

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής
και περιβάλλοντος

Διπλωματική Εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ GOJI BERRY ΤΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ CHINENSIS ΚΑΙ BARBARUM

STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF AQUEOUS
AND METHANOLIC EXTRACTS FROM GOJI BERRY FRUIT OF CHINENSIS AND
BARBARUM VARIETIES

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ Κ. ΚΑΡΚΑΝΤΑ
Διαιτολόγος-Διατροφολόγος



ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (Επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικοογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ Λάρισας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία, όπως επίσης και για όσα πολύτιμα μου δίδαξε.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα ο οποίος είναι και Δ/ντής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών στο οποίο παραγματοποιήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, για την συνεχή υποστήριξη του στα εργαστηριακά πειράματα.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωνσταντίνο Πετρωτό για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια του και για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να στηρίξει την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών με ταυτόχρονη ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Έτσι καθίσταται αναγκαία η εύρεση νέων αντιοξειδωτικών ουσιών που θα μπορούν να λαμβάνονται ως συμπληρώματα διατροφής ασκώντας προστατευτική δράση. Η δημοτικότητα του καρπού Goji Berry αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς στις μέρες μας στην Ελλάδα και υπάρχει επίσης αυξανόμενη ζήτηση από τη βιομηχανία τροφίμων για τα εκχυλίσματα Goji Berry υψηλής φυτοχημικής αξίας, δηλαδή με σαφείς ιατρικές και λειτουργικές ιδιότητες που μπορούν να παραχθούν με τη χρήση ‘πράσινων διαδικασιών’ για εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Γι’ αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση υδατικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων από τον καρπό Goji Berry των ποικιλιών Chinnensis και Barbarum. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων Goji Berry ποικιλιών Chinnensis και Barbarum εξετάσθηκε μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH και μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS. Στη συνέχεια εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των υδατικών εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Τέλος, στην μυκή κυτταρική σειρά C2C12 εξετάσθηκαν οι επιδράσεις του δείγματος με την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση δηλαδή το δείγμα 5 στα επίπεδα της GSH και των ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•] (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 51 µg/ml έως 4650 µg/ml) και με τη ρίζα ABTS⁺⁺ (το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 180 µg/ml και 1100 µg/ml). Επίσης, τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 690 µg/ml έως 6900 µg/ml. Τέλος, στην μυκή κυτταρική σειρά C2C12 τα επίπεδα της γλουταθειόνης έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα 5 αυξήθηκαν σημαντικά έως και 189,5% ενώ τα επίπεδα των ROS δεν επηρεάστηκαν.

ABSTRACT

Oxidative stress is a condition in which there is an increased production of free radicals with concomitant deficiency of antioxidant body mechanisms. Thus, it is necessary to find new antioxidants that can be taken as a dietary supplement exerting a protective action. The popularity of Goji Berry fruit grows rapidly these days in Greece and there is also a growing demand from the food industry for Goji Berry extracts with high phytochemical value, with medical and functional properties that can be produced by the use of 'green processes' for applications in the food industry. For this reason, in the present study we investigated the antioxidant and antimutagenic activity of aqueous and methanolic extracts from the Goji Berry fruit and specifically from the varieties *Chinensis* and *Barbarum*. The assessment of antioxidant activity of the extracts was tested through the interaction with the radicals DPPH and ABTS. Then it was tested the antimutagenic activity of the aqueous extracts against DNA damage that is caused by free radicals. Finally, in the muscle cell line C2C12, it was examined the effects of the sample with the most potent antioxidant and antimutagenic activity (sample 5) on the GSH and ROS levels with flow cytometry. The results showed that all the extracts exhibited a significant ability to scavenge DPPH[•] radical (the range of IC₅₀ values was from 51 µg/ml to 4650 µg/ml) and ABTS^{•+} radical (the range of IC₅₀ values was from 180 µg/ml to 1100 µg/ml). Also, the tested extracts inhibited dose-dependently the induction of breakage in the plasmid DNA caused by ROO[•] radicals (the range of IC₅₀ values was from 690 µg/ml to 6900 µg/ml). Finally, in the muscle cell line C2C12, the levels of GSH after incubation with extract 5 were increased significantly up to 189.5%, while ROS levels remained unaffected.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

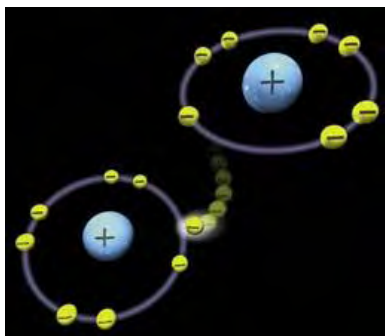
1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.1.1 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	8
1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	10
1.3 Οξειδωτικό στρες.....	11
1.4 Το φυτό Goji berry και οι ευεργετικές του επιδράσεις του καρπού του στην υγεία του ανθρώπου.....	14
1.5 Σύγχρονη έρευνα και αξιοποίηση του goji berry	15
1.6 Φυτικές πολυφαινόλες.....	18
1.6.1 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών.....	18
1.6.2 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών.....	20
1.6.2.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση.....	21
1.6.2.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών.....	24
1.6.2.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών.....	25
1.7 Σκοπός του πειράματος.....	25
2.Υλικά και μέθοδοι.....	26
2.1 Υλικά.....	26
2.1.1 Πλασμιδιακό DNA.....	26
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	26
2.1.3 Εκχυλίσματα.....	28
2.1.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH.....	32
2.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ^{•+}	34
2.1.6 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA	35
2.1.6.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες ROO [•]	37
2.1.6.1i Αρχή της μεθόδου.....	38
2.1.6.1.ii Πειραματική διαδικασία.....	38
2.1.6.1. iii Στατιστικά ανάλυση.....	41
2.1.7 Μυϊκά κύτταρα C2C12.....	41
2.1.7.1. Μέθοδοι	42
2.1.7.1.i Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)	42
2.1.7.1.ii Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων Goji Berry στα επίπεδα γλουταθειόνης	42

2.1.7.1.iii Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης με τη μέθοδο XTT.	44
2.1.7.1iii a Αρχή της μεθόδου	44
2.1.7.1iii b Πειραματική διαδικασία	44
2.1.7.2 Κυτταρομετρία Ροής	45
2.1.7.2.i Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών	48
3. Αποτελέσματα.....	49
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ποικιλίες καρπών του φυτού Goji Berry μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH.....	49
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ποικιλίες καρπών του φυτού Goji Berry μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ⁺	57
3.3 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων από ποικιλίες καρπών του φυτού Goji Berry στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζεςπεροξυλίου(ROOH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.....	65
3.4 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος 5 με τη μέθοδο του XTT.....	76
3.4.1 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής	77
3.4.2 Αποτελέσματα από τον Προσδιορισμό των επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής	80
4.Συζήτηση.....	83
5.Βιβλιογραφία.....	88

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστηριότητα (Εικόνα 2). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).

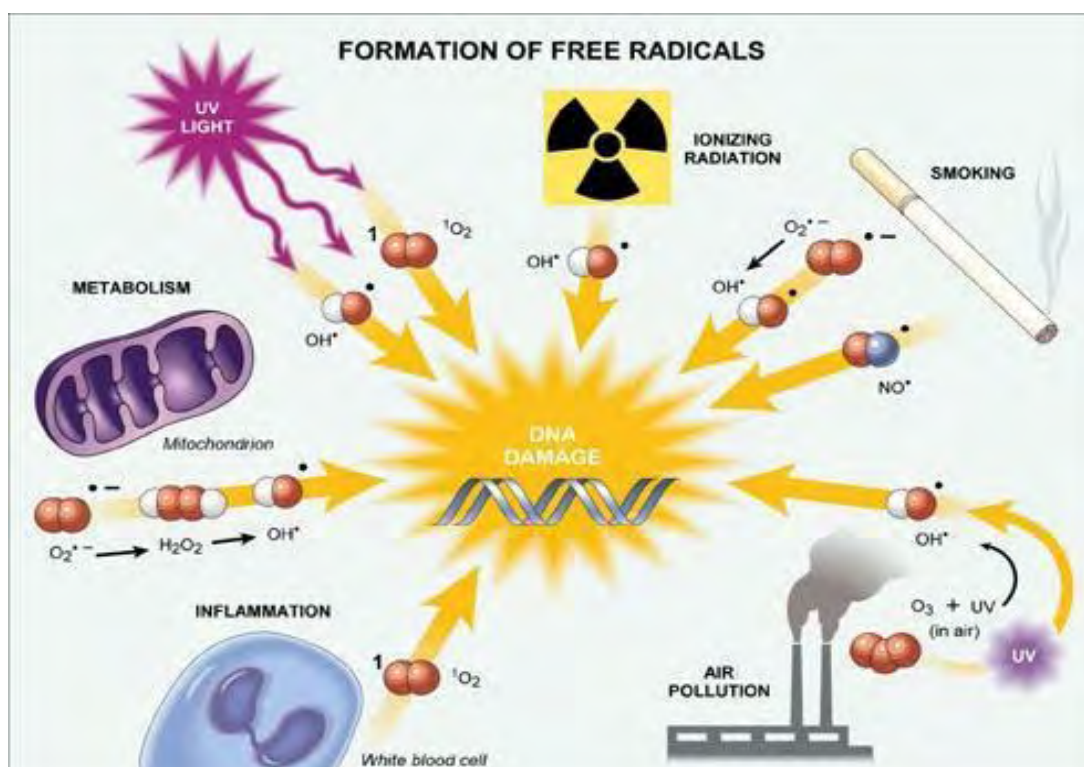


Εικόνα 2 Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

1.1.1 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, παλαίωσης των χρωμάτων, καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό [Halliwell B, 2001]. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από ρύπους της ατμόσφαιρας. (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές

λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

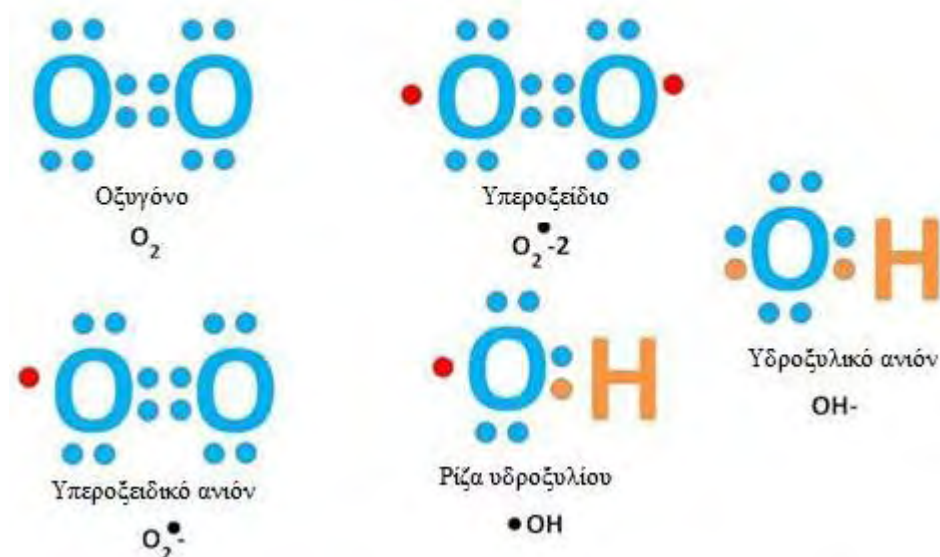


Εικόνα 3: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet), του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet) και οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις (εικόνα 4), που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl) (Halliwell 2001)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

● = Μονήρη ηλεκτρόνια



Εικόνα 4: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος [Halliwell B, 2001]. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών [Scalbert A. et al, 2005]. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν 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] (Εικόνα 5).



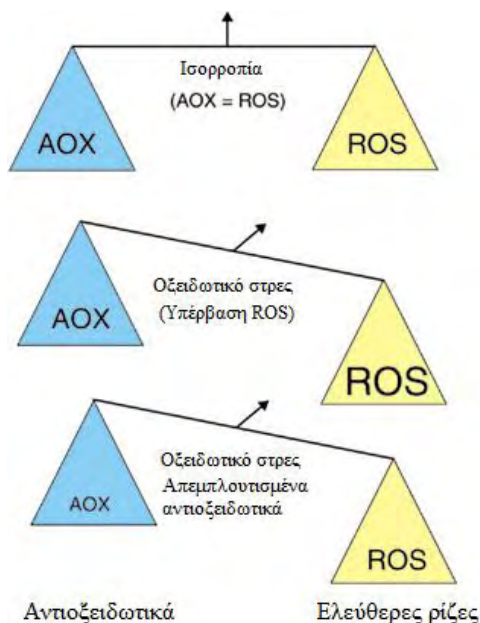
Εικόνα 5: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδοукτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q₁₀.

1.3 Οξειδωτικό στρες

Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 6) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).

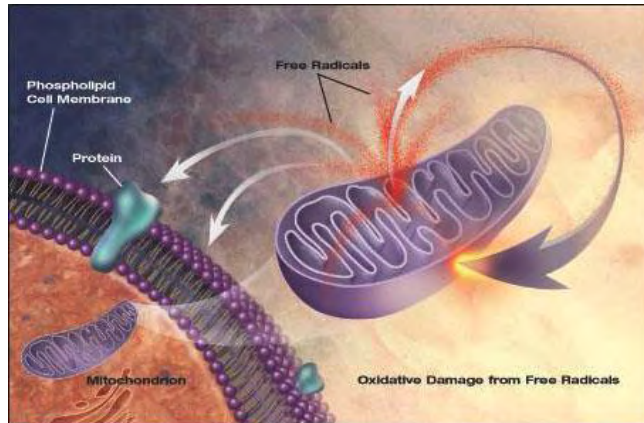


Εικόνα 6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

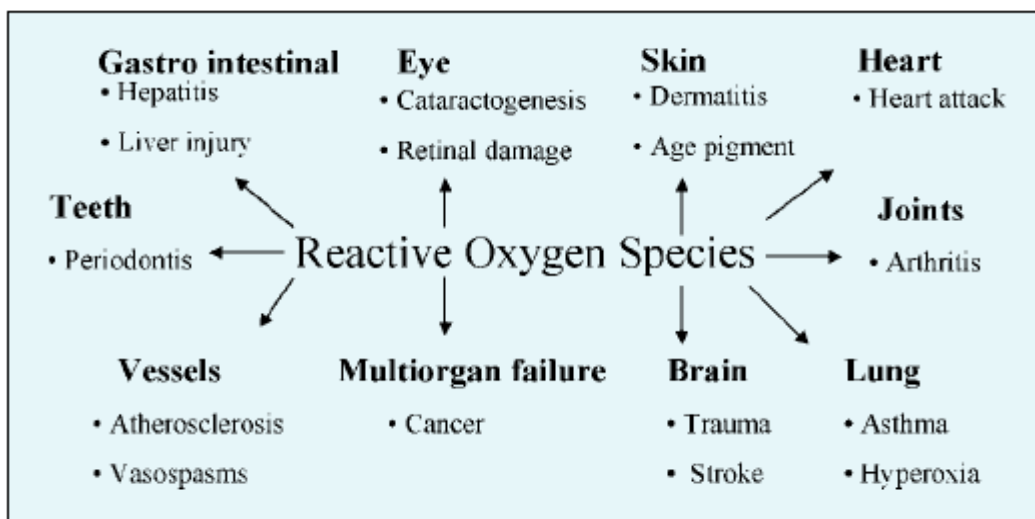
- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις με συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος. (Εικόνα 7). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται (Lyra et al, 1977). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πυρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D-ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



Εικόνα 7 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001), για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 8) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Toyokuni1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά.).



Εικόνα 8 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).

1.4 Το φυτό Goji berry και οι ευεργετικές του επιδράσεις του καρπού του στην υγεία του ανθρώπου.

Η επιμήκυνση του προσδόκιμου χρόνου ζωής και η υιοθέτηση του δυτικού βιομηχανοποιημένου τρόπου ζωής από τον σύγχρονο άνθρωπο έχει οδηγήσει στη μετάβαση του πληθυσμού προς γηραιότερες ηλικίες και συνεπώς στην επικράτηση ασθενειών όπως οι διάφοροι τύποι νεοπλασιών, οι εκφυλιστικές νόσοι κ.λ.π. Στο πλαίσιο αυτό έχει αρχίσει να γίνεται συνειδητή η ανάγκη αποδοχής ενός νέου τρόπου ζωής που θα περιλαμβάνει και την αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών που προέρχονται από φυσικές πηγές και έχουν θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι καρποί του φυτού Goji berry, ενός γνωστού και θαυμαστού για τις ιδιότητες του θαμνώδη δένδρου καταγόμενου από την Κίνα, που για πάνω από 2000 χρόνια η χρήση τους βρίσκει εφαρμογή στην Παραδοσιακή Κινεζική Ιατρική (TCM). Έχοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στην Ελλάδα αλλά και ειδικότερα στον θεσσαλικό χώρο ήδη καλλιεργείται ένας μεγάλος αριθμός δένδρων Goji berry κάνει επιτακτική την αξιολόγηση των εγχώριων καρπών καθώς και την αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών αυτών.

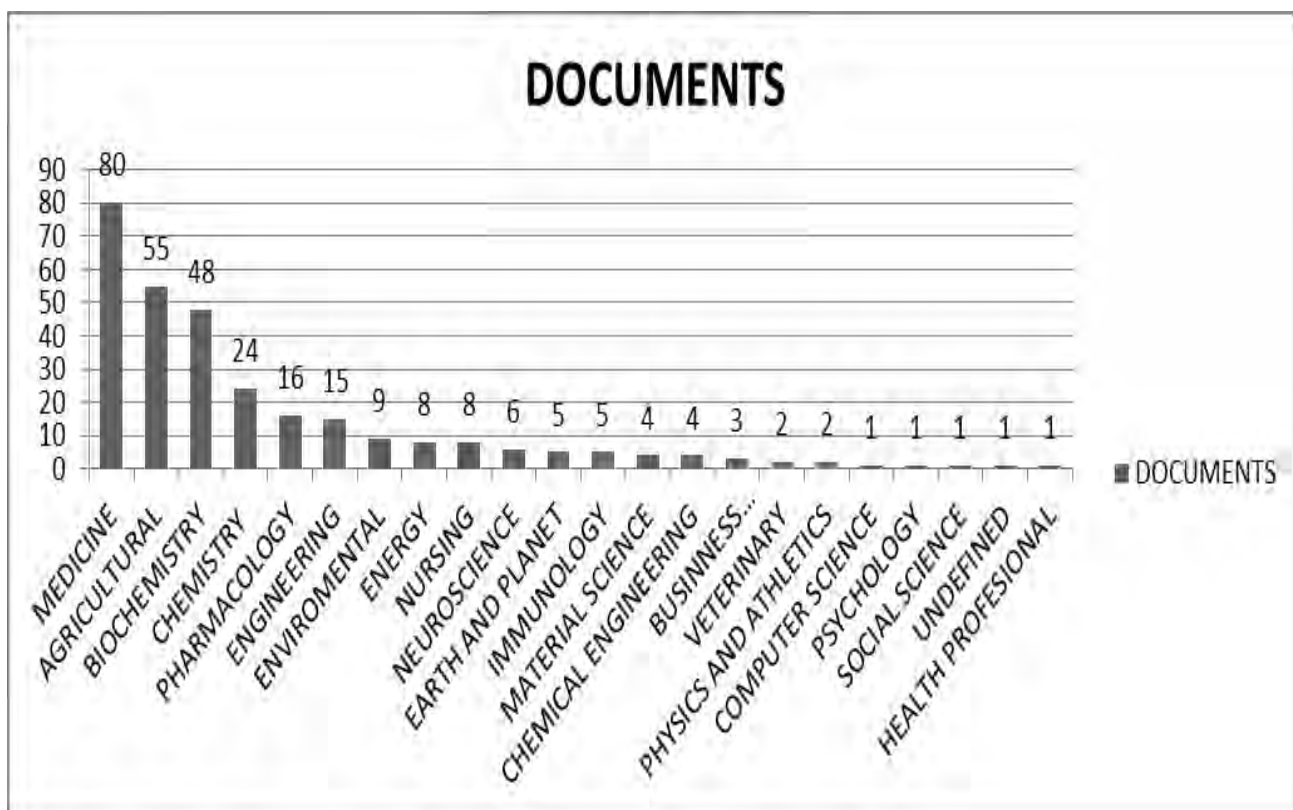
Οι ονομασίες Goji berry/Wolfberry/Gou-Qi-Zi είναι συνώνυμες για την περιγραφή των καρπών του Goji berry. Οι ονομασίες είναι κοινές και για τα δύο κύρια είδη του φυτού το *Lycium barbarum* (Ningxia gou qi) και *Lycium chinense* (gou qi) που ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae στην οποία επίσης ανήκουν οι πατάτες, οι ντομάτες, οι μελιτζάνες, οι καυτερές πιπεριές και το ταμπάκο. Η *L. Barbarum* καλλιεργείται στη βόρεια και βορειοδυτική Κίνα, κατά μήκος του κίτρινου ποταμού της επαρχίας Ningxia. Στην Ευρώπη επίσης έχει καταγραφεί ως αυτοφυές στη χλωρίδα της Γερμανίας, Αυστρίας και Ελβετίας χωρίς όμως να γίνεται αναφορά σε χρήση του καρπού (Thome O.W. 1985 Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz. Gera, Germany). Η καλλιέργεια του είδους *L. Chinense* είναι εξαπλωμένη στη νότια Κίνα, Ταϊλάνδη, το Νεπάλ, το Θιβέτ, το Πακιστάν και την Ευρώπη. (Wu Z. et al .2005). Τα άνθη του φυτού έχουν χρώμα μωβ ενώ οι καρποί έχουν λαμπερό πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα και το σχήμα τους είναι ελλειψοειδές με μήκος 1-2 cm. Στην πατρίδα τους, τα goji berry τρώγονται ωμά κατά την εποχή παραγωγής τους και μετά αποξηραμένα. Εκτός από τα φρούτα όμως, καταναλώνονται και τα φύλλα τους ως λαχανικά σε φαγητά και σαλάτες. Επίσης, τα φύλλα και ο φλοιός των δέντρων γίνονται αφέψημα. Η πρώτη αναφορά στις ιδιότητες του γίνεται το 200 π.χ. στο αρχαίο βιβλίο του μυθικού κινέζου αυτοκράτορα Shen Nong, Ben Cao Jing όπου εκεί αξιολόγησε και κατέταξε σε 3 κατηγορίες 356 βότανα. Τα goji berry συμπεριλήφθησαν μαζί με αλλά 119 στην πρώτη κατηγορία με την υψηλότερη βαθμολογία και θεωρούνταν ότι έχουν αξιοθαύμαστες

ευεργετικές ιδιότητες και ότι ήταν ακίνδυνα για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με το Shen Nong, Ben Cao Jing η μακροχρόνια κατανάλωση goji berry παρατείνει τη διάρκεια ζωής ενισχύοντας τον οργανισμό. Η δεύτερη αναφορά των goji berry στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική γίνεται τον 16^ο αιώνα στη συλλογή βιβλίων του Li Shi-Zhen που αποτελεί τον πρώτο οδηγό φαρμακοποιίας παγκοσμίως. Στον συγκεκριμένο οδηγό εκτός των καρπών (*Fructus Lycii*) αναφέρεται η χρήση και τμημάτων του φυτού όπως των λουλουδιών, των φύλλων και του φλοιού της ρίζας (*Cortex Lycii radices*). Η ευεργετική δράση σύμφωνα με την παραδοσιακή κινεζική ιατρική έχει να κάνει με την ικανότητά του να συμβάλλει στην ανάπλαση και τόνωση του ήπατος, των νεφρών, τη βελτίωση της λειτουργίας της όρασης και του jing (των βασικών στοιχείων που αποτελούν το ανθρώπινο σώμα και το διατηρούν στη ζωή) (Chinese Pharmacopoeia 2010). Εκτός της χρήσης του ως φάρμακο χρησιμοποιείται επίσης στην Κίνα και ως τρόφιμο με σκοπό την καλή διατήρηση της υγείας και επίσης ως καλλυντικό των μαλλιών και του δέρματος. Οι καρποί goji berry περιέχουν 21 ιχνοστοιχεία, 18 αμινοξέα, 6 βιταμίνες, 8 πολυσακχαρίτες 6 μονοσακχαρίτες, 5 ακόρεστα λιπαρά οξέα (συμπεριλαμβάνονται και τα απαραίτητα λιπαρά οξέα λινολενικό και α-λινολενικό οξύ), β-σιτοστερόλη και άλλες φυτοστερόλλες, 5 καροτενοειδή (διπαλμιτική ζεαξανθίνη(56%), μονοπαλμιτική ζεοξανθίνη, παλμιτική β-κρυπτοξανθίνη, β-καροτένη, ζεαξανθίνη). Τα περισσότερα αυτών ανήκουν στην κατηγορία των φυτοχημικών (phytochemicals) (Webb, 2006) και μπορούν να δρουν συνεργικά (Sze et al.,2008, Ορδούδη,2007, Μουρτζινός, 2007). Η περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά των καρπών goji berry εξαρτάται από το στάδιο της ωριμότητας του καρπού, την περιοχή και την περίοδο συλλογής του, καθώς επίσης και από τον τρόπο ξήρανσης (Ma et al., 2008). Επίσης η βιοδιαθεσιμότητα και οι θεραπευτικές ιδιότητες των goji berry και των προϊόντων αυτών είναι πιθανόν να επηρεάζονται από την μέθοδο της εκχύλισης και της ενσωμάτωσης αυτών σε ένα προϊόν.(Bucheli et al.,2011)

1.5 Σύγχρονη έρευνα και αξιοποίηση του goji berry

Από τη δεκαετία του '80 και μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών, προερχόμενες κυρίως από τον επιστημονικό χώρο της ιατρικής, έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των ευεργετικών δράσεων από την κατανάλωση των goji berry καθώς και των πολυσακχαριτών τους (*Lycium Barbarum Polysaccharides*), όπως φαίνεται και στο σχήμα 1. Αυτές μελέτησαν κυρίως τις αντιοξειδωτικές, και αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς και την επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ειδικότερα περιγράφουν ότι η κατανάλωση goji berry συμβάλλει στην προστασία του αμφιβληστροειδή χιτώνα των

ματιών(Liu et al. 1999), στην προστασία του ήπατος (Zhe et al. 1999), στη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος(Wang et al.1999, Chao et al. 2004, Amagase, et al.2009b) και τη μείωση της κόπωσης του οργανισμού (Amagase& Nance, 2008). Σε μία τελευταία μελέτη του 2011 έχει καταγραφεί ότι η κατανάλωση goji berry συμβάλλει στην καλή λειτουργία του οργανισμού προσδίδοντας του ιδιότητες όπως της αντιγήρανσης, της νευροπροστασίας, της προστασίας από το γλαύκωμα και τον διαβήτη και αντικαρκινικές (Amagase & Farnsworth, 2011a,Mao et al 2011).

