



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

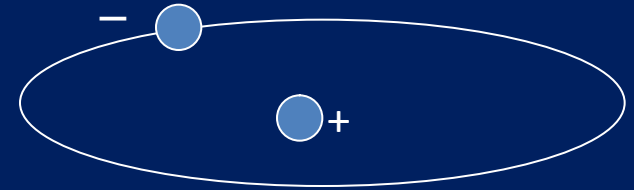
*ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ*

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



## Τι είναι ελεύθερες ρίζες;

- Ελεύθερη ρίζα είναι κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια



- Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου
- Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων είναι:  
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ ,  $\text{RO}^{\bullet}$ ,  $\text{ROO}^{\bullet}$ ,  $\text{NO}^{\bullet}$
- Υπάρχουν ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό τους  
π.χ.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$

# Σχηματισμός ελευθέρων ριζών



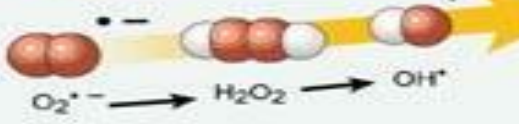
Ιονίζουσα ακτινοβολία

Κάπνισμα

Μεταβολισμός



Μιτοχόνδριο



Φλεγμονή



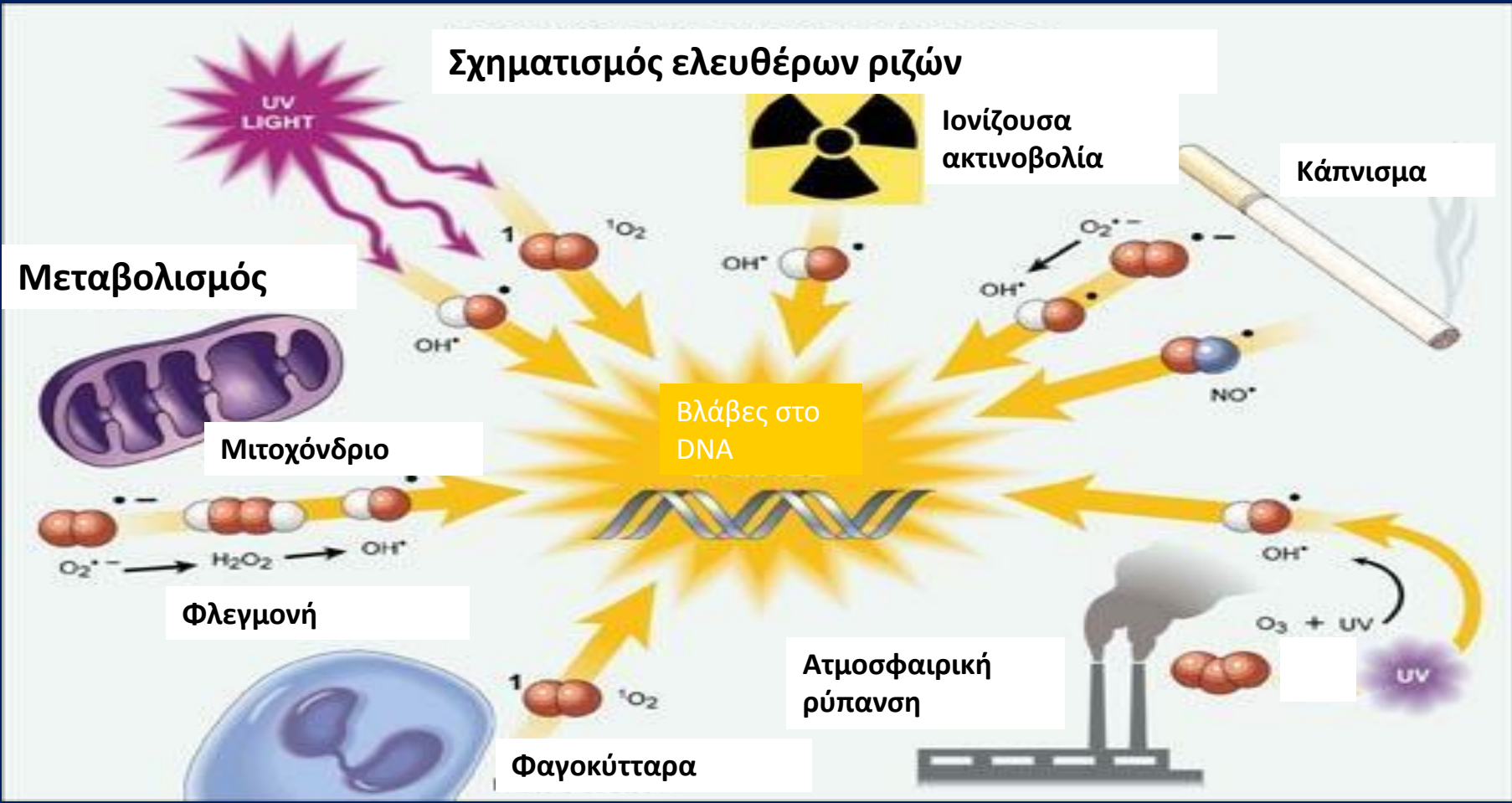
Φαγοκύτταρα

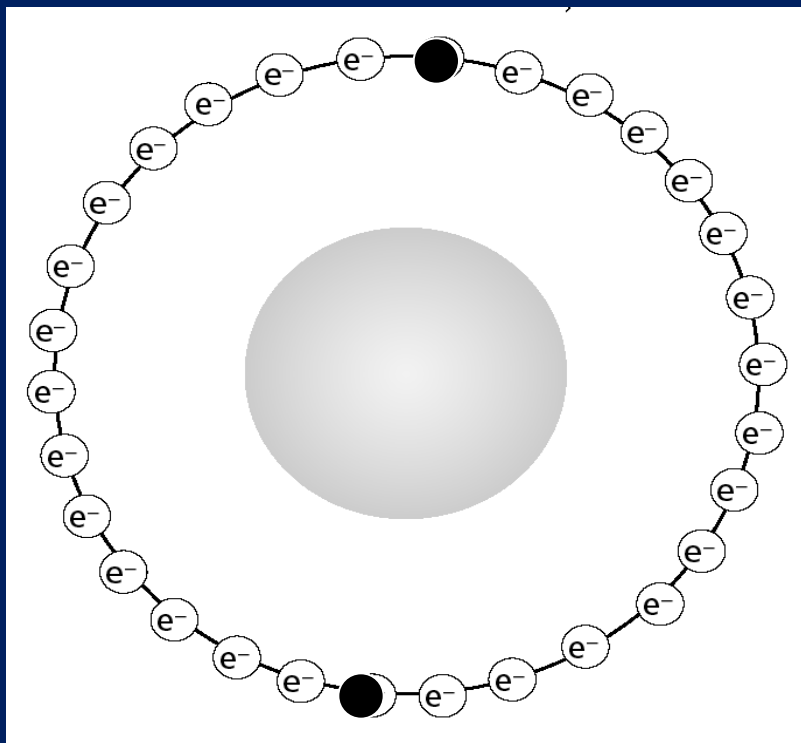
Ατμοσφαιρική ρύπανση



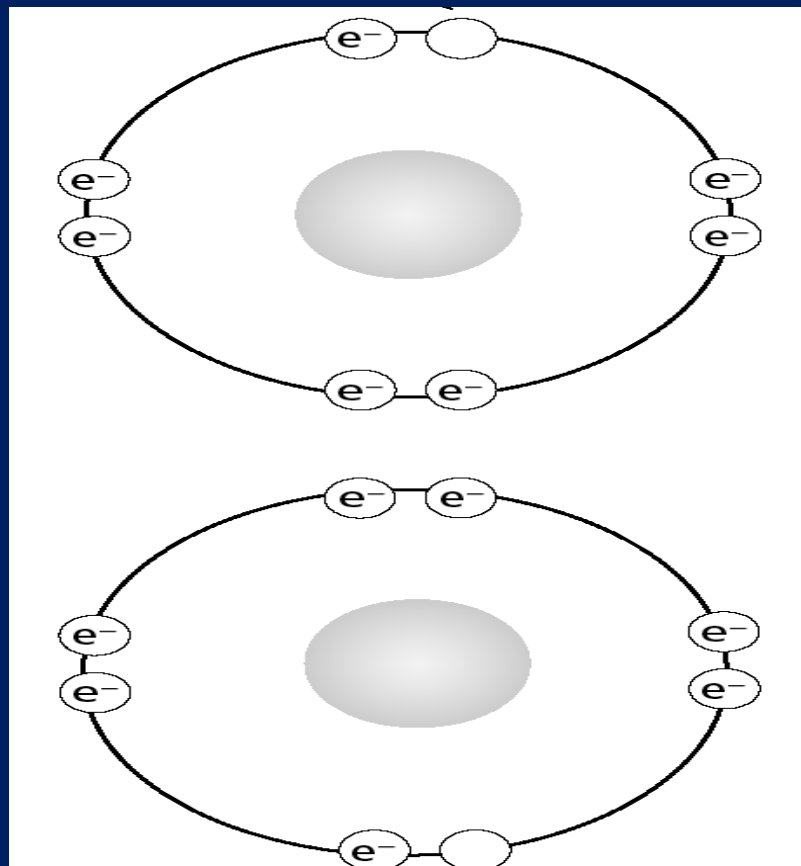
UV

Βλάβες στο DNA





Αντιοξειδωτικό



Ελεύθερες ρίζες

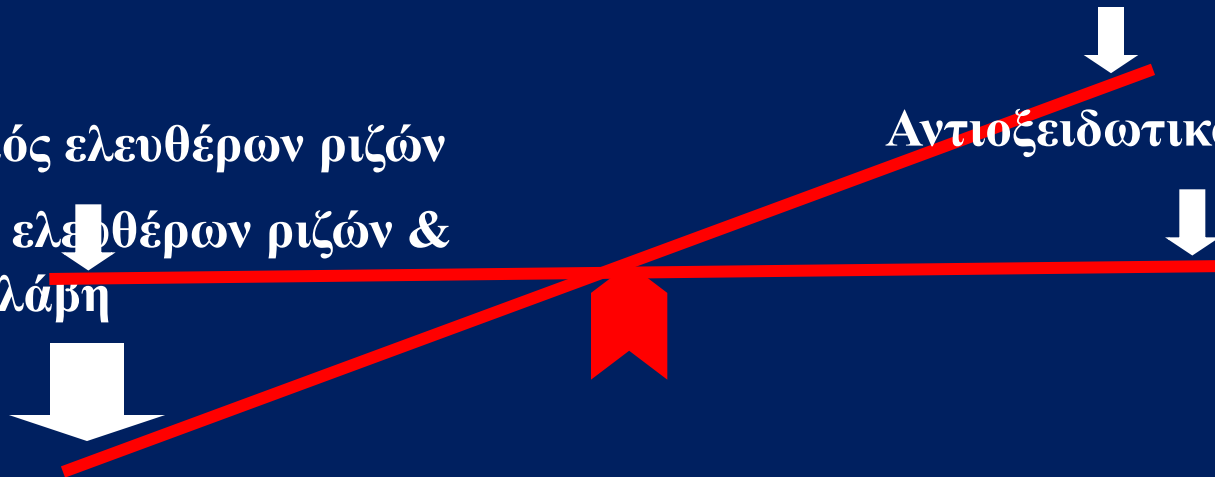
# Οξειδωτικό στρες

Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Σχηματισμός ελευθέρων ριζών &  
οξειδωτική βλάβη

Μείωση των  
αντιοξειδωτικών μηχανισμών

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

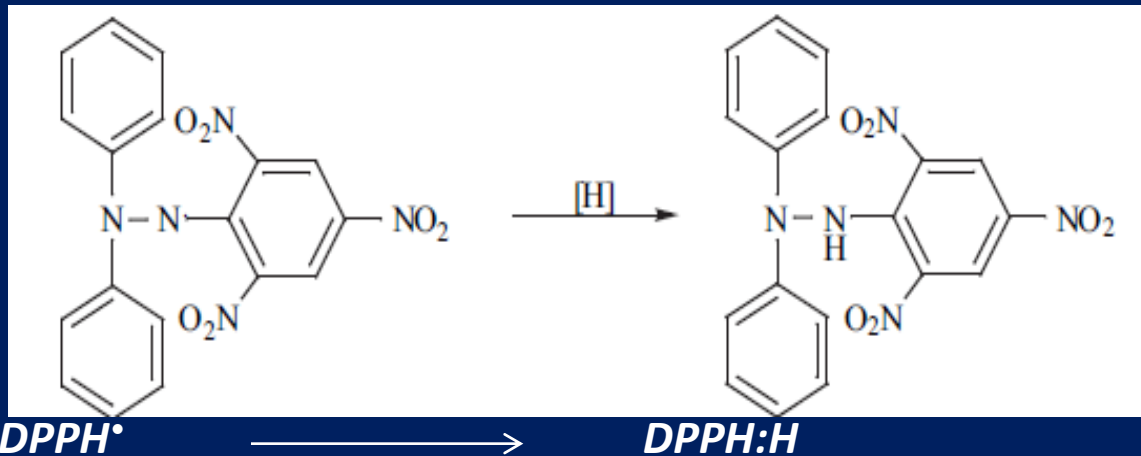


# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

- Μια σειρά από φασματοφωτομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες
- Μέθοδος του DPPH
- Μέθοδος του ABTS
- Εξουδετέρωση της  $\text{OH}\cdot$
- Εξουδετέρωση της  $\text{O}_2\cdot^-$

# Η Μέθοδος DPPH

- Η σταθερή ρίζα **DPPH<sup>•</sup>** αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται)
  - είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET)
  - είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT)
- Με φασματοφωτομετρία (μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας DPPH μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο

1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη



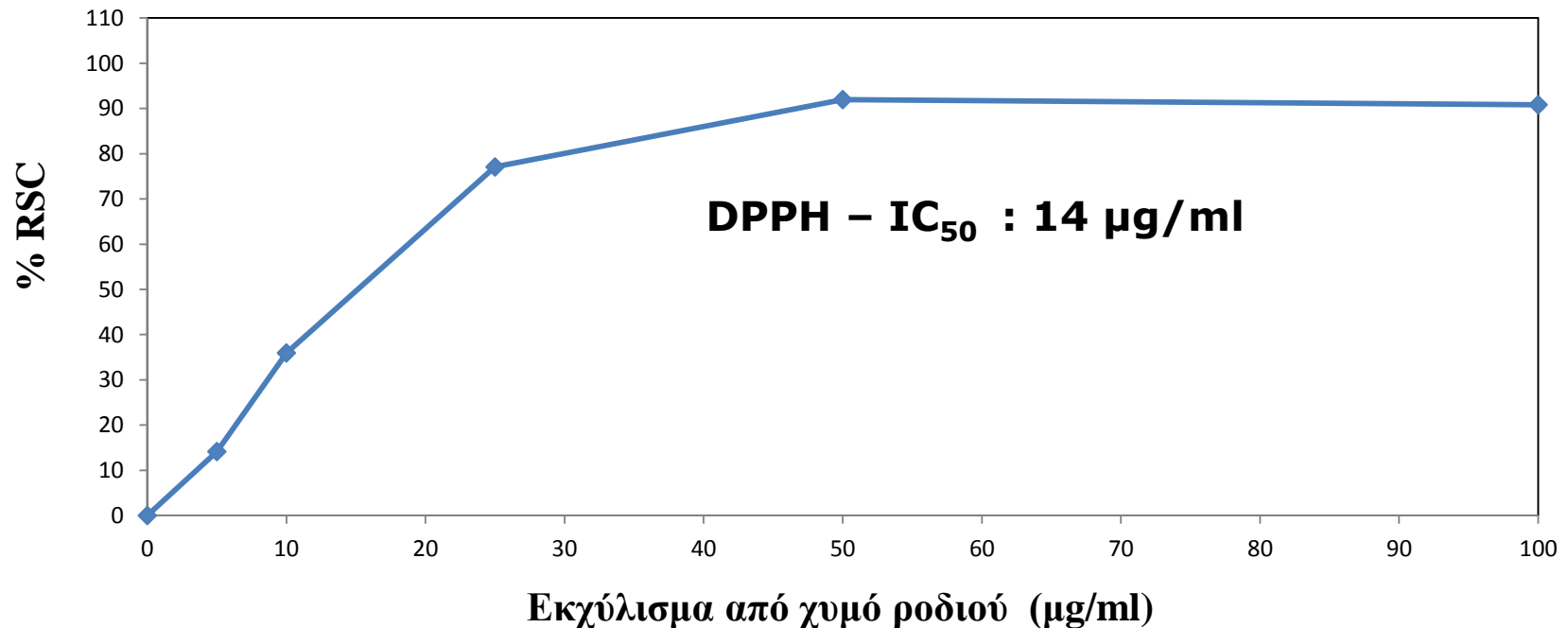
# Η Μέθοδος DPPH

• Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{RSC}\% = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

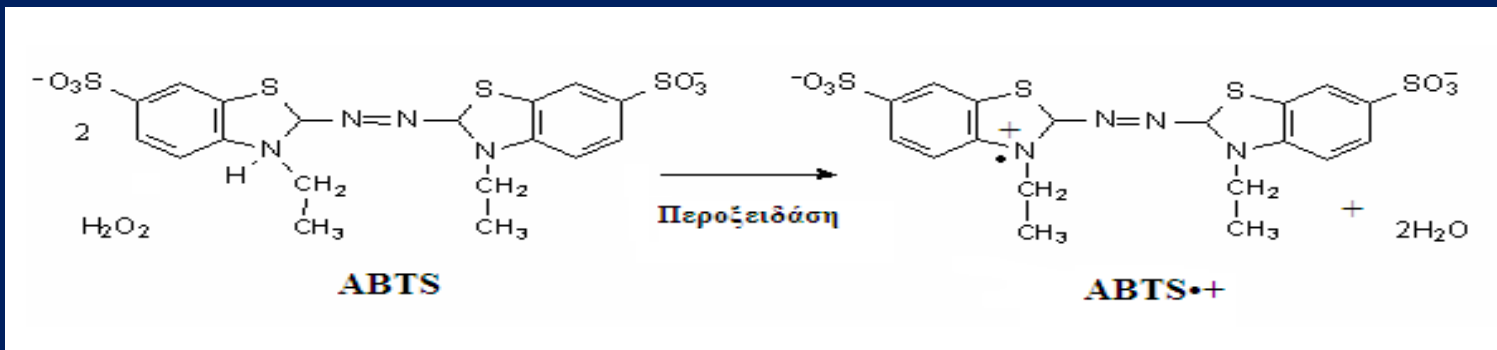
• Όπου Acontrol and Asample είναι οι τιμές της απορρόφησης για το μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα.

• Επίσης, για να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών εκχυλισμάτων, υπολογίζουμε το IC50, τη συγκέντρωση δηλαδή που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το %ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.



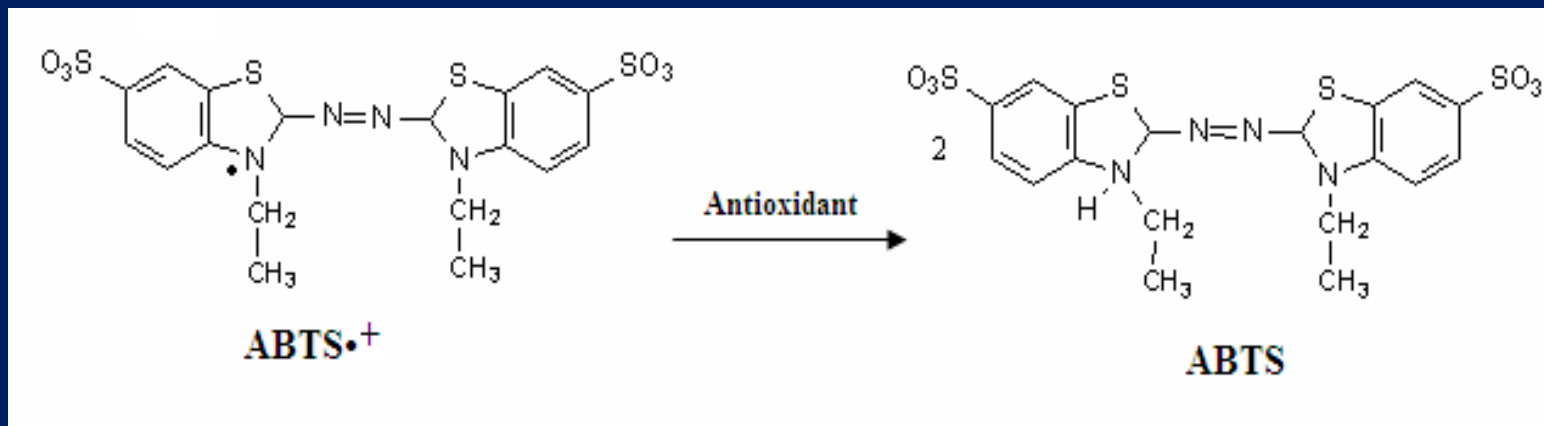
# Η Μέθοδος ABTS

- Το **ABTS** παρουσία *υπεροξειδίου του υδρογόνου* ( $H_2O_2$ ) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (**HRP**), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα **ABTS<sup>•+</sup>**



[2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]

- Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού η ρίζα **ABTS<sup>•+</sup>** ανάγεται και αποχρωματίζεται. Με φασματοφωτομετρία (μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



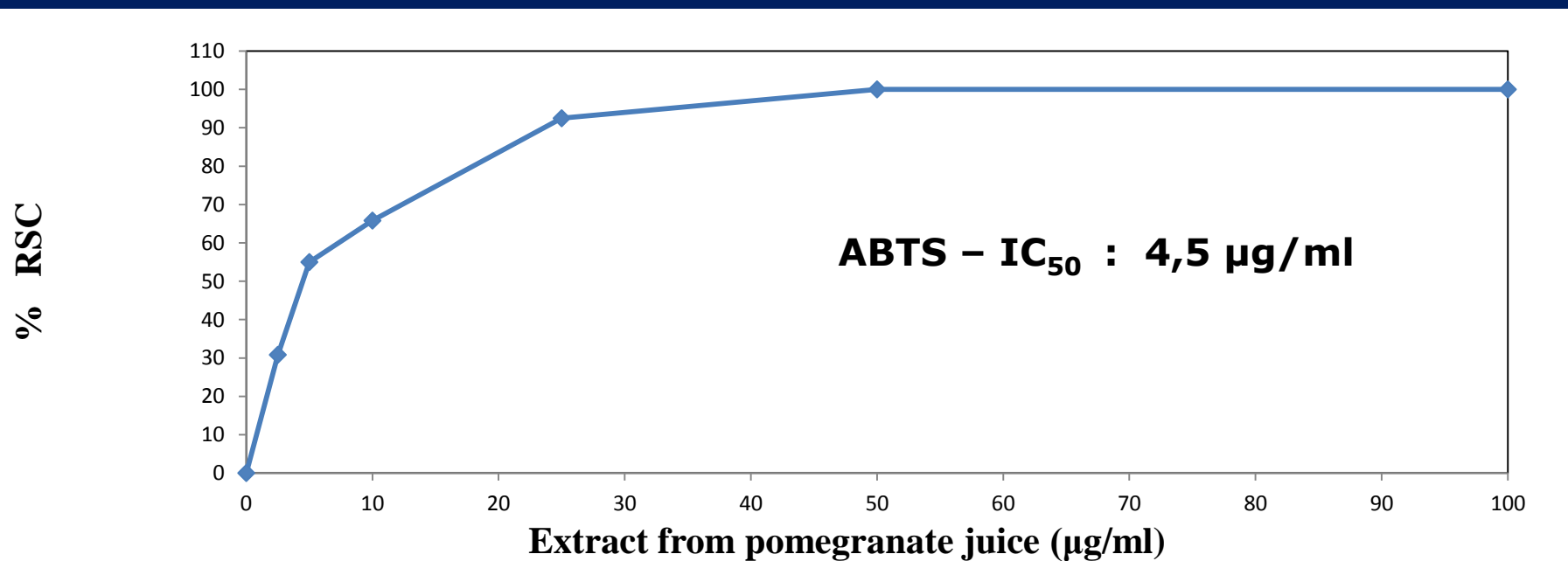
# Η Μέθοδος ABTS

• Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{RSC}\% = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

• Όπου Acontrol and Asample είναι οι τιμές της απορρόφησης για το μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα.

• Επίσης, για να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών εκχυλισμάτων, υπολογίζουμε το IC50, τη συγκέντρωση δηλαδή που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το % ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.



• Οι μέθοδοι DPPH και ABTS είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων ουσιών.

• Έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλους μεθόδους όπως το ότι οι ρίζες που χρησιμοποιούνται είναι σταθερές, ενώ είναι και ευαίσθητες, γρήγορες, απλές μέθοδοι με χαμηλό κόστος.

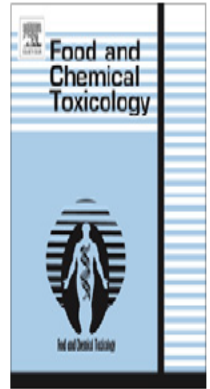
• Γενικά, χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης προϊόντων από φυτικά εκχυλίσματα.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



## Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts

Anna Apostolou<sup>b</sup>, Dimitrios Stagos<sup>a,\*</sup>, Elissavet Galitsiou<sup>a</sup>, Argiris Spyrou<sup>a</sup>, Serko Haroutounian<sup>b</sup>, Nikolaos Portesis<sup>a</sup>, Ioanna Trizoglou<sup>a</sup>, A. Wallace Hayes<sup>c,d</sup>, Aristides M. Tsatsakis<sup>e</sup>, Dimitrios Kouretas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aiolou, 41221 Larissa, Greece

<sup>b</sup> Agricultural University of Athens, Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

<sup>c</sup> Harvard School of Public Health, 677 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, USA

<sup>d</sup> Spherix Consulting, Inc., 6430 Rockledge Drive #503, Bethesda, MD 20817, USA

<sup>e</sup> Laboratory of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Voutes 71003, Heraklion, Greece

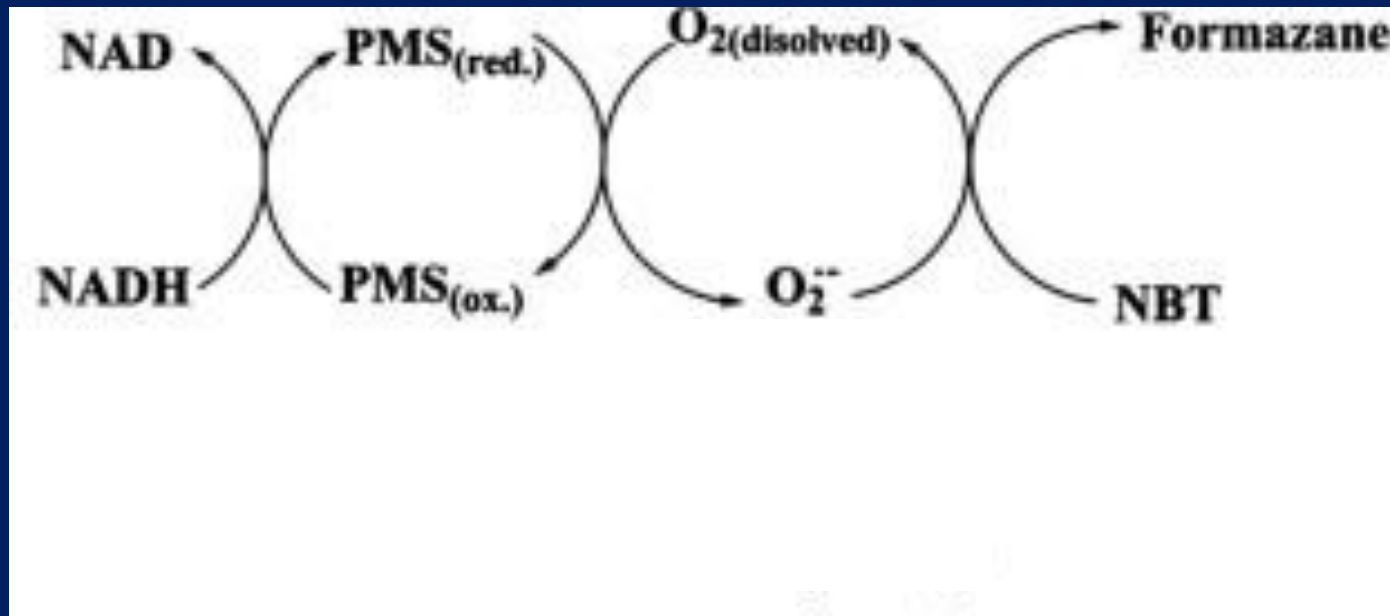
**Table 3**Antioxidant capacity, protective activity against hydroxyl (OH $\cdot$ ) and peroxy (ROO $\cdot$ ) radical-induced DNA damage.

Extract	Plant variety/harvest year	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	
		DPPH $\cdot$ <sup>a</sup>	ABTS $\cdot^{+}$ <sup>a</sup>
Stems	Assyrtiko/2009	4.2 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.4
	Assyrtiko/2010	5.5 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.2
	Mavrotragano/2009	5.0 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.3
	Mandilaria/2009	6.0 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 0.6
	Mandilaria/2006	9.0 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 0.9
	Voidomato/2006	7.0 $\pm$ 0.9	3.5 $\pm$ 0.5
	Voidomato/2009	8.5 $\pm$ 1.0	6.8 $\pm$ 0.7
	Vilana/2009	7.0 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 1.3
	Moshato/2009	8.0 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.5
	Ksinomavro/2010	9.0 $\pm$ 1.1	5.0 $\pm$ 0.3
	Vinsanto/2010	10.0 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 0.2
Athiri/2010	15.0 $\pm$ 1.6	5.0 $\pm$ 0.4	
Seeds	Assyrtiko/2010	3.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.4
	Ksinomavro/2010	4.7 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.3
	Robola/2010	6.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.2
Pomace	Assyrtiko/2009	5.0 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.8

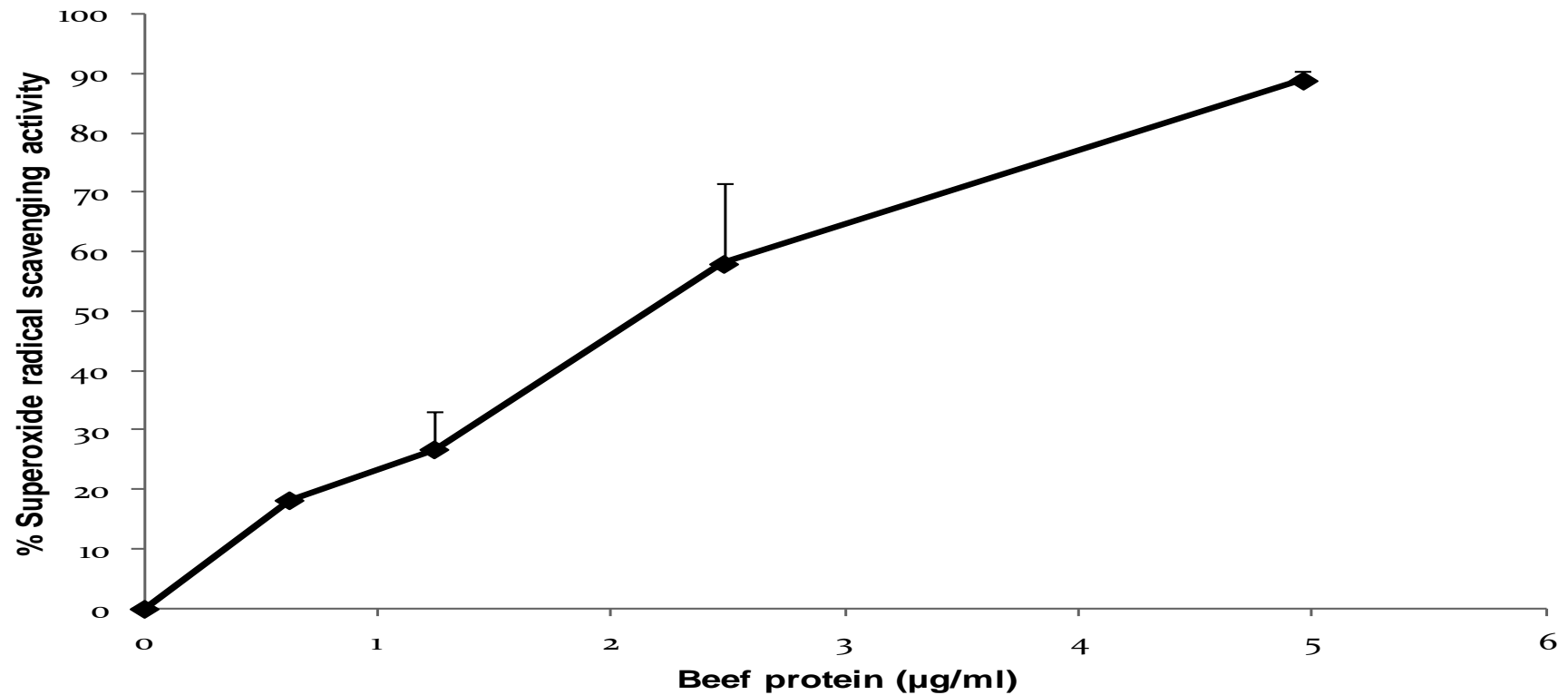
<sup>a</sup> Values are the mean  $\pm$  SD of at least two separate triplicate experiments.<sup>b</sup> Values are the mean  $\pm$  SD from three independent experiments.

# Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ )

- Η ρίζα του  $O_2^{\bullet-}$  είναι από τις πιο κοινές ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό.
- Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της εξουδετέρωσης της  $O_2^{\bullet-}$  βασίζεται στον σχηματισμό της  $O_2^{\bullet-}$  σε ένα σύστημα PMS-NADH με οξείδωση του NADH και αναγωγή του nitroblue tetrazolium (NBT).
- Η  $O_2^{\bullet-}$  ανάγει το NBT σε formazane και έτσι μειώνει την απορρόφηση του NBT στα 560nm.



• Εξουδετέρωση της  $O_2^{\bullet}$  πρωτεΐνη μοσχαρίσιου κρέατος.





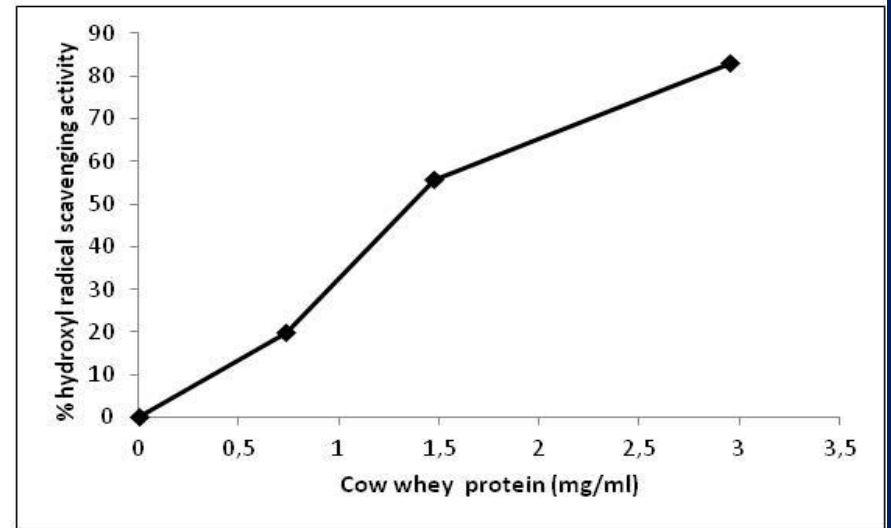
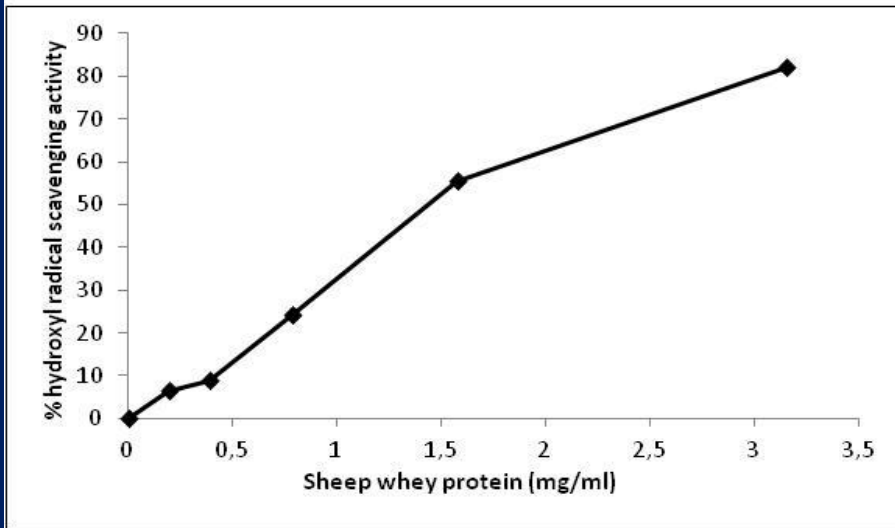
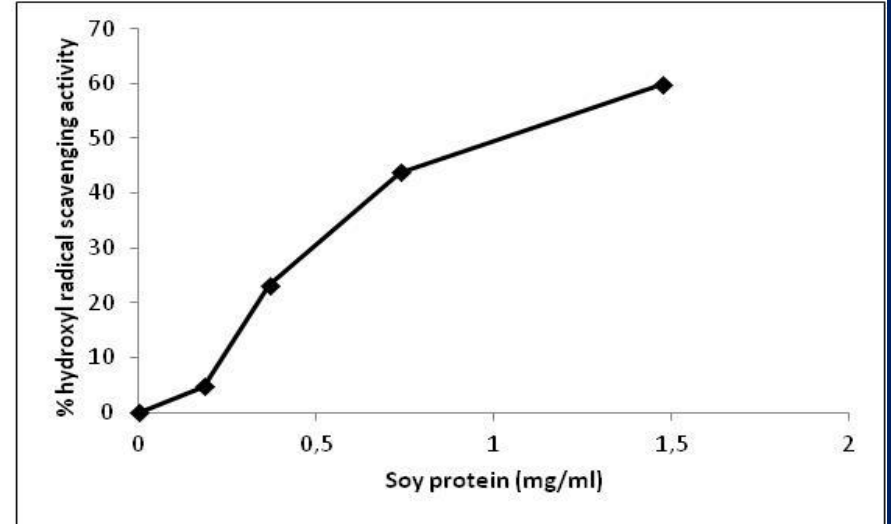
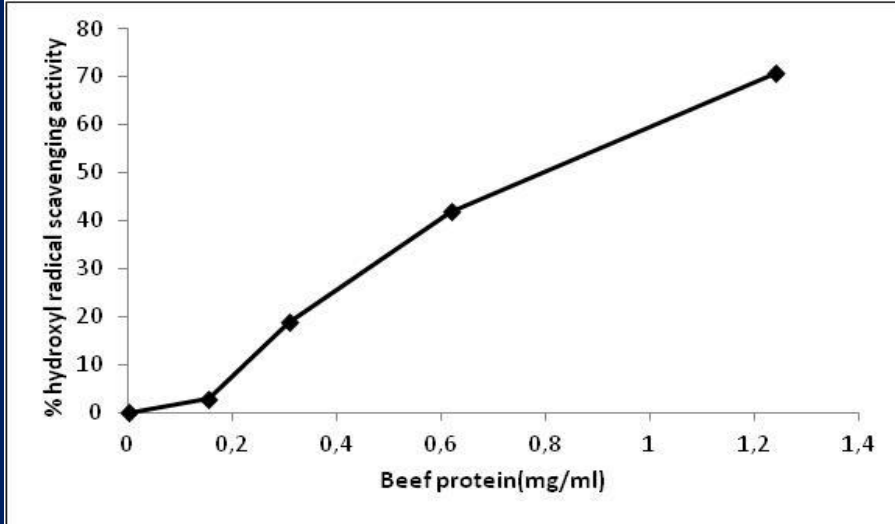
# Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου (OH•)

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

## Fenton reaction



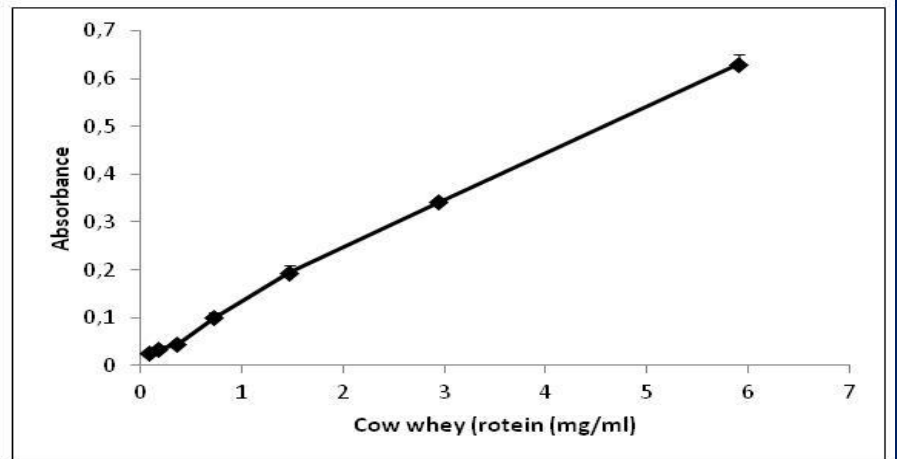
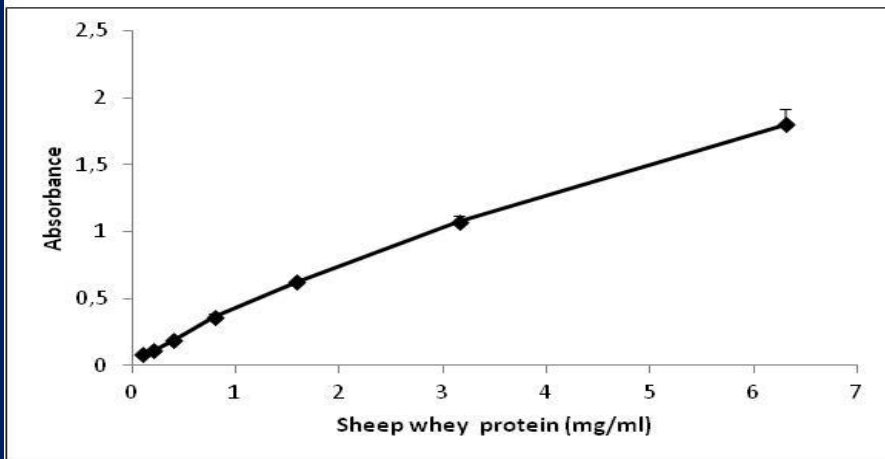
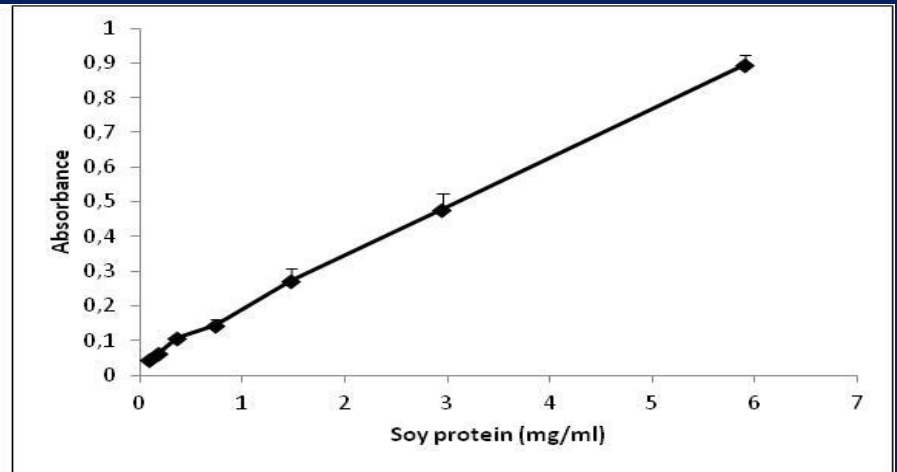
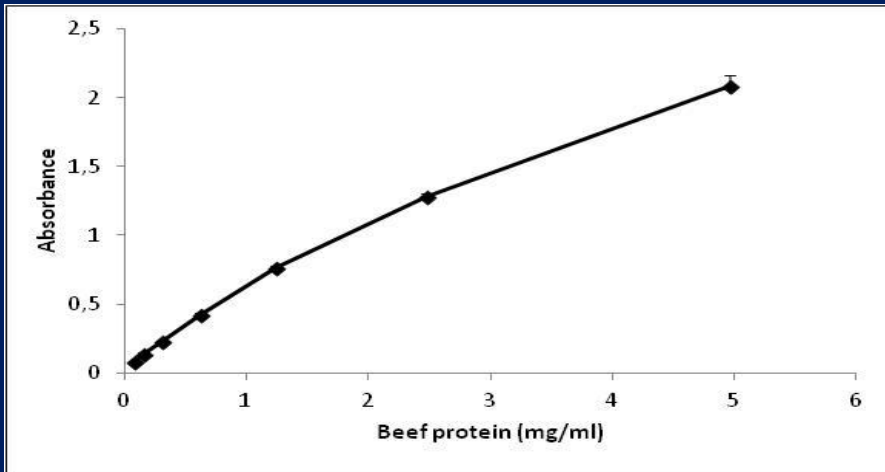
• Προσδιορισμός της ικανότητας πρωτεϊνών από πρόβειο τυρόγαλο, από αγελαδινό τυρόγαλο, από μοσχαρίσιο κρέας και από σόγια να εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου.



# 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  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$ .
- Ο  $\text{Fe}^{2+}$  αντιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο και παράγει ένα προϊόν που απορροφά στα 700nm.
- Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας, υπολογίζεται το  $\text{RPO.5AU}$ , που είναι η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί απορρόφηση 0,5 στα 700 nm.

- Αναγωγική ικανότητα πρωτεϊνών από πρόβειο τυρόγαλο, από αγελαδινό τυρόγαλο, από μοσχαρίσιο κρέας και από σόγια.

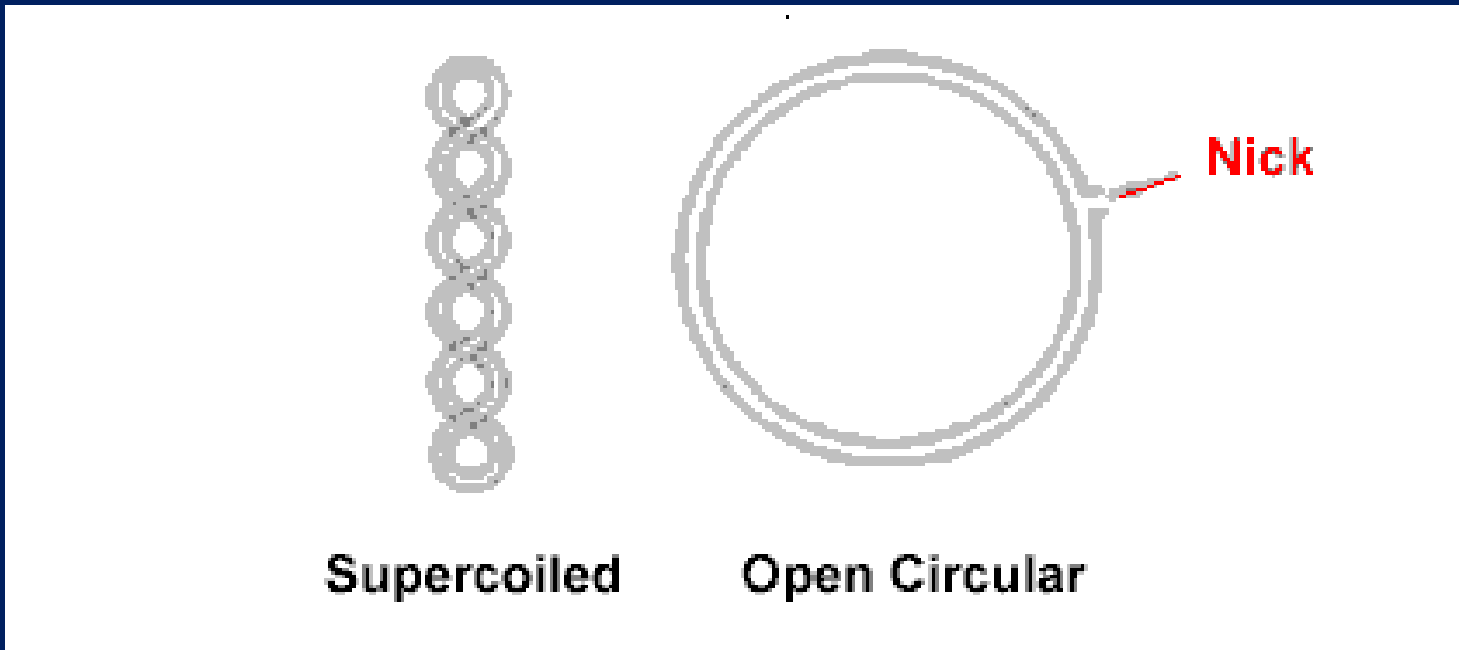


# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ DNA ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

- Μοριακές, βακτηριακές και κυτταρογενετικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών ουσιών έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.
- Οι μέθοδοι αυτές είναι:
- Το DNA breakage assay
- Το Ames test
- Οι ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange assay, SCEs)

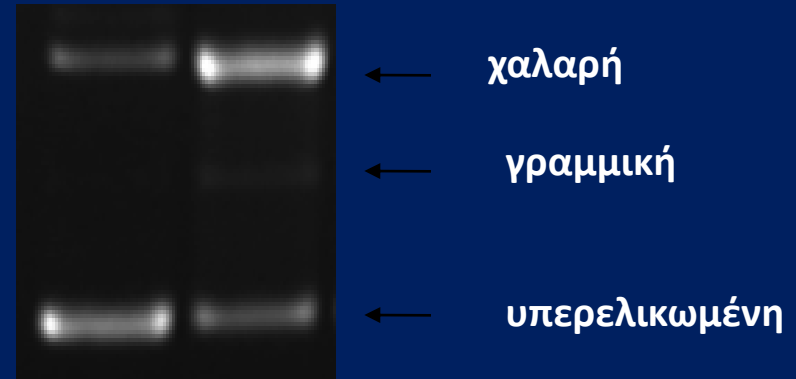
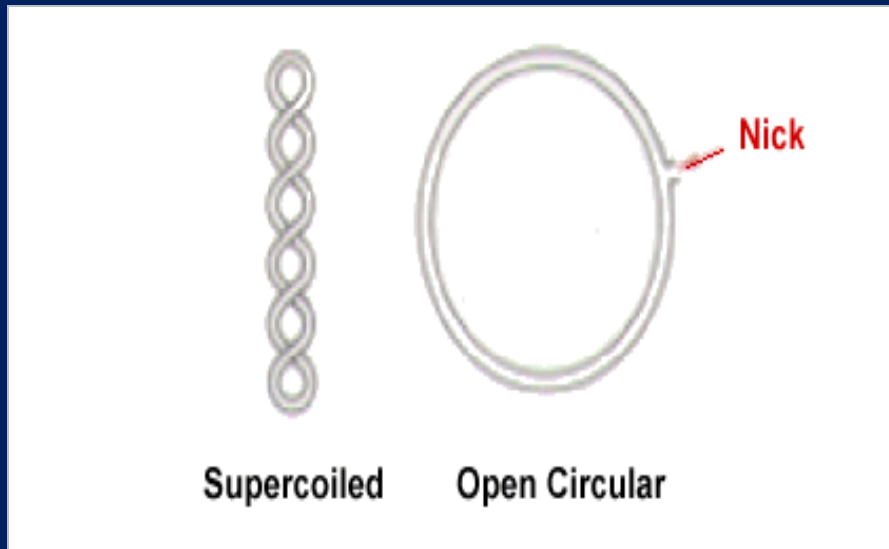
# ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Πρόκειται για μια μοριακή μέθοδο που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η ικανότητα αντιοξειδωτικών ουσιών να προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.
- Το πλασμιδιακό DNA υπάρχει σε 2 διαμορφώσεις, στην υπερελικωμένη και στη χαλαρή (ανοιχτή κυκλική).
- Όταν συμβαίνουν στο DNA μονόκλινα ή δίκλινα κοψίματα (nicks), τότε το υπερελικωμένο DNA μετατρέπεται σε χαλαρό.



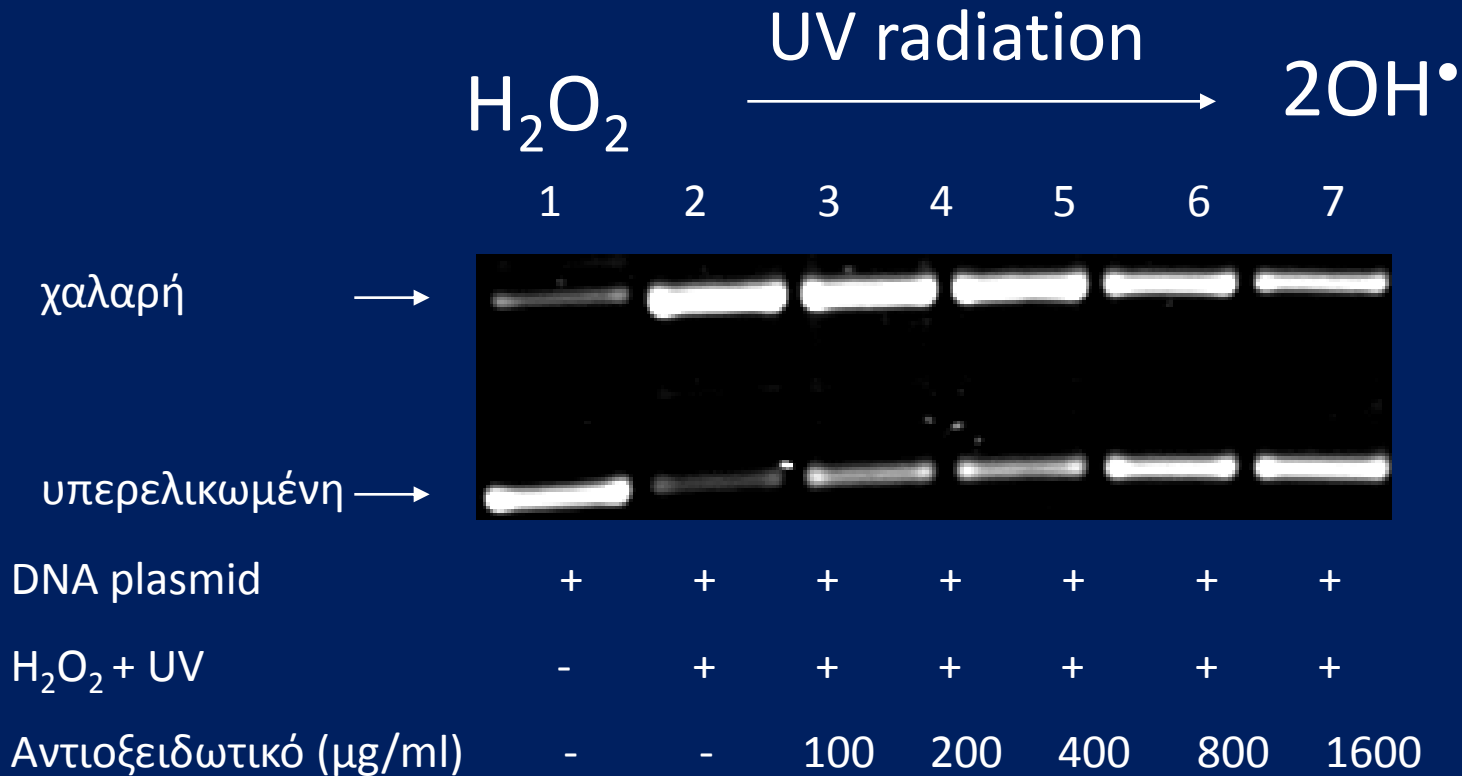
# ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Η υπερελικωμένη και η χαλαρή διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA έχουν διαφορετική κινητικότητα σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.
- Έτσι, όταν η υπερελικωμένη μορφή επωαστεί με ένα μεταλλαξιγόνο παράγοντα, όπως με μια ουσία που παράγει ελεύθερες ρίζες τότε προκαλούνται κοψίματα (nicks) στο DNA, και η υπερελικωμένη μορφή μετατρέπεται στη χαλαρή.



# ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

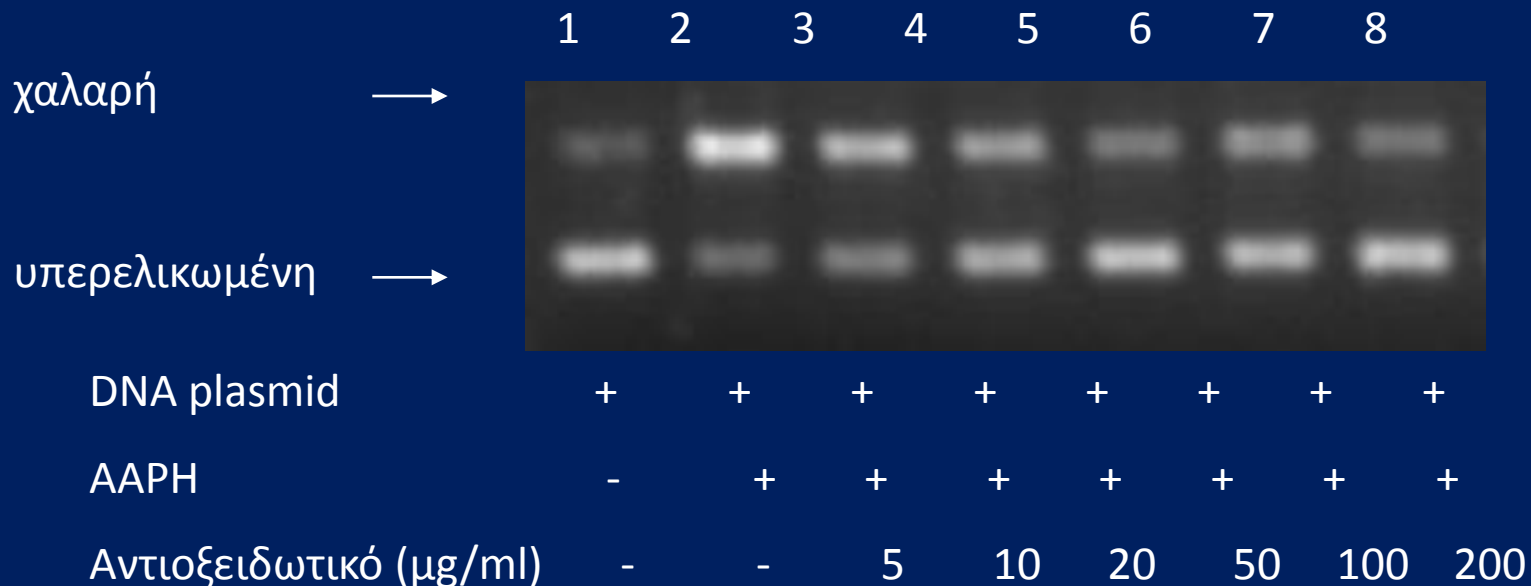
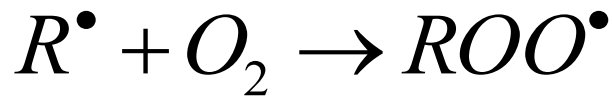
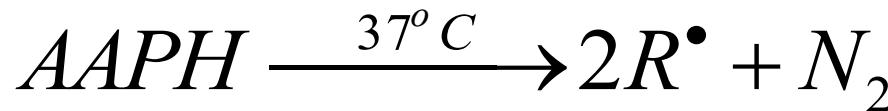
- Ρίζες υδροξυλίου παράγονται με επίδραση UV ακτινοβολίας σε  $H_2O_2$ .





# ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Ρίζες περοξυλίου ( $ROO\cdot$ ) παράγονται από τη θερμική αποικοδόμηση του AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride)] .
- Ρίζες περοξυλίου ( $ROO\cdot$ ) συνήθως σχηματίζονται στα κύτταρα ως προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών.



section for this paper

Experimental

Clinical

Epidemiological

# Assessment of Antioxidant Activity of Extracts from Unique Greek Varieties of *Leguminosae* Plants Using *In Vitro* Assays

C. SPANOU<sup>1</sup>, D. STAGOS<sup>1\*</sup>, L. TOUSIAS<sup>1</sup>, A. ANGELIS<sup>2</sup>, N. ALIGIANNIS<sup>2</sup>,  
A-L. SKALTSOUNIS<sup>2</sup> and D. KOURETAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa;*

*\*Institut of Biomedical Research and Technology, Larissa;*

<sup>2</sup>*Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece*

Table II. Inhibition of hydroxyl radical-induced DNA strand scission by Leguminosae plant extracts.

Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Plant part	Methanolic extract					r	Aqueous extract					r
		100	200	400	800	1600		% Inhibition	100	200	400	800	
<i>Phaseolus vulgaris</i> <sup>a</sup>	aerial part	10 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4*	37 $\pm$ 4*	38 $\pm$ 2*	0.881	NI	11 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1*	29 $\pm$ 3*	34 $\pm$ 2*	0.934
	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	23 $\pm$ 2*	19 $\pm$ 1*	18 $\pm$ 1*	0.681
<i>Vicia faba</i>	aerial part	NI	NI	27 $\pm$ 2*	29 $\pm$ 3*	32 $\pm$ 3*	0.774	NI	NI	28 $\pm$ 3*	31 $\pm$ 2*	37 $\pm$ 3*	0.960
<i>Vicia tenuifolia</i> subsp. <i>stenophylla</i>	fructus	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lens culinaris</i>	aerial part	NI	NI	19 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1*	0.776	NI	NI	NI	NI	16 $\pm$ 3	-
	seeds	NI	NI	31 $\pm$ 3*	32 $\pm$ 2*	33 $\pm$ 3*	0.848	NI	NI	19 $\pm$ 1*	18 $\pm$ 1*	27 $\pm$ 3*	0.758
<i>Lupinus albus</i>	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	11 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	0.734
	aerial part	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lotus edulis</i>	seed coat	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
	aerial part	NI	8 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2*	35 $\pm$ 1*	42 $\pm$ 2*	0.974	NI	NI	21 $\pm$ 2*	22 $\pm$ 2*	30 $\pm$ 3*	0.931
<i>Lotus longisiliquosus</i>	fructus	NI	NI	32 $\pm$ 1*	34 $\pm$ 2*	37 $\pm$ 3*	0.840	NI	NI	NI	NI	NI	-
	aerial part	NI	NI	30 $\pm$ 2*	33 $\pm$ 1*	33 $\pm$ 1*	0.905	NI	NI	13 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	20 $\pm$ 3	0.805
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	fructus	NI	NI	18 $\pm$ 4	21 $\pm$ 2*	23 $\pm$ 3*	0.729	NI	12 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2	21 $\pm$ 5	26 $\pm$ 3*	0.925
<i>Lathyrus sativus</i>	aerial part	NI	NI	26 $\pm$ 2*	27 $\pm$ 2*	32 $\pm$ 2*	0.768	9 $\pm$ 4	18 $\pm$ 1*	29 $\pm$ 2*	38 $\pm$ 3*	47 $\pm$ 3*	0.975
	aerial part	NI	NI	28 $\pm$ 3	24 $\pm$ 1*	31 $\pm$ 2*	0.851	NI	NI	NI	NI	13 $\pm$ 2	-
<i>Lathyrus clymenum</i>	aerial part	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	aerial part	14 $\pm$ 3	21 $\pm$ 4	52 $\pm$ 5*	62 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 3*	0.966	11 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1*	36 $\pm$ 3*	44 $\pm$ 3*	55 $\pm$ 2*	0.981
<i>Oleuropein</i> <sup>b</sup>	-	NI	11 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2*	33 $\pm$ 3*	42 $\pm$ 3*	0.986						

Values are the means $\pm$ SE of % inhibition from three independent experiments. <sup>a</sup>*Phaseolus vulgaris* was cultivated in Vrontou, Serres, Greece.

<sup>b</sup>Oleuropein: was used as positive control. r: represents the dose response correlation coefficient. NI: no significant inhibition (less than 8%). NT: not tested. \* $p$ <0.05 when compared with control (plasmid DNA plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+UV).

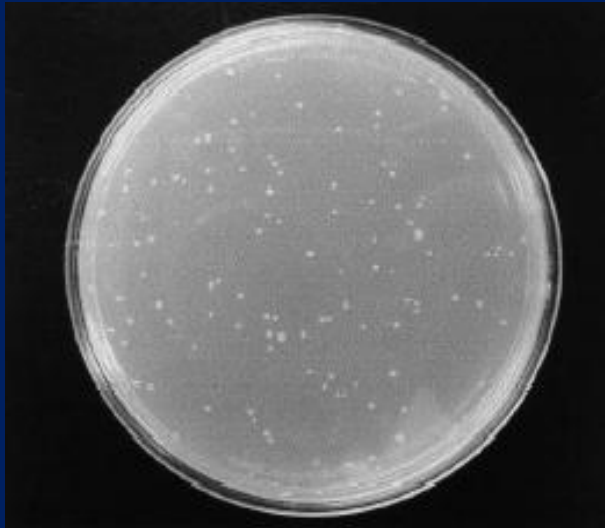
Table III. Inhibition of peroxyl radical-induced DNA strand scission by Leguminosae plant extracts.

Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Plant part	Methanolic extract						r	Aqueous extract						r
		5	10	20	50	100	200		% Inhibition	5	10	20	50	100	
<i>Phaseolus vulgaris</i> <sup>a</sup>	aerial part	NI	14 $\pm$ 4	24 $\pm$ 1*	56 $\pm$ 2*	81 $\pm$ 6*	93 $\pm$ 4*	0.968	16 $\pm$ 5	26 $\pm$ 4	57 $\pm$ 4*	84 $\pm$ 1*	87 $\pm$ 1*	91 $\pm$ 1*	0.987
	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	NI	10 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	0.904
<i>Vicia faba</i>	aerial part	NI	13 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4*	69 $\pm$ 3*	78 $\pm$ 4*	84 $\pm$ 5*	0.979	10 $\pm$ 1*	26 $\pm$ 1*	58 $\pm$ 1*	87 $\pm$ 1*	93 $\pm$ 1*	96 $\pm$ 1*	0.991
<i>Vicia tenuifolia</i>	fructus	NI	NI	NI	19 $\pm$ 1	37 $\pm$ 4*	65 $\pm$ 2*	0.985	NI	NI	14 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3*	63 $\pm$ 3*	80 $\pm$ 3*	0.958
subsp. <i>stenophylla</i>	aerial part	NI	NI	NI	17 $\pm$ 5	36 $\pm$ 5	67 $\pm$ 6*	0.972	NI	NI	15 $\pm$ 4	43 $\pm$ 3*	67 $\pm$ 5*	84 $\pm$ 6*	0.950
<i>Lens culinaris</i>	aerial part	NI	NI	20 $\pm$ 2*	44 $\pm$ 4*	61 $\pm$ 3*	78 $\pm$ 1*	0.971	NI	14 $\pm$ 2*	32 $\pm$ 2*	67 $\pm$ 3*	73 $\pm$ 1*	84 $\pm$ 3*	0.984
	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	31 $\pm$ 4	49 $\pm$ 2*	73 $\pm$ 1*	0.897
<i>Lupinus albus</i>	seeds	NI	NI	NI	10 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2*	16 $\pm$ 1*	0.968	NI	NI	NI	NI	NI	9 $\pm$ 3	-
	aerial part	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	14 $\pm$ 6	17 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4*	0.757
	seed coat	NI	NI	28 $\pm$ 3*	49 $\pm$ 4*	64 $\pm$ 2*	67 $\pm$ 3*	0.975	NI	NI	NI	14 $\pm$ 4	17 $\pm$ 2	20 $\pm$ 3	0.732
<i>Lotus edulis</i>	aerial part	NI	NI	24 $\pm$ 3*	50 $\pm$ 3*	79 $\pm$ 1*	90 $\pm$ 4*	0.983	NI	NI	15 $\pm$ 5	41 $\pm$ 3*	67 $\pm$ 4*	76 $\pm$ 3*	0.919
	fructus	NI	NI	NI	21 $\pm$ 2*	40 $\pm$ 3*	74 $\pm$ 4*	0.947	NI	NI	10 $\pm$ 3	49 $\pm$ 5*	71 $\pm$ 2*	81 $\pm$ 2*	0.977
<i>Lotus longisiliquosus</i>	aerial part	NI	NI	12 $\pm$ 2	34 $\pm$ 1*	72 $\pm$ 2*	92 $\pm$ 2*	0.943	NI	12 $\pm$ 1	33 $\pm$ 2*	74 $\pm$ 2*	84 $\pm$ 3*	84 $\pm$ 3*	0.976
<i>Tetragonolobus</i>	fructus	NI	NI	NI	8 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1*	48 $\pm$ 4*	0.841	NI	NI	NI	16 $\pm$ 2	39 $\pm$ 3*	67 $\pm$ 3*	0.976
<i>purpureus</i>	aerial part	NI	NI	9 $\pm$ 1	30 $\pm$ 2*	58 $\pm$ 5*	88 $\pm$ 2*	0.953	NI	11 $\pm$ 4	34 $\pm$ 2*	73 $\pm$ 3*	94 $\pm$ 3*	99 $\pm$ 1*	0.976
<i>Lathyrus sativus</i>	aerial part	NI	20 $\pm$ 1*	38 $\pm$ 3*	87 $\pm$ 4*	96 $\pm$ 2*	93 $\pm$ 4*	0.985	NI	12 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3*	73 $\pm$ 4*	75 $\pm$ 4*	78 $\pm$ 3*	0.920
<i>Lathyrus clymenum</i>	aerial part	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lathyrus laxiflorus</i>	aerial part	40 $\pm$ 2*	73 $\pm$ 5*	89 $\pm$ 6*	89 $\pm$ 6*	93 $\pm$ 7*	98 $\pm$ 3*	0.851	51 $\pm$ 6*	83 $\pm$ 4*	84 $\pm$ 2*	97 $\pm$ 2*	99 $\pm$ 1*	99 $\pm$ 1*	0.852
subsp. <i>laxiflorus</i>															
<i>Oleuropein</i> <sup>b</sup>	-	36 $\pm$ 3*	57 $\pm$ 4*	75 $\pm$ 1*	93 $\pm$ 1*	95 $\pm$ 1*	95 $\pm$ 1*	0.947							

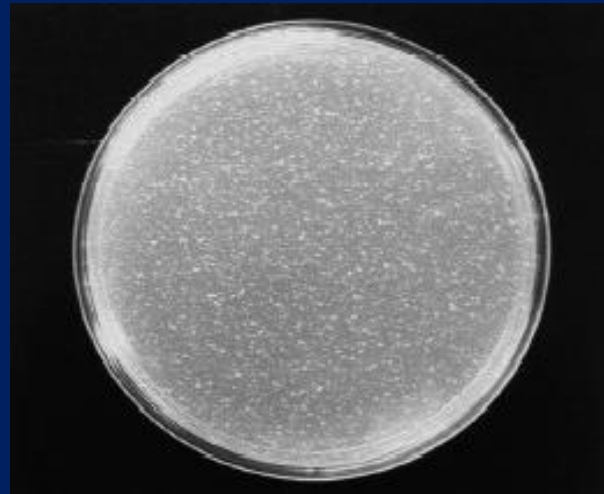
<sup>a</sup>*Phaseolus vulgaris* was cultivated in Vrondou, Serres, Greece. <sup>b</sup>Oleuropein: was used as positive control. Values are the means $\pm$ SE of % inhibition from three independent experiments. r: represents the dose response correlation coefficient. NI: no significant inhibition (less than 8%). NT: not tested. \* $p$ <0.05 when compared with control (plasmid DNA plus AAPH).

# Ames test

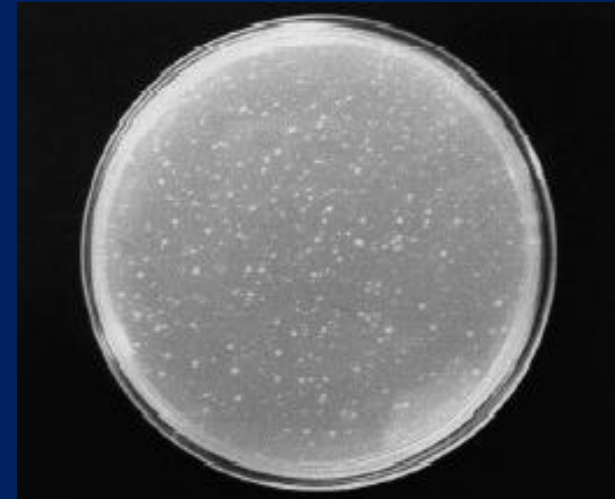
- Το Ames test είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη in vitro μέθοδος στην τοξικολογία για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων παραγόντων.
- Το Ames test όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση αντι-μεταλλαξιγόνων ουσιών.
- Για την ανίχνευση αντιοξειδωτικών που προστατεύουν από μεταλλάξεις που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιείται συνήθως το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102.



**Control**



**mutagen inducing  
mutations through ROS  
production**



**Mutagen + antioxidant**

# Ames test

- Η μπλεομυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση μεταλλάξεων μέσω ROS στα κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.



DNA mutations

# Ames test

- Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση μεταλλάξεων μέσω ROS στα κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.
- Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  παράγει ROS στα κύτταρα μέσω της αντίδρασης Fenton.

## Αντίδραση Fenton



DNA mutations



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



ScienceDirect

Mutation Research 609 (2006) 165–175



Genetic Toxicology and  
Environmental Mutagenesis

[www.elsevier.com/locate/gentox](http://www.elsevier.com/locate/gentox)

Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)

# Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102

Demetrios Stagos<sup>a</sup>, Georgios Kazantzoglou<sup>b</sup>, Demetra Theofanidou<sup>a</sup>,  
Georgia Kakalopoulou<sup>a</sup>, Prokopios Magiatis<sup>b</sup>,  
Sofia Mitaku<sup>b</sup>, Demetrios Kouretas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aiolou, GR-41221 Larissa, Greece

<sup>b</sup> Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, GR-15771 Athens, Greece

Received 22 September 2005; received in revised form 14 February 2006; accepted 24 June 2006

Available online 28 August 2006



# Ames test

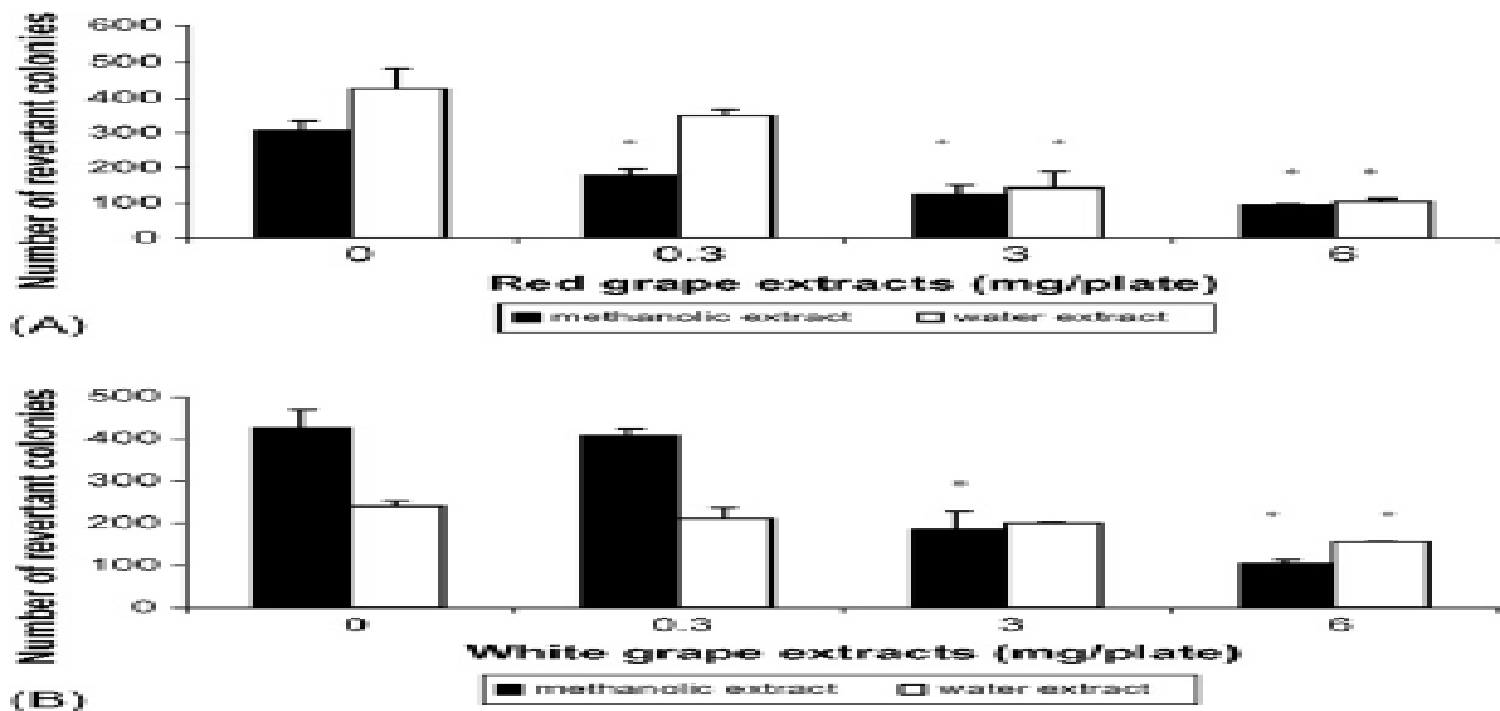
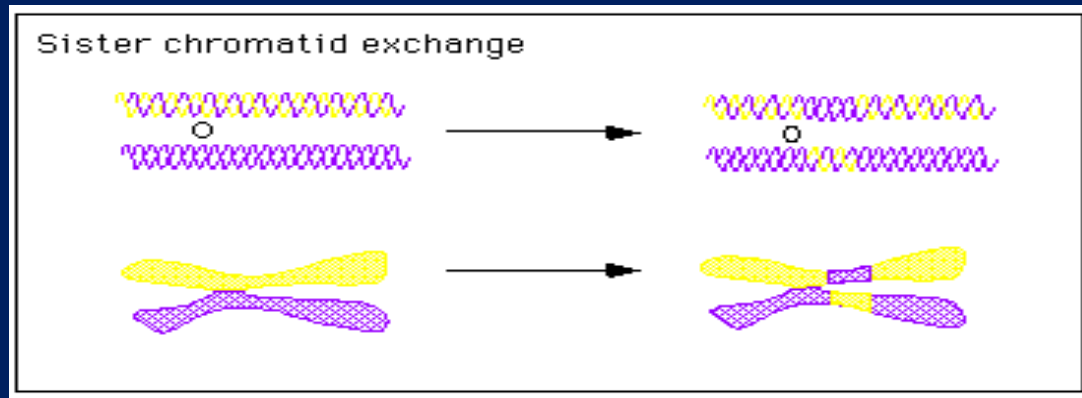


Fig. 2. Antimutagenic effects of grape extracts on BLM-induced mutagenicity in *S. typhimurium* TA102 cells. (A) Mandilaria variety (red grapes) and (B) Assyrtiko variety (white grapes). Values are the mean  $\pm$  S.D. number of histidine revertants minus the number of spontaneous revertants ( $356 \pm 29$ ) of three independent experiments carried out in triplicate. The concentration of BLM was  $0.5 \mu\text{g}/\text{plate}$ . \* $p < 0.05$  when compared with positive control.

# Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Οι SCEs είναι η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ ομόλογων περιοχών των δύο αδελφών χρωματίδων.
- Οι SCEs είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που συμβαίνει κατά το διπλασιασμό του DNA στη S φάση του κυτταρικού κύκλου πριν οι δύο χρωματίδες χωριστούν σε δύο διαφορετικά χρωμοσώματα.
- Αν και οι SCEs δεν αποτελούν μεταλλάξεις, ωστόσο είναι από τους πιο κοινούς κυτταρογενετικούς βιοδείκτες στην τοξικολογία για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών.
- Οι SCEs συνήθως προσδιορίζονται σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων αλλά μπορούν να προσδιοριστούν και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

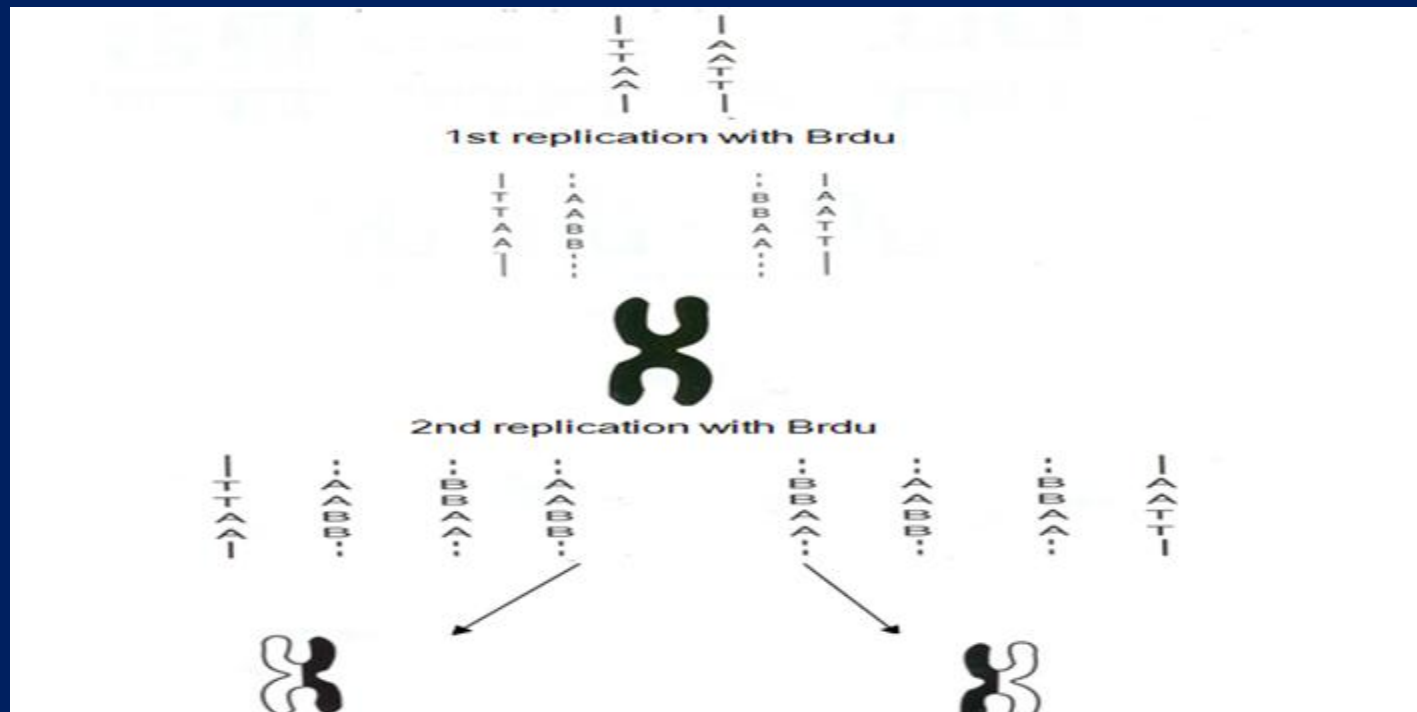


# Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Για τον προσδιορισμό των SCEs, είναι απαραίτητη η διαφορετική χρώση των 2 χρωματίδων.
- Αυτό επιτυγχάνεται με χρώση φθορισμού σε συνδυασμό με χρώση Giemsa (μέθοδος FPG) , η οποία βασίζεται στην προσθήκη βρωμοδεοξυουριδίνης (BrdU), ένα χημικό ανάλογο της θυμίνης στην κυτταροκαλλιέργεια από την οποία απομονώνονται τα χρωμοσώματα.
- Λόγω του ημισυντηρητικού διπλασιασμού του DNA, μετά τη 2<sup>η</sup> μίτωση οι δύο αδερφές χρωματίδες χρωματίζονται διαφορετικά.

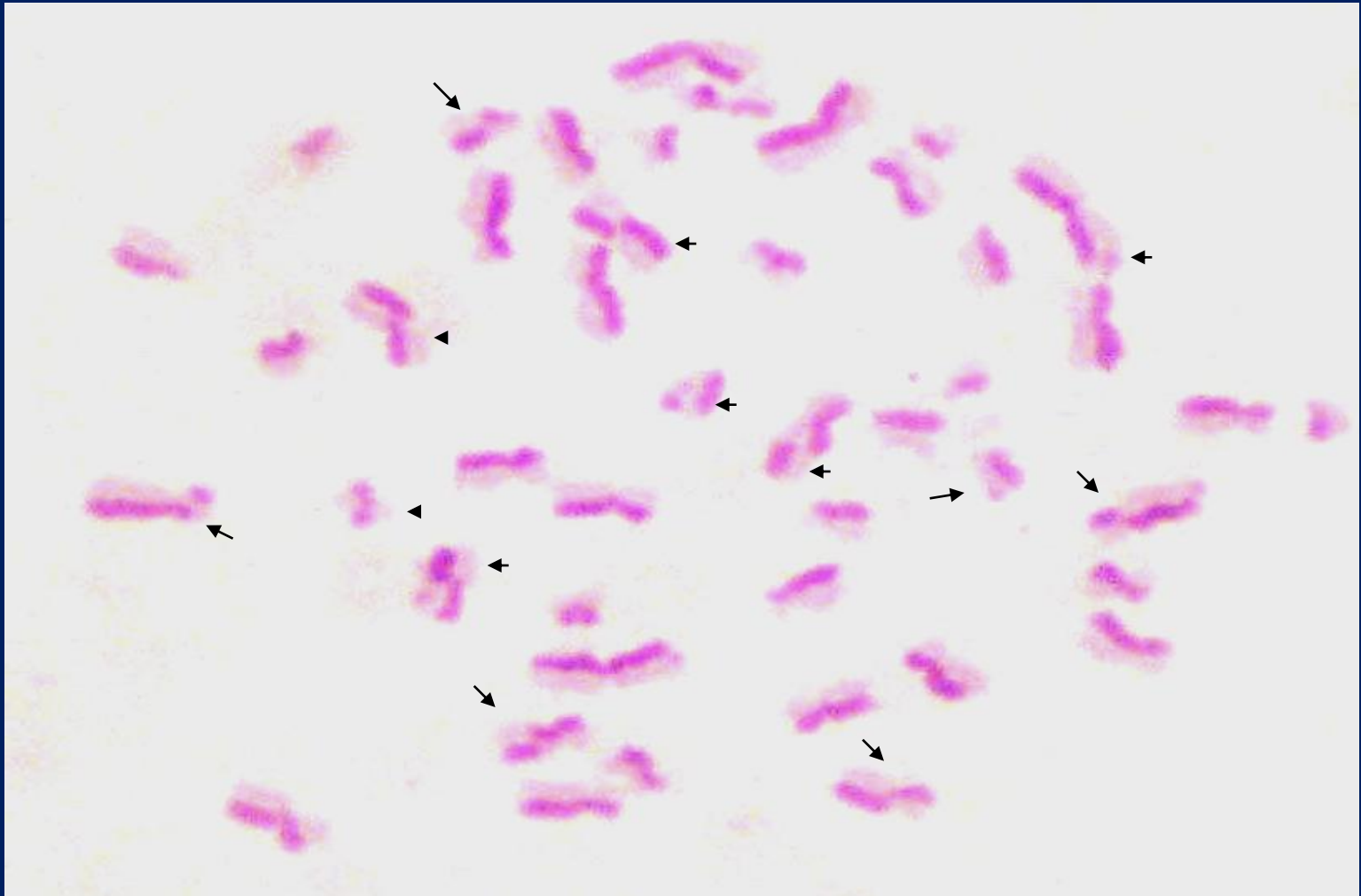
1<sup>η</sup> μίτωση

2<sup>η</sup> μίτωση



# Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Πυρήνας από ανθρώπινα λεμφοκύτταρα με χρωμοσώματα χρωματισμένα με τη μέθοδο FPG για τον προσδιορισμό των SCEs.



# Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

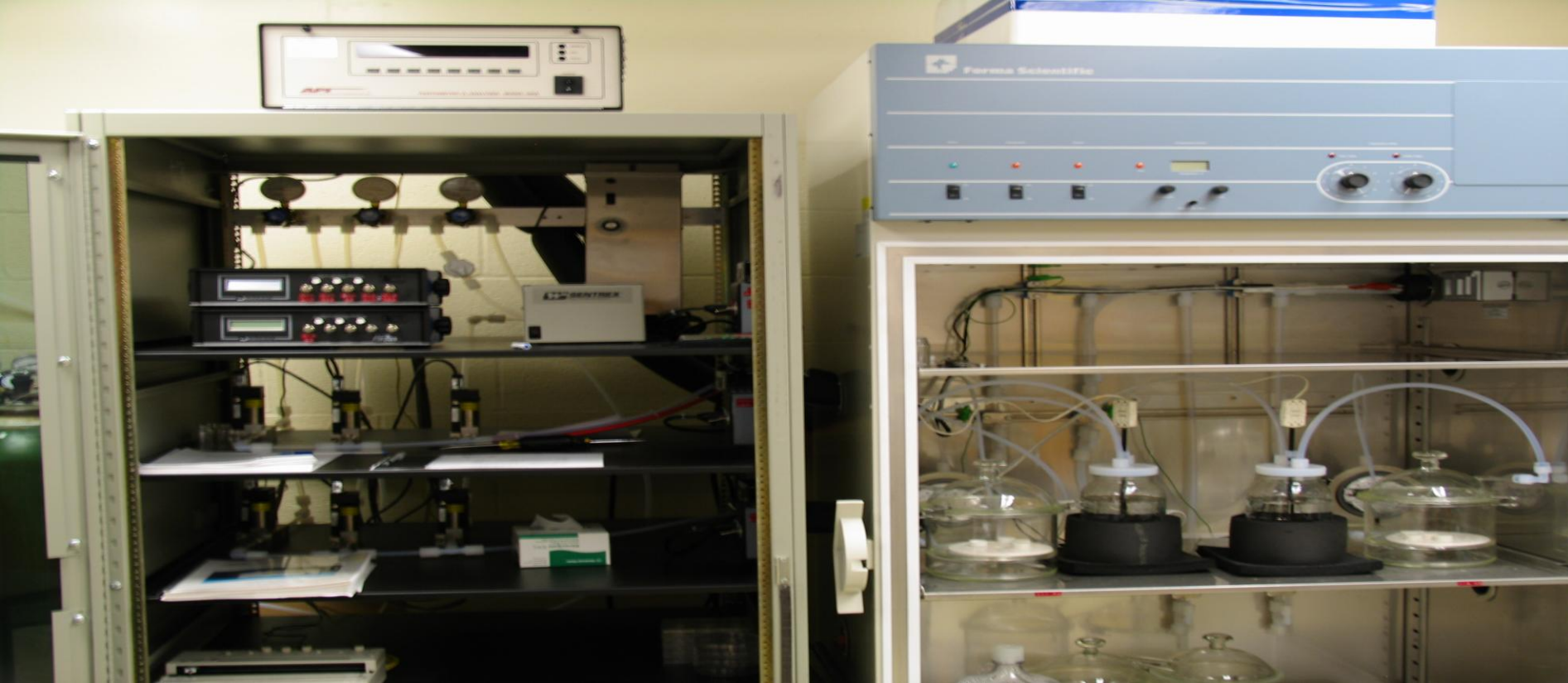
- Η αυξημένη παραγωγή ROS στα κύτταρα, αυξάνει τον αριθμό των SCEs.
- Έτσι, οι SCEs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων επωάζονται με παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες (π.χ. μιτομυκίνη), έτσι αυξάνονται οι SCEs.
- Σε διαφορετικές καλλιέργειες, γίνεται επώαση των κυττάρων με τον προ-οξειδωτικό παράγοντα αλλά και με το αντιοξειδωτικό.
- Εάν ο αριθμός των SCEs στις κυτταροκαλλιέργειες που προστέθηκε το αντιοξειδωτικό είναι μικρότερος από αυτόν όπου προστέθηκε μόνο το προ-οξειδωτικό, τότε αυτό είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

# 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-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) και παράγοντας δινιτροφαινυλδραζόνη (DNP-hydrazone).
- Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αντισώματα ειδικά για την ομάδα DNP-hydrazone.

## **Inhibition of ozone-induced SP-A oxidation by plant polyphenols**

DIMITRIOS STAGOS<sup>1,2</sup>, TODD M. UMSTEAD<sup>3</sup>, DAVID S. PHELPS<sup>3</sup>,  
LEANDROS SKALTSOUNIS<sup>4</sup>, SERKO HAROUTOUNIAN<sup>5</sup>, JOANNA FLOROS<sup>2,3,6,†</sup>, &  
DEMETRIOS KOURETAS<sup>1</sup>

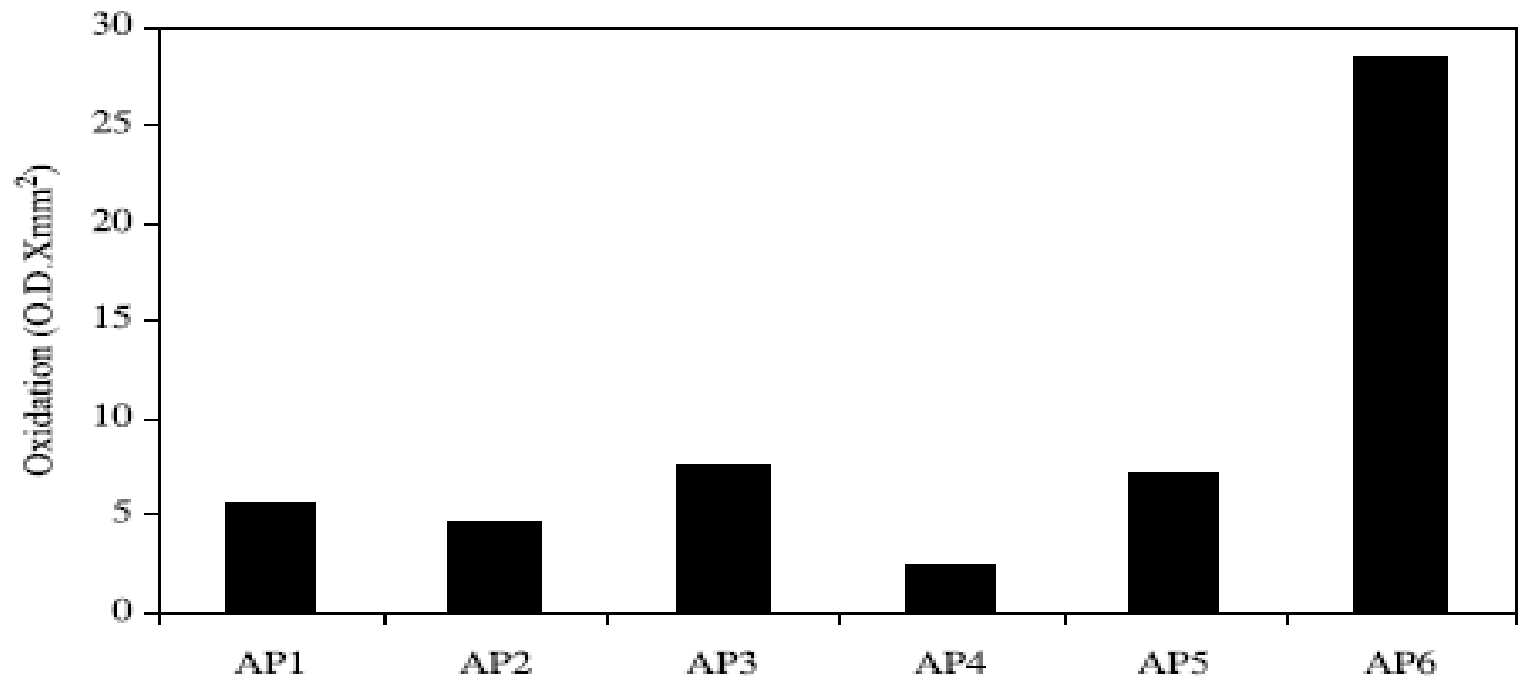


- Σύστημα για την *in vitro* έκθεση πρωτεϊνών σε όζον.
- Αυτό το σύστημα παράγει ακριβώς καθορισμένες ποσότητες αερίων (φιλτραρισμένος αέρας με 5% διοξείδιο του άνθρακα και υδρατμούς σε θερμοκρασία 37°C) στα δοχεία έκθεσης μαζί με συγκεκριμένες ποσότητες όζοντος.
- Δείγματα της SP-A πρωτεΐνης εκτέθηκαν σε όζον (1 ppm) για 4 h.



- Προσδιορισμός καρβονυλικών ομάδων σε δείγματα της SP-A πρωτεΐνης με τη μέθοδο Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit.

A



- Φυτικές πολυφαινόλες προστατεύουν την SP-A πρωτεΐνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και την άμυνα των πνευμόνων από οξείδωση από το όζον.

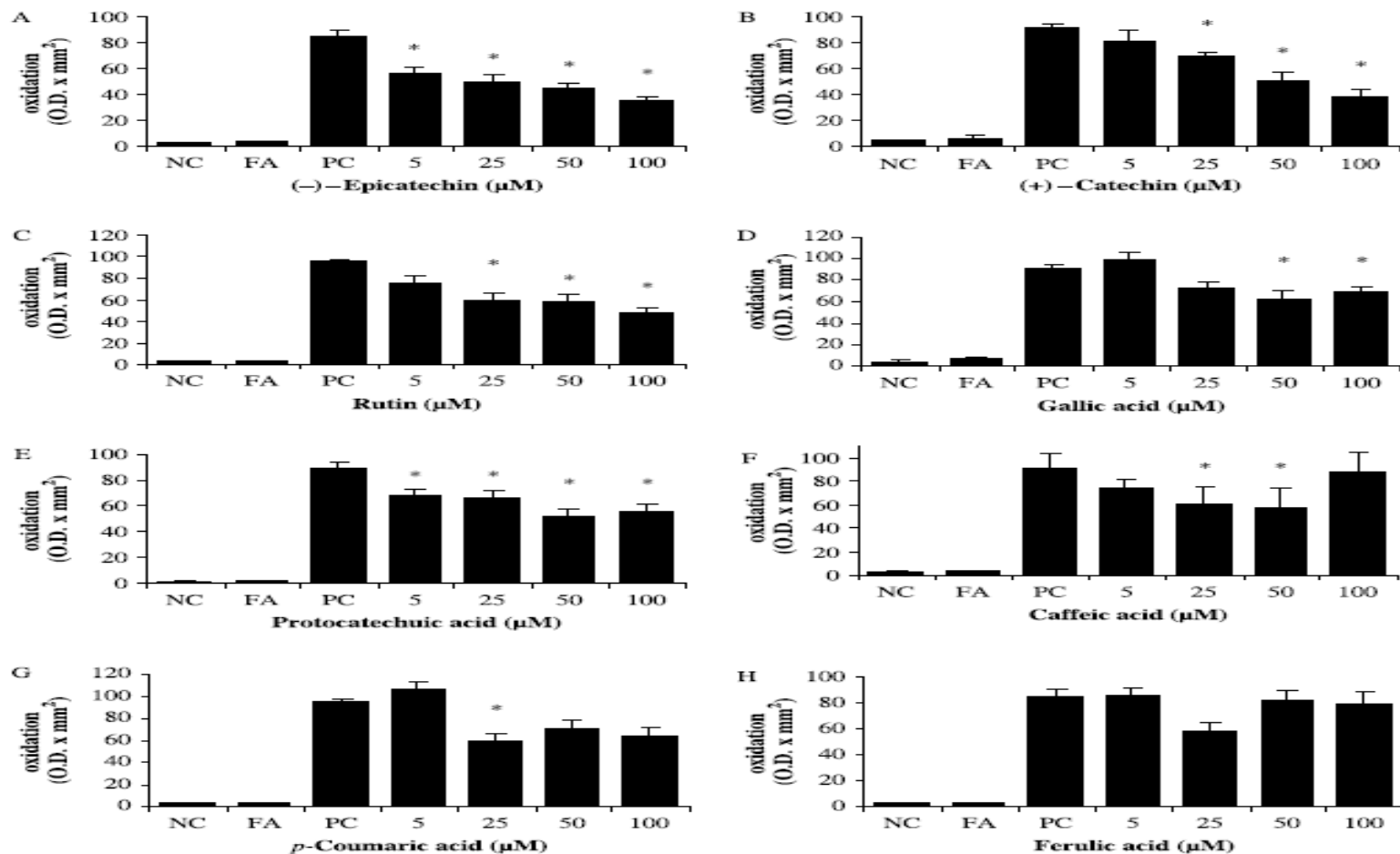


Figure 5. Effects of tested polyphenols on ozone-induced SP-A oxidation. SP-A was exposed to ozone (1ppm) for 4h. Oxidation was expressed as the product of optical density (OD) by the area (mm<sup>2</sup>) of dots. Values are the mean  $\pm$  SE from three independent experiments carried out in triplicate. NC: Negative control (SP-A alone exposed to filtered air); PC: Positive control (SP-A alone exposed to ozone); FA: SP-A plus polyphenol at a concentration of 100  $\mu$ M exposed to filtered air. ANOVA was used for the statistical analysis. \* $p$  < 0.05 when compared with positive control.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VITRO ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Αρκετά αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους με το να επάγουν τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και της οξειδάσης της ξανθίνης.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VITRO ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

➤ Η καταλάση (CAT) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.



➤ Αν και το  $\text{H}_2\text{O}_2$  δεν είναι ελεύθερη ρίζα, η διάσπασή του μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό της  $\text{OH}\bullet$ , και έτσι η απομάκρυνσή του από τον οργανισμό θεωρείται πολύ σημαντική.

➤ Ο προσδιορισμός της δράσης της CAT βασίζεται στον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με φασματοφωτομετρία στα 240nm.

➤ Έτσι, αλλαγές στα επίπεδα του ρυθμού αποικοδόμησης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  από την CAT επιτρέπει την ανίχνευση ουσιών που επάγουν ή αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VITRO ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

➤ Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της ρίζας του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$ .



➤ Η SOD υπάρχει στον ανθρώπινο οργανισμό σε 3 ισομορφές:

Cu/Zn SOD (διμερές, κυτταρόπλασμα), Mn SOD (τετραμερές, μιτοχόνδρια), Cu/Zn SOD (τετραμερές, εξωκυτταρική).

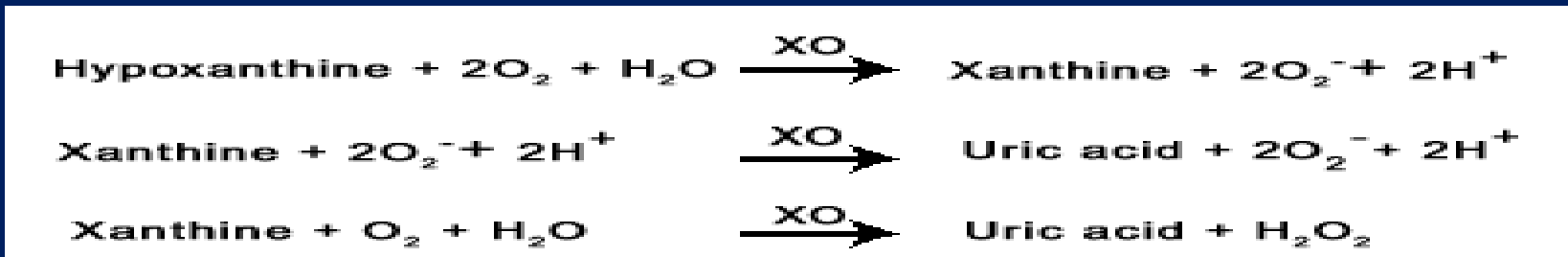
• Η αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης από το  $O_2^{\bullet-}$  που υπάρχει στην ατμόσφαιρα μπορεί να ανασταλεί από την εξουδετέρωση του  $O_2^{\bullet-}$  από τη SOD.

• Έτσι, μεταβολές στο ρυθμό αυτοοξείδωσης της πυρογαλλόλης παρουσία της SOD επιτρέπουν την ανίχνευση ουσιών που επάγουν/αναστέλλουν τη SOD.

• Η αυτοοξείδωση της πυρογαλλόλης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 420nm.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VITRO ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Ένας από τους παράγοντες που προκαλούν την παραγωγή ROS στον ανθρώπινο οργανισμό, ιδιαίτερα κατά την άσκηση, είναι το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης (XO), που καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και ουρικό οξύ.
- Η XO χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων κατά την αποικοδόμηση των πουρινών, και έτσι προκαλεί την  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$ .



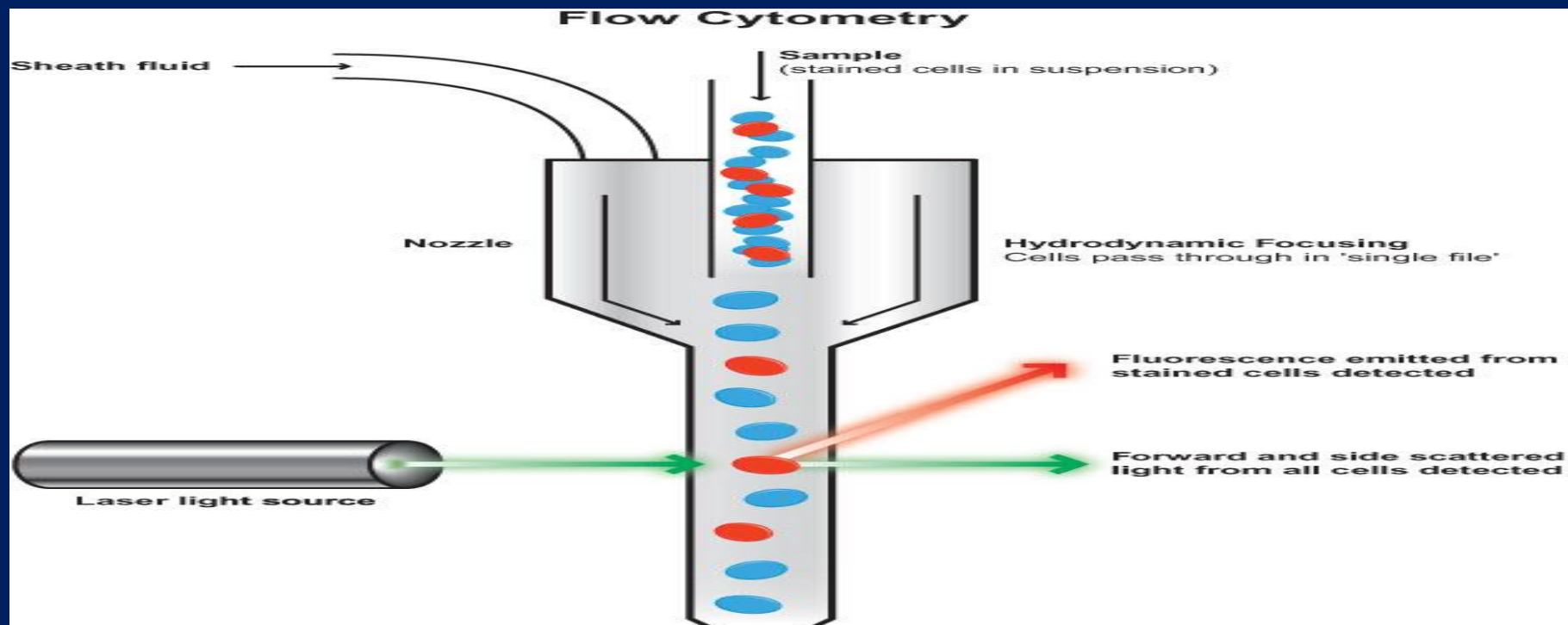
- Ο ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης είναι διπλός, καθώς οδηγεί όχι μόνο στην παραγωγή ROS αλλά και στην παραγωγή ουρικού οξέος που είναι από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά στο πλάσμα.
- Η δράση της XO activity προσδιορίζεται από το σχηματισμό του ουρικού οξέος από ξανθίνη με φασματοφωτομέτρηση στα 295nm.
- Μεταβολές στα επίπεδα του ουρικού οξέος παρουσία διαφόρων ουσιών επιτρέπουν την ανίχνευση επαγωγέων/αναστολέων της XO.

# 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.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- 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.

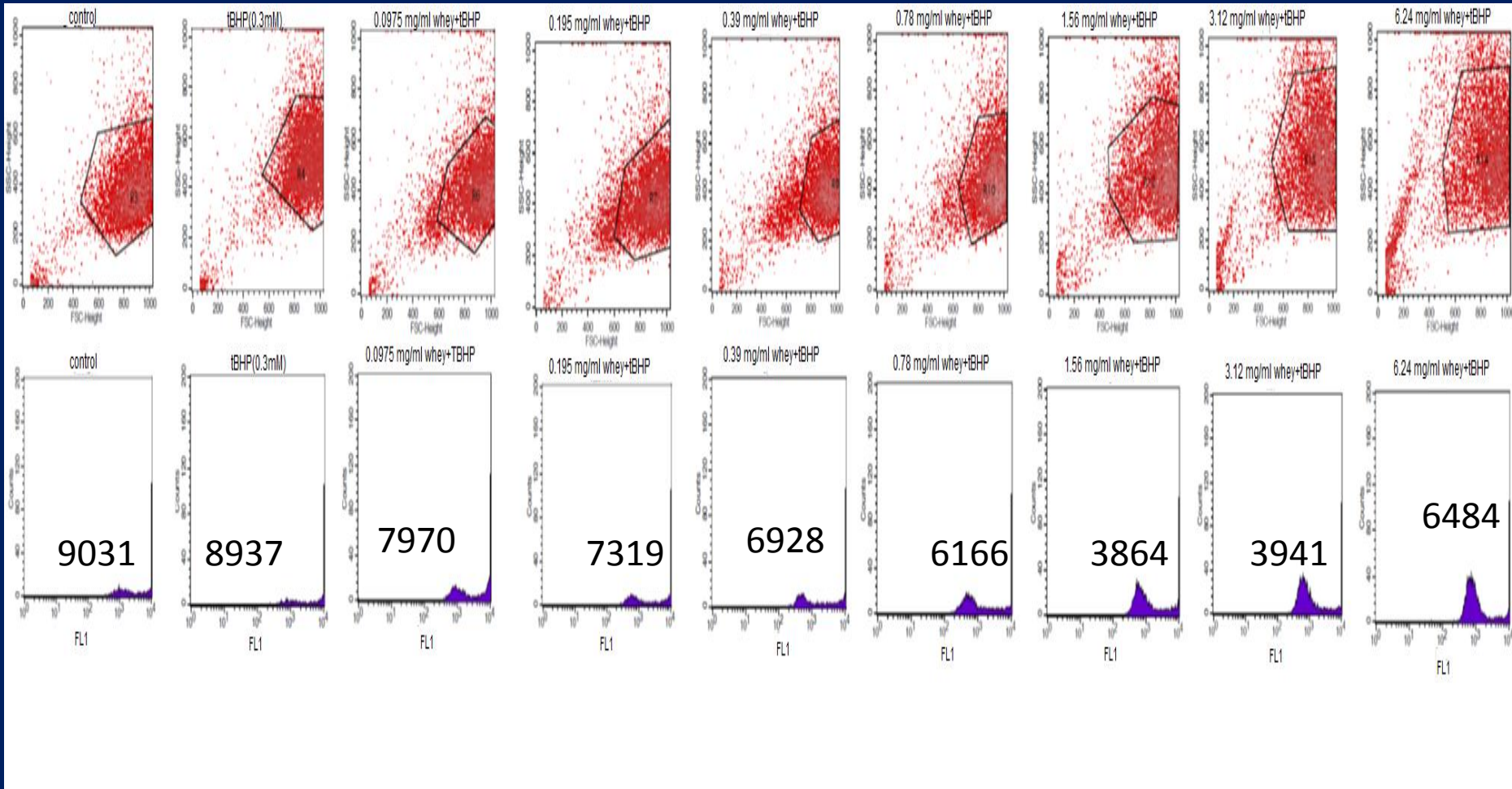




# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- 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.

# ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΙΩΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ROS ΣΕ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

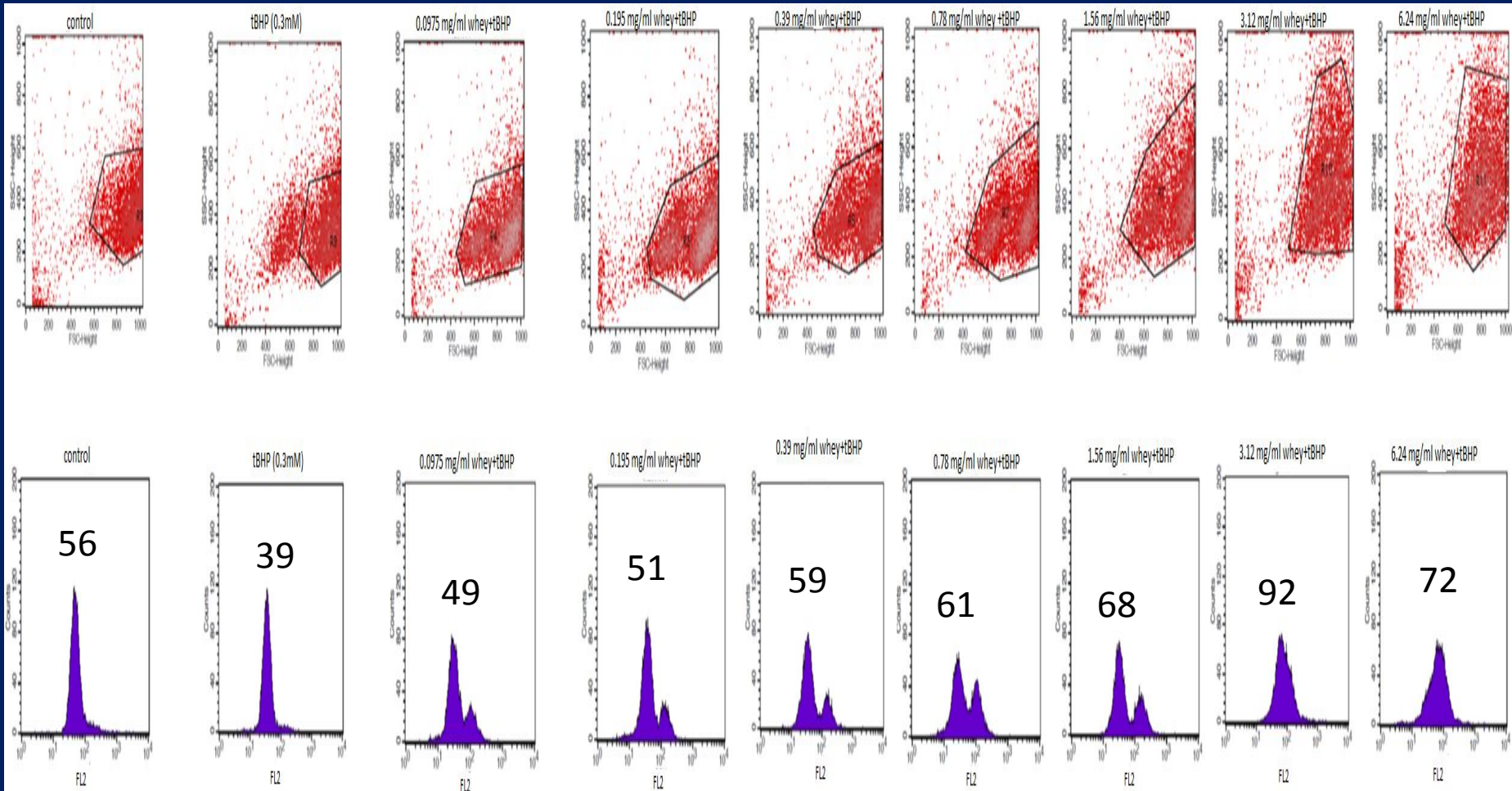


(A) Εικόνες από κυτταρομετρία ροής που δείχνουν την εσωτερική πολυπλοκότητα (SSC) και το μέγεθος (FSC) ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με πρωτεΐνη τυρογάλακτος. (B) Ιστογράμματα από κυτταρομετρία ροής που δείχνουν τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα μάρτυρες, σε κύτταρα στα οποία προστέθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, και σε κύτταρα όπου προστέθηκε ο tBHP μαζί με την πρωτεΐνη.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH)**
- 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.

# SHEEP WHEY PROTEIN INCREASES GSH LEVELS IN ENDOTHELIAL CELLS (EAhy926)



(A) Εικόνες από κυτταρομετρία ροής που δείχνουν την εσωτερική πολυπλοκότητα (SSC) και το μέγεθος (FSC) ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία επώαστηκαν με πρωτεΐνη τυρογάλακτος. (B) Ιστογράμματα από κυτταρομετρία ροής που δείχνουν τα επίπεδα της GSH στα κύτταρα μάρτυρες, σε κύτταρα στα οποία προστέθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας tBHP, και σε κύτταρα όπου προστέθηκε ο tBHP μαζί με την πρωτεΐνη.

# 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.

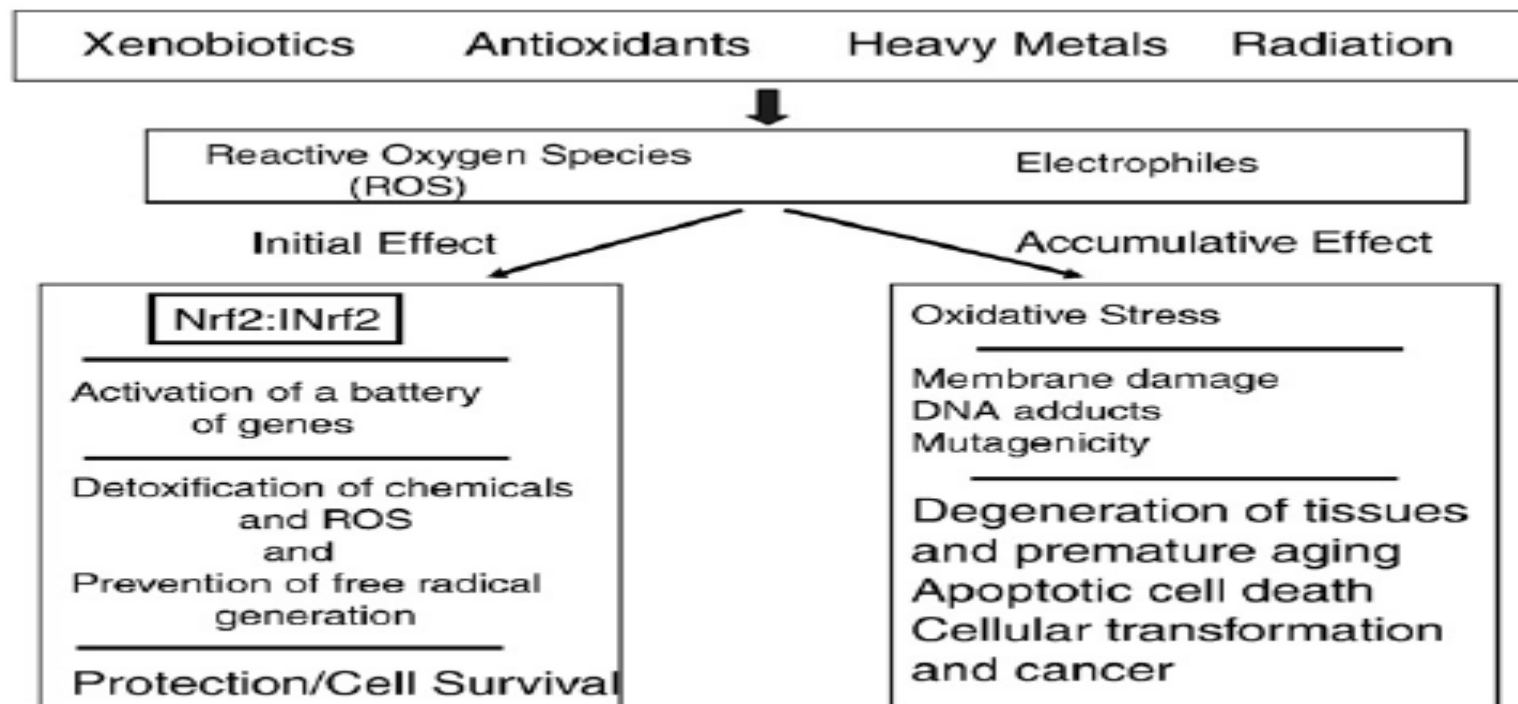
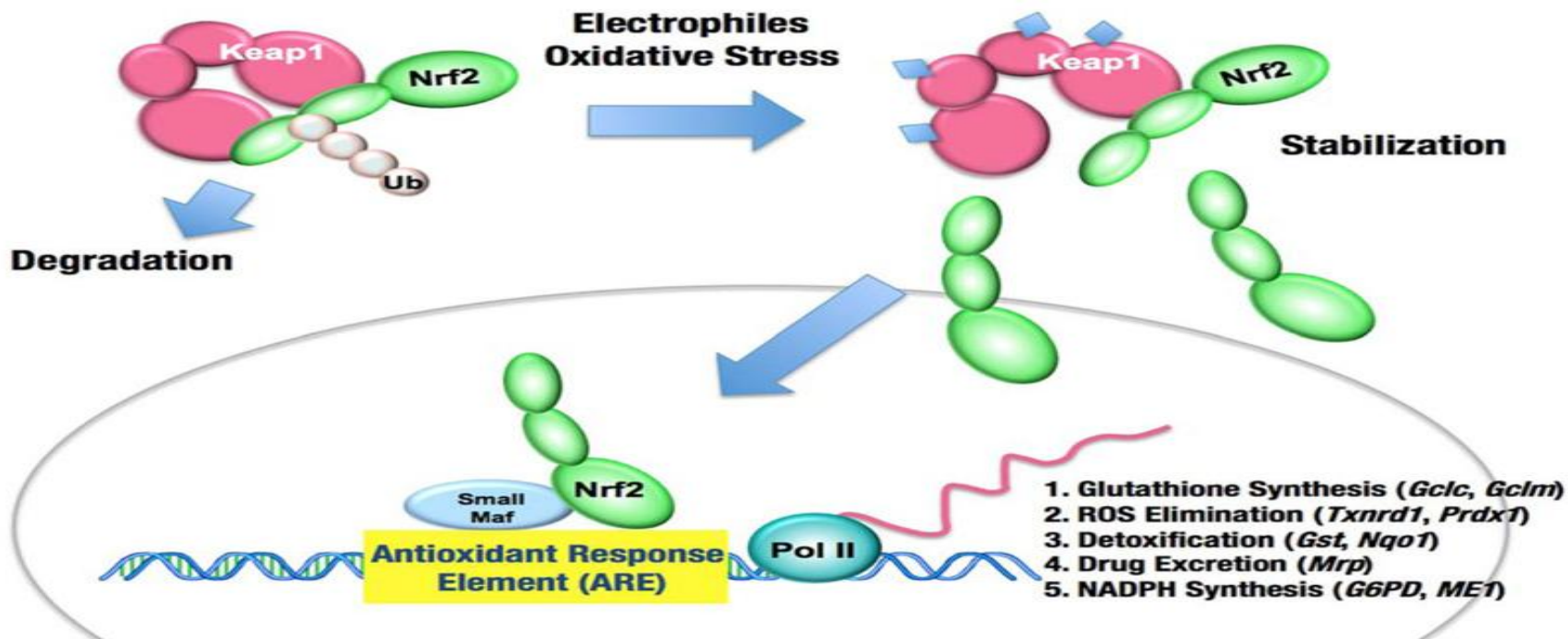
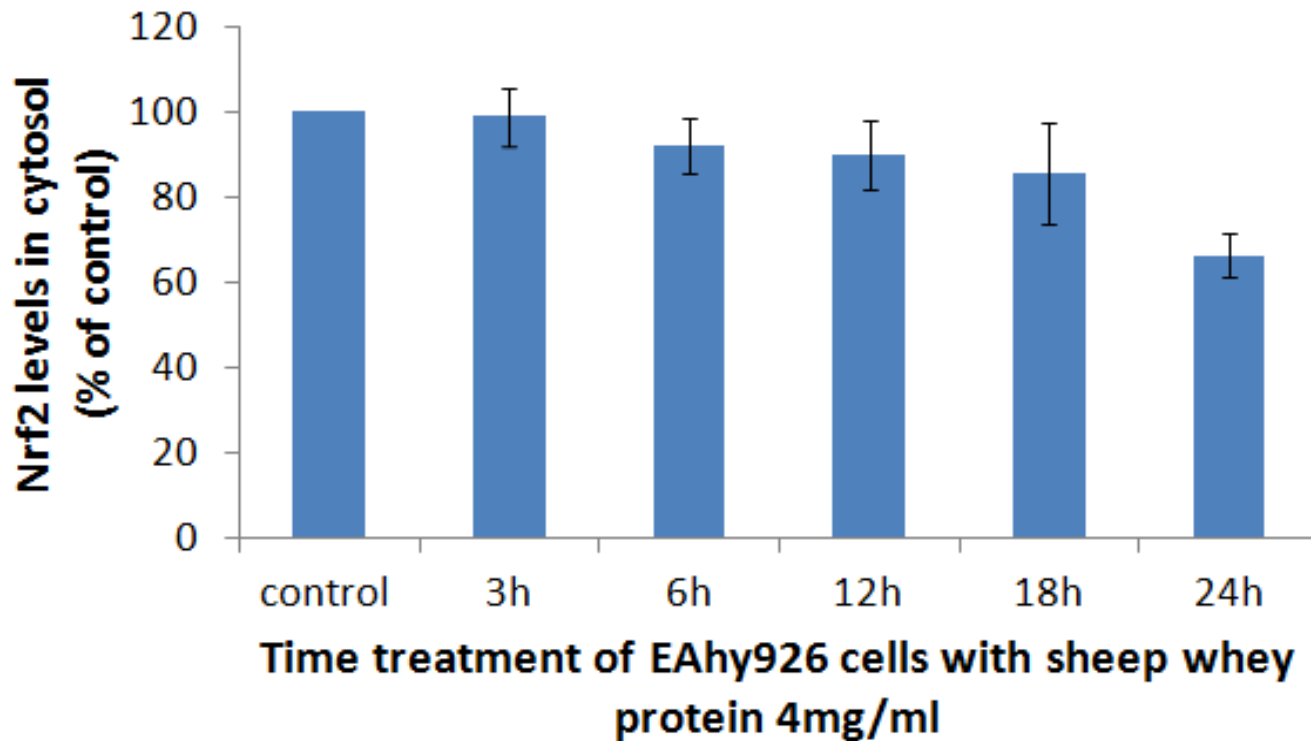
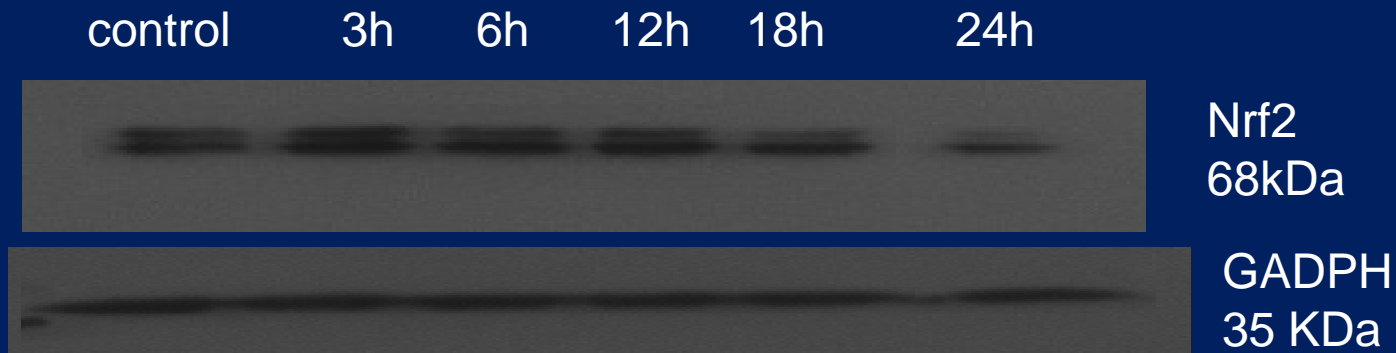


Fig. 1. Chemical and radiation exposure and coordinated induction of defensive genes.

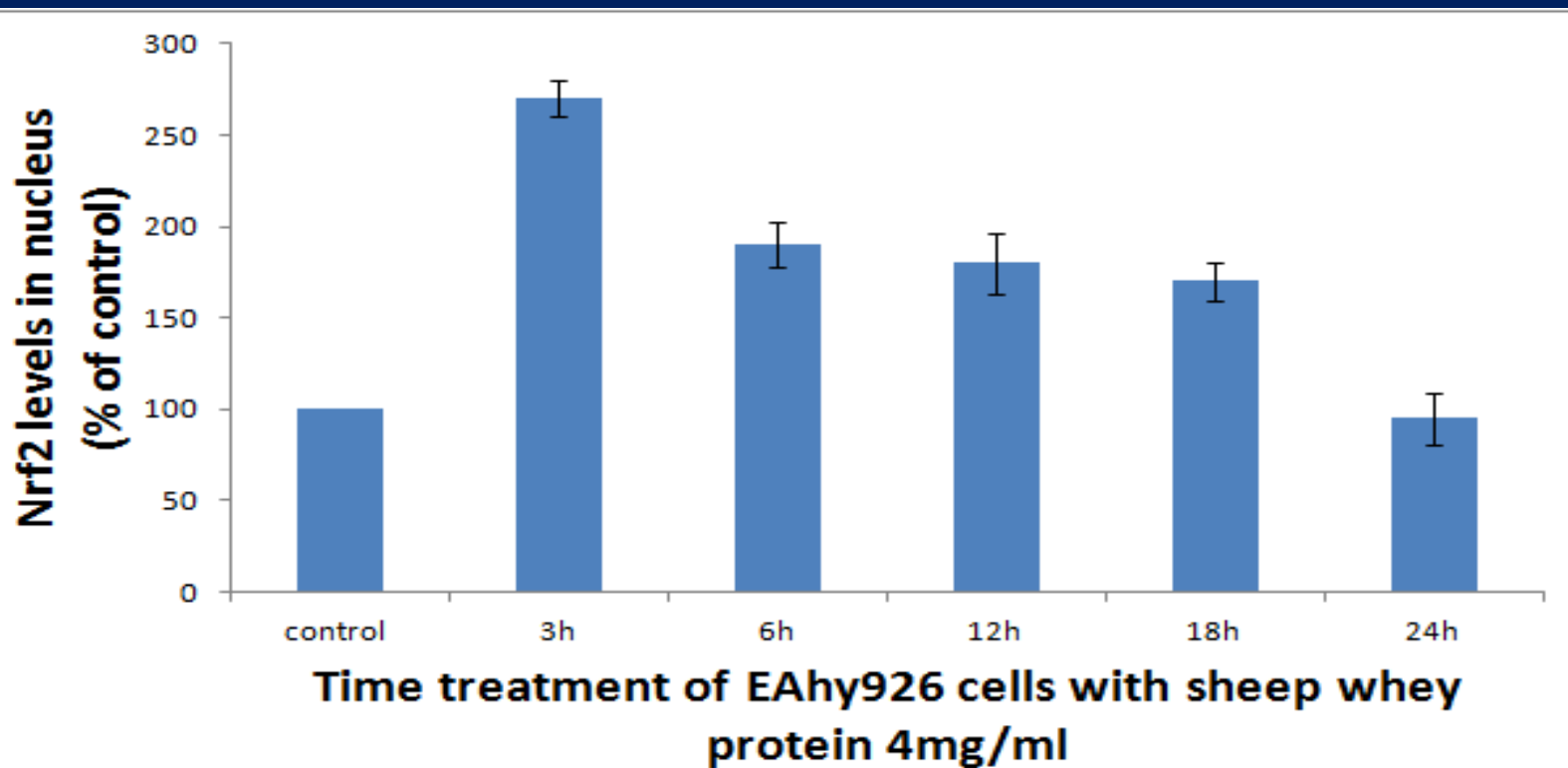
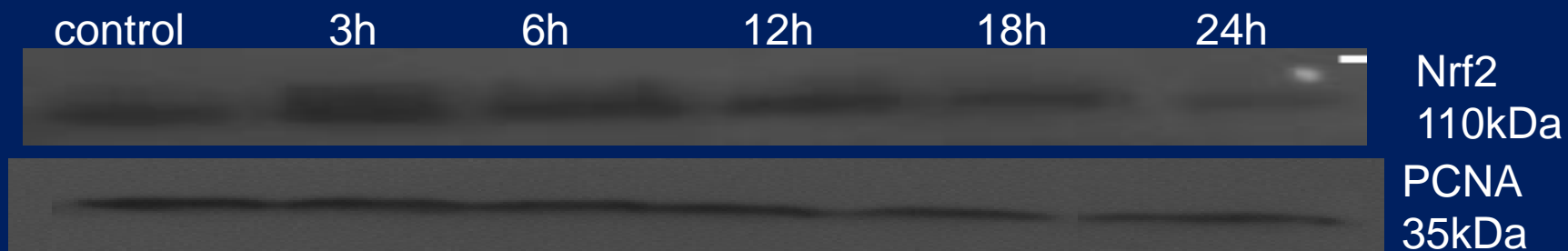
- Ο Nrf2 συνδέεται στο κυτταρόπλασμα με έναν αναστολέα του, το Keap1.
- Μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες ο Nrf2 φωσφορυλιώνεται ή/και αλλάζει η δομή του Keap1, και τα δύο μόρια αποσυνδέονται.
- Τότε ο Nrf2 μετακινείται στον πυρήνα, σχηματίζει ετεροδιμερή και συνδέεται στο ARE, και ενεργοποιεί την 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.



# Επίπεδα του Nrf2 στο κυτταρόπλασμα μετά από επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με πρωτεΐνη τυρογάλακτος.

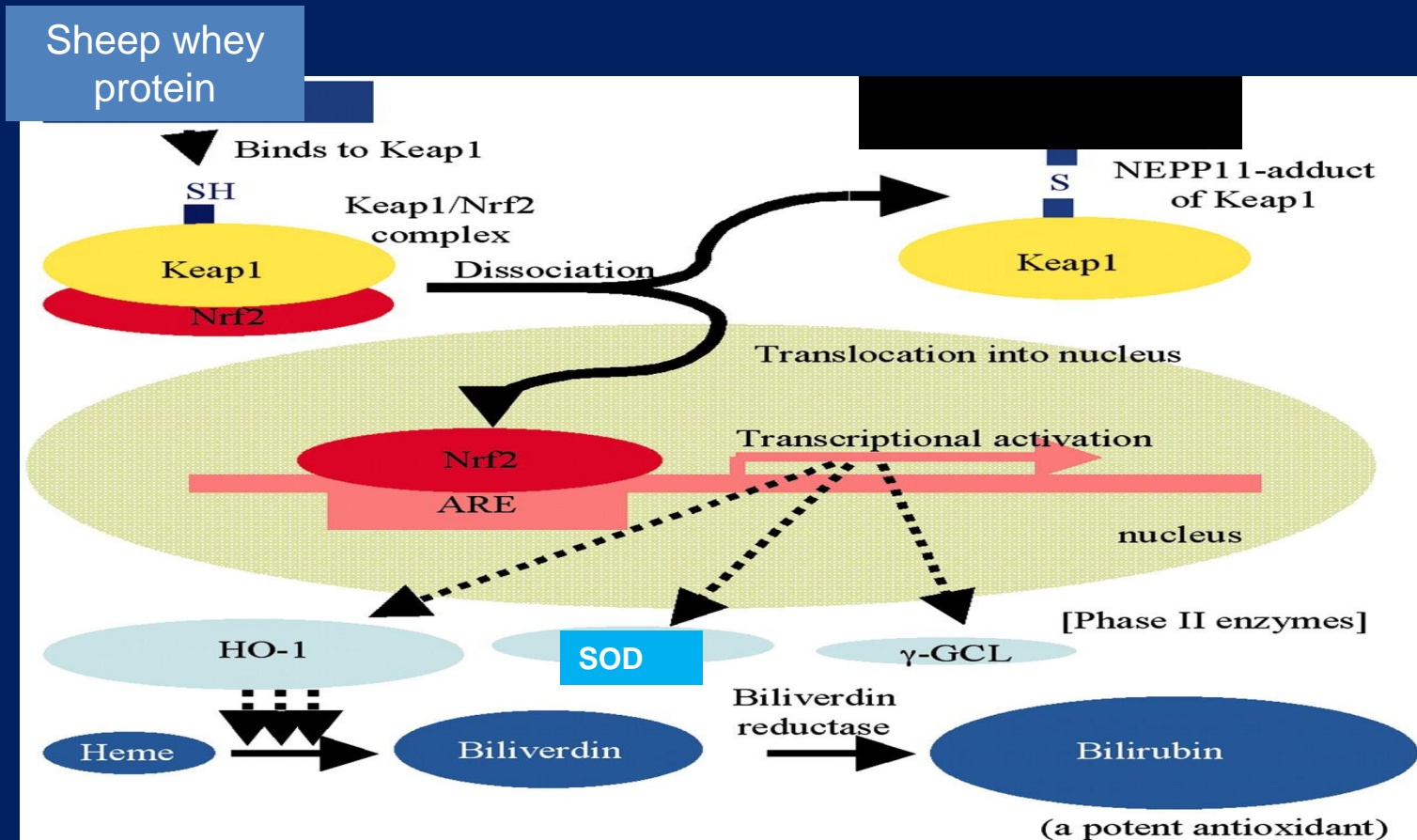


# Επίπεδα του Nrf2 στον πυρήνα μετά από επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με πρωτεΐνη τυρογάλακτος.





Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση μέσω του Nrf2 μεταγραφικού παράγοντα στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

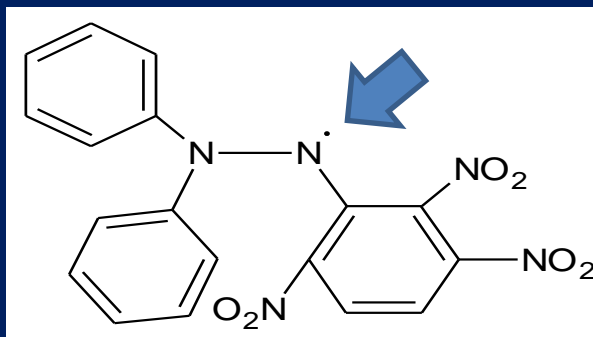
- Βιοδείκτης είναι μια ουσία ή ένα χαρακτηριστικό του κυττάρου που προσδιορίζεται με ακρίβεια και αξιοπιστία. Αποτελεί δείκτη φυσιολογικής βιολογικής λειτουργίας, ή παθολογικής διεργασίας ή φαρμακολογικής απόκρισης σε θεραπευτική παρέμβαση.
- Υπάρχουν αρκετοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες για τον υπολογισμό της οξειδωτικής κατάστασης των βιολογικών μακρομορίων (του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών), και οι οποίοι κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των επιπέδων του οξειδωτικού στρες στους ζωντανούς οργανισμούς.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)

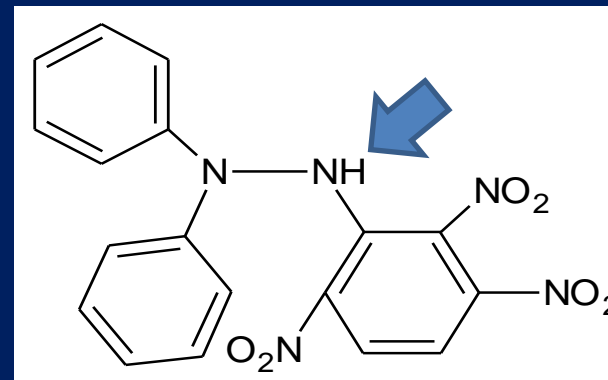
- Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και αποτελεί δείκτη της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού.
- Κάθε συστατικό του πλάσματος συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.
- Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.
- i) Ο πρώτος είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά και η άθροιση στη συνέχεια αυτών των αντιοξειδωτικών δράσεων. Αυτός ο τρόπος είναι δύσκολος και απαιτεί πολύ χρόνο.
- ii) Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των συστατικών συνολικά. Αυτό είναι το οποίο γίνεται στη μέθοδο της TAC.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)

- Η TAC του πλάσματος στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη ρίζα του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).
- Τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος δρουν ως δότες υδρογόνου και ανάγουν τη ρίζα DPPH προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine).
- Η μετατροπή της ρίζας DPPH στην ουδέτερη μορφή υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.



DPPH• ρίζα



DPPH

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ (TBARS)

- Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κυρίως των κυτταρικών μεμβρανών.
- Το κύριο προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η λιπιδική υπεροξείδωση.
- Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), κατά την οποία παράγεται ένα προϊόν (TBARS) που απορροφά στα 530nm.
- Έτσι, για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξείδωσης, το TBA προστίθεται στο πλάσμα και μετά από επώαση γίνεται φωτομέτρηση στα 530nm.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

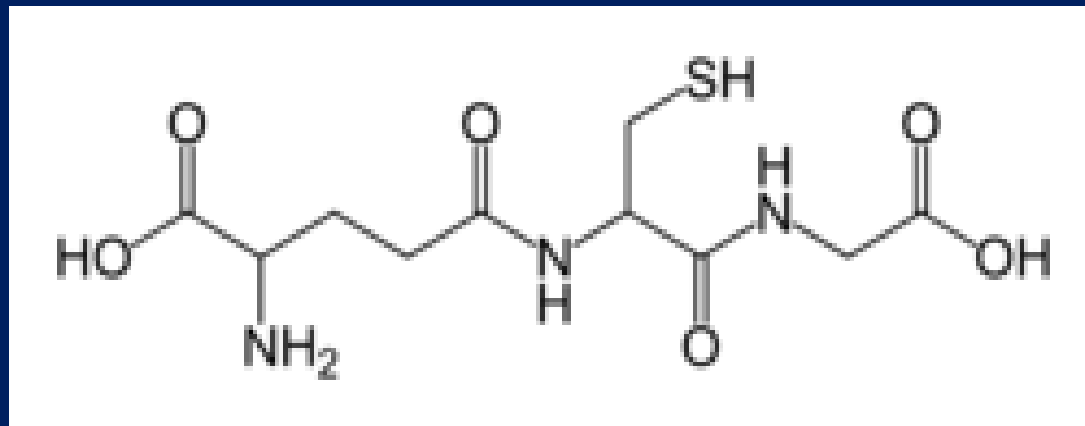
## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ)

- 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.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH)

- Η GSH είναι από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια στους ζωντανούς οργανισμούς.
- Η GSH είναι η πιο άφθονη θειόλη στους ιστούς του ανθρώπου. Οι ομάδες της θειόλης είναι αναγωγικοί παράγοντες που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις περίπου των 5mM στα ζωικά κύτταρα.
- Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη.

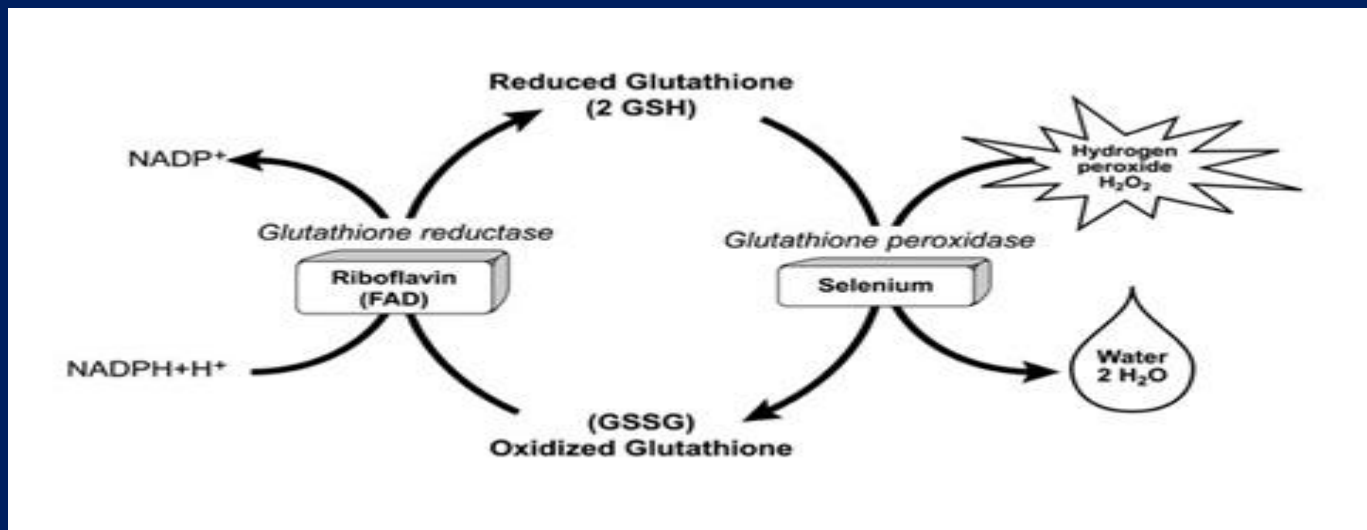


Χημική δομή της GSH

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH)

- Η GSH ανάγει τις ROS δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων.
- Έτσι, η GSH μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή, την GSSG.
- Η GSSG ανάγεται πάλι σε GSH από τη δράση της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης που χρησιμοποιεί NADPH ως δότη ηλεκτρονίων.
- Τα επίπεδα και της GSH καθώς και ο λόγος της GSH προς τη GSSG χρησιμοποιούνται σαν δείκτες οξειδωτικού στρες.
- Όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος GSH/GSSG τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός οργανισμού.



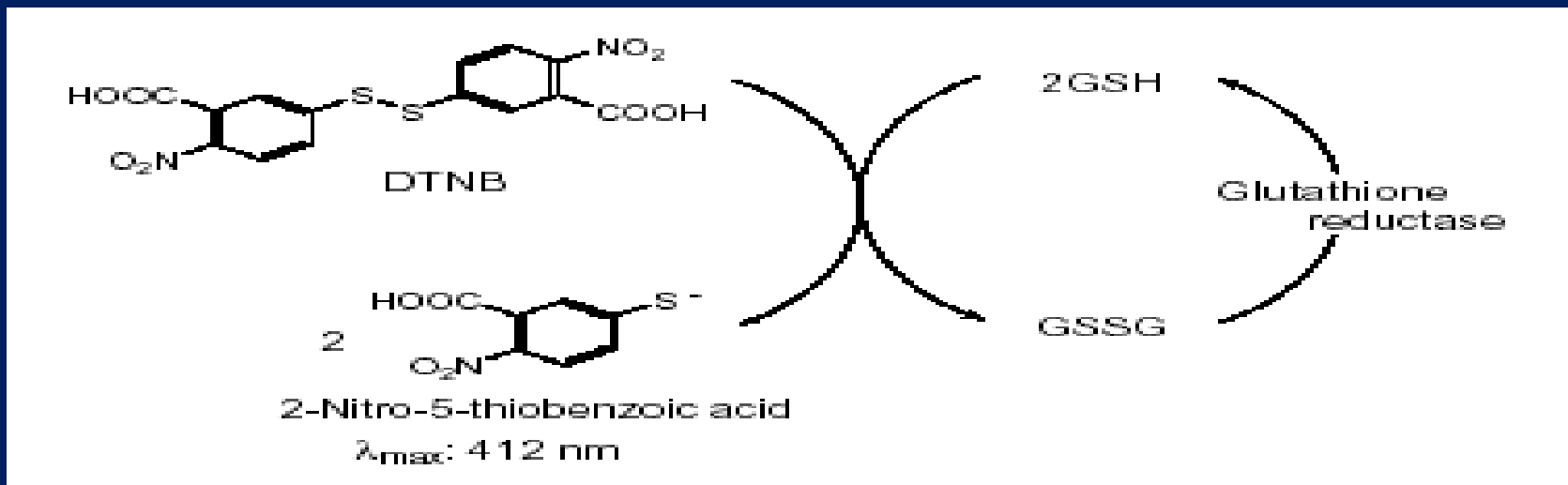
Μηχανισμός σχηματισμού της GSH από τη GSSG



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH)

- Ο προσδιορισμός της GSH στο αίμα γίνεται σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] .
- Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας 2-nitro-5-thiobenzoic acid που προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 412nm.
- Ο προσδιορισμός της GSSG βασίζεται στη μετατροπή της σε GSH από το ένζυμο ρεδουκτάση της γλουταθειόνης.
- Μετά τη μετατροπή, τα επίπεδα της GSH προσδιορίζονται με το DTNB μετρώντας την απορρόφηση στα 412nm για 70 sec.
- Η αύξηση στην απορρόφηση κατά τη διάρκεια των 70 sec οφείλεται στη μετατροπή της GSSG από τη ρεδουκτάση της γλουταθειόνης.



## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IN VIVO ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ (CAT)

- Η καταλάση (CAT) είναι από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

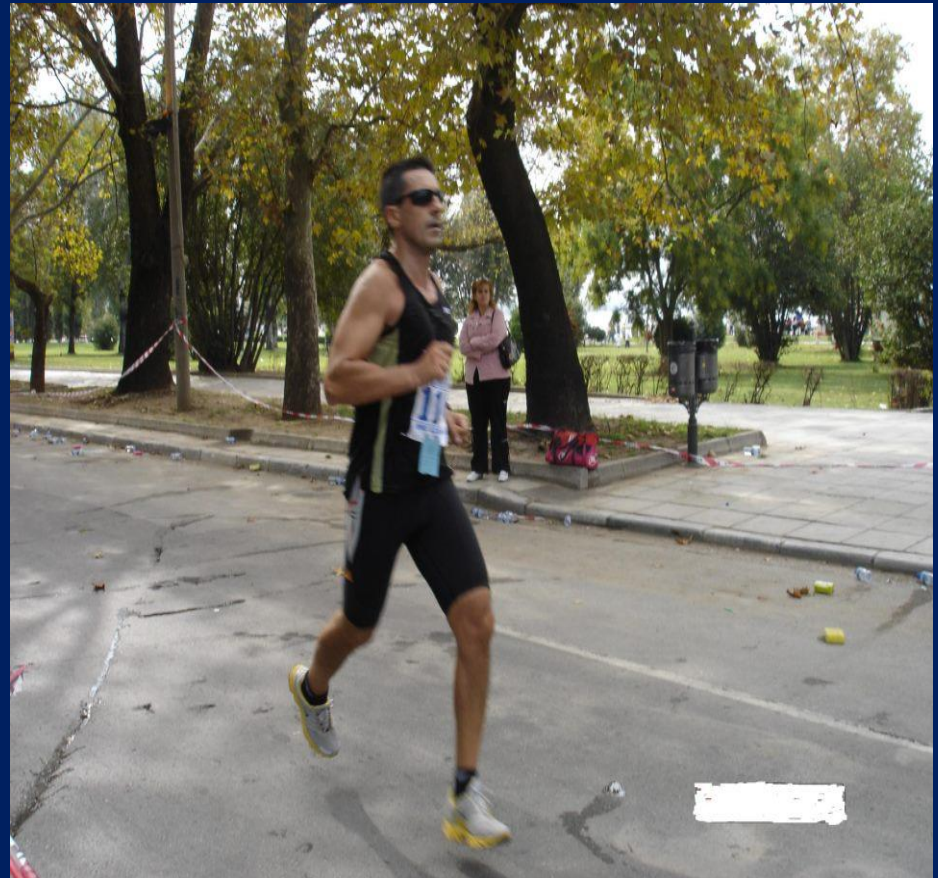


- Ο προσδιορισμός της δράσης της CAT στο αίμα γίνεται σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και βασίζεται στον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με φασματοφωτομετρία στα 240nm.
- Όσο μεγαλύτερη είναι η δράση της CAT τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού.

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



- Η σωματική άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες.



# EXERCISE AS A MODEL FOR STUDYING OXIDATIVE STRESS

- 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.

# Sampling Time is Crucial for Measurement of Aerobic Exercise-Induced Oxidative Stress

YIANNIS MICHAILIDIS<sup>1</sup>, ATHANASIOS Z. JAMURTAS<sup>2,3</sup>, MICHALIS G. NIKOLAIDIS<sup>2,3,4</sup>,  
IOANNIS G. FATOUROS<sup>1</sup>, YIANNIS KOUTEDAKIS<sup>2,5</sup>, IOANNIS PAPASSOTIRIOU<sup>6</sup>, and DIMITRIS KOURETAS<sup>4</sup>

0195-9131/07/3907-1107/0

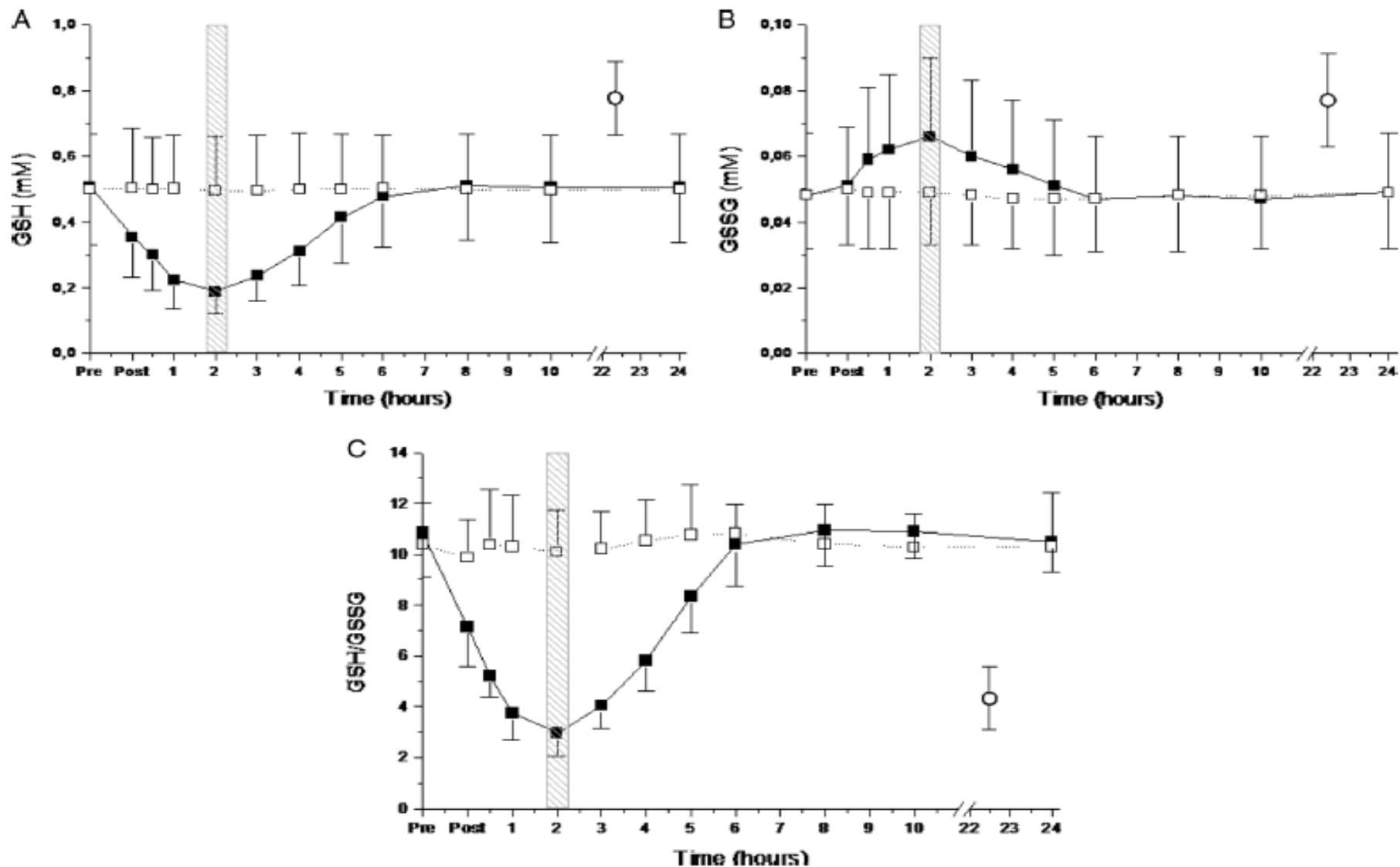
MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE<sup>®</sup>

Copyright © 2007 by the American College of Sports Medicine

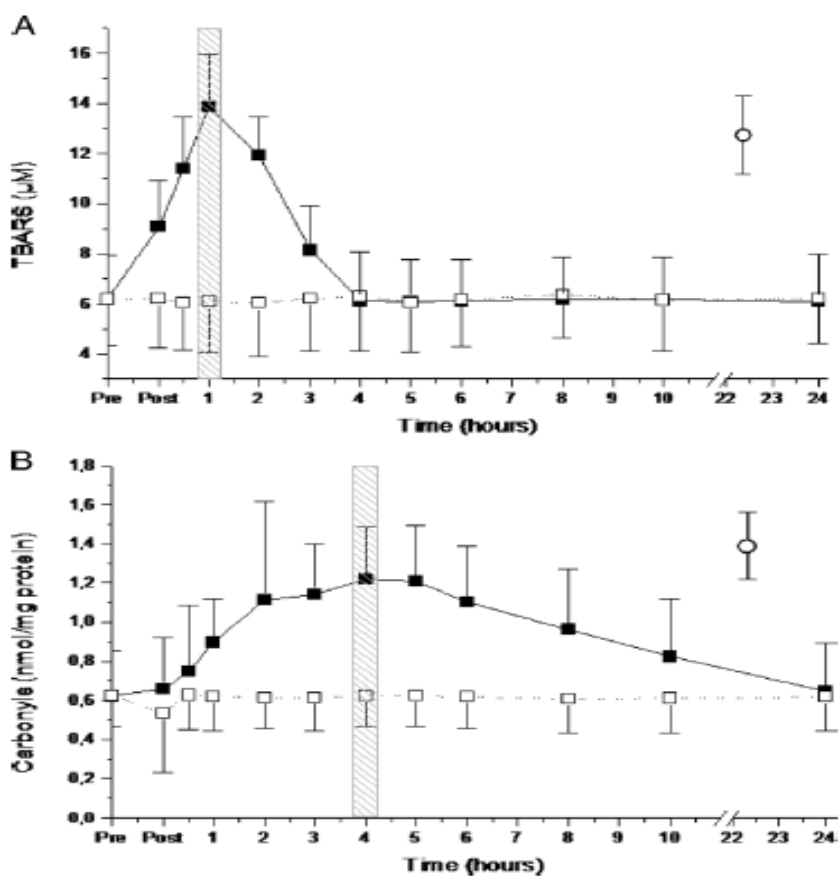


## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

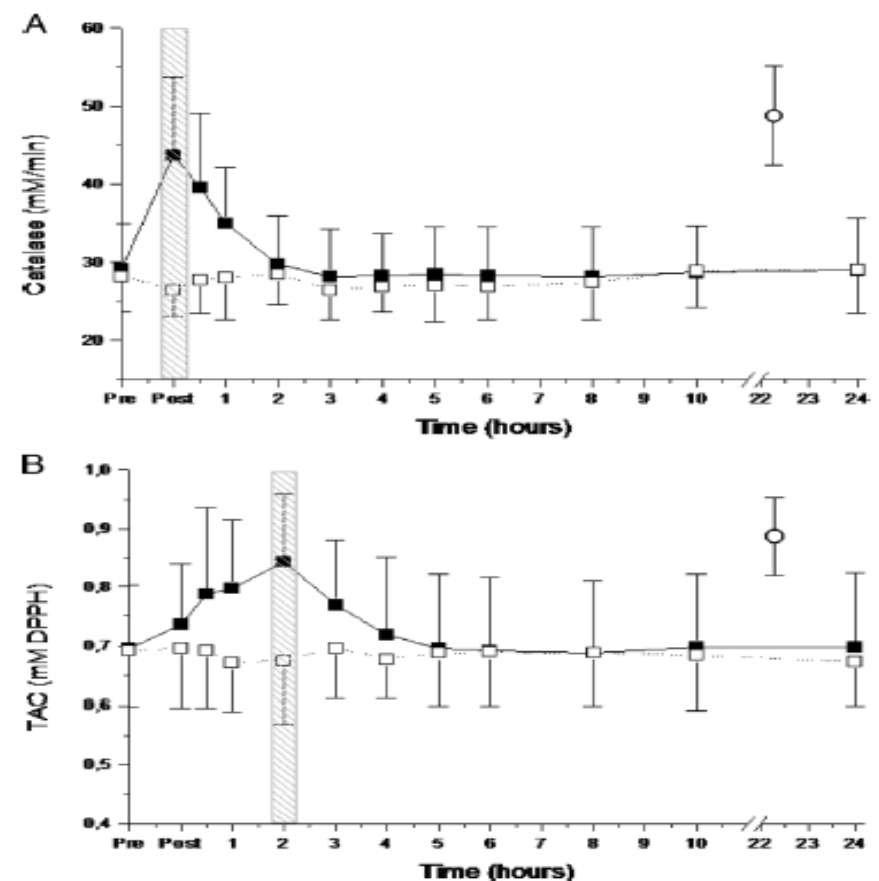
- 11 αθλητές υποβλήθηκαν σε άσκηση κατά την οποία έτρεξαν για 45 λεπτά σε διάδρομο με ρυθμό στο 70-75% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου.
- Μετά τα 45 λεπτά, η ταχύτητα αυξήθηκε στο 90% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου μέχρι πλήρους εξάντλησης.



**FIGURE 1**—Glutathione (A), oxidized glutathione (B), and glutathione/oxidized glutathione (C) concentrations during control (*open rectangles*) and exercise trials (*closed rectangles*). Values are means  $\pm$  SD. *Error bars* at the side of each figure represent 95% confidence limits of the difference between rest and exercise for the maximum or minimum concentration.



**FIGURE 2—**Thiobarbituric acid–reactive substances (*A*) and protein carbonyl (*B*) concentration during control (*open rectangles*) and exercise trials (*closed rectangles*). Values are means  $\pm$  SD. Error bars at the side of each figure represent 95% confidence limits of the difference between rest and exercise for the maximum concentration.



**FIGURE 3—**Catalase activity (*A*) and total antioxidant capacity (*B*) concentrations during control (*open rectangles*) and exercise trials (*closed rectangles*). Values are means  $\pm$  SD. Error bars at the side of each figure represent 95% confidence limits of the difference between rest and exercise for the maximum concentration.

- There is no best time point applying to all markers for collecting blood samples after aerobic exercise.
- The optimum postexercise time points for blood collection in untrained individuals are immediately after exercise for catalase, 1 h for TBARS, 2 h for TAC, GSH, and GSSG, and 4 h after exercise for protein carbonyls.



# 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.

The ORP Diagnostic System is a simple, rapid test that delivers results in less than four minutes

The ORP Diagnostic System is appropriate for both clinical and research settings.



OR



1.) Obtain a blood sample using standard collection techniques. (Stored plasma may also be used)



2.) Drop a single drop of blood or plasma onto the ORP sensor strips, and insert the strips into the reader



3.) Results received within four minutes –  
*Static ORP*  
*Transition ORP*  
*Capacitance*

- 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).

**The ORP Diagnostic System is a platform that also has distinct clinical applications.**

- ❖ The ORP measurements can alert a physician to a patient's worsening condition *before traditional laboratory tests can.*
- ❖ Knowing oxidative stress enables physicians to make *emergency treatment decisions quickly.*
- ❖ This integrated measure of oxidative stress *effectively guides therapeutic decisions in at-risk patients* who may not have been previously identified.

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ**