



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

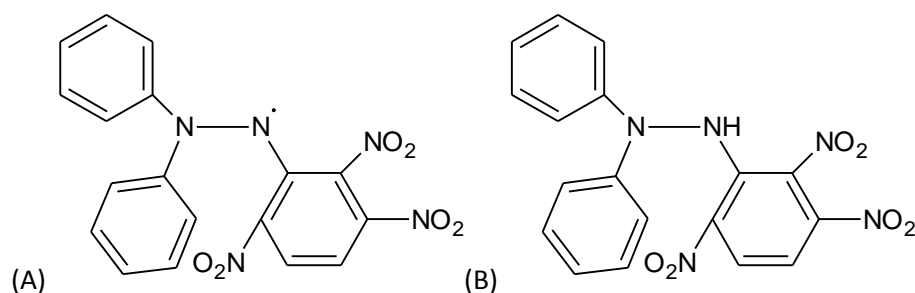
## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

## ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

### ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Σχήμα 1). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός  $e^-$ ) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 1), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση.

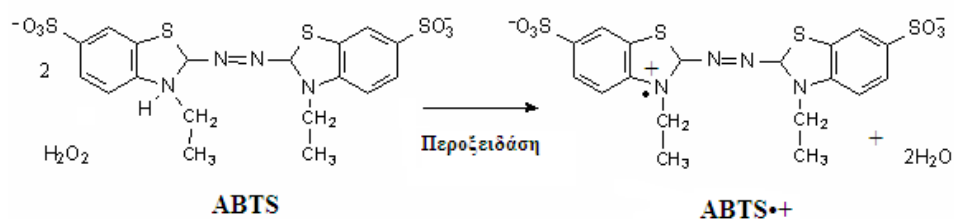


**Σχήμα 1** (A) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•). (B) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

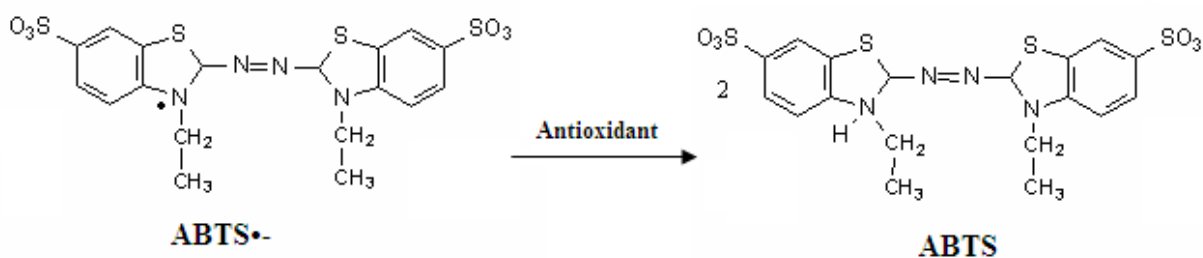
### ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ABTS<sup>•+</sup> (ABTS<sup>•+</sup> scavenging assay)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphononic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και

απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του  $ABTS^{\bullet+}$  ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται.



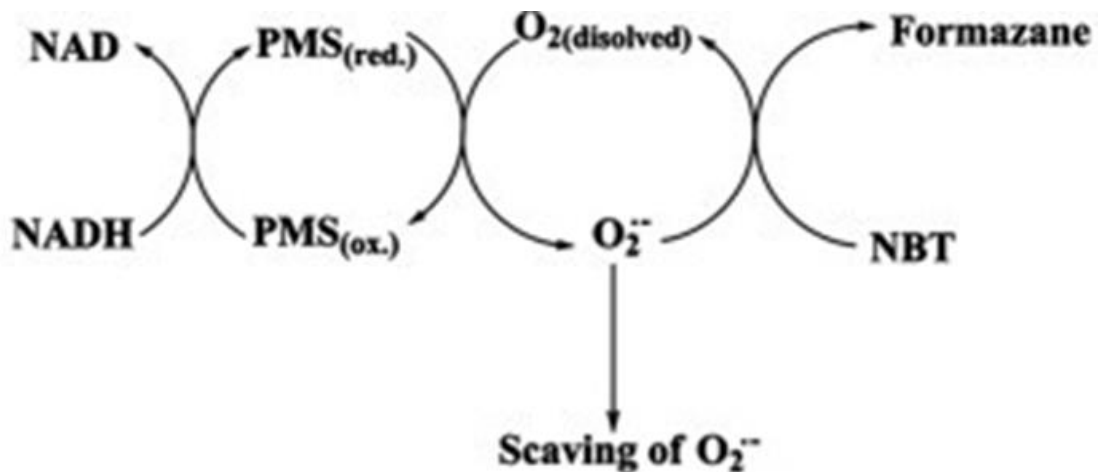
**Εικόνα:** Παραγωγή της ρίζας του  $ABTS^{\bullet+}$  μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$



**Εικόνα:** Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του  $ABTS^{\bullet+}$

### Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Η ρίζα του  $\text{O}_2^{\bullet-}$  είναι από τις πιο κοινές ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της εξουδετέρωσης της  $\text{O}_2^{\bullet-}$  βασίζεται στον σχηματισμό της  $\text{O}_2^{\bullet-}$  σε ένα σύστημα PMS-NADH με οξείδωση του NADH και αναγωγή του nitroblue tetrazolium (NBT).

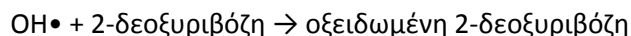
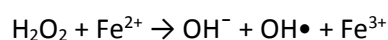


Εικ.: Η  $O_2^{\bullet-}$  ανάγει το NBT σε formazane και έτσι μειώνει την απορρόφηση του NBT στα 560nm

#### Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου ( $OH\bullet$ )

Η ρίζα του  $OH\bullet$  είναι από τις πιο κοινές και δραστικότερες ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της  $OH\bullet$  από αντιοξειδωτικά βασίζεται στην οξείδωση της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τη  $OH\bullet$  που παράγεται κατά την αντίδραση Fenton. Η οξειδωμένη 2-δεοξυριβόζη απορροφάει στα 520nm. Η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τη  $OH\bullet$  προσδιορίζεται ως το % ποσοστό μείωσης της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης.

Αντίδραση Fenton:



#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας συνδέεται με αντιοξειδωτική δράση γιατί δείχνει ότι η ουσία δρα ως δότης ηλεκτρονίων, και άρα μπορεί να ανάγει οξειδωμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες που σχηματίζονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών (π.χ. κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ . Ο  $Fe^{2+}$  αντιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο και παράγει ένα προϊόν που απορροφά στα 700nm. Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας, υπολογίζεται το

RP0.5AU, που είναι η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί απορρόφηση 0,5 στα 700 nm.

### **ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΡΙΖΕΣ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ (OH<sup>•</sup>) ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA**

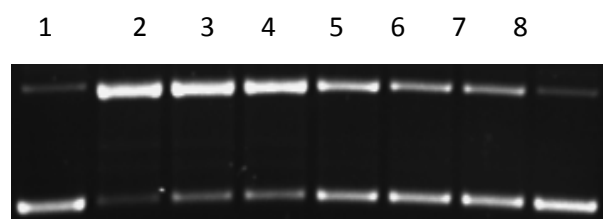
#### *Πλασμιδιακό DNA και διαμορφώσεις*

Το πλασμιδιακό DNA, είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA το οποίο βρίσκεται κυρίως σε βακτήρια και έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται από μόνο του. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα από πλασμιδιακό DNA τα οποία τα βοηθούν να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες, γιατί φέρουν συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Ακόμη με την βοήθεια των πλασμιδίων να μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο, δίνεται η δυνατότητα να μεταφέρονται πληροφορίες οι οποίες συμβάλλουν στην επιβίωσή τους.

Όταν το πλασμιδιακό DNA τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις.

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγή του μορφή.
2. Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
3. Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Επομένως το υπερελικωμένο τρέχει πρώτο, δεύτερο το γραμμικό και τρίτο το ανοιχτό κυκλικό.



1: control

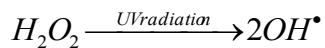
2: Plasmid + οξειδωτικός παράγοντας

3-7: Plasmid + αντιοξειδωτικός παράγοντας

8: Αντιοξειδωτικός παράγοντας

*Ρίζες υδροξυλίου (OH<sup>\*</sup>) και παραγωγή τους από φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρουσία UV ακτινοβολίας διασπάται και δίνει ρίζες OH<sup>\*</sup> οι οποίες είναι πολύ δραστικές προσβάλλοντας τόσο το DNA προκαλώντας σπασίματα, όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.



### **ΤΟ ΤΕΣΤ ΤΟΥ AMES**

Το τεστ του Ames, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του, είναι μία μέθοδος μικρής διάρκειας (short-term), αξιόπιστη και ευαίσθητη που έχει ως σκοπό την ανίχνευση χημικών ουσιών που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι εξαρτώμενα από το αμινοξύ ιστιδίνη, δηλαδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Όταν τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης τότε είναι πιθανό να συμβούν επαναμεταλλάξεις, δηλαδή νέες μεταλλάξεις στα ήδη μεταλλαγμένα γονίδια της ιστιδίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί επαναμεταλλάξεις μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Για το λόγο αυτό η μέθοδος ανήκει στη κατηγορία των τεστ αντιστροφής (reversion tests). Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Όταν μία μεταλλαξιγόνο ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό θα

προκαλέσει αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τις καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί η συγκεκριμένη ουσία.

Υπάρχουν διάφορα στελέχη *S. typhimurium*, καθένα από τα οποία είναι ευαίσθητο στην πρόκληση μεταλλάξεων από διαφορετικές κατηγορίες χημικών ουσιών. Στην πειραματική διαδικασία θα χρησιμοποιηθεί το στέλεχος TA102 το οποίο είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστιδίνης που υπάρχει σε αυτό το στέλεχος είναι η *hisG428*, η οποία είναι μία μετάλλαξη λήξης (TAA) και μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (μεταπτώσεις ή μεταστροφές). Η μετάλλαξη *hisG428* βρίσκεται στο πλασμίδιο *pAQ1* που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 με σκοπό να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις αναστροφών μεταλλάξεων. Επίσης το πλασμίδιο *pAQ1* προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Το στέλεχος TA102, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη *S. typhimurium*, φέρει χαρακτηριστικά που το καθιστούν πιο ευαίσθητο στη δράση χημικών μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης, περιέχει το πλασμίδιο *pKM101* το οποίο αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις μέσω ενίσχυσης του επιδιορθωτικού μηχανισμού βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway). Το πλασμίδιο αυτό προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευσή του.

