

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΑΒΒΙΔΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

**“Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής
δράσης του εκχυλίσματος από το φυτό
Sideritis scardica”**

**“Determination of the antioxidant
activity of the extract from the plant *Sideritis
scardica*”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στάγκος Δημήτριος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τραχανά Βαρβάρα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας – Κυτταρικής Βιολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μοσιαλός Δημήτριος: Αναπληρωτής καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια, τα οποία παράγονται φυσιολογικά από οργανισμό ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού, της κυτταρικής αναπνοής, της απόκρισης σε φλεγμονή, αλλά και ως προϊόν εξωτερικών παραγόντων, όπως η ακτινοβολία, το κάπνισμα και άλλων ρυπογόνων παραγόντων. Σε χαμηλές ποσότητες είναι ευεργετικές για τον οργανισμό, καθώς συμμετέχουν στην μεταγωγή σήματος. Ωστόσο, η συσσώρευσή τους μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση που προκαλεί σημαντικές βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα, συμβάλλοντας στην εμφάνιση μακροχρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Τα αντιοξειδωτικά, είναι ουσίες οι οποίες εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, περιορίζοντας το οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τελικά να προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες. Διακρίνονται σε ενδογενή, που παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό, και εξωγενή, που λαμβάνονται μέσω της διατροφής. Μάλιστα, τα τελευταία ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων άρχισε να υιοθετεί έναν διαφορετικό τρόπο διατροφής, επιλέγοντας προϊόντα τα οποία, εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, έχουν και ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Στο πλαίσιο αυτής της ανάγκης, έχουν γίνει προσπάθειες εύρεσης φυσικών συστατικών τα οποία έχουν την δυνατότητα να συμβάλουν στην βελτιστοποίηση της υγείας του ατόμου. Ιδιαίτερη σημασία φαίνεται να έχουν οι πολυφαινόλες, μια μεγάλη κατηγορία φυτικών ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση. Οι ενώσεις αυτές έχουν ταυτοποιηθεί σε φρούτα, λαχανικά, τσάι, κρασί και άλλα φυτικά προϊόντα.

Για αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του *Sideritis scardica* ('τσάι του Βουνού'). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δέκα *in vitro* μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος ήταν η Follin-Ciocalteau, για τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος. Ακολούθησαν, τέσσερις μέθοδοι οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•], ABTS^{•+} και των ριζών υδροξυλίου (OH[•]) και υπεροξειδίου (O₂^{•-}), από τις πολυφαινολικές ενώσεις του φυτικού εκχυλίσματος *Sideritis scardica*. Η έκτη μέθοδος, η αναγωγή του Fe⁺³ (Reducing Power Assay), αφορά την ικανότητα του εκχυλίσματος να ανάγει οξειδωμένα μόρια. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι το φυτικό εκχύλισμα ήταν πλούσιο σε πολυφαινόλες και διέθετε τόσο ικανότητα εξουδετέρωσης των παραπάνω ριζών όσο και αναγωγική δράση. Ακολούθησε η εξέταση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις μέθοδοι προσδιορισμού της προστασίας από οξείδωση των πρωτεϊνών (μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων), της λιπιδικής υπεροξείδωσης (μέθοδος TBARS), καθώς και της επίδραση στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν φάνηκε να προστατεύουν τα

κύτταρα ούτε από την οξείδωση των πρωτεϊνών, ούτε από την λιπιδική υπεροξείδωση. Όμως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης μόνο από την μικρότερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, διαπίστωση που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Λέξεις κλειδιά: Ελεύθερες ρίζες, Οξειδωτικό στρες, Αντιοξειδωτικά, Πολυφαινόλες, *Sideritis scardica*, Κυτταρική προστασία.

ABSTRACT

Free radicals are highly reactive molecules that are naturally produced by the body as a result of metabolism, cellular respiration, inflammatory responses, and external factors such as radiation, smoking, and other pollutants. In low amounts, they are beneficial to the body, as they participate in signal transduction. However, their accumulation can lead to oxidative stress, a condition that causes significant damage to biological macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids, contributing to the development of long-term diseases such as cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative disorders. Antioxidants are substances that neutralize free radicals, limiting oxidative stress, ultimately protecting cells from damage. They are distinguished into endogenous, which are produced naturally by the body, and exogenous, which are obtained through diet. In fact, recently an increasing number of people have begun to adopt a different way of eating, choosing products that, in addition to their nutritional properties, also have a beneficial effect on human health. In the context of this need, efforts have been made to find natural ingredients that have the potential to contribute to optimizing the health of the individual. Of particular importance seem to be polyphenols, a large class of plant compounds with strong antioxidant, anticancer and anti-inflammatory effects. These compounds have been identified in fruits, vegetables, tea, wine and other plant products.

For this reason, in the present work we studied the antioxidant properties of *Sideritis scardica* ('mountain tea'). A total of ten in vitro methods were performed. The first method was the Follin-Ciocalteu, for the determination of the total polyphenolic content of the extract. This was followed by four methods based on the neutralization of the stable chemical radicals DPPH[•], ABTS^{•+} and the hydroxyl (OH[•]) and peroxide (O₂^{•-}) radicals, by the polyphenolic compounds of the *Sideritis scardica* plant extract. The sixth method, the reduction of Fe⁺³ (Reducing Power Assay), concerns the ability of the extract to reduce oxidized molecules. The measurements made revealed that the plant extract was rich in polyphenols and had both the ability to neutralize the above radicals and a reducing effect. The antioxidant capacity of the extract was then examined in human mesenchymal stem cells. For this purpose, three other methods were performed to determine the protection against protein oxidation (protein carbonyl method), lipid peroxidation (TBARS method), as well as the effect on glutathione (GSH) levels. The concentrations used did not appear to protect the cells from either protein oxidation or lipid peroxidation. However, of particular interest was the increase in glutathione levels only by the lowest concentration of the extract, a finding that requires further investigation.

Keywords: Free radicals, Oxidative stress, Antioxidants, Polyphenols, *Sideritis scardica*, Cellular protection.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1.Εισαγωγή.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	9
1.1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών.....	10
1.1.3 Συνέπειες παραγωγής ελεύθερων ριζών – Οξειδωτικό στρες.....	14
1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.....	15
1.2 Αντιοξειδωτική άμυνα.....	17
1.2.1 Αντιοξειδωτική ουσία.....	17
1.2.2 Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών.....	18
1.2.3 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών.....	18
1.3 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις.....	20
1.3.1 Πολυφαινόλες.....	20
1.3.2 Φυσιολογική δράση πολυφαινολών.....	22
1.3.3 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών.....	22
1.4 Sideritis scardica.....	23
1.5 Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's jelly.....	24
2. Σκοπός.....	25
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	25
3.1 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Μέθοδος Follin-Ciocalteu.....	25
3.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	25
3.1.2 Πειραματική διαδικασία.....	26
3.1.3. Υπολογισμοί.....	27
3.2 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+}	27
3.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	27
3.2.2 Πειραματική διαδικασία.....	28
3.2.3. Υπολογισμοί.....	29
3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH [•]	29
3.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	29
3.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	30
3.3.3. Υπολογισμοί.....	31
3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH [•]	31
3.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	31
3.4.2 Πειραματική διαδικασία.....	32
3.4.3. Υπολογισμοί.....	33
3.5. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης.....	33
3.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	33
3.5.2 Πειραματική διαδικασία.....	34
3.5.3. Υπολογισμοί.....	35
3.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ ^{•-}	35
3.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	35
3.6.2 Πειραματική διαδικασία.....	35
3.6.3 Υπολογισμοί.....	36
3.7 Μέθοδος XTT.....	38
3.7.1 Πειραματική διαδικασία.....	39
3.7.2 Υπολογισμοί.....	40

3.8 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBARS).....	40
3.8.1 Αρχή της μεθόδου.....	40
3.8.2 Πειραματική διαδικασία.....	41
3.8.3 Υπολογισμοί.....	42
3.9 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	42
3.9.1 Αρχή της μεθόδου.....	42
3.9.2 Πειραματική διαδικασία.....	43
3.9.3 Υπολογισμοί.....	45
3.10 Γλουταθειόνη.....	45
3.10.1 Αρχή της μεθόδου.....	45
3.10.2 Πειραματική διαδικασία.....	46
3.10.3 Υπολογισμοί.....	46
3.11 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.....	47
4. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	47
4.1 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	47
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+.....	48
4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•.....	48
4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Reducing Power (RPA).....	49
4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας OH•.....	50
4.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ •-.....	51
4.7 Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης – Μέθοδος XTT.....	51
4.8 Προσδιορισμός επιπέδων θειοβαρβιτουρικού Οξέος - TBARS.....	53
4.9 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	53
4.10 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης- GSH.....	54
5. Συμπεράσματα.....	54
6. Βιβλιογραφία.....	56

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα αποσπά ηλεκτρόνιο από γειτονικό μόριο.....	9
Εικόνα 2:Αναπνευστική αλυσίδα – οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	11
Εικόνα 3: Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.	14
Εικόνα 4: Συνθήκες ισορροπίας αντιοξειδωτικών-ελεύθερων ριζών και οξειδωτικού στρες.....	15
Εικόνα 5: Δράση αντιοξειδωτικού έναντι σε ελεύθερη ρίζα.	17
Εικόνα 6: Δομικός σκελετός πολυφαινολών.....	21
Εικόνα 7: Οι τέσσερις κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών.	22
Εικόνα 8: Sideritis scardica.....	23
Εικόνα 9: Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's jelly.	25
Εικόνα 10: Γενική αντίδραση οξειδοαναγωγής της δοκιμασία Folin–Ciocalteu.....	26
Εικόνα 11: Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂	28
Εικόνα 12: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα του ABTS•+.....	28
Εικόνα 13: Μηχανισμός αναγωγής της DPPH από ένα αντιοξειδωτικό (AH).....	30
Εικόνα 14: Μετατροπή του αντιδραστηρίου XTT σε φορμαζάνη.....	39
Εικόνα 15: 96-Well Cell Culture Plate.	39

Εικόνα 16: Δύο μόρια TBA αντιδρούν με MDA.	41
Εικόνα 17: Αντίδραση DNPH με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.	43
Εικόνα 18: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.	45

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

Πίνακας 1: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Follin ciocalteau.	26
Πίνακας 2: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Follin ciocalteau.	26
Πίνακας 3: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο ABTS ^{•+}	29
Πίνακας 4: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο DPPH [•]	30
Πίνακας 5: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο OH [•]	32
Πίνακας 6: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο OH [•]	33
Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.	34
Πίνακας 8: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.	34
Πίνακας 9: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.	35
Πίνακας 10: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο O ₂ ^{•-}	36
Πίνακας 11: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.	41
Πίνακας 12: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.	42
Πίνακας 13: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.	42
Πίνακας 14: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	43
Πίνακας 15: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	44
Πίνακας 16: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	44
Πίνακας 17: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	44
Πίνακας 18: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	44
Πίνακας 19: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Γλουταθειόνης.	46
Πίνακας 20: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο <i>Sideritis scardica</i>	47

Πίνακας περιεχομένων διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος.	27
Διάγραμμα 2: Η % αναστολή της ρίζας ABTS ^{•+} από το <i>Sideritis scardica</i>	48
Διάγραμμα 3: Η % αναστολή της ρίζας DPPH [•] από το <i>Sideritis scardica</i>	49
Διάγραμμα 4: Η αναγωγική ισχύς του <i>Sideritis scardica</i>	50
Διάγραμμα 5: Η % αναστολή της ρίζας OH [•] από το <i>Sideritis scardica</i>	50
Διάγραμμα 6: Η % αναστολή της ρίζας O ₂ ^{•-} από το <i>Sideritis scardica</i>	51
Διάγραμμα 7: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης.	52
Διάγραμμα 8: Επίπεδα TBARS σε σχέση με το Control.	53
Διάγραμμα 9: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το Control.	53
Διάγραμμα 10: Επίπεδα Γλουταθειόνης σε σχέση με το Control.	54

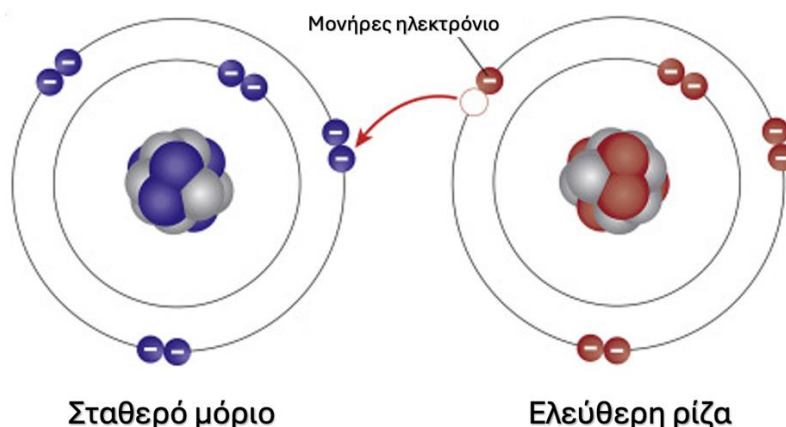
1.Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα (Lobo et al., 2010).

Η ύπαρξη του ασύζευκτου ηλεκτρονίου, καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ιδιαίτερα ασταθή και δραστικά μόρια, με σημαντικά μικρό χρόνο ημιζωής. Ο χαρακτηρισμός αυτός, προκύπτει από την τάση που έχουν οι ελεύθερες ρίζες είτε να παραχωρήσουν το μονήρες ηλεκτρόνιο που διαθέτουν, είτε να δεσμεύσουν ένα ηλεκτρόνιο από γειτονικά μόρια με στόχο την συμπλήρωση της εξωτερικής τους στιβάδας και την ανάκτηση της σταθερότητάς τους (Barba et al. 2020). Βέβαια, η κίνηση τους αυτή μετατρέπει το γειτονικό μόριο που δέχεται ή που χάνει ένα ηλεκτρόνιο σε ελεύθερη ρίζα, προκαλώντας έναν καταρράκτη αλυσιδωτών αντιδράσεων μετατροπής μορίων σε ελεύθερες ρίζες (Phaniendra et al., 2015).



Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα αποσπά ηλεκτρόνιο από γειτονικό μόριο

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών. Η απλούστερη ελευθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, η οποία διαθέτει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι μόρια με κέντρο το οξυγόνο (Zorov et al., 2014) και σπανιότερα το αζώτο (Halliwell et al., 2001), τον άνθρακα και το θείο. Αναλυτικότερα, μόρια που περιλαμβάνουν οξυγόνο, θεωρείται ότι είναι 'ελεύθερες ρίζες' είτε είναι πραγματικά ελεύθερες ρίζες όπως το Ανιον Σουπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα Υδροξυλίου ($OH\cdot$), η ρίζα Υπεροξειδίου ($RO_2\cdot$), η ρίζα Αλκοξειδίου ($RO\cdot$), η ρίζα Υδρουπεροξειδίου ($HO_2\cdot$), είτε όχι όπως το (Υπεροξειδιο Υδρογόνου (H_2O_2), το Υποχλωριωδες Οξύ ($HOCl$), το Υποβρωμιωδες Οξύ ($HOBr$), το Οζόν (O_3), το Μονήρες Οξυγόνο (1O_2), ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) (Zorov et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί πως τα μη ριζικά είδη, παρόλο που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, χαρακτηρίζονται ως τέτοιες γιατί μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς.

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και μοριακά είδη που έχουν σαν κεντρικό μόριο το αζώτο και ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO και το διοξειδίο του αζώτου NO₂, καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, όπως το Νιτρωδες Οξύ (HNO₂), το κατιόν Νιτροσυλίου (NO⁺), το ανιόν Νιτροσυλίου (NO⁻) (Halliwell, 2001).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πιο συνηθισμένος από αυτούς, είναι η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε ένα σταθερό μόριο και ακολουθεί, η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή η αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο. Τέλος, η πιο σύνθετη διαδικασία, η ομοιολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού ενός σταθερού μορίου, όπου κάθε θραύσμα διατηρεί ένα από τα ηλεκτρόνια ενός ζεύγους. Η διαδικασία αυτή, είναι η πιο περίπλοκη καθώς απαιτεί υψηλή ενεργειακή εισροή, όπως υψηλές θερμοκρασίες, υπεριώδη ακτινοβολία ή ιοντίζουσα ακτινοβολία (Cheeseman et al., 1993). Αυτά τα μοριακά είδη, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, παράγονται ενδογενώς δηλαδή από τον ίδιο τον οργανισμό μέσω φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών, αλλά πολλές φορές εξωγενείς παράγοντες, όπως παθολογικές καταστάσεις ή περιβαλλοντικές επιδράσεις, επάγουν την παραγωγή τους.

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν διπλό ρόλο στον οργανισμό και η δράση τους, μπορεί να είναι επιβλαβής ή ευεργετική για τον οργανισμό ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και την ισορροπία με τα αντιοξειδωτικά συστήματα. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στην ανοσολογική άμυνα (Nathan et al., 2003), στην κυτταρική σηματοδότηση (Finkel et al., 2011), στην απομάκρυνση κατεστραμμένων κυττάρων (Simon et al., 2000) και στην ρύθμιση του μεταβολισμού (Droge et al., 2002).

Από την άλλη, η συσσώρευση ελεύθερων ριζών έχει αρνητική επίδραση στο κύτταρο και κατ' επέκταση στον ίδιο οργανισμό. Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερων ριζών προάγει το οξειδωτικό στρες, μια κατάσταση κατά την οποία η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού διαταράσσεται. Η συνθήκη αυτή σε συνδυασμό με την έντονη δραστηριότητα των ελεύθερων ριζών, οδηγεί σε αντιδράσεις με σημαντικά βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα επηρεάζοντας τη δομή και τη λειτουργία τους. Οι συνέπειες μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία, απόπτωση ή και νέκρωση. Μακροπρόθεσμα, αυτές οι βλάβες σχετίζονται με την ανάπτυξη χρόνιων παθήσεων, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθώς και η πρόωρη γήρανση (Wickens et al., 2001). Επομένως, η ρύθμιση της παραγωγής ελεύθερων ριζών και η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης.

1.1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στον οργανισμό μέσω τριών διαφορετικών μηχανισμών: την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου, την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου και την ομοιολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού. Προέρχονται, είτε από ενδογενείς πηγές, είτε από εξωγενείς και μπορεί να είναι αποτέλεσμα τόσο ενζυμικών όσο και μη ενζυμικών αντιδράσεων. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών, που συμμετέχουν σε φυσιολογικές μεταβολικές δραστηριότητες, περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, πολλές ενζυμικές δραστηριότητες που ελέγχονται

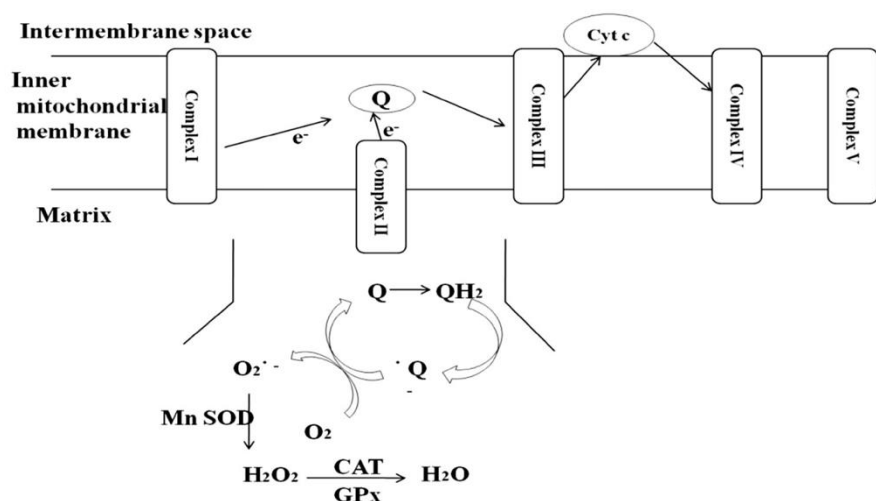
αυστηρά από το κύτταρο, το μεταβολισμό λιπαρών οξέων και τα φαγοκύτταρα (Lobo et al., 2010). Από την άλλη, οι εξωγενείς παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά και ατομικές συνήθειες.

I. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Ορισμένες από τις βασικότερες ενδογενείς πηγές παραγωγής των ελεύθερων ριζών είναι:

A. Αναπνευστική αλυσίδα - Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ενέργειας, μέσω παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), από ADP και ανόργανο φωσφορικό (Pi). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, ειδικότερα στην εσωτερική τους μεμβράνη και αποτελεί τελικό στάδιο της κυτταρικής αναπνοής. Αναλυτικότερα, κατά την έναρξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης οι φορείς NADH και FADH₂ μεταφέρουν ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται συνολικά από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (συμπlesμα NADH δευδρογονάσης, συμπlesμα αναγωγής κυτοχρώματος c, συμπlesμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχυόμενα μόρια (ουβικινίνη, κυτοχρώμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα συμπlesμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται σε ATP μέσω της συνθετάσης του ATP.



Εικόνα 2: Αναπνευστική αλυσίδα – οξειδωτική φωσφορυλίωση

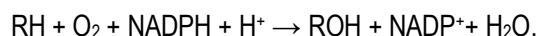
Όμως, ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και ενώνονται με το οξυγόνο, προάγοντας την δημιουργία ελεύθερων ριζών, ROS, ως παραπροϊόντα. Μάλιστα, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Το σύμπλοκο I (αφυδρογονάση NADH) και το σύμπλοκο III (αναγωγάση του κυτοχρώματος c ουβικινόνης), αποτελούν βασικές θέσεις παραγωγής της ρίζας υπεροξειδίου (Phaniendra et al., 2015). Η ενεργοποιημένη ουβικινόνη (Q) μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο οδηγώντας στο

σχηματισμό ρίζας υπεροξειδίου (Phaniendra et al., 2015). Το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με τη δράση της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (MnSOD) (Chance et al., 1979).

Β. Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P-450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 καταλύουν την οξείδωση και το μεταβολισμό πολλών ξενοβιοτικών και ενδογενών ενώσεων. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο O_2 , μέσω της παρακάτω αντίδρασης:



όπου με RH συμβολίζεται η ξενοβιοτική ουσία (Shankar et al., 2014).

Αυτή η διαδικασία αποτελεί την βασική άμυνα του οργανισμού έναντι ξενοβιοτικών ενώσεων, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις είναι πιθανόν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας βλάβη στο κύτταρο, αφού οι ξενοβιοτικές ουσίες μετατρέπονται σε τοξικές. Συγκεκριμένα, το NADPH οξειδώνεται δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ακόμα, παρουσιάζει ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παραγόντας $O_2^{\cdot-}$ (Phaniendra et al., 2015).

Γ. Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μικρά, σφαιρικά οργανίδια, τα οποία βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα και συμμετέχουν σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες, όπως η διαδικασία της αποτοξίνωσης του οργανισμού, η οξείδωση λιπαρών οξέων, ο μεταβολισμός λιπιδίων και ο μεταβολισμός του αζώτου. Βέβαια, όπως είναι γνωστό οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν τη διάσπαση, αλλά και την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες στο οξυγόνο, απελευθερώνοντας την ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Άλλες μορφές ελεύθερων ριζών, οι οποίες βέβαια συναντώνται λιγότερο συχνά στα υπεροξειδιοσώματα είναι η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η ρίζα του υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$) και η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($NO^{\cdot}$) (Martemucci et al., 2022).

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι η βασικότερη διαδικασία που προάγει την παραγωγή H_2O_2 στα υπεροξειδιοσώματα. Συγκεκριμένα, η παραγωγή αυτής της δραστηρικής μορφής οξυγόνου παράγεται μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al., 2010). Ακόμα, έχει αποδειχθεί πως και άλλα ένζυμα αυτού του συστήματος είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ROS, όπως οι ακυλο-CoA οξειδάσες, η D-αμινοξική οξειδάση, η L-α-υδροξυ οξειδάση, η ουρική οξειδάση, η ξανθική οξειδάση και η D-ασπαρτική οξειδάση (Martemucci et al., 2022).

Δ. Φλεγμονώδης απόκριση

Η φλεγμονή αντιπροσωπεύει τη φυσιολογική απόκριση ενός οργανισμού έναντι σε τραυματισμούς, λοιμώξεις και άλλες επιβλαβείς ουσίες. Με άλλα λόγια, αποτελεί την βασική γραμμή άμυνας για την προστασία ενός οργανισμού. Αναλυτικότερα, η οξεία φλεγμονώδης απόκριση

καταπολεμά τη μόλυνση σε αρχικό στάδιο και εκκινεί αντιδράσεις που έχουν ως στόχο την επιδιόρθωση των ιστικών βλαβών που προέκυψαν. Οι αντιδράσεις αυτές, περιλαμβάνουν την μετακίνηση των λευκοκυττάρων στην περιοχή που υφίσταται η φλεγμονή. Έτσι, τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMN) και τα λεμφοκύτταρα στρατολογούνται με ταυτόχρονη παραγωγή δευτερευόντων αγγειοφόρων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών οξείας φάσης, των ιντερλευκινών και των κυτοκινών.

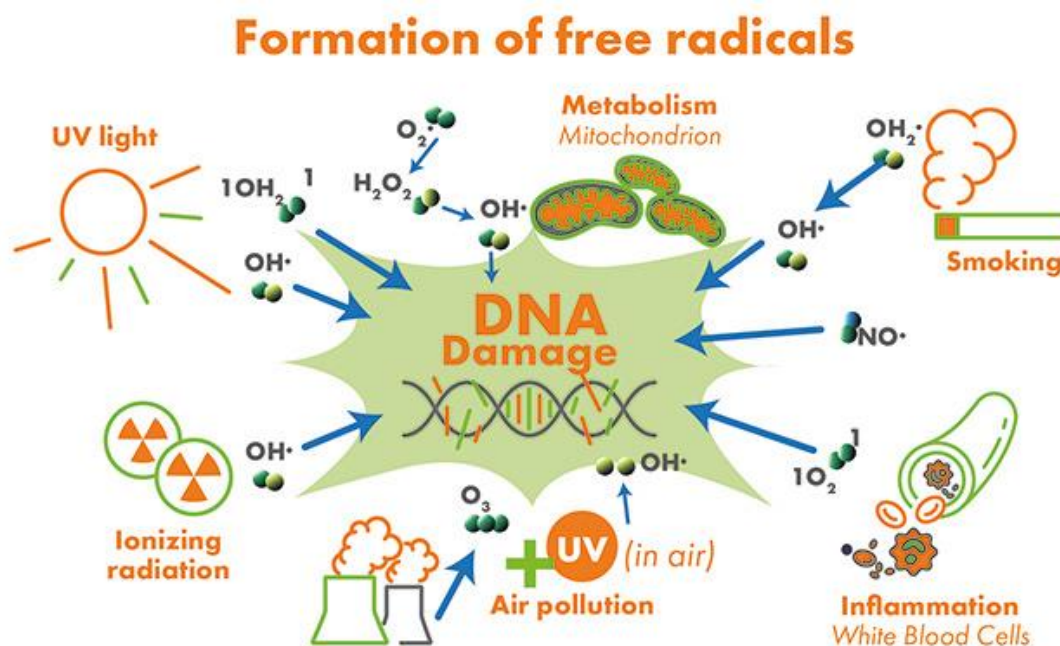
Κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, κύτταρα καταναλώνουν αυξημένες ποσότητες οξυγόνου, μια διαδικασία που ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη και ταυτόχρονα τα PMN απελευθερώνουν λυτικά ένζυμα και το $O_2^{\cdot-}$. Τα λυτικά ένζυμα συμβάλουν στην καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν βλάβες ενώ το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση, της οποίας η παραγωγή είναι αυξημένη λόγω της αναπνευστικής έκρηξης (Petroni et al., 1992). Στη συνέχεια, η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε $OH^{\cdot}$ από ιόντα μεταλλικών ή σε υποχλωριώδες οξύ $HOCl$ (Winrow et al., 1993). Επομένως, η φλεγμονώδης απόκριση είναι απαραίτητη για την προστασία και την άμυνα του οργανισμού αλλά συνεπάγεται της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$), οι οποίες σε αυξημένες ποσότητες είναι τοξικές και μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Ε. Άλλες πηγές παραγωγής ROS

Συνοπτικά, κάποιες ακόμα ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS περιλαμβάνουν τη σύνθεση προσταγλανδινών, την αυτοοξειδωση της αδρεναλίνης και ορισμένες έντονες καταστάσεις, όπως το ψυχικό στρες, η υπερβολική άσκηση, ο καρκίνος και η μεγάλη ηλικία (Phaniendra et al., 2015). Ακόμα, μόρια όπως οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν και να οδηγήσουν στον σχηματισμό ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

II. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Όπως υπογραμμίστηκε και νωρίτερα, δεν ευθύνονται μόνο ενδογενείς παράγοντες για την παραγωγή ελεύθερων ριζών, αλλά και εξωγενείς. Συγκεκριμένα, τα απόβλητα βιομηχανιών, η χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, το όζον και η ατμοσφαιρική ρύπανση, αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες (Martemucci et al., 2022). Ακόμα συνήθειες, όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών, αλλά και ένας τρόπος διαβίωσης βασισμένος στο στρες έχει φανεί να ενισχύουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών (Sharifi-Rad et al., 2020). Τέλος, η διατροφή, η οποία παρέχει ένα μεγάλο ποσοστό των απαραίτητων αντιοξειδωτικών βιταμινών και μετάλλων, ρυθμίζει τον αριθμό των ελεύθερων ριζών στο σώμα (Halliwell 2007).



Εικόνα 3: Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.

1.1.3 Συνέπειες παραγωγής ελεύθερων ριζών – Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσικό υποπροϊόν των κυτταρικών διεργασιών ενός ζωντανού οργανισμού και είναι απαραίτητες σε κάποιες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η συμμετοχή τους σε σημαντικές βιοχημικές οδούς (μεταγωγή σήματος και γονιδιακή έκφραση), η συμβολή τους στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (φαγοκυττάρωση και της φλεγμονής), αλλά και στην ενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων. Οι θετικές και οι αναγκαίες δράσεις των ελεύθερων ριζών όμως, αντιστρέφονται όταν οι συγκεντρώσεις τους ξεπεράσουν τις φυσιολογικές τιμές και πλέον οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν μπορούν να τις αντισταθμίσουν. Στην περίπτωση αυτή, υφίσταται μια κατάσταση οξειδωτικής βλάβης, η οποία περιγράφεται ως οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες, ορίζεται ως σημαντική ανισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζωτού (ROS και RNS) και της αντιοξειδωτικής άμυνας προς όφελος των πρώτων (Lobo et al., 2010). Σε μια τέτοια συνθήκη, προκαλείται διαταραχή της σηματοδότησης και του ελέγχου του οξειδοαναγωγικού συστήματος και/ή μοριακή βλάβη (Sies, 2015).



Εικόνα 4: Συνθήκες ισορροπίας αντιοξειδωτικών-ελεύθερων ριζών και οξειδωτικού στρες.

1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά είδη, τα οποία όταν βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αλληλεπιδράσουν με δομικά και λειτουργικά γειτονικά μόρια του οργανισμού όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA, οδηγώντας στον εκφυλισμό ή στην πλήρη καταστροφή τους. Άμεση συνέπεια αυτών είναι η κυτταρική και η ιστική βλάβη, οι οποίες συνήθως οδηγούν σε παθολογικές διαταραχές. Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες, λοιπόν έχει ταυτοποιηθεί σε πολλές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, ορισμένων μορφών καρκίνου και της διαδικασίας της γήρανσης. Ακόμα, το οξειδωτικό στρες θεωρείται πλέον ότι συμβάλλει σημαντικά σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες (αρθρίτιδα, αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, ερυθηματώδης λύκος, σύνδρομο αναπνευστικών παθήσεων ενηλίκων), τις ισχαιμικές ασθένειες (καρδιοπάθειες, εγκεφαλικό), το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, το εμφύσημα, την υπέρταση και νευρολογικές διαταραχές (νόσος Alzheimer, νόσος του Πάρκινσον, μυϊκή δυστροφία) (Martemucci et al., 2022; Halliwell, 2001; Lobo et al., 2010).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει αρνητική δράση σε βιομόρια, όπως τα παρακάτω:

I. DNA: Οι βλάβες που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στο DNA αποτελούν την συχνότερη αιτία εμφάνισης μακροχρόνιων προβλημάτων, λόγω ελεύθερων ριζών (Evans et al., 2004). Παρόλο που το DNA είναι ένα καλά προστατευμένο και σταθερό μόριο, οι ROS και οι RNS μπορούν να αλληλεπιδράσουν μαζί του και να οδηγήσουν σε: μεταλλάξεις και ελλείματα βάσεων, μονόκλωνα ή δίκλωνα θραύσματα, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, υπερ- και υπο-μεθυλίωση, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA και τελικά τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, η πιο κοινή ρίζα στο ανθρώπινο σώμα, η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωμένο παράγωγο, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Μάλιστα, το προϊόν αυτό αποτελεί δείκτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA και εμπλέκεται στη μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και τη γήρανση. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα του 8-OHdG είναι υψηλότερα στο μιτοχondριακό DNA από ότι στο πυρηνικό DNA, καθώς το μιτοχondριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στην επίθεση των ROS, αφού βρίσκεται κοντά στο σημείο όπου παράγονται (Phaniendra et al., 2015). Από την άλλη τα RNS, ειδικά το υπεροξυνιτρώδες, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη γουανίνη παράγοντας την 8-νιτρογουανίνη. Το μόριο αυτό μπορεί να σχηματίσει δεσμό με την αδενίνη

κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA, με αποτέλεσμα μετατροπές G-T. Επομένως, η 8-νιτρογουανίνη είναι μια μεταλλαξιγόνος βλάβη του DNA που εμπλέκεται στην καρκινογένεση (Martemucci et al., 2022).

II. RNA: Η αρνητική επίδραση των δραστικών μορφών οξυγόνου, με τα διαφορετικά είδη RNA μπορεί να μην συνεπάγεται βραχυπρόθεσμη βλάβη, όμως είναι ευκολότερο να πραγματοποιηθεί συγκριτικά με το DNA. Αυτό είναι άμεση απόρροια ορισμένων χαρακτηριστικών του RNA, όπως η μονή αλυσίδα του, η έλλειψη ενεργού μηχανισμού επιδιόρθωσης όταν οξειδώνεται, η περιορισμένη προστασία από πρωτεΐνες, αλλά και η θέση των κυταροπλασματικών RNA, κοντά στα μιτοχόνδρια, όπου παράγονται άφθονα ROS. Μάλιστα, το πιο μελετημένο προϊόν βλάβης του RNA, η 7,8-διϋδρο-8-οξο-γουανοσίνης (8-oxoG), προκαλείται από ρίζες υδροξυλίου αποτελεί έναν καλό δείκτη βλάβης. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα αυτού του δείκτη αντικατοπτρίζουν την τρέχουσα κατάσταση της οξειδωτικής ισορροπίας στο κύτταρο τη στιγμή που γίνεται η μέτρηση και όχι το ιστορικό της οξειδωτικής βλάβης, αφού το RNA αποικοδομείται και ανανεώνεται γρήγορα μέσα στα κύτταρα. Για παράδειγμα, σύμφωνα με ιστοχημικές μελέτες, σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer, εντοπίστηκε συσσώρευση κυταροπλασματικού RNA 8-OHG εντός των εγκεφαλικών νευρώνων ασθενών (Martemucci et al., 2022 ; Abe et al., 2002).

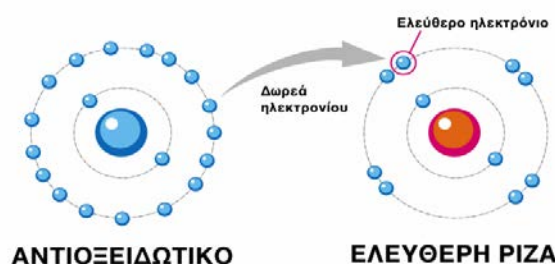
III. Λιπίδια: Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και κυρίως λόγω της αφθονίας και της δομής τους (πολλαπλοί διπλοί δεσμοί) είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε οξειδωτική βλάβη. Η οξείδωση των λιπιδίων ονομάζεται λιπιδική υπεροξείδωση και πραγματοποιείται σε τρία στάδια: έναρξη, μετάδοση και τερματισμός. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η προσβολή του λιπιδίου από μια ελεύθερη ρίζα, όπως οι ρίζες υδροξυλίου, και η αφαίρεση ενός υδρογόνου από μία μεθυλομάδα. Με την διαδικασία αυτή παράγεται μία λιπιδική ρίζα με κέντρο τον άνθρακα και το μόριο αυτό σταθεροποιείται, επαναδιευθετώντας τη μοριακή δομή του και σχηματίζοντας ένα συζυγές διένιο. Κατά τη διάρκεια του σταδίου της μετάδοσης, σε ένα περιβάλλον με υψηλά επίπεδα οξυγόνου οι λιπιδικές ρίζες θα αντιδράσουν με αυτό σχηματίζοντας υπερόξυλ-ρίζες ($\text{LOO}\cdot$), οι οποίες μπορεί να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από γειτονικά μόρια καταλήγοντας σε μια αλυσιδωτή πορεία οξείδωσης (Endale et al., 2023). Τελευταίο στάδιο είναι ο τερματισμός, όπου σε υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών παρατηρείται αλληλεπίδραση δύο ριζών, με άμεση συνέπεια την παραγωγή ενός μη-ριζικού μορίου (Yin et al, 2011). Τα **υπεροξειδικά λιπίδια** μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, προκαλώντας απώλεια της δομικής τους ακεραιότητας και μειώνοντας τη λειτουργικότητα των κυττάρων, οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις.

IV. Πρωτεΐνες: Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως το $\text{O}\cdot^{2-}$ και το $\text{OH}\cdot$, από μη ριζικά είδη όπως το H_2O_2 , το O_3 και το HOCl , αλλά και από ενεργές ρίζες αζώτου. Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορεί να επιτεθούν στις πρωτεΐνες και να παράγουν καρβονύλια και άλλα παράγωγα αμινοξέων (Martemucci et al., 2022 ; Phaniendra et al., 2015). Η οξείδωση αυτή, είναι δυνατόν να προκαλέσει θραύση της πεπτιδικής αλυσίδας, μεταβολή του ηλεκτρικού φορτίου της πρωτεΐνης, δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και οξείδωση αμινοξέων, αλλά και δομικές αλλαγές ή ολική απώλεια λειτουργίας της εκάστοτε πρωτεΐνης (Birben et al., 2012; Halliwell, 2007). Ειδικότερα, όταν οι ROS προκαλούν οξειδωτική βλάβη σε κατάλοιπα αμινοξέων όπως η λυσίνη, η προλίνη, η θρεονίνη και η αργινίνη, παράγονται παράγωγα καρβονυλίου. Οι καρβονυλικές ομάδες σε πρωτεΐνες αποτελούν ένα αξιόπιστο δείκτη οξείδωσης πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες. Για παράδειγμα, η Ο-τυροσίνη και η 3-νιτροτυροσίνη αποτελούν ειδικούς δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών από τη ρίζα υδροξυλίου και από τα RNS, αντίστοιχα (Martemucci et al., 2022 ; Dalle-Donne et al., 2005). Αύξηση της

συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ορό παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, μερικές από αυτές είναι η νόσος του Πάρκινσον, οι μυϊκές δυστροφίες, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η γήρανση (Dalle-Donne et al., 2003).

1.2 Αντιοξειδωτική άμυνα

Η προηγούμενη ενότητα καθιστά απόλυτα κατανοητή την αρνητική και πολλές φορές καταστροφική επίδραση που έχει το οξειδωτικό στρες στα βιομόρια. Μάλιστα πολλές φορές η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών οδηγεί τον οργανισμό σε παθολογικές καταστάσεις. Για την αντιμετώπιση της κατάστασης αυτής, οι διάφοροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας, όπως προληπτικό μηχανισμό, μηχανισμό επιδιόρθωσης, μέτρα προστασίας και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ταυτόχρονα, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει και μηχανισμούς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να καθυστερήσουν την οξειδωτική βλάβη ή να την αναστείλουν. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω της ιδιότητάς τους να εντοπίζουν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Halliwell et al., 1995).



Εικόνα 5: Δράση αντιοξειδωτικού έναντι σε ελεύθερη ρίζα.

1.2.1 Αντιοξειδωτική ουσία

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα, μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell et al., 2015). Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να παράγονται ενδογενώς από τον οργανισμό, ως φυσική άμυνα του οργανισμού έναντι σε ελεύθερες ρίζες, ή να προσλαμβάνονται από εξωγενείς πηγές, όπως συμβαίνει με τις διάφορες τροφές. Ο μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικός ή μη ενζυμικός. Μερικά από τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η ικανότητα τους να εμποδίζουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών, να μετατρέπουν τις ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια αδραντοποιώντας τις και να συμβάλουν στην επιδιόρθωση των βλαβών, που προκαλούνται από αυτές.

1.2.2 Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με πολλούς τρόπους:

1. Ο πιο συνηθισμένος από αυτούς, αποτελεί το σπάσιμο της αλυσίδας ηλεκτρονίων της ελεύθερης ρίζας. Στην περίπτωση αυτή το αντιοξειδωτικό δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα ή δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από αυτήν, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε σταθερή, μη δραστική ρίζα και η ελεύθερη ρίζα μετατρέπεται σε σταθερό μόριο (Young et al., 2001).
2. Ακόμα τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας την συμμετοχή μορίων στην αντίδραση Fenton, μέσω της δέσμευσης μετάλλων, όπως είναι ο σίδηρος (Fe) (Krinsky, 1992).
3. Δρουν συνεργιστικά, δηλαδή η ύπαρξη ενός αντιοξειδωτικού συμβαλλει στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός άλλου αντιοξειδωτικού.

Τελικά, μέσω αυτών των μηχανισμών τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να παρεμποδίσουν τη δημιουργία ROS, σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από την έντονη δραστικότητα των ελεύθερων ριζών που οδηγεί σε αλυσιδωτές αντιδράσεις.

1.2.3 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

Ορισμένα ένζυμα ή ενζυμικά συστήματα αποτελούν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του οργανισμού. Τα βασικότερα ένζυμα που προσδίδουν αντιοξειδωτική προστασία είναι: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η καταλάση (CAT) και η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD). Αναλυτικότερα:

1.2.3.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

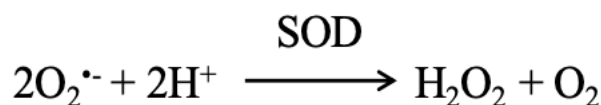
I. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη (δέσμευση των ξενοβιοτικών) και γλουταμινικό οξύ. Η GSH αποτελεί συνένζυμο αντίδρασης για τις υπεροξειδάσες της GSH (GPx), οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από την λιπιδιακή υπεροξείδωση. Είναι ένα ένζυμο, που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στον εξωκυττάριο χώρο. 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, που καταλύει η GPx:



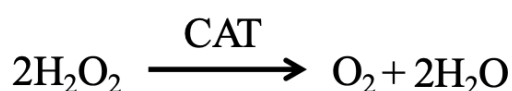
II. Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα για την αντιμετώπιση των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής της δραστηκής ρίζας του $O_2^{\bullet -}$ σε H_2O_2 και O_2 , με την παρακάτω αντίδραση:



III. Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο, το οποίο εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες που προκαλούν οι δραστηκές μορφές οξυγόνου. Η καταλάση συνεργάζεται στενά με την δισμουτάση του σουπεροξειδίου, αφού χρησιμοποιεί το προϊόν της, το H_2O_2 , και το μετατρέπει σε O_2 και H_2O . Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:



1.2.3.2 Μη - ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Από την άλλη, έχει βρεθεί πως υπάρχουν και πολλά μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, τα οποία δεν έχουν ενζυμικό χαρακτήρα, αλλά συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και λαμβάνονται κυρίως μέσω της διατροφής. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η βιταμίνη C, E και η β-καροτίνη, αλλά και το ουρικό οξύ και το σελήνιο.

I. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, που δρα ως ένα μονοσαχαριδικό αντιοξειδωτικό και εντοπίζεται τόσο σε ζώα, όσο και σε φυτά. Τα περισσότερα ζώα μπορούν να παράγουν τη βιταμίνη αυτή, σε αντίθεση με τον άνθρωπο που μπορεί να τη λάβει αποκλειστικά από την τροφή του. Αποτελεί έναν αναγωγικό παράγοντα και μπορεί να μειώσει ή/και να εξουδετερώσει τις ROS, προστατεύοντας τον οργανισμό από τις επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες (Lobo et al., 2010).

II. Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E, αναφέρεται σε ένα σύμπλεγμα οκτώ τοκοφερόλων και τοκοτριενολών, οι οποίες είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η α-τοκοφερόλη, προστατεύει τις μεμβράνες από την οξείδωση αντιδρώντας με λιπιδικές ρίζες που παράγονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, εμποδίζοντας τη συνέχιση της αντίδρασης διάδοσης (Lobo et al., 2010).

III. β-καροτίνη

Η β-καροτίνη, ανήκει στην οικογένεια των καροτενοειδών και αποτελεί μια φυσική χρωστική ουσία που βρίσκεται σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Η β-καροτίνη εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα και συνδέονται με χρόνιες ασθένειες, προστατεύοντας τελικά τα κύτταρα από τη φθορά που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, η β-καροτίνη είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο.

IV. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 60% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Ames et al., 1981). Μάλιστα, σύμφωνα με τον Jaeschke, 2002 το ουρικό οξύ μπορεί να έχει υποκαταστήσει το ασκορβικό στην ανθρώπινη εξέλιξη.

V. Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο μέταλλο, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ιχνοστοιχείων. Ακόμα, το σελήνιο αποτελεί συμπράγοντα αντιοξειδωτικών ενζύμων (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), συμμετέχοντας σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και επομένως συμβάλει στην μείωση των οξειδωτικών μορίων.

1.3 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Η αυξημένη έκθεση, του σύγχρονου ανθρώπου σε παράγοντες που επάγουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών και η συσχέτιση αυτών με χρόνιες παθήσεις, έχει στρέψει την επιστημονική κοινότητα στην εύρεση και στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από την καθημερινή διατροφή. Ως χημειοπροστατευτικός παράγοντας ορίζεται κάθε φυσική ή συνθετική ουσία που χορηγείται για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Jaeschke, 2002). Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν και οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, δηλαδή ουσίες φυτικής προέλευσης που αποτελούν συστατικό πολλών τροφίμων και έχουν την ικανότητα να συμβάλουν στην πρόληψη χρόνιων παθήσεων. Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλικες ενώσεις έχει αποδειχθεί πως αποτελούν τις βασικότερες βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και μάλιστα σύμφωνα με την βιβλιογραφία εμφανίζουν το μεγαλύτερο βιολογικό ενδιαφέρον και για αυτό έχουν μελετηθεί και περισσότερο από την ερευνητική κοινότητα.

1.3.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες, αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων και μάλιστα, πολλές από αυτές έχουν βρεθεί σε φυτικά τρόφιμα (Abbas et al., 2017). Πρόκειται για ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία εμπλουτίζουν και ενισχύουν την δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και βιταμινών έναντι στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Συνεπώς, βοηθούν έμμεσα στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών, ιδιαίτερα καρκίνων, καρδιαγγειακών παθήσεων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Abbas et al., 2017). Τα στοιχεία αυτά, σε συνδυασμό με

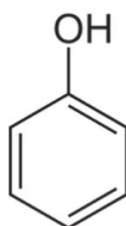
την εύρεση πολυφαινολών σε διάφορα τρόφιμα καθιστά κατανοητή τη στρόφη πολλών διατροφολόγων, ειδικών τροφίμων αλλά και καταναλωτών σε μία δίαιτα πλούσια σε πολυφαινόλες, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει συνδεθεί με πολλά οφέλη για την υγεία (Tsao, 2010). Τέτοιες τροφές είναι τα μήλα, το γαρύφαλλο, το τσάι, ο καφές, το κακάο, τα κρεμμύδια, τα πορτοκάλια, τα κεράσια, η σόγια και το κόκκινο κρασί.

1.3.1.1 Δομή και τάξεις πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι όπως αναφέρθηκε εντοπίζονται σε πολλά φυτικά είδη και παράγονται κυρίως ως απόκριση σε περιβαλλοντικό στρες ή τραυματισμό (Zagoskina et al., 2023). Μιλώντας για πολυφαινόλες, αναφερόμαστε σε ένα χημικό μόριο με χημικό τύπο C_6H_5OH . Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι η μία ή οι περισσότερες υδροξυλομάδες, που συνδέονται με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτύλιους (Zagoskina et al., 2023). Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ.

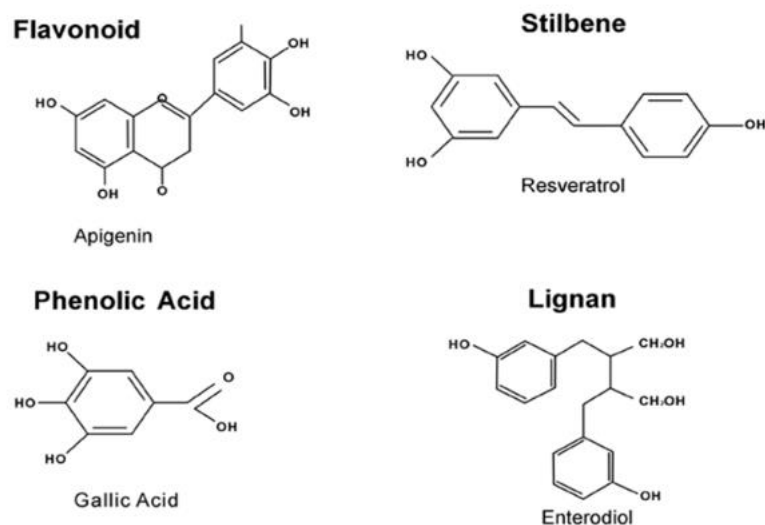
Ο δομικός σκελετός των φαινολικών ενώσεων αποτελείται από μια φαινολική ομάδα, η οποία είναι, ένα υδροξύλιο συνδεδεμένο σε έναν αρωματικό δακτύλιο (Abbas et al., 2017). Παρόλο που οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια όσο αφορά τις ομάδες που περιέχουν, η πλειοψηφία τους διαθέτει τις ακόλουθες χημικές ιδιότητες:

- Διαλυτότητα στο νερό,
- Διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες,
- Εντοπισμός υπό την μορφή γλυκοζιδίων και
- Περιεκτικότητα σε μεγάλα αδιάλυτα πολυμερή.



Εικόνα 6: Δομικός σκελετός πολυφαινολών.

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε κατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν, αλλά και με βάση τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που συνδέονται στους δακτύλιους τους. Επομένως, διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα φλαβονοειδή και τις μη φλαβονοειδείς ομάδες. Αναλυτικότερα στα φλαβονοειδή ανήκουν οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι ανθοκυανιδίνες και οι φλαβανόλες και στα μη φλαβονοειδή τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στιλβείνια (Abbas et al., 2017).



Εικόνα 7: Οι τέσσερις κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών.

1.3.2 Φυσιολογική δράση πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα είδη φυτών, οι οποίες δρουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες και εμπλέκονται σε βασικές μεταβολικές και φυσιολογικές διεργασίες των φυτών. Για παράδειγμα, συμμετέχουν σε διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των φυτών, όπως η βλάστηση των σπόρων, η κυτταρική διαίρεση και η σύνθεση φωτοσυνθετικών χρωστικών (Bujor et al., 2015). Ακόμα, οι πολυφαινόλες βοηθούν στην αλληλεπίδραση των φυτών με το περιβάλλον τους. Συγκεκριμένα, εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος από τη ρίζα στον βλαστό, αλλά και στη μετακίνηση των θρεπτικών συστατικών μέσα στο φυτό. Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως ρυθμιστές αναστολής του καταβολισμού της αυξίνης (IAA). Οι πολυφαινόλες, βοηθούν στην βελτιστοποίηση της απόδοσης των φυτών υπό συνθήκες στρες, δρώντας ως ένας αμυντικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση πολλαπλών αβιοτικών καταπονήσεων (Sharma et al., 2019).

