**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**Εργαστηριακές σημειώσεις: Μεταπτυχιακό πρόγραμμα « Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική- Διαγνωστικοί Δείκτες»**

****

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2017**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου**

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RClS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002). Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντιούνται συνηθέστερα είναι οι ROS. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου (O2·-), υδροξυλίου (OH·), υπεροξειδίου (RO2·), αλκοξειδίου (RO·), υδροϋπεροξειδίου (HO2·) και οι μη ρίζες υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2), υποχλωριώδες υξύ (HOCl), υποβρωμιώδες οξύ (HOBr), όζον (O3) και μονήρες οξυγόνο (1O2).

**Παραγωγή ελευθέρων ριζών**

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

**Ενδογενείς πηγές**

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti, 2001). Ο μηχανισμός παραγωγής τους βασίζεται στο γεγονός ότι κατά την παραγωγή του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες δραστικές ουσίες είναι ROS.

Η αναγωγάση της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγάση της ουβικινόνης- κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής O2·- και H2O2 (Chance et al., 1979). Το H2O2 δημιουργείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH2 στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O2·- (Chance et al., 1979). Το O2·- ανάγεται σε H2O2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O2·- και στο H2O2 δημιουργείται OH·.

Fe3+ + Ο2●- 🡪 Fe2+ + Ο2

Fe2+ + Η2Ο2 🡪 Fe3+ + ΟΗ- + ΟΗ●

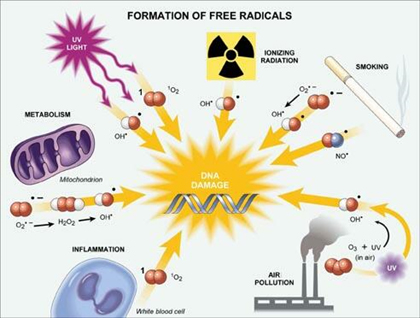
Εκτός από τις ROS στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου από τη συνθάση του NO. Πέρα από τα μιτοχόνδρια, μια άλλη πηγή ROS και κυρίως H2O2 αποτελούν τα υπεροξειδιοσώματα. Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.

RH (ξενοβιοτικό) + O2 + NADPH + H+ ●ROH + NADP+ +H2O

Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames et al., 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα Ο2●- (Cooper et al., 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή Η2Ο2 (Brandley et al., 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

**Εξωγενείς πηγές**

Εδώ περιλαμβάνονται διάφοροι και ετερογενείς παράγοντες όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίξει σημαντικό ρόλο (Ames, 1981; Halliwell & Gutteridge 1998).

**Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.**

**Επιδράσεις ελευθέρων ριζών**

**Θετικές**

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins, 1988). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Malm, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκή κόπωσης.

**Αρνητικές**

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O2) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

*Λιπίδια*

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

*Πρωτεΐνες*

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002)

*DNA*

Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να

αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

**Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

*Α) Ενζυμικοί μηχανισμοί*

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

*Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)*

Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του O2·- σε H2O2, όπως φαίνεται παρακάτω:

SOD

2O2·- + 2H H2O2 +O2

Το O2·- παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

*Καταλάση (CAT)*

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας Η2Ο2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του Η2Ο2 σε Η2Ο και Ο2.

CAΤ

2Η2Ο 🡪 2Η2Ο + Ο2

*Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)*

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του Η2Ο2 σε Η2Ο και Ο2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

GPX

H2O2 + 2GSH 🡪 2 H2O + GSSG

*Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)*

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

*Β) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί*

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη Ε, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

*Βιταμίνη E*

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

*Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)*

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

*Β-καροτίνη*

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, Ε και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998) .

*Ουρικό οξύ*

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

*Γλουταθειόνη*

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998).

*Συνένζυμο Q10*

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

*Σελήνιο*

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

**Οξειδωτικό στρες**

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών- αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991).



**Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες**

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

Α) Εξωγενείς παράγοντες:

* Ξενοβιοτικές ουσίες
* Παθογόνα βακτήρια και ιοί
* Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
* Ακτινοβολία
* Διατροφή
* Κάπνισμα
* Φάρμακα

Β) Ενδογενείς παράγοντες:

* Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
* Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχονδρίων
* Λευκοκύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**

Η μελέτη της δράσης των αντιοξειδωτικών μορίων καθώς και εκχυλισμάτων ή τροφίμων που περιέχουν αντιοξειδωτικά είναι σημαντική καθώς μπορεί να μας δώσει μια εικόνα για την αντιοξειδωτική και την πιθανή αντικαρκινική ικανότητα κάποιων μορίων ή τροφών. Η μελέτη του μπορεί να γίνει με μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες in vitro και in vivo. Στις περισσότερες in vitro πειραματικές τεχνικές μελετάται η άμεση αντιοξειδωτική δράση. Συνήθως χρησιμοποιείται μια τεχνητή ελεύθερη ρίζα και μελετάται η ικανότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει να εξουδετερώνει την ρίζα. Επίσης πλέον είναι διαδεδομένη η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης αντιοξειδωτικών σε in vitro συστήματα που περιλαμβάνουν κυτταροκαλλιέργειες. Η μελέτη των αντιοξειδωτικών σε κυτταροκαλλιέργειες μπορεί να μας δώσει αρκετές πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να δράσει ένα αντιοξειδωτικό και αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο. Τέλος η in vivo μελέτη των αντιοξειδωτικών μπορεί να μας δώσει μια πληθώρα πληροφοριών για το πώς δρουν τα αντιοξειδωτικά σε επίπεδο ιστών αλλά και ολόκληρων οργανισμών. Συνήθως οι μελέτες πραγματοποιούνται σε ζώα που καταναλώνουν αντιοξειδωτικά αλλά και σε ανθρώπους εφόσον οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι ασφαλείς (π.χ. μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης χυμών φρούτων).

Στην εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθεί in vitro, η ικανότητα απομάκρυνσης ριζών υδροξυλίου (•ΟΗ) ροφημάτων του εμπορίου (καφές espresso, χυμός πορτοκάλι και ανάμεικτος), με τη μέθοδο hydroxyl radical scavenging activity, η οποία σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική τους δράση. Ενώ επίσης, θα γίνει παρουσίαση ενός καινοτόμου μηχανήματος του bio lab 1, το οποίο δίνει της μονάδες αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στα ροφήματα.

**1η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ**

***Hydroxyl radical scavenging activity***

**Αρχή μεθόδου**

Η ρίζα υδροξυλίου (•OH) είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα, καθώς θεωρείται ένα άκρως επιβλαβές είδος ελεύθερης ρίζας, ικανό να προκαλέσει καταστροφή μακρομορίων όπως DNA, λιπίδια, πρωτεΐνης, οδηγώντας σε καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου, από φυτικά εκχυλίσματα, συνδέεται με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν την ρίζα υδροξυλίου, θα εξεταστεί με τη μέθοδο δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη εποικοδομείτε ύστερα από έκθεση στις ρίζες υδροξυλίου που προκύπτουν μέσω αντιδράσεων Fenton.

**Υλικά**

**1) Sodium phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)**

**a) 0.2M Monobasic stock**

Διαλύουμε 13.90g sodium phosphate monobasic (NaH2PO4) σε 500 ml απιονισμένου νερού.

**b) 0.2M Dibasic stock**

Διαλύουμε 26,825 g sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500 ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,50 ml 0.2M monobasic stock και 37.50 ml 0.2M dibasic stock σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7.4.

**2) 2-deoxyribose (10mM) MW=134.13 g/mol**

Για να φτιάξουμε 30 ml δ/τος ζυγίζουμε 40,239mg ουσίας.

