

ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ



Καθηγητής Δημήτριος Κουρέτας

Επίκουρος Καθηγητής Δημήτριος Στάγκος

Δρ. Νικόλαος Γκουτζουρέλας

Δρ. Αριστείδης Βεσκούκης



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα "ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ"
Λάρισα, 2020

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές 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 and 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 ελευθέρων ριζών. Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μία ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) ή τις δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCIS). Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες μπορούν να παραχθούν μετά από αντιδράσεις με τις ROS, οι οποίες συναντώνται συνηθέστερα στον οργανισμό (Veskoukis et al. 2012a). Στις ROS ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}) και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

Παραγωγή ελευθέρων ριζών

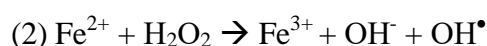
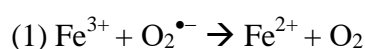
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo and Venditti 2001). Κατά τη διαδικασία παραγωγής του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες

ανήκουν στις ROS. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης (σύμπλοκο I) και η αναγωγή του κυτοχρώματος (σύμπλοκο II) είναι συνήθεις θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al. 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Veskoukis et al. 2012a). Η $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (1) και Fenton (2) ανάμεσα στην $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 παράγεται OH^{\cdot} .



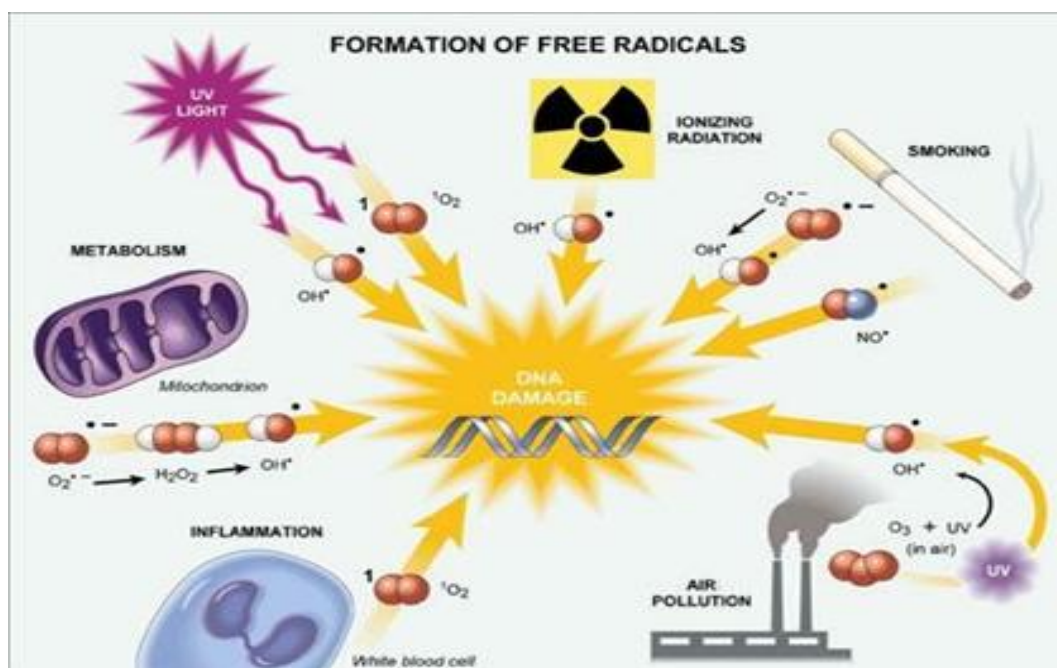
Εκτός από τις ROS, στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) από τη συνθάση του NO^{\cdot} . Μία άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 είναι τα υπεροξειδισώματα, τα οποία είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων βλαβερών ουσιών 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 O_2 οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



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 $O_2^{\cdot-}$ (Cooper et al. 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brantley et al. 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελευθέρων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Εξωγενείς πηγές

Σε αυτές περιλαμβάνονται διάφοροι ετερογενείς παράγοντες, όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες, όπως διάφορες τοξίνες, τα εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Ames 1981; Halliwell and Gutteridge 2015).



Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί, κυρίως, με την επιβλαβή δράση τους στον οργανισμό. Έχει, ωστόσο,δειχθεί ότι συμμετέχουν 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 φαγοκύτωσης (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 συμμετέχοντας στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al. 1999). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια

της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές

Η υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών ευθύνεται για τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell and Gutteridge 2015), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al. 2008) και την κόπωση (Bettters et al. 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του O₂, που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή O₂⁻ στην ηρεμία (Sjödín et al. 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η διαρροή του O₂ στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al. 1997) ή συμβαίνει σε ποσοστό 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 ποσοστό οξυγόνου, που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού κατά την ηρεμία (Viña et al. 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν, ακόμα, συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες, όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell and Gutteridge 2015).

Λιπίδια

Καθώς οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια, τα οποία είναι ευαίσθητα σε οξείδωση και κύριο λόγο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFA), μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση του καταρράκτη των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO•, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεύδης (Malonyl Dialdehyde, 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 and 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 βιοδείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Η οξειδωτική τροποποίηση των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως είναι η απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine 2002)

DNA

Το DNA είναι κατά κανόνα ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν προκαλέσουν την οξειδωτική καταστροφή του. Οι βλάβες που, συνήθως, προκαλούνται είναι τροποποιήσεις στις βάσεις του, θραύσεις στις έλικές του, βλάβες στις πουρίνες, την εξόξη και στο σύστημα επιδιόρθωσής του. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al. 1996).

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

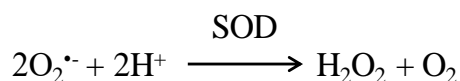
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell and Gutteridge 2015). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες μετατρέποντάς τις σε λιγότερο δραστικά μόρια και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών, που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

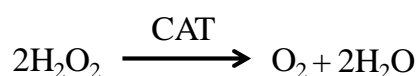
Είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:



Η $O_2^{\cdot -}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όταν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al. 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

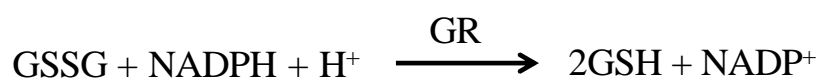
Είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται (Antunes et al. 2002). Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GPx.



Ωστόσο, η GPx ενεργοποιείται όταν το H_2O_2 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ η καταλάση δρα όταν η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι υψηλή (Halliwell and Gutteridge 2015).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα το λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Η φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι, σχηματίζονται δύο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GR.



Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια και τη βιταμίνη A από την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell and Gutteridge 2015).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ταυτόχρονα ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell and Gutteridge 2015).

Β-καροτένιο

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Πιστεύεται ότι 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, E και το σελήνιο (Halliwell and Gutteridge 2015).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης τα επίπεδα του ουρικού οξέος αυξάνονται στο πλάσμα του αίματος (Green and Fraser 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα ασκώντας προστατευτικό ρόλο ενάντια στις 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 της και το αντίστροφο. Στην ανηγμένη μορφή της οφείλονται οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της γλουταθειόνης (Halliwell and Gutteridge 2015).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά την παραγωγή ATP. Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλει στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell and Gutteridge 2015).

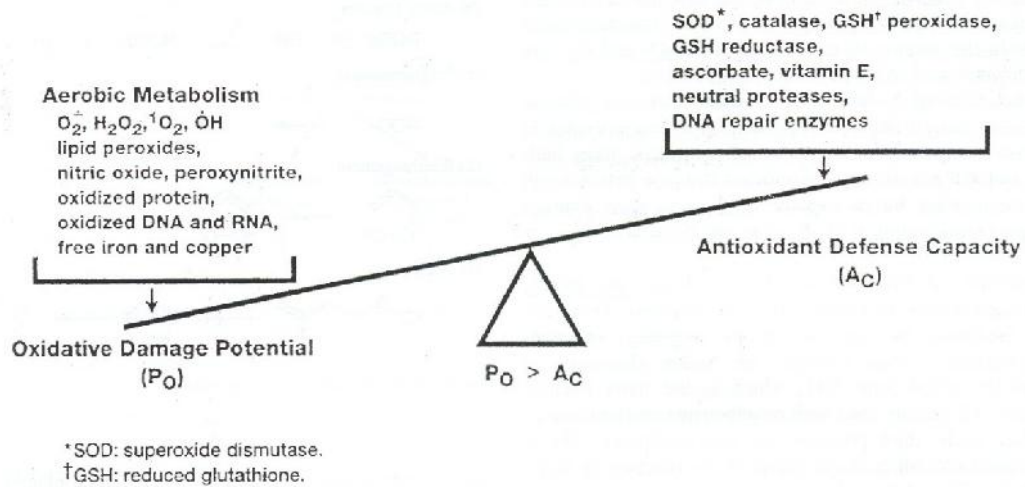
Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία και βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της GPx και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα (Halliwell and Gutteridge 2015).

Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies 1991). Προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια ενώ μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

OXIDATIVE STRESS



Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται τόσο από εξωγενείς πηγές, όπως οι ξеноβιοτικές ουσίες, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, το όζον, οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, η ακτινοβολία, η διατροφή και το κάπνισμα όσο και από ενδογενείς παράγοντες όπως διάφορα ένζυμα (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης), ο αερόβιος μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια και η δράση των λευκοκυττάρων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η μελέτη της δράσης μορίων καθώς και εκχυλισμάτων ή τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά είναι σημαντική καθώς μπορεί να μας δώσει μία εικόνα για την αντιοξειδωτική και την πιθανή αντικαρκινική τους ικανότητα. Η μελέτη τους μπορεί να γίνει τόσο με *in vitro* όσο και με *in vivo* πειραματικές διαδικασίες. Στις περισσότερες *in vitro* πειραματικές δοκιμές μελετάται η άμεση αντιοξειδωτική δράση. Συνήθως, χρησιμοποιείται μία τεχνητή ελεύθερη ρίζα και μελετάται η ικανότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει να εξουδετερώνει τη ρίζα αυτή. Επίσης, είναι πλέον διαδεδομένη η μελέτη της δράσης αντιοξειδωτικών σε *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών. Η μελέτη των αντιοξειδωτικών σε κυτταροκαλλιιεργειες μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους δρουν και για το λόγο αυτό αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο. Τέλος, η *in vivo* μελέτη μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες για τη δράση των αντιοξειδωτικών σε επίπεδο ιστών, οργάνων και ολόκληρων οργανισμών. Τα αντιοξειδωτικά χορηγούνται σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους εφόσον είναι ασφαλή (π.χ. μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης χυμών φρούτων ή βιταμινών).

Στον παρόντα εργαστηριακό οδηγό παρουσιάζονται διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα, που χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στο ερευνητικό πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας. Στην πρώτη εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθεί *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση δύο δειγμάτων χυμών φρούτων και ενός δείγματος καφέ του εμπορίου. Στη μέθοδο αυτή, που ονομάζεται αναγωγική ισχύς (reducing power) θα μελετηθεί η αντιοξειδωτική ισχύς των δειγμάτων μέσω της ικανότητάς τους να ανάγουν τον ιδιαίτερα δραστικό τρισθενή σίδηρο (Fe^{+3}) σε δισθενή (Fe^{+2}). Στους ζωντανούς οργανισμούς, η οξείδωση του σιδήρου είναι συνδεδεμένη με την παραγωγή ROS. Έτσι, η ικανότητα μίας ουσίας να ανάγει το σίδηρο σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της δράση. Στη δεύτερη εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος στεμφύλων σε μυϊκά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, μυϊκά κύτταρα θα καλλιιεργηθούν παρουσία του εκχυλίσματος για 24 ώρες και στη συνέχεια θα προσδιοριστούν βιοδείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα η ολική συγκέντρωση ROS και η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στην τρίτη εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθεί *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση των παραπάνω δειγμάτων χυμών φρούτων και καφέ του εμπορίου με τη μέθοδο DPPH. Στη συγκεκριμένη μέθοδο θα προσδιοριστεί η ικανότητα των δειγμάτων να

εξουδετερώνουν τη σταθερή ρίζα DPPH. Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις από ένα δείγμα απαιτούνται για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Στην τέταρτη και την πέμπτη εργαστηριακή άσκηση θα μελετηθούν τα διαφορετικά επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων σε ζωικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) και η συγκέντρωση της GSH σε τέσσερις ιστούς από δύο διαφορετικά ζώα με σκοπό τον προσδιορισμό των πιθανών διαφορών των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μορίων μεταξύ των ιστών αλλά και των ζώων.

1^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

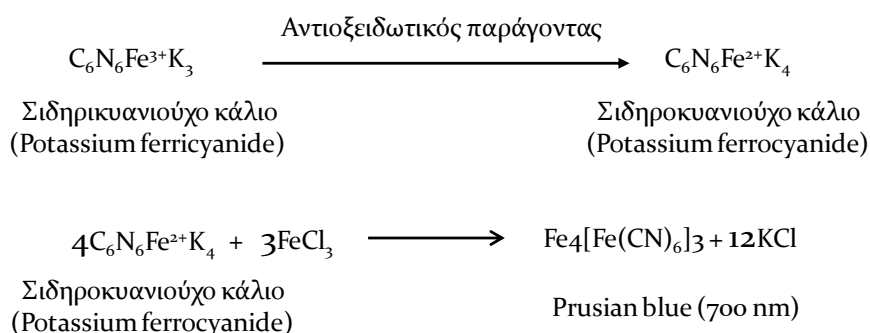
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΩΝ ΚΑΙ ΚΑΦΕ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER (ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΙΣΧΥΣ)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η αναγωγική δύναμη διαφόρων ουσιών προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen and Duh, (1994). Η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων δειγμάτων. Ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δύναμη (ισχυρά αντιοξειδωτικά) είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του υπό μελέτη διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε μελετώμενης ουσίας. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe^{+3} /σιδηρικούανιούχο κάλιο στην ανηγμένη μορφή του σιδήρου (Fe^{+2}). Με τη μέτρηση του σχηματισμού του κυανού χρώματος (Pearl's Prussian blue) στα 700 nm είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του Fe^{+3} .

Αρχή της Μεθόδου

Ουσίες με αναγωγική ισχύ αντιδρούν με το σιδηρικούανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) (που περιέχει Fe^{+3}) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) (που περιέχει Fe^{+2}), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο και παράγεται ένα σύμπλοκο με μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Παρασκευή Διαλυμάτων

1) Ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά και νάτριο (sodium phosphate buffer) 0,2 M, pH = 6,6

Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό, διαλύουμε 13,9 g δισόξινο φωσφορικού νατρίου (sodium phosphate monobasic, NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού και 26,825 g όξινο φωσφορικού δινατρίου (sodium phosphate dibasic heptahydrate, Na_2HPO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 62,5 ml του πρώτου διαλύματος και 37,5 ml του δεύτερου διαλύματος σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6,6.

2) Σιδηρικυανιούχο κάλιο (Potassium ferricyanide, $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$, 1% w/v)

Διαλύουμε 0,1 g $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

3) Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος (Ferric chloride, FeCl_3 0,1 % w/v)

Διαλύουμε 0,01 g FeCl_3 σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

4) Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA, 10% w/v)

Προσθέτουμε 10 ml από ένα πυκνό διάλυμα TCA περιεκτικότητας 100% σε 90 ml απιονισμένου νερού.

Πειραματική Διαδικασία

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Τυφλό (Blank)	Δείγμα ελέγχου (Control)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Δείγμα	-	-	250 μl	250 μl	250 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	500 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Σιδηρικυανιούχο κάλιο	-	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

2. Επιάζουμε στο υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.

3. Κρυνώνουμε τα δείγματα και προσθέτουμε 250 μl TCA 10% σε κάθε φιαλίδιο.

4. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 λεπτά.

5. Μεταφέρουμε 250 μl από το υπερκείμενο σε νέα φιαλίδια erpendorf και προσθέτουμε 250 μl απιονισμένου νερού και 50 μl διαλύματος χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου.

6. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm. Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

- Επειδή υπάρχει πιθανότητα να απορροφούν τα συστατικά των εξεταζόμενων δειγμάτων στα 700 nm, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος χωρίς την παρουσία του σιδηρικού ανιούχου καλίου. Η μέτρηση αυτή γίνεται ως ακολούθως:

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Δείγμα	250 μl	250 μl	250 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	250 μl	250 μl	250 μl
TCA 10%	250 μl	250 μl	250 μl

2. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 λεπτά.

3. Μεταφέρουμε 250 μl από το υπερκείμενο σε νέα φιαλίδια erpendorf και προσθέτουμε 250 μl απιονισμένου νερού και 50 μl διαλύματος χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου.

4. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm.

Υπολογισμοί

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που έχει απορρόφηση 0,5.

2^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

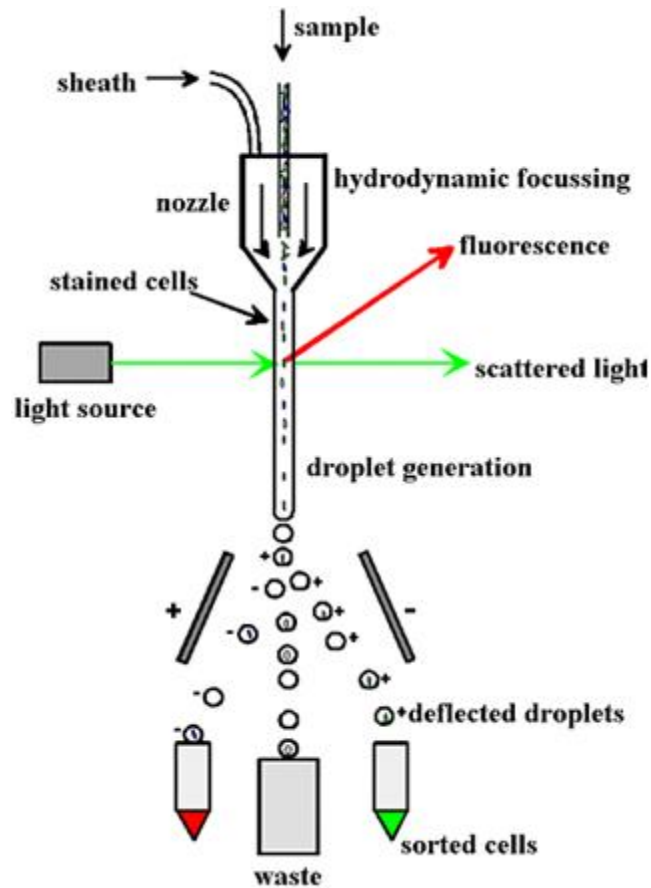
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FLOW CYTOMETRY)

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική, που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση και το χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων καθώς και των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

Αρχή της μεθόδου

Μία δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο, όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Συγκεκριμένα, ένας ανιχνευτής βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι είναι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι είναι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0,2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό, που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά, που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως διαφορετικού μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός λαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρομέτρου.

Συσκευές κυτταρομετρίας ροής

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων σε κάθε δευτερόλεπτο σε πραγματικό χρόνο και ορισμένες έχουν επιπλέον τη δυνατότητα ενεργού διαχωρισμού και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Μία συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί να παράγει την εικόνα ενός κυττάρου, παρέχει δεδομένα για τα χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρόνο. Για την ανάλυση στερεών ιστών θα πρέπει πρώτα να παρασκευαστεί εναιώρημα απομονωμένων (όχι συσσωματώματα) κυττάρων.

Μία συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από 5 κύρια συστατικά μέρη:

- μία ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid), η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα - ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- ένα οπτικό σύστημα - συνήθως χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου), υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό λέιζερ), αερόψυκτα

λείζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488nm), ερυθρού-HeNe (633nm), πράσινο-HeNe, HeCd (υπεριώδες), λείζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες) - που παράγει φωτεινά σήματα

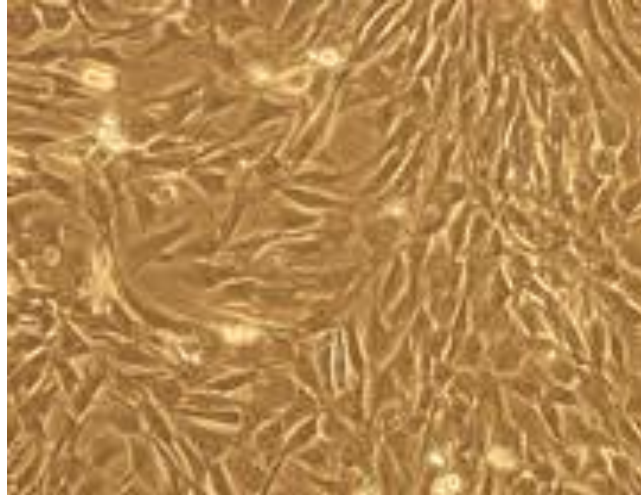
- έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion - ADC), το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία μπορούμε να τα επεξεργαστούμε με έναν Η/Υ
- ένα σύστημα ενίσχυσης - δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
- έναν Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων

Τα σύγχρονα όργανα κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά λείζερ και ανιχνευτές φθορισμού (το μέγιστο είναι 4 λείζερ και 18 ανιχνευτές φθορισμού). Η αύξηση του αριθμού των λείζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων κι έτσι δίνει τη δυνατότητα για πιο ακριβή ταυτοποίηση των πληθυσμών, που αποτελούν το στόχο βάσει του φαινοτύπου τους. Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφήσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων.

Πειραματική Διαδικασία

Καλλιέργεια κυττάρων

Μυϊκά κύτταρα της σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12 θα καλλιεργηθούν και θα πολλαπλασιαστούν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) και συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα (5%) σε ειδικό επωαστήριο χωρισμένα σε φλάσκες επιφάνειας 25 cm². Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μία αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe and Saxel 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Τα C2C12 κύτταρα όπως φαίνονται σε οπτικό μικροσκόπιο.

Η καλλιέργεια θα πραγματοποιηθεί για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό, που περιέχει DMEM (4 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100 µg/ml). Στη συνέχεια θα απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό που περιέχει FBS και θα αντικατασταθεί με θρεπτικό υλικό που περιέχει εκχύλισμα στεμφύλων συγκεντρώσεων 2,5 και 10 µg/ml. Στα κύτταρα ελέγχου, το θρεπτικό υλικό θα αντικατασταθεί με απλό θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Αφού τα κύτταρα επωαστούν και πολλαπλασιαστούν για 24 ώρες με το εκχύλισμα θα ακολουθήσει η διαδικασία συλλογής και προετοιμασίας τους για των προσδιορισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με την κυτταρομετρία ροής.

Προετοιμασία των κυττάρων για μέτρηση ROS και GSH στο Κυτταρόμετρο

Μετά το πέρας 24 ωρών καλλιέργειας των κυττάρων με το προς μελέτη εκχύλισμα, τα κύτταρα συλλέγονται με τη χρήση θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που διασπά τις πρωτεΐνες, με τις οποίες τα κύτταρα συνδέονται στον πάτο της φλάσκας. Η διαδικασία γίνεται ως εξής:

1. Αφαιρούμε με πιπέτα το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και προσθέτουμε 1 ml PBS (ρυθμιστικό διάλυμα) με σκοπό την πλύση των κυττάρων και την απομάκρυνση των υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού.
2. Απομακρύνουμε με πιπέτα το PBS, προσθέτουμε 0,5 ml θρυψίνης 0,25% και επωάζουμε τα κύτταρα στον κλίβανο για 3 λεπτά.
3. Προσθέτουμε στη φλάσκα 3 ml θρεπτικού υλικού που περιέχει FBS. Πραγματοποιούμε ήπιες αναδεύσεις και συλλέγουμε τα κύτταρα σε φιαλίδιο falcon των 15 ml.

- 4) Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα (300 g, 10 λεπτά, 5°C).
- 5) Απομακρύνουμε με πιπέτα το υπερκείμενο και προσθέτουμε 3 ml PBS, αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε (300 g, 10 λεπτά, 5°C). Στη συνέχεια, απομακρύνουμε με πιπέτα το υπερκείμενο και αποθηκεύουμε τα κύτταρα στους -80°C.

Την ημέρα της μέτρησης

1. Βγάζουμε τα κύτταρα από τους -80°C και τοποθετούμε τα φιαλίδια falcon απευθείας στον πάγο.
2. Προσθέτουμε σε κάθε falcon 300 μl PBS και αναδεύουμε με την πιπέτα.
3. Χωρίζουμε το περιεχόμενο του falcon σε δύο φιαλίδια κατάλληλα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο (150 μl για τη μέτρηση των ROS και 150 μl για τη μέτρηση της GSH).
4. Προσθέτουμε 15 μl χρωστικής DCFda στα φιαλίδια, στα οποία θα μετρήσουμε τις ROS και 15 μl χρωστικής Mercury Orange στα φιαλίδια, στα οποία θα μετρήσουμε την GSH.
5. Ανακινούμε απαλά με το δάχτυλο και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37°C για 30 min.
6. Προσθέτουμε 250 μl PBS σε κάθε φιαλίδιο.
7. Φυγοκεντρούμε (300 g, 5 λεπτά, 5°C).
8. Αναποδογυρίζουμε τα φιαλίδια για να χύσουμε το υπερκείμενο.
9. Προσθέτουμε εκ νέου 250 μl PBS σε κάθε φιαλίδιο και μεταφέρουμε τα φιαλίδια (στον πάγο) στο κυτταρόμετρο για τις μετρήσεις.

Χρωστικές

A) DCFda (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 400 mM. Η χρωστική DCFda χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό προσδιορισμό των ROS. Για την παρασκευή 10 ml της χρωστικής, ζυγίζουμε 1,9 mg και τα διαλύουμε σε 10 ml μεθανόλης.

B) Mercury Orange. Η χρωστική Mercury Orange χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της GSH. Για την παρασκευή 10 ml της χρωστικής ζυγίζουμε 8 mg και τα διαλύουμε σε 10 ml ακετόνης.

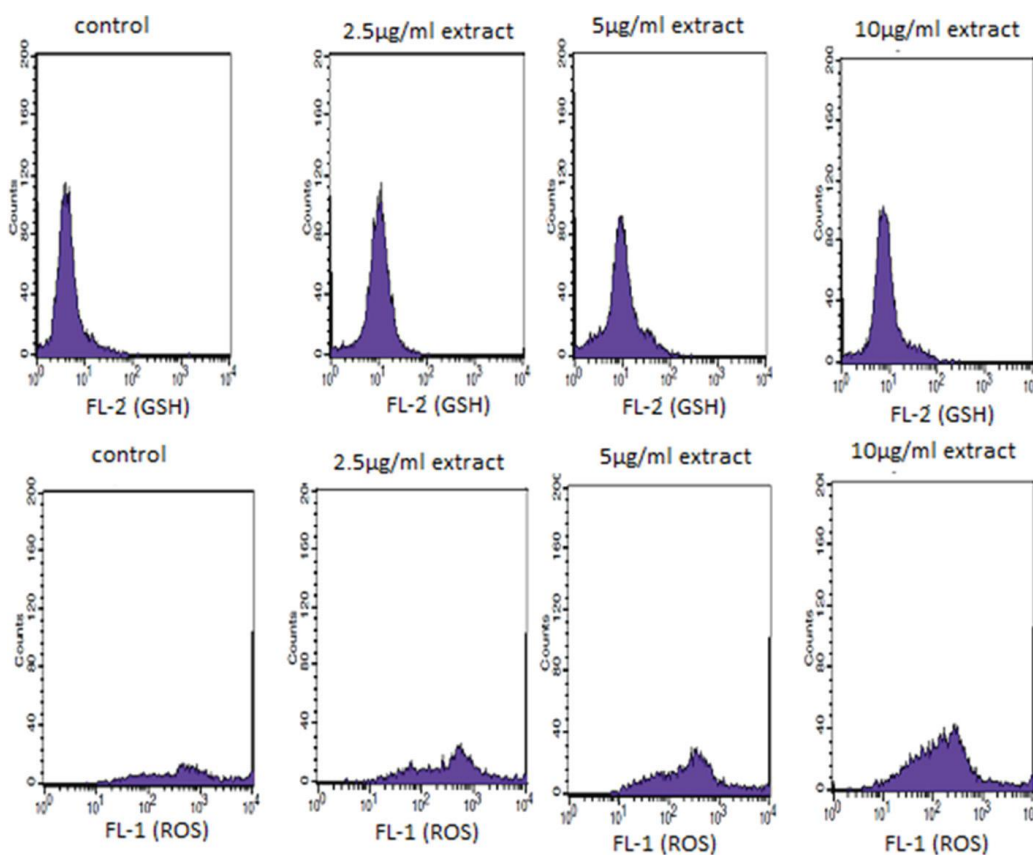
Προετοιμασία Κυτταρομέτρου

1. Ανοίγουμε το διακόπτη, το κυτταρόμετρο και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
2. Αδειάζουμε το Waste και βάζουμε γλωρίνη.

3. Γεμίζουμε το δοχείο του Sheath μέχρι τη γραμμή.
4. Ανοίγουμε το μαύρο διακόπτη προς τα εμπρός.
5. Ανοίγουμε το φίλτρο για να δούμε αν υπάρχει πίεση και το ξανακλείνουμε.
5. Κάνουμε prime 4 φορές με σωληνάκι που περιέχει νερό.
6. Γεμίζουμε ένα σωληνάκι με 3ml νερό και πατάμε RUN για 10 λεπτά.

Κλείσιμο Κυτταρομέτρου

1. Βάζουμε 3 ml FACS clean σε ένα σωληνάκι και κάνουμε RUN σε ταχύτητα HIGH για 10 λεπτά, στην αρχή με ανοιχτό τον βραχίονα και μετά με κλειστό.
2. Επαναλαμβάνουμε το ίδιο με FACS rinse και απιονισμένο νερό.
3. Φροντίζουμε να μείνουν 0,5 ml νερό στο σωληνάκι.
4. Κλείνουμε τον υπολογιστή (αν δεν προχωρήσουμε στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων), τη βαλβίδα αέρα, το διακόπτη του οργάνου και το γενικό διακόπτη. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Cell Quest Pro.



Ενδεικτικά διαγράμματα

Στην εικόνα παρουσιάζονται διαγράμματα από μια μελέτη του εργαστηρίου για την αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος στεμφύλων σε μυϊκά κύτταρα C2C12

(Goutzourelas et al. 2014). Σε κάθε διάγραμμα ο άξονας x αντιστοιχεί στις διάφορες τιμές φθορισμού ενώ ο άξονας y αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων που παρουσιάζουν συγκεκριμένα επίπεδα φθορισμού. Η πάνω σειρά διαγραμμάτων αναφέρεται στα επίπεδα GSH και η κάτω στα επίπεδα ROS.

3^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

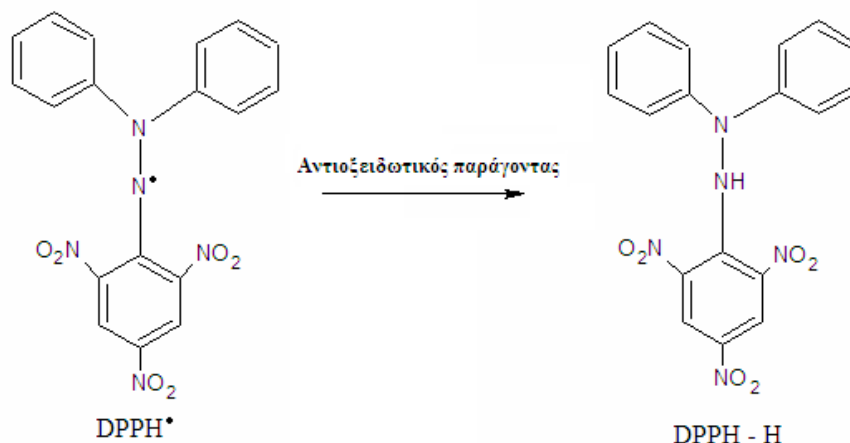
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΥΜΩΝ ΚΑΙ ΚΑΦΕ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH^{*}

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH^{*} πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (1995). Η μέθοδος αποτελεί μία παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές δοκιμασίες για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων, φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και χυμών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά (Spanou et al. 2008; Veskoukis et al. 2012b).

Αρχή της Μεθόδου

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή δειγμάτων με τη σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH^{*}). Η ρίζα DPPH^{*} μπορεί να αδρανοποιηθεί μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al. 2005). Είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου, η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 520 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH^{*}) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται στην 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 τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 ml, στον οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH^{*} και το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. 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 520 nm.



Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH[•] (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM 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).

Παρασκευή Διαλύματος DPPH[•] (2 mM)

Σε 25,4 ml μεθανόλης διαλύουμε 20 mg DPPH. Καλύπτουμε το ποτήρι ζέσεως με αλουμινόχαρτο καθώς το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

Πειραματική Διαδικασία

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Τυφλό (Blank)	Δείγμα ελέγχου (Control)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Δείγμα	-	-	50 μl	50 μl	50 μl
Μεθανόλη	1000 μl	950 μl	900 μl	900 μl	900 μl
DPPH [•]	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

2. Αναδεύουμε καλά στο vortex και επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Μηδενίζουμε με το τυφλό (blank) που περιέχει μόνο μεθανόλη στα 520 nm και φωτομετρούμε τα δείγματα.

- Επειδή υπάρχει πιθανότητα τα συστατικά των εξεταζόμενων δειγμάτων να απορροφούν στα 520 nm, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος χωρίς την παρουσία της ρίζας DPPH[•]. Η μέτρηση αυτή γίνεται ως ακολούθως:

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Δείγμα	50 μl	50 μl	50 μl
Μεθανόλη	950 μl	950 μl	950 μl

2. Αναδεύουμε καλά στο vortex, επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Μηδενίζουμε με το τυφλό (blank) που περιέχει μόνο μεθανόλη στα 520 nm και φωτομετρούμε τα δείγματα.

Υπολογισμοί

Η % αναγωγή (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση control} \times 100$$

4^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (ΤΑC) ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Βιοχημικό υπόβαθρο

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως συνόλου (Veskoukis et al. 2008).

Αρχή της μεθόδου

Η TAC των ιστών στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη ρίζα DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων, που υπάρχει στους ιστούς, η ρίζα DPPH[•] ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 520 nm (Janaszewska and Bartosz 2002; Veskoukis et al. 2016). Τα δείγματα περιλαμβάνουν 4 ιστούς (σκελετικός μυς, καρδιά, ήπαρ και νεφρός) από κοτόπουλο και αρνί. Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι να διευκρινιστούν διαφορές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων ιστών καθώς και των δύο ειδών ζώων. Στους ιστούς υπάρχουν πολλά αντιοξειδωτικά μόρια, που όμως συνεισφέρουν διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffer 10 mM pH = 7,4)

MB (KH₂PO₄): 136 και MB (Na₂HPO₄): 178. Για να φτιάξουμε 500 ml του διαλύματος φτιάχνουμε 100 ml KH₂PO₄ (10 mM) και 400 ml Na₂HPO₄ (10 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0,136 g και τα διαλύουμε σε 100 ml απιονισμένου νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 0,712 g και τα διαλύουμε σε 400 ml απιονισμένου νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 M μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7,4.

2. Διάλυμα DPPH 0.1 mM. MB: 394,32

Διαλύουμε 0,02 g DPPH σε 5 ml μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μl του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19,8 ml μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, το τυφλό και το δείγμα ελέγχου). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 ml είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

3. Ασκορβικό οξύ 10 mM.

Είναι έτοιμο προς χρήση.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Τυφλό (Blank)	Δείγμα θετικού ελέγχου (Positive control)	Δείγματα
Ρυθμιστικό διάλυμα	500 μl	495 μl	460 μl
DPPH*	500 μl	500 μl	500 μl
Ασκορβικό οξύ	-	5 μl	-
Ομογενοποιημένος ιστός (αραιωμένος)	-	-	40 μl

2. Ανακινούμε τα φιαλίδια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή υδραζίνη.

3. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 15.000 g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων, που θα επηρεάσουν την απορρόφηση).

4. Μεταφέρουμε 900 μl από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα, που περιέχει το ασκορβικό οξύ θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από την τιμή τόσο των δειγμάτων όσο και του τυφλού.

Ο λόγος είναι ότι το ασκορβικό οξύ είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο στη

μελετώμενη συγκέντρωση. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{ml πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 25 \times 3 \times 5] / 1000$.

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/l}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 για να λάβουμε υπόψη την αραιώση του ιστού στην κυψελίδα ($1000 \mu\text{l} / 40 \mu\text{l}$ ιστού του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να συνυπολογίσουμε την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και με 5 επειδή το δείγμα αραιώνεται κατά τη μέτρηση 1/5.

ε) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα l σε ml.

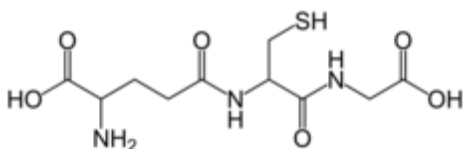
Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη γίνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: $\text{mmol DPPH} / \text{mg total protein}$.

5^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH) ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Βιοχημικό υπόβαθρο

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη (-SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες.

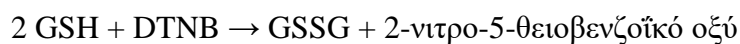


Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

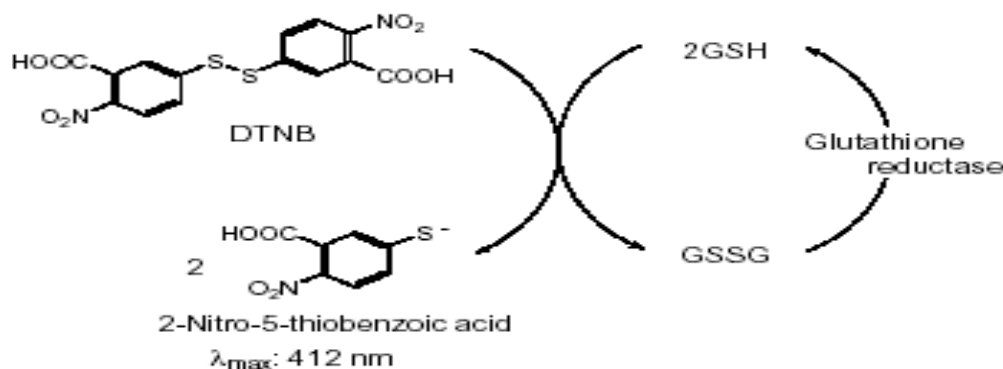
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι, επίσης, ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών καθώς και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση), το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy et.al. 2004; Veskoukis et al. 2016).



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης.

Τα δείγματα περιλαμβάνουν 4 ιστούς (σκελετικός μυς, καρδιά, ήπαρ και νεφρός) από κοτόπουλο και αρνί. Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι να διευκρινιστούν διαφορές στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης των διαφόρων ιστών καθώς και των δύο ειδών ζώων.

Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffer 67 mM pH = 8).

MB (KH_2PO_4): 136, MB (Na_2HPO_4): 178.

Για να φτιάξουμε 500 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα φτιάχνουμε 25 ml KH_2PO_4 (67 mM) και 500 ml Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0,227 g και τα διαλύουμε σε 25 ml απιονισμένου νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5,94 g και τα διαλύουμε σε 475 ml απιονισμένου νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH ή HCl, 1 M για pH = 8.

2. DTNB (1 mM, MB: 396,35) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε απιονισμένο νερό.

Διαλύουμε 39,6 mg DTNB σε 100 ml διαλύματος του κιτρικού νατρίου 1%.

3. Κιτρικό Νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate, MB: 294,1). Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο, το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε 100 μl ομογενοποιημένου ιστού σε 100 μl TCA 5% και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε ένα φιαλίδιο erpendorf για τη μέτρηση.
2. Προσθέτουμε σε φιαλίδια erpendorf τα αντιδραστήρια, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα	Τυφλό (Blank)	Δείγματα
Ρυθμιστικό διάλυμα 67 mM, pH 7.95	660 μl	660 μl
DTNB 1 mM	330 μl	330 μl
Απιονισμένο νερό	20 μl	-
Ομογενοποιημένος ιστός (αραιωμένος)	-	20 μl

2. Αναδεύουμε τα φιαλίδια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH.
3. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση GSH (μmol/mg total prot.) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta abs_{\text{τυφλού}}/13,6) \times 2 \times 3$ ή 4 (λόγω αραιώσεων) $\times 50,5$ / Συγκ. πρωτεΐνης (mg/ml).

Όπου το 5,5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μl) με τον όγκο του δείγματος (20 μl) ($1010/20=50,5$), πολλαπλασιάζουμε με 2 για να λάβουμε υπόψη την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), πολλαπλασιάζουμε με 3 για να λάβουμε υπόψη την αραιώση που έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υπολογίζεται βάσει της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης.

Πρωτόκολλο ομογενοποίησης των ιστών

Η ομογενοποίηση των ιστών γίνεται με ειδικό ομογενοποιητή. Ένα μέρος (mg) κονιορτοποιημένου ιστού διαλύεται σε τρία μέρη (μl) διαλύματος PBS pH 7,4 (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl και 1 mM EDTA) και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche Diagnostics GmbH). Ακολούθως, φυγοκεντρούμε (15.000 g, 5 min, 4°C) και συλλέγουμε το υπερκείμενο, το οποίο είναι ο ομογενοποιημένος ιστός.

Προσδιορισμός ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα, το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford 1976).

Πειραματική διαδικασία

Αραιώνουμε το προς μέτρηση δείγμα 1/20 (π.χ. προσθέτουμε 10μl δείγματος σε 190 μl H₂O). Προσθέτουμε το αντιδραστήριο Bradford και το δείγμα σε σωληνάρια eppendorf σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

	Τυφλό	Δείγμα
H ₂ O	20 μl	-
Δείγμα	-	20 μl
Αντιδραστήριο Bradford	1000 μl	1000 μl

Ακολουθεί ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έγχυση των περιεχομένων σε πλαστική κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Με το τυφλό μηδενίζουμε. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προκύπτει από την καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, Hochstein P. 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* 78:6858-62, 1981.
- 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* 33(9):1260-7, 2002.
- Bettors JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, Deering M, Yimlamai T, Powers SK. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 170:1179-1184, 2004.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54, 1976.
- Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268(10):6995-7010, 1993.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28:25-30, 1995.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605, 1979.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30(2):280-5, 2002.
- Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270(5639):725-727, 1977.
- Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10:25-40, 2001.
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioli E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, Tsioutsouliti A, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol* 33(11):1099-112, 2014.
- Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 20(2):55-9, 1988.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition.
- Hansford R, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr* 29:89-95, 1997.
- Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62:231-236, 2002.
- Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 5:156-70, 1988.

- Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:283-292, 1999.
- Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszteid K, Kładna A. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20:81-9, 2005.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32(9):790-6, 2002.
- Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 171:233-9, 2001.
- Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13:295-309, 1999.
- 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.* 38(7):579-606, 2008.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302, 2005.
- Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno, H. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 72:189-194, 1996.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 51:213-218, 2004.
- 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* 90:724-31, 2001.
- Sies H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
- Sjödin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10:236-54, 1990.
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *J Agric Food Chem* 56(16):6967-76, 2008.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790, 2002.
- Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, Chronis K, Goutzourelas N, Skaltsounis L, Kouretas D. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract *in vitro* do not correspond *in vivo* using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012:185867, 2012b.

- Veskoukis AS, Kyparos A, Paschalis V, Nikolaidis MG. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers* 21(3):208-17, 2016.
- Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 33(6):1140-54, 2008.
- Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* 17(1):11-21, 2012a.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 16(7-8):716-8, 2000.
- Viña 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.
- Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Com* 247:60-4, 1998.
- Yen GC, Duh PD. 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.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29(2):358-62, 2001.