Στα φρούτα και στα λαχανικά, είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό φωτεινό χρώμα, το οποίο, προσελκύει έντομα επικονιαστές, διευκολύνοντας τη γονιμοποίηση αυτών των φυτών. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις, οι οποίες δεσμεύουν τοξικά για τα φυτά μέταλλα, περιορίζοντας την πρόκληση βλάβης στο φυτό. Από την άλλη, οι ενώσεις αυτές σύμφωνα με αρκετές έρευνες φαίνεται να έχουν και οφέλη για τον άνθρωπο. Μάλιστα υποστηρίζεται πως η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες συμβάλλει στην πρόληψη μακροχρόνιων παθήσεων, αφού εμφανίζουν αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, αντιγηραντική αλλά και αντιοξειδωτική δράση.

1.3.3 Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι πολυφαινόλες των φυτών αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν την δυνατότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, παραχωρώντας σε αυτές ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο. Επομένως, οι πολυφαινόλες, μειώνουν τον ρυθμό οξείδωσης ενός

κυττάρου μέσω της αναστολής ή της πλήρης εξουδετέρωσης τόσο των ελεύθερων ριζών, όσο και των πρόδρομων μορίων αυτών. Συχνότερα, οι πολυφαινόλες δρουν ως:

- I. Άμεσοι δεσμευτές ριζών στο πλαίσιο των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσής λιπιδίων. Στην περίπτωση αυτή, οι πολυφαινόλες δίνουν ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα, μετατρέποντάς την σε ένα πιο σταθερό και λιγότερο δραστικό μόριο, διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Guo et al., 2009).
- II. Χηλικές ενώσεις, αφού μπορούν να δεσμεύσουν τα μέταλλα μετάπτωσης, όπως το Fe^{2+} μειώνοντας άμεσα τον ρυθμό της αντίδρασης Fenton, αποτρέποντας την οξειδωση που προκαλούν οι ρίζες υδροξυλίου.
- III. Αναγεννητές βιταμινών, δρώντας συνεργατικά μαζί τους (Prior et al., 2005).
- IV. Μόρια που συμβάλλουν στην αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης και στην αύξηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση που αποσυνθέτουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Tsao, 2010).

Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή οφείλει να δοθεί στο γεγονός πως τα μόρια πολυφαινόλων, αφού δώσουν ένα ηλεκτρόνιο ή άτομο υδρογόνου, γίνονται τα ίδια ελεύθερες ρίζες, επομένως μπορούν να προκαλέσουν προ-οξειδωτικές δράσεις. Επομένως, θα είναι χρήσιμη η διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών για να διαλευκανθεί η ποσότητα πολυφαινόλων που πρέπει να καταναλώνεται από τον άνθρωπο, για να αποφευχθούν τα οξειδωτικά φαινόμενα.

1.4 *Sideritis scardica*

Τα φυτά του γένους *Sideritis*, ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae και απαντώνται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, στα νησιά της Μακαρονησίας και στη δυτική και κεντρική Ασία. Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη ετήσιων ή πολυετών ξηρόφυτων και θερμόφυτων, που αναπτύσσονται κυρίως σε ορεινές περιοχές (πάνω από 1.000 μέτρα υψόμετρο) (Żyżelewicz et al., 2020). Χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή τσαγιού από βότανα (Βαλκάνια και Μέση Ανατολή), όπου θεωρείται ωφέλιμο για την ενδυνάμωση του σώματος και τη βελτίωση της διάθεσης.



Εικόνα 8: *Sideritis scardica*.

Στη 'λαϊκή' ιατρική χρησιμοποιείται για τη θεραπεία φλεγμονών, ειδικά σε περιπτώσεις κρυολογήματος, άσθματος, βρογχίτιδας και γαστρεντερικών διαταραχών. Ταυτόχρονα, το γένος αυτό παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αγγολυτική δράση. Από ετυμολογικής πλευράς, το όνομα του γένους *Sideritis* προέρχεται από την ελληνική λέξη «Σίδηρος».

Αρκετές μελέτες, επιβεβαιώνουν τις παραπάνω δράσεις του φυτού, καθώς πλέον έχει επιβεβαιωθεί πως η κατανάλωση του μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης και τριγλυκεριδίων στο αίμα και ταυτόχρονα αυξάνει την περιεκτικότητα του γλυκογόνου στο ήπαρ (Żyżelewicz et al., 2020). Ακόμα, έχουν επιβεβαιωθεί και οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Αυτό επιτυγχάνεται τόσο με την περιεκτικότητα του σε μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, όσο και λόγω της ενίσχυσης της δραστηριότητας της καταλάσης στο ήπαρ (Jeremic et al., 2019). Επιπλέον, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του φυτού σε πολυφαινολικές ενώσεις, το φυτό εμφανίζει δοσοεξαρτώμενες αντιφλεγμονώδεις και γαστροπροστατευτικές δράσεις, αλλά και κυτταροτοξική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων (Tadić et al., 2012).

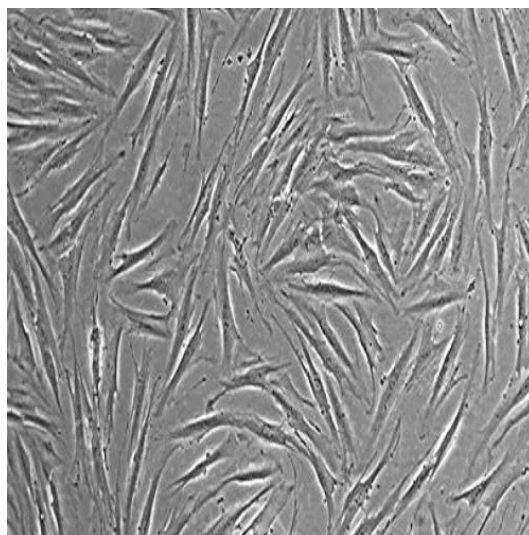
1.5 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's jelly

Τα μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα (MSCs) ή Στρωματικά κύτταρα (Stromal cells) παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τους Friedenstein et al. 1970, οι οποίοι απέδειξαν την ύπαρξη ενός μη αιμοποιητικού κυτταρικού πληθυσμού, τα οποία είχαν απομονωθεί από τον μυελό των οστών και οπτικά έμοιαζαν με ινοβλάστες. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για πολυδύναμα βλαστοκύτταρα με ικανότητα αυτοανανέωσης, ικανά να διαφοροποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα μεσεγχυματικών κυτταρικών σειρών, όπως λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και υποστηρικτικό στρώμα του αιμοποιητικού (Marino et al., 2019). Τα κύτταρα αυτά, συλλέγονται από πολλούς ιστούς, όπως σκελετικούς μύες, λιπώδη ιστό, ομφάλιο λώρο, αρθρικό υμένα, οδοντικό πολτό, αμνιακό υγρό, εμβρυϊκό αίμα, ήπαρ, μυελό των οστών, πνεύμονες και καρδιά. Ανεξάρτητα από την προέλευση τους, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διαθέτουν στην επιφάνειά τους συγκεκριμένους κυτταρικούς δείκτες, όπως ο CD90, ο CD1005, ο CD44, ο CD73, ο CD9 και μικρή ποσότητα του CD80 (*CD: Cluster of Differentiation*).

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε ενήλικα και σε εμβρυϊκά ή περιγεννητικά βλαστοκύτταρα, ανάλογα την προέλευση τους. Πρόκειται για έναν επιπλέον διαχωρισμό, που σχετίζεται με την ηλικία του δότη και κατά συνέπεια τον ιστό που απομονώθηκαν. Συγκεκριμένα, τα ενήλικα βλαστοκύτταρα απομονώνονται από ενήλικους ιστούς όπως ο μυελός των οστών (BM-MSCs) ή ο λιπώδης ιστός (AD-MSCs), ενώ τα εμβρυϊκά από το ίδιο το έμβρυο ή από εξεμβρυϊκές δομές όπως ο ομφάλιος λώρος (π.χ. τα MSCs της γέλης του Wharton ή WJ-MSCs) και η αμνιακή μεμβράνη. Συγκεκριμένα, τα εμβρυϊκά κύτταρα που απομονώνονται από την γέλη του Wharton, η οποία αποτελεί τον βλεννώδη συνδετικό ιστό που βρίσκεται στο εσωτερικό μέρος του αμνιακού επιθηλίου και προβάλλει στον ομφάλιο λώρο, χαρακτηρίζονται ως πολυδύναμα με ικανότητα διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα (Carvalho et al., 2011).

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα της γέλης του Wharton, συχνά προτιμώνται έναντι των ενήλικων. Ένας από τους βασικούς λόγους επιλογής αυτών των κυττάρων είναι το γεγονός πως σε σύγκριση με τα ενήλικα MSC, τα WJ-MSCs έχουν μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης, υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού, μακροζωία, ανοσορρυθμιστικές και μικρότερες ανοσογονικές αποκρίσεις (Kim et al., 2013). Είναι μη ογκογόνια και λιγότερο ετερογενή σε σύγκριση με τα ενήλικα MSCs (Liau et al., 2020).

Ακόμα, η πηγή απομόνωσης τους δηλαδή ο ομφάλιος λώρος, ο οποίος θεωρείται ιατρικό απόβλητο, ξεπερνώντας ηθικούς και κλινικούς περιορισμούς που σχετίζονται με τα ενήλικα MSCs, όπως οι επεμβατικές διαδικασίες συλλογής και η διαθεσιμότητα κατάλληλων δοτών κυττάρων (Kim et al., 2013). Επιπλέον, τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα έχουν εκτεθεί σε σημαντικά μικρότερο βαθμό από τα ενήλικα σε περιβαλλοντικές τοξίνες, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με τη γονιδιακή τροποποίηση (Fong et al., 2011).



Εικόνα 9: Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's jelly.

2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος του φυτού *Sideritis scardica* που είχε συλλεχθεί στο όρος Πήλιο. Αρχικά προσδιορίστηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια εξετάστηκε *in vitro* η ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες DPPH, ABTS, υδροξυλίου και σουπεροξειδίου καθώς και η αναγωγική του ικανότητα. Επίσης, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προσδιορίζοντας την προστασία από οξείδωση των πρωτεϊνών (μέθοδος πρωτεϊνικών καρβονυλίων), τη λιπιδική υπεροξείδωση (μέθοδος TBARS) καθώς και την επίδραση στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH).

3. Υλικά και Μέθοδοι

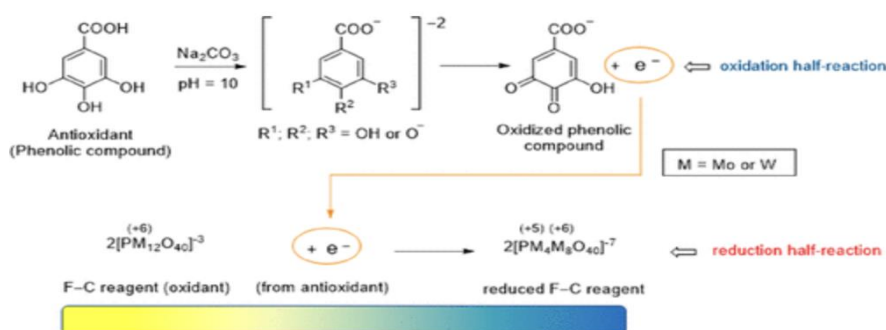
In vitro μέθοδοι

3.1 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

3.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η ανάλυση Folin-Ciocalteu είναι μία από τις πιο δημοφιλείς δοκιμασίες για την ανάλυση του πολυφαινολικού ποσοτικού προσδιορισμού μιας ουσίας. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται σε μια αντίδραση

μεταφοράς ηλεκτρονίων στην οποία το αντιοξειδωτικό είδος δρα ως δότης ηλεκτρονίων και το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu δρα ως οξειδωτικό (Pérez et al., 2023). Συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο φαινόλης Folin–Ciocalteu είναι ένα μίγμα φωσφορομολυβδαινικού και φωσφονικού άλατος που χρησιμοποιείται για τη *in vitro* φασματοφωτομετρική δοκιμασία φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών. Το αντιδραστήριο αυτό, αντιδρά με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες για να σχηματίσουν χρωμογόνα που μπορούν να ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά. Η αναγωγή των ανιονικών παραγώγων του αντιδραστήριου Folin–Ciocalteu από αντιοξειδωτικά προκαλεί μεταβολή του χρώματος από κίτρινο σε μπλε, που καθορίζονται φασματοφωτομετρικά στα 765 nm. Μάλιστα, το μέγεθος της χρωματικής μεταβολής, με το πέρας της αντίδρασης, είναι ευθέως ανάλογο με την αναγωγική δράση των φαινολικών ενώσεων (Pérez et al., 2023). Η αναγωγική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού συχνά μετρείται ως ισοδύναμο του γαλλικού οξέος (GAE).



Εικόνα 10: Γενική αντίδραση οξειδοαναγωγής της δοκιμασία Folin–Ciocalteu.

3.1.2 Πειραματική διαδικασία

Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) (25% w/v)

2,5gr Na_2CO_3 σε 10ml απιονισμένου H_2O

Καταρχάς, την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος προετοιμάζεται το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το εκχύλισμα, σε ποσότητες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Follin ciocalteau.

	Blank	C1-C6	Αρνητικά Control
H₂O	1ml	1ml	1,1ml
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	100μl	100μl	-
Εκχύλισμα	-	20μl	20μl

Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προσθέτουμε τα επόμενα διαλύματα :

Πίνακας 2: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Follin ciocalteau.

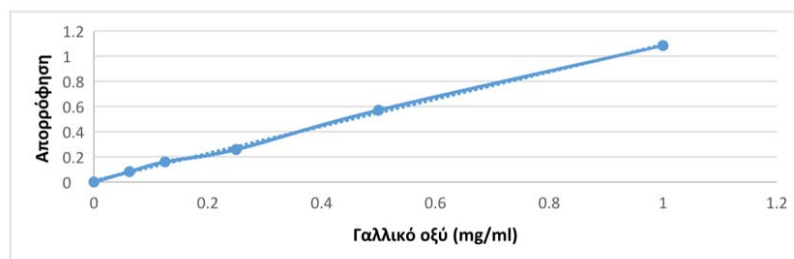
	Blank	C1-C6	Αρνητικά
--	-------	-------	----------

			Control
Na₂CO₃	280μl	280μl	280μl
H₂O	600μl	600μl	600μl

Στη συνέχεια, ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται στα 765nm.

3.1.3. Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,0793x + 0,0103$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,9984$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



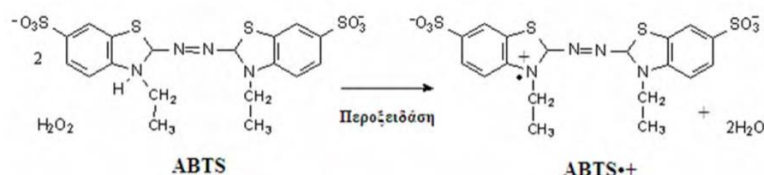
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος.

3.2 Προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}

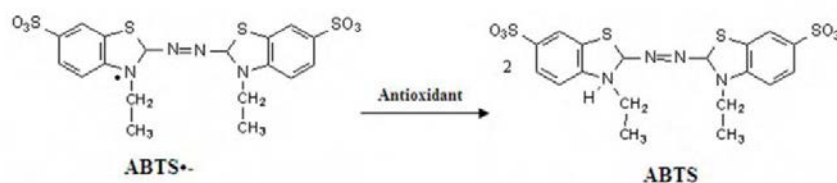
3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+}. Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει αρχικά να πραγματοποιηθεί μια διαδικασία που περιλαμβάνει τον σχηματισμό της ρίζας και στην συνέχεια να προστεθεί η εξεταζόμενη ουσία.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005, Miller et al., 1993).



Εικόνα 11: Παραγωγή της ρίζας του $ABTS^{\bullet+}$ μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H_2O_2 .



Εικόνα 12: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του $ABTS^{\bullet+}$.

3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Διάλυμα ABTS (1mM)

Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μ l) παρασκευάζεται διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζονται 10.97 mg ABTS και διαλύονται σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μ M)

Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μ M σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μ l) παρασκευάζεται διάλυμα 600 μ M. Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M πραγματοποιείται αραίωση με H_2O_2 , ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μ M.

Διάλυμα HRP (6 μ M)

Διαλύεται 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια αραίωση 1/10 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς είναι φωτοευαίσθητα.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μ l και προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και

επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο ABTS⁺.

	Blank	Control	C1 - C6
H₂O	450μl	300μl	300μl
ABTS	500μl	500μl	500μl
H₂O₂	50μl	50μl	50μl
HRP	-	50μl	50μl
Τελικός όγκος	1ml	1ml	1ml
Εκχύλισμα	-	-	100μl
H₂O (μετά την επώαση)	-	100μl	-

Μετά την επώαση και την προσθήκη εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση με vortex και μέτρηση της απορρόφησης στα 730nm, σε κυβελίδες του 1ml. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με το blank. Για την αποφυγή της πιθανότητας η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκεντρώσεως χωρίς την παρουσία του ενζύμου (αρνητικά control). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν για τουλάχιστον τρία πειράματα.

3.2.3. Υπολογισμοί

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική δράση της εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

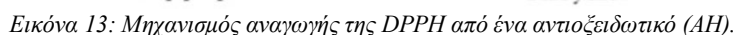
Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκεντρώση της εξεταζόμενης ουσίας, στην οποία προκαλείται μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH[•]

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-

Η DPPH• είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη, αλλά όχι στο νερό (Munteanu and Apetrei, 2021). Όπως αναφέρθηκε, πρόκειται για μία ιδιαίτερα σταθερή και δραστική ρίζα, λόγω του π-radical συστήματος, η οποία φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν, όμως προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH• ανάγεται, και μετατρέπεται στην 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας επάγει την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο. Η μεταβολή αυτή, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και της αντίστοιχης μείωσης της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά και ποσοτικοποιείται με τον προσδιορισμό της τιμής IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση του 50% του DPPH•.



Καταρχάς, την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, προετοιμάζεται το διάλυμα της ρίζας DPPH• (1000 μl μεθανόλης στα οποία εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH•), το οποίο όντας φωτοευαίσθητο καλύπτεται με αλουμινόχαρτο. Ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων του εξεταζόμενου εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, στη συνέχεια η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων:

	Blank	Control	C1-C6	Αρνητικά
--	--------------	----------------	--------------	-----------------

				Control
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl
Μεθανόλη	1ml	950μl	850μl	900μl
DPPH	-	50μl	50μl	-
Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm, σε κυψελίδες του 1ml. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με το blank. Για την αποφυγή της πιθανότητας η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (αρνητικά control), ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH • σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν για τουλάχιστον τρία πειράματα.

3.3.3. Υπολογισμοί

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_5) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A₅: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλείται μείωση της ρίζας DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•

3.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η ρίζα •OH είναι μια ιδιαίτερα δραστική ρίζα στα βιολογικά συστήματα. Χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά επιβλαβές είδος ελεύθερων ριζών, το οποίο μπορεί να αλληλεπιδράσει και να προκαλέσει βλάβη σε όλα τα βιομόρια και κυρίως στο DNA, όπου προκαλεί θραύση των κλώνων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, μέσω καρκινογένεσης, μεταλλαξγένεσης και κυταροτοξικότητας.

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (•OH) ενός εκχυλίσματος σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του δράση. Η επίδραση των εκχυλισμάτων στις ρίζες υδροξυλίου προσδιορίστηκε με τη

χρήση της μεθόδου δεοξυριβόζης. Ειδικότερα, η 2-δεοξυριβόζη αποικοδομείται κατά την έκθεση σε ρίζες υδροξυλίου που παράγονται από την αντίδραση Fenton. Με την αντίδραση των προϊόντων με το TBA, σχηματίζεται ένα χρωμογόνο σύμπλοκο, το οποίο προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 520nm. Επομένως, η ένταση του χρώματος και η τιμή της απορρόφησης είναι ανάλογη της ποσότητας των παραγόμενων ριζών υδροξυλίου.

3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία του εξεταζόμενου εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Διάλυμα Sodium phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)

A) 0,2M Monobasic stock

Διαλύονται 13,90gr sodium phosphate monobasic(NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού.

B) 0,2M Dibasic stock

Διαλύονται 26,825gr sodium phosphate dibasic heptahydrate σε 500ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια προστίθενται 62,50ml 0.2M monobasic stock και 37,50ml 0,2M dibasic stock σε 200ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7,4.

Διάλυμα 2-deoxyribose(10mM) MW=134,13g/mol

Για 10ml διαλύματος ζυγίζονται 13,413mg ουσίας.

FeSO_4 (MW=278.01) – EDTA (MW=372.24) (10mM)

Προετοιμάζονται 450ml από το κάθε διάλυμα. Για το FeSO_4 ζυγίζονται 1,251gr και το διαλύεται σε 450ml απιονισμένου H_2O . Για το EDTA ζυγίζονται 1,6751gr και διαλύονται σε 450ml απιονισμένου H_2O .

Το EDTA θερμαίνεται μέχρι να βράσει και στη συνέχεια αναμιγνύεται με τον FeSO_4 και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο (100°C) για 1 ώρα. Με το πέρας της ώρας το διάλυμα κρύνει και τοποθετείται στους 4°C .

H_2O_2 (10mM) MW=34,01g/mol

Από stock 8,82M ανακτώνται 28μl και το προσδίδονται σε 20ml απιονισμένου H_2O .

TCA 2,8%

TBA 1%

Ζυγίζονται 0,3gr TBA και τα διαλύονται σε 30ml NaOH. Θερμαίνουμε το διάλυμα κατά την ανάδευση για καλύτερο αποτέλεσμα το διάλυσης.

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο OH $\cdot$.

	Blank	Control	C1-C6	Αρνητικά
--	-------	---------	-------	----------

				Control
Buffer	225μl	225μl	225μl	225μl
2-deoxyribose	75μl	75μl	75μl	75μl
FeSO₄-EDTA	75μl	75μl	75μl	75μl
H₂O	375μl	300μl	225μl	300μl
Δείγμα			75μl	75μl
H₂O₂	-	75μl	75μl	-

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται:

Πίνακας 6: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο OH[·].

	Blank	Control	C1-C6	Αρνητικά Control
TCA 2,8%	375μl	375μl	375μl	375μl
TBA 1%	375μl	375μl	375μl	375μl

Πραγματοποιείται ανάδευση με vortex και βράσιμο για 10 λεπτά. Τα διαλύματα τοποθετούνται σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν για τουλάχιστον τρία πειράματα.

3.4.3. Υπολογισμοί

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[·] υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520nm

A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520nm

3.5. Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

3.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της αναγωγικής δύναμης μιας ουσίας είναι από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης της ουσίας αυτής. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα αντιοξειδωτικά μόρια που εξετάζονται είναι πιθανώς δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Σε αυτή τη τεχνική, το κίτρινο χρώμα του αρχικού διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με τη αναγωγική ισχύ κάθε ένωσης. Συγκεκριμένα, το σιδηροκυανιούχο κάλιο (C₆N₆FeK₃) (που περιέχει Fe⁺³), μέσω αναγωγής μετατρέπεται σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο (C₆N₆FeK₄) (που περιέχει Fe⁺²), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο και το μετατρέπει σε ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου (Fe⁺³), το οποίο έχει κυανό χρώμα έχει κυανό χρώμα. Το προϊόν αυτό, εντοπίζεται φασματοφωτομετρικά στα 700nm και μπορεί να προσδιορίσει την συγκέντρωση του Fe⁺³ και επομένως την αναγωγική ικανότητα του υπό μελέτη εκχυλίσματος.

3.5.2 Πειραματική διαδικασία

Διάλυμα 0,2M Phosphate buffer pH 6,6

I. 0,2M Monobasic stock

Διαλύεται 1,74gr sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) σε 62,5ml απιονισμένου νερού.

II. Διαλύεται 2,01gr sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) σε 37,5ml απιονισμένου νερού.

Ανάμιξη των δυο stock σε 150ml απιονισμένου νερού και μέτρηση ώστε το pH να ισούται με 6,6. Έπειτα προστίθενται απιονισμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 300ml.

Potassium ferricyanide (1% w/v)

Διαλύεται 0,1gr $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ σε 10ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Ferric chloride (0,1% w/v)

Διαλύεται 0,01gr FeCl_3 σε 10ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Trichloroacetic acid (10% w/v)

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

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.

	Blank	Control	C1 -C6	Αρνητικά Control
Buffer	250μl	250μl	-	-
Buffer (+ εκχύλισμα)	-	-	250μl	250μl
Potassium Ferricyanide	-	250μl	250μl	-
H₂O	250μl	-	-	250μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση στο υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο μέχρι να κρυώσουν (περίπου 10 λεπτά) και προστίθεται το TCA.

Πίνακας 8: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.

	Blank	Control	C1 -C6	Αρνητικά Control
TCA 10%	250μl	250μl	250μl	250μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 10 λεπτά. Από τα δείγματα διατηρείται το υπερκείμενο όγκου 250μl και προστίθενται ferric chloride, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο RPA.

	Blank	Control	C1 -C6	Αρνητικά Control
Ferric chloride	250μl	250μl	250μl	250μl
H₂O	500μl	500μl	500μl	500μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση για 10 λεπτά. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται στα 700nm.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν για τουλάχιστον τρία πειράματα.

3.5.3. Υπολογισμοί

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκεντρωση της ουσίας που προκαλεί (0.5AU) απορρόφηση 0,5.

3.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O₂⁻

3.6.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας O₂⁻ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004, με μια μικρή διαφοροποίηση. Οι ρίζες υπεροξειδίου, είναι ιδιαίτερα δραστικές και προκαλούν άμεση βλάβη σε πολλά μακρομόρια, προκαλώντας αποικοδόμηση του DNA, κυτταρικών μεμβρανών και πολυσακχαριτών, επιφέροντας τελικά θανάτωση κυττάρων, αδρανιοποίηση ενζύμων. Οι ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου δημιουργούνται σε συστήματα PMS-NADH με οξείδωση του NADH και προσδιορίζονται με την μείωση του NBT. Το O₂⁻ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT²⁺ και το μετρέπει σε μπλε της φορμαζάνης, το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να μειώσουν τον σχηματισμό του μπλε NBT.

3.6.2 Πειραματική διαδικασία

Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0)

Αρχικά δημιουργείται δ/μα 1M, όπου για 250ml ζυγίζονται 30.285g Tris και διαλύονται σε HCl. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης για παραγωγή 150ml, διαλύονται 2,4ml 1M σε όγκο 147,6ml. Το pH αυτού του διαλύματος ρυθμίζεται στα 8.

NBT (nitroblue tetrazolium) (300μM)

Ζυγίζονται 20mg NBT και διαλύονται σε 20ml H₂O

NADH (468μM)

Ζυγίζονται 13,28 mg NADH και διαλύονται σε 40ml H₂O

PMS (phenazine methosulfate) (60μM)

Ζυγίζονται 0,368 mg PMS και διαλύονται σε 20ml H₂O.

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο O₂⁻.

	Blank	Control	C1 – C6	Αρνητικά Control
Εκχύλισμα	-	-	250μl	250μl
H₂O	-	250μl	-	-
Tris-HCl	3,25ml	2,5ml	2,5ml	3ml
NBT	500μl	500μl	500μl	500μl
NADH	500μl	500μl	500μl	500μl
PMS	-	500μl	500μl	-

Τα δείγματα αναδεύτηκαν με vortex και επωάστηκαν για 5 λεπτά. Έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν για τουλάχιστον τρία πειράματα.

3.6.3 Υπολογισμοί

Η χαμηλή απορρόφηση αντανάκλα σε αυξημένη δραστηριότητα, όσο αφορά την εξουδετέρωση των ανιόντων σουπεροξειδίου και επομένως όσο μικρότερη είναι η τιμή τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το εκχύλισμα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O₂⁻ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(A_0 - A_5) / A_0] \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560nm

A₅: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560nm

Μέθοδοι σε μεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Υλικά

- ο DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) θρεπτικό μέσο με 4,5g/l γλυκόζη, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο και Gibco BRL 41966. Στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών θηλαστικών.

- FBS (Fetal Bovine Serum, 1x) ορός απομονωμένος από έμβρυα βοοειδών. Παρέχει αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες για την ανάπτυξη για διατήρηση των κυττάρων *in vitro* και προστίθενται στο θρεπτικό μέσο DMEM.
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution Gibco) που προστίθενται στο θρεπτικό DMEM με σκοπό την αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων.
- PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4) ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας και την απομάκρυνση υπολειμμάτων.
- Τρυψίνη 0,25% (Gibco). Ως πρωτεολυτικό ένζυμο χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συνδέουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας, με σκοπό την επανακαλλιέργεια των κυττάρων.
- XTT Cell Proliferation Kit II (Sigma).

Κυτταροκαλλιέργειες

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και την απόδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος *Sideritis Scardica* ήταν απαραίτητη η χρήση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων.

Συνθήκες Καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θάλαμος καθέτου νηματικής ροής τάξης II, ο οποίος εξασφαλίζει στείρες συνθήκες μέσω της UV ακτινοβολίας και του φιλτραρισμένου αέρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες πολυστυρενίου με ειδικό φίλτρο που επιτρέπει την παροχή οξυγόνου χωρίς να διακυβεύεται η στειρότητα. Η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C, επαρκή υγρασία και 5% CO₂. Η κατάσταση των κυττάρων παρακολουθήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

I. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από την γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν μικρότερο χρόνο αναδιπλασιασμού του πληθυσμού τους σε σχέση με τα άλλα κύτταρα. Προσκολλώνται στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας, μέσα στο οποίο επωφελούνται από την επαφή τους με γειτονικά κύτταρα. Ωστόσο, καλύπτουν το καλλιεργητικό μέσο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% εκκρίνουν παράγοντες, οι οποίοι μειώνουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, όταν η κάλυψη της επιφάνειας του καλλιεργητικού μέσου είναι στο 80% είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων ώστε να έχουν τον απαραίτητο χώρο και τις ιδανικές συνθήκες για να αναπτυχθούν.

III. Καλλιέργεια κυττάρων

Θρεπτικό μέσο

Για την καλλιέργεια των κυττάρων ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's Modified Eagle Medium της εταιρείας Biowest (DMEM, BioWest). Είναι απαραίτητη η ύπαρξη όλων των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων στο μέσο καλλιέργειας, για την ανάπτυξη των κυττάρων, για αυτό και προστίθεται ορός εμβρύου βοός σε τελική συγκέντρωση 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco).

IV. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν τα κύτταρα καλύπτουν το περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται με τη χρήση της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που διευκολύνει την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η θρυψίνη καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και του υποστρώματος, επιτρέποντας την απομάκρυνση των κυττάρων. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

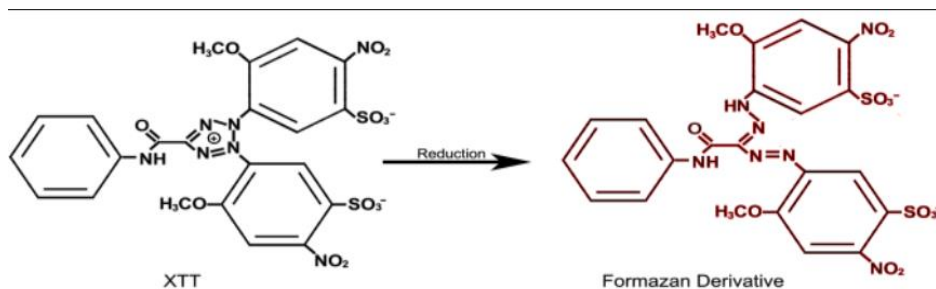
- i. Αφαίρεση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- ii. Πλύση με PBS 1% (Phosphate-Buffered saline), το οποίο αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας και την απομάκρυνση υπολειμμάτων.
- iii. Ανάδευση και απομάκρυνση όλης της ποσότητας PBS με τη χρήση πιπέτας (αλλιώς αναστέλλεται η δράση της θρυψίνης, που θα προστεθεί στην συνέχεια).
- iv. Προσθήκη διαλύματος θρυψίνης και επώαση για 3min στους 37°C
- v. Παρακολούθηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση επιτυχούς αποκόλλησης των κυττάρων.
- vi. Προσθήκη θρεπτικού διαλύματος στη φλάσκα των κυττάρων, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη, η οποία μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα είναι τοξική για τα κύτταρα.
- vii. Προθήκη θρεπτικού διαλύματος σε κάθε καινούργια φλάσκα, έτσι ώστε όταν προσθέσω τα κύτταρα για ανακαλλιέργεια να υπάρχει ήδη το θρεπτικό μέσο για τα κύτταρα
- viii. Διαχωρισμός των κυττάρων μέσα στη φλάσκα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την πλύση της επιφάνειας της φλάσκας που είχαν προσκολληθεί τα κύτταρα και ακολουθεί ο διαχωρισμός των συσσωματωμάτων που έχουν δημιουργήσει τα κύτταρα.
- ix. Προσθήκη του διαλύματος των κυττάρων σε κάθε νέα φλάσκα που έχει ήδη το θρεπτικό υλικό.

3.7 Μέθοδος XTT

3.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμή κυτταρικής ανάπτυξης XTT περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 από τους Scudiero et al. ως μια φασματοφωτομετρική μέθοδος για τη μέτρηση της ανάπτυξης των κυττάρων και της ευαισθησίας τους σε φάρμακα. Ακόμα, αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, αλλά και της κυτταροτοξικότητας.

Το XTT είναι μια άχρωμη ή ελαφρώς κίτρινη ένωση που, όταν μειώνεται, γίνεται έντονα πορτοκαλί. Αυτή η αλλαγή χρώματος επιτυγχάνεται με τη διάσπαση του θετικά φορτισμένου τετραζολικού δακτυλίου (Εικόνα 14). Το προϊόν που προκύπτει από αυτή τη διάσπαση είναι η φορμαζάνη, η οποία είναι διαλυτή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φασματοφωτομετρικές δοκιμές.



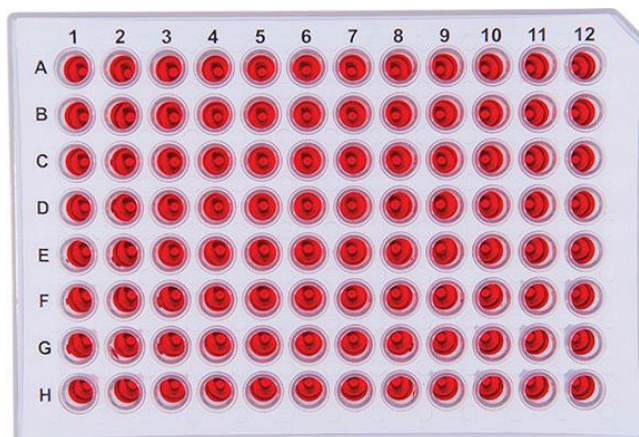
Εικόνα 14: Μετατροπή του αντιδραστηρίου XTT σε φορμαζίνη.