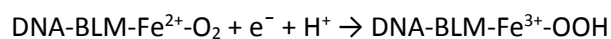
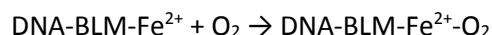
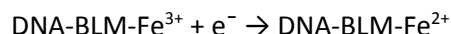
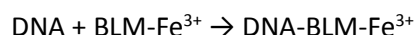
Για να θεωρηθεί μια χημική ένωση ότι είναι μεταλλαξιγόνος σύμφωνα με το τεστ του Ames θα πρέπει να πληρούνται δύο βασικά κριτήρια:

- 1) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να είναι τουλάχιστον διπλάσιος σε κάποια από τις συγκεντρώσεις της, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μάρτυρες (δηλαδή αυτές στις οποίες προστίθενται μόνο βακτήρια).
- 2) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης.

Επίσης, το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Για το σκοπό αυτό, σε κάποιες καλλιέργειες προστίθεται μία μεταλλαξιγόνος ουσία ενώ σε άλλες καλλιέργειες προστίθεται η μεταλλαξιγόνος ουσία μαζί με την πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο ουσία. Μείωση του αριθμού των επαναμεταλλαγμάτων στις δεύτερες καλλιέργειες σε σύγκριση με τις πρώτες είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης της ουσίας.

#### Μηχανισμός μεταλλαξιγόνου δράσης μπλεομυκίνης

Μια μεταλλαξιγόνος ουσία είναι η μπλεομυκίνη η οποία προκαλεί μεταλλάξεις μέσω παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Μπλεομυκίνη είναι η ονομασία μιας οικογένειας αντιβιοτικών γλυκοπεπτιδίων που παράγονται από το *Streptomyces verticillus*. Λόγω της μεταλλαξιγόνου δράσης της η μπλεομυκίνη μπορεί να θανατώνει καρκινικά κύτταρα και έτσι χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διάφορων μορφών καρκίνου. Έχει προταθεί ότι η μπλεομυκίνη προκαλεί βλάβες στο DNA σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Δηλαδή, η μπλεομυκίνη συνδέεται στο DNA και σχηματίζει σύμπλοκο με ιόντα τρισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, το σύμπλοκο ανάγεται και σχηματίζεται ένα νέο σύμπλοκο με μοριακό οξυγόνο. Μετά την αναγωγή του, το νέο σύμπλοκο ενεργοποιείται και παράγει ελεύθερες ρίζες, όπως  $\text{O}_2^{\bullet-}$  και  $\text{OH}^{\bullet}$  οι οποίες προκαλούν μονόκλωνα και δίκλωνα σπασίματα στο DNA.



## ΑΝΤΑΛΛΑΓΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ (SISTER CHROMATID EXCHANGES ή SCEs)

Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister Chromatid Exchanges ή SCEs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά, το 1958 από τον Taylor και τους συνεργάτες του. Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές είναι η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ απόλυτα ομόλογων θέσεων των δύο αδελφών χρωματίδων του χρωμοσώματος. Αποτελούν ένα φυσικό φαινόμενο άμεσα συνδεδεμένο με την αντιγραφή του DNA. Έτσι σε υγιή άτομα ο αριθμός των SCEs είναι 8-9 ανά κύτταρο. Η ανταλλαγή συμβαίνει κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA στη φάση S του κυτταρικού κύκλου πριν οι χρωματίδες ξεχωρίσουν σε δύο αυτοτελή χρωμοσώματα. Προϋπόθεση για τη δημιουργία των SCEs είναι η ρήξη των αλυσίδων του DNA και η επανασύνδεσή τους.

Η παρατήρηση των SCEs γίνεται στα μεταφασικά χρωμοσώματα (που απομονώνονται συνήθως από λεμφοκύτταρα του αίματος) με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Για να μπορέσουν οι SCEs να γίνουν ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο πρέπει να χρωματιστούν διαφορετικά οι δύο αδελφές χρωματίδες. Αυτό γίνεται με την ενσωμάτωση στο DNA της 5-βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) που είναι χημικό ανάλογο της θυμιδίνης. Μετά από μία μιτωτική κυτταρική διαίρεση, λόγω του ημισυντηρητικού αυτοδιπλασιασμού του DNA, κάθε χρωματίδα αποτελείται από μία μητρική αλυσίδα DNA και από μία θυγατρική στην οποία έχει ενσωματωθεί η BrdU. Μετά από μία δεύτερη μιτωτική διαίρεση η μία χρωματίδα έχει ενσωματωμένη BrdU στη μία αλυσίδα γιατί χρησιμοποιεί σαν μητρική αλυσίδα αυτή που έχει θυμιδίνη. Ενώ η άλλη χρωματίδα έχει ενσωματωμένη BrdU και στις δύο αλυσίδες γιατί χρησιμοποιεί σαν μητρική αλυσίδα αυτή που έχει BrdU. Η χρώση των χρωματίδων γίνεται με την τεχνική Fluorescence plus Giemsa (FPG), με την οποία συνδυάζονται διαδοχικά χρώση των παρασκευασμάτων με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258, έκθεση των παρασκευασμάτων σε υπεριώδες φως ώστε να γίνει η φωτοχημική αντίδραση μεταξύ της BrdU και της Hoechst 33258 και στη συνέχεια χρώση με Giemsa (Perry και Wolff 1974). Ο συνδυασμός της BrdU με τη Hoechst 33258 παρεμποδίζει τη δράση της Giemsa. Συνεπώς, η Giemsa χρωματίζει σκούρα τη μία χρωματίδα που έχει ενσωματωμένη BrdU μόνο στη μία αλυσίδα ενώ η χρωματίδα που έχει BrdU και στις δύο αλυσίδες παραμένει ανοιχτόχρωμη.

Οι SCEs αποτελούν μία εξαιρετικά ευαίσθητη δοκιμασία για τη διαπίστωση των βλαβών που προκαλούν ουσίες στο DNA των κυττάρων στη διάρκεια της συνθετικής φάσης S του

κυτταρικού κύκλου. Δηλαδή χρησιμοποιούνται ως κυτταρογενετικός δείκτης για την ανίχνευση μεταλλαξιόνων και καρκινογόνων ουσιών αν και αυτές καθαυτές οι SCEs δεν είναι μεταλλάξεις. Η αύξηση της συχνότητας των SCEs προκαλείται κυρίως από μεταλλαξιγόνα που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς με τις βάσεις του DNA (DNA adducts) ή παρεμβαίνουν στο μηχανισμό διπλασιασμού του DNA παρεμποδίζοντας τη δράση των ενζύμων που επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA. Ενδεικτικά, αύξηση στη συχνότητα των SCEs προκαλείται από το κάπνισμα και τα φυτοφάρμακα. Η μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία, δηλαδή υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να επισημανθεί η καρκινογόνος δράση μιας ουσίας, ενώ έχει μικρότερη εξειδίκευση δηλαδή μπορεί μία μη καρκινογόνος ουσία να δώσει θετικό αποτέλεσμα. Επίσης, αύξηση στον αριθμό των SCEs παρατηρείται σε ασθενείς με κληρονομικά νοσήματα που σχετίζονται με γενωμική αστάθεια (π.χ. σύνδρομο του Bloom, μελαγχρωματική ξηροδερμία), γεγονός που δείχνει ότι στη δημιουργία των SCEs παίζουν ρόλο οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των βλαβών του DNA.

Γενικά, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται αύξηση στον αριθμό των SCEs δεν είναι εντελώς γνωστός. Πιστεύεται ότι δημιουργούνται κοντά ή ακριβώς στο σημείο της διχάλας διπλασιασμού. Έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις, όπως ότι οι SCEs μπορεί να προκύπτουν από μετατόπιση μίας αλυσίδας του DNA σε μία διχάλα διπλασιασμού που έχει ακινητοποιηθεί ή ότι η τοποϊσομεράση II προκαλεί τη δημιουργία SCEs δημιουργώντας ταυτόχρονα σπασίματα και στις δύο αδελφές χρωματίδες κοντά στο σημείο της διχάλας διπλασιασμού με επακόλουθη επανασύνδεση. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination) ίσως είναι ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς που προκαλούν SCEs.

Εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιόνων ουσιών, οι SCEs χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων σε μελέτες in vitro, in vivo και συνδυασμένα in vivo – in vitro. Επίσης, οι SCEs χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιόνων ουσιών.

#### Δείκτης πολλαπλασιασμού των κυττάρων (PRI)

Η τεχνική με την οποία γίνεται καταμέτρηση των SCEs μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον υπολογισμό του δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Proliferation Rate Index ή PRI). Στην περίπτωση αυτή γίνεται καταμέτρηση 100 πυρήνων που μπορεί να βρίσκονται στην 1<sup>η</sup> (M1), στη 2<sup>η</sup> (M2) ή στην 3<sup>η</sup> και μετέπειτα κυτταρικές διαιρέσεις (M3). Το PRI υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$PRI = (M1 + 2M2 + 3M3) / 100$$

Δηλαδή, το PRI είναι ο μέσος όρος του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων της καλλιέργειας και με βάση αυτόν το δείκτη μπορεί να εκτιμηθεί η κυτταροστατική ή κυτταροτοξική δράση μιας ουσίας. Η ελάχιστη τιμή που μπορεί να πάρει το PRI είναι ίση με (1) που σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλη κυτταροστατικότητα στην καλλιέργεια και τα κύτταρα δεν μπορούν να προχωρήσουν πέρα από την 1<sup>η</sup> κυτταρική διαίρεση. Ενώ η μέγιστη τιμή του είναι ίση με (3) που δείχνει ότι τα κύτταρα διαιρούνται με υψηλό ρυθμό.

#### *Πειραματική διαδικασία*

#### Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων

Για τις καλλιέργειες των λεμφοκυττάρων γίνεται αιμοληψία με ηπαρινισμένη σύριγγα μιας χρήσεως κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι επόμενοι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow). 10 σταγόνες από το αίμα προστίθενται σε σωλήνες των 50ml που περιέχουν 5ml καλλιεργητικού υλικού RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 15% ορό από έμβρυο μόσχου, 4mM L-γλουταμίνη, 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0,1ml φυτοαιμογλουτίνη (PHA). Η PHA είναι μία μουκοπρωτεΐνη που δρα ως μιτογόνο διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Στις καλλιέργειες προστίθεται και 5-βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 72 ώρες. 70 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας προστίθεται 50μl διαλύματος κολχικίνης σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και η επώαση συνεχίζεται για 2 ώρες ώστε τα κύτταρα να σταματήσουν στη φάση της μετάφασης.

#### Απομόνωση χρωμοσωμάτων

Μετά τις 72 ώρες οι καλλιέργειες βγαίνουν από τον επωαστικό κλίβανο και ύστερα από ανάδευση μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 15ml και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα με ταυτόχρονη ανάδευση 5-7ml υποτονικού διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) 0,075M και αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υποτονικό διάλυμα συμβάλλει στην καταστροφή των ερυθροκυττάρων ενώ παράλληλα προκαλεί διόγκωση των λεμφοκυττάρων και βοηθάει έτσι στην καλύτερη διασπορά των χρωμοσωμάτων μέσα στα λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται

σταγόνα-σταγόνα με σύγχρονη ανάδευση 5-7ml διαλύματος μονιμοποίησης (διάλυμα Fix) που αποτελείται από μεθανόλη και οξικό οξύ σε αναλογία 3:1 αντίστοιχα. Με τη διαδικασία της μονιμοποίησης σκοτώνονται τα κύτταρα και απομακρύνονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες, ενώ τα χρωμοσώματα διατηρούν τη μορφολογία τους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το στάδιο της προσθήκης του διαλύματος Fix και της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται τουλάχιστον άλλες δύο φορές ή μέχρι να γίνει ανοιχτόχρωμο το διάλυμα, γεγονός που δείχνει ότι έχουν απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα. Μετά την τελευταία φορά που προστίθεται διάλυμα Fix, δεν ακολουθεί φυγοκέντρηση αλλά τα παρασκευάσματα τοποθετούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1500 στροφές ανά λεπτό, το υπερκείμενο απορρίπτεται έτσι ώστε να απομείνει  $\sim 0,5\text{ml}$  διαλύματος και το ίζημα εναιωρείται στο εναπομείνον διάλυμα με ανάδευση χρησιμοποιώντας πιπέττα Pasteur. 3-4 σταγόνες από το διάλυμα ενσταλλάζονται με πιπέττα Pasteur από ύψος τουλάχιστον ενός μέτρου σε αντικειμενοφόρες πλάκες (που διατηρούνται σε αιθανόλη στους  $+4^{\circ}\text{C}$ ) οι οποίες στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

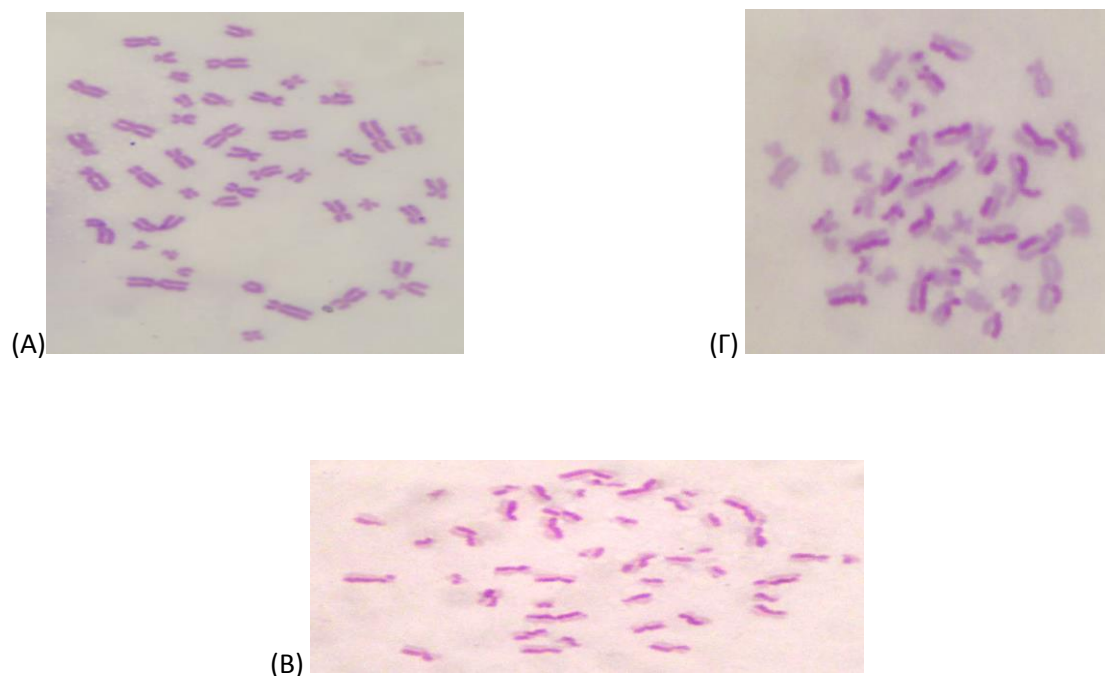
#### Fluorescence plus Giemsa χρώση

Πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετείται για 12 λεπτά διάλυμα χρωστικής Hoechst 33258 συγκέντρωσης  $100\mu\text{g/ml}$ . Απορρίπτεται η Hoechst, 2-3 σταγόνες διαλύματος McIlvaines pH 8,0 (παρασκευάζεται με ανάμιξη διαλύματος κιτρικού οξέος  $0,1\text{M}$  και μονόξινου φωσφορικού νατρίου  $0,25\text{M}$  σε αναλογία 15:85 αντίστοιχα) ενσταλλάζονται πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες και ακολουθεί η τοποθέτηση καλυπτρίδων. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται κάτω από λάμπα (Osram 300W) υπεριώδους φωτός για 1 ώρα και 15 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρούνται οι καλυπτρίδες και οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται για 8 λεπτά σε διάλυμα χρωστικής Giemsa 3%/v (3ml Giemsa προστίθενται σε 97ml ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen pH 6,8). Μετά τη χρώση οι αντικειμενοφόρες ξεπλένονται με νερό βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX41 σε μεγέθυνση X100 (καταδυτικός φακός σε λάδι μικροσκοπίου).

#### Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για να υπολογιστεί η συχνότητα των SCEs ανά πυρήνα (δηλαδή ανά 46 χρωμοσώματα) σε μία καλλιέργεια, μετρούνται οι SCEs σε 30 πυρήνες  $2^{\text{ns}}$  μιτωτικής

διαίρεσης που περιέχουν τουλάχιστον 42 χρωμοσώματα και στη συνέχεια υπολογίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση. Στους πυρήνες που έχουν λιγότερα από 46 χρωμοσώματα, πολλαπλασιάζουμε τον ολικό αριθμό των ανταλλαγών επί 46 και διαιρούμε το γινόμενο με τον αριθμό των χρωμοσωμάτων.



**Σχήμα 1.** (Α) Πυρήνας 1<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Οι χρωματίδες σε όλα τα χρωμοσώματα είναι σκουρόχρωμες. (Β) Πυρήνας 2<sup>ης</sup> μιτωτικής διαίρεσης. Σε όλα τα χρωμοσώματα η μία χρωματίδα είναι σκουρόχρωμη και η άλλη ανοιχτόχρωμη (εκτός από τα σημεία των χρωματιδιακών ανταλλαγών). (Γ) Πυρήνας 3<sup>ης</sup> και μετέπειτα κυτταρικής διαίρεσης. Υπάρχουν χρωμοσώματα όπου και οι δύο χρωματίδες είναι ανοιχτόχρωμες.

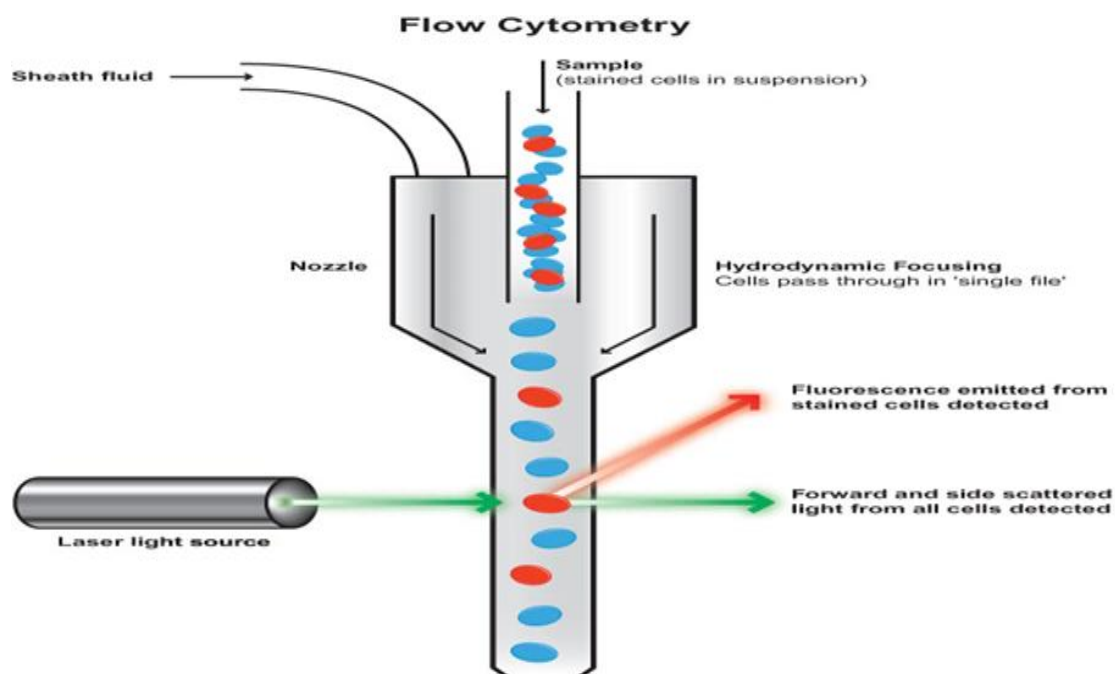
#### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΒΛΑΒΩΝ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Η μέθοδος OxyBlot Protein Oxidation Detection χρησιμοποιείται για γρήγορο και ευαίσθητο προσδιορισμό των βλαβών που προκαλούνται σε πρωτεΐνες από ελεύθερες ρίζες. Μία από τις τροποποιήσεις που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τις ROS είναι ο σχηματισμός καρβονυλίων. Αυτές οι καρβονυλικές ομάδες μπορούν να προσδιοριστούν αντιδρώντας με τη 2,4-δινιτροφαιλυδραζίνη (DNPH) και παράγοντας δινιτροφαιλυδραζόνη (DNP-hydrazone). Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αντισώματα ειδικά για την ομάδα DNP-hydrazone.

