέπει να εξεταστούν και άλλα πιθανά μονοπάτια που επηρεάζονται από τις πολυφαινόλες και μπορούν να ρυθμίσουν την NRF2-KEAP1 οδό.

Μια δεύτερη παράμετρος που πρέπει να εξεταστεί είναι ο χρόνος απόκρισης του μονοπατιού στη δράση των πολυφαινολών. Και εκεί τα αποτελέσματα είναι άμεσα συσχετισμένα με τη σύσταση του πολυφαινολικού προϊόντος. Προγενέστερη έρευνα του εργαστηρίου μας, η οποία αξιολογούσε διαφορετικά πολυφαινολικά εκχυλίσματα καφέ με βάση την επιρροή τους στο NRF2-KEAP1 μονοπάτι σε μυοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, απέδειξε ότι η τα διαφορετικά εκχυλίσματα ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό χρόνο την μεταγραφή του παράγοντα NRF2, όσο και των κατάντη γονιδίων στις 2 κυτταρικές σειρές.<sup>171</sup> Συγκεκριμένα, οι καρβουδισμένοι κόκκοι καφέ σε συγκέντρωση 400 µg/ml φαίνεται να αφήνουν ανεπηρέαστα τα επίπεδα mRNA του NRF2 και γονιδίων όπως *cat*, *txn* *hmox1* σε κύτταρα μυοβλαστών, έπειτα από 3, 12 και 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα. Ταυτόχρονα, όμως, παρατηρείται εκλεκτική αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων κυρίως έπειτα από 12 και 24 ώρες, όπως για παράδειγμα των γονιδίων *gclc*, *hqr1*, *grx1* *gsta2*, ενώ μερική καταστολή σημειώνεται στην έκφραση του γονιδίου *sod* έπειτα από 12 ώρες επώασης με το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα πράσινων κόκκων καφέ έφερε τα αντίθετα αποτελέσματα στην μεταγραφή του ρεπερτορίου των γονιδίων στόχων του NRF2, όπου παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων *sod1* στις 24 ώρες, *hmox1* στις 3 ώρες, *nrf2* στις 12 ώρες, *gsr* στις 12 και στις 24 ώρες, του *grx1* στις 3 ώρες και του *gsta2* στις 24 και 4 ώρες αντίστοιχα. Η εικόνα στα ενδοθηλιακά κύτταρα άλλαξε για το εκχύλισμα καβουρδισμένου καφέ σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Εκεί, παρατηρήθηκε σοβαρή μείωση των μεταγραφικών επιπέδων για το *nrf2*. Ακόμα, βρέθηκαν γονίδια που η έκφρασή τους τριαπλασιάζεται, όπως το *gclc* στις 12 ώρες και το *hqr1* στις 12 και 24 ώρες,



γονίδια που έκφρασή τους εκτοξεύεται και στις 3 χρονικές στιγμές όπως το *gsr* και γονίδια που η έκφραση τους καταστέλλεται και στις 3 χρονικές στιγμές όπως το *gpx1*. Την ίδια στιγμή, το εκχύλισμα πράσινων κόκκων καφέ στην ίδια συγκέντρωση φαίνεται να επηρέασε το μονοπάτι σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, αυξάνοντας τη μεταγραφή του *nrf2* γονιδίου περίπου 2.5 φορές, *gpx1* γονιδίου κατά 4 φορές και μειώνοντας κατά πολύ τη μεταγραφή του *gclc* και του *txn1*.

Αυτό που γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, είναι ότι διαφορετικές κυτταρικές σειρές, καρκινικές και μη, μπορούν να αποκριθούν με διαφορετικό τρόπο στο ίδιο εκχύλισμα κρασιού και στην ίδια συγκέντρωση, αυξάνοντας, μειώνοντας είτε αφήνοντας αναλλοίωτη την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων του μονοπατιού. Ακόμα, ο παράγοντας χρόνος σχετίζεται με το ρυθμό μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων του μονοπατιού. Επομένως πρέπει να εξεταστούν περισσότερα χρονικά σημεία και περισσότερα γονίδια του μονοπατιού προκειμένου να ληφθεί σαφή εικόνα για τη δράση των οίνων στο αντιοξειδωτικό μονοπάτι. Επιπρόσθετα, παρατηρείται διαφορική απόκριση της ίδιας κυτταρικής σειράς στις 4 ποικιλίες κρασιού, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική πολυφαινολική σύσταση των κρασιών. Συγκεκριμένες κατηγορίες φαινολών μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων της οδού, προκαλώντας την πυρηνική μετατόπιση του NRF2. Περαιτέρω πειράματα απαιτούνται προκειμένου να διαπιστωθεί ο μηχανισμός δράσης των διαφορετικών υποκατηγοριών των πολυφαινολών που βρίσκονται στους οίνους και τα γονίδια της οδού που επηρεάζουν.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων δημοσιευμένων εργασιών, και στις 2 μελέτες του εργαστηρίου μας πάνω σε εκχυλίσματα κρασιών και σε εκχυλίσματα καφέ διαπιστώθηκε πως ορισμένα πολυφαινολικά εκχυλίσματα μπορούν να επηρεάσουν μεταγραφικά τον NRF2 σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές και χρονικά σημεία, δεν διαφαίνεται, ωστόσο, σαφής θετική ή αρνητική συσχέτιση των μεταγράφων του και των μεταγράφων των γονιδίων στόχων του παράγοντα. Για να μπορέσει να δοθεί εξήγηση σε αυτή την παρατήρηση πρέπει να μελετηθούν εκτενέστερα οι οδοί που συμμετέχουν στη μεταγραφή του NRF2. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στον υποκινητή του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα υπάρχει περιοχή ARE, η ίδια περιοχή στην οποία προσδένεται ο NRF2 για να εκκινήσει τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων του κυττάρου. Με βάση τον παραπάνω θετικό μηχανισμό ανάδρασης, είναι πιθανό η αυξημένη πρωτεϊνική συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα στο πυρήνα λόγω της δράσης των πολυφαινολών να οδηγεί σε πρόσδεση του NRF2 στον δικό του υποκινητή, επηρεάζοντας έτσι την μεταγραφή του. Το γεγονός αυτό θα εξηγούσε μια πιθανή αύξηση των μεταγράφων του. Τα αποτελέσματα όμως πέρα από

αύξηση, δείχνουν και μείωση των μεταγράφων του παράγοντα. Είναι λοιπόν χρήσιμο να γίνει περαιτέρω διερεύνηση των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην μεταγραφή του NRF2 και στην αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με αυτούς. Είναι γεγονός πως οι παράγοντες NF-κΒ, AhR-ARNT, ATF4 και πολλοί ακόμα μεταγραφικοί παράγοντες και συμπάραγοντες δρουν συνεργιστικά στην έκφραση του NRF2 και ορισμένοι από αυτούς φαίνεται να ενεργοποιούνται ή να καταστέλλονται από τις πολυφαινόλες.<sup>139</sup> Μελέτες υποστηρίζουν πως πολυφαινολικά στοιχεία όπως η επιγαλλοκατεχίνη, η ρεσβερατρόλη, η κουρκουμίνη, η λουτεολίνη και η κερκετίνη αποτελούν αναστολείς του NF-κΒ ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας AhR φαίνεται να ενεργοποιείται εκλεκτικά από κάποιες πολυφαινόλες (ρεσβερατρόλη) και να απενεργοποιείται από άλλες (απιγενίνη).<sup>172,173</sup>

Πέραν της διερεύνησης του μηχανισμού ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 από τα συστατικά του κρασιού, είναι απαραίτητο να μελετηθεί εκτενώς η αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων στις πολυφαινόλες, μέσω της έκφρασης κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων. Αν και βιβλιογραφικά υπάρχουν πολλές αναφορές που υποστηρίζουν την αύξηση της έκφρασης του αντιοξειδωτικού ρεπερτορίου των κυττάρων από τα πολυφαινολικά σκευάσματα, ωστόσο και οι 2 μελέτες του εργαστηρίου μας υποδεικνύουν και αντίστοιχες μειώσεις στα επίπεδα mRNA των γονιδίων αλλά και των πρωτεϊνών του μονοπατιού. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε χοίρους οι οποίοι λάμβαναν διατροφικών συμπλήρωμα στεμφύλων και σπόρων σταφυλιού για 4 εβδομάδες.<sup>174</sup> Αποτελέσματα που πάρθηκαν από το δωδεκαδάκτυλο των ζώων έδειξαν μειωμένη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και NRF2 στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταγραφή τους. Σημαντική ήταν η καταστολή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων GPX1, NQO1, PRDX6, SOD1 και TXNRD1. Μια πιθανή εξήγηση της καταστολής της έκφρασης των εν λόγω ενζύμων έγκειται στην ιδιότητα των πολυφαινολών να εξουδετερώνουν άμεσα τις ROS. Είναι γνωστό πως το μονοπάτι NRF2-KEAP1 ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες, από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και από ξενοβιοτικές ουσίες, όπως είναι οι φυτοχημικές ενώσεις. Μια απευθείας μείωση των επιπέδων των ROS από τις πολυφαινόλες θα μπορούσε να μειώσει τη συγκέντρωση των ROS στον οργανισμό και να καταστείλει το αντιοξειδωτικό μονοπάτι. Το συμπέρασμα αυτό που παρατηρήθηκε *in vivo* πιθανώς θα εξηγούσε και τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας που πάρθηκαν πάνω σε κυτταρικές σειρές. Παρόλου που τα κόκκινα κρασιά Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο θεωρούνται ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από το Ασύρτικο και τη Μαλαγουζιά *in vitro*, το Ξινόμαυρο ελάττωσε τη μεταγραφή του NRF2 στα MKN45 και το Αγιωργίτικο μείωσε τα επίπεδα της GCLC και στις 2 κυτταρικές σειρές. Εν

αντιθέσει, το Ασύρτικο ενίσχυσε τα επίπεδα mRNA του NRF2 στα MKN45. Πιθανώς, μια άμεση ισχυρή εξουδετέρωση των ROS από τους ερυθρούς οίνους οδήγησε στην καταστολή του μονοπατιού.

Σε μια δεύτερη φάση πειραμάτων, η έρευνα στράφηκε γύρω από την εκτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων κρασιών στη βιοσύνθεση των λιπιδίων και συγκεκριμένα στη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου ACLY σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Η ACLY συμμετέχει στο πρώτο βήμα της σύνθεσης των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης.<sup>150</sup> Όπως είναι γνωστό, ο μεταβολισμός των λιπιδίων είναι μια κρίσιμη διαδικασία για το κύτταρο και αφορά διαδικασίες σύνθεσης, αποθήκευσης και καταβολισμού των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.<sup>175</sup> Δεδομένα προηγούμενων δημοσιεύσεων υποστηρίζουν την ρύθμιση σταδίων του μεταβολισμού των λιπιδίων από τις ROS και από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2.<sup>153</sup> Συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης-καταστολέα Kear1 στα οποία χορηγήθηκαν τριπεπτένια ως επαγωγείς του NRF2, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα οδήγησε σε μειωμένη έκφραση τριών γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε ηπατικά κύτταρα: της ATP-κιτρικής λυάσης (ATP-Citrate Lyase, ACLY), της συνθάσης λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthase, FAT) και της στεαρούλο-CoA δεσατουράσης-1 (stearoyl CoA desaturase, SCD-1).<sup>149</sup> Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως ποντίκια τα οποία έχουν υποστεί καταστολή της έκφρασης του παράγοντα NRF2, είναι επιρρεπή στη στεάτωση (συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ), υποδηλώνοντας μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης του παράγοντα και της βιοσύνθεσης λιπιδίων.<sup>176-178</sup> Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης έδειξαν πως η ποικιλία Ξινόμαυρο παρουσιάζει μια ισχυρή τάση μείωσης των μεταγράφων της ACLY στην καρκινική κυτταρική σειρά MKN45 (P=0,0823), χωρίς όμως αυτή η μεταβολή να μεταφράζεται και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Παράλληλα, παρατηρείται μείωση της πρωτεΐνης ACLY στα HepG2 κύτταρα έπειτα από τη χορήγηση της ποικιλίας Ασύρτικο, χωρίς ταυτόχρονη ελάττωση της μεταγραφής. Τα παραπάνω δεδομένα συμπίπτουν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που υποστηρίζει την κατασταλτική δράση των πολυφαινόλων στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση λιπιδίων. Ένας πιθανός τρόπος δράσης αφορά την καταστολή της έκφρασης του SREBP-1c μεταγραφικού παράγοντα από τις πολυφαινόλες, ενός παράγοντα που συμμετέχει στη σύνθεση λιπιδίων.<sup>179,180</sup> Ωστόσο, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα προκειμένου να διευκρινιστούν εκτενώς οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες επηρεάζουν τη συγκεκριμένη οδό, καθώς και η αλληλεπίδραση του NRF2 με το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των λιπιδίων.

Ολοκληρώνοντας, παρά την έντονη ερευνητική δραστηριότητα των τελευταίων χρόνων γύρω από τα φυτοχημικά συστατικά και την εμπλοκή τους στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού, δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν να επηρεάσουν το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού. Τα αποτελέσματα από τις υπάρχουσες μελέτες πάνω στις πολυφαινόλες που προέρχονται από το κρασί προδίδουν ενίσχυση και καταστολή του μονοπατιού NRF2-KEAP1 με τρόπο που εξαρτάται από τη διάρκεια δράσης των πολυφαινολών, την κατηγορία τους, τον ιστό που επιδρούν και άλλα. Ακόμα, περεταίρω διερεύνηση απαιτεί και ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του NRF2 μεταγραφικού παράγοντα, των πολυφαινολών του κρασιού και του μονοπατιού βιοσύνθεσης λιπιδίων, προκειμένου οι πολυφαινόλες του κρασιού να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα για την αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού αλλά και ως θεραπευτικοί παράγοντες για νόσους που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος.

## Βιβλιογραφία

1. Chambers, P. J. & Pretorius, I. S. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep.* **11**, 914–920 (2010).
2. Soleas, G. J., Diamandis, E. P. & Goldberg, D. M. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **11**, 287–313 (1997).
3. wine | Definition, History, Varieties, & Facts | Britannica.  
<https://www.britannica.com/topic/wine>.
4. Banks, G. & Overton, J. Old World, New World, Third World? Reconceptualising the Worlds of Wine. *J. Wine Res.* (2010).
5. Tello, J., Mammeler, R., Čajić, M. & Forneck, A. Major Outbreaks in the Nineteenth Century Shaped Grape Phylloxera Contemporary Genetic Structure in Europe. *Sci. Rep.* **9**, 17540 (2019).
6. Kwon, W. & Constantinides, P. Ideology and Moral Reasoning: How wine was saved from the 19<sup>th</sup> century phylloxera epidemic. *Organ. Stud.* **39**, 1031–1053 (2018).
7. Powell, K. S., Cooper, P. D. & Forneck, A. The Biology, Physiology and Host–Plant Interactions of Grape Phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. in *Advances in Insect Physiology* vol. 45 159–218 (Elsevier, 2013).
8. Federation, G. W. Ταυτότητα. *Greek Wine Federation*  
<http://greekwinefederation.gr/gr/content/show/&tid=2>.
9. ΤΣΕΤΟΥΡΑΣ Λ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ. *Οινοτεχνία. Η Επιστήμη του Κρασιού στην Πράξη - Β έκδοση.* (2008).
10. Nemzer, B., Kalita, D., Yashin, A. Y. & Yashin, Y. I. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. *Beverages* **8**, 1 (2021).

11. Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J. & Cantos-Villar, E. Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules* **26**, 718 (2021).
12. Sies, H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol.* **41**, 101867 (2021).
13. Le Gal, K., Schmidt, E. E. & Sayin, V. I. Cellular Redox Homeostasis. *Antioxidants* **10**, 1377 (2021).
14. Wang, R.-S., Oldham, W. M., Maron, B. A. & Loscalzo, J. Systems Biology Approaches to Redox Metabolism in Stress and Disease States. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 953–972 (2018).
15. Tretter, V., Hochreiter, B., Zach, M. L., Krenn, K. & Klein, K. U. Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 106 (2021).
16. Forman, H. J., Ursini, F. & Maiorino, M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **0**, 2–9 (2014).
17. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–126 (2010).
18. Auten, R. L. & Davis, J. M. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr. Res.* **66**, 121–127 (2009).
19. Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M. & Kouretas, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* **17**, 11–21 (2012).
20. Hanniman, E. A. & Sinal, C. J. Hormesis. in *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)* (ed. Wexler, P.) 529–532 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/B0-12-369400-0/00492-0.
21. Sthijns, M. M. J. P. E., Weseler, A. R., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1649 (2016).

22. Nita, M. & Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 3164734 (2016).
23. Sies, H. Chapter 13 - Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. in *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (ed. Fink, G.) 153–163 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.
24. Yang, S. & Lian, G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol. Cell. Biochem.* **467**, 1–12 (2020).
25. Perdrizet, G. A. Hans Selye and beyond: responses to stress. *Cell Stress Chaperones* **2**, 214–219 (1997).
26. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. & Fenn, W. O. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science* **119**, 623–626 (1954).
27. Pomatto, L. C. D. & Davies, K. J. A. ADAPTIVE HOMEOSTASIS AND THE FREE RADICAL THEORY OF AGEING. *Free Radic. Biol. Med.* **124**, 420–430 (2018).
28. Harman, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
29. Fridovich, I. The Biology of Oxygen Radicals. 7.
30. Loschen, G. & Flohé, L. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* **18**, 261–264 (1971).
31. Mittal, C. K. & Murad, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4360–4364 (1977).
32. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 2015).

33. Dismukes, G. C. *et al.* The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 2170–2175 (2001).
34. Hill, G. E. Cellular Respiration: The Nexus of Stress, Condition, and Ornamentation. *Integr. Comp. Biol.* **54**, 645–657 (2014).
35. Schopfer, P., Plachy, C. & Frahry, G. Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiol.* **125**, 1591–1602 (2001).
36. Krumova, K. & Cosa, G. Chapter 1 Overview of Reactive Oxygen Species. 1–21 (2016) doi:10.1039/9781782622208-00001.
37. Martínez, M. C. & Andriantsitohaina, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 669–702 (2009).
38. Sharifi-Rad, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
39. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**, 48 (2012).
40. Conklin, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* **3**, 294–300 (2004).
41. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. & Crowe, S. E. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol. Rev.* **94**, 329–354 (2014).
42. Tan, B. L., Norhaizan, M. E. & Liew, W.-P.-P. Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 9719584 (2018).



43. Burg, A. & Meyerstein, D. Chapter 7 - The chemistry of monovalent copper in aqueous solutions. in *Advances in Inorganic Chemistry* (eds. Eldik, R. van & Ivanović-Burmazović, I.) vol. 64 219–261 (Academic Press, 2012).
44. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage.  
<https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/277-284.htm>.
45. Lodovici, M. & Bigagli, E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *J. Toxicol.* **2011**, 487074 (2011).
46. Valavanidis, A., Vlachogianni, T. & Fiotakis, K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**, 445–462 (2009).
47. Li, H. *et al.* Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects. *Front. Microbiol.* **11**, (2021).
48. Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M. & Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *J. Toxicol.* **2012**, 645460 (2012).
49. Paiva, C. N. & Bozza, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1000–1037 (2014).
50. Kim, H. J. *et al.* Reactive Oxygen Species Induce Antiviral Innate Immune Response through IFN- $\lambda$  Regulation in Human Nasal Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 855–865 (2013).
51. Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L. & Yu, Z.-B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* **44**, 3–15 (2019).
52. Cooper, G. M. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* (2000).

53. Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M. & Bolognesi, A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 3527579 (2016).
54. Mahler, H. R. & Green, D. E. Metallo-Flavoproteins and Electron Transport. *Science* (1954) doi:10.1126/science.120.3105.7.
55. Παπαγαλάνης, Ν. & Παπαγαλάνης, Ν. Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ΙΙΙ. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών - Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. ΙΙΙ. Reactive species toxicity. *Ελληνική Νεφρολογία - Hell. Nephrol.* **27**, (2015).
56. Schrader, M. & Fahimi, H. D. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 383–393 (2004).
57. Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C. & del Río, L. A. Role of Peroxisomes as a Source of Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Molecules. in *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism* (ed. del Río, L. A.) 231–255 (Springer Netherlands, 2013). doi:10.1007/978-94-007-6889-5\_13.
58. Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. & Fransen, M. Peroxisome degradation in mammals: mechanisms of action, recent advances, and perspectives. *Front. Physiol.* **4**, (2013).
59. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 1363–1373 (2012).
60. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 1755–1766 (2006).
61. Anavi, S. & Tirosh, O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **146**, 16–35 (2020).
62. Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).

63. Siegenthaler, K. D. & Sevier, C. S. Working Together: Redox Signaling between the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 342–344 (2019).
64. Yoboue, E. D., Sitia, R. & Simmen, T. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death Dis.* **9**, 1–14 (2018).
65. Sevier, C. S. & Kaiser, C. A. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1783**, 549–556 (2008).
66. Santos, C. X. C. *et al.* Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 989–998 (2009).
67. Cederbaum, A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol.* **4**, 60–73 (2014).
68. Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P.-A. & Zarkovic, N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells* **8**, 793 (2019).
69. Bardaweel, S. K. *et al.* Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J. Med.* **50**, 193–201 (2018).
70. Tavassolifar, M. javad, Vodjgani, M., Salehi, Z. & Izad, M. The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis.* **2020**, 5793817 (2020).
71. Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J. & De Pasquale, R. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J. Exp. Neurosci.* **10**, 23–48 (2016).
72. Physiological Functions of Mitochondrial Reactive Oxygen Species | IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/69153>.

73. Shields, H. J., Traa, A. & Van Raamsdonk, J. M. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
74. He, F. *et al.* Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Front. Physiol.* **7**, 486 (2016).
75. Barbieri, E. & Sestili, P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J. Signal Transduct.* **2012**, 982794 (2012).
76. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 360438 (2014).
77. Repetto, M., Semprine, J. & Boveris, A. *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. Lipid Peroxidation* (IntechOpen, 2012). doi:10.5772/45943.
78. Dahl, J.-U., Gray, M. J. & Jakob, U. Protein Quality Control Under Oxidative Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* **427**, 1549–1563 (2015).
79. Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J. & Bernlohr, D. A. Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes\*. *J. Biol. Chem.* **283**, 21837–21841 (2008).
80. Goto, S. & Radak, Z. Implications of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *J. Sport Health Sci.* **2**, 75–80 (2013).
81. Boonstra, J. & Post, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**, 1–13 (2004).
82. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* **329**, 23–38 (2003).
83. Monari, A. P. D. & Dumont, E. Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. *Front. Chem.* **0**, (2015).

84. Gonzalez-Hunt, C. P., Wadhwa, M. & Sanders, L. H. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 87–94 (2018).
85. Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4642 (2021).
86. Zhou, X. Deoxyribose oxidation chemistry and endogenous DNA adducts. (Massachusetts Institute of Technology, 2006).
87. Reddy, V. P. *et al.* The Role of Oxidative Damage to Nucleic Acids in the Pathogenesis of Neurological Disease. in *Oxidative Damage to Nucleic Acids* (eds. Evans, M. D. & Cooke, M. S.) 123–140 (Springer New York, 2007). doi:10.1007/978-0-387-72974-9\_10.
88. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
89. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A. & Yar, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **178**, 687–704 (2019).
90. Flieger, J., Flieger, W., Baj, J. & Maciejewski, R. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials* **14**, 4135 (2021).
91. Aguilar, T. A. F., HernándezNavarro, B. C. & Pérez, J. A. M. *Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* (IntechOpen, 2016). doi:10.5772/65715.
92. Raj Rai, S. *et al.* Glutathione: Role in Oxidative/Nitrosative Stress, Antioxidant Defense, and Treatments. *ChemistrySelect* **6**, 4566–4590 (2021).
93. Lu, S. C. GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3143–3153 (2013).

94. The role of reduced glutathione (GSH) in the process of spermatic capacitation | IVIS. <https://www.ivis.org/library/spermatozoa-a-view-from-mexico/role-of-reduced-glutathione-gsh-process-of-spermatic-capacitation> (2020).
95. Franco, R., Schoneveld, O. J., Pappa, A. & Panayiotidis, M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. 27.
96. Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino Acids* **2012**, e736837 (2012).
97. Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **134**, 489–492 (2004).
98. Lipoic Acid. *Linus Pauling Institute* <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/lipoic-acid> (2014).
99. Packer, L., Witt, E. H. & Tritschler, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 227–250 (1995).
100. Tibullo, D. *et al.* Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm. Res.* **66**, 947–959 (2017).
101. Ndrepepa, G. Uric acid and cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* **484**, 150–163 (2018).
102. Sautin, Y. Y. & Johnson, R. J. URIC ACID: THE OXIDANT–ANTIOXIDANT PARADOX. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 608–619 (2008).
103. Badu-Boateng, C. & Naftalin, R. J. Ascorbate and ferritin interactions: Consequences for iron release in vitro and in vivo and implications for inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 75–87 (2019).
104. Theil, E. C. Ferritin iron minerals are chelator targets, antioxidants, and coated, dietary iron. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1202**, 197–204 (2010).

105. Alcázar-Fabra, M., Navas, P. & Brea-Calvo, G. Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1857**, 1073–1078 (2016).
106. Cirilli, I. *et al.* Role of Coenzyme Q10 in Health and Disease: An Update on the Last 10 Years (2010–2020). *Antioxidants* **10**, 1325 (2021).
107. Borges, T. H., López, L. C., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C. & Seiquer, I. Comparative analysis of minor bioactive constituents (CoQ10, tocopherols and phenolic compounds) in Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain. *J. Food Compos. Anal.* **63**, 47–54 (2017).
108. McDonnell, M. C. & Mohiuddin, S. S. Biochemistry, Biliverdin. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
109. Yanatori, I., Richardson, D. R., Toyokuni, S. & Kishi, F. How iron is handled in the course of heme catabolism: Integration of heme oxygenase with intracellular iron transport mechanisms mediated by poly (rC)-binding protein-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **672**, 108071 (2019).
110. Adin, C. A. Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities. *Antioxidants* **10**, 1536 (2021).
111. Ziberna, L., Martelanc, M., Franko, M. & Passamonti, S. Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Sci. Rep.* **6**, 29240 (2016).
112. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. & Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* **217**, 1915–1928 (2018).
113. Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1583–1606 (2011).
114. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C. & De Castro, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**, 595–603 (1999).

115. Reddi, A. R. & Culotta, V. C. SOD1 Integrates Signals from Oxygen and Glucose to Repress Respiration. *Cell* **152**, 224–235 (2013).
116. Butti, Z. & Patten, S. A. RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Genet.* **9**, (2019).
117. Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R. & de Holanda Paranhos, L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* **697**, 108701 (2021).
118. Flynn, J. M. & Melov, S. SOD2 in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027 (2013).
119. Sah, S. K., Agrahari, G. & Kim, T.-Y. Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells. *Cell Biosci.* **10**, 1–12 (2020).
120. Huang, P., Feng, L., Oldham, E. A., Keating, M. J. & Plunkett, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* **407**, 390–395 (2000).
121. Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int. J. Health Sci.* **12**, 88–93 (2018).
122. Nandi, A., Yan, L.-J., Jana, C. K. & Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, e9613090 (2019).
123. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* **54**, 287–293 (2018).
124. Aziz, M. A., Diab, A. S. & Mohammed, A. A. *Antioxidant Categories and Mode of Action. Antioxidants* (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.83544.
125. Sarıkaya, E. & Doğan, S. *Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease* (IntechOpen, 2020). doi:10.5772/intechopen.91009.



126. Higuchi, M. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. in *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* 181–199 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-401716-0.00015-5.
127. Fundu, T. M., Kapepula, P. M., Esimo, J. M., Remacle, J. & Ngombe, N. K. *Subcellular Localization of Glutathione Peroxidase, Change in Glutathione System during Ageing and Effects on Cardiometabolic Risks and Associated Diseases. Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease* (IntechOpen, 2019). doi:10.5772/intechopen.89384.
128. Xu, C. *et al.* The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity. *Cell Rep.* **35**, 109235 (2021).
129. Engin, K. N. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol. Vis.* **15**, 855–860 (2009).
130. Tucker, J. M. & Townsend, D. M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **59**, 380–387 (2005).
131. Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschütter, A. & Beisiegel, U. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **37**, 1436–1448 (1996).
132. Fiedor, J. & Burda, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* **6**, 466–488 (2014).
133. Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. Nrf2:INrf2(Keap1) Signaling in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1304–1309 (2009).
134. Baird, L. & Yamamoto, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **40**, e00099-20 (2020).

135. Sykiotis, G. P. & Bohmann, D. Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Sci. Signal.* **3**, re3 (2010).
136. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A. & Donato, R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1865**, 721–733 (2018).
137. Xu, J. *et al.* The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6379–6384 (2000).
138. Zhang, J. *et al.* Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *Biochem. J.* **404**, 459–466 (2007).
139. He, F., Ru, X. & Wen, T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4777 (2020).
140. Dhanoa, B. S., Cogliati, T., Satish, A. G., Bruford, E. A. & Friedman, J. S. Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Hum. Genomics* **7**, 13 (2013).
141. Lo, S.-C., Li, X., Henzl, M. T., Beamer, L. J. & Hannink, M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* **25**, 3605–3617 (2006).
142. Canning, P., Sorrell, F. J. & Bullock, A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 101–107 (2015).
143. Gugliandolo, A., Bramanti, P. & Mazzon, E. Activation of Nrf2 by Natural Bioactive Compounds: A Promising Approach for Stroke? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4875 (2020).
144. Bajpai, V. K. *et al.* Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. *Sci. Rep.* **7**, 46035 (2017).
145. Tonelli, C., Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 1727–1745 (2018).
146. Wu, S., Lu, H. & Bai, Y. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med.* **8**, 2252–2267 (2019).

147. Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q. & Sha, H. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging Dis.* **10**, 637 (2019).
148. Lin, T.-Y., Cantley, L. C. & DeNicola, G. M. *NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response. A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* (IntechOpen, 2016). doi:10.5772/65141.
149. Yates, M. S. *et al.* Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* **30**, 1024–1031 (2009).
150. Batchuluun, B., Pinkosky, S. L. & Steinberg, G. R. Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21**, 283–305 (2022).
151. Li, C., Zhang, L., Qiu, Z., Deng, W. & Wang, W. Key Molecules of Fatty Acid Metabolism in Gastric Cancer. *Biomolecules* **12**, 706 (2022).
152. Panieri, E. *et al.* Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy. *Antioxidants* **9**, 193 (2020).
153. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y. & Dinkova-Kostova, A. T. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem. J.* **457**, 415 (2014).
154. Qader, M., Xu, J., Yang, Y., Liu, Y. & Cao, S. Natural Nrf2 Activators from Juices, Wines, Coffee, and Cocoa. *Beverages* **6**, 68 (2020).
155. Keum, Y.-S. & Choi, B. Y. Molecular and Chemical Regulation of the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Molecules* **19**, 10074–10089 (2014).
156. Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A. & De la Torre, R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants* **6**, 73 (2017).

157. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8416763 (2017).
158. López-Alarcón, C. & Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* **763**, 1–10 (2013).
159. Ljevar, A. *et al.* Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and in vitro Cytotoxicity Assessment of Fruit Wines. *Food Technol. Biotechnol.* **54**, 145–155 (2016).
160. Lorenzo, C. D. *et al.* Antioxidant activity of wine assessed by different in vitro methods. *BIO Web Conf.* **9**, 04008 (2017).
161. Tekos, F. *et al.* Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metabolites* **11**, 436 (2021).
162. Mollica, A. *et al.* Phenolic Analysis and In Vitro Biological Activity of Red Wine, Pomace and Grape Seeds Oil Derived from *Vitis vinifera* L. cv. Montepulciano d’Abruzzo. *Antioxidants* **10**, 1704 (2021).
163. Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I. & Boban, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* **86**, 593–600 (2004).
164. Rodríguez-Vaquero, M. J. *et al.* Antibacterial, antioxidant and antihypertensive properties of polyphenols from argentinean red wines varieties. *Open J. Pharmacol. Pharmacother.* **5**, 001–006 (2020).
165. Sharma, S. K. & Singh, A. P. In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Nardostachys jatamansi* DC. *J. Acupunct. Meridian Stud.* **5**, 112–118 (2012).
166. Miguel-Chávez, R. S. *Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. Phenolic Compounds - Biological Activity* (IntechOpen, 2017). doi:10.5772/66897.
167. Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C. & Câmara, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* **105**, 204–214 (2007).

168. Nunes, C. *et al.* Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways. *Toxicol. Res.* **5**, 53–65 (2015).
169. Lin, H. *et al.* Yellow Wine Polyphenolic Compounds prevents Doxorubicin-induced cardiotoxicity through activation of the Nrf2 signalling pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 6034–6047 (2019).
170. Patel, R. & Maru, G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1897–1911 (2008).
171. Priftis, A., Angeli-Terzidou, A.-E., Veskoukis, A. S., Spandidos, D. A. & Kouretas, D. Cell-specific and roasting-dependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Mol. Med. Rep.* **17**, 8325–8331 (2018).
172. Krajka-Kuźniak, V. & Baer-Dubowska, W. Modulation of Nrf2 and NF-κB Signaling Pathways by Naturally Occurring Compounds in Relation to Cancer Prevention and Therapy. Are Combinations Better Than Single Compounds? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8223 (2021).
173. Amakura, Y. *et al.* Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay. *Phytochemistry* **69**, 3117–3130 (2008).
174. Gessner, D. K. *et al.* Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF-κB and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Vet. Scand.* **55**, 18 (2013).
175. Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R. & Adhikari, B. Managing obesity through natural polyphenols: A review. *Future Foods* **1–2**, 100002 (2020).
176. Sugimoto, H. *et al.* Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G283-294 (2010).

177. Chowdhry, S. *et al.* Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 357–371 (2010).
178. Zhang, Y.-K. J., Yeager, R. L., Tanaka, Y. & Klaassen, C. D. Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 326–334 (2010).
179. Murase, T. *et al.* Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **300**, E122-133 (2011).
180. Sato, R. *et al.* Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 12497–12502 (2000).