Μετά την χορήγηση του αντιδραστηρίου XTT, επάγεται ο μεταβολισμός του από τις δεϋδρογονάσες των μιτοχονδρίων των κυττάρων, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος με χρώμα η ποσότητα του οποίου είναι χαρακτηριστική του αριθμού των κυττάρων. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με την χρήση φωτόμετρου και μέτρηση στα 450nm. Επομένως, όσα περισσότερα κύτταρα εντοπίζονται τόσο μεγαλύτερη είναι και η απορρόφηση, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η μείωση της απορρόφησης σημαίνει την μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και ταυτόχρονα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους.

3.7.2 Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα, που χρησιμοποιήθηκαν αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM το οποίο περιείχε 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης με συγκέντρωση 100 units/ml και 100 µg/ml, αντίστοιχα.

Η πειραματική διαδικασία για την αξιολόγηση της ανάπτυξης των κυττάρων με χρήση XTT διαρκεί 3 ημέρες. Την πρώτη ημέρα, πραγματοποιείται η επίστρωση των κυττάρων στα ειδικά 96-Well Cell Culture Plates (Εικόνα 17). Ο αριθμός των κυττάρων που τοποθετούνται σε κάθε θέση της πλάκας είναι 10.000 και τα κύτταρα αυτά προέρχονται από μια φλάσκα στην οποία είχαν αναπτυχθεί και καλύπτει το 75-80% της επιφάνειάς της. Αφού γίνει προσθήκη θρεπτικού μέσου στα πηγαδάκια της πλάκας που θα χρησιμοποιηθούν, προστίθενται και τα κύτταρα. Τα κύτταρα διαχωρίζονται μεταξύ τους και με την επιφάνεια της φλάσκας με τη χρήση της θρυψίνης όπως αναλύθηκε νωρίτερα. Στη συνέχεια, η πλάκα επωάζεται στον κλίβανο (37°C και 5% CO₂) για 24 ώρες, με σκοπό τα κύτταρα να προσκολληθούν στην ειδική επιφάνεια της πλάκας που είναι φτιαγμένη από πολυστυρένιο.



Εικόνα 15: 96-Well Cell Culture Plate.

Μετά από 24 h, τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας και αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της πλάκας, για να προστεθεί η προς εξέταση ουσία διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS σε κάθε βοθρίο της πλάκας. Η προς εξέταση ουσία προστέθηκε σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κάθε συγκέντρωση της ουσίας τοποθετήθηκε 3 φορές έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα. Ακόμα, η προς εξέταση ουσία μπήκε και σε βοθρία της πλάκας όπου δεν υπήρχαν κύτταρα, για να ελέγξουμε αν η ουσία απορροφά στα 450 nm. Εάν αυτό συνέβαινε, αφαιρούσαμε από την απορρόφηση των κυττάρων την απορρόφηση της ουσίας για να βρούμε το σωστό αποτέλεσμα (2 βοθρία). Τέλος, προστέθηκαν controls, τα οποία περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό με FBS. Έπειτα από αυτή την διαδικασία η πλάκα επώαστηκε στον κλίβανο (37°C και 5% CO₂) για 24 h.

Την τρίτη μέρα, προστέθηκε το αντιδραστήριο XTT. Χρησιμοποιήθηκε το Cell Proliferation Kit II της εταιρίας Roche το οποίο περιείχε 2 αντιδραστήρια: το XTT labeling reagent και το Electron coupling reagent. Δημιουργήθηκε ένα premix το οποίο μοιράστηκε σε κάθε βοθρίο της πλάκας. Η παραπάνω διαδικασία πρέπει να γίνει σχετικά γρήγορα διότι τα 2 αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτάδι καθώς είναι φωτοευαίσθητα. Στη συνέχεια, η πλάκα επώαστηκε για 4 h στον κλίβανο (37°C και 5% CO₂). Έπειτα από την τετράωρη επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek).

3.7.3 Υπολογισμοί

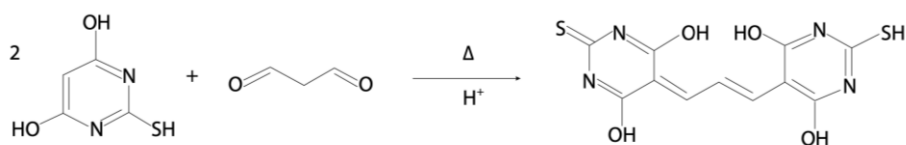
Η εξέταση κάθε συγκέντρωσης εξετάστηκε σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100.$$

3.8 Μέθοδος θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBARS)

3.8.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού με το θειοβαρβιτουρικό οξύ χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1978 και αποτελεί ακόμα και σήμερα μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό της σχετικής περιεκτικότητας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Οι οξειδωτικοί παράγοντες μπορούν να αλλάξουν τη δομή των λιπιδίων, δημιουργώντας υπεροξειδία λιπιδίων, η διάσπαση των οποίων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μαλονδιαλδεΐδη (MDA). 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 ελεύθερη MDA είναι συνήθως σε αρκετά χαμηλά επίπεδα. Για την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA απαιτείται με όξινη επεξεργασία των πρωτεϊνών και διάσπαση των υπεροξειδίων με θερμότητα, ώστε να διευκολυνθεί η ανάπτυξη χρώματος στην αντίδραση. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος (530 nm) για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 16: Δύο μόρια TBA αντιδρούν με MDA.

3.8.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία το υδατόλουτρο ρυθμίζεται σε θερμοκρασία 95°C. Στη συνέχεια προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η προετοιμασία του εξεταζόμενου εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

Για ≈100 mL του Tris-HCl buffer χρησιμοποιούνται 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζονται 0.61 g και διαλύονται σε 25 mL απιονισμένου νερού. Για το HCl διαλύονται 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια το δύο διαλύματα αναμιγνύονται σε ένα ποτήρι ζέσεως και έπειτα προστίθενται απιονισμένο νερό ως τα 100 mL. Τέλος το pH ρυθμίζεται στο 7.4.

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

Για παρασκευή 20ml διαλύματος, ζυγίζονται 5,68g Na₂SO₄ και 0,16g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Μεταφέρονται σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστίθενται 20ml dH₂O. Η ανάδευση γίνεται με μαγνητάκι και θέρμανση, μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως.

TCA 35%

Για 100 ml TCA 35%, από αρχικό stock TCA 100% μεταφέρονται 35ml σε 65ml απιονισμένου νερού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100mL dH₂O.

TCA 70%

Για 100 ml TCA 35%, από αρχικό stock TCA 100% μεταφέρονται 70ml σε 25ml απιονισμένου νερού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100mL dH₂O.

Την 1^η μέρα έναρξης του συγκεκριμένου πειραματικού πρωτοκόλλου τα κύτταρα μεταφέρονται από δύο φλάσκες T75 σε έξι τρυβλία (2 control + 4 για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος). Μετά από 24h πραγματοποιείται η επίδραση με την ουσία και μετά από άλλες 24h τα κύτταρα από κάθε τρυβλίο μεταφέρονται σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα Falcon (15 ml). Στη συνέχεια, τα Falcon φυγοκεντρώνονται για 5min στις 1.500 rpm στους 20°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα), διαλύεται σε 300μl PBS κάνοντας ανάδευση με την πιπέτα και vortex. Τα κύτταρα διατηρούνται σε πάγο.

Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.

	Blank	Control , C1 – C4
--	-------	-------------------

PBS	400μl	300μl
Κυτταρικό αιώρημα	-	100μl
TCA 35%	500μl	500μl
Tris-HCl	500μl	500μl

Οι δοκιμαστικοί σωληνίδες Falcon επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια:

Πίνακας 12: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.

	Blank	Control , C1 – C4
Na₂SO₄ – TBA	1ml	1ml

Ακολουθεί, επώαση στους 95°C για 45 min στο υδατολουτρό και έπειτα τα Falcon μεταφέρονται στον πάγο και τα αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Μόλις κρυώσουν προσθέτουμε:

Πίνακας 13: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο TBARS.

	Blank	Control , C1 – C4
TCA 70%	1ml	1ml

Ανάδευση με vortex και 1 mL μεταφέρεται σε eppendorfs, τα οποία φυγοκεντρώνονται στις 10.000 rpm στους 25°C για 3 min. Τέλος, μεταφέρονται με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδια και μετράται η απορρόφηση στα 530 nm.

3.8.3 Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs_{δείγματος} – Abs_{τυφλού}) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3.100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156.000 (mol/L) διαιρουμένου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

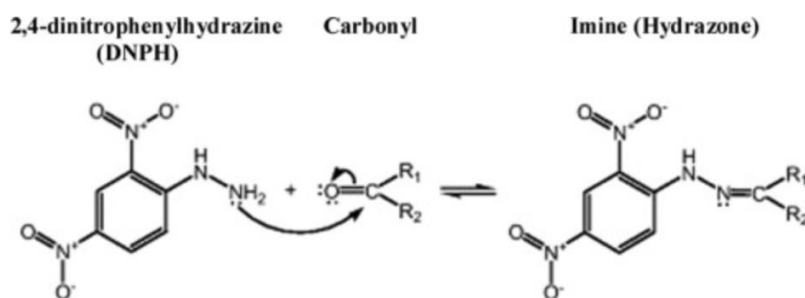
* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

3.9 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

3.9.1 Αρχή της μεθόδου

Ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε βιολογικά δείγματα αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες. Γενικά, τα αμινοξέα και κατ' επέκταση οι πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε οξειδωτικές βλάβες. Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, οι οποίες οδηγούν απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας, αλλά και της φυσιολογικής λειτουργίας και άλλων μακρομορίων. Τα καρβονύλια παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys)

και της θρεονίνης (thr) και αποτελούν έναν αξιόπιστο δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών, αφού πρόκειται για ιδιαίτερα σταθερά μόρια. Οι Levine et al. 1990, εισήγαγαν μια μέθοδο προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που βασίζεται στην 2,4-δινιτροφαινυλϋδραζίνη (DNPH). Αυτό το μόριο αντιδρά με ομάδες καρβονυλίων οδηγώντας στο σχηματισμό του σταθερού 2,4-δινιτροφαινυλϋδραζονίου (DNP), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί φασματοφωτομετρικά στα 375 nm (Colombo et al., 2016).



Εικόνα 17: Αντίδραση DNPH με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

3.9.2 Πειραματική διαδικασία

Διάλυμα HCl 2.5 N

Για παρασκευή 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προστίθονται αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈70 mL απιονισμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απιονισμένο νερό.

Αιθανόλη - Οξικός αιθυλεστέρας (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v)

DNPH 14 mM (φωτοευαίσθητο)

Για 100 mL 14 mM DNPH διαλύονται 0.2833g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

Ουρία 5 M (pH 2.3)

Για 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2.5 N HCl), διαλύονται 30g ουρίας σε ≈70 mL απιονισμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απιονισμένο νερό.

Την 1^η μέρα έναρξης του συγκεκριμένου πειραματικού πρωτοκόλλου τα κύτταρα μεταφέρονται από δύο φλάσκες T75 σε έξι τρυβλία (2 control + 4 για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος). Μετά από 24h πραγματοποιείται η επίδραση με την ουσία και μετά από άλλες 24h τα κύτταρα από κάθε τρυβλίο μεταφέρονται σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα Falcon (15 ml). Στη συνέχεια, τα Falcon φυγοκεντρούνται για 5min στις 1.500 rpm στους 20°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα), διαλύεται σε 200μl PBS κάνοντας ανάδευση με την πιπέτα και vortex. Τα κύτταρα διατηρούνται σε πάγο.

Πίνακας 14: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Control , C1 – C4	Αρνητικά Control , C1 – C4
PBS	350μl	350μl
Κυτταρικό αιώρημα	50μl	50μl

Τα διαλύματα επωάζονται στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούνται στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, προστίθενται στο ίζημα:

Πίνακας 15: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Control , C1 – C4	Αρνητικά Control , C1 – C4
DNPH	500μl	-
HCl 2.5N	-	500μl

Το ίζημα διαλύεται με την πιπέτα και με ανάδευση με vortex και τα διαλύματα επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

Πίνακας 16: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Control , C1 – C4	Αρνητικά Control , C1 – C4
TCA 20%	1ml	1ml

Το ίζημα διαλύεται με την πιπέτα και με ανάδευση με vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

Πίνακας 17: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Control , C1 – C4	Αρνητικά Control , C1 – C4
Αιθανόλη – οξικός αιθυλεστέρας	1ml	1ml

Το ίζημα διαλύεται με την πιπέτα και με ανάδευση με vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά.

Στόχος των πλύσεων με το TCA 20% και του διαλύματος αιθανόλης – οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.

Πίνακας 18: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

	Control , C1 – C4	Αρνητικά Control , C1 – C4
Ουρία 5M	1ml	1ml

Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους. Με το

πέρασ των 15 λεπτών, ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C και γίνεται μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 375 nm.

3.9.3 Υπολογισμοί

Για το κυτταρικό αιώρημα:

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mL) = $[(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 0.022] * 1000/X$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. 0,022 υπολογίζεται ως εξής: $22 \text{ mmol} / \text{L}$ ισούται με $22 \text{ μmol} / \text{ml}$, ισούται με $0,022 \text{ nmol} / \text{ml}$.

Όπου $1000 / X$ είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μl στην κυβελίδα / $X \text{ μl}$ του δείγματος),

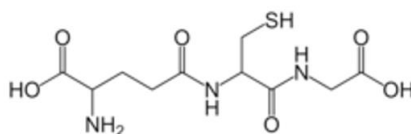
Η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με τον ακόλουθο τύπο:

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol / mg) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol / mL / συγκέντρωση πρωτεΐνης mg / mL. Συγκέντρωση πρωτεϊνών = Y mg / mL.

3.10 Γλουταθειόνη

3.10.1 Αρχή της μεθόδου

Μια έμμεση μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης ενός εκχυλίσματος είναι η δοκιμή της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό οξύ. Πρόκειται για την αφρονότερη θειόλη (SH), στους ιστούς τόσο ζώων, όσο και του ανθρώπου. Η γλουταθειόνη, μπορεί να λειτουργεί ως συνένζυμο διάφορων ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Ακόμα συμμετέχει στον μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου, ενώ ταυτόχρονα συμβάλει στην απομάκρυνση ξеноβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών, αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.



Εικόνα 18: Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης.

Όσο αφορά, τις αναγωγικές ιδιότητες της γλουταθειόνης, αυτές είναι απαραίτητες σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, αλλά και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη εντοπίζεται 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. Η μέθοδος του Ellman περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1959 και βασίζεται στην οξείδωση της GSH με το αντιδραστήριο Ellman ή το διθειόδιο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB), προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι η GSSG και το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (TNB⁻), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση: $2 \text{ GSH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{GSSG} + \text{TNB}^-$, το

ανιόν TNB έχει βαθύ κίτρινο χρώμα και μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί μετρώντας την οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

3.10.2 Πειραματική διαδικασία

Phosphate buffer (67mM) (pH 7.95)

Για 500 mL phosphate buffer φτιάχνονται 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζονται 0.227 g και διαλύονται σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζονται 5.94 g και διαλύονται σε 475 mL νερού. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Το PH ρυθμίζεται με NaOH or HCl, 1 N, ώστε να φτάσει την τιμή 7.95

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] (1mM) (φωτοευαίσθητο)

Διαλύονται 19,8 mg DTNB σε 50 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου.

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)

Ζυγίζονται 0,5g κιτρικού νατρίου και διαλύονται σε 50 ml απιονισμένου νερού.

Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Την 1^η μέρα έναρξης του συγκεκριμένου πειραματικού πρωτοκόλλου τα κύτταρα μεταφέρονται από δύο φλάσκες T75 σε έξι τρυβλία (2 control + 4 για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος). Μετά από 24h πραγματοποιείται η επίδραση με την ουσία και μετά από άλλες 24h τα κύτταρα από κάθε τρυβλίο μεταφέρονται σε ξεχωριστό δοκιμαστικό σωλήνα Falcon (15 ml). Στη συνέχεια, τα Falcon φυγοκεντρώνονται για 5min στις 1.500 rpm στους 20°C. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα), διαλύεται σε 200μl PBS κάνοντας ανάδευση με την πιπέτα και vortex. Τα κύτταρα διατηρούνται σε πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί, σε φιαλίδια erppendorf, η προσθήκη των αντιδραστηρίων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 19: Σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων στη μέθοδο Γλουταθειόνης.

	Blank	Control, C1 – C4
Phosphate buffer	620 μl	620μl
Απιονισμένο νερό	50 μl	-
Κυτταρικό αιώρημα	-	50μl
DTNB	330 μl	330μl

Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση των erppendorf στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση στα 412 nm με πλαστική κυψελίδα.

3.10.3 Υπολογισμοί

Για το κυτταρικό αιώρημα:

Ποσότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta \text{abs}_{\text{blank}} / 13.6) * 20$, όπου το 20 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (50 μL, >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης) (1000/50 = 20). Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Μετά τον υπολογισμό των mmol/L GSH στα δείγματα, τα αποτελέσματα ανάγονται σε nmol GSH/mg πρωτεΐνης στα αντίστοιχα δείγματα.

3.11 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για καθεμία από τις *in vivo* μεθόδους πραγματοποιήθηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford και της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης. 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 ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 595 nm.

4. Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1 Προσδιορισμός ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Μέθοδος Follin-Ciocalteu

Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας με τα αποτελέσματα της μέτρησης. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ και έχουν εκφραστεί σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.

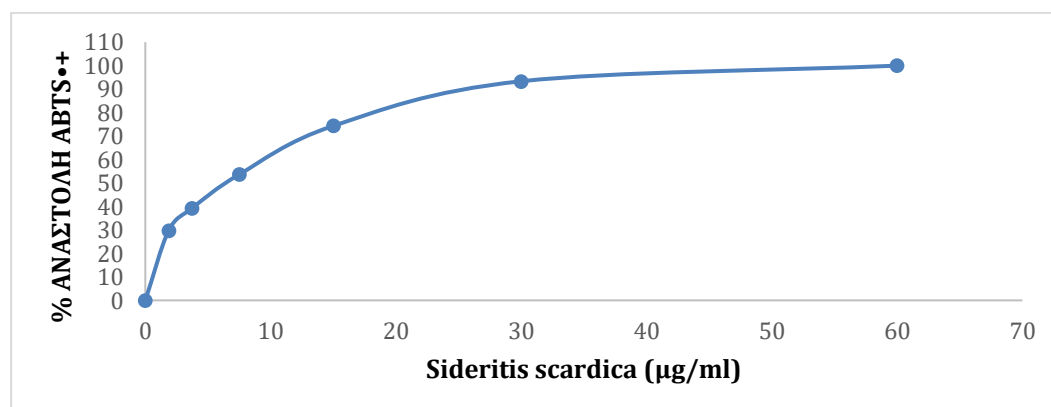
Πίνακας 20: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο *Sideritis scardica*.

Φυτικό εκχύλισμα	μg GAE / g εκχυλίσματος
Sideritis scardica	132,82 ± 10,4

Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ανέρχεται στα 132,82 mg GAE/g εκχυλίσματος. Οι φαινολικές ενώσεις προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση στο φυτικό εκχύλισμα που εμπεριέχονται, καθώς δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στο *Sideritis scardica* ενισχύει την υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην παρουσία αυτών των ενώσεων. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι το *Sideritis scardica* είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, τα οποία σχετίζονται με την αντιοξειδωτική του δράση (Żyżelewicz et al., 2020).

4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+

Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα.

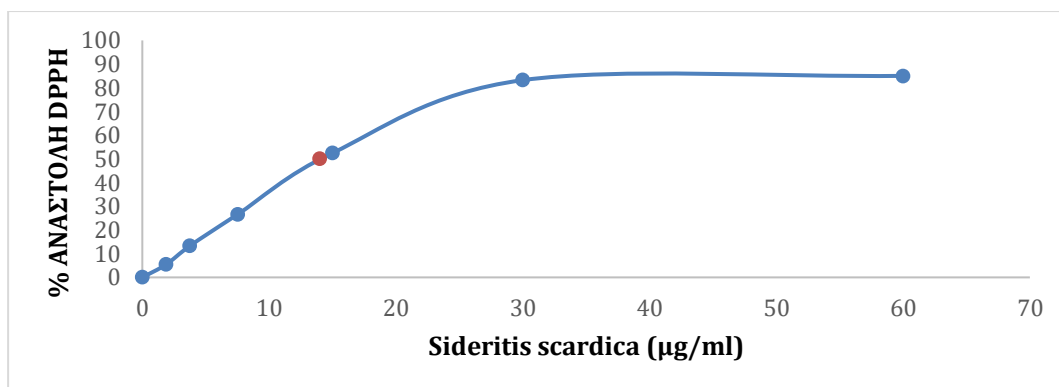


Διάγραμμα 2: Η % αναστολή της ρίζας ABTS•+ από το *Sideritis scardica*.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει τη ρίζα ABTS•+, όπου φαίνεται πως το *Sideritis scardica* εμφανίζει σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Το IC₅₀ ισούται με 8,9 µg/ml. Γενικά, όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS•+ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Τα αποτελέσματα αυτά, ενισχύονται από την έρευνα των Gründemann et al., 2013, η οποία ανέδειξε σημαντική δράση του φυτού έναντι ελεύθερων ριζών, επιβεβαιώνοντας ότι αποτελεί πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Σε σύγκριση με άλλα φυτικά εκχυλίσματα της οικογένειας Lamiaceae, το IC₅₀ του *Sideritis scardica* είναι υψηλότερο από το IC₅₀ του εκχυλίσματος **φασκόμηλου (*Salvia officinalis*)**, το οποίο εμφανίζει τιμές γύρω στα 20,64 mg/ml (Tundis et al., 2020). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική χημική σύσταση των φυτικών εκχυλισμάτων, στον τρόπο εκχύλισης και στην γεωγραφική θέση ανάπτυξης του φυτού.

4.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα.

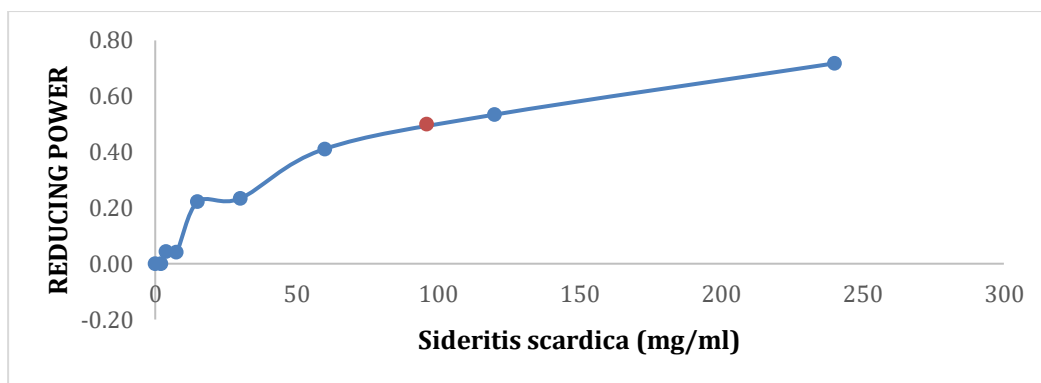


Διάγραμμα 3: Η % αναστολή της ρίζας DPPH• από το *Sideritis scardica*.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα του εκχυλίσματος να εξουδετερώνει τη ρίζα DPPH•, όπου φαίνεται πως το *Sideritis scardica* εμφανίζει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το IC₅₀ ισούται με 14 μg/ml. Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Η τιμή IC₅₀ 14μg/ml υποδηλώνει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτικού εκχυλίσματος. Μάλιστα, μελέτη των De La Puerta et al., 2013, αποδεικνύει πως το *Sideritis scardica*, εμφανίζει υψηλότερη προστασία έναντι των ελεύθερων ριζών από το *Sideritis perezlarae* 360μg/ml. Ακόμα, μελέτη των Karapandzova et al. 2013 ανέφερε ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH με τιμές IC₅₀ μεταξύ 3,2 και 8,9 mg/mL για αιθανολικά εκχυλίσματα *S. scardica* από διαφορετικές τοποθεσίες (Βόρεια Μακεδονία και Αλβανία), οι οποίες δεν διαφέρουν σημαντικά με την παρούσα μελέτη. Ωστόσο, οι όποιες διαφορές στις τιμές IC₅₀ ενδέχεται να σχετίζονται με τον διαλύτη εκχύλισης, καθώς διαφορετικοί διαλύτες ενισχύουν διαφορετικές κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, οι διαφορές μπορεί επίσης να οφείλονται σε γεωγραφικές, περιβαλλοντικές ή καλλιεργητικές παραμέτρους. Επίσης, η τιμή IC₅₀ στη μέθοδο DPPH δεν διέφερε σημαντικά με την τιμή IC₅₀ στη μέθοδο ABTS•+, γεγονός που δείχνει ότι πιθανώς οι αντιοξειδωτικές ουσίες στις οποίες οφείλεται η εξουδετέρωση των δύο ριζών είναι παραπλήσιες.

4.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Reducing Power (RPA)

Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την αναγωγική ισχύ του εκχυλίσματος.

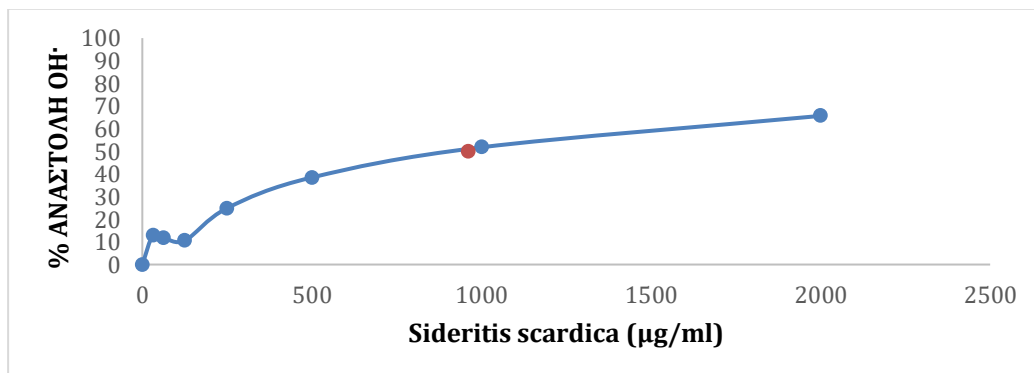


Διάγραμμα 4: Η αναγωγική ισχύς του *Sideritis scardica*.

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί απορρόφηση 0,5. Η τιμή RP(0,5AU) για το *Sideritis scardica* είναι 96 $\mu\text{g/ml}$. Όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του φυτικού εκχυλίσματος που προκαλεί απορρόφηση 0,5 τόσο μεγαλύτερη είναι η αναγωγική του ισχύς και επομένως τόσο ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση έχει. Άρα, το συγκεκριμένο φυτικό εκχύλισμα με βάση την τιμή 96 $\mu\text{g/ml}$ που προκύπτει από την συγκεκριμένη μέθοδο, φαίνεται να έχει αξιοσημείωτη αναγωγική ικανότητα. Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας υποδηλώνει και αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού πολλά αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες λειτουργώντας ως δότες ηλεκτρονίων.

4.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας OH $\cdot$

Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την % εξουδετέρωση της ρίζας OH $\cdot$ από το εκχύλισμα.

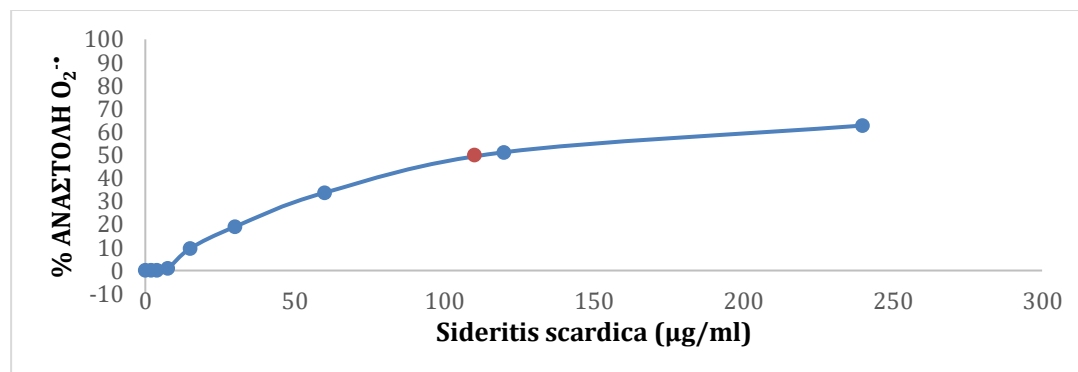


Διάγραμμα 5: Η % αναστολή της ρίζας OH $\cdot$ από το *Sideritis scardica*.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα του *Sideritis scardica* να εξουδετερώνει τη ρίζα OH $\cdot$. Το IC₅₀ ισούται με 1150 $\mu\text{g/ml}$. Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας OH $\cdot$ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Αυτό υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα έχει μέτρια αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας OH, καθώς απαιτεί συγκέντρωση 1150 $\mu\text{g/ml}$ για να εξουδετερώσει το 50%. Η σχετικά χαμηλή ικανότητα εξουδετέρωσης του φυτικού εκχυλίσματος έναντι της συγκεκριμένης ρίζας σε σύγκριση με τις ρίζες DPPH και ABTS $^{+}$ οφείλεται προφανώς στον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων του εκχυλίσματος με τις ανωτέρω ρίζες λόγω του ότι αυτές έχουν διαφορετική δομή.

4.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\bullet-}$.

Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την % εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ από το εκχύλισμα.

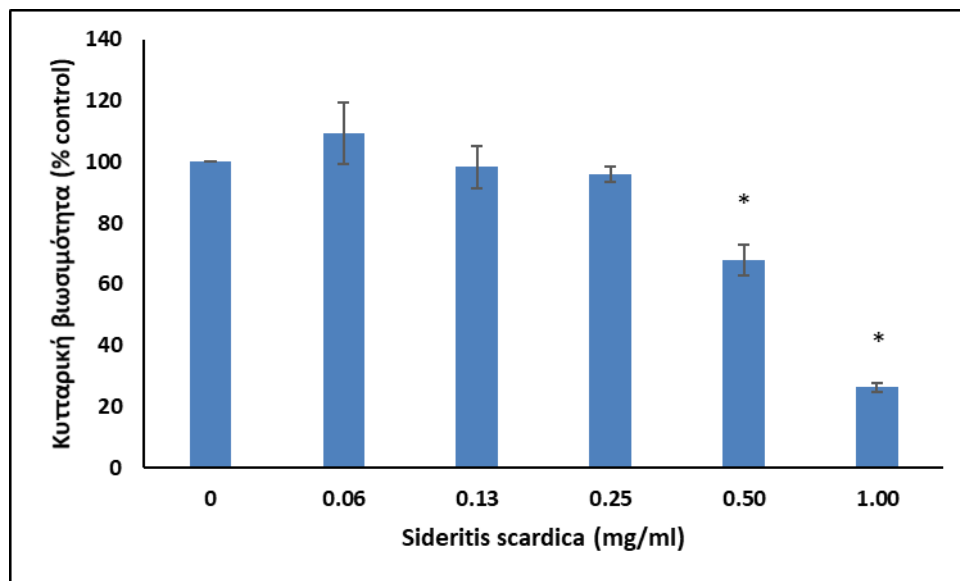


Διάγραμμα 6: Η % αναστολή της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ από το *Sideritis scardica*.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η ικανότητα του *Sideritis scardica* να εξουδετερώνει τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$. Το IC_{50} ισούται με 110 µg/ml. Όσο μικρότερες συγκεντρώσεις απαιτούνται από ένα εκχύλισμα για την εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Επομένως το *Sideritis scardica* υποδεικνύει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, όσο αφορά την εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\bullet-}$. Η αποτελεσματική εξουδετέρωση της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ από το εκχύλισμα έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ είναι πιο τις πιο κοινές ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζεται κυρίως κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια των κυττάρων.

4.7 Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης – Μέθοδος XTT

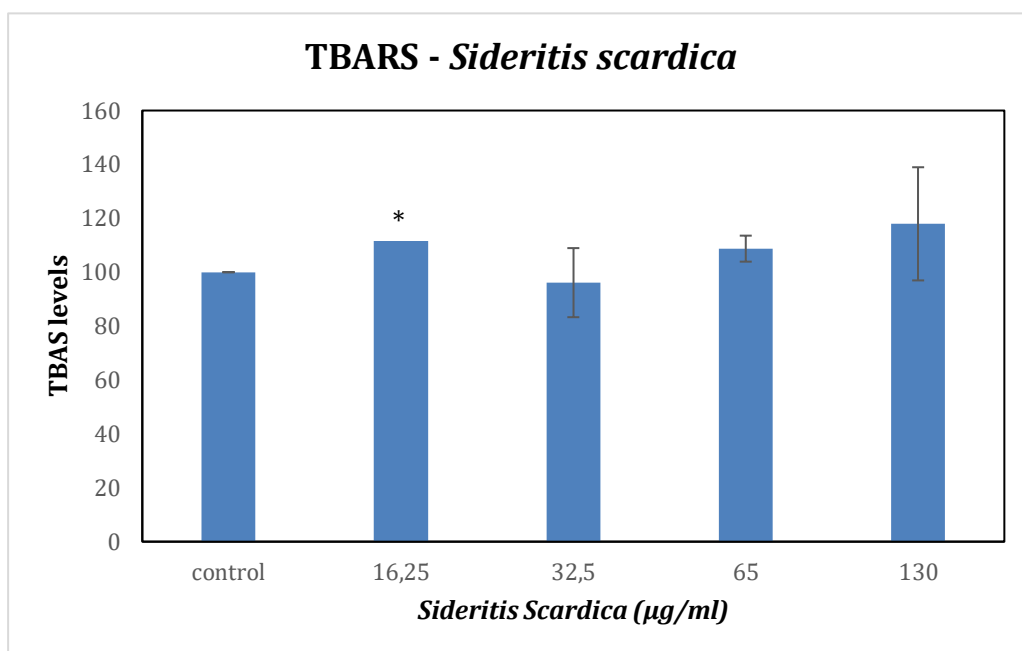
Το εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εξετάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με τη μέθοδο XTT σε ανθρώπινα βλαστικά μεσεγχυματικά κύτταρα ομφάλιου λώρου. Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή της κυτταρικής αύξησης παρουσία του εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 7: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης. (*) στατιστικά σημαντική $p < 0,05$ διαφορά σε σχέση με το control

Στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζεται η επίδραση στη βιωσιμότητα των κυτάρων όπως εξετάστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ. Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθούν οι κυτταροτοξικές και οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*, ώστε να πραγματοποιηθούν τα επόμενα πειράματα επιλέγοντας συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος: 0,06mg/ml, 0,13mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml και 1mg/ml. Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, οι οποίες και επιλέχθηκαν ήταν οι ακόλουθες: 0,06mg/ml και 0,13mg/ml. Οι συγκεντρώσεις αυτές, δεν προκάλεσαν αναστολή της κυτταρικής αύξησης στατιστικά σημαντική. Για τα επόμενα πειράματα, εκτός από αυτές τις δύο συγκεντρώσεις τα κύτταρα επωάστηκαν και στις αμέσως επόμενες δύο μικρότερες συγκεντρώσεις, τις: 0,03mg/ml και 0,01625mg/ml.

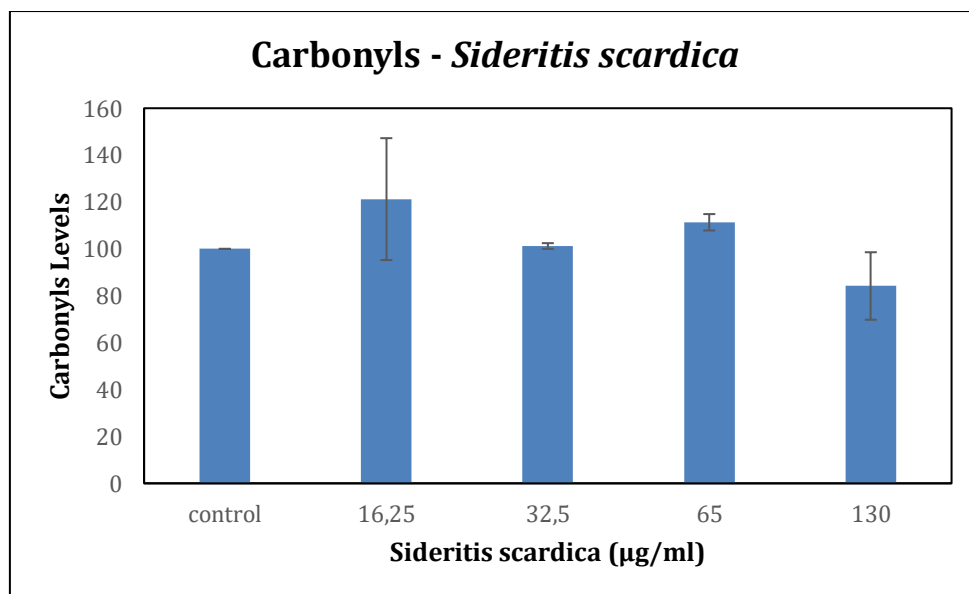
4.8 Προσδιορισμός επιπέδων θειοβαρβιτουρικού Οξέος - TBARS



Διάγραμμα 8: Επίπεδα TBARS σε σχέση με το Control. . (*) στατιστικά σημαντική $p < 0,05$ διαφορά σε σχέση με το control.

Μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*: 16,25 µg/ml, 32,5 µg/ml, 130 µg/ml και 65 µg/ml. Συγκριτικά με το control, δεν παρατηρήθηκε μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Αντίθετα, η μικρότερη συγκεντρώνση (16,25 µg/ml), εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό λιπιδικής υπεροξειδωσής στο 113,33%.

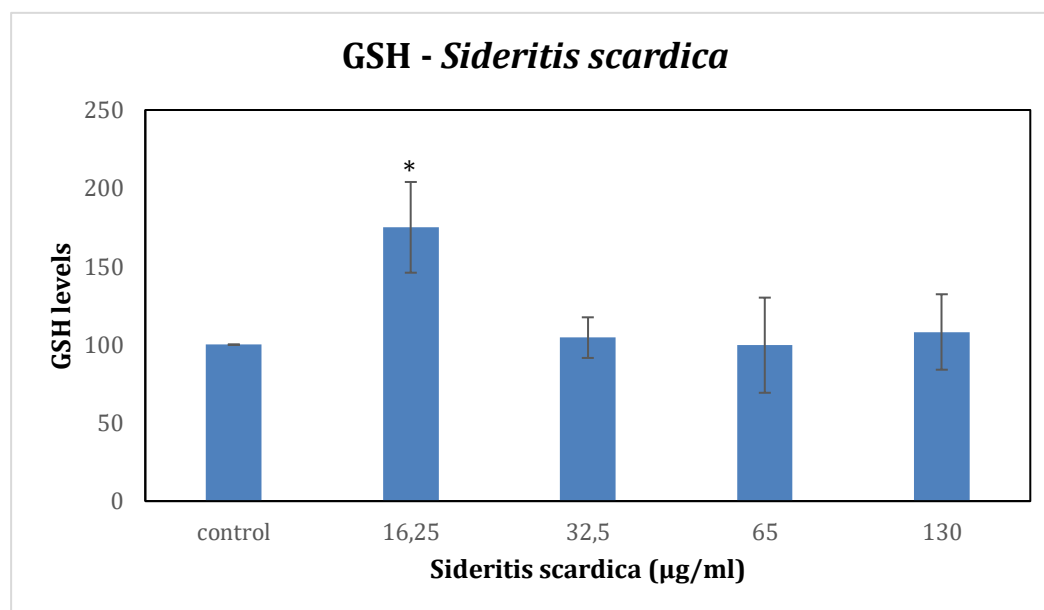
4.9 Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα 9: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το Control.

Μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*: 16,25 µg/ml, 32,5 µg/ml, 130 µg/ml και 65 µg/ml. Έπειτα, από επώαση 24h των κυτάρων με το φυτικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*, στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που αποτελούν δείκτη πρωτεϊνικής οξειδωσης, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

4.10 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης- GSH



Διάγραμμα 10: Επίπεδα Γλουταθειόνης σε σχέση με το Control. . (*) στατιστικά σημαντική $p < 0,05$ διαφορά σε σχέση με το control.

Μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*: 16,25 µg/ml, 32,5 µg/ml, 130 µg/ml και 65 µg/ml. Έπειτα, από επώαση 24h των κυτάρων με το φυτικό εκχύλισμα *Sideritis scardica*, στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, . Υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH κατά 75% στη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 16,25 µg/ml. Ήταν αξιοσημείωτο ότι όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην ίδια συγκέντρωση υπήρξε και στατιστικά σημαντική αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Αυτά τα δύο αποτελέσματα μαζί υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα *Sideritis scardica* στη συγκέντρωση 16,25 µg/ml και μετά από 24h επώαση προκαλείται ήπιο οξειδωτικό στρες. Για αυτό και πιθανώς ως απόκριση των κυτάρων υπάρχει αύξηση του αντιοξειδωτικού μορίου της GSH. Το γεγονός ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζονται αυτές οι μεταβολές, πιθανώς να οφείλεται ότι σε αυτές τις συνθήκες προκαλείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξειδωτικό στρες νωρίτερα από τις 24h, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που το εξουδετερώνουν.

5. Συμπεράσματα

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ένα προϊόν φυσιολογικών διεργασιών πολλών ζωντανών οργανισμών και ταυτόχρονα αποτελούν σημαντικό σύμμαχο των οργανισμών αυτών καθώς εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος, σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις, στην ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού φορτίου του κυττάρου και

στον έλεγχο της συγκέντρωσης οξυγόνου συμβάλλοντας στη διατήρηση της ισορροπίας και της ευεξίας του οργανισμού. Από την άλλη, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται και λόγω εξωγενών παραγόντων, όπως το κάπνισμα ή κατανάλωση αλκοόλ, η υπερϊώδης ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση κ.α. Όταν η παραγωγή των ελεύθερων ριζών υπερβεί την ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυττάρου να τις εξισορροπήσει, επάγεται ένα φαινόμενο που ορίζεται ως οξειδωτικό στρες. Η εγκαθίδρυση αυτής της συνθήκης για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί βλάβες στα κύτταρα, αλλά και στα βιομόρια, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση μακροχρόνιων προβλημάτων υγείας, όπως ο καρκίνος, διάφορες καρδιαγγειακές και νευρολογικές παθήσεις.

Επομένως, ιδιαίτερα λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής και της υπερβολικής έκθεσης του ανθρώπου σε εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών, η ανάγκη για αντιοξειδωτική προστασία έχει αυξηθεί. Η κατάσταση αυτή έχει στρέψει το ενδιαφέρον σε φυσικές ουσίες που έχουν αντιοξειδωτική δράση και καταπολεμούν το οξειδωτικό στρες. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε *in vitro* αλλά και σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα η αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικού εκχυλίσματος του φυτού *Sideritis scardica*.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εξεταζόμενο εκχύλισμα είχε σημαντική συγκέντρωση πολυφαινολών στην τιμή των 132,82 mg GAE/g extract. Οπότε, στις πολυφαινόλες που περιέχει οφείλονται τουλάχιστον εν μέρει η ικανότητα του εξουδετέρωσης των ριζών DPPH[•], ABTS^{•+} και O₂^{•-} και OH[•] αλλά και η αναγωγική του ικανότητα που παρατηρήθηκαν *in vitro*. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα παρουσίασε ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH με τιμή του IC₅₀ στα 14 μg/ml. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+}, ήταν ακόμα ισχυρότερη με την τιμή του IC₅₀ να εντοπίζεται στα 8,9 μg/ml. Ακόμα, ελαφρώς χαμηλότερη αλλά εξίσου σημαντική ήταν η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{•-} με τιμή IC₅₀ ίσο με 110 μg/ml, αλλά και η αναγωγική ισχύς του εκχυλίσματος, η οποία κυμαίνεται στα 96 μg/ml. Από την άλλη, εμφανώς μικρότερη φαίνεται να είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας OH[•] με τιμή IC₅₀ 1150 μg/ml.

Επιπλέον, το εκχύλισμα εξετάστηκε για την αντιοξειδωτική του ικανότητα σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Μελετήθηκαν τέσσερις μη τοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Sideritis scardica*, δηλαδή 16,25 μg/ml, 32,5 μg/ml, 130 μg/ml και 65 μg/ml σε επώαση 24h με τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH κατά 75% στη μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 16,25 μg/ml. Ήταν αξιοσημείωτο ότι στην ίδια συγκέντρωση υπήρξε και στατιστικά σημαντική αύξηση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων κατά 13%. Αυτά τα δύο αποτελέσματα μαζί υποδηλώνουν ότι το εκχύλισμα *Sideritis scardica* στη συγκέντρωση των 16,25 μg/ml και μετά από 24h επώαση προκαλεί ήπιο οξειδωτικό στρες. Για αυτό και πιθανώς ως απόκριση των κυττάρων υπάρχει αύξηση του αντιοξειδωτικού μορίου της GSH. Το γεγονός ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζονται αυτές οι μεταβολές, πιθανώς να οφείλεται ότι σε αυτές τις συνθήκες προκαλείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξειδωτικό στρες νωρίτερα από τις 24h, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που το εξουδετερώνουν. Είναι γνωστό ότι πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες στην πραγματικότητα δρουν με την πρόκληση ήπιου οξειδωτικού στρες στα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια ως προσαρμογή ενεργοποιούν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που εξουδετερώνουν το ήπιο οξειδωτικό στρες αλλά και προστατεύουν τον οργανισμό από πιθανή επίδραση ισχυρότερου οξειδωτικού στρες. Βέβαια, θα πρέπει να υπάρξει περαιτέρω μελέτη για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση για

το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όπως για παράδειγμα θα πρέπει να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος στα κύτταρα παρουσία οξειδωτικού στρες που θα προκληθεί από κάποιον οξειδωτικό παράγοντα.

6. Βιβλιογραφία

- Lobo, V, A Patil, A Phatak, N Chandra. (2010). 'Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health'. *Pharmacognosy Reviews* 4(8): 118. doi:[10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902).
- Barba, Francisco J., Shahin Roohinejad, Kenji Ishikawa, Sze Ying Leong, Alaa El-Din A Bekhit, Jorge A. Saraiva, Nikolai Lebovka. (2020). 'Electron Spin Resonance as a Tool to Monitor the Influence of Novel Processing Technologies on Food Properties'. *Trends in Food Science & Technology* 100: 77–87. doi:[10.1016/j.tifs.2020.03.032](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.032).
- Phaniendra, Alugoju, Dinesh Babu Jestadi, Latha Periyasamy. (2015). 'Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases'. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30(1): 11–26. doi:[10.1007/s12291-014-0446-0](https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0).
- Cheeseman, K. H., T. F. Slater. (1993). 'An Introduction to Free Radical Biochemistry'. *British Medical Bulletin* 49(3): 481–93. doi:[10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625).
- Nathan, C., Cunningham-Bussell, A. (2003). Beyond oxidative stress: a protective role for reactive oxygen species (ROS) in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(11), 967–974. <https://doi.org/10.1038/nri1201>
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415–418. <https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Wickens, Andrew P. 2001. 'Ageing and the Free Radical Theory'. *Respiration Physiology* 128(3): 379–91. doi:[10.1016/S0034-5687\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00313-9).
- K. Shankar, H.M. (2014). Mehendale, in *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition)
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Winrow, V. R., Winyard, P. G., Morris, C. J., & Blake, D. R. (1993). Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, 49(3), 506–522. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072627>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>

- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2(2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T., & Sato, C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 447–450. <https://doi.org/10.1002/jnr.10349>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Endale, H. T., Tesfaye, W., & Mengstie, T. A. (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1226044. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1226044>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 4.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 55–99. <https://doi.org/10.1002/mas.20006>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Antioxidants in Health and Disease*, 11. doi: 10.1136/jcp.54.3.176
- Rice-Evans, C. A., & Diplock, A. T. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1), 77–96. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90127-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90127-G)
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 248–254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Munteanu, I.G., Apetrei, C., 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *IJMS* 22, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 78(11), 6858–6862. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6858>
- Jaeschke, H. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2), 166–176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
 - Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
 - Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
 - Zagorskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
 - Bujor, O.-C., Adina Talmaciu, I., Volf, I., & I. Popa, V. (2015). Biorefining to recover aromatic compounds with biological properties. *TAPPI Journal*, 14(3), 187–193. <https://doi.org/10.32964/TJ14.3.187>
 - Jeremic, I., Petricevic, S., Tadic, V., Petrovic, D., Tosic, J., Stanojevic, Z., Petronijevic, M., Vidicevic, S., Trajkovic, V., & Isakovic, A. (2019). Effects of *Sideritis scardica* Extract on Glucose Tolerance, Triglyceride Levels and Markers of Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. *Planta Medica*, 85(06), 465–472. <https://doi.org/10.1055/a-0835-6622>
 - Żyżelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J., & Żyżelewicz, K. (2020). Polyphenols and Other Bioactive Compounds of *Sideritis* Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 25(16), 3763. <https://doi.org/10.3390/molecules25163763>
 - Tadić, V., Jeremic, I., Dobric, S., Isakovic, A., Markovic, I., Trajkovic, V., Bojovic, D., & Arsic, I. (2012). Anti-inflammatory, Gastroprotective, and Cytotoxic Effects of *Sideritis scardica* Extracts. *Planta Medica*, 78(05), 415–427. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298172>
 - Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 1019, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
 - Kim, D.-W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., & Borlongan, C. (2013). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11692–11712. <https://doi.org/10.3390/ijms140611692>
 - Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *International Journal of Stem Cells*, 12(2), 218–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>
 - Liao, L. L., Ruszymah, B. H. I., Ng, M. H., & Law, J. X. (2020). Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Current Research in Translational Medicine*, 68(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.09.001>
 - De La Puerta, R., Fernández-Arche, M. A., Lopez-Lazaro, M., & Garcia, M. D. (2013). Antioxidant and cytotoxic activities of *Sideritis perezlarae* (Borja) Roselló, Stübing and Peris. *Natural Product Research*, 27(17), 1602–1606. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.740031>

- Karapandzova, M., Qazimi, B., Stefkov, G., Bačeva, K., Stafilov, T., Panovska, T. K., & Kulevanova, S. (2013). Chemical Characterization, Mineral Content and Radical Scavenging Activity of *Sideritis scardica* and *S. raeseri* from R. Macedonia and R. Albania. *Natural Product Communications*, 8(5), 1934578X1300800525. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800525>
- Tundis, R., Leporini, M., Bonesi, M., Rovito, S., & Passalacqua, N. G. (2020). *Salvia officinalis* L. from Italy: A Comparative Chemical and Biological Study of Its Essential Oil in the Mediterranean Context. *Molecules*, 25(24), 5826. <https://doi.org/10.3390/molecules25245826>

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας – Τοξικολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα. Ακόμα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Βαρβάρα Τραχανά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας – Κυτταρικής Βιολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε, ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό της. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αυτής της εργασίας, τόσο εκείνη, όσο και ο κ. Δημήτριος Μόσιαλος, αναπληρωτή καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιπροσθέτως, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Ζωζώ Ουτσκούνη για την καθοριστική συμβολή της. Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την στήριξη, αλλά και την βοήθεια που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπλέον, εκτιμώ βαθύτατα το φιλικό κλίμα που καλλιέργησε στο εργαστήριο και έκανε όλη την πορεία μου ακόμα πιο ευχάριστη.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια και τους φίλους μου που είναι πάντα στο πλευρό μου και στηρίζουν όλες τις αποφάσεις και τους στόχους μου.