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η δράση αντιοξειδωτικών ουσιών μπορεί να υπολογιστεί σε κύτταρα με τον προσδιορισμό βιοδεικτών οξειδωτικού στρες όπως τα επίπεδα των ROS και της GSH. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να προσδιοριστεί είτε σε φυσιολογικά κύτταρα ή σε κύτταρα που έχουν δεχτεί την επίδραση ενός προ-οξειδωτικού παράγοντα. Συνήθως, μείωση στα επίπεδα των ROS και αύξηση στα επίπεδα της GSH υποδηλώνει αντιοξειδωτική δράση μιας ουσίας.

Κυτταρομετρία ροής είναι η διαδικασία μέτρησης φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Στη κυτταρομετρία ροής οι μετρήσεις γίνονται καθώς τα κύτταρα ρέουν ενώ βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα. Είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών χιλιάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο καθώς αυτά περνάνε από μια δέσμη laser.



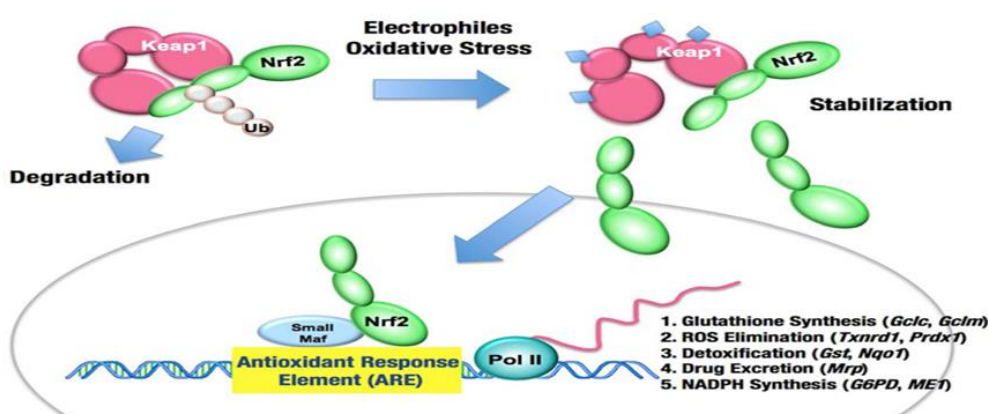
Για τον προσδιορισμό του συνολικού επιπέδου των ROS στα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούμε τη χρωστική 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Η DCFDA μετά την είσοδό της στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS σε 2,7-dichlorofluorescein (DCF). Η DCF είναι μια φθορίζουσα χρωστική (excitation 495nm, emission 529nm) που μπορεί να προσδιοριστεί με κυτταρομετρία ροής. Άρα, από τα επίπεδα της DCF υπολογίζονται τα επίπεδα των ROS: όσο μεγαλύτερη η τιμή της DCF, τόσο περισσότερες οι ROS.

Για τον προσδιορισμό της GSH χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική mercury orange (excitation 488nm, emission 580nm) η οποία συνδέεται με τη GSH. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της mercury orange, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της GSH.

**ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΣ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ: Nrf2/ARE: ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ ΚΛΕΙΔΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor 2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στο DNA στο στοιχεί απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (antioxidant response element, ARE) και έτσι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Αυτός ο μηχανισμός είναι μεγάλης σημασίας για την κυτταρική προστασία από το οξειδωτικό στρες και την επιβίωση των κυττάρων.

Ο Nrf2 συνδέεται στο κυτταρόπλασμα με έναν αναστολέα του, το Keap1. Μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες ο Nrf2 φωσφορυλιώνεται ή/και αλλάζει η δομή του Keap1, και τα δύο μόρια αποσυνδέονται. Τότε ο Nrf2 μετακινείται στον πυρήνα, σχηματίζει ετεροδιμερή και συνδέεται στο ARE, και ενεργοποιεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων. Χρειάζονται 15 λεπτά για να γίνει η παραπάνω διαδικασία. Έτσι, με την ενεργοποίηση του Nrf2 προστατεύεται το κύτταρο από βλάβες που προκαλούνται από τις ROS, δεν προκαλείται απόπτωση και εξασφαλίζεται η επιβίωση του κυττάρου.



Μοριακός μηχανισμός δράσης του Nrf2.

## **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ**

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA. Ωστόσο, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και τη μυική συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό αλλά τον βοηθούν και στην ομαλή λειτουργία του.

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια σειρά από βιοχημικούς δείκτες. Για παράδειγμα, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Εκτός από το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα οι παραπάνω δείκτες μπορούν να προσδιοριστούν σε αιώρημα κυττάρων που έχουν διαρρηχθεί με υπερήχους. Σε αυτή την εργαστηριακή άσκηση θα παρουσιαστεί η μέθοδος προσδιορισμού των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα. Στην επόμενη εργαστηριακή άσκηση θα παρουσιαστούν οι μέθοδοι προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, προσδιορισμός της δράσης της καταλάσης σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα αίματος.



#### *ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (TAC) ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ*

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο δύσκολος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH<sup>\*</sup>) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

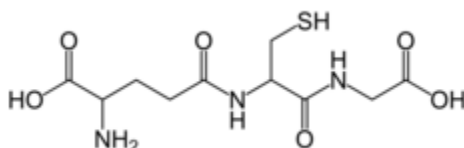
#### *ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS) ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ*

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης

προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH) ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. 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 σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.

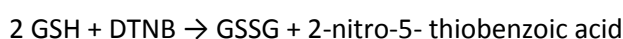


Εικ. Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

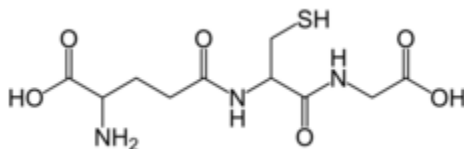
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.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

#### Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. 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.



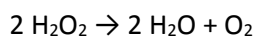
Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



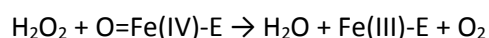
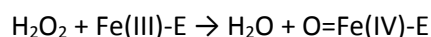
Εικ. Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια  $H_2O_2$  το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το  $H_2O_2$ . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του  $H_2O_2$  από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο).

#### Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 $\mu$ L
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 $\mu$ L

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
3. Προσθέτουμε 5  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

#### *ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ)*

Μια από τις κύριες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που προκαλούνται από τις ROS είναι ο σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μπορούν να προσδιοριστούν με αντίδραση με 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), κατά την οποία παράγεται dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone) που απορροφά στα 375nm. Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, το DNPH προστίθεται στο πλάσμα και μετά από επώαση μετράται η απορρόφηση στα 375nm.

#### **Η ΑΣΚΗΣΗ ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

Η σωματική άσκηση προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την άσκηση δρουν με 2 διαφορετικούς τρόπους:

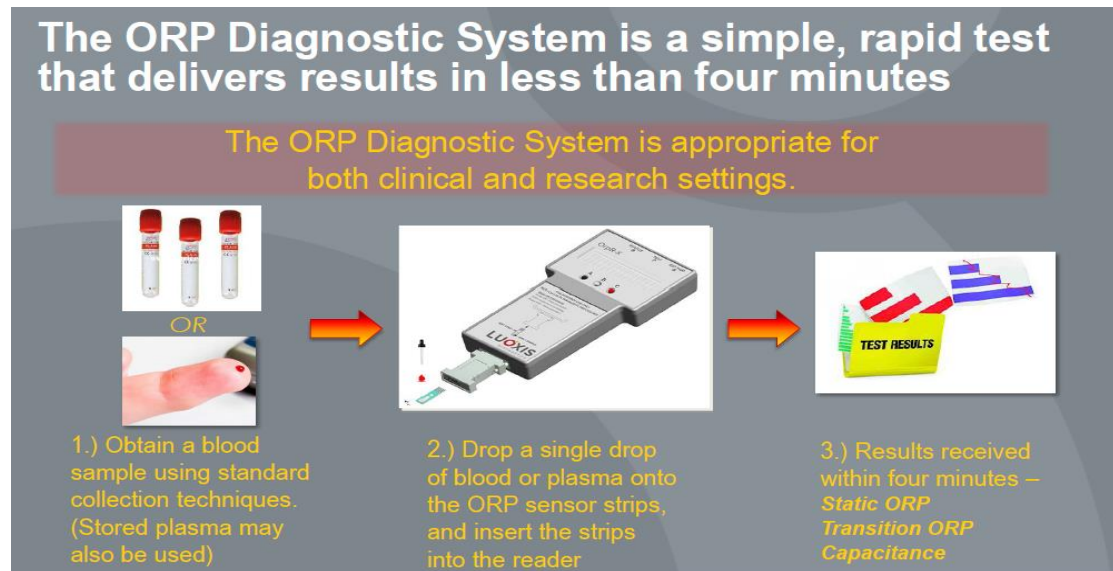
- i) Η άσκηση υψηλής έντασης προκαλεί μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών που προκαλούν οξειδωτικό στρες και βλάβη στον οργανισμό.
- ii) Η άσκηση μικρής έντασης ενεργοποιεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων και άλλων προσαρμοστικών μηχανισμών.

Αυτές οι επιπτώσεις μπορεί να έχουν πρακτική εφαρμογή :

Η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι χρήσιμη στην εξαντλητική άσκηση (η οποία προκαλεί βλάβη), αλλά ίσως όχι χρήσιμη στην άσκηση μέτριας έντασης (επειδή έτσι δεν ενεργοποιούνται οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί του οργανισμού). Γενικά, η άσκηση αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο για να κατανοήσουμε το οξειδωτικό στρες και τις κυτταρικές προσαρμογές σε αυτό.

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ORP

Η μέθοδος Oxidative Reduction Potential (ORP) είναι μία απλή και γρήγορη μέθοδος που προσδιορίζει το οξειδωτικό στρες σε λιγότερο από 4 λεπτά.



Η μέθοδος ORP μπορεί να έχει κλινικές εφαρμογές. Έτσι, η μέθοδος ORP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί η επιδείνωση της υγείας ενός ασθενούς λόγω οξειδωτικού στρες, πριν αυτή διαπιστωθεί από τις συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε ασθενείς με σοβαρά προβλήματα υγείας (π.χ. μονάδες εντατικής θεραπείας).