

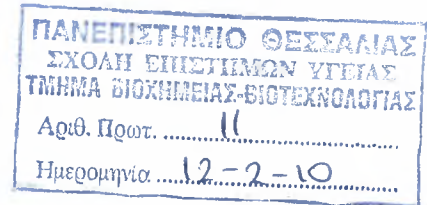


Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας**

**Βιοτεχνολογία Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος**



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ  
ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΙΩΑΝΝΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**



**ΛΑΡΙΣΑ 2010**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8098/1  
Ημερ. Εισ.: 13-04-2010  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
572.7  
ΙΩΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087113

**Επίδραση εκχυλισμάτων των ψυχανθών στο σύστημα της  
γλουταθειόνης ανθρώπινων μονοκύτταρων περιφερικού αίματος**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας, εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κομιώτης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **Ευχαριστίες**

*Η διαδρομή μου από την αρχή των σπουδών μου στο Μεταπτυχιακό, ήταν άλλοτε γλυκιά, άλλοτε πικρή, τότε βατή και τότε αντίζοη, ποτέ όμως δεν υπήρξε μοναχική.*

*Και αυτό, χάρη αρχικά στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας που θεσμικά ευχαριστώ όχι μόνο για την ευκαιρία για πνευματική πρόοδο που μου έδωσε, αλλά γιατί, πέρα από θεσμούς και πλαίσια, πέρα από την ιδιότητα του φοιτητή, αναγνώρισε σε μένα και σε όλους τους συμφοιτητές μου την ανθρώπινη ιδιότητα.*

*Ευκαιρίας δοθείσης λοιπόν, ως κύριο εκφραστή και φορέα όλων αυτών των συναισθημάτων και τάσεων που λειτούργησαν δημιουργικά και διαφωτιστικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και την κατανόηση που επέδειξε κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της Μεταπτυχιακής μου εργασίας.*

*Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Σπανού για την άψογη συνεργασία μας καθ'όλη τη διάρκεια της Μεταπτυχιακής εργασίας. Η συμβολή της ήταν πολύ σημαντική και καθοριστικής σημασίας σε όλα τα στάδια για την ολοκλήρωση της εργασίας, καθώς η επιστημονική της κατάρτιση σε συνδυασμό με την κατανόηση και υπομονή της έφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα.*

*Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την δημιουργία του αρμονικού και παραγωγικού κλίματος καθ'όλο το χρονικό διάστημα της παραμονής μου σε αυτό.*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>11</b>
1.1 Μεσογειακή διατροφή: ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία	11
1.1.2 Πολυφαινόλες	13
1.1.3 Ψυχανθή – Όσπρια	16
1.2 Χημειοπροστασία	19
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες	20
1.2.2 Οξειδωτικό στρες	21
1.2.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	22
1.2.4 Γλουταθειόνη	23
1.3 Ψυχανθή της οικογένειας Leguminosae	25
1.4 Σκοπός του πειράματος	27
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>28</b>
2.1 Υλικά	28
2.1.1 Υλικά καλλιέργειας μονοκύτταρων περιφερικού αίματος	28
2.2 Εκχυλίσματα	28
2.3 Μέθοδοι	29
2.3.1 Απομόνωση μονοκυττάρων περιφερικού αίματος	29
2.3.2 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων	30
2.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής άμυνας των κυττάρων παρουσία οξειδωτικού παράγοντα και εκχυλισμάτων	31
2.4 Εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	32
2.4.1 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης	33
2.4.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης	34
2.5 Υπολογισμοί	36
2.6 Στατιστική ανάλυση	37
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>38</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>42</b>
<b>5. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	<b>10</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>44</b>

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

### Γράφημα 1:

Κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων *Lathyrus laxiflorus*, *Phaseolus vulgaris* στα PMCs 38

### Γράφημα 2:

A: Επίδραση του *L.laxiflorus* στο σύστημα της ανηγμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 40

B: Επίδραση του *L.laxiflorus* στο σύστημα της οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 40

Γ: Επίδραση του *L.laxiflorus* στον λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 40

### Γράφημα 3:

A: Επίδραση του *P.vulgaris* στο σύστημα της ανηγμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 41

B: Επίδραση του *P.vulgaris* στο σύστημα της οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 41

Γ: Επίδραση του *P.vulgaris* στον λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα tBOOH 41

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 1.1: Πυραμίδα μεσογειακής διατροφής</u>	<u>13</u>
<u>Εικόνα1.2: Φλαβονόλες</u>	<u>14</u>
<u>Εικόνα1.3: Φλαβανόλες</u>	<u>14</u>
<u>Εικόνα1.4: Ανθοκυανίδες</u>	<u>15</u>
<u>Εικόνα1.5: Υδροξυβενζοϊκό οξύ</u>	<u>15</u>
<u>Εικόνα1.6: Υδροξυκινναμικό</u>	<u>15</u>
<u>Εικόνα 1.7: trans- ρεσβερατρόλη</u>	<u>16</u>
<u>Εικόνα 1.8: Όσπρια</u>	<u>17</u>
<u>Εικόνα 1.9: Όσπρια</u>	<u>17</u>
<u>Εικόνα 1.10: Μηχανισμός χημειοπροστασίας</u>	<u>19</u>
<u>Εικόνα 1.11: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό</u>	<u>22</u>
<u>Εικόνα 1.12: Παραγωγή ελευθέρων ριζών &amp; αντιοξειδωτικών ενζύμων</u>	<u>23</u>
<u>Εικόνα 1.13: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης</u>	<u>24</u>
<u>Εικόνα 1.14: Πόα <i>Phaseolus vulgaris</i></u>	<u>25</u>
<u>Εικόνα 1.15: Πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i></u>	<u>26</u>
<u>Εικόνα 2.1: Παρουσίαση στρωμάτων έπειτα από φυγοκέντριση</u>	<u>30</u>
<u>Εικόνα 2.2: Οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης σε οξειδωμένη με ταυτόχρονη μετατροπή του δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ</u>	<u>33</u>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες με διατροφικά πρότυπα έχουν δείξει ότι η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή θεωρείται το καταλληλότερο διαιτητικό πρόγραμμα λόγω των λειτουργικών της συστατικών τα οποία προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Ανάμεσα στις άλλες ευεργετικές επιδράσεις της, η Μεσογειακού τύπου διατροφή η οποία περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες φυτικών τροφίμων συμπεριλαμβανομένων των οσπρίων θεωρείται ότι συμβάλλει στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες μέσω των υψηλών αντιοξειδωτικών που περιέχει. Στα πλαίσια της μελέτης των βιολογικών φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών έγινε η παρούσα εργασία. Στην εργασία μελετήθηκε η επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε ανθρώπινα φυσιολογικά μονοκύτταρα αλλά και η επίδραση των εκχυλισμάτων σε αυτά υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες. Χρησιμοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από υπέργεια τμήματα των φυτών *Phaseolus vulgaris* και *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* της οικογένειας *Leguminosae*. Αρχικά μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις και βρέθηκαν οι μη τοξικές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση των φυτικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα όταν βρίσκονται υπό την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH). Συνοπτικά, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης μετά την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα και των εκχυλισμάτων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στη δράση του οξειδωτικού παράγοντα σε πολύ μικρή συγκέντρωση (10 µg/mL), ενώ το εκχύλισμα *Phaseolus vulgaris* εμφάνισε προοξειδωτική δράση όπως φάνηκε από την αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα. Συνεπώς το φυτό *Lathyrus laxiflorus* μπορεί να θεωρηθεί σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

## ABSTRACT

The traditional Mediterranean diet has been considered as very beneficial for human health because of its functional components. The Mediterranean diet includes high quantities of plant foods, such as legumes which are considered to possess potent antioxidant properties. The present study examined the effects of two potent antioxidant *Leguminosae* family plant extracts using a cell based system. Specifically we examined the effects on the glutathione status of human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) following induction of oxidative stress. From the extracts tested, only *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* aerial plant parts extract, at a concentration as low as 10 µg/mL, prevented the decrease in GSH and the increase in GSSG levels induced by t-BOOH. On the contrary, *Phaseolus vulgaris* extract, at a higher concentration it increased GSSG levels in the presence of t-BOOH showing possible pro-oxidant activity. These results point out *L. laxiflorus* extract as possible source of chemopreventive agents.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- LDL –χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
- ROS - δραστικές μορφές οξυγόνου
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ρίζα του σουπεροξειδίου
- OH<sup>•</sup> - ρίζα του υδροξυλίου
- ROO<sup>•</sup> - ρίζες περοξυλίου
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - το υπεροξείδιο του υδρογόνου
- O<sub>2</sub> - μονήρης κατάσταση του οξυγόνου
- NO<sup>•</sup> - μονοξείδιο του αζώτου
- NO<sub>2</sub><sup>•-</sup> διοξείδιο του αζώτου
- GSSG - οξειδωμένη γλουταθειόνη
- GSH - ανηγμένη γλουταθειόνη
- PBMCs – μονοκύτταρα αίματος
- tBOOH- *tert*-butyl hydroperoxide
- TAC - συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα
- DTNB -5,5’δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ

## **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Μεσογειακή διατροφή: ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία**

Η Μεσογειακή διατροφή έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που έχει στην υγεία. Οι επιδράσεις αυτές οφείλονται στο υψηλό περιεχόμενο αυτής της Μεσογειακής διατροφής σε αντιοξειδωτικά και φυτοχημικά συστατικά (Vasilopoulou E, Trichopoulou A, 2005). Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της Μεσογειακής Διατροφής, όλες όμως παρουσιάζουν οχτώ κοινά χαρακτηριστικά: υψηλή κατανάλωση οσπρίων, υψηλή κατανάλωση φρούτων, υψηλή αναλογία μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπίδια, υψηλή κατανάλωση δημητριακών και λαχανικών, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς και χαμηλή κατανάλωση κρέατος (Simopoulos, 2001).

Η Μεσογειακή διαίτα γίνεται ευρέως γνωστή για πρώτη φορά την δεκαετία του '70 από την μελέτη των Εφτά Χωρών. Η μελέτη των Εφτά Χωρών άρχισε μέσα στο 1960 και σύγκρινε την επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων και τον τρόπο ζωής πληθυσμών από επτά χώρες: τις Η.Π.Α., Ολλανδία, Φιλανδία, Ιαπωνία, πρώην Γιουγκοσλαβία, Ιταλία, και Ελλάδα. Το βασικό εύρημα από αυτή τη μελέτη ήταν ότι ο Ελληνικός πληθυσμός από την Κρήτη είχε πολύ χαμηλούς δείκτες θνητότητας και θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σύγκριση με πληθυσμούς από τις άλλες χώρες. Η Μελέτη των Επτά Χωρών αποκάλυψε ότι η παραδοσιακή Κρητική Μεσογειακή Διατροφή ήταν πλούσια σε ολικό και μονοακόρεστο λίπος και φτωχή σε κορεσμένο λίπος (Kafatos et al, 1997).

Πολλά από τα βασικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Τα λαχανικά και τα φρούτα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, ισοφλαβονοειδή, φυτοστερόλες και άλλα βιοδραστικά συστατικά που παρέχουν σημαντικό όφελος στην υγεία. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα ψάρια ρυθμίζουν αποτελεσματικά τους αιμοστατικούς παράγοντες, προστατεύουν από τις καρδιακές αρρυθμίες, τον

καρκίνο και την υπέρταση, και διαδραματίζουν έναν ζωτικής σημασίας ρόλο στη συντήρηση των νευρικών λειτουργιών και την πρόληψη ορισμένων ψυχιατρικών διαταραχών (Kafatos et al, 1997).

Το ελαιόλαδο, ένα θεμελιώδες συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίων καρδιακών παθήσεων και της πρόληψης διάφορων τύπων καρκίνου. Το ελαιόλαδο είναι γνωστό για τα υψηλά επίπεδά του στα λιπαρά οξέα και είναι μια καλή πηγή φυτοχημικών συστατικών, όπως οι πολυφαινολικές ενώσεις, και η α-τοκοφερόλη (Ortega RM, 2006). Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η βιταμίνη E και κυρίως η α-τοκοφερόλη, παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίσταση της οξειδωσης της LDL. Όμως, όσον αφορά τη Μελέτη Επτά Χωρών, παρατηρήθηκε ότι η διατροφική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπως επίσης και το κάπνισμα, ήταν πιο σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων από τις διατροφικές προσλήψεις της βιταμίνης E, C και καροτενοειδών (Hertog et al, 1995).

Σε μια άλλη μελέτη, μια πιο μέτρια αλλά ασήμαντη αντίθετη σχέση καταγράφηκε μεταξύ της πρόσληψης φλαβονολών και φλαβονών, και των δεικτών θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο. Σ' αυτήν τη μελέτη, η μέση πρόσληψη φλαβονολών στο ανώτερο τεταρτημόριο ήταν 43 mg/ημέρα και 14 mg/ημέρα στο κατώτερο. Κάποιοι μηχανισμοί προτάθηκαν για την προστατευτική επίδραση των φλαβονοειδών. Δεσμεύουν την LDL και αναστέλλουν την οξειδωση της, και μειώνουν την ευαισθησία της στην οξείδωση. Επιπρόσθετα, οι μηχανισμοί αυτοί αναστέλλουν την οξειδωση της LDL των μακροφάγων με το να αυξάνουν το περιεχόμενο της κυτταρικής γλουταθειονικής τρανσφεράσης, και αναστέλλουν κυτταρικά ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην οξειδωση της LDL μέσω των κυττάρων (Hertog et al, 1995, Hollman et al, 1999).

Αν και η Μεσογειακή Διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, φρούτων, και οσπρίων, μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, και χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος, δεν

υπάρχει μια και μοναδική Μεσογειακή Διατροφή ευρέως αποδεκτή. Κάθε χώρα αυτής της περιοχής έχει τη δικιά της εκδοχή σύμφωνα με την κουλτούρα της (Kafatos et al,1997).



Εικόνα 1.1: Πυραμίδα μεσογειακής διατροφής

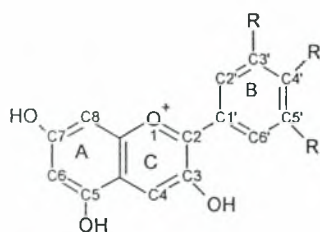
### 1.1.2 Πολυφαινόλες

Τα βιοδραστικά στοιχεία είναι συστατικά που κατά κανόνα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στα τρόφιμα. Έχουν μελετηθεί εντατικά ώστε να αξιολογηθούν οι επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. Έχουν ανακαλυφθεί πολλές βιοδραστικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό στην χημική δομή και στην λειτουργία τους και ομαδοποιούνται ανάλογα. Όπως είναι γνωστό, οι πολυφαινόλες και πιο ειδικά τα φλαβονοειδή είναι από τα σημαντικότερα βιοδραστικά στοιχεία, που βρίσκονται σε πολλές τροφές και παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση επιδρώντας με διάφορους τρόπους στα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας ενώ παράλληλα έχουν και αντιοξειδωτική δράση.

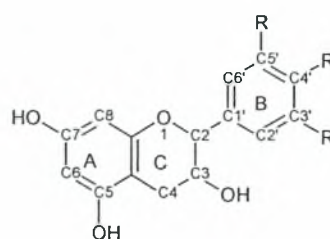
Οι πολυφαινόλες είναι συστατικά των τροφίμων φυτικής προέλευσης και σημαντικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες της διατροφής. Υπολογίζεται ότι

περισσότερες από 8000 ενώσεις έχουν απομονωθεί και περιγραφεί (Ramos S, 2007). Αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη τάξη φυτικών ουσιών που έχουν κοινό χαρακτηριστικό έναν αρωματικό δακτύλιο με μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Πρόδρομος των πολυφαινολών είναι η φαινυλαλανίνη η οποία προκύπτει από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Υπάρχουν περισσότερες από 10 κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων εκ των οποίων οι πιο γνωστές είναι τα флаβονοειδή και τα μη флаβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, και τα λιγνάνια (Nishenametla S and Taruscio T, 2006).

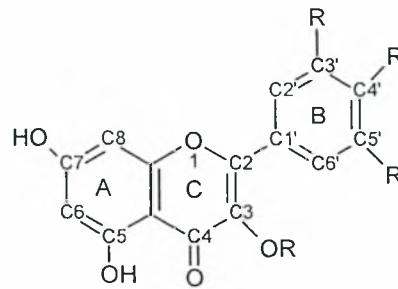
Στα флаβονοειδή οφείλεται το χρώμα των λουλουδιών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και άμυνα του φυτού. Όλα τα флаβονοειδή έχουν ένα κοινό ανθρακικό σκελετό από διφαινολικά προπάνια και δύο βενζοϊκούς δακτυλίους ενωμένους με μια γραμμική τριπλή ανθρακική αλυσίδα. Τα флаβονοειδή διαχωρίζονται σε флаβόνες, флаβονόλες, флаβανόνες, флаβανονόλες, флаβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες ανάλογα με την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Di Carlo G et al, 1999).



Εικόνα 1.2: Φλαβονόλες

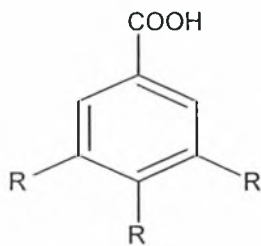


Εικόνα 1.3: Φλαβανόλες

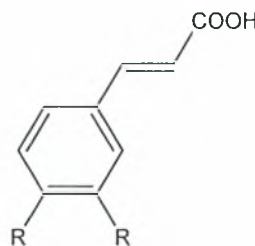


**Εικόνα 1.4:** Ανθοκυανίνες

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται πιο συχνά σαν απλοί εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και περιέχουν το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το σιριγγικό οξύ, ενώ τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται συνήθως με τη μορφή γλυκοσιδίων και περιλαμβάνουν το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ. Παρουσιάζουν αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες οι οποίες οφείλονται στην εξουδετέρωση ενεργών ηλεκτρόφιλων ριζών οξυγόνου όπως ακόμα και στην αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (Nishenametla S and Taruscio T, 2006).



**Εικόνα 1.5:** Υδροξυβενζοϊκό οξύ

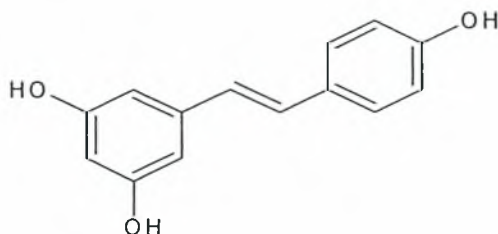


**Εικόνα 1.6:** Υδροξυκινναμικό οξύ

Τα στυλβένια αποτελούνται από δύο φαινολικούς δακτυλίους οι οποίοι είναι ενωμένοι με μία γέφυρα μεθυλενίου (Yang C.S et al, 2001). Τα στυλβένια είναι μία ακόμη ομάδα φαινολικών ενώσεων η οποία ανήκει στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών. Το κυριότερο μέλος της ομάδας των στυλβενίων είναι η ρεσβερατρόλη η οποία συναντάται είτε με τη μορφή γλυκοσιδίου είτε σε ελεύθερη μορφή. Έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως η αναστολή του



σχηματισμού ελεύθερων ριζών και η αναστολή της κυκλοξυγενάσης 1. Παρουσιάζει ακόμη αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, ενώ έχει την ιδιότητα της αναστολής της βιοενεργοποίησης των καρκινογόνων και την επαγωγή των μεταβολικών ενζύμων της φάσης II. Ακόμη μια ιδιότητα της είναι η οιστρογονική της δράση (Nishenametla S and Taruscio T, 2006).



**Εικόνα 1.7:** trans- ρεσβερατρόλη

Στις πολυφαινολικές ενώσεις όπως αναφέραμε παραπάνω ανήκουν και τα φυτοοιστρογόνα τα οποία είναι ένα διαιτητικό συστατικό που βρίσκεται σε περίπου 300 φυτά και η σημαντικότερη διαιτητική πηγή τους είναι η σόγια (Messina M et al, 1995) και τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην μειωμένη εμφάνιση χρόνιων παθήσεων συμπεριλαμβάνονται και τα λιγνάνια (Zava DT, et al, 1997). Τα λιγνάνια έχουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο ο οποίος καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Η απομόνωση τους μπορεί να γίνει από τα επικαλύμματα των σπόρων και από τα ξυλώδη μέρη των φυτών. Εκτός από τα φυτικά λιγνάνια που είναι η μετερσινόλη και η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη υπάρχουν και τα ζωικά τους παράγωγα που είναι η εντεροδιόλη και η εντερολακτόνη (Webb Cullough et al, 2005).

### 1.1.3 Ψυχανθή – Όσπρια

Στην οικογένεια των φυτών *Leguminosae*, η οποία αποτελεί ομάδα δικοτυλήδων φυτών και περιλαμβάνονται περισσότερα από 18.000 είδη ανήκουν τα ψυχανθή. Η οικογένεια των φυτών *Leguminosae* είναι μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών η οποία ταξινομείται σε τρεις

υποοικογένειες: τη *Mimosoideae*, τη *Faboideae* και τη *Caesalpinioideae*. Η μορφή των ψυχανθών χαρακτηρίζεται από ισχυρό πασαλώδες ριζικό σύστημα με πολλές διακλαδώσεις. Τόσο στην κύρια ρίζα όσο και στις διακλαδώσεις υπάρχουν εξογκώσεις που ονομάζονται φυμάτια τα οποία σχηματίζονται από τη συμβιωτική δράση των αζωτοβακτηρίων του γένους *Rhizobium*. Τα αζωτοβακτήρια χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου και την απόδοσή τους στα φυτά σε άμεση αφομοιώσιμη μορφή (Kurlovich B.S et al, 1995).

Τα ψυχανθή περιέχουν σίδηρο, αλκαλικές βάσεις και άλλα συστατικά απαραίτητα για τον οργανισμό. Από τα ψυχανθή καταναλώνονται ως τρόφιμα κυρίως τα σπέρματά τους όπως είναι η φακή, τα φασόλια, τα κουκιά, η σόγια, τα κουκιά, τα μπιζέλια και τα ρεβίθια. Οι καρποί των ψυχανθών οι οποίοι καταναλώνονται ως τρόφιμα ονομάζονται όσπρια (Duranti, 2006).

Τα όσπρια είναι μια από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών των τροφίμων. Σε πολλές περιοχές του κόσμου, οι σπόροι των οσπρίων είναι η μοναδική διατροφική πηγή πρωτεΐνης. Επομένως, η διαιτητική σημασία των σπόρων των οσπρίων αναμένεται να αυξηθεί στα επόμενα έτη λόγω της πρωτεϊνικής τους σύνθεσης αλλά και των υπολοίπων θρεπτικών στοιχείων, όπως επίσης και του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού (Duranti et al, 2005).



**Εικόνα 1.8:** Όσπρια



**Εικόνα 1.9:** Όσπρια

Τα όσπρια είναι λειτουργικά τρόφιμα πλούσια σε άμυλο, φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, ασβέστιο, σίδηρο, κάλιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρο. Έχουν χαμηλό

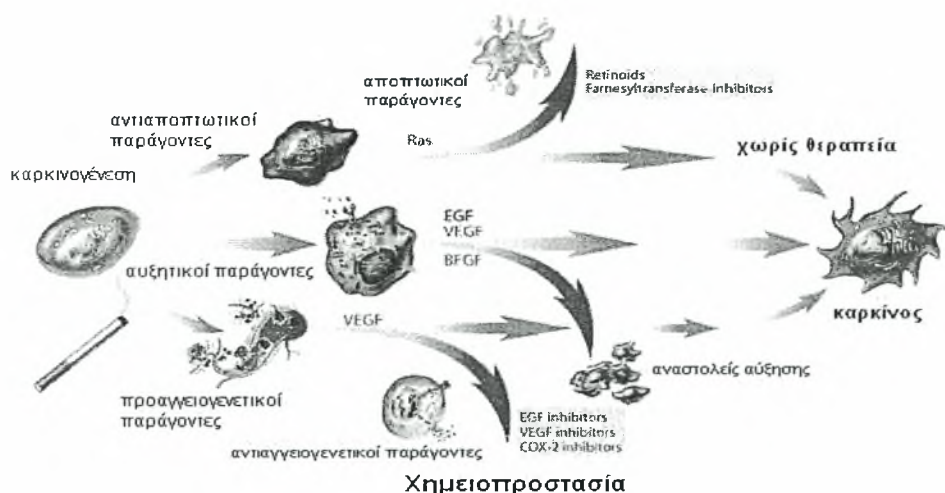
γλυκαιμικό δείκτη, είναι φτωχά σε νάτριο, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά τρόφιμα σε διαιτολογία διαβητικών και υπερτασικών και γενικότερα κλινικών καταστάσεων (Geil PB et al, 1994). Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι αρκετά ωφέλιμες για την υγεία αφού έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε πολλές ασθένειες όπως σε καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, παχυσαρκία κ.ά (Duranti, 2006).

Η συχνή κατανάλωση των οσπρίων στο διαιτολόγιο, παράλληλα με μια φτωχή σε λιπαρά διατροφή, μπορεί να βοηθήσει στην ομοίωση των λιπιδίων και να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Foster-Powell K et al, 1995). Ακόμη λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη και του υψηλού περιεχομένου των φυτικών ινών, τα όσπρια βοηθούν στον γλυκαιμικό έλεγχο στα διαβητικά άτομα. Επιπλέον, τα όσπρια μπορούν να συμβάλουν για να αποτρέψουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, στον διαβήτη τύπου II (Duranti, 2006).

Τέλος τα όσπρια περιέχουν και μη θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι: τα φυτικά οξέα, οι σαπωνίνες, οι ολιγοσακχαρίτες και οι αναστολείς της τρυψίνης. Τα συστατικά αυτά έχουν άμεση σχέση με την πρωτεϊνική πέψη και σε μερικά είδη ζώων μπορούν να προκαλέσουν παγκρεατική αύξηση και προαγωγή των χημικά επαγόμενων παγκρεατικών όγκων. Σε αντίθεση με τις παραπάνω επιβλαβείς δράσεις οι ουσίες αυτές μπορούν και δρουν και ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι σαπωνίνες παρατηρήθηκε ότι εμφανίζουν αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας κατά 2/3 την ανάπτυξη των αζοξυμεθάνιο - επαγόμενων βλαβών στον έντερο. Τα φυτικά οξέα έχουν συσχετιστεί με την μείωση εμφάνισης καρκίνου λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Οι ολιγοσακχαρίτες θεωρούνται πως ευθύνονται για την παραγωγή αερίων γεγονός που ευνοεί την υγεία του εντέρου αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής και μειώνοντας την εμφάνιση διάφορων ειδών καρκίνου όπως του καρκίνου του εντέρου (Messina M, 1999).

## 1.2 Χημειοπροστασία

Με τον όρο χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με την λήψη ενός ή περισσοτέρων χημικών ενώσεων είτε μέσω φαρμάκου, είτε μέσω της διατροφής με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροστασίας σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια. Το 80% περίπου των μορφών καρκίνου στον άνθρωπο οφείλεται στην έκθεση σε καρκινογόνα όπως κάπνισμα, διατροφή και εργασιακό περιβάλλον σύμφωνα με πολλές επιδημιολογικές μελέτες (Greenwald P et al, 1994).



Εικόνα 1.10: Μηχανισμοί χημειοπροστασίας

Τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας αλλά και η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η καρκινογένεση μπορεί εν μέρει να προληφθεί (Morse MA et al, 1993). Ανάλογα με το στάδιο στο οποίο επιδρούν οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τους “blocking agents” δηλαδή τους παράγοντες που παρεμποδίζουν την δράση του καρκινογόνου στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι αναστολείς του κυτοχρώματος P450, οι επαγωγείς των ενζύμων της φάσης 2, οι εξουδετερωτές των ελεύθερων ριζών και οι επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (Morse MA et al, 1993).

Στην δεύτερη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι “suppressing agents” δηλαδή οι καταστολείς της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Σε αυτούς ανήκουν οι αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, του μεταβολισμού των πολυαμινών, όπως επίσης και οι αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης και οι αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ακόμη ανήκουν και οι ρυθμιστές της οδού μετάδοσης του μηνύματος, οι ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων.

Όπως επίσης σε αυτήν την κατηγορία των “suppressing agents” ανήκουν και οι επαγωγείς της απόπτωσης, της τελικής διαφοροποίησης και οι επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας και τέλος οι παράγοντες αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης, όπως και οι επιδιορθωτές της ανισοροπίας της μεθυλίωσης του DNA (Gonzalez de Mejia et al, 2006).

Στην τρίτη κατηγορία χημειοπροστατευτικών παραγόντων ανήκουν οι αναστολείς του σχηματισμού των καρκινογόνων “inhibitors of carcinogen formation” στην οποία περιλαμβάνονται οι παρεμποδιστές σχηματισμού νιτροζαμινών από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον (Morse MA, et al 1993).

### **1.2.1 Ελεύθερες ρίζες**

Ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται τα μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Παράγονται από διάφορες βιολογικές διεργασίες ακόμη και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Ειδικότερα, μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα και κατά την λιπιδική οξειδωση και φλεγμονή. Ακόμη παράγονται από έκθεση σε ακτινοβολία και μολυσμένη ατμόσφαιρα και από το κάπνισμα (Lee et al, 2003). Από χημικής άποψης οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ασταθή και ταυτόχρονα εξαιρετικά ενεργά. Το άτομο του υδρογόνου με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο είναι η πιο απλή ελεύθερη ρίζα. Η υψηλή δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών μπορεί να αποδοθεί στα ασύζευκτα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας.

Η σημαντικότερη βιολογικά τάξη των ελευθέρων ριζών προέρχεται από το οξυγόνο και αναφέρονται ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) χωρίζονται στις ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, στις οποίες ανήκουν η ρίζα του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ) και οι ρίζες περοξυλίου ( $ROO^{\cdot}$ ) και στις μη ρίζες στις οποίες ανήκουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου ( $^1O_2$ ). Άλλα παραδείγματα ελεύθερων ριζών είναι κάποιες δραστικές μορφές αζώτου όπως το μονοξειδίο του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ) και το διοξειδίο του αζώτου ( $NO_2^{\cdot}$ ) (Halliwell B, 2001).

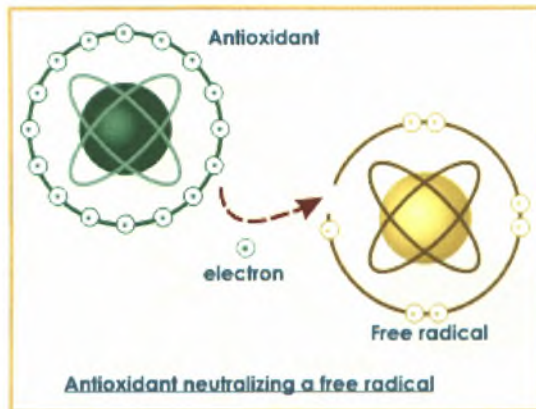
Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν και μεταξύ τους αλλά και με βιολογικά μακρομόρια όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους παράγεται μια μη ρίζα, η οποία τις περισσότερες φορές είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με τα αντιδρώντα. Όμως σε μερικές περιπτώσεις, η παραγομένη ένωση μπορεί να είναι πιο δραστική. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με βιομόρια, μπορούν να δημιουργηθούν νέες ρίζες, οι οποίες στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσουν ξανά και να παράγουν νέες ρίζες. Αυτή η διαδικασία η οποία είναι αλυσιδωτή μπορεί να επαναλαμβάνεται και να οδηγήσει τον οργανισμό σε δυσμενή κατάσταση (Halliwell, 2001, Mylonas and Kouretas, 1999).

### **1.2.2 Οξειδωτικό στρες**

Με τον όρο οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτό μπορεί να προκύψει είτε ως απόρροια υψηλότερης παραγωγής ελευθέρων ριζών είτε ως απόρροια περιορισμένης δράσης του αντιοξειδωτικού συστήματος άμυνας. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας μπορεί να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οι οποίες καταστρέφουν τα βιομόρια (Halliwell and Whiteman, 2004).

### 1.2.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός οξειδωμένου υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001).



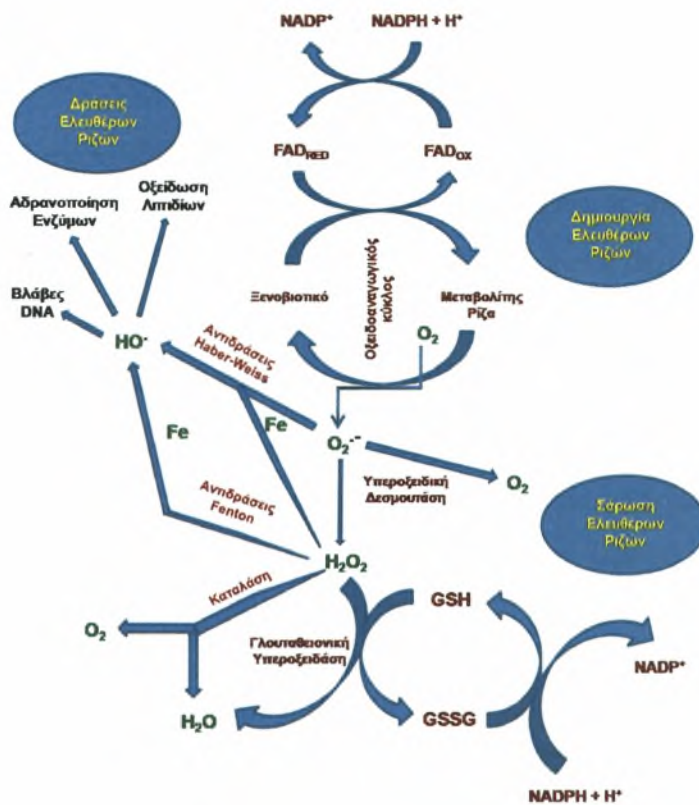
**Εικόνα 1.11:** Εξουδετέρωση μιας ελεύθερης ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό

Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών (Scalbert A et al., 2005). Ειδικότερα, τα αντιοξειδωτικά παρέχουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell B, 2001).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ενζυμικούς και στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Στους ενζυμικούς συμπεριλαμβάνονται τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια ενώ στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβάνονται λιπίδια, μέταλλα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, και ουσίες όπως για παράδειγμα οι πολυφαινόλες.

Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες εμφανίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των φαινολικών τους ομάδων καθώς λειτουργούν ως δέκτες ηλεκτρονίων για τον σχηματισμό σταθερών φαινοξυλικών ριζών και σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξείδωσης (Scalbert A et al, 2005). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης των πολυφαινολών έχουν ακόμη και

την ικανότητα να δρουν σαν δότες υδρογόνου και να δεσμεύουν τα χηλικά μέταλλα. Η βασικότερη κατηγορία πολυφαινόλων με αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή τα οποία εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου και περοξυλίου, σχηματίζουν συμπλέγματα με μέταλλα και εμποδίζουν την προκαλούμενη από μέταλλα λιπιδική οξείδωση (Lee J et al., 2003)



Εικόνα 1.12: Παραγωγή ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών ενζύμων

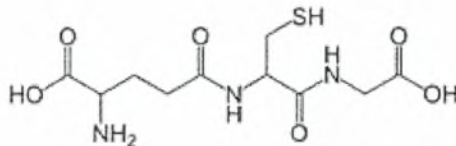
### 1.2.4 Γλουταθειώνη

Η γλουταθειώνη (γ-γλουταμυλοκυστεινογλυκίνη) είναι η πιο πολυπληθής μη πρωτεϊνική, χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη που βρίσκεται στα κύτταρα (Dringen, 2000). Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που σχηματίζεται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη, και γλουταμινικό οξύ και απαντάται είτε ως μονομερές στην ανηγμένη του μορφή, είτε ως δισουλφιδικό διμερές που σχηματίζεται κατά την οξείδωση του (GSSG). Η GSH δεν αποτελεί μόνο αναγωγικό συστατικό και το κυριότερο αντιοξειδωτικό των κυττάρων αλλά



παράλληλα μεσολαβεί πλήθος φυσιολογικών αντιδράσεων, όπως η κυτταρική σηματοδότηση (Franco et al, 2007). Στις βιολογικές λειτουργίες της GSH συμπεριλαμβάνονται η ρύθμιση της αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η ρύθμιση του κυτταρικού εντοπισμού της γλουταθειόνης, η γλουταθειονυλίωση ηλεκτρόφιλων συστατικών και η γλουταθειονυλίωση πρωτεϊνών. Την γλουταθειόνη την συναντούμε περισσότερο στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Ο λόγος GSH/GSSG χρησιμοποιείται ως δείκτης του οξειδωτικού στρες.

Την ανηγμένη γλουταθειόνη την συναντούμε και ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Αναφορικά μερικά παραδείγματα είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Επίσης, είναι σημαντικός ο ρόλος της στην λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμη μια ιδιότητα της είναι ο μεταβολισμός των φαρμάκων και του ασβεστίου. Τέλος συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.



**Εικόνα 1.13:** Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

### 1.3 Ψυχανθή της οικογένειας *Leguminosae*

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από δύο υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Phaseolus vulgaris* και *Lathyrus laxiflorus*.

Το γένος *Phaseolus* έχει 50 είδη φυτών τα οποία προέρχονται από την Αμερική. Το *Phaseolus* ευδοκίμει σε θερμές περιόδους του έτους και δεν αντέχει στον παγετό. Είναι ετήσιο φυτό, αν και πολλές φορές στην άγρια μορφή του συναντάται και ως πολυετές.

Τα διάφορα καλλιεργούμενα είδη φασολιού, σύμφωνα με τη σπουδαιότητά τους, είναι τα εξής:

- *Phaseolus vulgaris*
- *Phaseolus coccineus*
- *Phaseolus Lunatus*
- *Phaseolus acutifolius* var. *lutifolius*

Το πιο χαρακτηριστικό από όλα είναι το *Phaseolus vulgaris* το οποίο είναι ένα ετήσιο φυλλώδες ετήσιο φυτό και φτάνει τα 2 μέτρα ύψος. Οι βλαστοί του *Phaseolus vulgaris* είναι ποώδεις, όρθιας αναπτύξεως, κυλινδρικού σχήματος και ισχυρώς διακλαδιζόμενοι. Η επιμήκυνση του βλαστού σταματάει με το σχηματισμό της κορυφαίας ταξιανθίας και το ύψος τους μπορεί να φτάσει στα 30 – 60 cm. Ο καρπός είναι λοβός, μήκους 8 – 20 cm και πλάτους 0,6 – 2,0 cm, με διατομή κυλινδρική ή πλατιά. Το χρώμα του είναι πράσινο και φέρει 4-9σπόρους (Σπάρτση et al 1987).



**Εικόνα 1.14:** Πόα *Phaseolus vulgaris*

Το γένος *Lathyrus* έχει 160 είδη και αναπτύσσεται στην Ευρώπη, στην Αμερική, Αφρική και Ασία. Είναι φυτά αναρριχητικά, ετήσια, με χαρακτηριστικά στενόμακρα φυλλάρια. Ο βλαστός και ο μίσχος των φύλλων έχουν πτερύγια. Είναι ανθεκτικά στην ξηρασία, στη ζέστη, αλλά και στη χαμηλή θερμοκρασία μέχρι  $-10^{\circ}\text{C}$ . Όλα τα μέρη του λαθουριού περιέχουν μια τοξική ουσία που λέγεται λαθυρίνη, η οποία προκαλεί την ασθένεια λαθυρισμό σε ανθρώπους και ζώα, όταν καταναλώσουν μεγάλες ποσότητες. Το *Lathyrus laxiflorus* είναι μη εδώδιμο ενώ το *Lathyrus clymenum* (φάβα) είναι εδώδιμο. (Σπάρτση et al, 1987).



**Εικόνα 1.15:** Πόα *Lathyrus laxiflorus*

## 1.4 Σκοπός του πειράματος

Στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων μερικών φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε ανθρώπινα φυσιολογικά μονοκύτταρα περιφερικού αίματος. Χρησιμοποιήθηκαν 2 υδατικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από υπέργεια τμήματα των φυτών *Phaseolus vulgaris* και *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*. Τα εκχυλίσματα αυτά, έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ότι έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για την επίτευξη του στόχου μελετήθηκε η δράση των φυτικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα όταν βρίσκονται υπό την επίδραση ενός οξειδωτικού παράγοντα.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- ▣ Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), Sigma-Aldrich
- ▣ DTNB (5,5' δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ), Sigma-Aldrich
- ▣ NADPH
- ▣ Tert-Butyl hydroperoxide solution (70% w/v) (tBOOH) ,Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

#### 2.1.1 Υλικά καλλιέργειας μονοκύτταρων περιφερικού αίματος

- ▣ Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, Gibco (Paisley, Scotland, UK)
- ▣ Εμβρυϊκός βόειος ορός FBS Gibco, (Paisley, Scotland, UK)
- ▣ Διάλυμα Ficoll 1mg/ml, Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA)
- ▣ Διάλυμα αντιβιοτικών/ αντιμικροβιακών, Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA)
- ▣ Διάλυμα χρωστικής trypan blue (0,4%), Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA)
- ▣ Διάλυμα φωσφορικών PBS (0,01M), Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA)

### 2.2 Εκχυλίσματα

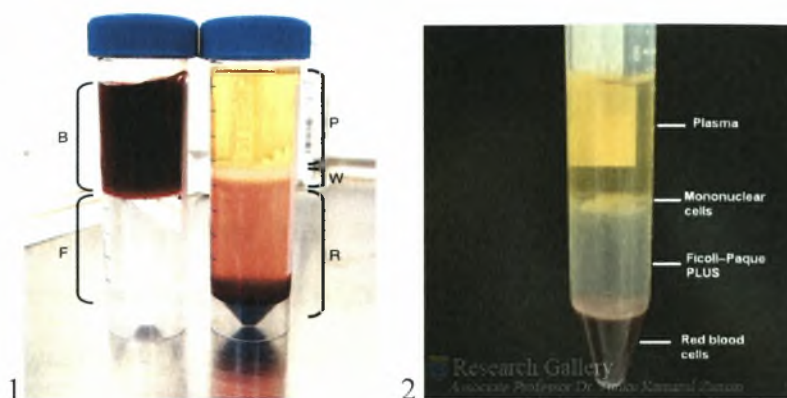
Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο υδατικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* και *Phaseolus vulgaris*. Τα υπέργεια τμήματα των φυτών αφού αποξηραθήκαν, κονιοποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ακολούθησε εκχύλιση με νερό (2: 1 v/v) σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε εκχύλιση επαναλήφθηκε τρεις φορές για 48 ώρες εκχύλιση. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, και τα υπολείμματα διαλύθηκαν στη συνέχεια σε νερό.

## 2.3 Μέθοδοι

### 2.3.1 Απομόνωση μονοκυττάρων περιφερικού αίματος

Για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά 10 ml ολικού περιφερικού αίματος συλλέγεται σε ηπαρινισμένη σύριγγα ώστε να παρεμποδιστεί η πήξη του αίματος. Τα μονοκύτταρα απομονώνονται με τη βοήθεια του διαχωριστικού μέσου Ficoll, προσθέτοντας ίση ποσότητα αίματος με αυτή του Ficoll. Πιο αναλυτικά 10 mL ηπαρινισμένου αίματος προστίθενται προσεκτικά πάνω σε 10 mL Ficoll. Η προσθήκη του αίματος γίνεται σταγόνα σταγόνα πάνω από το Ficoll για να αποφευχθεί ανάμειξη του αίματος με το Ficoll το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Μετά το επιτυχημένο στρώσιμο του αίματος ακολουθεί φυγοκέντρηση η οποία διαρκεί 20 min στα 400 g στους 20°C. Η επιτάχυνση και το φρένο της φυγοκέντρησης είναι στο 0 ώστε να μην υπάρχει ανάμειξη του αίματος με το Ficoll. Μετά τη φυγοκέντρηση το ημίλευκο στρώμα ανάμεσα στο πλάσμα και το στρώμα των ερυθροκυττάρων και του Ficoll αποτελεί το στρώμα των μονοκυττάρων (Εικόνα 2.1). Το στρώμα των κυττάρων συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και προστίθεται σε 10 mL θρεπτικού μέσου RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS με 10% ορό. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση στα 400 g για 20 min στους 20°C σε κανονικό φρένο και επιτάχυνση. Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 20 mL του παραπάνω θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Στην συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 h σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.



**Εικόνα 2.1:** 1) (B) Το ευδιάκριτο στρώμα του αίματος και (F) το στρώμα με το Ficoll. Μετά από τη φυγοκέντριση, πρέπει να υπάρξουν ευδιάκριτα στρώματα όπως φαίνεται (από το κατώτατο σημείο προς την κορυφή) παρατηρούμε: κόκκινα κύτταρα αίματος και Ficoll (R), Στρώμα μονοκυττάρων (άσπρο στρώμα)-(W), πλάσμα με τα αιμοπετάλια (P)).

2) Ο διαχωρισμός των στρωμάτων (από το κατώτατο σημείο προς την κορυφή) κύτταρα αίματος, Ficoll, μονοκύτταρα, πλάσμα αίματος.

### 2.3.2 Μελέτη της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων

Για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα παρουσία οξειδωτικού παράγοντα αρχικά εκτιμήθηκε κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων στα κύτταρα.

Μετά από την απομόνωση και την 24 ωρών επώαση των μονοκυττάρων, τα κύτταρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο με τη χρήση πλάκας τύπου Neubauer. Αριθμός  $2 \times 10^6$  κύτταρων προστέθηκαν σε κάθε θέση μιας 24-θέσεων πλάκας καλλιέργειας κυττάρων. Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε μετά από 4 ώρες επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων (2, 5, 10, 50, 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Όλα τα πειράματα για τη δοκιμή της επίδρασης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό FBS. Οι θέσεις που περιείχαν μόνο κύτταρα σε θρεπτικό υλικό αποτελούσαν τους αρνητικούς μάρτυρες. Μετά από την επώαση ακολούθησε μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων με τη χρήση πλάκας τύπου Neubauer αφού είχαν χρωματιστεί τα νεκρά κύτταρα προηγουμένως με τη χρωστική Trypan Blue. Η κυτταροτοξική επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε ως μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων έναντι του αριθμού των κυττάρων στον

αρνητικό μάρτυρα. Η δράση των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων εξετάστηκε εις τριπλούν σε δύο πειραματικές διαδικασίες.

### **2.3.3 Μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της γλουταθειόνης υπό την παρουσία οξειδωτικού παράγοντα**

Για την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στο σύστημα της γλουταθειόνης παρουσία οξειδωτικού παράγοντα εκτιμήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων. Ως οξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το t-BOOH το οποίο είναι ένα οργανικό υπεροξείδιο που χρησιμοποιείται ευρέως σε ποικίλες διαδικασίες οξείδωσης και ειδικότερα για την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Το t-BOOH είναι ηπατοτοξικός παράγοντας που χρησιμοποιείται συχνά και ως πρότυπο για τη μελέτη του μηχανισμού των κυτταρικών αλλαγών ως αποτέλεσμα της δράσης ελευθέρων ριζών.

Μετά από την απομόνωση και την 24-ωρών επώαση των μονοκυττάρων, τα κύτταρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο με τη χρήση πλάκας τύπου Neubauer. Αριθμός  $8 \times 10^6$  κύτταρων προστέθηκαν σε κάθε θέση μιας 24-θέσεων πλάκας καλλιέργειας κυττάρων. Η αξιολόγηση της δράσης των εκχυλισμάτων στην επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα πραγματοποιήθηκε σε δυο μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις και των δύο εκχυλισμάτων (5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το *Lathirus laxiflorus* και 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  για τα *Phaseolus vulgaris* αντίστοιχα).

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με 80  $\mu\text{M}$  t-BOOH και τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Μετά από την επώαση τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, και το ίζημα των κυττάρων ξεπλύθηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 3000 g για 5 λεπτά σε 4°C με 1 ml PBS (0,01 M, pH 7,4). Το ίζημα επαναιωρήθηκε στη συνέχεια σε 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.01 M, pH 7,4) και ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους για 1 λεπτό με διαστήματα 10 sec, και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 15 λεπτά στους 4°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο του



Bradford και για την αξιολόγηση των δεικτών οξειδωτικού στρες. Εν συντομία, οι συγκεντρώσεις της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) αξιολογήθηκαν. Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης έγινε αμέσως, ενώ για τις άλλες μετρήσεις τα υπερκείμενα πάγωσαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και αποθηκεύτηκαν μέχρι την ανάλυση.

Όλα τα πειράματα για τη δοκιμή της επίδρασης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό FBS. Οι θέσεις που περιείχαν μόνο κύτταρα σε θρεπτικό υλικό αποτελούσαν τους αρνητικούς μάρτυρες. Ακόμη μελετήθηκε και η δράση των εκχυλισμάτων στους δείκτες και απουσία του οξειδωτικού παράγοντα. Η δράση των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων εξετάστηκε εις τριπλούν σε δύο πειραματικές διαδικασίες.

## **2.4 Εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford**

Για την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford και ο υπολογισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης. Η ποσότητα πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί με τον καθορισμό του ποσού χρωστικής ουσίας στην μπλε ιοντική μορφή.

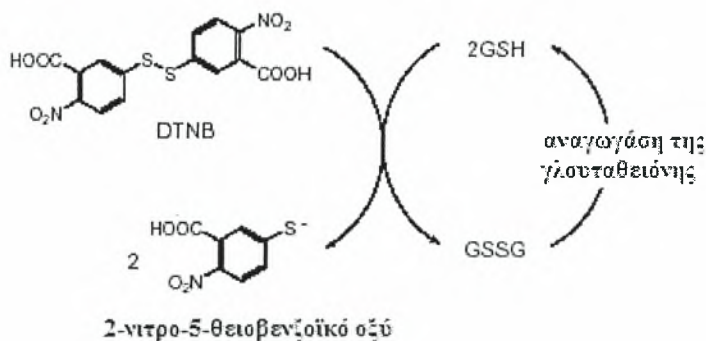
Για τον προσδιορισμό της καμπύλης της αλβουμίνης προετοιμάστηκαν διαλύματα αλβουμίνης με συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Έπειτα από ελαφρά ανακίνηση των δειγμάτων ακολουθεί επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Κατόπιν γίνεται η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Για τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των

δειγμάτων 20  $\mu\text{L}$  προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

#### 2.4.1 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης στα δείγματα κυτταροπλασματικού αιωρήματος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο (Tieze 1969). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH στηρίζεται στην οξείδωση της GSH που βρίσκεται στο κυτταροπλασματικό αιώρημα από το 5,5'-δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Όταν αντιδρά η GSH με το DTNB παράγεται GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, με βάση την παρακάτω αντίδραση. Το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412 nm.



**Εικόνα 2.2:** Οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης σε οξειδωμένη με ταυτόχρονη μετατροπή του δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ.

Πιο συγκεκριμένα για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της GSH στα δείγματα η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 520  $\mu\text{L}$  67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 8), 150  $\mu\text{L}$  κυτταροπλασματικού αιωρήματος και 330  $\mu\text{L}$  διαλύματος DTNB 1 Mm. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι για 45 min. Στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση της οπτικής

απορρόφησης στα 412nm. Ως τυφλό ήταν τα δείγματα που δεν περιείχαν κυτταροπλασματικό αιώρημα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης του δείγματος εκφράζεται ως nmol ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Για την μέτρηση χρειάζονται >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης για το προς εξέταση δείγμα.

Σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο γίνονται οι υπολογισμοί:

$$\text{nmol GSH/ mg πρωτεΐνης} = [((A_{\delta} - A_0)/13,6) \times 6,6 \times 1000]/C_{\delta}$$

$A_{\delta}$  → αφορά την μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

$A_0$  → αφορά την μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

$\epsilon_{\text{GSH}}$  (mmol/L) → το 13,6 είναι ο συντελεστής της μοριακής απόσβεσης της GSH.

Τιμή 6,6 → είναι ο συντελεστής της αραιώσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/ \mu\text{L αιωρήματος}$  [1000  $\mu\text{L}$  /150  $\mu\text{L}$ ]).

Τιμή 1000: → χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή των mol/L σε  $\mu\text{mol/mL}$ .

$C_{\delta}$  → είναι συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που εκτιμήθηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

#### 2.4.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης

Σύμφωνα με την ίδια αρχή εκτίμησης της συγκέντρωσης της GSH (Tieze 1969) γίνεται και ο προσδιορισμός της GSSG. Είναι έμμεσος προσδιορισμός και στηρίζεται στην αναγωγή της GSSG σε GSH μέσω της αναγωγάσης (ρεδουκτάσης) της γλουταθειόνης. Παράγεται GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ από την οξείδωση της GSH από το 5,5'-δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB), που είναι έγχρωμο προϊόν και παρουσιάζει οπτική απορρόφηση στα 412 nm.

Το 2-vinylpyridine χρησιμοποιείται στην αντίδραση το οποίο εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να εμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Έπειτα προστίθεται το NADPH για να μετατραπεί η GSSG του δείγματος σε GSH και για την δημιουργία του χρώματος.  $2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{GSSG} + \text{NADPH}$ .

Πιο αναλυτικά, σε 50  $\mu\text{L}$  κυτταροπλασματικού αιωρήματος (pH 7,4) προστίθενται 5  $\mu\text{L}$  αραιωμένου 1/100 διαλύματος 2-vinylpyridine. Ακολουθεί

επώαση των δειγμάτων για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 600  $\mu\text{L}$  143 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος 3 mM NADPH, 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος DTNB 10 mM, 189  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 10  $\mu\text{L}$  κυτταροπλασματικού αιωρήματος το οποίο έχει επωαστεί με το 2-vinylpyridine.

Σε θερμοκρασία δωματίου και για 10 λεπτά επωάζονται τα δείγματα για και έπειτα προστίθενται 1  $\mu\text{L}$  ενζύμου αναγωγής της γλουταθειόνης. Μετά την προσθήκη του ενζύμου ακολουθεί η μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm για 3 min. Ως τυφλό ήταν τα δείγματα που δεν περιείχαν κυτταροπλασματικό αιώρημα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν

Η εκτίμηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στα δείγματα προσδιορίστηκε μέσω πρότυπου δειγμάτων που περιέχουν 75  $\mu\text{L}$  διαλύματος οξειδωμένης γλουταθειόνης 10  $\mu\text{mol/L}$ .

Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο δείγμα εκφράζεται ως nmol ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Για την μέτρηση χρειάζονται >24 $\mu\text{g}$  απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης για το προς εξέταση δείγμα.

Σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο έγιναν οι υπολογισμοί:

$$\text{nmol GSSG/ mg πρωτεΐνης} = \{[(A_{\delta} - A_0) \times 0,75]/(A_{\pi} - A_0) \times 100\}/2\}/C_{\delta}$$

$A_{\delta}$  → αφορά την μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

$A_0$  → αφορά την μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

$A_{\pi}$  → είναι η μέση τιμή της απορρόφησης του πρότυπου δείγματος.

Τιμή 0,75 → καθορίζει την συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης του πρότυπου δείγματος  $\mu\text{mol/L}$  (nmol/mL)

Τιμή 100 → εκφράζει τον συντελεστή της αραίωσης του αιωρήματος ( $V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{L αιωρήματος}$  [1000  $\mu\text{L}$  /10  $\mu\text{L}$ ]).

Τιμή 2 → για τον συνυπολογισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (2 GSH → 1 GSSG)

$C_{\delta}$  → αφορά την συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που εκτιμήθηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

## 2.5 Υπολογισμοί

♦ Για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

% μείωση του αριθμού των κυττάρων = [(αριθμός κυττάρων του μάρτυρα – αριθμός κυττάρων του δείγματος) / αριθμός κυττάρων του μάρτυρα] \* 100

όπου ▪ μάρτυρας : Μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων του μάρτυρα

▪ δείγμα: κύτταρα μαζί με τα εκχυλίσματα

♦ Για τον υπολογισμό της προστατευτικής δράσης έγιναν οι παρακάτω υπολογισμοί:

▪ Για τον θετικό μάρτυρα tBooH

Για το εκχύλισμα μαζί με τον οξειδωτικό παράγοντα όσον αφορά την GSH & GSSG βρέθηκε η % διαφορά η οποία παρουσιάζεται ως εξής :

% Διαφορά = [(GSH και GSSG θετικού μάρτυρα – GSH και GSSG δείγματος) / GSH και GSSG θετικού μάρτυρα] \* 100

Όπου θετικός μάρτυρας → ο οξειδωτικός παράγοντας
--

δείγμα → τα κύτταρα μαζί με το εκχύλισμα και τον οξειδωτικό παράγοντα
---

♦ Για τον υπολογισμό της δράσης μόνο των εκχυλισμάτων στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

% Διαφορά = [(GSH και GSSG αρνητικού μάρτυρα – GSH και GSSG δείγματος) / GSH και GSSG αρνητικού μάρτυρα] \* 100

Όπου αρνητικός μάρτυρας → μόνο τα κύτταρα
---

δείγμα → τα κύτταρα μαζί με το εκχύλισμα
--

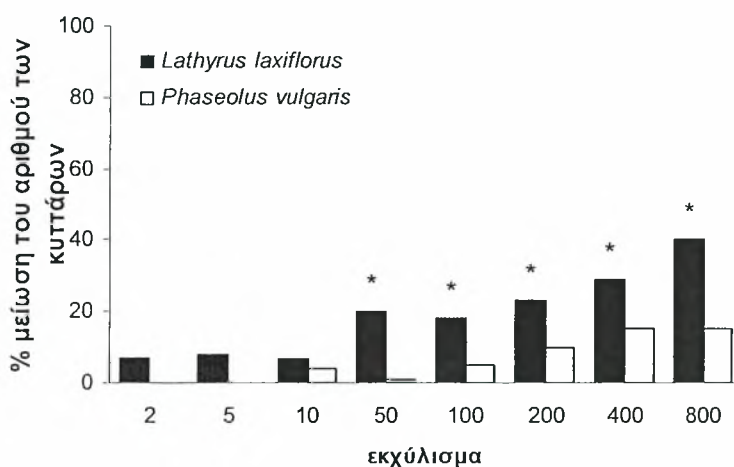
## **2.6 Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 13.0 και συγκεκριμένα μέσω δοκιμασία ομογένειας δύο ανεξάρτητων δειγμάτων Mann-Whitney. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για  $p < 0,05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων στα κύτταρα PBMCs προκύπτει ότι μόνο το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* στις 4 ώρες ήταν κυτταροτοξικό. Πιο συγκεκριμένα μείωσε τον αριθμό των κυττάρων κατά 20%, 18%, 23%, 29% και 40% στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  αντίστοιχα. Το εκχύλισμα του φυτού *Phaseolus vulgaris* στις ίδιες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε καμία κυτταροτοξική δράση.



**Γράφημα 1:** Κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων των φυτών *Lathyrus laxiflorus*, *Phaseolus vulgaris* στα PBMCs.

### 3.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα της γλουταθειόνης υπό την παρουσία οξειδωτικού παράγοντα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στο σύστημα της γλουταθειόνης υπό την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα χρησιμοποιήθηκαν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν 5 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* και 400 και 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για το εκχύλισμα *Phaseolus vulgaris* αντίστοιχα (Γράφημα 1).

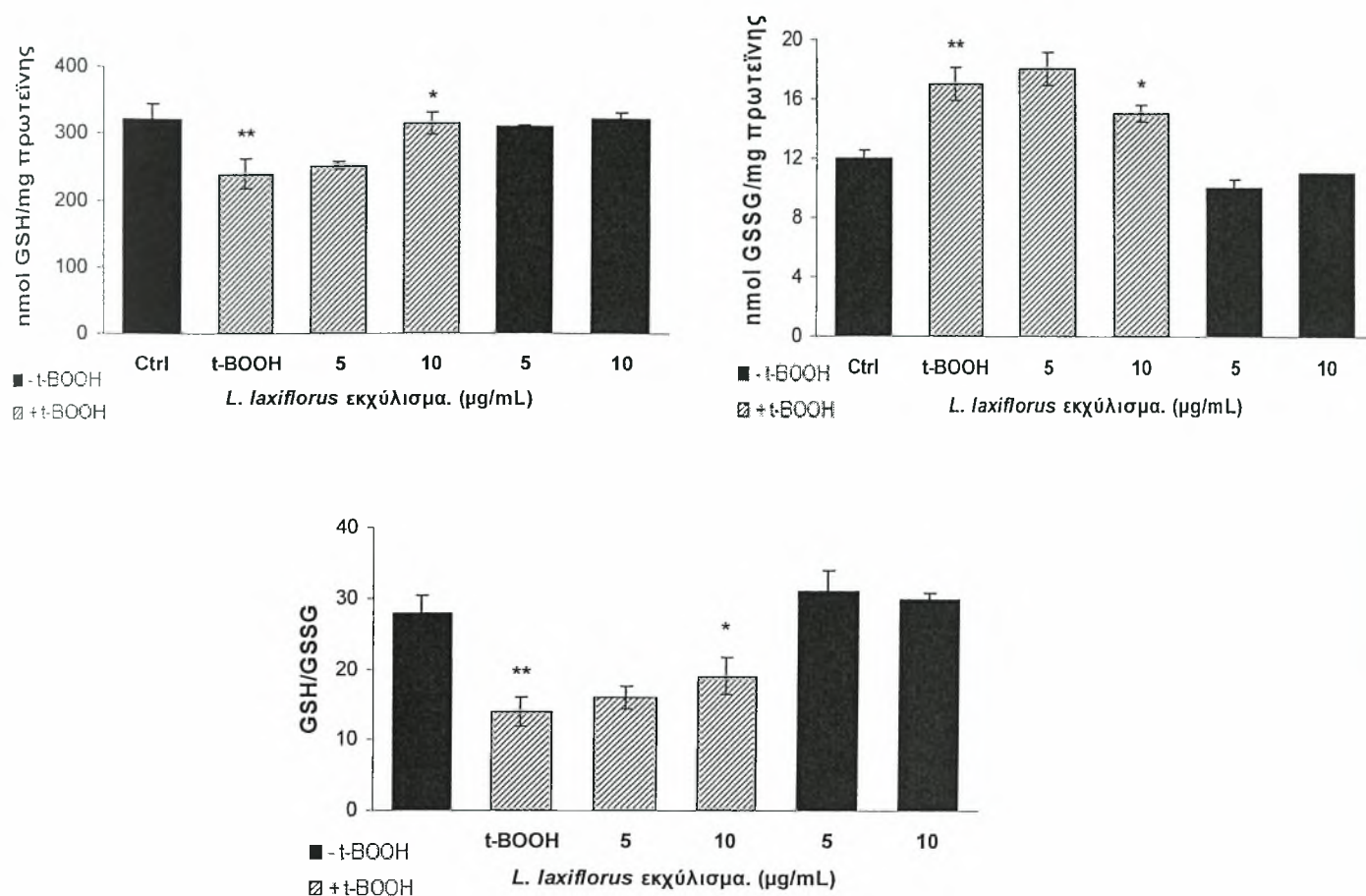
Η επώαση (2 ώρες) με τη συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH (80  $\mu\text{M}$ ) ήταν μη κυτταροτοξική και προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης της GSH και αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG κατά 26% και 43% αντίστοιχα σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις του αρνητικού μάρτυρα. Η αναλογία GSH/GSSG επίσης μειώθηκε κατά 50%.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι, το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* παρουσίασε προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στην επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στο σύστημα της γλουταθειόνης των κυττάρων. Πιο αναλυτικά στην συγκέντρωση 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 31% και μείωσε τα επίπεδα της GSSG κατά 15% σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του θετικού μάρτυρα (t-BOOH). Ο λόγος GSH/GSSG αυξήθηκε επίσης κατά 37% σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (Γράφημα 2).

Αντίθετα, το εκχύλισμα *Phaseolus vulgaris*, δεν παρουσίασε προστατευτική δράση. Αύξησε τα επίπεδα της GSSG κατά 33% σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα στη συγκέντρωση 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η συγκέντρωση της GSH και ο λόγος GSH/GSSG δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του εκχυλίσματος μαζί με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH (Γράφημα 3).

Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε επίδραση στο σύστημα της γλουταθειόνης όταν επώαστηκαν μόνα τους με τα κύτταρα (Γραφήματα 2,3).



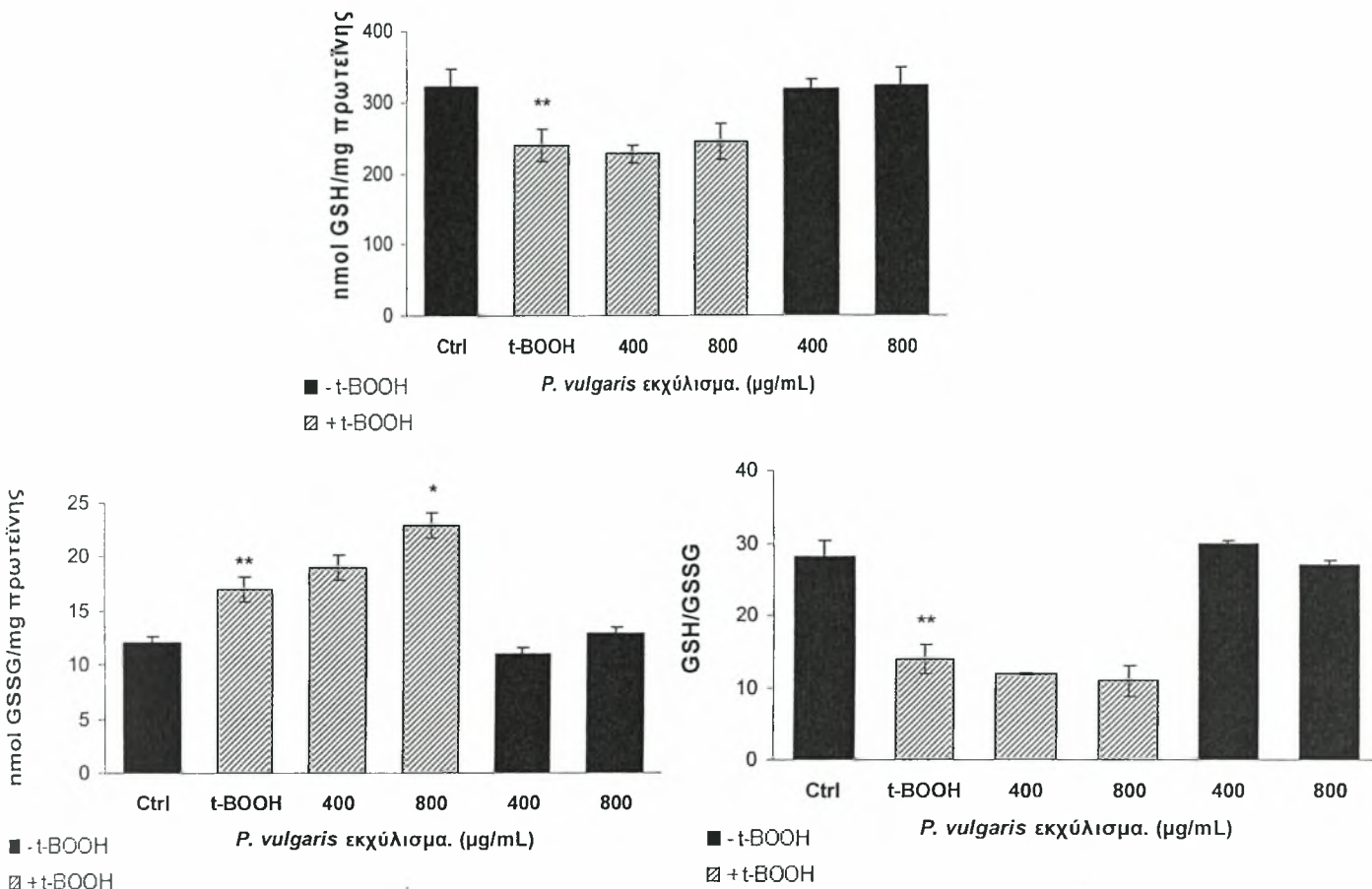


## Γράφημα 2:

**A:** Επίδραση του *L. laxiflorus* στο σύστημα της ανηγμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

**B:** Επίδραση του *L. laxiflorus* στο σύστημα της οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

**Γ:** Επίδραση του *L. laxiflorus* στον λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.



**Γράφημα 3:**

**A:** Επίδραση του *P. vulgaris* στο σύστημα της ανηγμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

**B:** Επίδραση του *P. vulgaris* στο σύστημα της οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

**Γ:** Επίδραση του *P. vulgaris* στον λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης υπό την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ως Μεσογειακή Διατροφή ορίζεται το είδος της διατροφής που χαρακτηρίζεται από χαμηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων, και αντίθετα από υψηλή κατανάλωση υδατανθράκων, που βρίσκονται κυρίως στα σιτηρά και τα προϊόντα τους, στα φρούτα, στα λαχανικά, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά. Τα όσπρια αποτελούν την δεύτερη πιο σημαντική κατηγορία εδώδιμων σπόρων μαζί με τα σιτηρά. Βρίσκονται στην βάση της Μεσογειακής πυραμίδας που πρέπει να καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα. Έχουν αναγνωριστεί για την υψηλή τους περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αποτελούν καλή πηγή αμύλου, φυτικών ινών, ιχνοστοιχείων όπως το Ca, Fe, K, Mg και Zn και έχουν μικρή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Επίσης περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυφαινόλων και φλαβονοειδών, ισοφλαβόνες και φαινολικά οξέα.

Στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων μερικών φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών έγινε η συγκεκριμένη εργασία. Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων ψυχανθών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε ανθρώπινα φυσιολογικά μονοκύτταρα αλλά και η επίδραση των εκχυλισμάτων σε αυτά τα κύτταρα υπό κατάσταση επίδρασης οξειδωτικού στρες. Για την επίτευξη του στόχου χρησιμοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από υπέργεια τμήματα των φυτών τα οποία είναι το *Phaseolus vulgaris* και το *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* είναι πιο κυτταροτοξικό σε σύγκριση με αυτό του *Phaseolus vulgaris*. Αυτό οφείλεται στο ότι τα εκχυλίσματα προέρχονται από διαφορετικά φυτά και έχουν διαφορετική σύσταση πολυφαινολικών ενώσεων. Έτσι ο συνδυασμός των πολυφαινολικών ενώσεων πιθανόν μέσα στο εκχύλισμα να είναι υπεύθυνος για την κυτταροτοξική του δράση.

Όσον αφορά το εκχύλισμα *Lathyrus laxiflorus* παρουσίασε προστατευτική δράση απέναντι στην επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στο σύστημα της γλουταθειόνης των κυττάρων. Πιο ειδικά στην συγκέντρωση 10 µg/mL αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 31% και μείωσε τα επίπεδα της GSSG κατά 15% σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του θετικού

μάρτυρα (t-BOOH). Ο λόγος GSH/GSSG αυξήθηκε επίσης κατά 37% σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (Γράφημα 2). Επειδή τα εκχυλίσματα επωάζονταν μαζί με τον οξειδωτικό παράγοντα η προστατευτική δράση που παρουσιάζει το εκχύλισμα μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των βιοδραστικών του ενώσεων να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες που παράγονται από τη δράση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH. Το *L. laxiflorus* μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει (Spanou et al,2007). Ωστόσο πρέπει να υπάρχει προσοχή στον ορισμό των δραστικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων γιατί παρότι το εκχύλισμα του φυτού *L. Laxiflorus* παρουσιάζει προστατευτική δράση είναι παράλληλα και κυτταροτοξικό σε συγκεντρώσεις >10 μg/mL.

Αντίθετα το εκχύλισμα *Phaseolus vulgaris*, δεν παρουσίασε προστατευτικές ιδιότητες αντίθετα προκάλούσε αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε συγκέντρωση 800 μg/mL, παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH). Η δράση αυτή μπορεί να οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση 800 μg/mL είναι σχετικά μεγάλη. Πιθανόν να υπάρχουν ουσίες στο εκχύλισμα που δρουν ως προοξειδωτικά. Έχει παρατηρηθεί ότι διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν προ-οξειδωτικές ιδιότητες σε υψηλές συγκεντρώσεις (Halliwell, 2007).

Η μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων και βιοδραστικών τους ενώσεων σε ποικίλα κυτταρικά συστήματα είναι πολύ σημαντική. Περαιτέρω επιστημονική έρευνα πρέπει να γίνει για να μπορέσουμε να αρχίσουμε με βάση την επιστήμη να παρέχουμε διατροφικές συστάσεις. Παρόλο αυτά υπάρχουν αρκετά ερευνητικά δεδομένα που προτείνουν κάποια τρόφιμα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις για κατανάλωση.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Anderson RL, Wolf WJ,(1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. J Nutr. 125: (Suppl):581S–588S.
- B.S. Kurlovich, S.I. Repyev, (1995), The gene bank and breeding of grain legumes, The N.I Vavilov Institute of Plant Industry, 111:438
- Cao et al., Cao G, Sofic E and Prior R. (1997), antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radic.Biol.Med. 1997;22: 749–760.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A, Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sciences, 4:337-353
- Dickson (2004), Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degenerations :cause or effect J Clin Invest, 114, 23-27,2004
- Dringen R. (2000), Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol 62 649- 671
- Duranti M, (2006), Grain legume proteins and nutraceutical properties, Filoterapia, 77:67-82
- Duranti M, Gius C, (2005) Grain legume proteins and nutraceutical properties, Field Crops Res 1997;53:31
- Elinder L.S., Walldius G. (1994), Antioxidants and atherosclerosis progression: unresolved questions,Curr. Opin. Lipidol. 1994;5:265-271.

- Foster-Powell K & Miller JB (1995) International tables of glycemic index, American Journal of Clinical Nutrition 62,871S-890S
- Franco R, Schoneveld O.J, Pappa A. And Panayiotidis M.I (2007). The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. Arch Physiol Biochem 113 (4/5), 234 -258
- Frei B. & Higdon J. V (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies;; J. Nutr. 133, 3275S
- Fresco P, et al. (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols;; Med. Res. Rev. 26, 747
- Geil PB & Anderson JW, (1994) ,Nutrition and health implications of dry beans: a review, Journal of the American College of Nutrition 13, 549-558.
- Gentile,C, Teseriere, L, Butera, D, Fazzari, M, Monastero, M, Allegra,M and Livrea ,M, 2007,A,Antioxidant Activity Sicilian Pistachio (Pistacia vera L. Var.Bronte),Nut extract and its Bioactive Components. J.Agric.Food.Chem. 55,643-648
- Hertog M.G., Kromhout D., Aravanis C, et al.,(1995),Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study.Arch. Intern. Med. 1995;155:381-388
- Golbitz P. (1995) Traditional soyfoods: processing and products. J Nutr. 125(Suppl):570S–572S

- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS(1995): Chemopreventin  
CA Cancer J Clin, 45: 31-49
- Halliwell B, (2001), Free radicals and other reactive species in disease,  
Encyclopedia of life sciences Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M.,  
Monastero, M., Allegra, M.
- Halliwell, B. (2007) Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your  
health? *Cardiovascular Research*, 73, 341–347
- Kromhout D., Aravanis C, et al.,(1995),Flavonoid intake and long-term risk of  
coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study.Arch. Intern. Med.  
1995;155:381-388.
- Hollman P.C.H., Katan M.B (1999), Dietary flavonoids: Intake, Health effects  
and Bioavailability,FoodChem. Toxicol. 1999;37:937-945
- Kampa M, ( 2007) Polyphenols and cancer cell growth:, et al.; Rev.Physiol.  
Biochem. Pharmacol. 159,79
- Kao PC, P'eng FK. (1995 ) How to reduce the risk factors of osteoporosis in  
Asia.Chin Med J. 55:209 –213.
- Keys A, Menotti A, Aravanis C, et al. (1984) The seven countries study: 2,289 deaths in  
15 years. Prev Med. 13:141–15
- Knight DC, Eden JA, (1996), A review of the clinical effects of  
phytoestrogens,Obstet Gynecol. 87:897–904.

- Lee, N. Koo, D.B. Min, (2003), Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Society*, 3:21-33
- Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. (2005) Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 2005;81(suppl):326S–9S.
- Messina M, (1999), Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects, *American Society for Clinical Nutrition*, 70:439-450
- Messina M.( 1995) Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J Nutr.* 125(Suppl):567S–569S.
- Morse MA, Stoner GC(1993): Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, 14:1737-1746
- Mylonas C., Kouretas D., (1999), Lipid Peroxidation and tissue Damage, *In Vivo*, 13:295-310
- Nichenametla S.N., Taruscio T.G, Barney D.L, Exon J.H, (2006), A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:161-183
- Ortega RM, (2006), Importance of functional foods in the Mediterranean diet, *Public Health Nutrition*: 9(8A), 1136–1140
- Pannala S, Chan T, O'Brien P and Rice-Evans C. (2001) Flavonoid B-ringchemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001; 282: 1161–1168



- Ramos S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention.; J. Nutr. Biochem. 18,427
- Rose DP, Boyar AP, Wynder EL. (1986) International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate and colon, and per capita food consumption. Cancer. 58:2363–2371
- Sauer J.D. (1993). Historical geography of crop plants - a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45:287-306
- Simopoulos, (2001), The Mediterranean Diets: What is so special about the diet of Greece ? The scientific evidence, Am.Soc. Nutr. Sc. 2001; (suppl): 3065S-71S. Simopoulos P. A., MD.
- Shankar S, et al , (2007 ), Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer.; Front. Biosci. 12, 4881
- Slimestad R, et al (2007) Onions: a source of unique dietary flavonoids.; J. Agric. Food Chem. 55, 10067
- Spanou, C., Stagos, D., Tousias, L, Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Kouretas, D. (2007). Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of *Leguminosae* plants using *in vitro* assays. Anticancer Research, 27:3403-10.
- Zava DT, Duwe G. (1997) Estrogenic and antiproliferative properties and other flavonoids in human breast cancer cells in vivo. Nutr Cancer. 27:31– 40.

- Yang C.S., Landau J.M , Huang M, Newmark H, (2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, Annual Review of Nutrition, 21:381-406
- Vasilopoulou E, Georga K, Bjoerkov M, Joergensenb A, Naska and Trichopoulou A, (2005), The Antioxidant Properties of Greek Foods and the  
●Flavonoid Content of the Mediterranean Menu, Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents, 2005, 5, 33-45
- Webb A., McCullough M, (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, Nutrition and Cancer, 51:117-131
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al. (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst. 85:1819 –1827
- Δημητράκη Κ. (1982). Πρακτική Λαχανοκομία. Potamitis Press, Αθήνα
- Καφάτος Α., Διακάτου Α., Βουκυκλάρης Ε. Γ, κ.α.(1997),Μεταβολές παραγόντων κινδύνου και διατροφής στους επιζώντες της μελέτης των Επτά Χωρών στην Κρήτη (1960-61).» Ελλ. Καρδ. Επιθ.;37(suppl A):A81-A83.
- Καφάτος Α., Διακάτου Α., Βουκυκλάρης Ε. Γ., κ.α.,(1997), Μεταβολές παραγόντων κινδύνου και διατροφής στους επιζώντες της μελέτης των Επτά Χωρών στην Κρήτη (1960-61).» Ελλ. Καρδ. Επιθ.;37(suppl A):A81-A83.