**3) FeSO4 (MW=278.01)-EDTA (MW=372.24) (10mM)**

Φτιάχνουμε 450 ml από το κάθε διάλυμα. Για το FeSO4 ζυγίζουμε 1,251 g και το διαλύουμε σε 450 ml Η2Ο . Για το EDTA διαλύουμε 1,6751 g και το διαλύουμε σε 450 ml Η2Ο. Θερμαίνουμε το EDTA μέχρι να βράσει και στη συνέχεια το ρίχνουμε στο FeSO4 και τα βράζουμε μαζί για 1 ώρα. Στη συνέχεια το κρυώνουμε πλήρως και το βάζουμε στους 4οC.

**4) H2O2 (10mM) MW=34.01 g/mol**

Από stock 8,82 M για να φτιάξουμε 50 ml δ/τος 10mM παίρνουμε 57μl και συμπληρώνουμε με 49,943 ml Η2Ο.

**5) TCA 2.8%**

**6) TBA 1%**

Το διαλύουμε σε ΝαΟΗ 50mM

Στα 100 ml → 1 g

Στα 20 ml→0,2 g

**7) NaOH (50mM)**

Από stock 1 M για να φτιάξουμε 50 ml παίρνουμε 2,5 ml και συμπληρώνουμε με 47,5 ml Η2Ο.

Αλλιώς για 150 ml NaOH 50mM ζυγιζω 300mg

**Πειραματική διαδικασία**

1) Προσθέτουμε sodium phosphate buffer 0.2 M pH 7.4 + 10 mM 2-deoxyribose + 10 mM FeSO4- EDTA + H2O + δείγμα + H2O2

2) Επωάζουμε για 1 h στους 37οC.

3) Προσθέτουμε TCA 2.8 % και TBA 1 %.

4) Βράζουμε το μίγμα για 10 λεπτά και κρυώνουμε σε πάγο

5) Μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm.

Οι μετρήσεις θα γίνουν εις τριπλούν

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **3X** | **Blank** | **Control** | **C1** | **C2** | **C3** | **C4** | **C5** |
| **Phosphate buffer (0.2M,pH 7.4)** | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl |
| **2-deoxyribose 10 mM** | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl |
| **FeSO4-EDTA 10 mM** | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl |
| **H2O2 10 mM** | - | 30 μl | 30μl | 30 μl | 30μl | 30μl | 30μl |
| **dH2O** | 330 μl | 300 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl |
| **Δείγμα** | - | - | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl |
| **Επώαση 1 h στους 37οC** | | | | | | | |
| **TCA 2.8%** | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl |
| **TBA 1%** | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl |
| **Βράσιμο για 10 λεπτά, κρυώνουμε σε πάγο, φυγοκεντρούμε (3000 rpm, 5 min) και μέτρηση απορρόφησης στα 520 nm** | | | | | | | |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **2X** | **C1** | **C2** | **C3** | **C4** | **C5** |
| **Phosphate buffer (0.2M,pH 7.4)** | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl | 270 μl |
| **2-deoxyribose 10 mM** | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl |
| **FeSO4-EDTA 10 mM** | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl | 75 μl |
| **H2O2 10 mM** | - | - | - | - | - |
| **dH2O** | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl |
| **Δείγμα** | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl | 150 μl |
| **TCA 2.8%** | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl |
| **TBA 1%** | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl | 375 μl |

**Υπολογισμοί**

**% Hydroxyl radical scavenging activity** = (1− Asample/ Acontrol) ×100

Αcontrol: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

Α sample: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520nm

**2η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΉ ΑΣΚΗΣΗ**

***Biolab 1.0***

Με το μηχάνημα Biolab 1.0,πραγματοποιείται μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τροφών και ροφημάτων. Σκοπός του συγκεκριμένου μηχανήματος είναι η ανάπτυξη μιας οικονομικής, γρήγορης και απλής μεθόδου που θα είναι προσβάσιμη πχ στον απλό καταναλωτή ή σε διαιτολόγους. H χρησιμότητα του έγκειται:

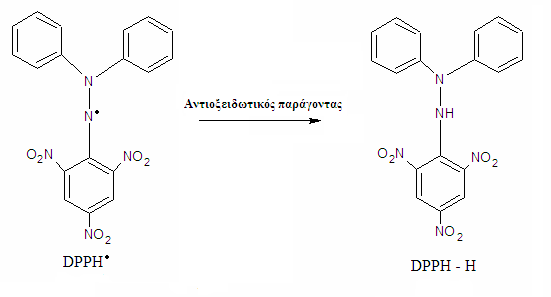
* Διευκόλυνση ελέγχου ποιότητας τροφίμων ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα
* Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων τροφίμων

**Μεθοδολογία**

1. Χρήση μεθόδου DPPH
2. Ανάπτυξη νέου χρωμομέτρου και λογισμικού επεξεργασίας αποτελεσμάτων από την Polytech SA
3. Ενσωμάτωση του απαραίτητου εξοπλισμού και συστατικών σε ένα βαλιτσάκι-κιτ που καθιστά πολύ απλή τη διαδικασία.

**Μέθοδος *DPPH•***

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH• πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brad-Williams et al. (Brad-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων, φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και χυμών πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή δειγμάτων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, η αντίδραση με την ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μΜ ρίζας DPPH• και το φυτικό εκχύλισμα. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα προσδιορίζεται και η απορρόφηση που έχει η εξεταζόμενη ουσία από μόνη της διαλυμένη σε μεθανόλη. Επίσης, η ρίζα DPPH• (100 μΜ) σε μεθανόλη αποτελεί το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό).

****

**Εικόνα:** Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100 μΜ) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH• (5, 10, 20, 40, 80, 100 μΜ) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μΜ βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο (Visioli et al, 1998; Kruk et al., 2005).

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

% αναστολή = (Αο - Αδ) / Αο Χ 100

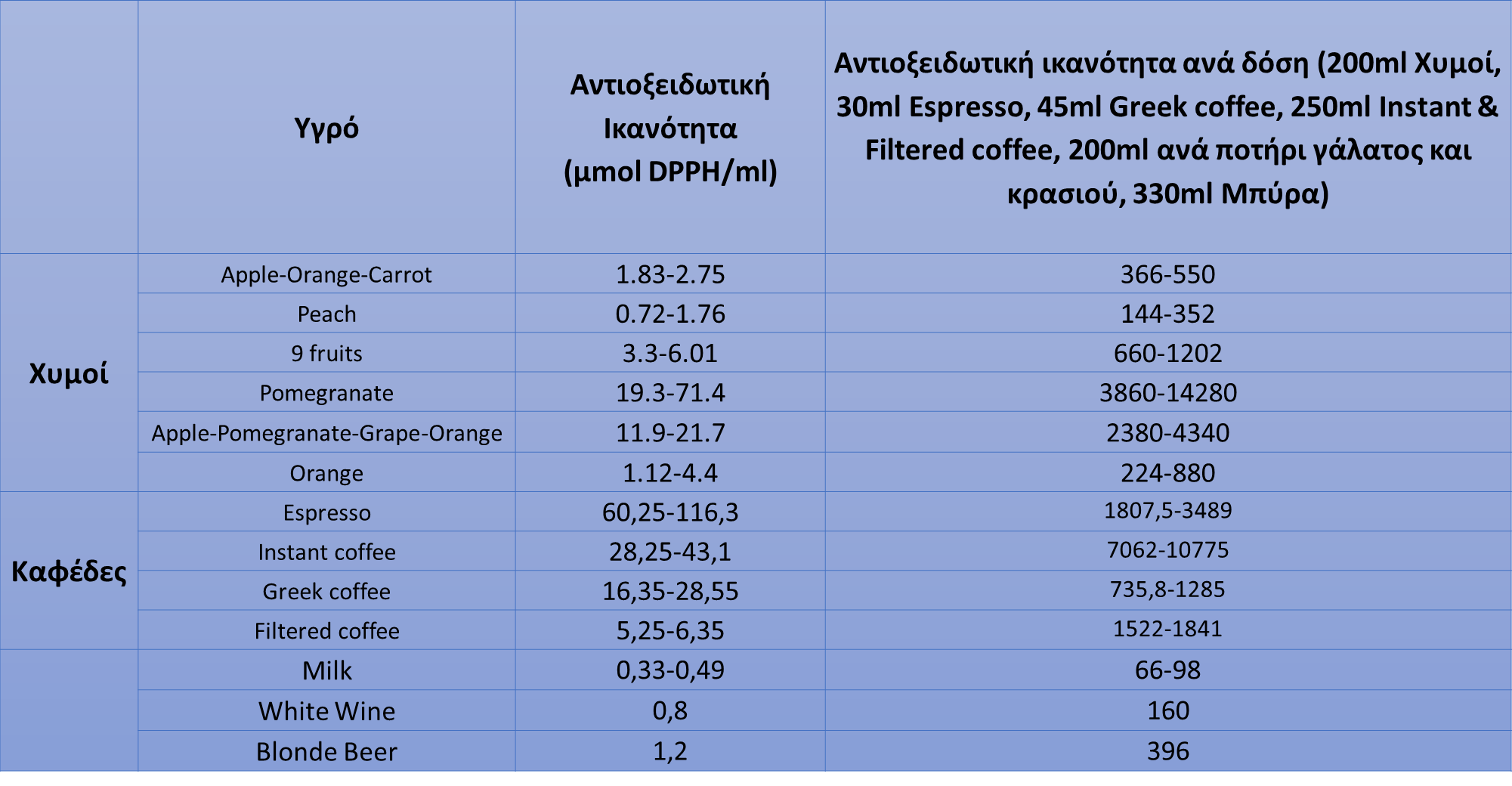
Αο: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

Αδ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm



Εικόνα 3. Μηχάνημα Biolab 1.0

Πίνακας 1 Ενδεικτικές τιμές ροφημάτων, με τη χρήση Bio lab 1.



**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 6858-62.
2. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H2O2 detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 2002; 33 (9): 1260-7.
3. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. Am.J.Respir.Crit Care Med 2004; 170:1179-1184.
4. Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. J Biol Chem 1993; 268 (10): 6995-7010.
5. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995 Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol 28:25-30.
6. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; 59: 527-605.
7. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans 2002; 30 (2): 280-5.
8. David Yaffe and Ora Saxel. ["Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle."](http://www.nature.com/nature/journal/v270/n5639/abs/270725a0.html). Nature 270 (5639): 725–727. 1977.
9. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. Biol Signals Recept 2001; 10: 125-40.
10. Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, Tsioutsiouliti A, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D.[Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25205739) Hum Exp Toxicol. 2014 Nov;33(11):1099-112
11. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. Med Sci Sports Exerc 1988; 20(2): 55-9.
12. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.
13. Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. Bioenerg Biomembr. 1997; 29: 89-95.
14. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest. 2002 62: 231 236.
15. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med 1988; 5: 156 70.
16. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 222:283-292.
17. Kruk I., Aboul-Enein H.Y., Michalska T., Lichszteld K., Kładna A. 2005 Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. Luminescence 20:81-9.
18. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. Free Radic Biol Med 2002; 32 (9): 790-6.
19. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. Acta Physiol Scand 2001; 171: 233-9.
20. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo. 13: 295-309.
21. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. Sports Med. 2008;38(7):579-606.
22. Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005 Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290-302.
23. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in Uver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. Eur. J. Appl. PhysioL 72: 189-194.
24. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. Indian J Tuberc. 2004; 213-218.
25. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don’t. J Appl Physiol 2001; 90: 724-31.
26. Sies, H. (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York: Academic Press.
27. Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med 1990; 10: 236-54.
28. St-Pierre J, Buckingham, JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem 2002; 277: 44784-44790.
29. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. Nutrition 2000; 16 (7-8): 716 8.
30. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. IUBMB Life 50:271-277; 2000.
31. Visioli F., Bellomo G., Galli C. 1998 Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochem Biophys Res Com 247:60–4.
32. Yen, G.C. and Der Duh, P. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 629-632, 1994.
33. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 2001; 29 (2): 358-62.