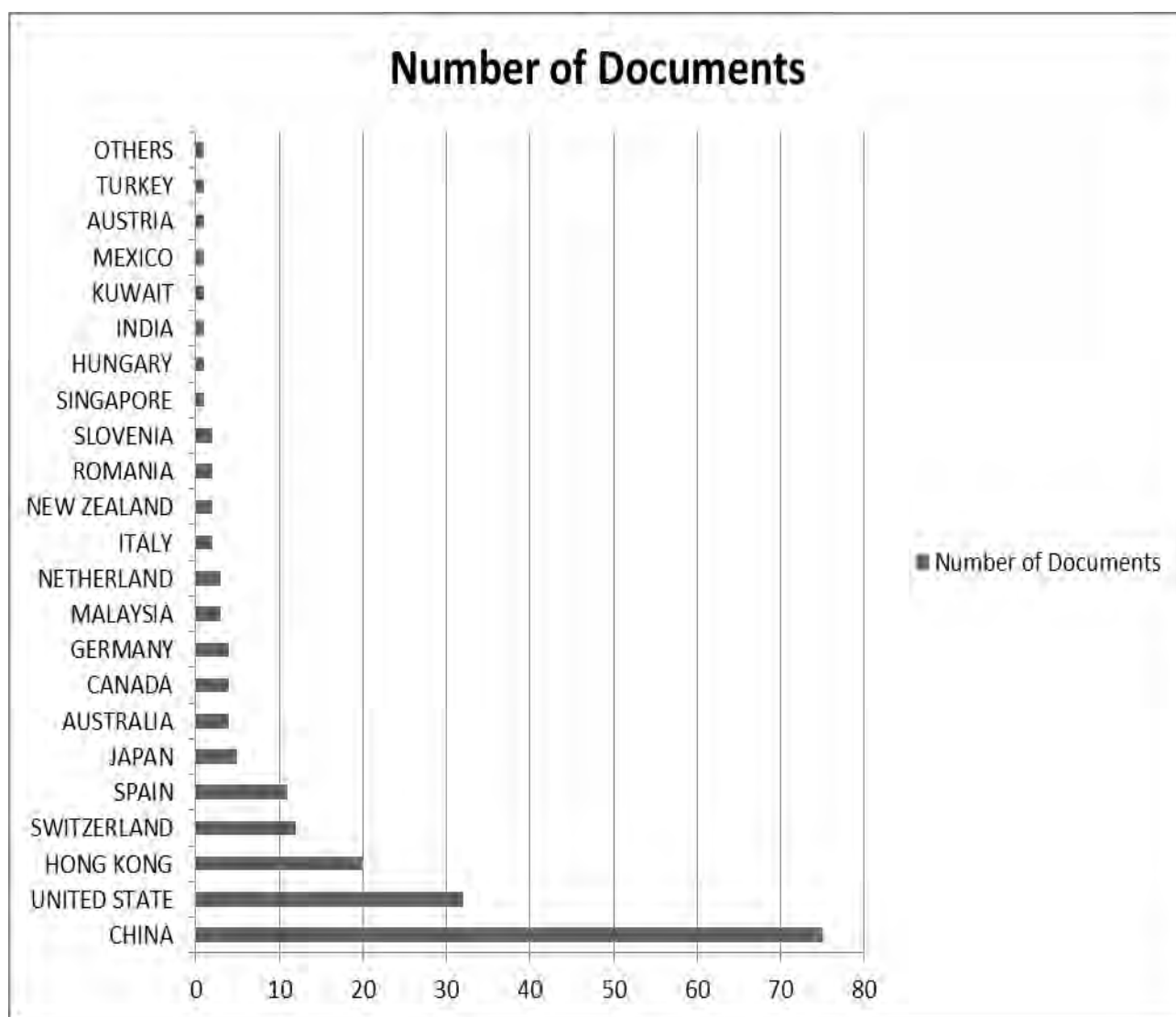


Σχήμα 1. Αριθμός αναφορών από τα αποτελέσματα αναζήτησης με λέξεις κλειδιά α. goji berry & β. wolfberry ανά τομέα επιστήμης.(www.scopus.com Απρίλιος 2014)

Στη βιβλιογραφία καταγράφεται το προϊόν Lacto-Wolfberry που έχει παραχθεί από το ερευνητικό κέντρο της Nestlé με έδρα τη Λωζάνη της Ελβετίας. Στη διαδικασία παραγωγής αυτού του προϊόντος το γάλα χρησιμοποιείται ως παράγοντας εκχύλισης (Wang et al 2005). Η Lacto-Wolfberry καταγράφεται ως λειτουργικό τρόφιμο που το προφίλ των βιοδραστικών συστατικών είναι κοντά σε αυτό των φρούτων goji berry και έχει καλή σταθερότητα, ικανότητα ανάμειξης, και διασκορπισιμότητα σε υδατικά συστήματα.

Η καλλιέργεια των goji berry άγνωστη για τους περισσότερους αγρότες στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια φαίνεται πως κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος και αποτελεί μία εναλλακτική καλλιέργεια για την οποία ενδιαφέρον επιδεικνύουν κυρίως οι νέοι αγρότες. Το

goji berry άρχισε να καλλιεργείται αρχικά σε πειραματικό στάδιο σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας και μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα, καθώς τα δέντρα είναι μικρά. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της παραγωγής και επεξεργασίας των καρπών δημιουργήθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας ο πρώτος πανελλήνιος συνεταιρισμός καλλιεργητών goji berry με σκοπό την παραγωγή νωπού, αποξηραμένου καρπού και μαρμελάδων από goji berry. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 2 ενώ υπάρχουν μελέτες από αρκετές χώρες σχετικά με τα goji berry και τις ιδιότητες τους εντούτοις δεν υπάρχει μία που να αξιολογεί τις ελληνικές καλλιέργειες.



Σχήμα 2. Αριθμός αναφορών από τα αποτελέσματα αναζήτησης με λέξεις κλειδιά α. goji berry & β. wolfberry ανά χώρα σε απόλυτους αριθμούς. (www.scopus.com Απρίλιος 2014)

Από τα προαναφερόμενα γίνεται κατανοητή η σημαντικότητα των βιοδραστικών στοιχείων που θα απομονωθούν με τη χρήση της προτεινόμενης μεθόδου που θα προκύψει από την μελέτη αυτή καθώς θα δώσει νέες δυνατότητες στην αξιοποίηση της εγχώριας παραγωγής. Αν και

αρκετές μελέτες έχουν εστιαστεί στην παραγωγή βιοδραστικών στοιχείων από φυσικά προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας εντούτοις τα αποτελέσματά τους παρέχουν μία αποσπασματική πληροφόρηση, ενώ μία ολοκληρωμένη έρευνα που να λαμβάνει υπ' όψιν παραμέτρους όπως την περιοχή προέλευσης των καρπών, τη μέθοδο ξήρανσης, την αξιολόγηση των παραμέτρων εκχύλισης με Supercritical Fluid Extraction και τελικώς την αξιολόγηση των παραγόμενων σταθεροποιημένων βιοδραστικών σκονών από καρπούς goji berry δεν έχει γίνει μέχρι τώρα. Έτσι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν καρποί από τις 2 ποικιλίες (L. Barbarum & L. Chinensis) οι οποίες έχουν φυτευτεί ήδη στην Ελλάδα και ειδικότερα στο χώρο της Θεσσαλίας .

1.6 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Ως σήμερα έχουν αναγνωριστεί χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδώδιμα φυτά, προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, ο καφές και το τσάι.

Το κοινό χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μίας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, και τα λινγάνια.

1.6.1 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση

πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα (Kuhnau 1976; Radtke και συν., 1998; Santos-Buelga και Scalbert 2000). Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα (Scalbert και Williamson 2000). Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert και Williamson 2000). Οι αγλυκόνες (δηλαδή οι πολυφαινόλες που δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα) απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές με τη μορφή γλυκοσιδίων ή πολυμερών είναι αρκετά υδρόφιλες για να απορροφηθούν με παθητική διάχυση από το έντερο και έτσι πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο (Hollman και Katan 1997). Όταν η υδρόλυση γίνεται από τα βακτήρια του εντέρου τότε συνήθως μειώνεται η απορρόφηση των πολυφαινολών γιατί οι αγλυκονικές μορφές που σχηματίζονται αποικοδομούνται περαιτέρω σε διάφορα αρωματικά οξέα (Scheline 1991). Επιπλέον, έχει προταθεί (Hollman και συν., 1995) ότι κάποια γλυκοσίδια μεταφέρονται στα εντεροκύτταρα από τη μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης που εξαρτάται από νάτριο (SGLT1) και στη συνέχεια υδρολύονται από την κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση ή από την υδρολάση της φλοριζινικής λακτάσης (LPH). Οι ανθοκυανιδίνες (κατηγορία φλαβονοειδών) πρέπει να απορροφώνται και να μεταβολίζονται με διαφορετικό μηχανισμό από τις άλλες πολυφαινόλες γιατί βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος με τις γλυκοσιδικές τους μορφές (Passamonti και συν., 2002). Οι πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών όπως οι προκυανιδίνες (ανήκουν στα φλαβονοειδή) πιστεύεται ότι απορροφώνται σε μικρό βαθμό και ότι η όποια βιολογική δράση τους περιορίζεται στην περιοχή του εντέρου (Deprez και συν., 2001).

Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θειικές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ (οι κυριότεροι όμως μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος είναι τα γλυκουρονίδια) και η προσθήκη αυτών των ομάδων καταλύεται από θειοτρανσφεράσες, μεθυλτρανσφεράσες, και από γλυκουρονικές τρανσφεράσες αντίστοιχα (Manach και συν., 2004). Η προσθήκη αυτή συμβαίνει σε όλες τις ξеноβιοτικές ουσίες με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η απέκκριση τους είτε μέσω της χολής είτε με τα ούρα. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή ένα σημαντικό ποσοστό των γλυκουρονιδίων που σχηματίζονται στο βλεννογόνο του εντέρου εκκρίνεται πίσω στον εντερικό αυλό και έτσι μειώνεται η καθαρή απορρόφησή τους (Crespy και συν., 1999). Οι μεταβολίτες των πολυφαινολών δεν βρίσκονται στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή

αλλά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη (Boulton και συν., 1998). Η επίδραση της σύνδεσης των πολυφαινολών με την αλβουμίνη στις βιολογικές τους δράσεις δεν είναι γνωστή, αν και μία μελέτη (Dangles και συν., 1999) έδειξε ότι η κερκετίνη (μία από τις πιο κοινές πολυφαινόλες) διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση μετά τη σύνδεσή της με την αλβουμίνη. Αν και μέχρι σήμερα οι μεταβολίτες λίγων πολυφαινολών είναι γνωστοί, η αναγνώρισή τους είναι σημαντική γιατί μπορεί να έχουν διαφορετική δράση από τις αρχικές πολυφαινόλες.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των πολυφαινολών στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και 10μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001; Lee και συν., 1995; Rein και συν., 2000; Manach και συν., 2004). Η διάρκεια ημιζωής των πολυφαινολών στο πλάσμα έχει υπολογιστεί από 2 έως 11 ώρες ανάλογα με τον τύπο της πολυφαινόλης, γεγονός που δείχνει ότι στο πλάσμα θα μπορούσαν να διατηρηθούν οι πολυφαινόλες σε σημαντικές συγκεντρώσεις μετά από τακτική κατανάλωση φυτικών τροφών (Cao και συν., 2001; Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001). Η απέκκριση των πολυφαινολών γίνεται είτε μέσω της χολής (κυρίως των πολυμερισμένων μορφών) είτε με τα ούρα. Ένα ποσοστό των αγλυκονικών μορφών που αποβάλλεται με τη χολή μπορεί να επαναπορροφηθεί μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας (Coldham και Sauer 2000).

Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωοθήκες) (Fritz και συν., 1998; Chang και συν., 2000; Wang και συν., 2002). Επιπλέον, μπορεί στο πλάσμα να υπερτερούν οι αγλυκονικές μορφές των πολυφαινολών και στους ιστούς οι γλυκοσιδικές ή το αντίστροφο ενώ μπορεί να εμφανίζονται στους ιστούς και διαφορετικοί μεταβολίτες λόγω του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού (Hong και συν., 2002; Maubach και συν., 2003).

1.6.2 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών

Η μεγάλη εξάπλωση των πολυφαινολών στα φυτά οφείλεται στις πολλές και ποικίλες ιδιότητές τους. Συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασής του φυτού απέναντι στην υπερϊώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα. Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach και συν., 2004; Di Carlo και συν., 1999; Harborne 1986).

1.6.2.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινολών που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blocina et al., 2003; Ferguson, 2001).

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες (αντίδραση 1.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 1.2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



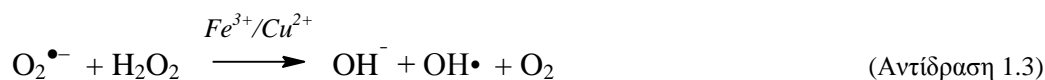
Όπου : RO^\bullet : η ελεύθερη ρίζα

PPH: η πολυφαινόλη

PP[•]: η φαινολική ρίζα



Η ικανότητα των πολυφαινολών να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν, πιθανότατα στοχευμένα, ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (αντίδραση 1.3) και της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 1.4) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες καθιστώντας τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά αφού έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας τις ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002).

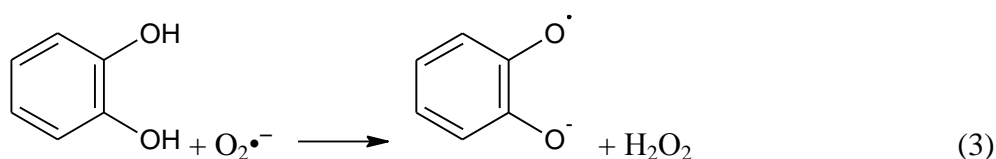
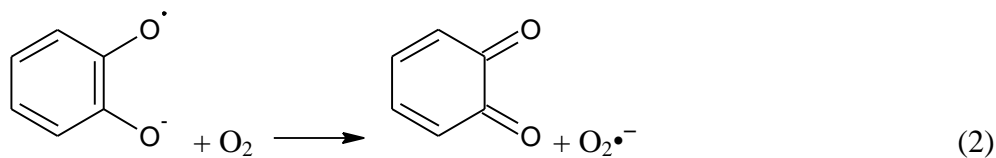
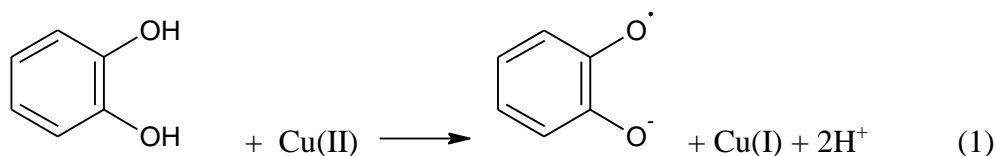


Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans και συν., 1996).

Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, όπως είναι η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση (Robak και συν., 1988) και η οξειδάση της ξανθίνης (Chang και συν., 1993). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, όπως είναι η καταλάση, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Breinhold και συν., 1999). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να γίνεται με άμεση ή έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element ή

ARE) (Yu και συν., 1997). Το ARE βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους.

Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman και συν., 1989). Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα (Yoshino και συν., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό $\text{OH}\cdot$. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των πολυφαινολών με το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} μπορεί να προκαλέσει μέσω μιας σειράς αντιδράσεων (Σχήμα 3) και το σχηματισμό H_2O_2 , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton (Sakihama και συν., 2002). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino και συν., 1999) και άρα έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto και συν., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).



Σχήμα 3 Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Η οξείδωση της πολυφαινόλης από το Cu(II) οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης (αντίδραση 1), η οποία μπορεί να αντιδράσει με O₂ και να σχηματίσει τη ρίζα του O₂^{•-} (αντίδραση 2). Η αντίδραση αυτή έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα, αφού το O₂^{•-} μπορεί να αντιδράσει με την αρχική πολυφαινόλη και να ξανασχηματιστεί η ημικινόνη και H₂O₂ (αντίδραση 3). H₂O₂ μπορεί να σχηματιστεί και από την αντίδραση του O₂^{•-} με H⁺ (αντίδραση 4). Τέλος ο Cu(I) μπορεί να αντιδράσει με το H₂O₂ μέσω της αντίδρασης Fenton και να οδηγήσει στην παραγωγή OH[•] (αντίδραση 5).

1.6.2.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικά ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως αντιμεταλλαξιγόνου εξαρτάται από την ακριβή χημική δομή της και από το αν η ουσία αυτή ήταν παρούσα πριν ή κατά την διάρκεια της έκθεσης σε κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι διάφορες αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες έχουν προκύψει από παρατήρηση της δράσης τους παρουσία κάποιων μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές είναι μη εξειδικευμένες όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιγόνων μέσω ενεργοποίησης

των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001).

Γενικά οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις πολυφαινόλες είναι οι ακόλουθοι: επίδραση στην σύνθεση και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, επίδραση στην δέσμευση των μεταλλαξιγόνων, όπως το διβενζοπυρένιο, στο DNA, αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II και τέλος επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών (Ferguson, 2001).

1.6.2.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog και συν., 1993; Knekt και συν., 1996) και προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt και συν., 2002), του στήθους (Dai και συν., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas και συν., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand και συν., 2000). Η προστατευτική αυτή δράση παρέχεται μέσα από ποικίλους αντικαρκινικούς μηχανισμούς. Ακόμη, η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής παρέχει κάποιου είδους προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994 και του έλκους (Alarcon και συν., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιϊκές (Chu και συν., 1992) αντιαλλεργικές (Di Carlo και συν., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia και συν., 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach και συν., 2004)

1.7 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων από τον καρπό Goji Berry (ποικιλίες chinensis και barbarum). Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης in vitro χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Τέλος προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική του δράση σε μυοβλάστες επιμύου (κυτταρική σειρά C2C12) με τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

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

- Folin Ciocalteu 2N
- Διάλυμα Na_2CO_3 20% (για την παραγωγή 200gr άνυδρου ανθρακικού νατρίου προστίθενται 800mL απιονισμένου νερού και θερμαίνονται μέχρι βρασμού. Μετά την ψύξη προσθέτουμε ακόμα μερικούς κρυστάλλους ανθρακικού νατρίου για να κάνουμε το διάλυμα κορεσμένο. Μετά από 24h φιλτράρουμε και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τη συμπλήρωση 1L.
- Γαλλικό οξύ
- Αιθανόλη
- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-H.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics- H.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Merck-Γερμανία)
- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma- Germany)
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

- Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων C2C12 είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:
 - ✓ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
 - ✓ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
 - ✓ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)
 - ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα:

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

i. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)

- PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- Χρωστική DCF (Sigma)
- FACS Clean (Becton-Dickinson)
- FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

2.1.3 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από αποξηραμένους καρπούς των ποικιλιών *L.Barbarum* και *L. Chinensis* θεσσαλικής παραγωγής. Παρασκευάστηκαν συνολικά 14 εκχυλίσματα (10 υδατικά και 4 μεθανολικά) με τη χρήση πειραματικών συνθηκών που επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών αριστοποίησης της εκχύλισης που αναπτύχθηκαν από τους (P.Skenderidis et al 2014) με σκοπό τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα δείγματα και οι συνθήκες με τις οποίες εκχυλίστηκαν.

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με χρήση της συσκευής υπερήχων Hielscher UP400S.

Οι συνθήκες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να δημιουργηθούν εκχυλίσματα υψηλά σε συγκέντρωση πολυφαινολών. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα μετρήθηκαν με τη μέθοδο Waterhouse AL. 2001 με τη χρήση αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu για να διαπιστωθεί η συγκέντρωση πολυφαινολών.

Πίνακας 2.1: Συνθήκες εκχύλισης Δειγμάτων 1-10^a και η συγκέντρωσή τους σε πολυφαινόλες.

Αριθμός Δείγματος	Ποικιλία/Διαλύτης	Διαλύτης (ml) / Goji Berry σκόνη (gr)	Θερμοκρασία εκχύλισης	Ισχύς υπερήχων (W/cm ²)	Χρόνος εκχύλισης(min)	μgGAE/ml ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ
1	Barbarum/H ₂ O	30	65	115	20	432,3
2	Barbarum/H ₂ O	40	55	184	30	296,3
3	Barbarum/H ₂ O	38,38	55	184	30	323,3
4	Barbarum/H ₂ O	40	55	115	20	164,3
4α	Barbarum/MeOH	40	65	115	30	355,3
5	Barbarum/H ₂ O	20	65	115	40	494,3
6	Barbarum/H ₂ O	30	55	184	40	368,3
7	Barbarum/H ₂ O	30	45	115	30	343,3
8	Barbarum/H ₂ O	36,3	45	57,5	30	283,3
8α	Barbarum/MeOH	30	55	184	20	315,3
9	L.chinensis/ H ₂ O	40	55	115	40	167,3
9α	L.chinensis/MeOH	40	55	115	30	301,3
10	L.chinensis/ H ₂ O	30	55	57,5	30	371,3
10α	L.chinensis/MeOH	30	45	184	30	470,3

Τα αποξηραμένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με γουδί και γουδοχέρι χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Για την εφαρμογή των πειραμάτων 2,5gr ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίζονταν και τοποθετούνταν σε ποτήρι ζέσεως των 200 mL και προσθέτονταν η ανάλογη για κάθε πείραμα ποσότητα νερού ή μίγματος 70% μεθανόλης με 30% νερό και θερμαίνονταν υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την επίτευξη της επιθυμητής από τον πειραματικό σχεδιασμό θερμοκρασίας. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στη συσκευή της ακίδας υπερήχων αφού πρώτα είχε ρυθμιστεί ο χρόνος και τα W/cm² σε αυτά του πειράματος. Μετά την ολοκλήρωση του

χρόνου στη συσκευή της ακίδας υπερήχων Hielscher UP400S μετρούνταν η θερμοκρασία και καταγράφονταν.

Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα τοποθετούνταν σε σωληνάκια Falcon των 50 mL και φυγοκεντρούνταν στις 10000 rpm για 10 min στους 40 °C και στη συνέχεια λαμβάνονταν η υδατική φάση.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

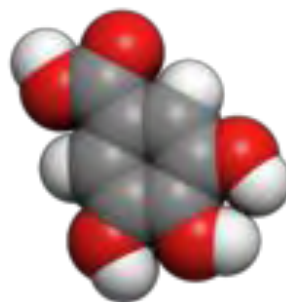
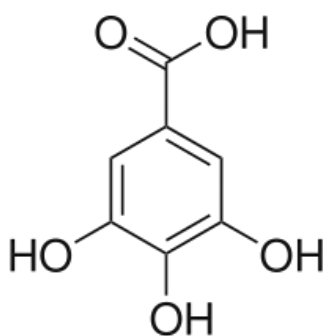
Αναλυτικός προσδιορισμός

Ο βασικός μηχανισμός της μεθόδου βασίζεται σε μια αντίδραση οξείδωσης αναγωγής. Στη μέθοδο αυτή το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (3,4-διυδρο-διοξοναφθαλενο-σουλφονικό νάτριο) FCR είναι απαραίτητο να αντιδράσει γρήγορα με τα αντιοξειδωτικά συστατικά των δειγμάτων σε επαρκή χρόνο και με καλή ανάμιξη του FCR με τα δείγματα πριν γίνει η προσθήκη του αλκαλικού διαλύματος Na_2CO_3 και σε ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του χρώματος.

Το αντιδραστήριο FCR είναι ένα μίγμα φωσφοροβολφραμικού οξέως ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφορομολυβδαινικού οξέως ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) που ανάγεται κατά την οξείδωση των φαινολών σε μίγμα κυανών οξειδίων βολφραμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}).

Το διάλυμα Na_2CO_3 20% προστίθεται για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 10 και μετά από παραμονή 30 min στους 40 °C μετράται η απορρόφηση του παραγόμενου κυανού χρώματος σε μήκος κύματος 765nm και είναι ανάλογο της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων.

Αρχικά δημιουργείται πρότυπη καμπύλη με τη μέτρηση της απορρόφησης γνωστής συγκέντρωσης διαλυμάτων γαλλικού οξέως. Για τον λόγο αυτό αρχικά δημιουργήθηκε διάλυμα stock 5000mg/L διαλύοντας 0,5g γαλλικού οξέως σε 10 ml αιθανόλης σε ογκομετρικό φλασκί των 100ml και συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.



Σχήμα Μοριακός τύπος γαλλικού οξέως

Από το διάλυμα αυτό παίρνοντας 0, 1, 2, 3, 5 & 10 ml σε ογκομετρικές φιάσκες των 100ml και συμπληρώνοντας με απιονισμένο νερό. παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0, 50, 100,150, 250, 500 mg/L

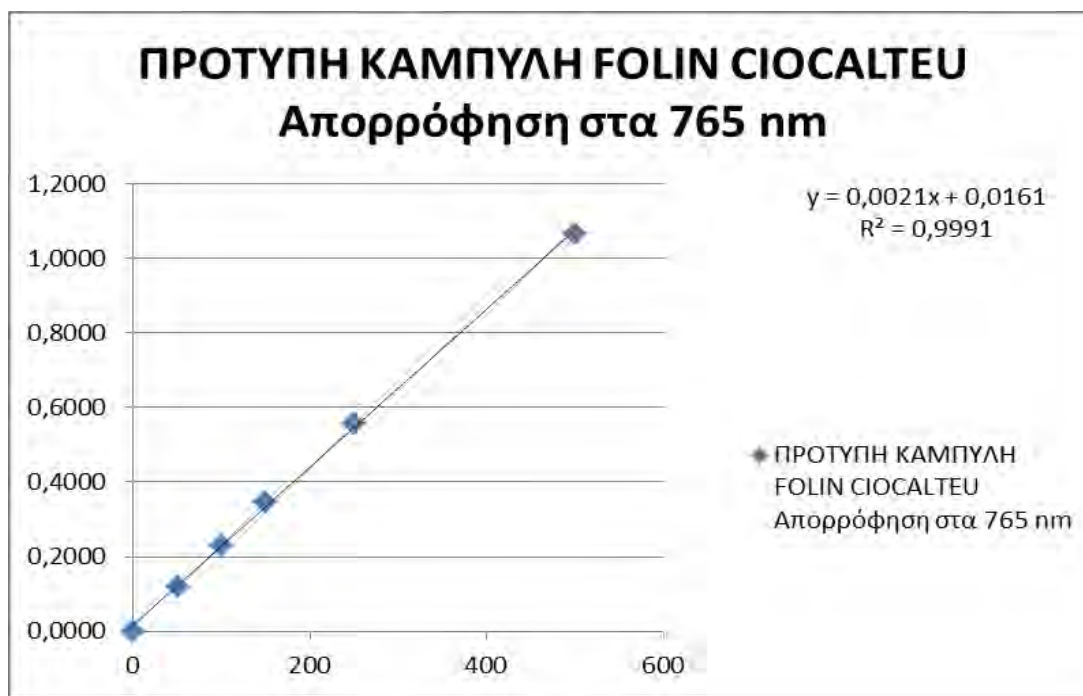
Στη συνέχεια σε σωληνάκια Eppendorf των 2 ml προστίθενται με τη σειρά που αναγράφονται 20 μ L από κάθε δείγμα αραιώσης, 1,58 ml απιονισμένο νερό, 100 μ L αντιδραστηρίου FCR. Τα σωληνάκια αναδεύονται σε vortex και στη συνέχεια και σε χρονικό διάστημα μεταξύ 30sec & 8 min προσθέταμε 300 μ L διαλύματος Na_2CO_3 20% και αναμιγνύαμε καλά. Γίνονταν επώαση σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία 40° C για 30 min.

Το φασμαφωτόμετρο ρυθμίστηκε στα 765nm και μηδενίστηκε με προσθήκη 20 μ L αποσταγμένου νερού αντί για δείγμα σε ένα από τα παραπάνω Eppendorf.

Παρακάτω παρατίθενται οι μετρήσεις αυτών των διαλυμάτων, η πρότυπη καμπύλη και η εξίσωση που προέκυψε από αυτή.

Συγκέντρωση γαλλικού οξέως $\mu\text{g/ml}$	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ FOLIN CIOCALTEU Απορρόφηση στα 765 nm
0	0,0000
50	0,1210
100	0,2310
150	0,3460
250	0,5580

500	1,0650
-----	--------



Με βάση την παραπάνω πρότυπη καμπύλη και τις απορρόφησης των γνωστής συγκέντρωσης διαλυμάτων γαλλικού οξέως και τη συνάρτηση που προέκυψε μετρούμενες απορρόφησης με βάση των παρακάτω τύπο ανάγονταν σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέως:

$$y=0,0021x+0,0161$$

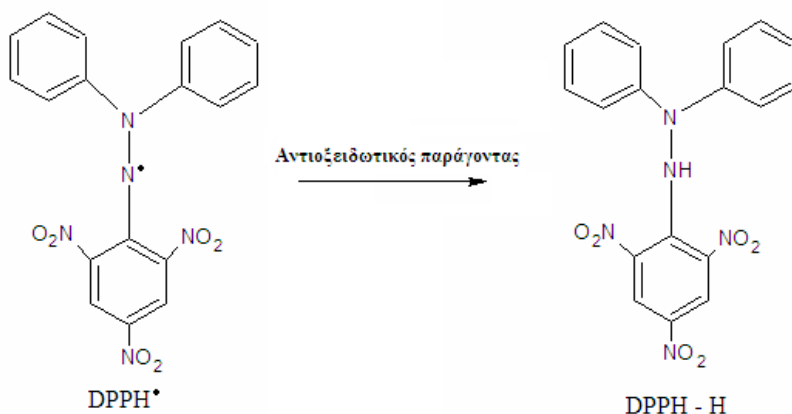
y: Η τιμή της απορρόφησης.

X: Η ποσότητα γαλλικού οξέως εκφρασμένη σε mg/L.

2.1.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•]

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•] πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. 1995. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al.,

2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης) (900μL), 100 μM ρίζας DPPH[•] (50μL) και εκχύλισμα Goji Berry (50μL) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH[•] (100 μM) μαζί με την μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 517 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

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

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

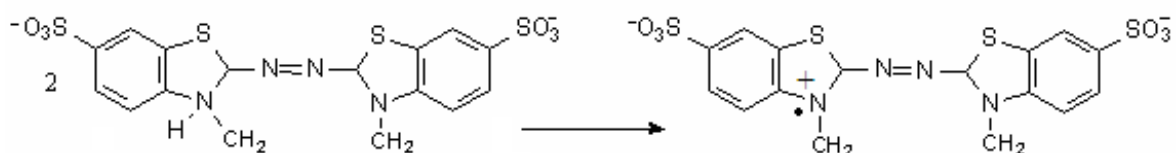
A_δ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

2.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS^{•+} είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH[•], η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH[•], η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξ αρχής, η ρίζα ABTS^{•+} πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του ABTS. Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS^{•+} και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδάσων (Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS^{•+} από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂ (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού (ABTS^{•+}) μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

Πιο αναλυτικά, η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 400μL H₂O, 1 mM ABTS (500 μL), 30 μM H₂O₂ (50 μL) και 6 μM περοξειδάση (50 μL). Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστέθηκαν 10 μL από διάφορα δείγματα goji berry σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H₂O με 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ αποτελούσε το τυφλό. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} υπολογίζεται από τον τύπο:

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

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

2.1.6 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση λοιπόν της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

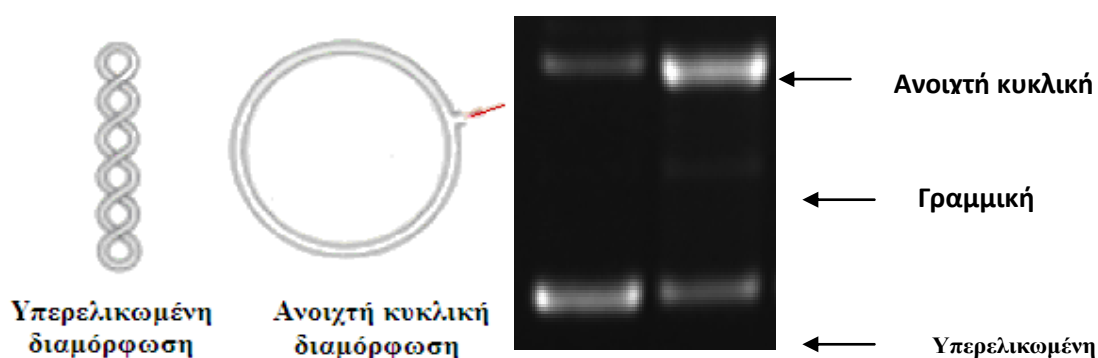
Για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιήθηκε μία *in vitro* μέθοδος, όπου σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε η ρίζα ROO[•].

Γενικά

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλωνα κυκλικά μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, φέροντας συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 11).

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

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική.



Εικόνα 11: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της

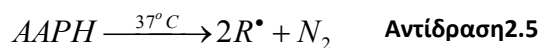
μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των ριζών OH^\bullet , ROO^\bullet να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

2.1.6.1 Επαγόμενη από ρίζες ROO^\bullet πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

2.1.6.1.i Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες ROO^\bullet είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO^\bullet χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride)). Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO^\bullet (Αντιδράσεις 2.5,2.6).



Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO^\bullet να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO^\bullet .

2.1.6.1.ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 g αгарόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικομένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.2. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex) (Εικόνα 21)

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control (-)	8 μl	-	2μl	-

AAPH 15mM (+)	4 μ l	-	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (4 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (8 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (16 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (32 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (64 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	5 μ l	3 μ l	2 μ l	-

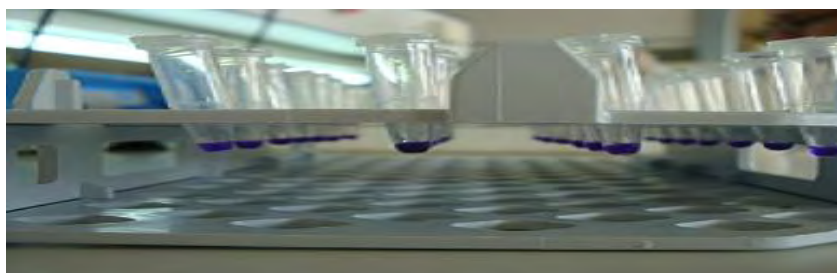
Πίνακας 2.2 : Ποσότητες αντιδραστηρίων.



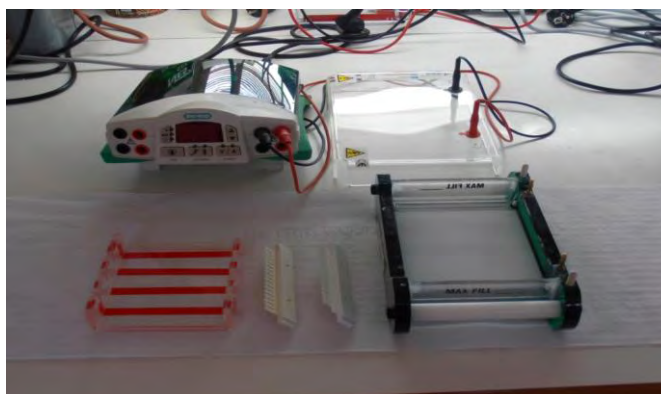
Εικόνα 21: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

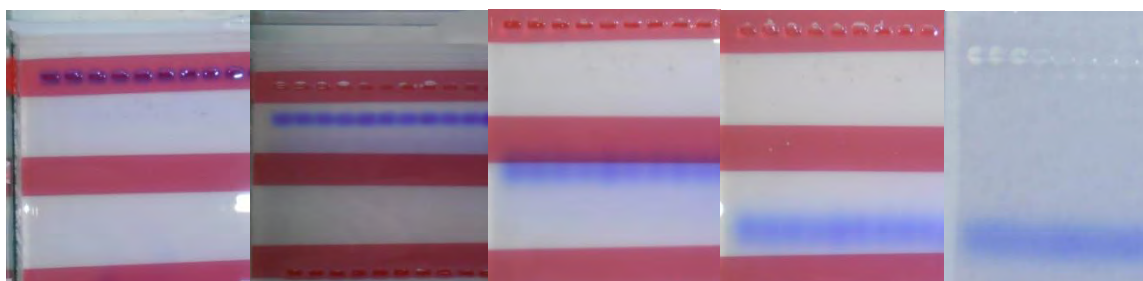
Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μ l διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 22) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αгарόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min (Εικόνες 23 και 24). Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech (Εικόνα 25). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.



Εικόνα 11: Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης



Εικόνα 12: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 13: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης, στάδια απομάκρυνσης χρωματισμένων ζωνών.



Εικόνα 14: Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech

2.1.6.1 iii Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^\bullet , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

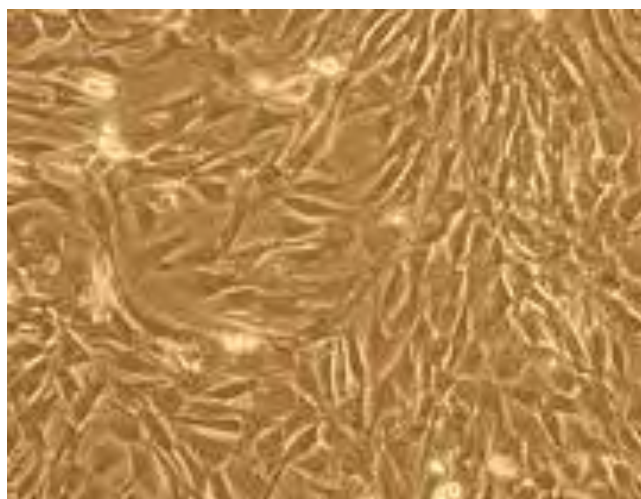
S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και

S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

2.1.7 Μυϊκά κύτταρα C2C12

Τα μυϊκά κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών επιμύου C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ επιμύων μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe και Saxel, 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 15: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο

2.1.7.1. Μέθοδοι

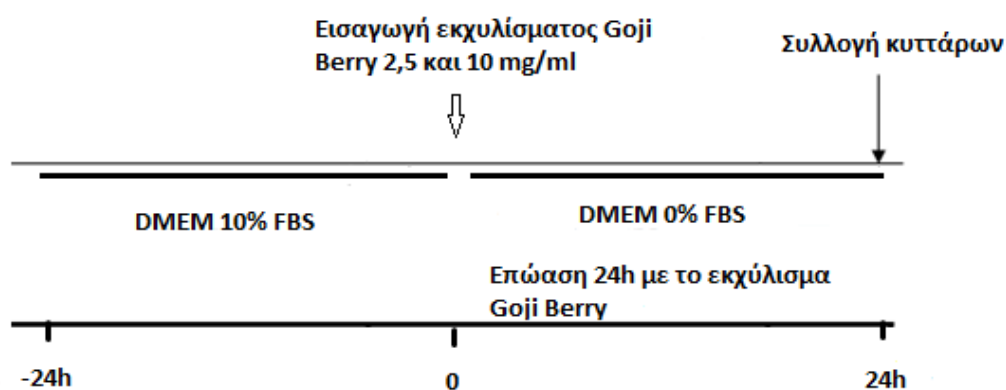
2.1.7.1.i Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)

Οι μυοβλάστες αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.1.7.1.ii Μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων Goji Berry στα επίπεδα της γλουταθειόνης

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Τα κύτταρα επωάζονται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (5 mL) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται το εκχύλισμα 5 (1 mL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (2,5 και 10 mg/mL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος για 24 h. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4)

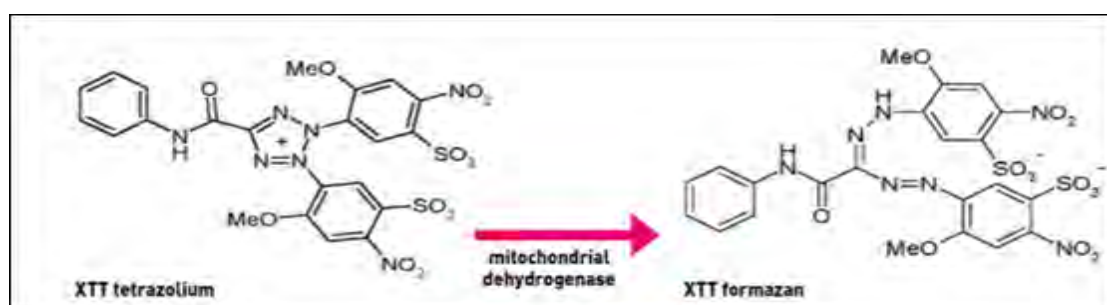


Εικόνα 16: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος 5 στα κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη του εκχυλίσματος 5. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων

2.1.7.1.iii Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης με τη μέθοδο XTT.

2.1.7.1.iiia Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της αντιοξειδωτικής ουσίας από τα αποβλήτα ελαιотριβείου στα κύτταρα τύπου Eahy χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 17: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

2.1.7.1.iii b Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γινόταν επίστρωση 10000 κυττάρων/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του τριβλίου της καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων της αντιοξειδωτικής ουσίας (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την ουσία) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της αντιοξειδωτικής ουσίας,

επώαζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μ l από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων Α και Β από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των Α και Β, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν την πρωτεΐνη και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή της αντιοξειδωτικής ουσίας στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων μυοβλαστών C2C12 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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



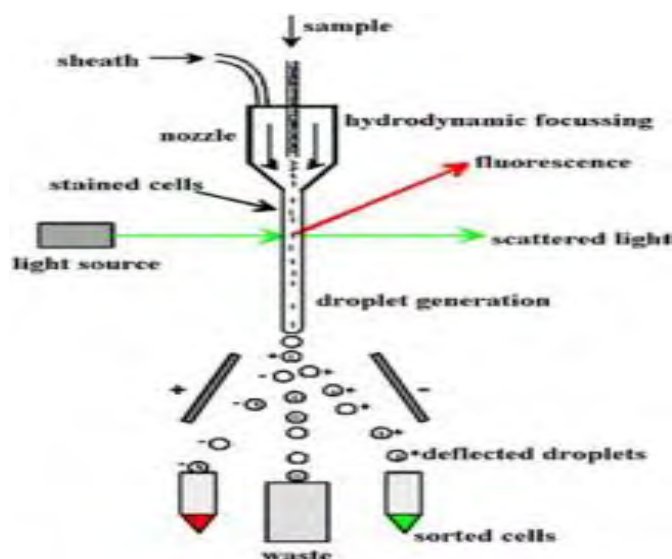
Εικόνα 18α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer, β) 96-well plate

2.1.7.2 Κυτταρομετρία Ροής

Αρχή Μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων

σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λείζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 19: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών

προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



Εικόνα 20: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson

2.1.7.2.i Προσδιορισμός της γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)

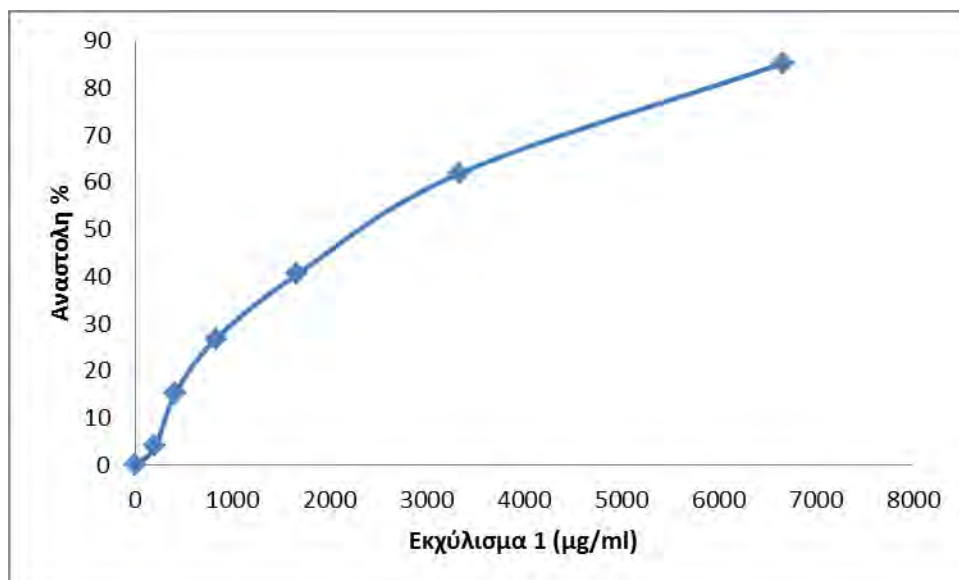
Πειραματική διαδικασία

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 µL PBS και 15 µL χρωστικής mercury orange ή 15 µL χρωστικής DCF για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5% CO₂. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250 µL PBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 µL PBS και προχωράμε στην ανάλυση.

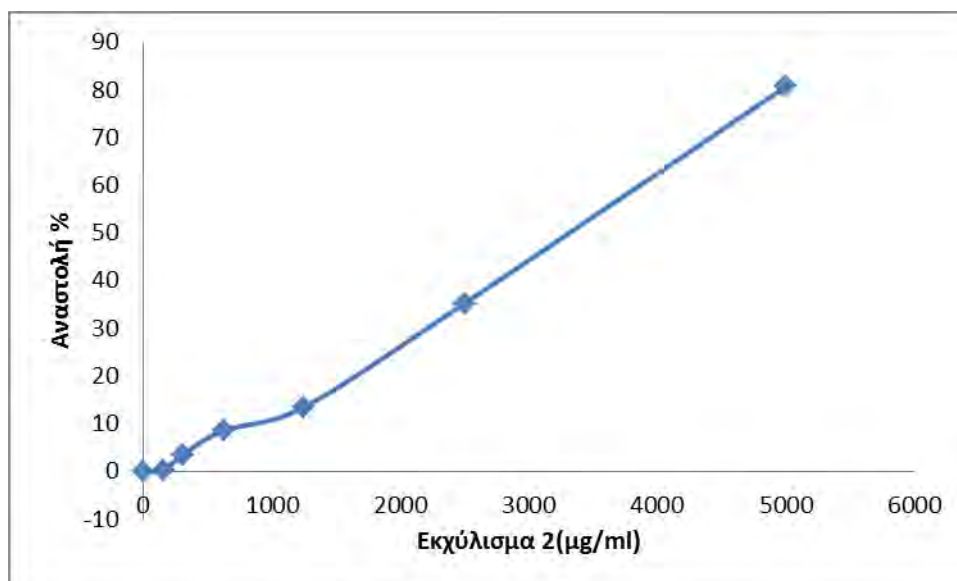
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλίσμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

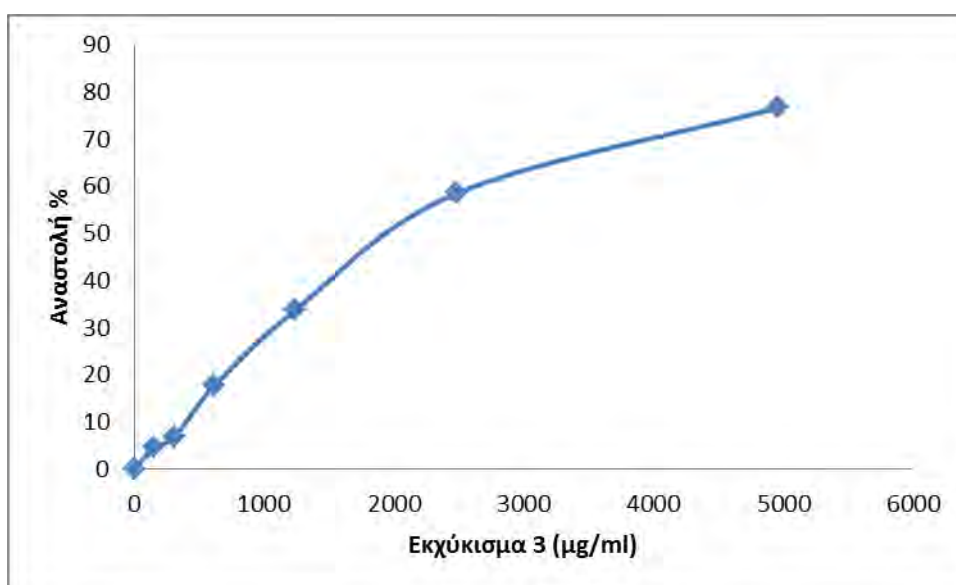
Συνολικά μελετήθηκαν 14 εκχυλίσματα (1-10a) από ποικιλίες *Chinensis* και *Barbarum* του φυτού *Goji Berry*. Τα δείγματα 1, 6, 7, 8a, 10, 10a εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 52, 104, 208, 416, 833 και 1667 $\mu\text{g/ml}$, τα δείγματα 2, 4, 4a, 9, 9a στις συγκεντρώσεις 39, 78, 156, 313, 625 και 1250 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 3 στις συγκεντρώσεις 41, 81, 163, 326, 652 και 1303 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 5 στις συγκεντρώσεις 34, 69, 138, 277, 555 και 1111 $\mu\text{g/ml}$ και το δείγμα 8 στις συγκεντρώσεις 43, 86, 172, 344, 688 και 1377 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 51 $\mu\text{g/ml}$ έως 4650 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα 9a (Γράφημα 3.1.9a) με IC_{50} ίσο με 51 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 7 (Γράφημα 3.1.7) με IC_{50} ίσο με 4650 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (3.1.1- 3.1.10a) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



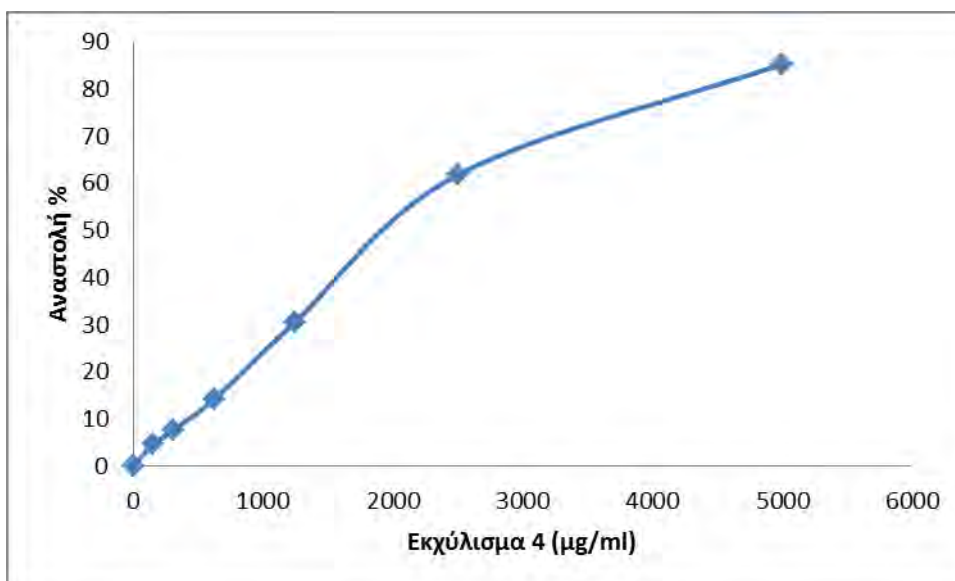
Διάγραμμα 3.1.1 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 1



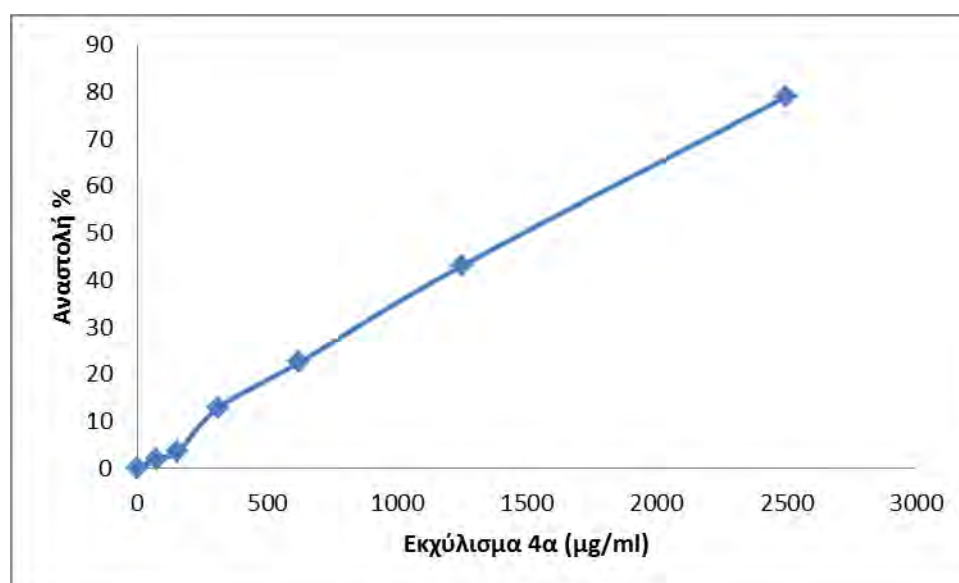
Διάγραμμα 3.1.2 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 2



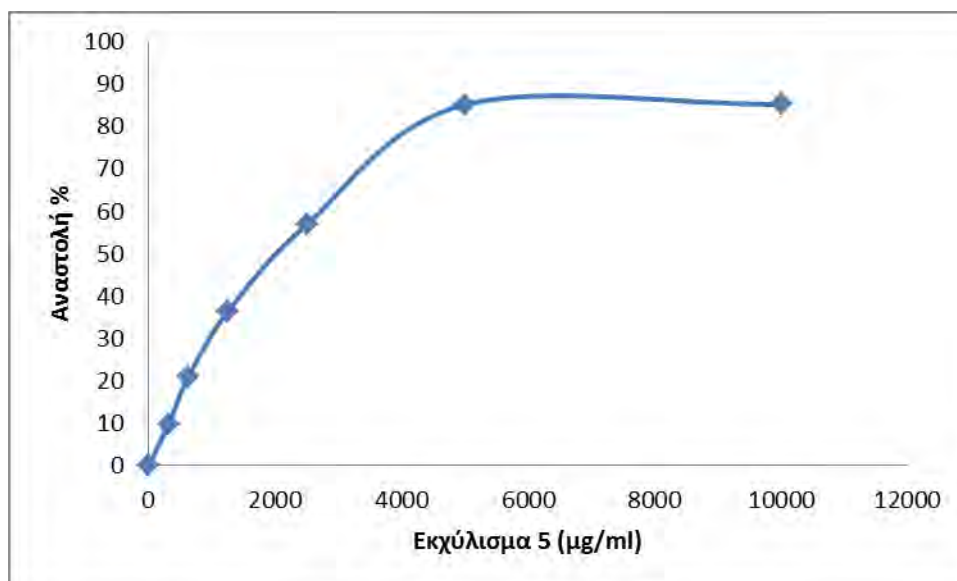
Διάγραμμα 3.1.3 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 3



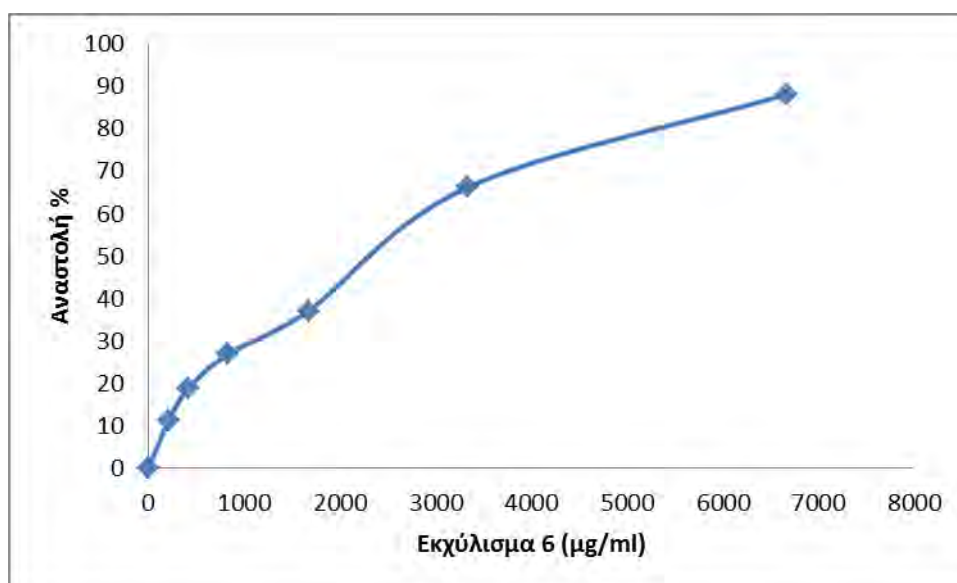
Διάγραμμα 3.1.4 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 4



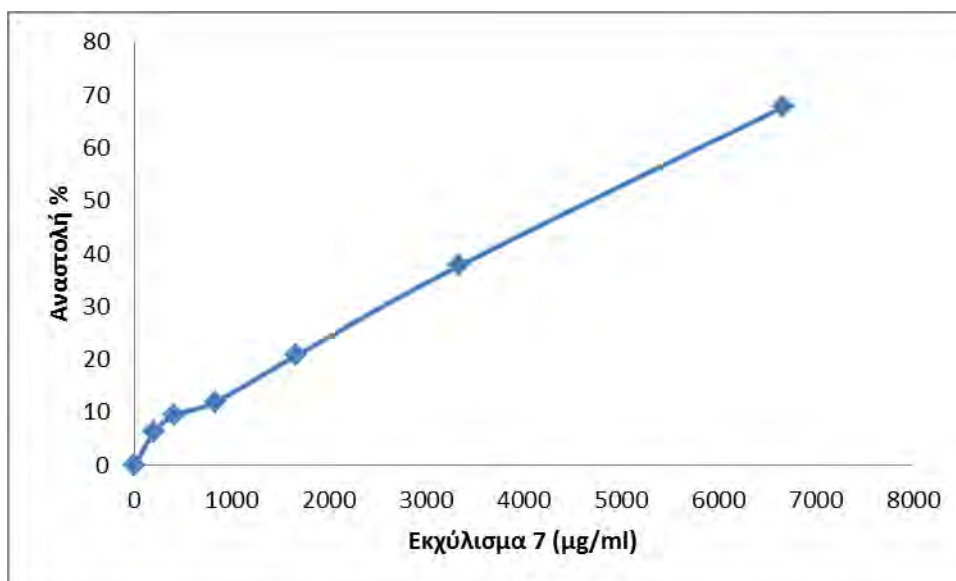
Διάγραμμα 3.1.4.a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 4a



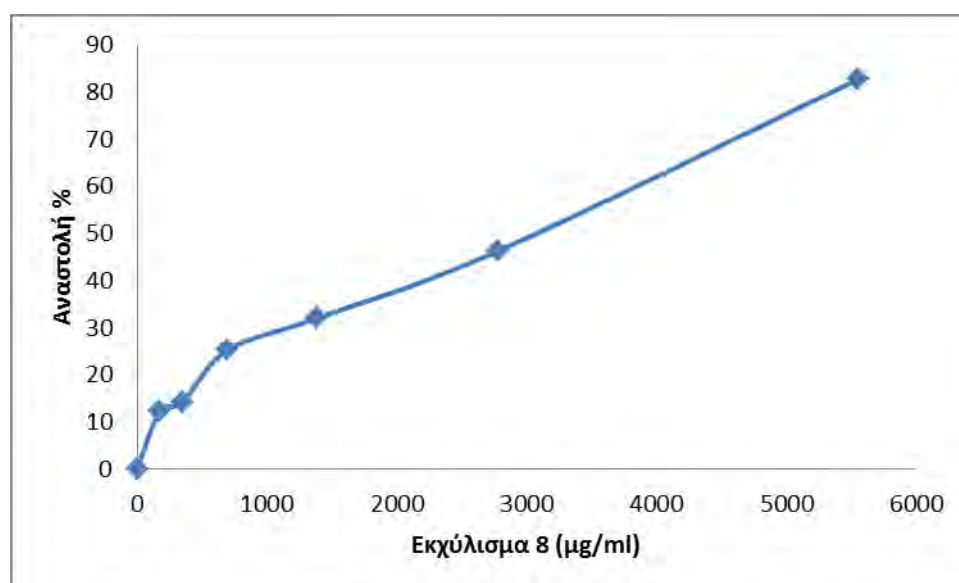
Διάγραμμα 3.1.5 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 5



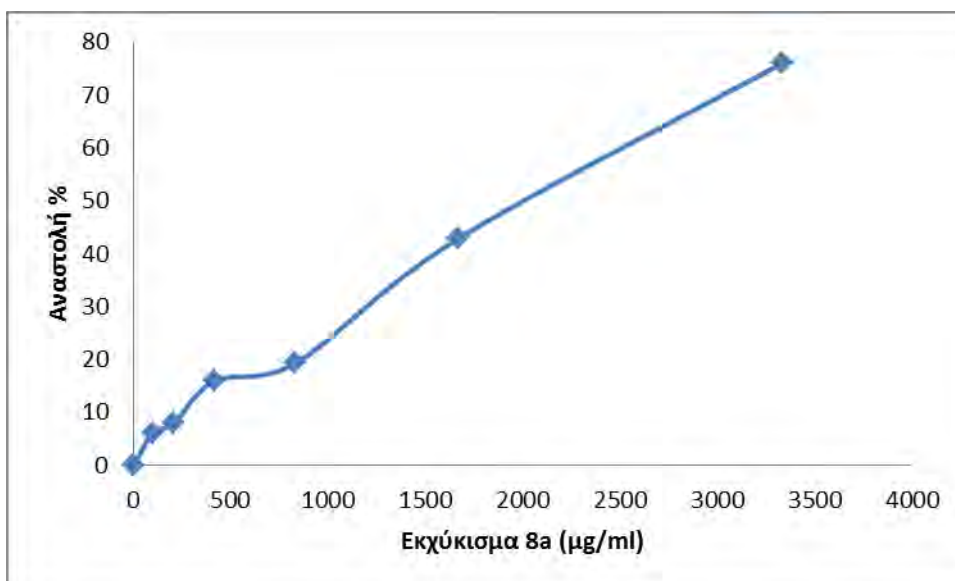
Διάγραμμα 3.1.6 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 6



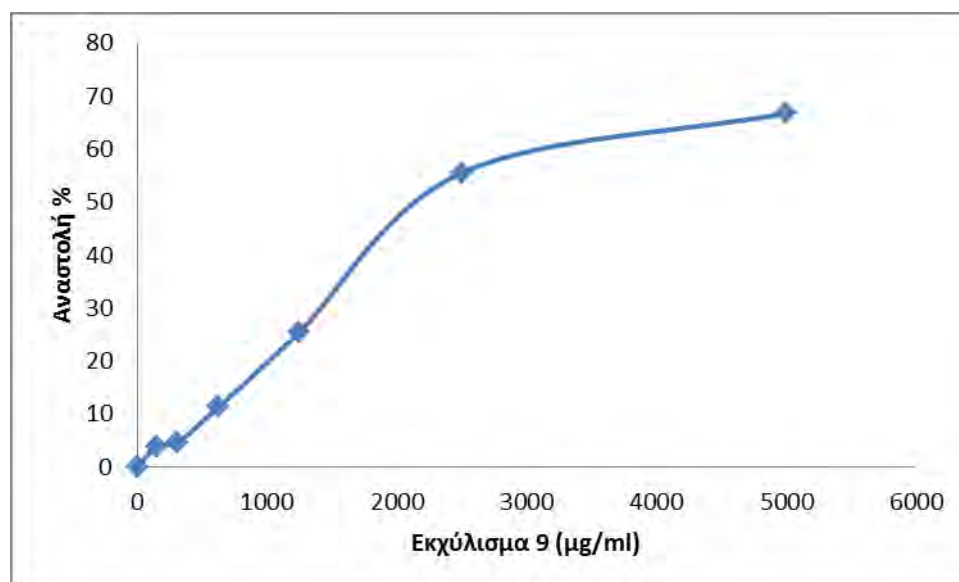
Διάγραμμα 3.1.7 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 7



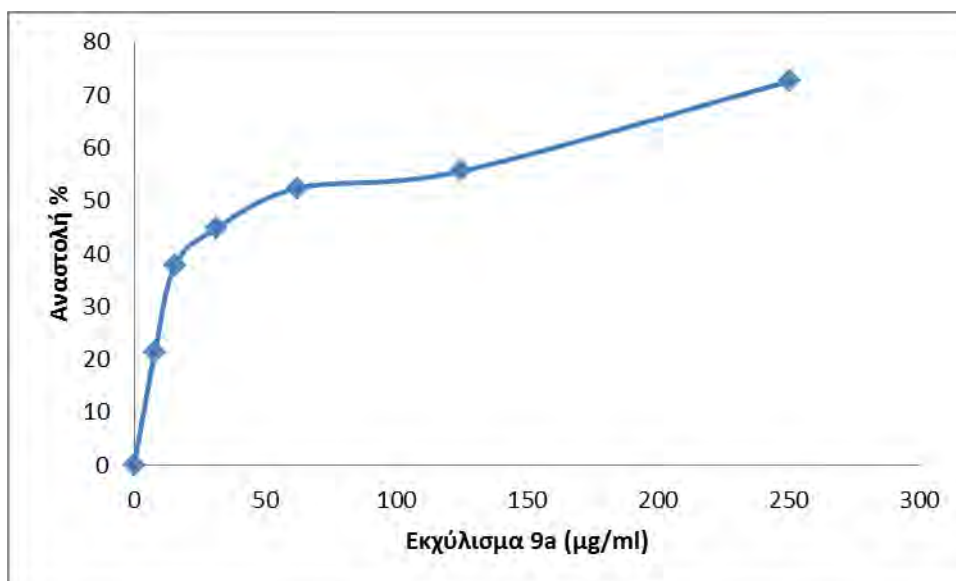
Διάγραμμα 3.1.8 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 8



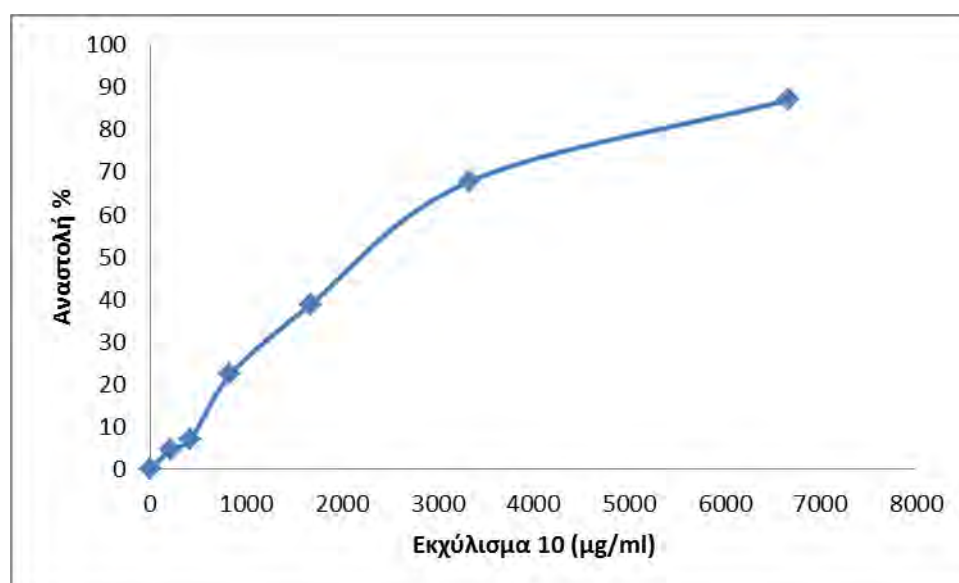
Διάγραμμα 3.1.8a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 8a



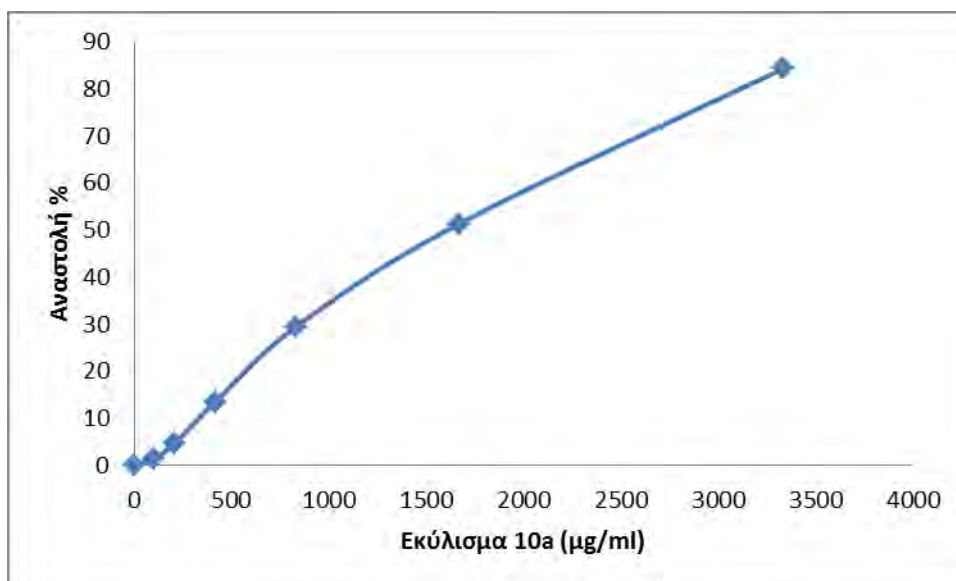
Διάγραμμα 3.1.9 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 9



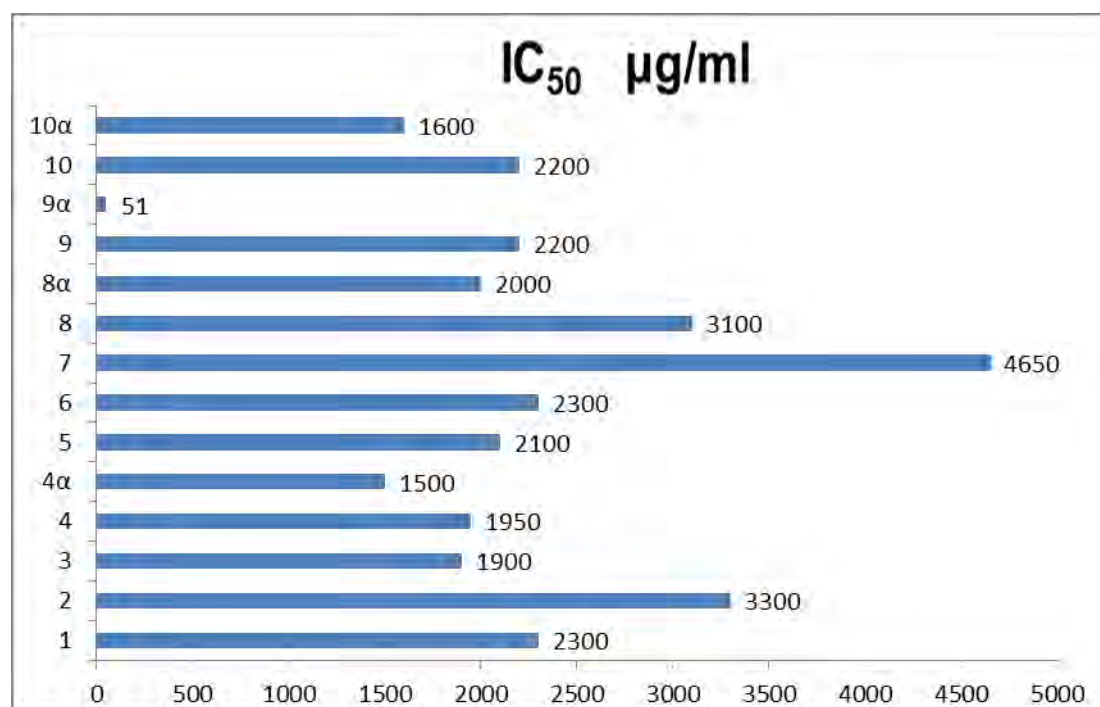
Διάγραμμα 3.1.9a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 9a



Διάγραμμα 3.1.10 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 10



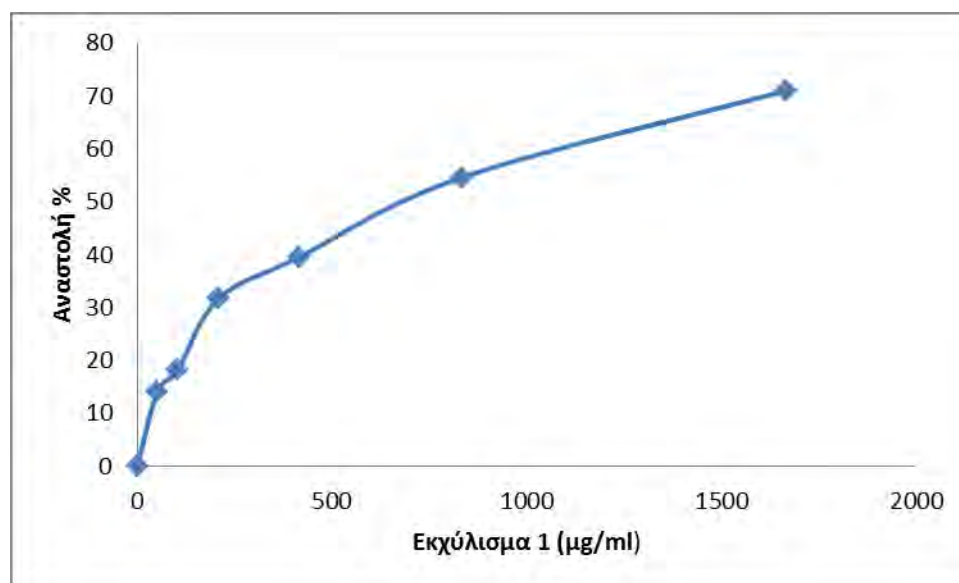
Διάγραμμα 3.1.10a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος 10a



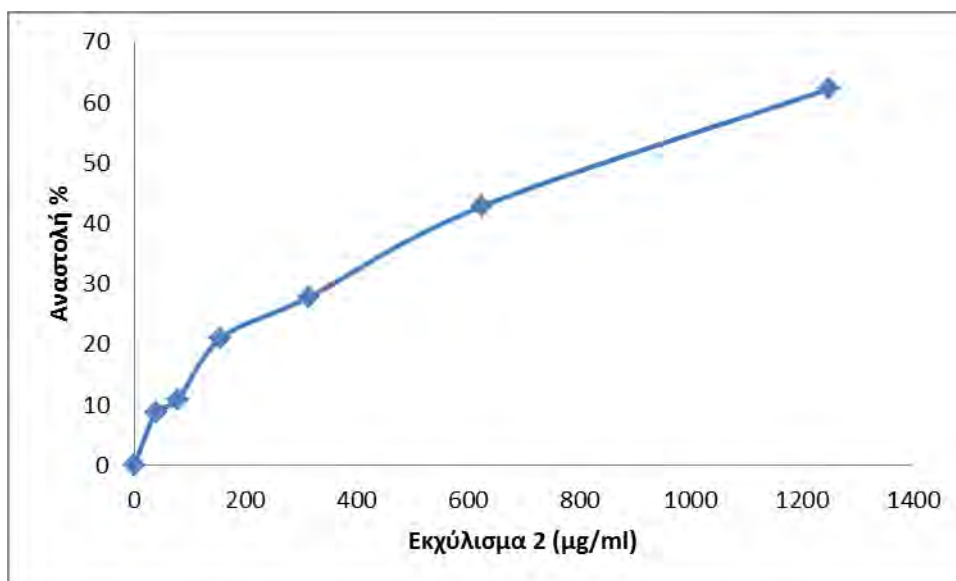
Γράφημα 3.1.11 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από Goji Berry για την αλληλεπίδραση με την ρίζα DPPH

3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ποικιλίες *Chinensis* και *Barbarum* του φυτού *Goji Berry* μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $ABTS^{+}$.

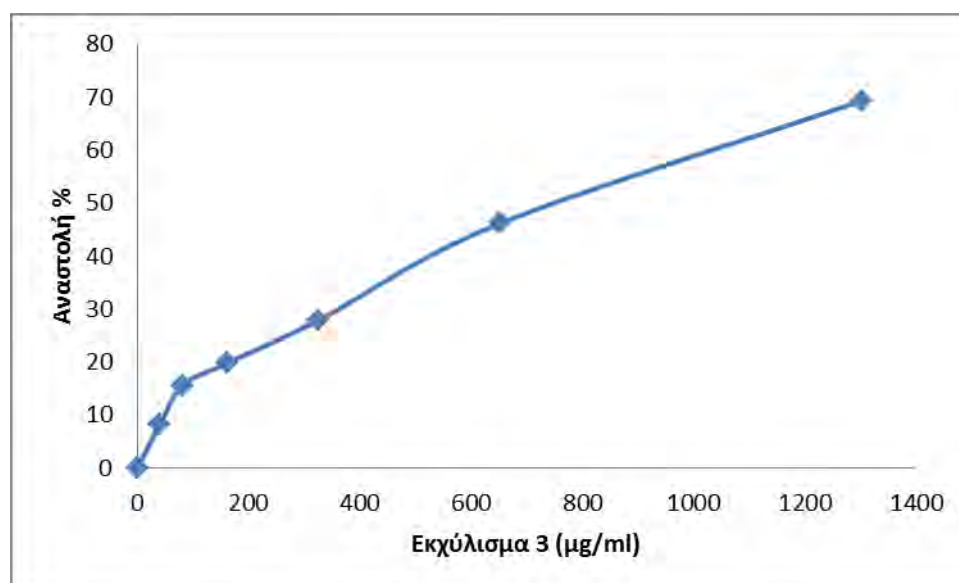
Συνολικά μελετήθηκαν 14 εκχυλίσματα (1-10a) από ποικιλίες *Chinensis* και *Barbarum* του φυτού *Goji Berry*. Τα δείγματα 1, 6, 7, 8a, 10, 10a εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 52, 104, 208, 416, 833 και 1667 $\mu\text{g/ml}$, τα δείγματα 2, 4, 4a, 9, 9a στις συγκεντρώσεις 39, 78, 156, 313, 625 και 1250 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 3 στις συγκεντρώσεις 41, 81, 163, 326, 652 και 1303 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 5 στις συγκεντρώσεις 34, 69, 138, 277, 555 και 1111 $\mu\text{g/ml}$ και το δείγμα 8 στις συγκεντρώσεις 43, 86, 172, 344, 688 και 1377 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $ABTS^{+}$. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 180 $\mu\text{g/ml}$ και 1100 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 4a (Γράφημα 3.2.4a) με IC_{50} ίσο με 180 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 5 (Γράφημα 3.2.5) με IC_{50} ίσο με 1100 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (3.2.1-3.2.10a) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας $ABTS^{+}$ από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



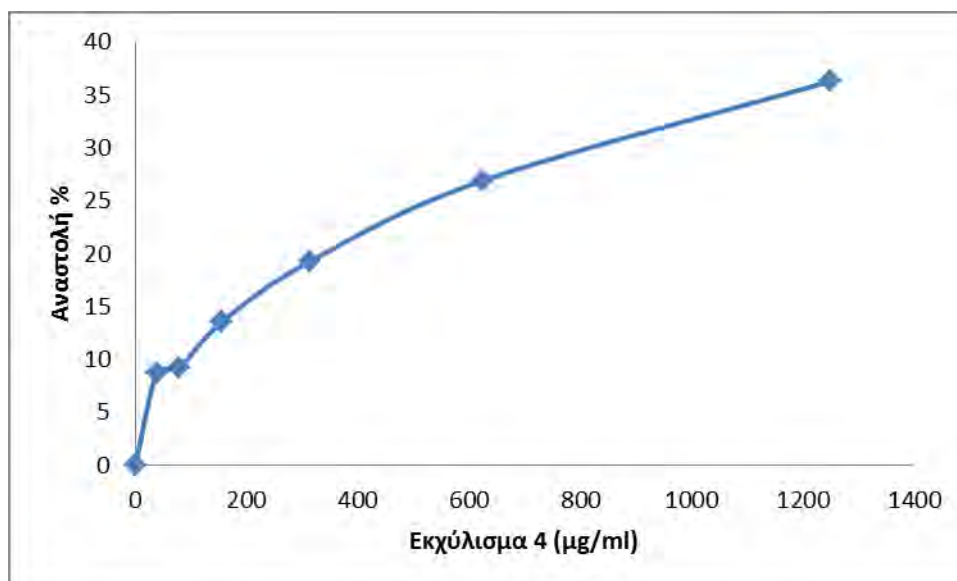
Διάγραμμα 3.2.1 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας $ABTS^{+}$ του εκχυλίσματος 1



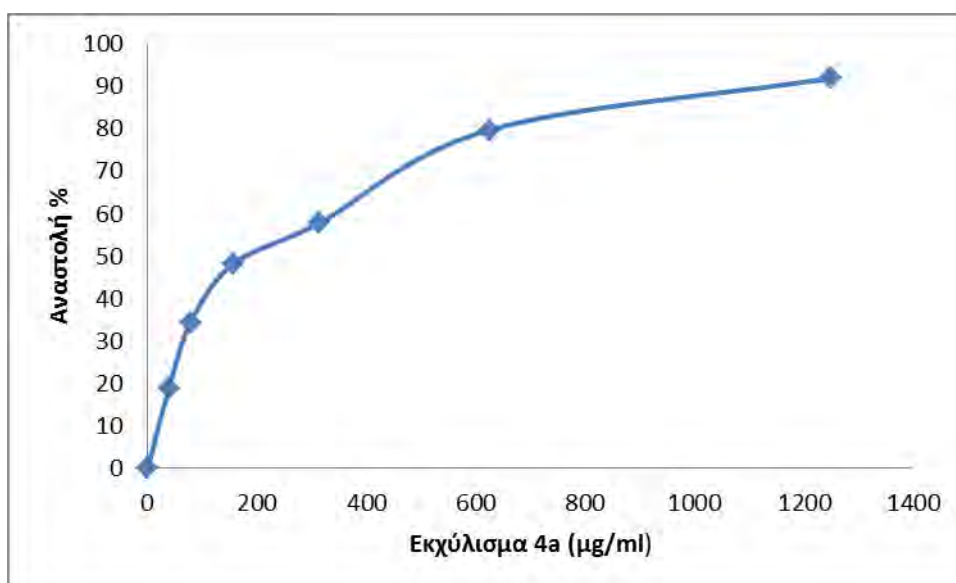
Διάγραμμα 3.2.2 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 2



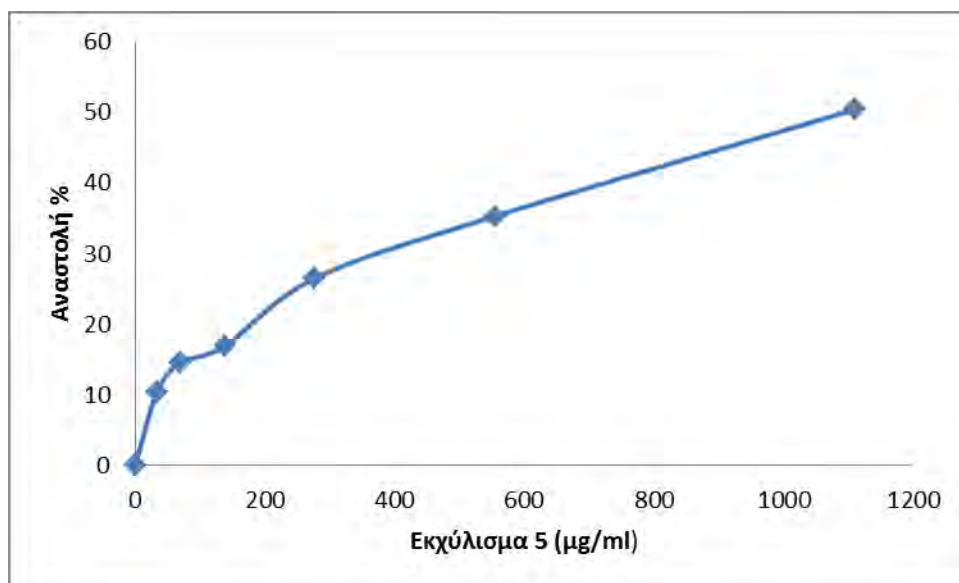
Διάγραμμα 3.2.3 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 3



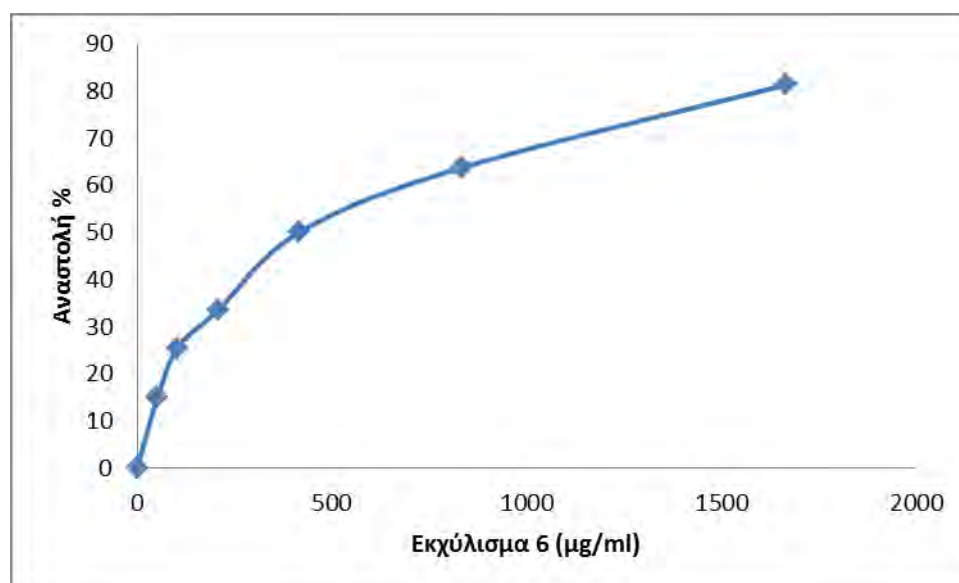
Διάγραμμα 3.2.4 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 4



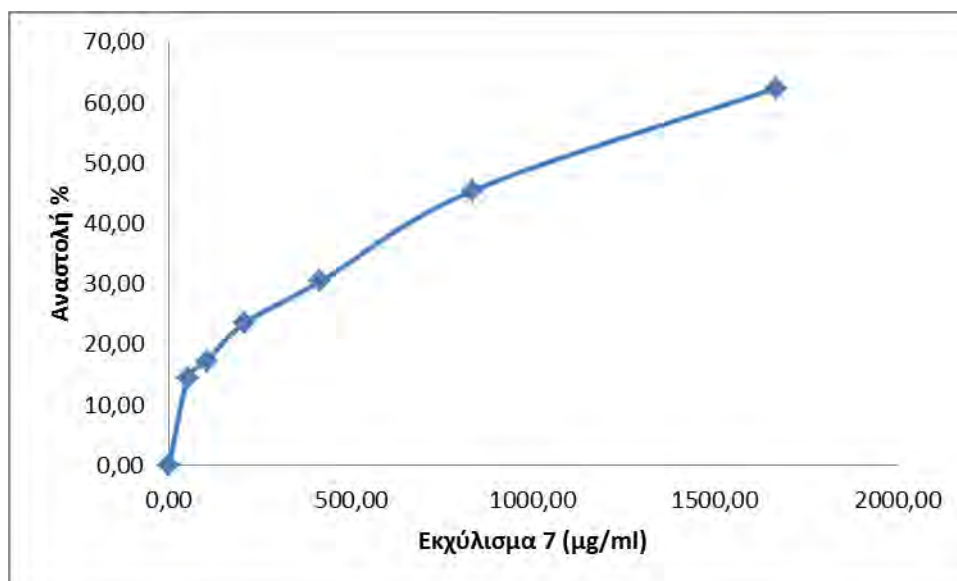
Διάγραμμα 3.2.4a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 4a



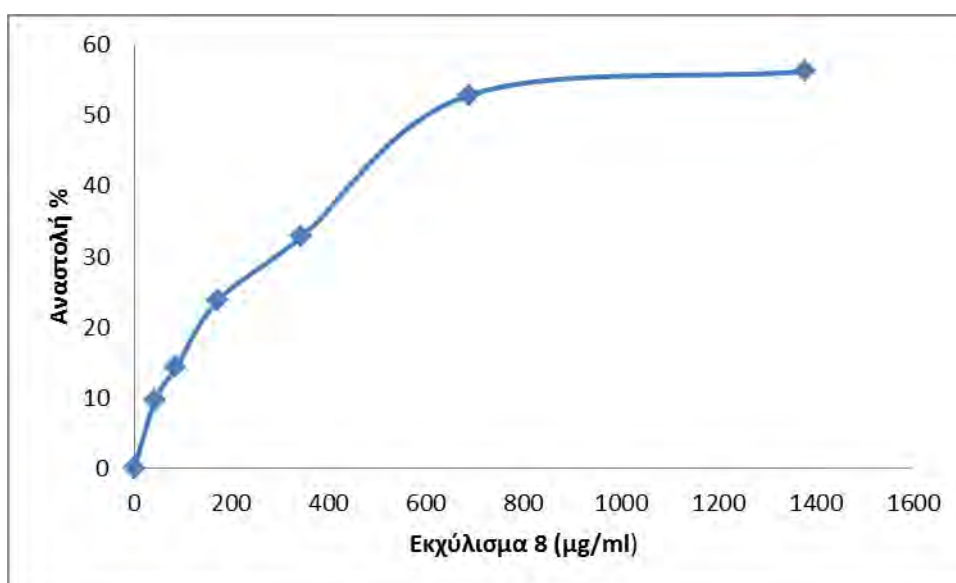
Διάγραμμα 3.2.5 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 5



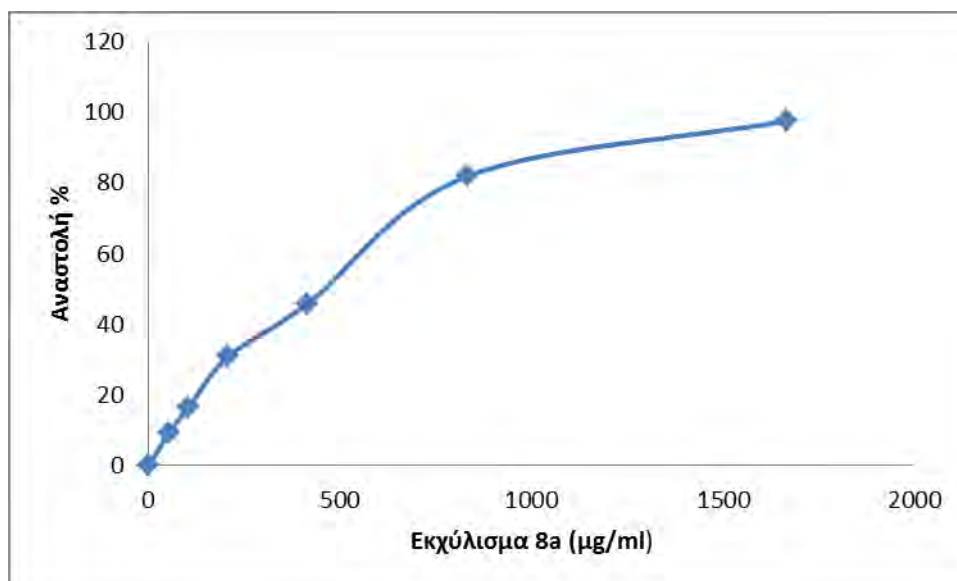
Διάγραμμα 3.2.6 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 6



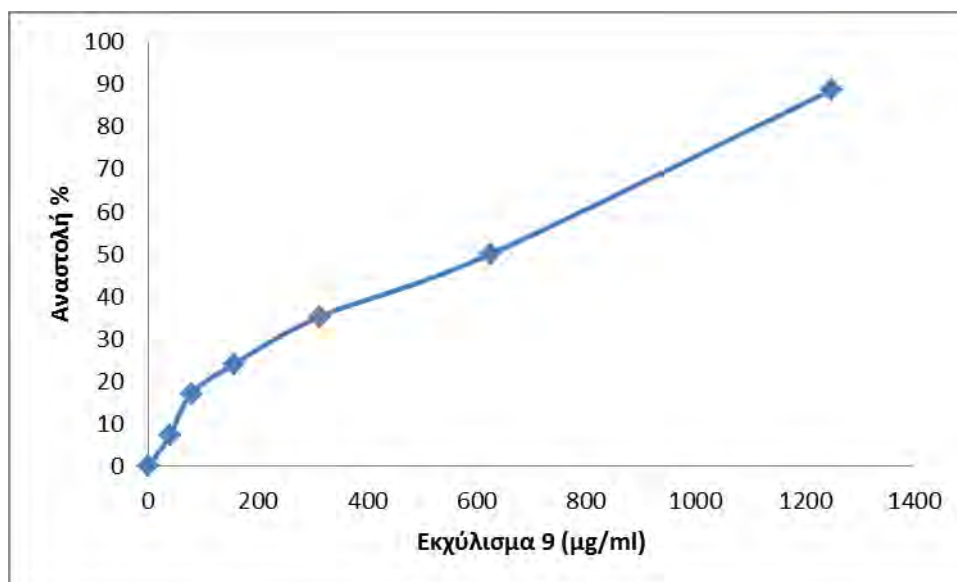
Διάγραμμα 3.2.7 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 7



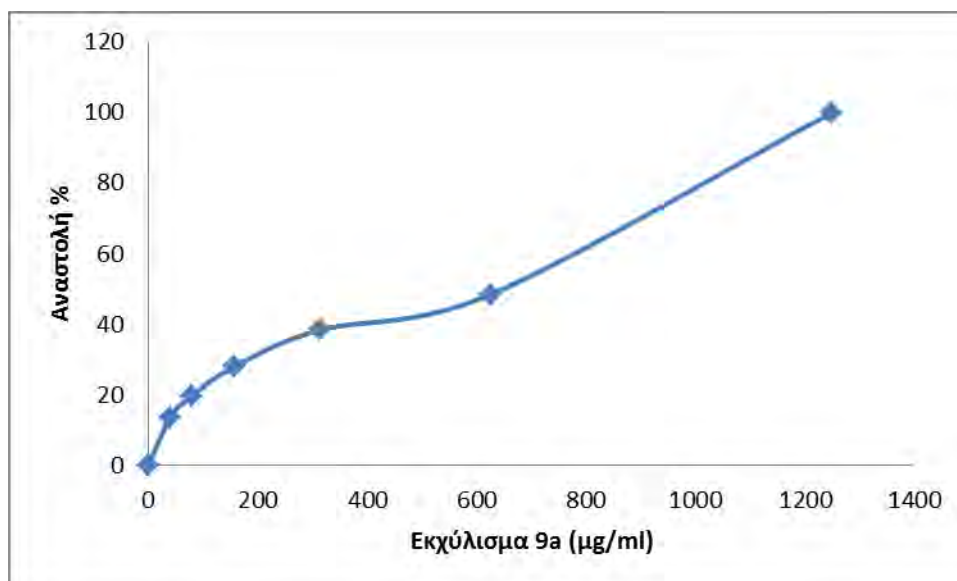
Διάγραμμα 3.2.8 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 8



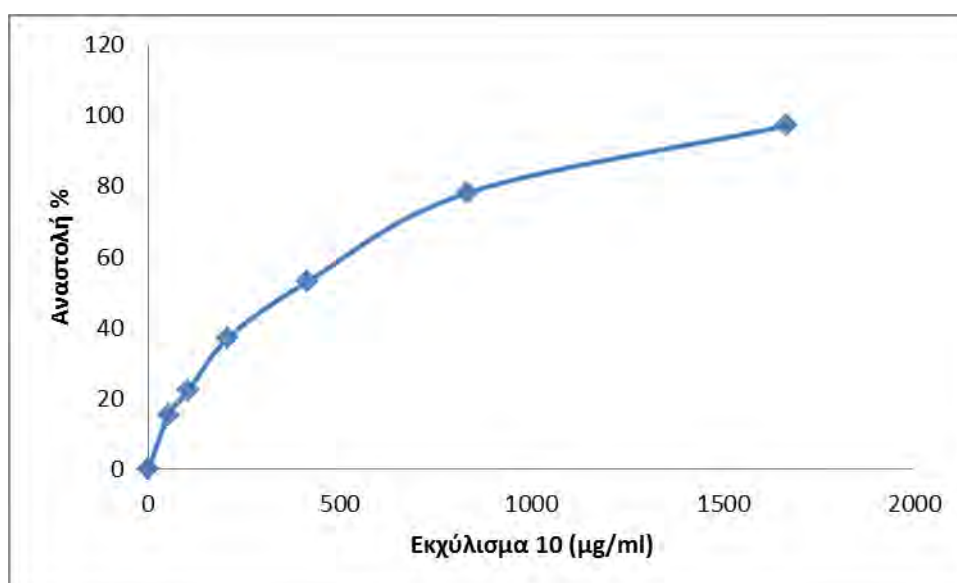
Διάγραμμα 3.2.8a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 8a



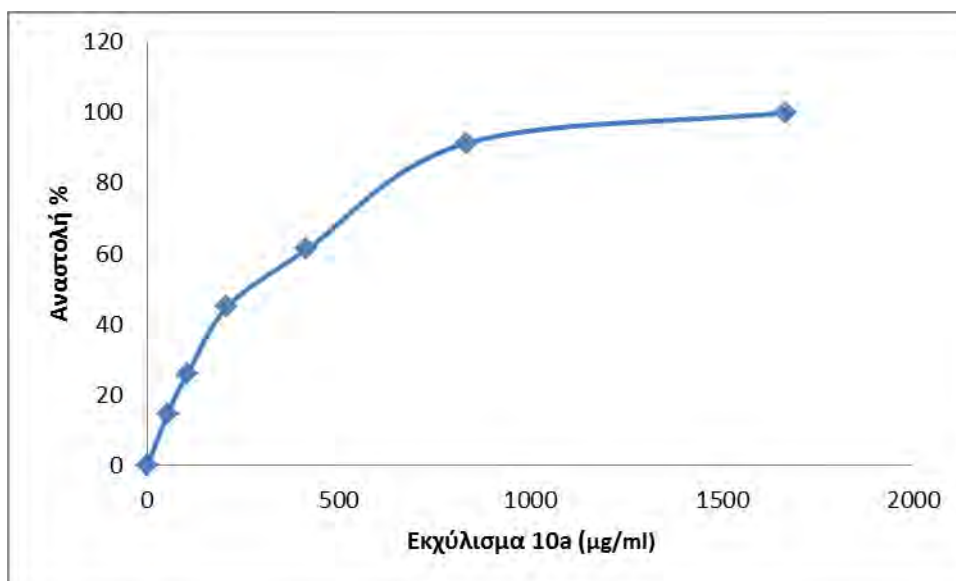
Διάγραμμα 3.2.9 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 9



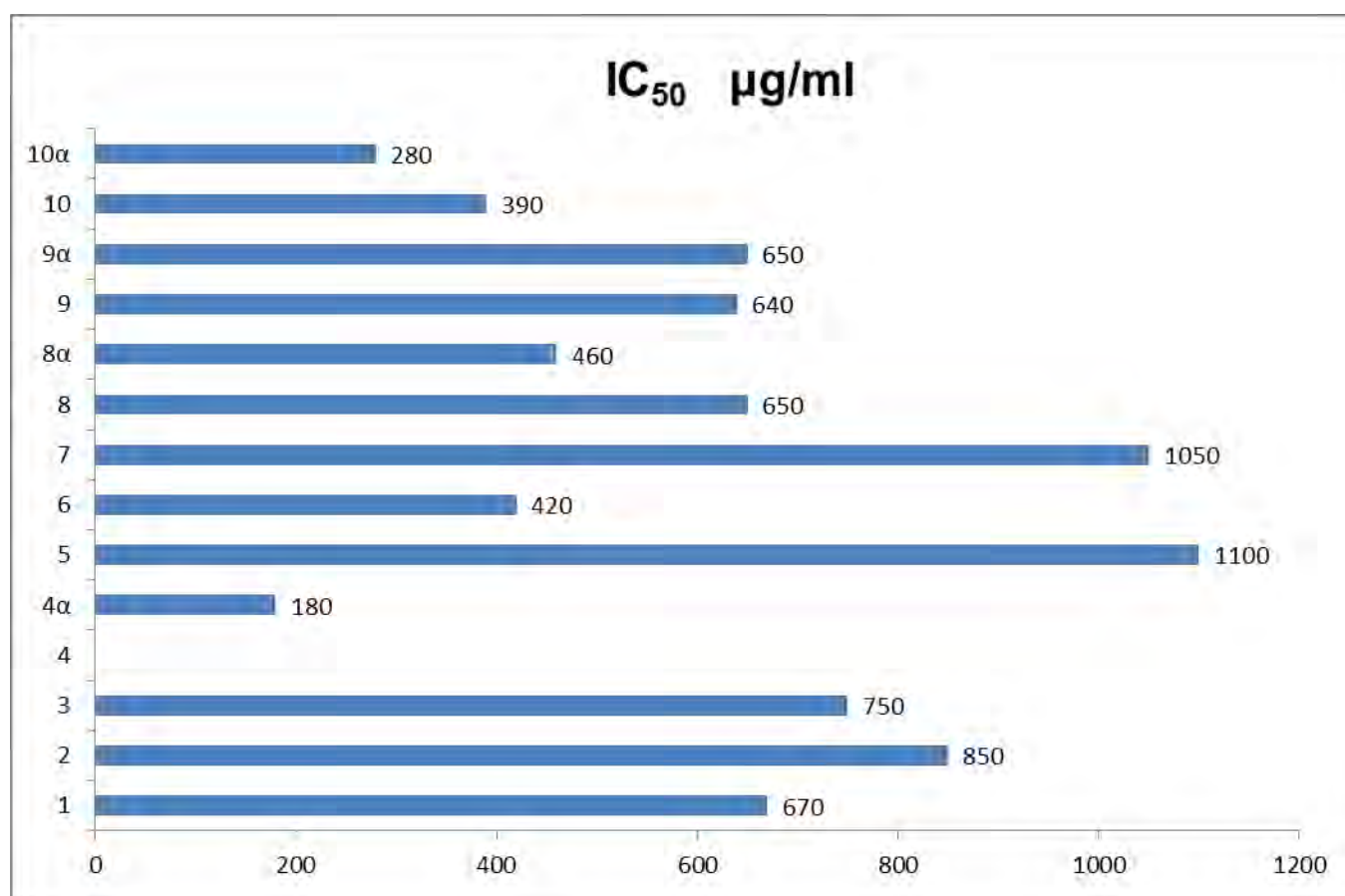
Διάγραμμα 3.2.9a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 9a



Διάγραμμα 3.2.10 Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 10



Διάγραμμα 3.2.10a Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ του εκχυλίσματος 10a

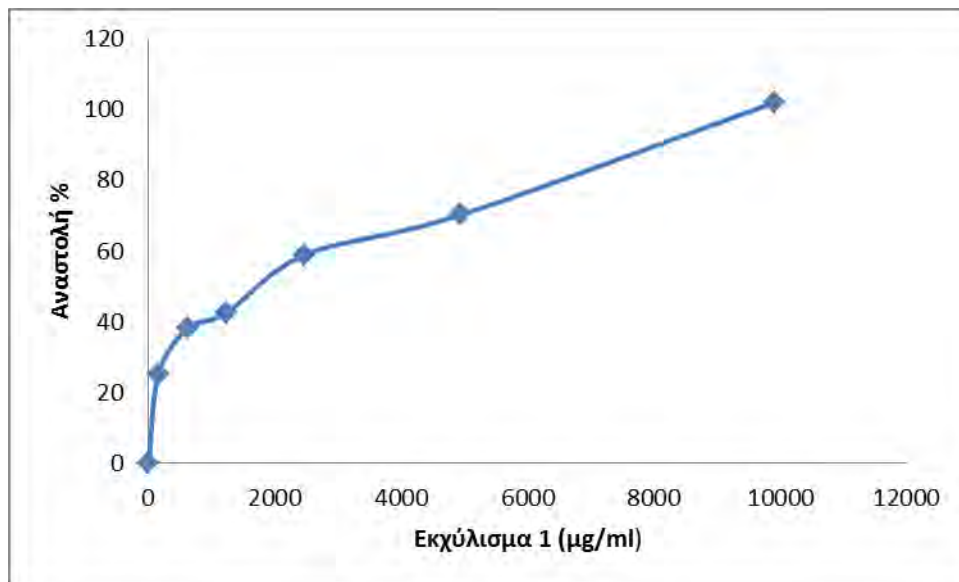
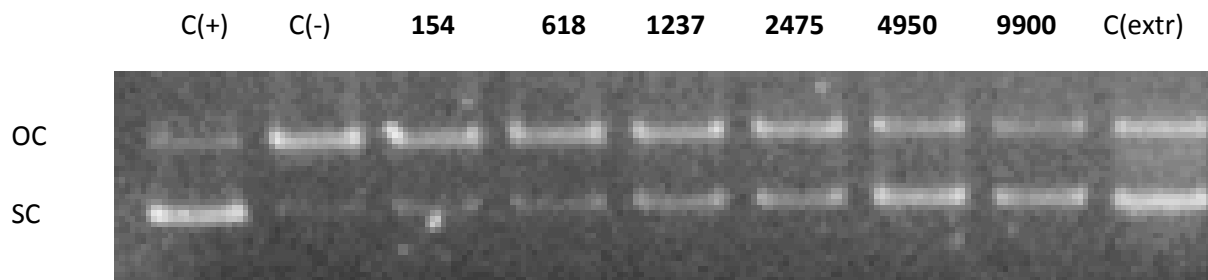


Γράφημα 3.2.11 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από Goji Berry για την αλληλεπίδραση με την ρίζα ABTS (το δείγμα 4 δεν εξετάστηκε λόγω έλλειψης υλικού).

3.3 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλίσμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

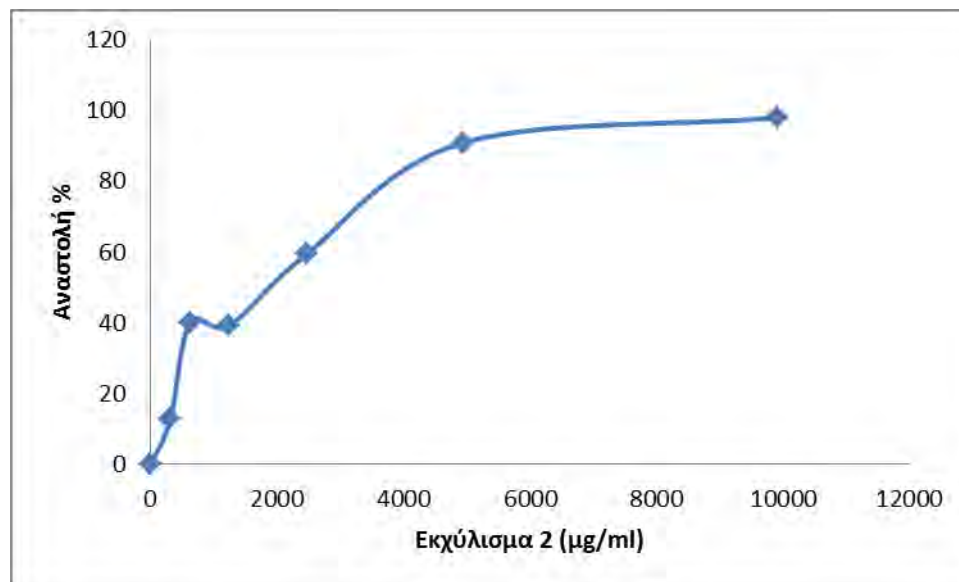
Στην μέθοδο αυτή εξετάστηκαν 10 εκχυλίσματα. Δεν εξετάστηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα τα οποία εξετάστηκαν στις μεθόδους με το DPPH και το ABTS. Τα δείγματα 1, 6, 7, 10 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 52, 104, 208, 416, 833 και 1667 $\mu\text{g/ml}$, τα δείγματα 2, 4, 9 στις συγκεντρώσεις 39, 78, 156, 313, 625 και 1250 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 3 στις συγκεντρώσεις 41, 81, 163, 326, 652 και 1303 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 5 στις συγκεντρώσεις 34, 69, 138, 277, 555 και 1111 $\mu\text{g/ml}$ και το δείγμα 8 στις συγκεντρώσεις 43, 86, 172, 344, 688 και 1377 $\mu\text{g/ml}$. Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 690 $\mu\text{g/ml}$ έως 6900 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 5 (Γράφημα 3.3.5) με IC₅₀ ίσο με 690 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 8 (Γράφημα 3.3.8) με IC₅₀ ίσο με 6900 $\mu\text{g/ml}$.

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 1



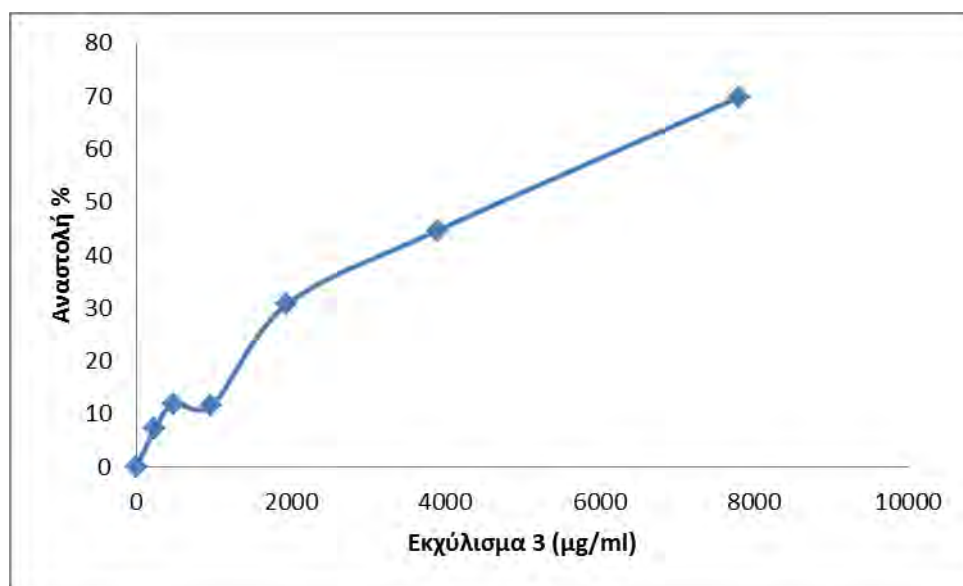
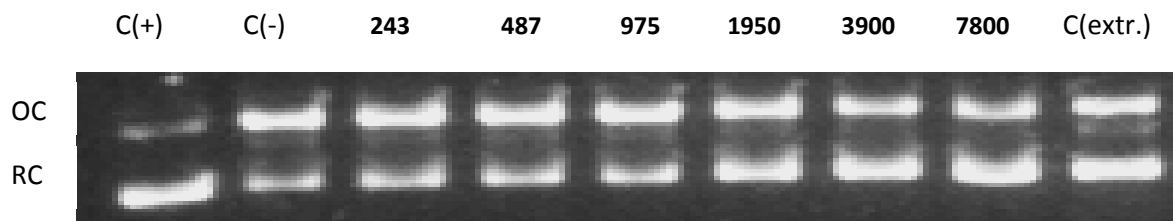
Διάγραμμα 3.3.1 Επίδραση του εκχυλίσματος 1 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 2



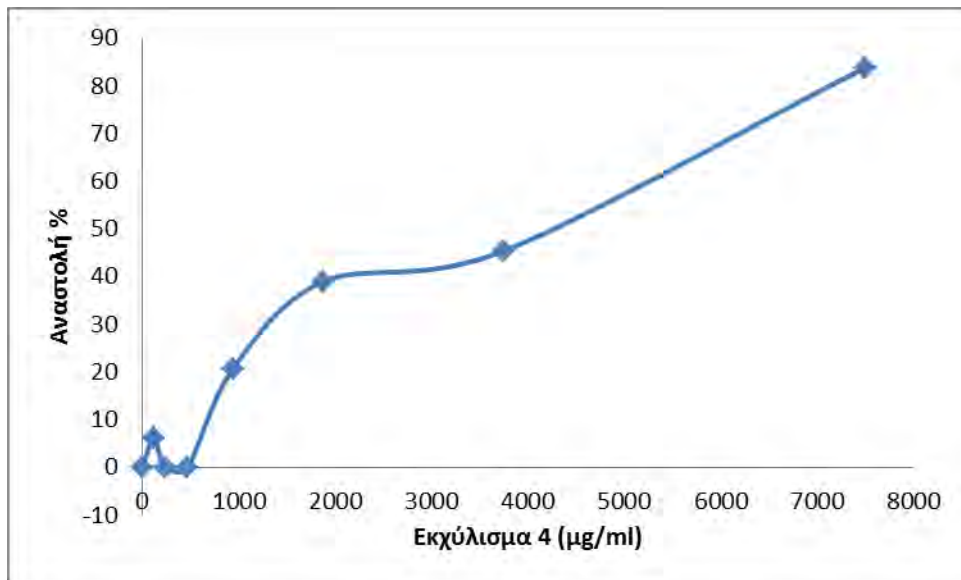
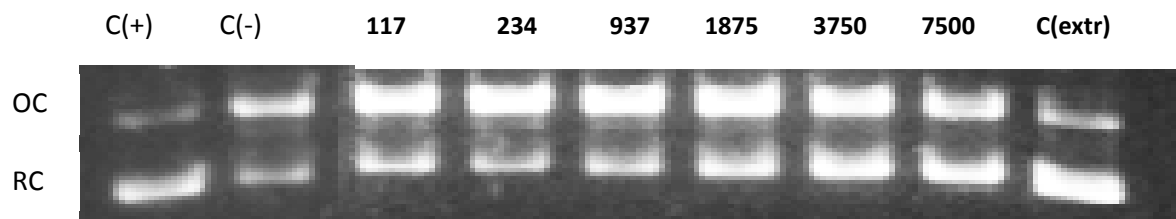
Διάγραμμα 3.3.2 Επίδραση του εκχυλίσματος 2 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•]

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 3



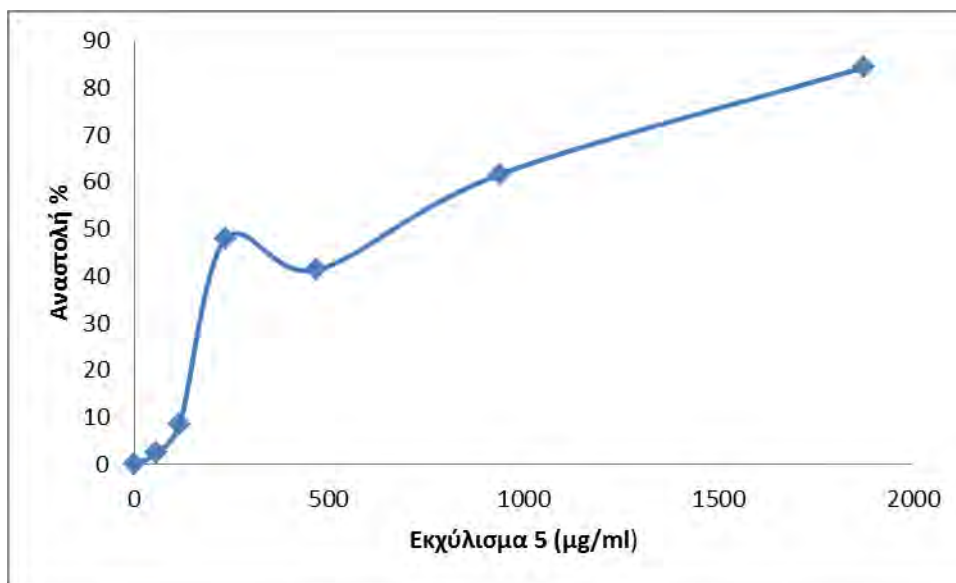
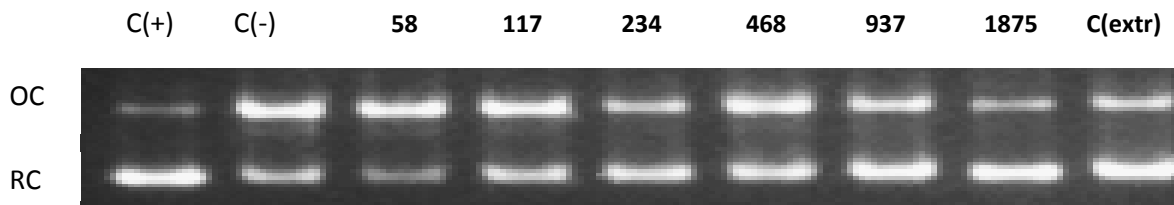
Διάγραμμα 3.3.3 Επίδραση του εκχυλίσματος 3 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 4



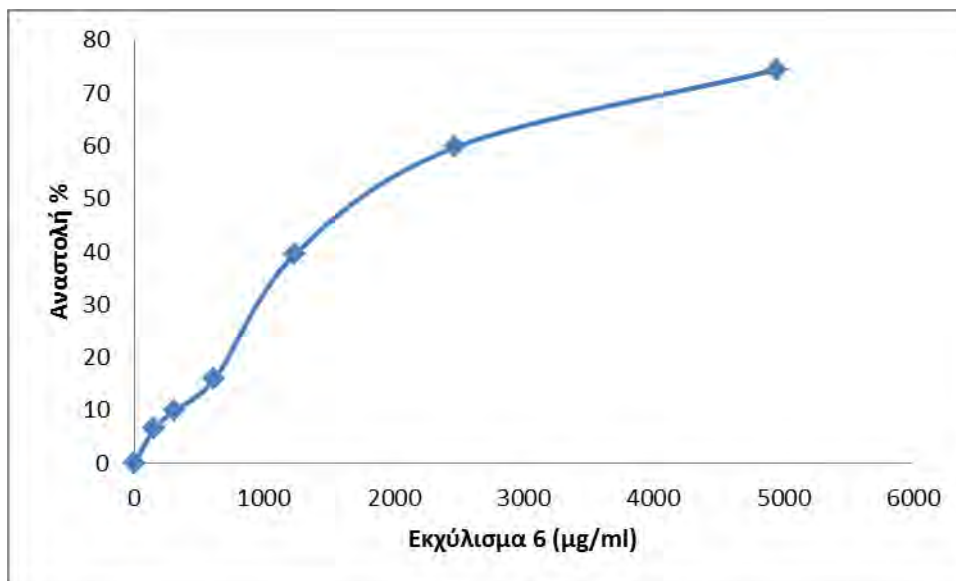
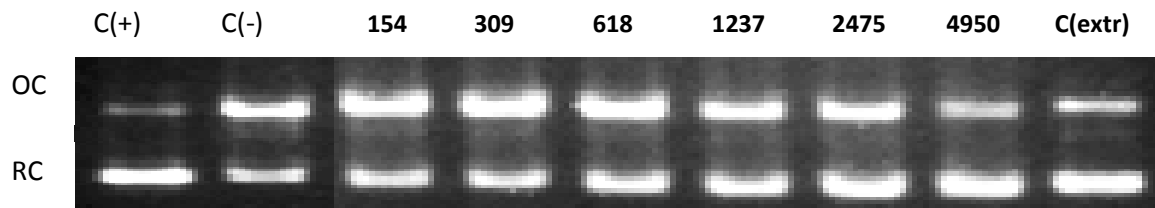
Διάγραμμα 3.3.4 Επίδραση του εκχυλίσματος 4 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 5



Διάγραμμα 3.3.5 Επίδραση του εκχυλίσματος 5 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

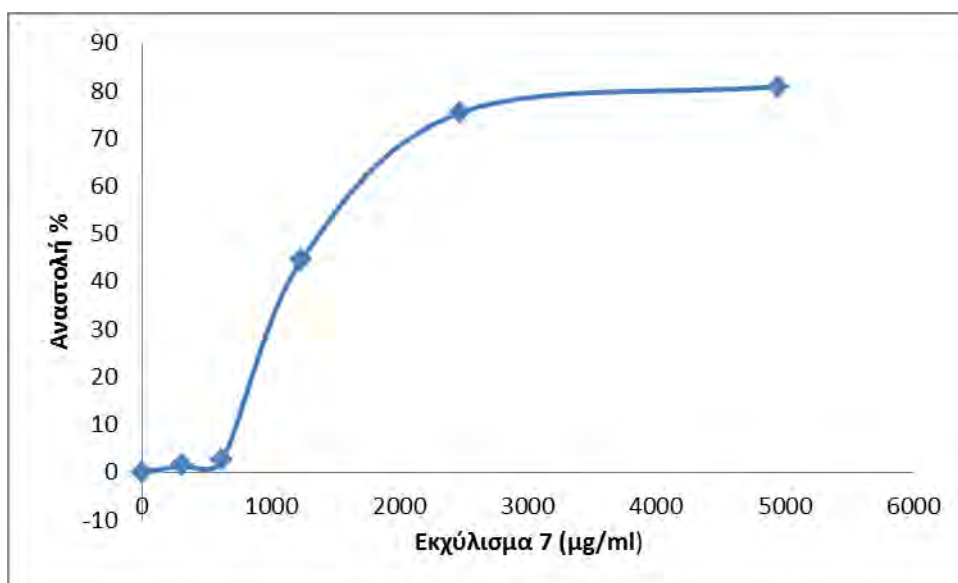
Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 6



Διάγραμμα 3.3.6 Επίδραση του εκχυλίσματος 6 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

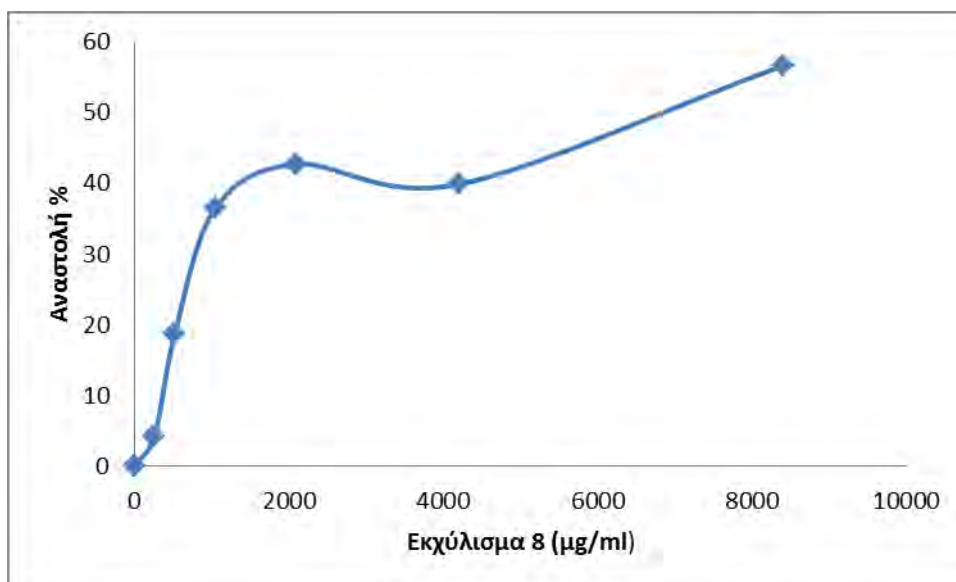
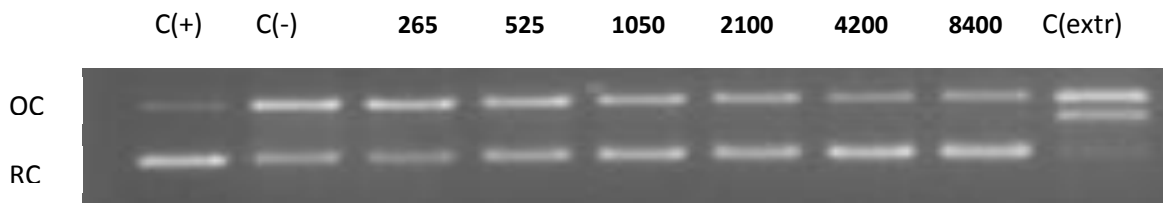
Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 7

	C(+)	C(-)	309	618	1237	2475	4950	9900	C(extr)
OC									
RC									



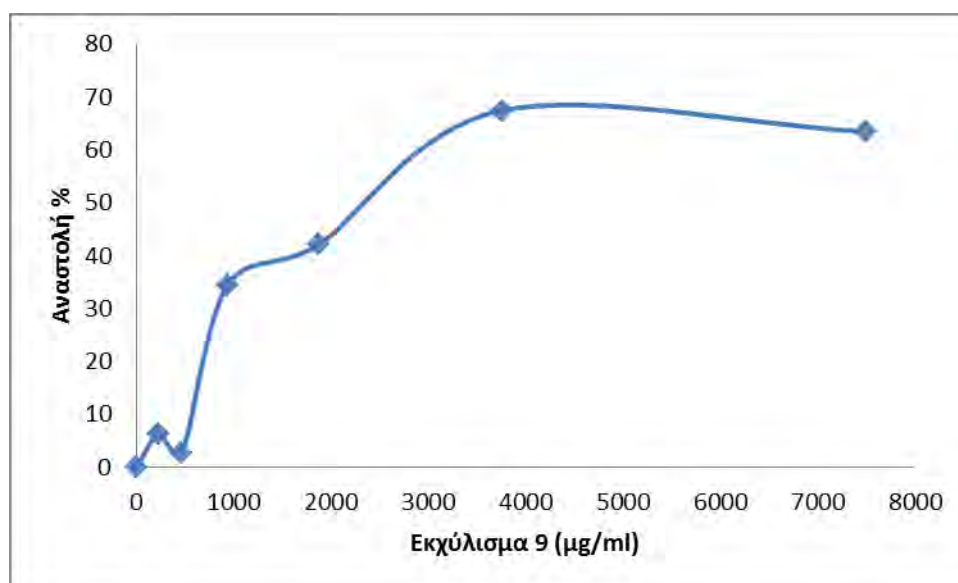
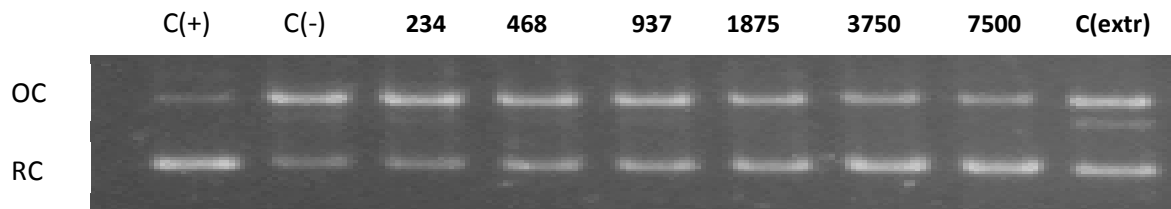
Διάγραμμα 3.3.7 Επίδραση του εκχυλίσματος 7 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 8



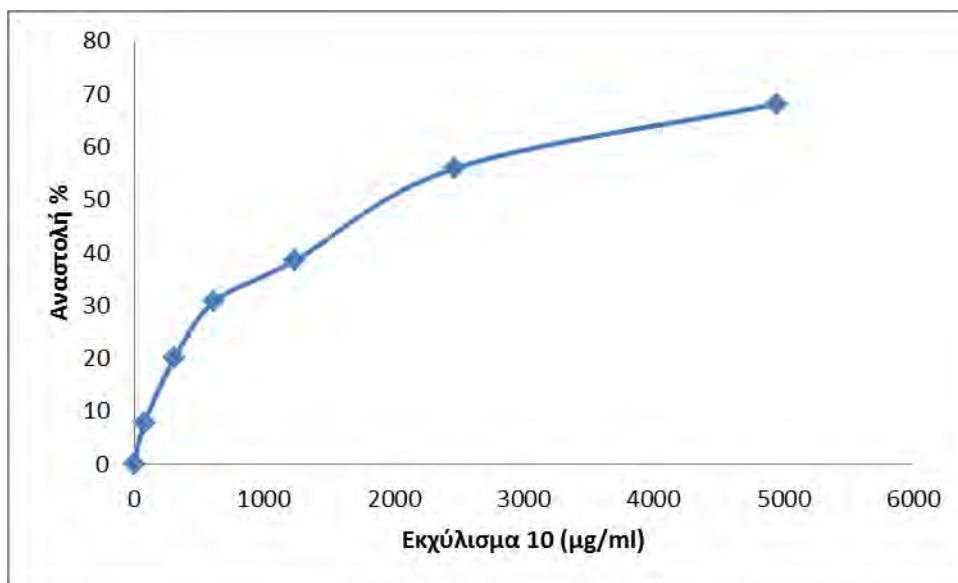
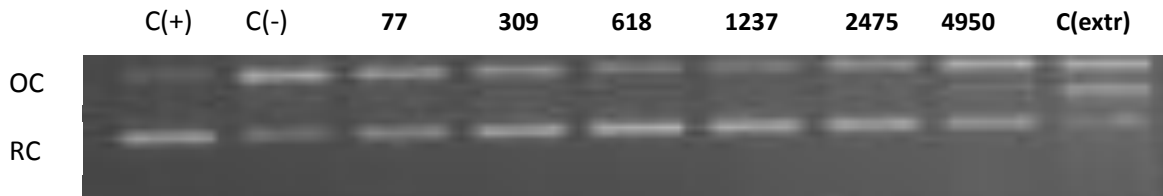
Διάγραμμα 3.3.8 Επίδραση του εκχυλίσματος 8 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 9

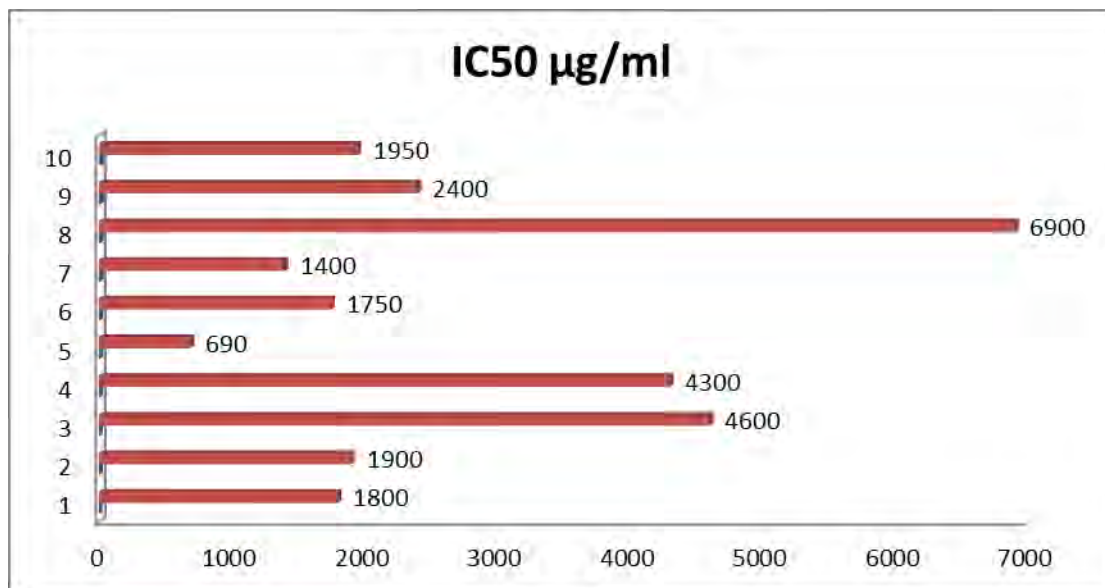


Διάγραμμα 3.3.9 Επίδραση του εκχυλίσματος 9 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) από το εκχύλισμα 10



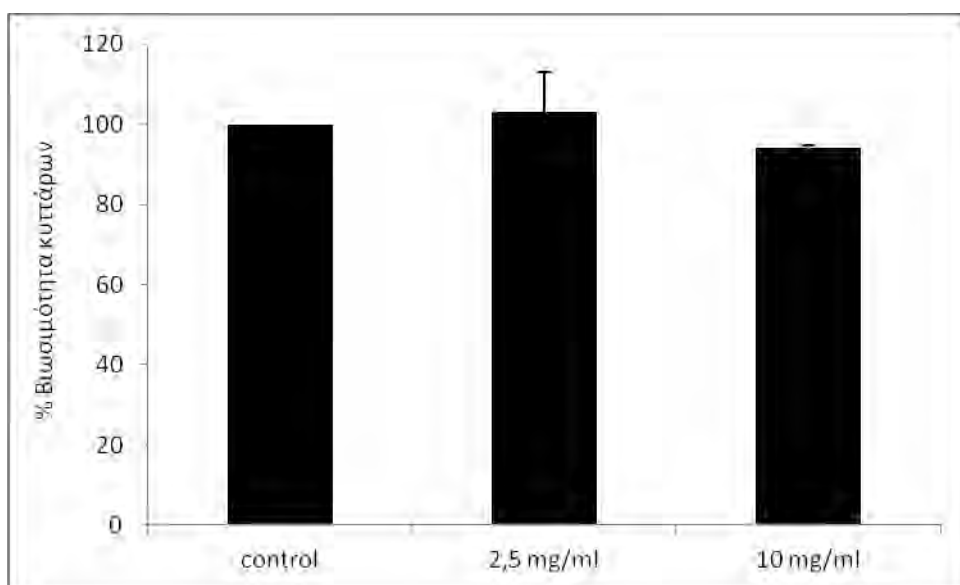
Διάγραμμα 3.3.10 Επίδραση του εκχυλίσματος 10 στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].



Διάγραμμα 3.3.11 Ε Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλίσμάτων από Goji Berry για την αλληλεπίδραση στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.

3.4 Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος Goji Berry με τη μέθοδο του XTT.

Σε αυτή τη μέθοδο εξετάστηκε το εκχύλισμα 5 διότι από το σύνολο των μεθόδων προκύπτει πως είναι το πιο ισχυρό. Το εκχύλισμα 5 δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στους μυοβλάστες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (2,5 mg/ml και 10 mg/ml).

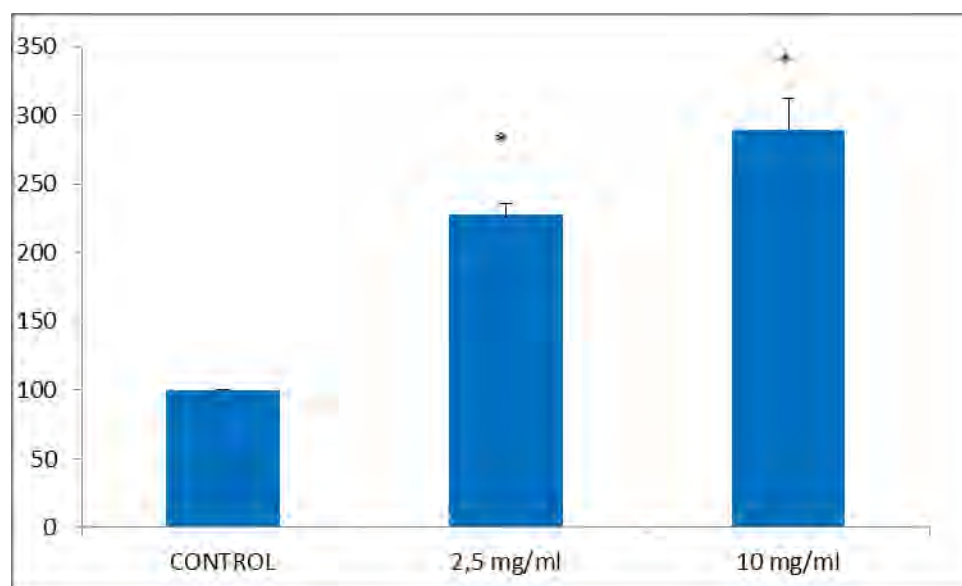


Γράφημα 1: Η % βιωσιμότητα των C2C12 κυττάρων από το εκχύλισμα 5 (2,5 mg/ml και 10 mg/ml).

3.4.1 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) μέσω κυτταρομετρίας ροής

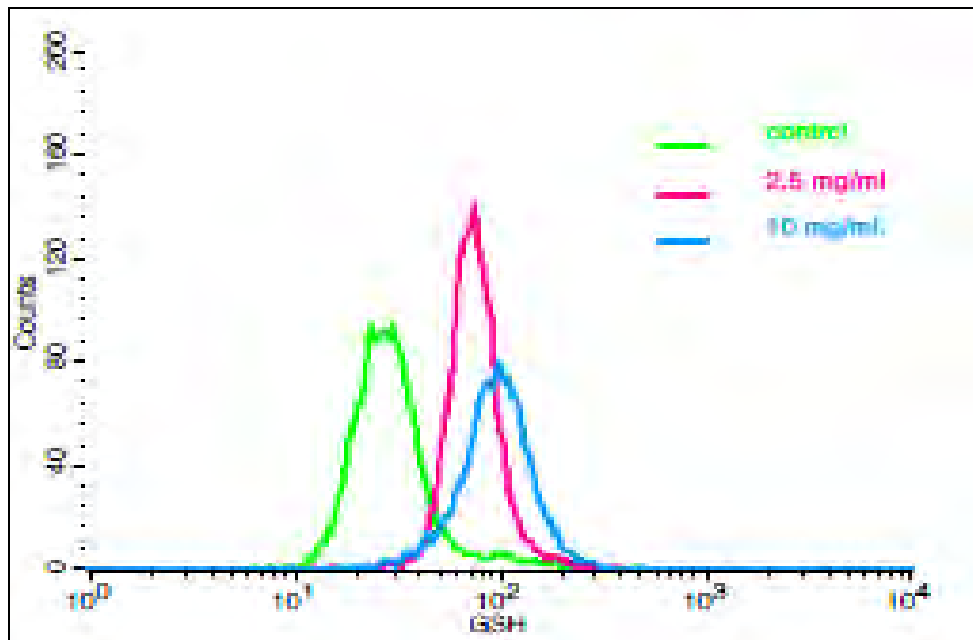
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στους μυοβλάστες C2C12 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα 5 (2,5mg/ml και 10mg/ml) για 24 ώρες. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 2 τα επίπεδα της γλουταθειόνης μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος 5 αυξήθηκαν σημαντικά κατά 127,5%, και 189,5%, σε σχέση με το control.

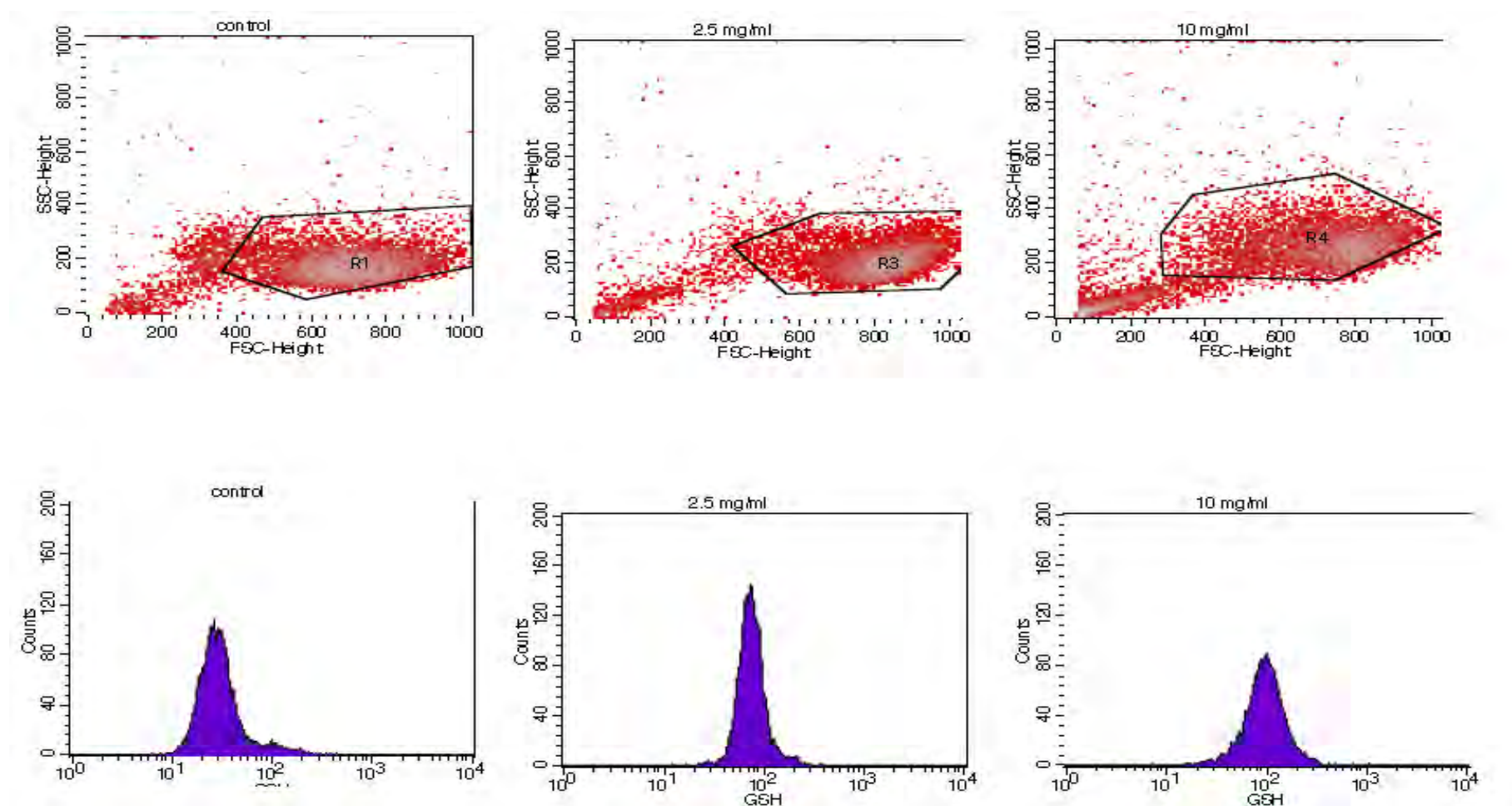


Γράφημα 2: Επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 5 (2.5 και 10 mg/ml). * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control ($P < 0.05$).

Στο γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος 5. Όπως παρατηρείται στο γράφημα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος 5 έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.



Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής



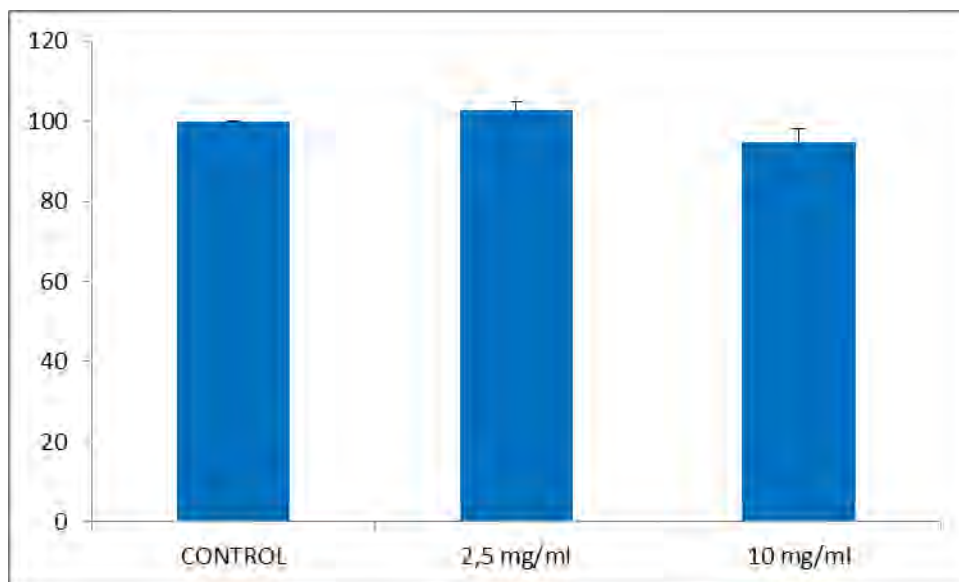
Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 5 (2.5 mg/ml και 10 mg/ml).

3.4.2 Προσδιορισμός επιπέδων ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής

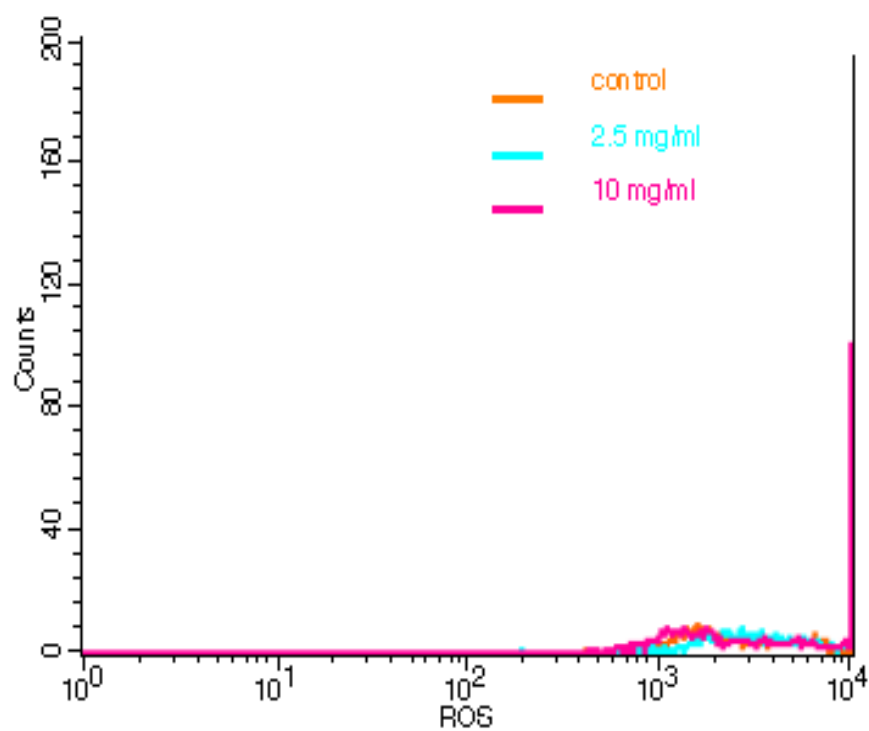
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στους μυοβλάστες C2C12 έπειτα από επώαση με το εκχυλίσμα 5 (2,5 mg/ml και 10mg/ml) για 24 ώρες. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5 στα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος 5 δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε σχέση με το control.

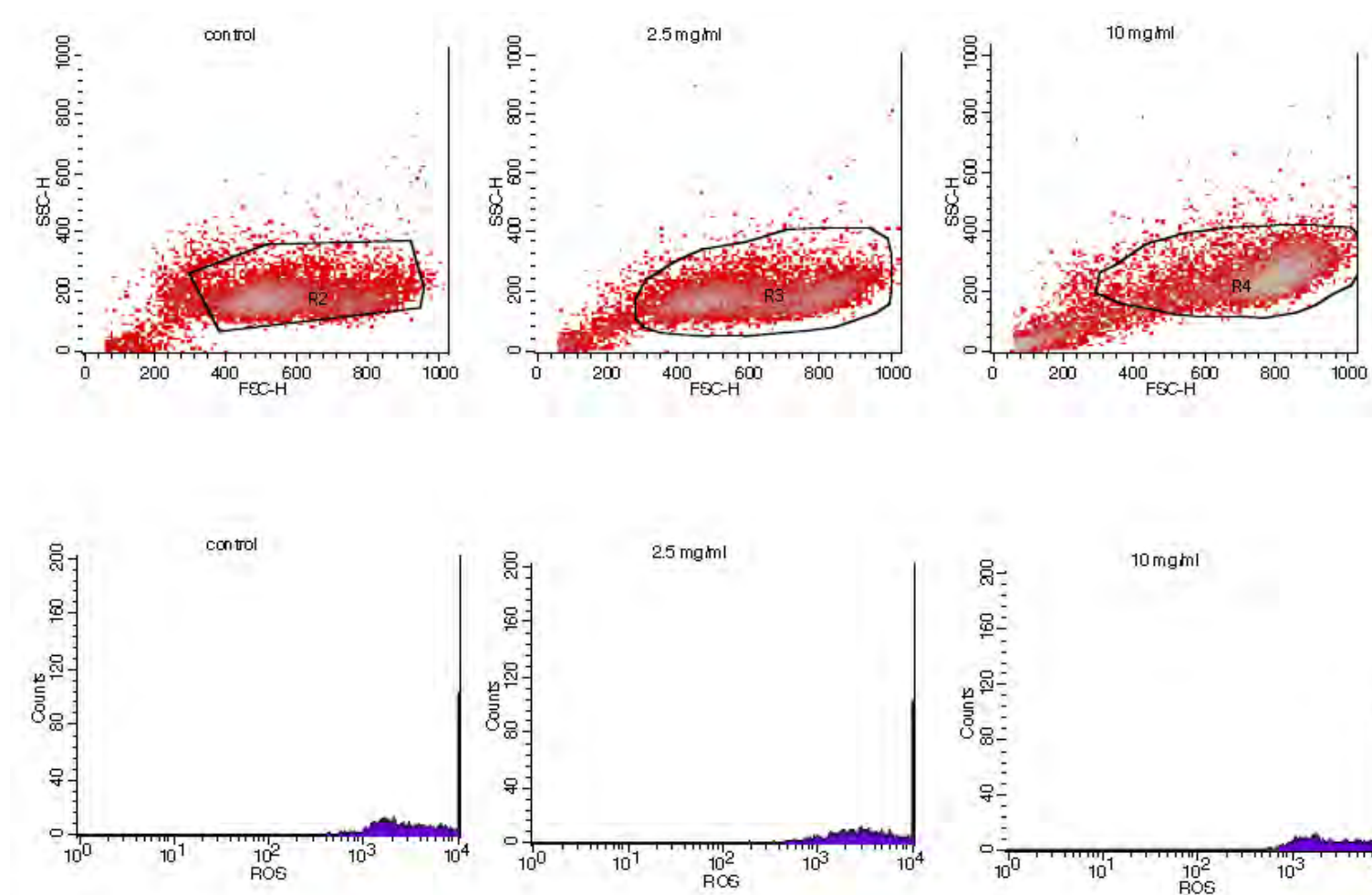
Στο γράφημα 6 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Οι καμπύλες αντιστοιχούν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος 5.



Γράφημα 5 : Επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στους μυοβλάστες C2C12 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 5 (2.5 και 10 mg/ml).



Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής σε σχέση με το control και τις συγκεντρώσεις 2,5 και 10 mg/ml



Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων C2C12 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή των ελευθέρων ριζών (ROS) στα κύτταρα C2C12 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με DCF υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και υπό την επίδραση του εκχυλίσματος

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια, για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινολών, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), η πρόωρη γήρανση (Wiseman et al., 1995) και το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έτσι καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Χημειοπροστατευτικές ιδιότητες αποδίδονται για παράδειγμα σε εκχυλίσματα αμπέλου (*Vitis vinifera*) κυρίως λόγω των πολυφαινολικών συστατικών που περιέχουν (Torres et al, 2002). Ομοίως τα ψυχανθή και ιδιαίτερα οι καρποί τους, τα όσπρια, που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη) (Mathers, 2002), καρδιαγγειακές παθήσεις (Anderson et al., 1999) και διαβήτη (Venn & Mann, 2004). Έχει ακόμη αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων, τους προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefer & Milner 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στο δενδROLίβανο, το φασκόμηλο, τη ρίγανη, τη μέντα και το θυμάρι (Zandi & Ahmadi, 2000) καθώς τα συστατικά των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια αυτή παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση (Craig, 1999).

Επίσης, οι καρποί του Goji Berry παρέχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία καθώς περιέχουν εκτός των άλλων και υψηλά ποσοστά πολυφαινολών (Zhao Y. et al 2007). Στα φρούτα του Goji berry βρίσκονται πολυφαινόλες που περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες, όπως υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκιναμικά οξέα, ανθοκυανίνες, προανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, στιλβένια και λιγνάνια (Moyer

RA, et al 2002, Manach C et al 2004). Οι καρποί του Goji berry περιέχουν επίσης 21 ιχνοστοιχεία, 18 αμινοξέα, 6 βιταμίνες, 8 πολυσακχαρίτες 6 μονοσακχαρίτες, 5 ακόρεστα λιπαρά οξέα (συμπεριλαμβάνονται και τα απαραίτητα λιπαρά οξέα λινολενικό και α-λινολενικό οξύ), β-σιτοστερόλη και άλλες φυτοστερόλλες, 5 καροτενοειδή (διπαλμιτική ζεαξανθίνη (56%), μονοπαλμιτική ζεοξανθίνη, παλμιτική β-κρυπτοξανθίνη, β-καροτένη, ζεαξανθίνη). Τα περισσότερα αυτών ανήκουν στην κατηγορία των φυτοχημικών (Webb, 2006) και μπορούν να δρουν συνεργικά καθώς ο καρπός περιέχει τόσο υδατοδιαλυτά (π.χ., πολυσακχαρίτες (LBP), βιταμίνη C) όσο και λιποδιαλυτά (π.χ., ζεαξανθίνη) βιοδραστικά συστατικά (Sze et al.,2008, Ορδούδη,2007, Μουρτζινός, 2007). Από τη δεκαετία του '80 και μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών, προερχόμενες κυρίως από τον επιστημονικό χώρο της ιατρικής, έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των ευεργετικών δράσεων από την κατανάλωση των καρπών του Goji berry. Αυτές μελέτησαν κυρίως τις αντιοξειδωτικές, και αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς και την επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ειδικότερα περιγράφουν ότι η κατανάλωση Goji berry συμβάλλει στην προστασία του αμφιβληστροειδή χιτώνα των ματιών (Liu et al. 1999), στην προστασία του ήπατος (Zhe et al. 1999), στη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Wang et al.1999, Chao et al. 2004, Amagase, et al.2009b) και την ενίσχυση του οργανισμού σε καταστάσεις κόπωσης (Amagase & Nance, 2008). Σε μία μελέτη του 2011 έχει καταγραφεί ότι η κατανάλωση Goji berry συμβάλλει στην καλή λειτουργία του οργανισμού προσδίδοντας του ιδιότητες όπως της αντιγήρανσης, της νευροπροστασίας, της προστασίας από το γλαύκωμα και τον διαβήτη, και αντικαρκινικές (Amagase & Farnsworth, 2011a, Mao et al 2011).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν από τον καρπό Goji Berry. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι η ρίζα ROO[•]. Άλλωστε, η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Σε όλες τις μεθόδους προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών

που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Επίσης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής.

Το σύνολο των 14 εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH•. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 51 $\mu\text{g/ml}$ έως 4650 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν του δείγματος 9a με IC_{50} 51 $\mu\text{g/ml}$. Οι τιμές IC_{50} των υπολοίπων μεθανολικών δειγμάτων (4a, 8a, 10a) είναι χαμηλότερες από αυτές των υδατικών και κυμαίνονται από 1500 έως 2000 $\mu\text{g/ml}$. Το γεγονός ότι το δείγμα 9a ήταν από καρπό Goji Berry της ποικιλίας chinensis αποτελεί ένδειξη πως η συγκεκριμένη ποικιλία έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την ποικιλία. Παρ'όλο που το δείγμα 9a βρέθηκε ως το πιο ισχυρό από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH• η μέθοδος Folin, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην αρχική διαδικασία παρασκευής των εκχυλισμάτων, έδειξε πως το εκχύλισμα 9a δεν έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινόλων. Αυτό δείχνει ότι κυρίως η ποιοτική και λιγότερο η ποσοτική σύσταση σε πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων Goji berry παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Επίσης, ίσως να υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS^{•+} έδειξε σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσής της. Έτσι, το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 180 $\mu\text{g/ml}$ έως 1100 $\mu\text{g/ml}$. Στην περίπτωση αυτής της μεθόδου το εύρος των τιμών IC_{50} ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μέθοδο του DPPH•. Αν και το πιο ισχυρό δείγμα σε αυτή τη μέθοδο είχε υψηλότερη τιμή IC_{50} σε σύγκριση με το πιο ισχυρό δείγμα στη μέθοδο DPPH•. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν του δείγματος 4a με IC_{50} 180 $\mu\text{g/ml}$. Στη μέθοδο ABTS^{•+}, όπως και στη μέθοδο DPPH, δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση με τη μέθοδο Folin καθώς σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο το 4a δεν είναι αυτό με τις περισσότερες πολυφαινόλες. Η απουσία συσχέτισης δείχνει ότι κυρίως η ποιοτική και λιγότερο η ποσοτική σύσταση σε πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Επίσης, ίσως να υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS. Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση και χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας DPPH οφείλεται κυρίως σε ενώσεις που είναι λιγότερο πολικές αφού η αντίδραση γίνεται σε μεθανόλη. Ενώ, στην μέθοδο ABTS η αντίδραση γίνεται σε υδατικό διάλυμα και έτσι η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως σε πολικές ενώσεις. Κατά συνέπεια, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για πιθανή προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO•. Σύμφωνα με τις τιμές IC₅₀ όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν αρκετά ισχυρή δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO• βλάβη στο DNA, με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 690 μg/ml έως 6900 μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν το εκχύλισμα 5 με IC₅₀ 690μg/ml. Το εκχύλισμα 5 ήταν αυτό και με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινόλων όπως έδειξε η μέθοδος Folin.

Το γεγονός ότι η τιμή IC₅₀ του δείγματος 5 στην επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες έναντι των ριζών ROO• ήταν η μικρότερη, καθώς και το ότι αυτό το εκχύλισμα είχε το μικρότερο μέσο όρο του IC₅₀ και από τις 3 μεθόδους (DPPH, ABTS και επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες έναντι των ριζών ROO•), οδηγεί στο συμπέρασμα πως ήταν το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και για αυτό εξετάστηκε στη συνέχεια η δράση του σε κυτταροκαλλιέργειες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πήραμε από τα πειράματα στα κύτταρα μπορούμε να πούμε πως το εκχύλισμα 5 εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Λόγω αυτής της δραστηριότητας του, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας χρήσιμος αντιοξειδωτικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT έδειξαν πως το εκχύλισμα δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες (2,5 και 10 mg/ml). Όσον αφορά τα επίπεδα γλουταθειόνης, που μετρήθηκαν με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου, έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα 5, αυξήθηκαν σημαντικά και στις 2 συγκεντρώσεις (2,5 και 10 mg/ml). Η επίδραση του

εκχυλίσματος Goji Berry στα επίπεδα γλουταθειόνης φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα αυτού σε πολυφαινόλες (Amagase H et al, 2009). Ωστόσο, τα επίπεδα των ROS, που επίσης προσδιορίστηκαν με κυτταρόμετρο, δεν επηρεάστηκαν από την επώαση με το εκχύλισμα 5 σε σύγκριση με το control. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι δεν υπήρξε αντιοξειδωτική προστασία. Θα πρέπει έτσι να μετρηθούν μελλοντικά και άλλοι δείκτες (π.χ. λιπιδική υπεροξειδωση, οξειδωση πρωτεϊνών) για να εξεταστεί η προστασία από το οξειδωτικό στρες του εκχυλίσματος 5 στους μυοβλάστες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα των δειγμάτων από τον καρπό Goji Berry παρουσιάζουν ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Επίσης, φαίνεται να ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα σε μυοβλάστες αυξάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης, ενός από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια του οργανισμού. Κατά συνέπεια, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι επιτακτική η αξιοποίηση του καρπού Goji Berry στην κατεύθυνση της ανάκτησης των φυτικών πολυφαινόλων που περιέχει και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Αυτό βέβαια θα πρέπει να γίνει με χρήση σύγχρονων και ασφαλών, για την ανθρώπινη υγεία, μεθόδων ανάκτησης (π.χ. εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα). Οι ανακτημένες από τον καρπό Goji Berry φυτικές πολυφαινόλες θα μπορούσαν επίσης να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων και καινοτόμων προϊόντων με πλούσιο βιοδραστικό περιεχόμενο είτε αυτά θα είναι βιοδραστικά τρόφιμα και ποτά είτε άλλου τύπου προϊόντα όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alacron De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Pharmacology. 1994 48:56-52

Amagase, H., Sun, B., & Borek, C.. Lycium barbarum (goji) juice shows significant in vivo antioxidant effects in human serum in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. Nutrition and Research, 29. 2009b; 19-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2008.11.005>

Amagase, H., & Nance, D. M. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized Lycium barbarum (Goji) Juice, GoChiTM. Journal of Alternative and Complementary Medicine. 2008; 14, 403-412. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2008.0004>

Amagase, H., & Farnsworth, N. R. A Review of Botanical Characteristics, Phytochemistry, Clinical Relevance in Efficacy and Safety of Lycium barbarum Fruit (Goji). Food Research International. 2011a; 44, 1702–1717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.027>

Amagase H¹, Sun B, Borek C, (2009)
(Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults.

Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. 1999 Cardiovascular and renal benefits of dry beans and soybean intake. Am J Clin Nutr 70: S464-474.

Arnao M, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chem. 2001; 73:239–44.

Baruchel S, Wainberg MA, “The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus”: Journal of Leukocyte Biology, 52, 111–114: 1992

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. Technol. 28, 25-30.

Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. J Nutr. 2000 130:2109S–2114S.

Boulton DW, Walle UK, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. J Pharm Pharmacol. 1998 50:243–249.

Caragay AB, "Cancer- preventative foods and ingredients" Food Tech 46(4), 65-68: 1992.

Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. Am J Clin Nutr. 2001 73:920-926.

Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. J Nutr. 2000 130:1963–1970.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. Anticancer Res. 1993 13:2165-2170

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. Anticancer Res. 1993 13:2165-2170

Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. J Nat Prod. 1992 55:179–183.

Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. J Mol Med. 2000 78:333-336.

Craig WJ, "Health Promoting Properties of Common Herbs", Am. J Clin Nutr 70(3): 491-499, 1999.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. Am J Physiol. 1999 277:120–126.

Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 11:815-821.

Dangles O, Dufour C, Bret S. Flavonol–serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. J Chem Soc. 1999 2:737–744.

Deprez S, Mila I, Huneau J-F, Tomé D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. Antioxid Redox Signal. 2001 3:957–967.

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

Evans PH, "Free radicals in brain metabolism and pathology", British Medical Bulletin, 49: 577–587, 1993

Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*. 1998 19:2151–2158

Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 48:3597-3604.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.

Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. 2001 41:492–499.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.

Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9

Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*

Halliwell B and Gutteridge JMC, “Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme bgy* 186, 1990.

Halliwell B, Gutteridge JMC, “Free Radicals in Biology and Medicine”, 11: 416-493, 188-266, 1989.

Halliwell B, Gutteridge JMC, “The antioxidants of human extracellular fluids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.

Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine*. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993 342:1007-1011.

Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1995 62:1276–1282.

Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J*. 2002 43:236–241.

Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*. 1997 278:1073-1077.

Kaefer CM, Milner JA, “The role of herbs and spices in cancer prevention”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6): 347-361, 2008.

Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA, Elliott BE. Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high-frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment. *J Cell Physiol Suppl*. 1984 3:87-97.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 312:478-481.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002 76: 560-568.

Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*. 1976 24:117–191.

Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000 92:154-160.

Lee M-J, Wang Z-Y, Li H, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995 4:393–399.

Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res*. 1994 54:1895s-1898s

Liu N, Lee Z, Zao A. The protection by wolfberry from retinal damage in mice. In: Bai S, ed. *Ningxia Lycium Barbarum L. Research*. Ningxia, P.R. China: Ningxia People's Press. 1999;642-644

Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols, food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47

Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47

Mathers J.C. 2002 Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br J Nutr* 88: S273-9.

Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003 784:137–144

Medina, M.B. (2011): Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods* 3: 79-87.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Copinathan, V., Milner, A. (1993). A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407-412.

Mira Elena IONICĂ^{1,*}, Violeta NOUR¹ and Ion TRANDAFIR², 2012
Polyphenol content and antioxidant capacity of Goji Berry (*Lycium chinense*) as affected by the extraction solvents

Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits, *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J Agric Food Chem* 2002;50:519–25.

Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential gynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25

Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, “Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases”, *Immunopharmacology*, 1: 3–36: 1991.

Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27,1173-1181

Qiuyun Zhang, Weiwei Chen, Jianhua Zhao, Wanpeng X, 2016)
Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes

Radtke J, Linseisen J, Wolfram G. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food composition survey. *Z Ernahrungswiss.* 1998 37:190–197

Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis.* 1989 10:1833-1839.

Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956

Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002 177:67-80.

Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 2000 80:1094–117

Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, 130:20735-855

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “The role of oxidative stress in the genesis of heart disease”, *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998

Scheneeman, B. O. Relationship of food nutrition and health in *Essentials of functional foods*.Schmidl, M.K.; Labuza, T. P. Eds.Aspen publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.2000;Chapter 1;3-7

Scheline RR. *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds.* CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.

Shapiro SL, Figueredo, AJ, Caspi O, Bootzin R, Schwartz G, Lopez AM, Lake D. Going quasi: the premature disclosure effect in a randomized clinical trial. *J Behav Med* 2002;25(6):605 – 21.

Skenderidis Prodromos, Petrotos Kostantinos, Giavasis Ioannis, Hadjichristodoulou Christos , Tsakalof Andreas Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berries and evaluation of extracts phytochemistry,2014

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “The role of oxidative stress in the genesis of heart disease”, *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998

Stagos D, Karaberis E anf Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo*: 741-747

Sze S.C.W, Song J, Chang R.C.C, Zhang K.Y, Wong R.N.S, Tong Y. Research advances on the anti-aging profile of *Fructus lycii*: An ancient Chinese herbal medicine. *J Comp Int Med.* 2008;5:1–17

Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* 1976 36:2699-2702.

Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998

Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555

Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998.

Trosko JE, Chang CC, Medcalf A. Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.* 1983 6:511-526

Trosko JE, Chang CC. Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 1989 49:283-295.

Valavanidis A, "Free radicals in organic chemistry", University of Athens, 2006.

Venn B.J., Mann J.I. 2004 Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr* 58: 1443-1461

Wang B, Xing S, Zhou J. Effects of *Lycium Barbarum* polysaccharides on the immune response of T, CTL and NK cells in normal and cyclophosphamide-treated mice: In: Bai S, ed. *Ningxia Lycium Barbarum L. Research*. Ningxia, P.R. China: Ningxia People's Press. 1999;706-711

Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect.* 2002 110:79-84.

Wattenberg L W, "Chemoprevention of cancer", *Cancer Res*, 45: 1-8, 1985

Webb, G. P. *Dietary supplements and functional foods*. Blackwell Publishing, Ltd. Oxford, UK, 2006; Ch. 5, p.109-111, Ch. 8, p 165-166.

Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002 296:695-698.

Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120

Wu Z. Y, Raven P.H. *Flora of China* Vol. 17. St. Louis: Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press; 1994.2005).

Yaffe, D. & Saxel, O. Differentiation 7, 159–166 (1977).

Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 2003 307:230-236.

Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. Carcinogenesis. 1997 18:451–456.

Zhao Y. Berry fruit value-added products for health promotion. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007.

Zhe G, Tian G, Liu L, Wu X. The effect of Jilin wolfberry polysaccharide on mouse liver. In: Bai S, ed. Ningxia Lycium Barbarum L. Research. Ningxia, P.R. China: Ningxia People's Press. 1999;655-656.

Καράταγλης Σ., (1994), Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text

Κουρέτας Δημήτριος Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Λάρισα 2003.

Μουρτζινός Ι. Προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση διατροφοδραστικών ουσιών μικροενθυλακωμένων σε δομές πολυμερών. 2007 Διδακτορική Διατριβή. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ορδούδη Σ.. Φαινολικά οξέα ως παρεμποδιστές οξείδωσης-αξιολόγηση δραστηριότητας, προοπτική αξιοποίησης σε λειτουργικά τρόφιμα 2007. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης