



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης σε εκχυλίσματα από *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus spinosa*

Assessment of antioxidant and protective activity against ROS induced DNA damage of extracts from *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* and *Pyrus spinosa*



ΧΡΟΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

1

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Αριστείδης Τσατσάκης: Καθηγητής Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Δημητρίου Στάγκου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα, το οποίο μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις καθώς και τον καθηγητή κ. Τσατσάκη Αριστεΐδη, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησής μου.

Τέλος ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό μετά από πολλές μελέτες που έχουν γίνει, ότι οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, σχετίζονται με πλήθος ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα αρκετά φυτικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτική και η αντιμεταλλαξιγόνος δράση που έχουν. Σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τα είδη φυτών *Rosa canina* και *Pyrus spinosa* της οικογένειας των ροδοειδών (*Rosaceae*), και από τα είδη *Lupinus albus* και *Lupinus angustifolius* της οικογένειας των ψυχανθών (*Leguminosae*). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS, με ισχυρότερο το εκχύλισμα *Rosa canina* με IC50 100μg/ml και IC50 60μg/ml αντίστοιχα. Επίσης εξετάστηκε και η ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στην δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]). Την χημειοπροστατευτική δράση την ποσοτικοποιήσαμε από την αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική μορφή. Οι τιμές των IC50 κυμάνθηκαν από 420 έως 1080 μg/ml.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση που είχε η χορήγηση μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης πολυφαινολικού εκχυλίσματος *Rosa canina*, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων. Εξετάστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης και ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι το εκχύλισμα προκαλεί βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, καθώς είχαμε αύξηση της γλουταθειόνης (GSH) έως και 43,1%, η οποία είναι το σημαντικότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό, και μείωση στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) έως και 13,4%.

Τα αποτελέσματα της έρευνας μας έδωσαν αρκετές πληροφορίες για την αντιμεταλλαξογόνο δράση των εκχυλισμάτων και της επίδρασης του εκχυλίσματος *Rosa canina* σε επιθηλιακά κύτταρα, οποίο μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω για τις ευεργετικές του δράσεις.

ABSTRACT

It is known after many studies, that free radicals and oxidative stress relate to a variety of diseases, like cancer and cardiovascular diseases. Additionally, a lot of extracts derived from plants are rich in polyphenols, which have important biological attributes, like antioxidative capacity and chemo-protective activity. In that study, we examined extracts from plants of the Rosaceae family, *Rosa Canina* and *Pyrus Spinosa*, and from *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* of the Leguminosae family. We tested in vitro the antioxidant capability of the extracts with DPPH and ABTS assays. In both assays the extract from *Rosa Canina* was the most antioxidant with IC₅₀:100µg/ml for the DPPH assay and IC₅₀:60µg/ml for the ABTS assay. Furthermore, we examined the capability to protect DNA from free radical-induced monoclinal fragments, specifically from peroxy (ROO[•]) radicals. The chemo-protective/anti-mutagenic activity was quantified from the inhibition of the free radical-induced conversion of DNA plasmid supercoiled form to relaxed form. The IC₅₀ values ranged from 420 to 1080 µg/ml.

Next, we examined the effect on the cell redox status, when we treated human endothelial cells with non-cytotoxic concentrations of *Rosa Canina*. The levels of glutathione and those of free radicals were measured using flow cytometry. According to the results we found that the extract improved the redox status of cells by increasing glutathione (GSH) levels up to 43.1%, which is the most important non-enzymatic endogenous antioxidant, and by reducing, although slightly, free radical (ROS) levels up to 13.4%.

The results of the study provided significant information for the protective activity of extracts against free radical-induced DNA damage as well as the effect of *Rosa Canina* extract on epithelium cells, which can be further studied for its beneficial effects.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.2. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	10
1.2.1. Ενδογενείς πηγές.....	10
1.2.2. Εξωγενείς πηγές.....	11
1.3. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	11
1.3.1. Θετικές επιδράσεις.....	11
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	11
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	13
1.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	15
1.5. Οξειδωτικό στρες.....	18
1.6. Πολυφαινόλες.....	19
1.7. Κατηγορίες Πολυφαινολών.....	20
1.7.1. Φλαβονοειδή.....	20
1.7.2. Πολυφαινολικά οξέα.....	22
1.7.3. Στιλβένια.....	22
1.7.4. Λιγνάνες.....	23
1.8. Φυτά.....	23
1.8.1. <i>Pyrus spinosa</i>	24
1.8.2. <i>Rosa canina</i>	24
1.8.3. <i>Lupin</i>	25
1.8.3.1. Το λευκό λούπινο (<i>Lupinus albus</i>).....	26
1.8.3.2. Το κυανό λούπινο (<i>Lupinus angustifolius</i>).....	26
2. ΣΚΟΠΟΣ	27
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.1. Αντιδραστήρια.....	28
3.2. Εκχυλίσματα.....	28
3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•.....	29
3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+.....	31
3.5. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA...	34

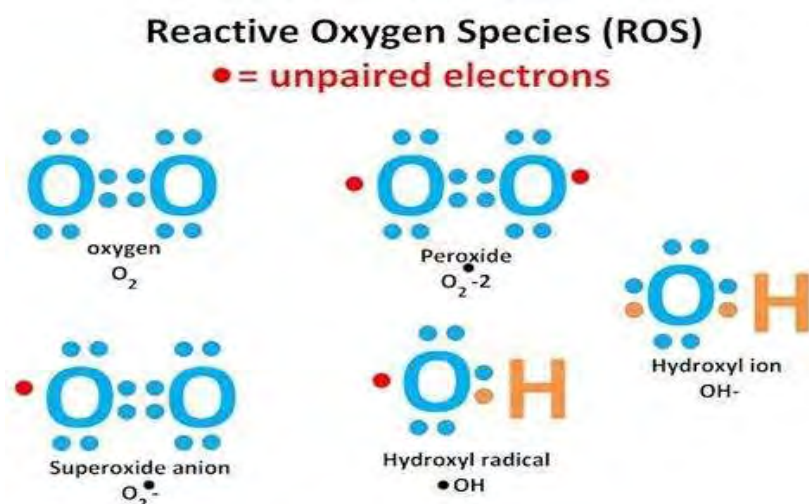
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	35
3.6. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926	39
3.7. Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης	40
3.8. Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1. DPPH	45
4.2. ABTS	48
4.3. AAPH	51
4.4 ΧΤΤ	53
4.5. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	53
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια, άτομα ή ιόντα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και υπάρχουν ελεύθερα (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η διαμόρφωσή τους αυτή είναι πολύ ασταθής και τις κάνει ιδιαίτερα δραστικές. Μπορούν έτσι εύκολα να οξειδώσουν και να βλάψουν ζωτικά βιολογικά μόρια όπως λίπη, πρωτεΐνες και το DNA με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική τους στιβάδα. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι ή προέρχονται από δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) ή δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS). Τα δραστικά είδη οξυγόνου περιλαμβάνουν όχι μόνο ρίζες, όπως είναι το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) και το ανιόν υδροξυλίου (OH^{\bullet}), αλλά και μερικά προϊόντα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$). Ο όρος δραστικά είδη αζώτου περιλαμβάνει τις ρίζες αζώτου όπως το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\bullet}) και τις μη ρίζες αζώτου όπως η ρίζα του $ONOO^{\bullet}$.

Οι ελεύθερες ρίζες αναπτύσσονται ενδογενώς στον οργανισμό σε ένα σύνολο μεταβολικών διαδικασιών (π.χ. μεταβολισμός των κατεχολαμινών, κυτταρική αναπνοή) και αυξάνονται από εξωτερικούς παράγοντες αλλά έχει παρατηρηθεί ότι έχουν και συμμετοχή σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στη μεταγωγή σήματος (Ji, 2007) και τη γονιδιακή έκφραση (Ji et al., 2006).



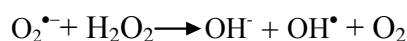
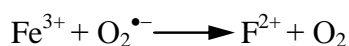
Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

1.2. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι πηγές παραγωγής των ελευθέρων ριζών μπορούν να διαχωριστούν σε ενδογενείς και εξωγενείς.

1.2.1. Ενδογενείς πηγές

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια της αναπνευστικής αλυσίδας για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), αντίδραση την οποία καταλύει η υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD) (Halliwell & Gutteridge, 1998). Μια ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, συνήθως σιδήρου, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση.



Η δραστηριότητα της παραγόμενης ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Μια άλλη πηγή παραγωγής ROS είναι η φλεγμονώδης αντίδραση. Αν και η σημασία της είναι μεγάλη κατά την απομάκρυνση ορισμένων υπολειμμάτων βακτηρίων ή ιικών πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση κάποιας μόλυνσης, σε αυτήν απελευθερώνονται ROS μεταξύ των οποίων H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και άλλα οξειδωτικά, από τα ουδετερόφιλα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν βλάβες (Meydani et al., 1992).

Επίσης, ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμοσφαιρίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$). Τέλος, το σύστημα του κυτοχρώματος P450 είναι μια σημαντική πηγή παραγωγής ROS (Yu, 1994). Το NADPH οξειδώνεται παράγοντας $O_2^{\bullet-}$, το οποίο οξειδώνει το υπόστρωμα του ενζύμου συμμετέχοντας στο μεταβολισμό διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών.

1.2.2. Εξωγενείς πηγές

Οι κυριότεροι εξωτερικοί παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών είναι το άγχος, η περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής), η ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία και διαφόρων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η βαριά σωματική άσκηση, το κάπνισμα, η κακή διατροφή, οι ασθένειες, τα φάρμακα, το αλκοόλ και άλλες τοξικές ουσίες.

1.3. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Όπως προαναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες έχουν αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό όμως είναι και απαραίτητες για ορισμένες βασικές λειτουργίες.

1.3.1. Θετικές επιδράσεις

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό αποτελεί μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία, η οποία είναι σημαντική κατά τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος (Reid, 2001). Παρουσία φλεγμονής σε κάποιο ιστό οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύοντας την καταστροφή των αντιγόνων κατά τη διαδικασία της φαγοκύτωσης (Fehrenbach et al., 2001). Συμπληρωματικά, οι ROS παίρνουν μέρος σε διαδικασίες όπως ο σχηματισμός του DNA, του RNA, ορισμένων πρωτεϊνών καθώς και στη μυϊκή συστολή.

1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις

Η χημική αστάθεια που παρουσιάζουν οι ελεύθερες ρίζες τις κάνει ικανές για αντίδραση με όλα σχεδόν τα βιομόρια. Έτσι, μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση τόσο DNA, όσο πρωτεϊνών και λιπιδίων.

Οξείδωση DNA

Το DNA είναι από τους πιο σημαντικούς στόχους των ελευθέρων ριζών. Μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση των αλυσίδων, αλλαγές σε αζωτούχες βάσεις και βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του με αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων και καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων (Radak et al., 1999; Dizdaroglu et al., 2002).

Οξείδωση λιπιδίων

Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό. Αρχικά, παρατηρείται η αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια και το σχηματισμό μιας αλκυλορίζας (-CH[•]-). Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει λιποϋπεροξειδικές ρίζες (ROO[•]) κατά τη διάρκεια της φάσης της διάδοσης. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες (ROO[•]) είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες (επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο). Με τον τρόπο αυτό οι ROO[•] προωθούν τη διάδοση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε άλλα λιπαρά οξέα (Halliwell & Gutteridge, 1998; Clarkson & Thompson, 2000).

Οξείδωση πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να επηρεάσει την τριτοταγή δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών έχοντας σαν αποτέλεσμα απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας όπως και θρυμματισμό των αμινοξέων των πρωτεϊνών (Radak et al., 1999). Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, άσκηση ή ισχαιμία-επαναιμάτωση. Τα λυσοσώματα και το πρωτεόσωμα είναι οι κύριοι αποικοδομητές των οξειδωμένων πρωτεϊνών όμως τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που

παράγονται από την πρωτεϊνική οξειδωση δεν εισέρχονται σε αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002).

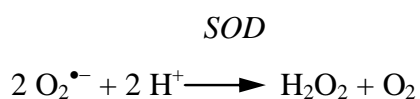
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτικό θεωρείται κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξειδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η δράση τους στηρίζεται στην παρεμπόδιση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, στη μετατροπή των ελευθέρων ριζών σε λιγότερο δραστικά μόρια και στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά του οργανισμού ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να καταταχθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.

1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι των ριζών σουπεροξειδίου και του οξειδωτικού στρες (Mylonas & Kouretas, 1999). Η SOD καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $\text{O}_2^{\bullet -}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Cu-Zn SOD) (Das et al., 1997).

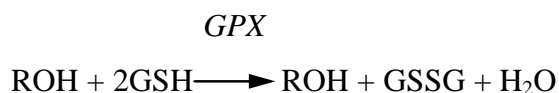
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα και διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό (H₂O) και μοριακό οξυγόνο (O₂) σύμφωνα με την αντίδραση:

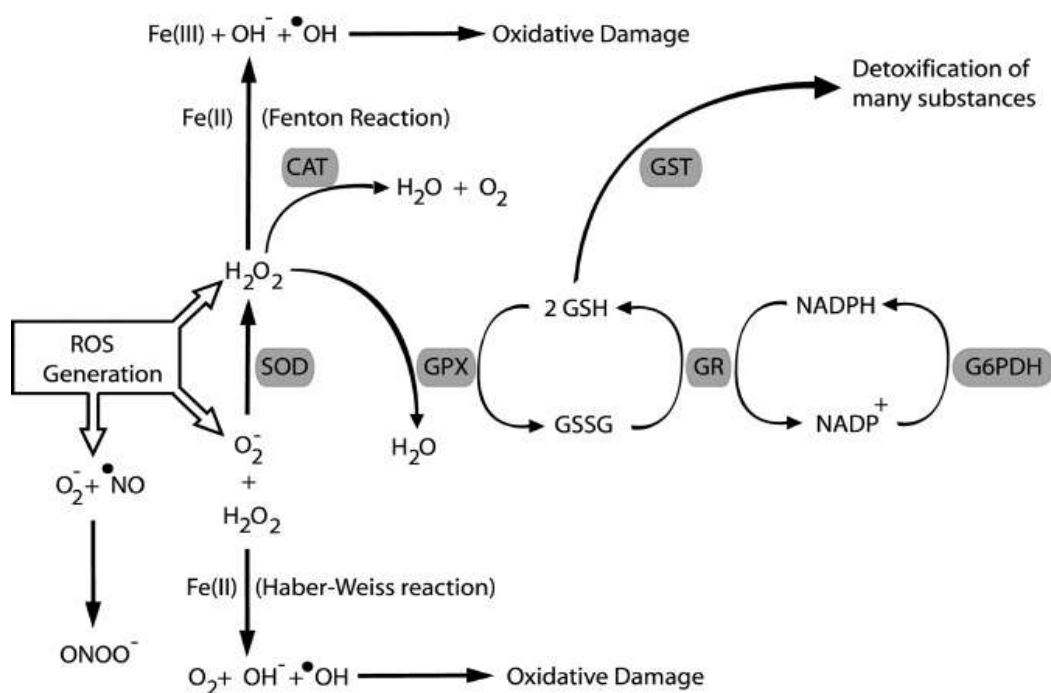


Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Πρόκειται για ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου. Η GPX καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση (CAT) έχουν την ίδια δράση ενάντια στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η GPX είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, ενώ η CAT δρα αποτελεσματικότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (Antunes et al., 2002).



Εικόνα2: Ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

1.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο, το οποίο περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό

επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης της από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Εξουδετερώνει και απευθείας τις ελεύθερες ρίζες ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Σε καταστάσεις που υπάρχουν μειωμένες ποσότητες GSH, αυτές μπορούν να εξισορροπηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους.

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία δρα τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στα υγρά των ιστών η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδραση τους με τις ROS (Finaud et al., 2006; Evans, 2000).

Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία έχει αρκετές ισομορφές γνωστές ως τοκοφερόλες. Βρίσκεται σε αφθονία στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων, οι οποίες είναι πλούσιες σε λιπίδια και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τις μεμβράνες από την λιπιδική υπεροξείδωση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο

Η βιταμίνη A είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη. Το β-καροτένιο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το β-καροτένιο και η βιταμίνη A δρουν σε συνεργασία με τις βιταμίνες E και C ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, αν κι έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτές (Livrea et al., 1995).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες οι οποίες σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ (Willcox et al., 2002). Έχει βρεθεί ότι καταστέλλουν τη δράση προοξειδωτικών ενζύμων *in vitro* ενώ έχουν επίσης την ικανότητα να απενεργοποιούν ορισμένες ελεύθερες ρίζες (Finaud et al., 2006).

Ουρικό οξύ

Πρόκειται για το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Η άσκηση οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Στη συνέχεια διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από ROS οξειδωσή τους (Hellsten et al., 1998). Έτσι, προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από το οξειδωτικό στρες (Wayner et al., 1987).

Συνένζυμο Q10

Είναι ένα μόριο, το οποίο βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης (Siemieniuk et al., 2005).

Άλλα αντιοξειδωτικά

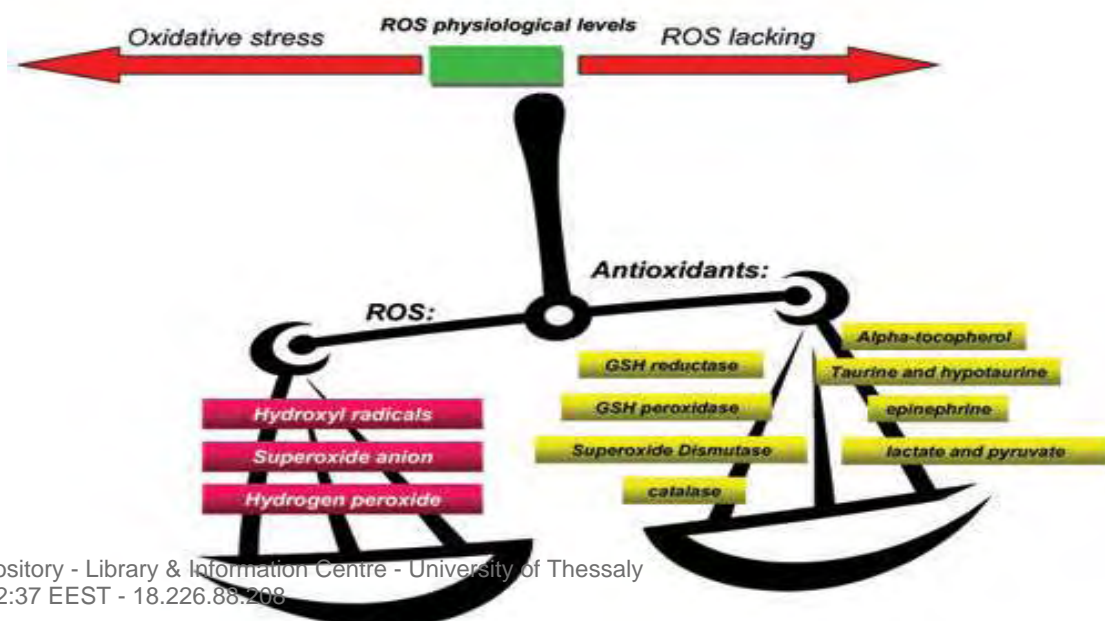
Διάφορες άλλες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη και η φερριτίνη έχουν αντιοξειδωτική δράση έναντι των ROS. Η φερριτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων του καθώς η υψηλή συγκέντρωσή του έχει προοξειδωτικές συνέπειες μέσω της αντίδρασης Fenton. Επίσης, ιχνοστοιχεία όπως χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος, σελήνιο και μαγγάνιο εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικές λειτουργίες ως συνεργιστικοί παράγοντες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Powers et al., 2004).

1.5. Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού υπέρ των πρώτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1998). Αυτή η διαταραχή μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω κάποιων μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Cu/Zn-SOD, CAT ή GPX). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Στις εξωγενείς πηγές συγκαταλέγονται η περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής), η ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική), η βαριά σωματική άσκηση καθώς και το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η κακή διατροφή, η λήψη φαρμάκων και τοξικές ουσίες. Στις ενδογενείς πηγές ανήκουν ένζυμα που παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ) καθώς επίσης και την άσκηση, το ψυχολογικό στρες, τη φλεγμονή, τον καρκίνο και τον κυτταρικό θάνατο. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες δρουν συχνά πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική

Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια καθώς και κυτταρικό θάνατο. Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο



σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσής του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες, που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του. Στον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο φτάνει είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενό του μπορεί να περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά μόρια όπως η καταλάση και η GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Εικόνα 3: Δημιουργία οξειδωτικού στρες

1.6. Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες απαραίτητοι για τη φυσιολογία των φυτών. Συνιστούν την φυσική άμυνα του φυτού απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια μύκητες και ιούς αλλά τις βλαβερές επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας, του όζοντος καθώς και περιβαλλοντολογικών μολύνσεων (Korkinaetal., 2009). Επιπλέον επιδρούν στους μηχανισμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των φυτών.

Οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες προέρχονται από τον μεταβολισμό πρωτογενών μεταβολιτών, κυρίως αμινοξέων και υδατανθρακών, μέσω μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης και γλυκοξυλίωσης. Μέχρι σήμερα χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αναγνωριστεί, οι οποίοι κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες τα τερπένια, τις πολυφαινόλες και τα μόρια που περιέχουν άζωτο (Korkinaetal., 2009). Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 8000 διαφορετικές δομές, διακρίνονται σε φλαβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδή, κουρκουμινοειδή, ταννίνες κ.α. (Rahmanetal., 2006). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ειδών είναι ότι διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο, ή και περισσότερους, υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, δηλαδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις (Duthieetal., 2003). Ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποδίδουν τις ωφέλιμες για την υγεία ιδιότητες των φυτών, των φρούτων, των βοτάνων, αλλά και τροφίμων και ποτών φυτικής προέλευσης στις πολυφαινόλες.

1.7. Κατηγορίες Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες: φλαβονοειδή, πολυφαινολικά οξέα, στιλβένια, λιγνάνες (Manachetal., 2004)

1.7.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και χαρακτηριστικό τους είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόλες. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δρουν προστατευτικά έναντι των βλαβών που προκαλούνται στα κύτταρα από τη δράση των ελευθέρων ριζών.

Παρόλα αυτά, τα φλαβονοειδή δεν είναι καθαρά αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση, η δράση τους μπορεί να είναι ωφέλιμη, δεδομένου ότι μια ήπια αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Procházková et al., 2011).

Φλαβανόλες: Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερούκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη (Manachetal., 2004).

Φλαβόνες: Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή), στα αμύγδαλα και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Wijeratneetal., 2006).

Φλαβονόλες: Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκيتينή, καθώς και η καμφερόλη, η μυρικετίνη και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manachetal., 2004).

Φλαβανόνες: Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Rangel-Huertaetal., 2015).

Ισοφλαβόνες: Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊδζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες (Chengetal., 2010). Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχουν την ικανότητα να ασκούν προστατευτική δράση στο ήπαρ έναντι της ηπατοτοξικότητας προκαλούμενης από ξενοβιοτικά (Widyarinietal., 2012).

Ανθοκυανιδίνες: Στις ανθοκυανιδίνες οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς, και του διαβήτη τύπου I και τύπου II, και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το

οξειδωτικό στρες (Chenet al., 2015). Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (π.χ. στο λάχανο, στα φασόλια, στη μελιτζάνα) αλλά είναι περισσότερο άφθονα στα φρούτα (Kozłowska et al., 2014; Pascual-Teresa et al., 2010).

1.7.2. Πολυφαινολικά οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Zamora-Ros et al., 2013). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Ludwig et al., 2014; Gazzani et al., 2012). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Klepacka and Fornal, 2006).

1.7.3. Στιλβένια

Στην κατηγορία των στιλβενίων αντιπροσωπευτική χημική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη. Είναι λιγότερο διαδεδομένη στη διατροφή σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες. Βρίσκεται γενικά στο κρασί και ειδικά στο κόκκινο. Έρευνες έχουν δείξει την αντιοξειδωτική της δράση, κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Sung and Dyck, 2015; Carrizo et al., 2013). Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των

πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertellietal., 1998; Flaminietal., 2013). Είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση.

1.7.4. Λιγνάνες

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνανών (AdlercreutzandMazur, 1997). Οι λιγνάνες έχουν μελετηθεί για τον προστατευτικό τους ρόλο σε καρδιαγγειακές ασθένειες (Chunetal., 2014).

Παρόλο που η σημασία των πολυφαινολών είναι εξαιρετικά μεγάλη, η αξιολόγηση των φυσιολογικών επιδράσεων συγκεκριμένων φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι εξίσου δύσκολη. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από συστατικά που ενδεχομένως να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιέχονται στο ίδιο τρόφιμο. Για παράδειγμα, πάνω από εξήντα διαφορετικά χημικά φλαβονοειδή περιέχονται στο κόκκινο κρασί. Αν και έχει διεξαχθεί ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων σχετικά με τα οφέλη των τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, για το οξειδωτικό στρες και τις υπερλιπιδαιμίες, εντούτοις τα αποτελέσματα που προκύπτουν θα χαρακτηρίζονταν ασαφή. Ωστόσο, τα συνεπέστερα ευρήματα ερευνών αφορούν το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες δρουν ευεργετικά στην ενδοθηλιακή λειτουργία και στην ομοίωση. (ManachC, 2005;SungandDyck, 2015; Carrizzoetal., 2013).

1.8. Φυτά

Τα φυτά που μελετήθηκαν είναι τα *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus spinose* και ανήκουν σε 2 μεγάλες οικογένειες φυτών. Τα *Rosa canina* και *Pyrus spinose* ανήκουν στην οικογένεια των ροδοειδών (*Rosaceae*) ενώ τα *Lupinus albus* και *Lupinus angustifolius* ανήκουν στην οικογένεια των ψυχανθών (*Leguminosae*).

1.8.1. *Pyrus spinosa*

Πρόκειται για φυλλοβόλο, αγκαθωτό δέντρο, που φτάνει τα 6 μέτρα ύψος. Τα νεαρά κλαδιά στην αρχή έχουν λευκές τρίχες, αργότερα όμως είναι γυμνά. Τα φύλλα είναι πράσινα επάνω και γαλαζωπά κάτω. Τα άνθη είναι λευκά. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες θέσεις και απαντάται σε ξέφωτα δασών, περιθώρια χωραφιών και δίπλα σε δρόμους. Η γκορτσιά (κοινή ονομασία) είναι ένα παμπάλαιο ελληνικό δέντρο. Ο καρπός (γκόρτσι) είναι σφαιρικός με χρώμα κιτρινοκάστανο και αρκετά στυφός, που όμως γίνεται νοστιμότατο γλυκό. Εξαιρετικά ανθεκτικό είδος, ανταπεξέρχεται πολύ καλά σε κάθε είδους υπόστρωμα, με προτίμηση σε pH ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο. Οι γνωστές φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι :

Αιμοστατικό, κατά της δυσπεψίας, κατά της διάρροιας, ψυκτικό, αντισπασμωδικό, ευεργετικό στις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και στην οδυνηρή δυσμηνόρροια.

Γνωστά συστατικά και ουσίες του είναι: Οξέα φρούτων: μαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, κουϊνικό οξύ, κυανογενικά γλυκοσίδια (αμυγδαλίνη), αρωματικές ουσίες, παράγωγα του καφεϊκού οξέος και κυρίως 5-κοφφεοϋλ-κουϊνικό οξύ, πηκτίνη.

1.8.2. *Rosa canina*

Το βότανο *Rosa canina* (Ροδή η κυνοροδή) ανήκει στην οικογένεια των Ροδοειδών. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες του φυτού. Τα αυτοφυή είδη στη χώρα μας υπολογίζονται σε 25 εκ των οποίων τα πιο αξιόλογα είναι η Αειθαλής (το κυνόσβατο του Διοσκουρίδη), η κανθοδεστάτη (η Ροδωνιά του Θεόφραστου), η Αρουραία, η Γαλλική, η Κυνοροδή και η Μόσχομος. Στη χώρα μας συναντούμε το φυτό με τις ονομασίες ροδαριά, κυνοροδή ή αγριοτριανταφυλλιά. Είναι θεραπευτικό και μελισσοτροφικό φυτό. Χρησιμοποιείται και ως υποκείμενο της δενδροειδούς τριανταφυλλιάς. Είναι φυλλοβόλο και το ύψος του κυμαίνεται από 1-3 μέτρα. Έχει στελέχη τοξοειδή με κυρτά αγκάθια και φύλλα πτεροειδή με οδοντωτά φυλλάρια. Οι καρποί (κυνόροδα) είναι ωοειδείς, λείοι με χρώμα πορτοκαλί και κόκκινοι όταν ωριμάσουν. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, συνήθως με 5 σέπαλα, 5 πέταλα, ανοιχτού ρόδινου χρώματος (σπάνια λευκά ή κίτρινα), μυρωδάτα. Οι καρποί σχηματίζονται από την ανθοδόχη που καθίσταται σαρκώδης. Τους καρπούς τους χρησιμοποιούσαν εδώ και αιώνες ως ξινό φρούτο αλλά μόνο στη διάρκεια του δεύτερου παγκόσμιου

πολέμου αναγνωρίστηκαν ως πλούσια πηγή βιταμίνης C. Τα φύλλα της αγριοτριανταφυλλιάς τα χρησιμοποιούσαν στο παρελθόν ως υποκατάστατο τσαγιού και για να φτιάχνουν σιρόπια, ενώ τον πολτό των καρπών τον χρησιμοποιούσαν για γλυκά.. Οι καρποί είναι πολύ πλούσιοι σε βιταμίνη C και έχει γίνει συσχετισμός του υψομέτρου που μεγαλώνουν τα φυτά, με την περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ (Romanetal.). Περιέχουν επίσης βιταμίνες A, B και K, οργανικά οξέα, τανίνη και φλαβονοειδείς χρωστικές (βιταμίνη P), καροτινοειδή (προβιταμίνη A), πηκτίνη, φυτικά οξέα και έλαιο.

Το βότανο είναι θρεπτικό και δρα ως ήπιο υπακτικό, ήπιο διουρητικό και ήπιο στυπτικό. Τα κυνόροδα είναι μία από τις καλύτερες φυσικές πηγές της βιταμίνης C. Είναι χαρακτηριστικό ότι 3 καρποί του φυτού αντιστοιχούν με τη βιταμίνη που μας προσφέρει ένα πορτοκάλι. Βοηθούν στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και ιδιαίτερα στα κρυολογήματα. Επίσης υπάρχουν αναφορές ότι μειώνει την πίεση, αυξάνει την ελαστικότητα των αγγείων, διεγείρει την αιμοποίηση, αυξάνει τα λευκά αιμοσφαίρια και βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία και έχει νευροπροστατευτική δράση. Είναι εξαιρετικό τονωτικό και βοηθά σε περιπτώσεις γενικής εξασθένησης και εξάντλησης, και χορηγείται σε περιπτώσεις οστεοαρθρίτιδας καθώς έχει αντιφλεγμονώδη δράση, πιθανότατα λόγω αναστολής της δράση των κυκλοοξυγενασών (Orhanetal.). Πρόσθετα, αναστέλλει φλεγμονές επαγόμενες από παρακενίνη *in vivo* (Lattanzioetal., 2011), καθώς επίσης έχει και *in vivo* ηπατοπροστατευτική δράση (Sadeghietal., 2016).

1.8.3. *Lupin*

Το λούπινο είναι ένα φυτό της οικογένειας των ψυχανθών που ανήκει στο γένος *Lupinus*. Υπάρχουν περίπου 300 είδη. Από αυτά καλλιεργούνται κυρίως τα εξής: Το λευκό λούπινο (*Lupinus albus*) το κίτρινο (*Lupinus luteus*), το κυανό (*Lupinus angustifolius*), το μαργαριτώδες λούπινο (*Lupinus mutabilis*).

Τα λούπινα είναι γνωστά από τα αρχαία χρόνια. Αναφέρονται δε από τον Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, όπως και αργότερα από διάφορους ευρωπαϊούς συγγραφείς.

Το λούπινο είναι ένα ποώδες φυτό, ετήσιο, ορθόκλαδο. Έχει ριζικό σύστημα που αναπτύσσει διακλαδώσεις και μία κεντρική κατακόρυφη ρίζα. Τα φύλλα των λούπινων είναι σύνθετα παλαμοειδή τα δε φυλλάρια τους εκπτύσσονται κυκλικά

γύρω από την άκρη του μίσχου. Τα άνθη του μπορεί να έχουν λευκό, κίτρινο, κυανό, μαργαριτώδες χρώμα και εκπτύσσονται επάκρια σε βότρες. Έχει βρεθεί ότι οι καρποί του κίτρινου λούπινου είναι πλουσιότεροι σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή από το λευκό ή το κυανό (Sigeretal.). Τα άνθη του φέρουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ανθέων των ψυχανθών. Τα λούπινα είναι φυτά αυτογόνιμα αλλά μπορούν να σταυρογονιμοποιηθούν με την βοήθεια των εντόμων. Παρά την μεγάλη τους σπουδαιότητα που έχουν στην διατροφή των ζώων αλλά και των ανθρώπων, σήμερα, καλλιεργούνται σε περιορισμένες εκτάσεις.

1.8.3.1. Το λευκό λούπινο (*Lupinus albus*)

Αυτό είναι ένα φυτό που αποκτά ύψος 20-40 εκατοστών αλλά μπορεί να φθάσει και το 1,5 μέτρο. Το στέλεχος του δεν διακλαδίζεται και καλύπτεται από λεπτές τρίχες. Κάθε φύλλο του αποτελείται από 7-9 φυλλάρια. Η κάτω επιφάνεια τους φέρει τριχίδια ενώ η επάνω όχι.

Τα άνθη του έχουν χρώμα λευκό, και φέρονται στην άκρη του βλαστού σε βοτρυώδεις ταξιανθίες. Ο καρπός του είναι λοβός που φέρει 2-4 μεγάλα σπέρματα. Το χρώμα των σπερμάτων είναι λευκό και σχήμα που πλησιάζει το τετραγωνικό.

Τα λευκά λούπινα είναι περισσότερο ευαίσθητα στο ψύχος. Μπορεί να καταστραφούν σε θερμοκρασίες -4 έως -5° C. Το λευκό λούπινο αντέχει περισσότερο στο ασβέστιο του εδάφους και μέχρι περιεκτικότητα 5-10%.

Οι νέες ποικιλίες του λευκού λούπινου καλλιεργούνται για την διατροφή των ανθρώπων επειδή είναι γλυκές, δηλαδή έχουν μικρές ποσότητες αλκαλοειδών όπως και οι παραδοσιακές ποικιλίες μετά από κατεργασία για απομάκρυνση των αλκαλοειδών ουσιών. Επίσης χρησιμοποιούνται, για χλωρή λίπανση αλλά και σαν κτηνοτροφικό φυτό για βόσκηση των ζώων.

1.8.3.2. Το κυανό λούπινο (*Lupinus angustifolius*)

Συνήθως έχουν ύψος 20-50 εκατοστά, αλλά μπορεί να φθάσουν και το 1 μέτρο. Τα στελέχη τους διακλαδίζονται από την βάση τους και έχουν λεπτές τρίχες. Κάθε φύλλο έχει 5-9 φυλλάρια των οποίων η κάτω επιφάνεια φέρει τριχίδια. Τα άνθη του έχουν κυανό χρώμα και σχηματίζουν στις άκρες των βλαστών ταξιανθίες από βότρες. Ο λοβός τους είναι τριχωτός και φέρει 4-6 σπέρματα. Τα σπέρματα έχουν

καστανόλευκο χρώμα και σχήμα στρογγυλό ενώ είναι μικρότερα από τα σπέρματα του λευκού λούπινου. Το είδος αυτό απαντάται συνήθως σαν αυτοφυές. Το είδος αυτό είναι το πιο ανθεκτικό από όλα τα είδη των λούπινων όσον αφορά τις χαμηλές θερμοκρασίες. Τα λούπινα αυτά δεν αναπτύσσονται καλά σε αμμώδη εδάφη αλλά έχουν καλύτερη προσαρμοστικότητα στα βαριά εδάφη. Το είδος αυτό είναι πρωιμότερο του κίτρινου λούπινου.

Υπάρχουν πολλές εμπορικές ποικιλίες αυτού του είδους. Όλες τους περιέχουν μικρές ποσότητες αλκαλοειδών (είναι γλυκές) και μπορούν να καταναλωθούν από τους ανθρώπους και τα ζώα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη φυτών *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus spinosa*, καθώς επίσης και η μελέτη και εκτίμηση με τη χρήση μοριακών μεθόδων της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης που ασκούν στο DNA παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του πιο δραστικού εκχυλίσματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών: τα Tris-HCl, Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), Όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), H_2O_2 (Υπεροξείδιο του Υδρογόνου) καθώς και το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία), η γλυκερόλη (Glycerol), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το EDTA ήταν της εταιρίας Panreac (Ισπανία), το βορικό οξύ (Boric acid) και το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropanehydrochloride) ήταν της εταιρίας Sigma (Γερμανία), η αγαρόζη (agarose) ήταν της εταιρίας Seakem (Η.Π.Α). Επίσης το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιείχε άλατα Earle's (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS), ο ορός εμβρύου μόσχου (FBS), τα διαλύματα των αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x), το διάλυμα της γλουταμίνης και η τρυψίνη (0.25%) αποκτήθηκαν από την εταιρία Gibco (GrandIsland, NY). Οι χρωστικές mercury orange και 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού (2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (StLouis, MO, USA). Το kit κυτταρικού πολλαπλασιασμού (XTT) αγοράστηκε από την εταιρία Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

3.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν, απομονώθηκαν από τα φυτά *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus spinosa*, με 2 διαφορετικούς διαλύτες, μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο. Όπου M το εκχύλισμα είναι μεθανολικό, όπου D η εκχύλιση έγινε με διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες διότι καθένας έχει διαφορετική πολικότητα, με αποτέλεσμα να εκχυλίζουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πίνακας 1: Λίστα φυτικών εκχυλισμάτων

<i>Φυτό</i>	<i>Μέρος φυτού</i>	<i>Διαλύτης</i>	<i>Κωδικός</i>
Rosa canina	Fruit	Μεθανόλη	6M
Rosa canina	Fruit	Διχλωρομεθάνιο	6D
Pyrus spinosa	Seed	Μεθανόλη	7M
Pyrus spinosa	Seed	Διχλωρομεθάνιο	7D
Lupinus albus	Seed	Μεθανόλη	9M
Lupinus albus	Seed	Διχλωρομεθάνιο	9D
Lupinus angustifolius	Seed	Μεθανόλη	10M
Lupinus angustifolius	Seed	Διχλωρομεθάνιο	10D

Αρχικά έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

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

Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williamsetal, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prioretal., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή

της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH^{*} την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH^{*}) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται παρακάτω.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	950μl	950μl
DPPH[*]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V ΤΕΛ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 2: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH^{*} αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (50μl εκχυλίσματος σε 950μl μεθανόλη) Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH^{*} σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

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

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

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH 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.

3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS^{•+}

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), **οξειδώνεται** και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) (Εικόνα 18). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της

εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{*+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prioretal., 2005; Milleretal, 1993).

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.

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

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

όπου: A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης,

εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

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

3.5. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν 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.

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα 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 δίκλιωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης, η οποία 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 διαμόρφωση.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LBbroth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στις 4000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL **διαλύματος 1** (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL **διαλύματος 2** (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA.

Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, για αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL

διαλύματος 3 (5M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 5000rpm στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στις 5000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στις 5000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL

Ποσότητα DNA = ABS₂₆₀ x 50x αραιώση

Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή.

Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες ROO• 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 .

Οι ρίζες ROO^\bullet έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA 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 αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO^\bullet .

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), Na_2HPO_4 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH_2PO_4 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 180mg/ml**: Σε 100μl PBS προστίθενται 18mg AAPH. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων στις εξής συγκεντρώσεις: 31, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA plasmid, AAPH180mg/ml 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 (30-280mg/ml) στα 45 min στους 37°C . Το ζητούμενο ήταν η συγκέντρωση που θα

χρησιμοποιήσουμε να προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 80% 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 παρακάτω πίνακα. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex). 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.

Πίνακας 4: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	PBS	Extract	DNA	AAPH	V τελ
Control (-)	8 μl	-	2 μl	-	10 μl
AAPH (+)	4 μl	-	2 μl	4 μl	10 μl
C1-C5	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl	10 μl
Max C	5 μl	3 μl	2 μl	-	10 μl

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. 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 (0,5μg/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 AlphaInnotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκε 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 + AAPH)

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

Για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή 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 Dunnett.

Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν αναστολή της δράσης των ριζών περοξυλίου κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.6. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα EA.hy926 (ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), τα οποία αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη

σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.7. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 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 450-500nm 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.

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml.

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10⁴ κυττάρων/θέση σε ένα 96-well plate. Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά

το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100 μl. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια των οποίων τα κύτταρα σε καθένα από αυτά έχει προέλθει από διαφορετική φλάσκα. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση αλλά και για το control χρησιμοποιείται τέταρτο πηγαδάκι που δε περιέχει κύτταρα για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του θρεπτικού και του εκχυλίσματος. Το πείραμα πραγματοποιείται εις τριπλούν. Έπειτα, το plate επωάζεται για 24 h στους 37⁰C και σε 5% CO₂.

Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα XTT σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. Το μείγμα του XTT προκύπτει από την ανάμιξη XTGA και XTTB (PMS), πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται αμέσως πριν την χρησιμοποίησή του. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm καθώς και στα 630nm (για καλιμπράρισμα) με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή των εκχυλισμάτων καφέ στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικής σειράς EA.hy 926 υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Για να θεωρηθεί μία συγκέντρωση εκχυλίσματος κυτταροτοξική, η βιωσιμότητα των κυττάρων θα πρέπει να είναι κάτω από 80% και αυτές οι συγκεντρώσεις δε χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής.

3.8. Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS

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. 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 λέιζερ) 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 στην αγορά 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.

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 μία ή περισσότερες ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) 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.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάζεται ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύεται στους 4°C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα.

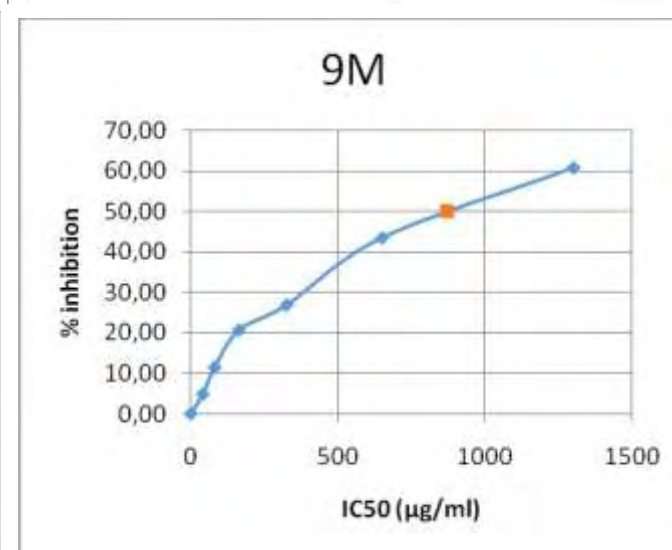
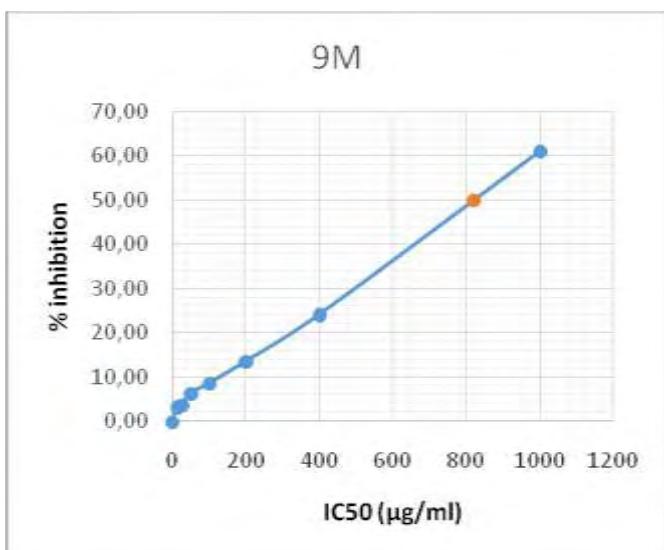
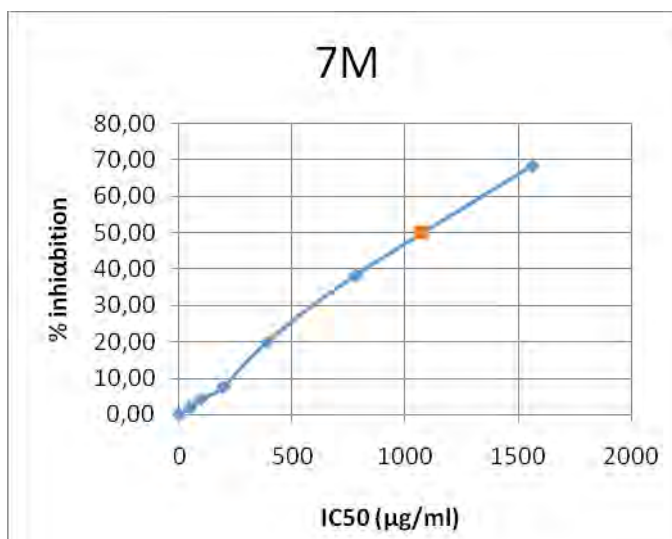
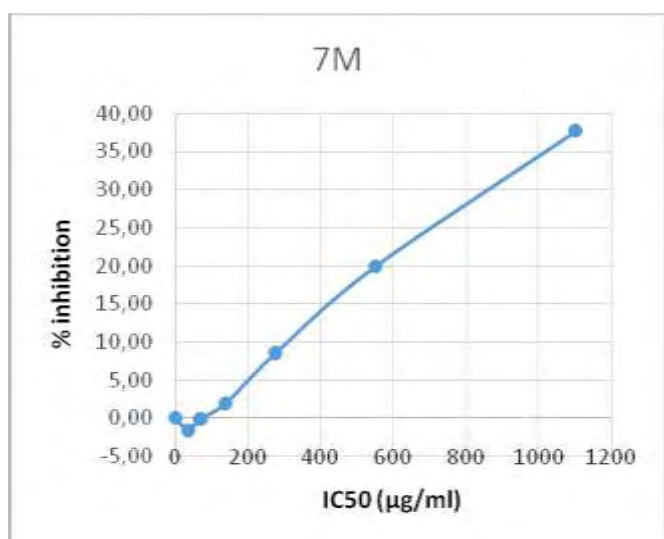
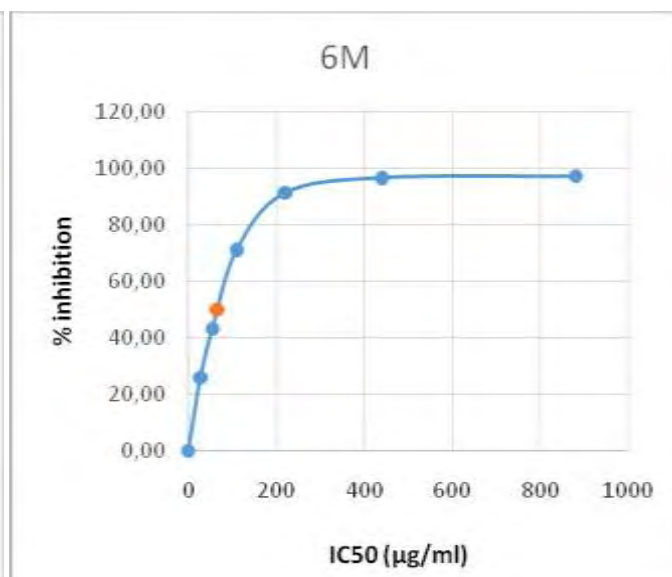
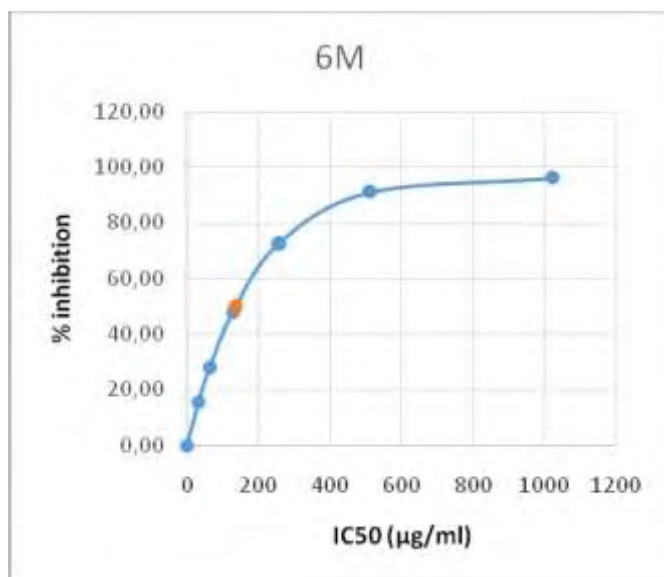
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργούνται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO₂. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει το εκχύλισμα *Rosa canina* σε εξεταζόμενες συγκεντρώσεις έως 1000μg/ml, οι οποίες έχει προκύψει από τη μέθοδο XTT ότι δεν είναι κυτταροτοξικές. Χρησιμοποιούνται και δύο φλάσκες control οι οποίες περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Έπειτα ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO₂.

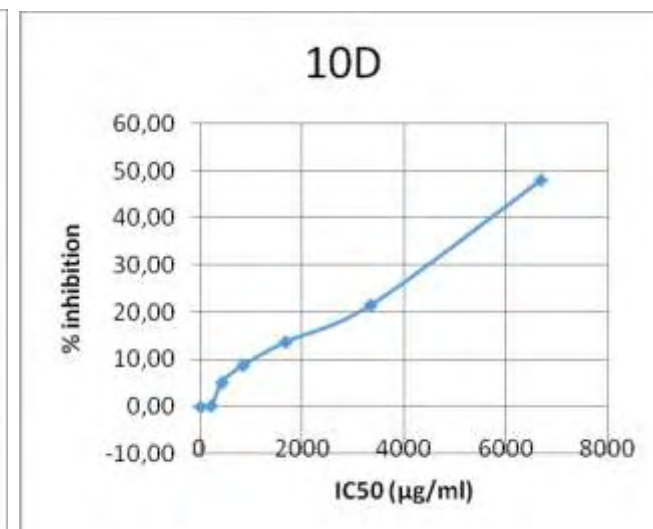
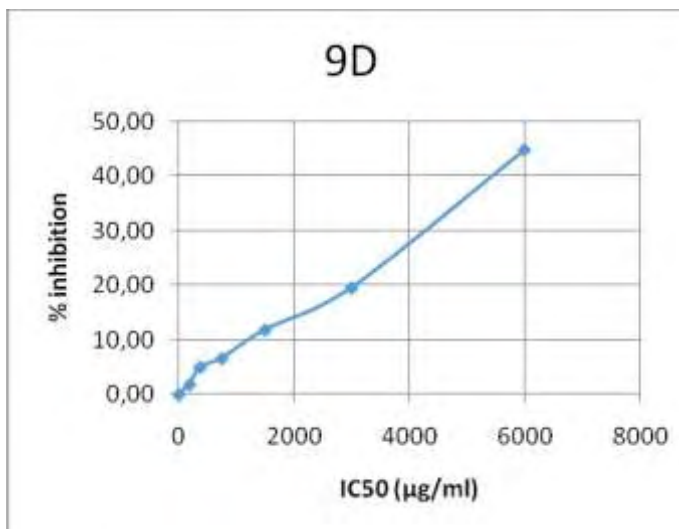
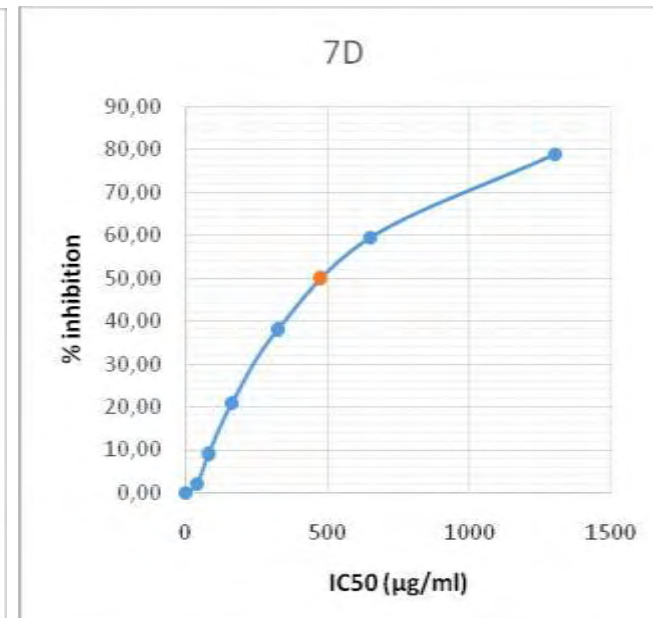
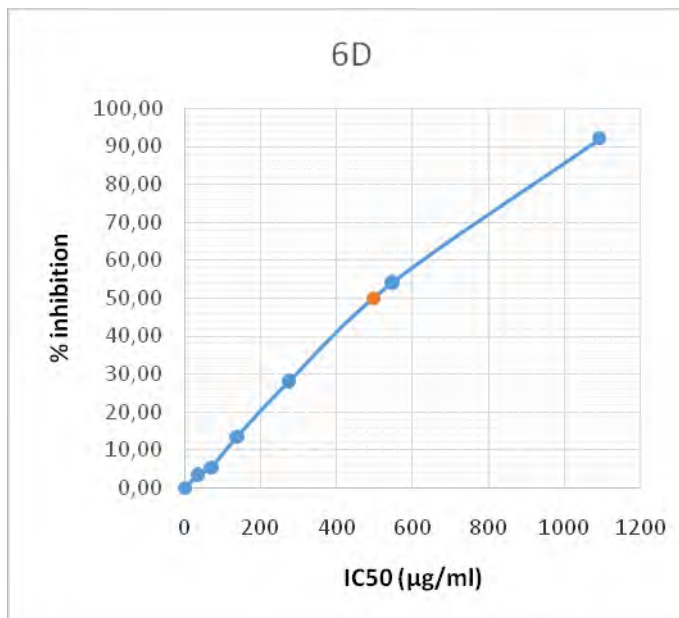
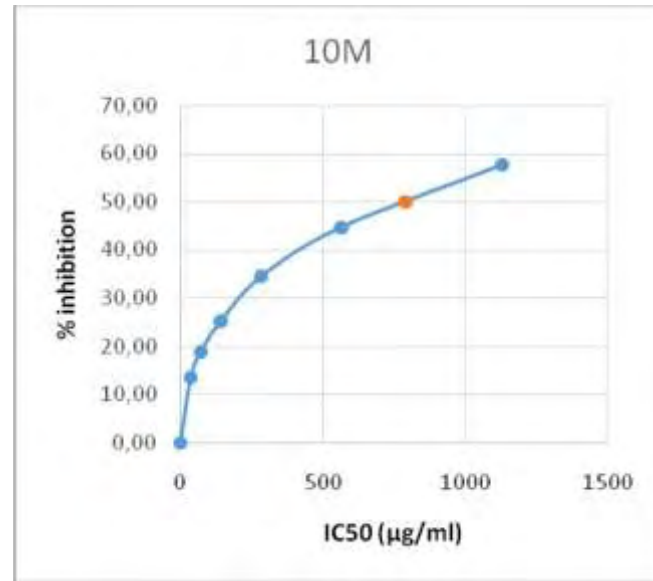
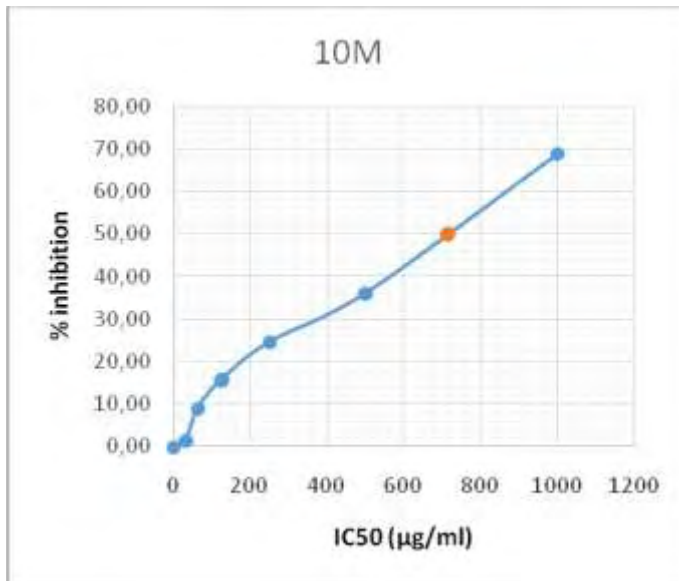
Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (333 μl 0,25% για τις 25cm² φλάσκες), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, μεταφορά κάθε φλάσκας σε falcon και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με 2mlPBS (0,01 M με pH 7,4), έπειτα φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά, αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 300μl PBS (0,01 M με pH 7,4).

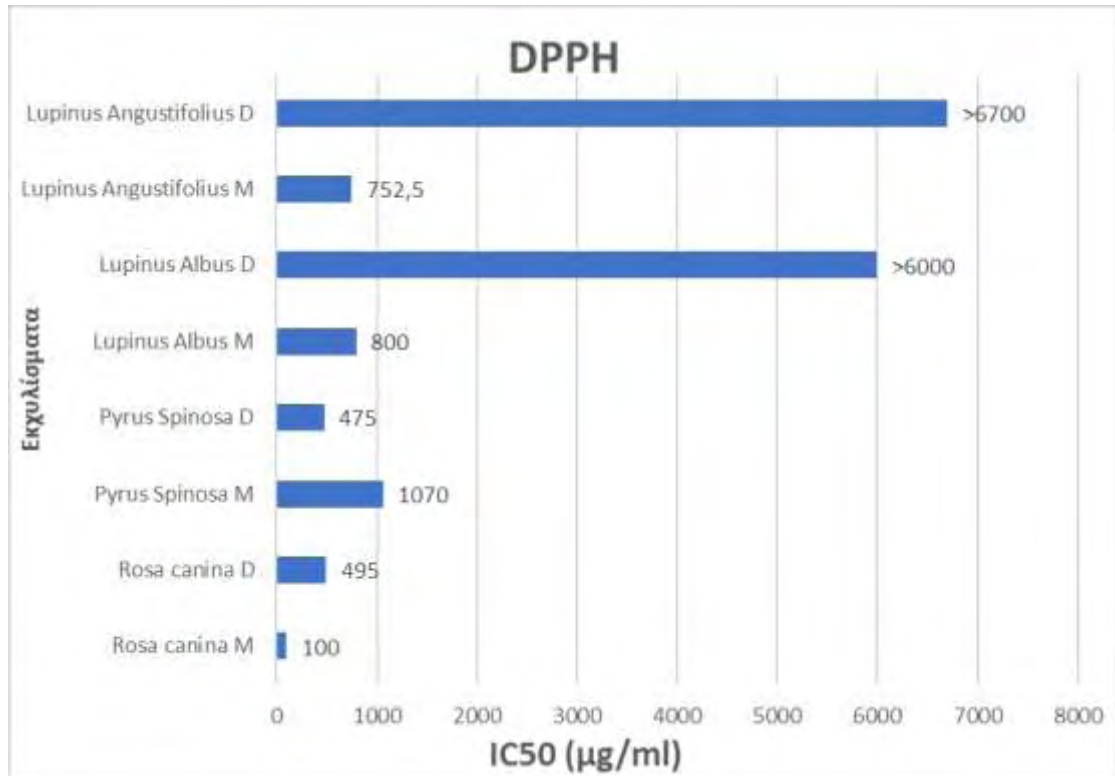
Στη συνέχεια κάθε δείγμα 300μl χωρίζεται σε δύο σωληνάκια κυτταρομέτρου από 150μl στο καθένα και στη συνέχεια προστίθενται 15μl χρωστικής ουσίας σε κάθε σωληνάκι. Προστίθεται mercury orange στα σωληνάκια που θα μετρηθεί η GSH και DCF-DA σε αυτά που θα μετρηθούν τα ROS. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C στο σκοτάδι και μετά το πέρας 30 λεπτών προστίθεται σε αυτά 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα που έχουν καθιζάνει επαναδιαλυτοποιούνται σε 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί η μέτρησή τους με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρούνται η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύονται με έναν ρυθμό 1000 γεγονότων/sec. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετράται σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύονται χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. DPPH

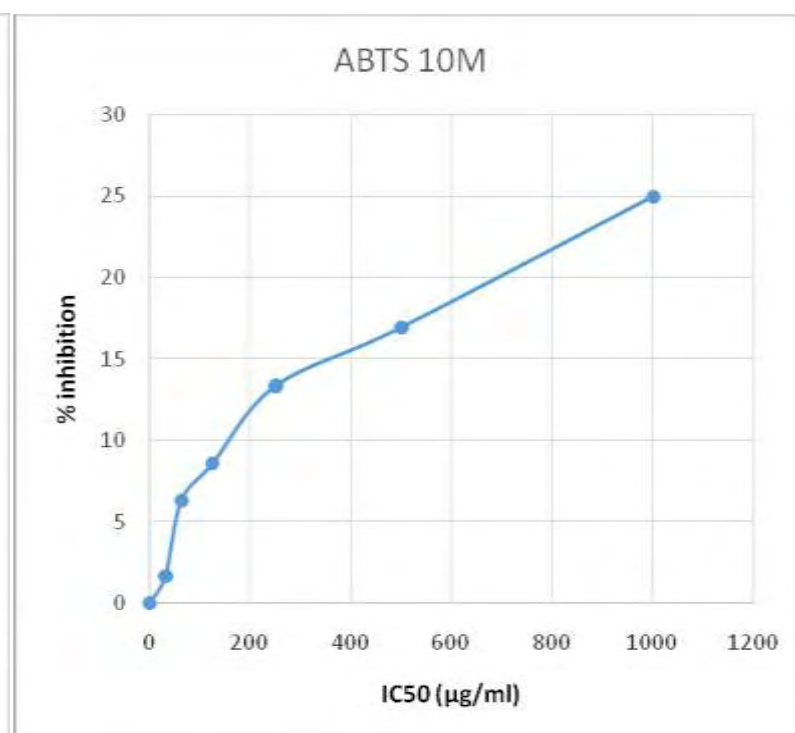
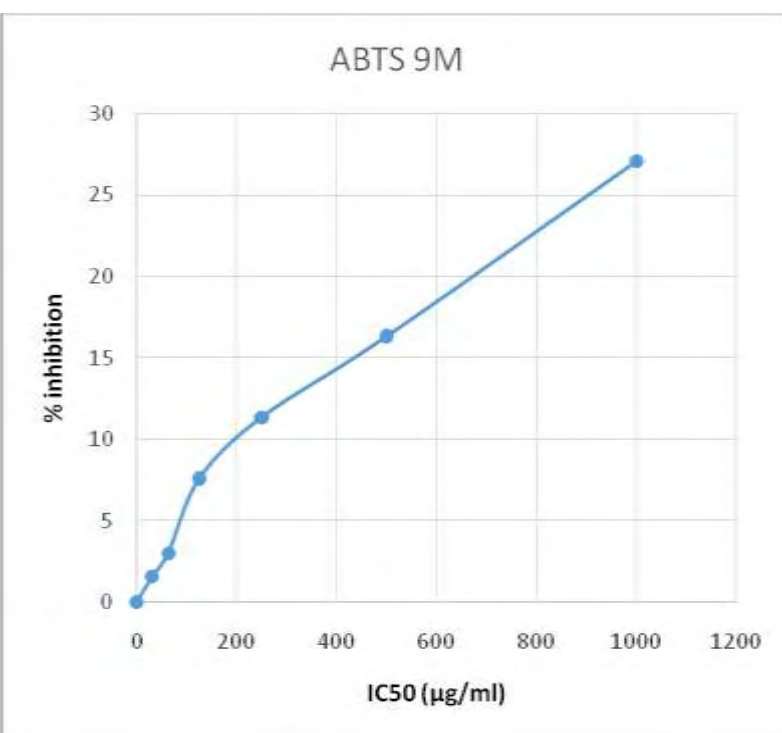
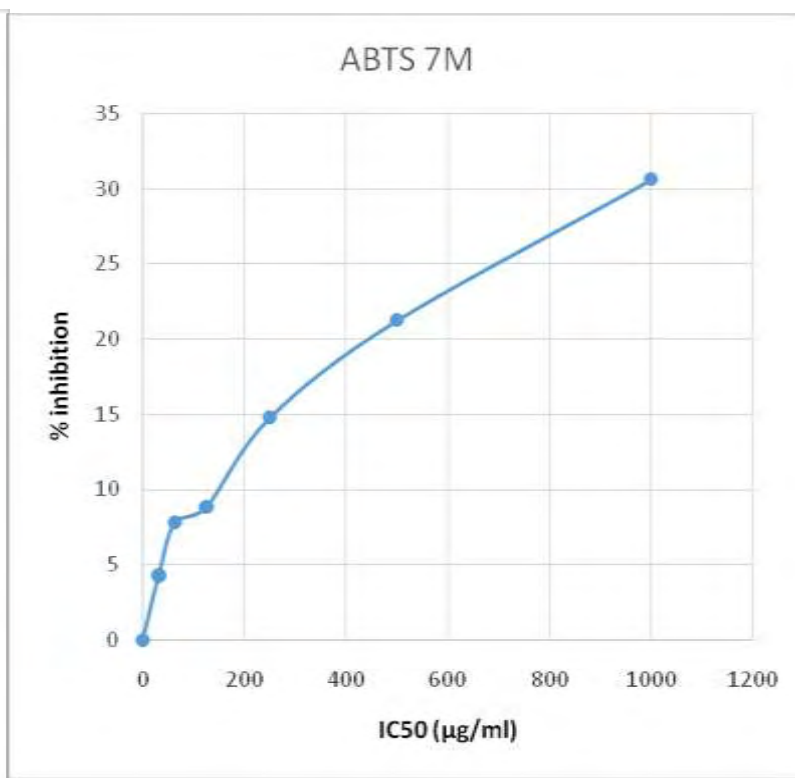
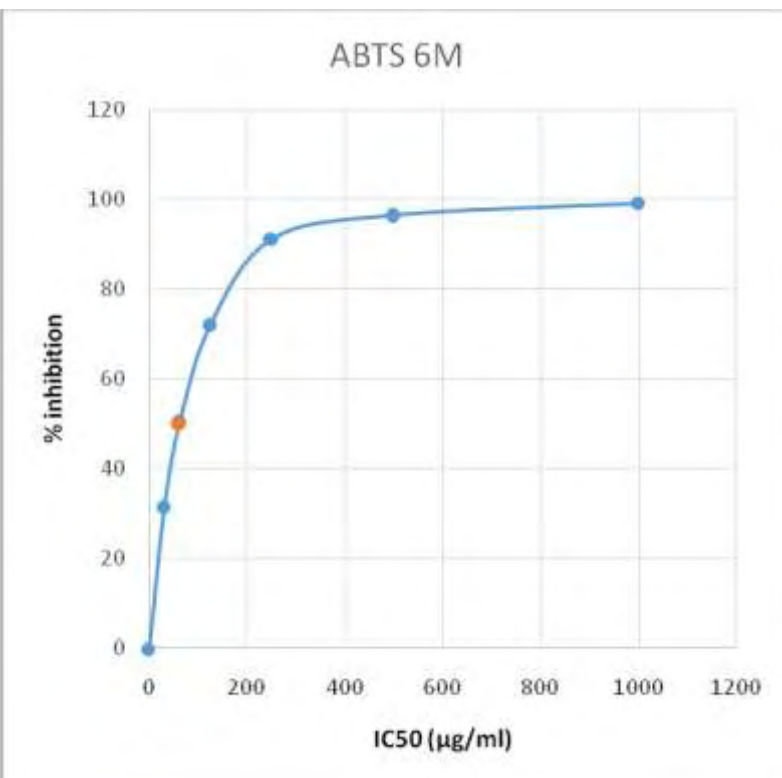




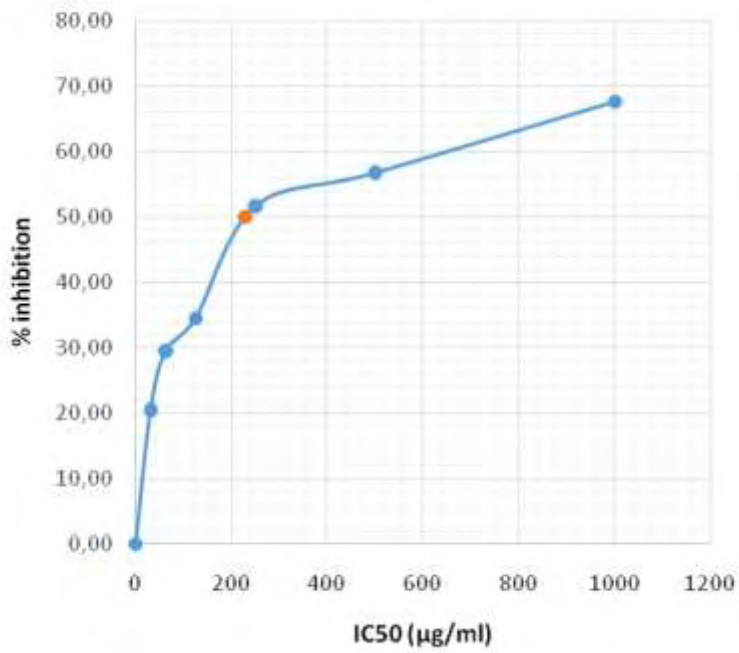


Παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι το μεθανολικό *Rosa canina* (IC50: 100µg/ml), το οποίο ήταν πιο δραστικό σε σύγκριση με το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (IC50: 495µg/ml). Το επόμενο εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη αναστολή ήταν το διχλωρομεθανικό *Pyrus spinosa* με IC50 475µg/ml. Αντίθετα στα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα και από τα 2 είδη λούπινων, αν και χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις δεν βρέθηκε το IC50.

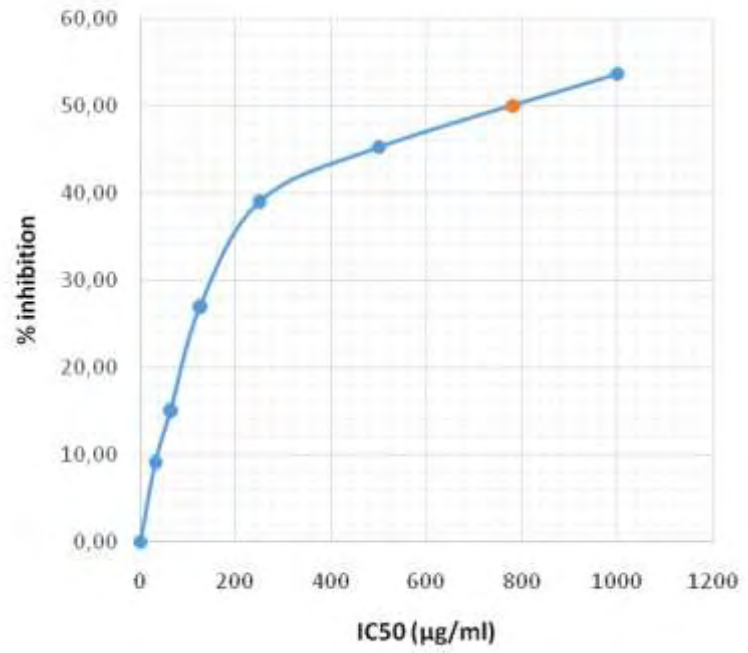
4.2. ABTS



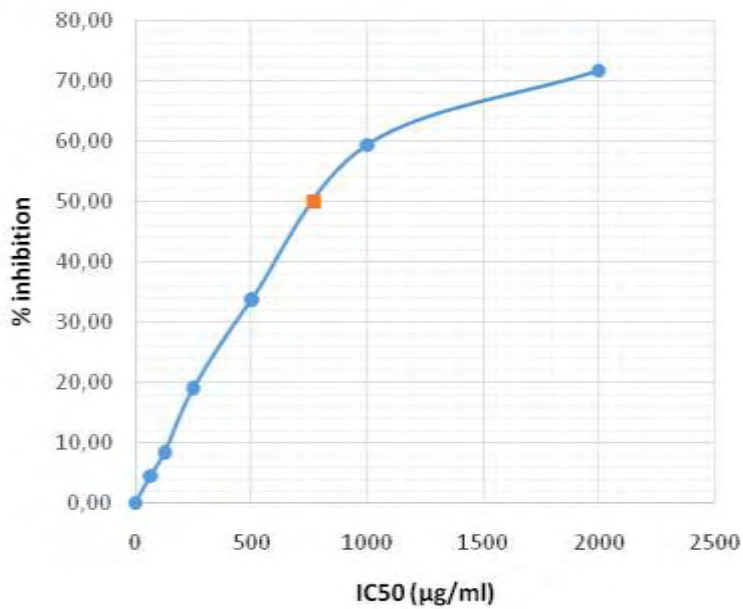
ABTS 6D



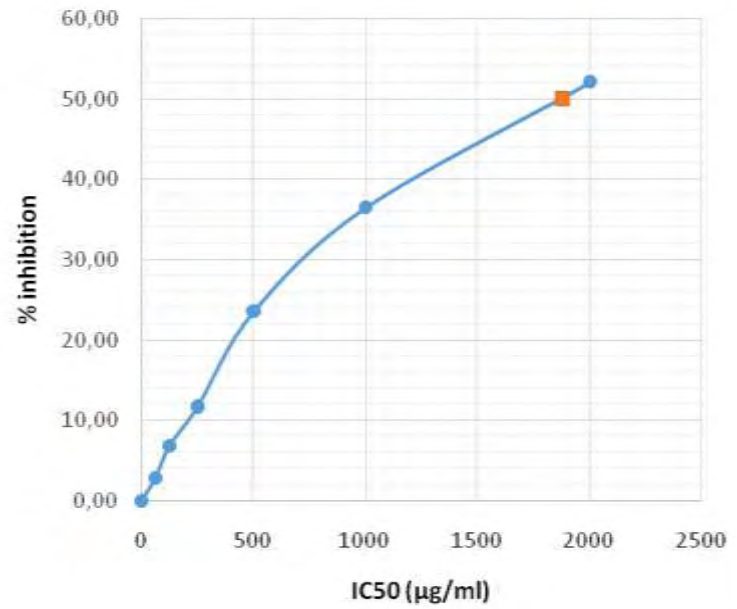
ABTS 7D

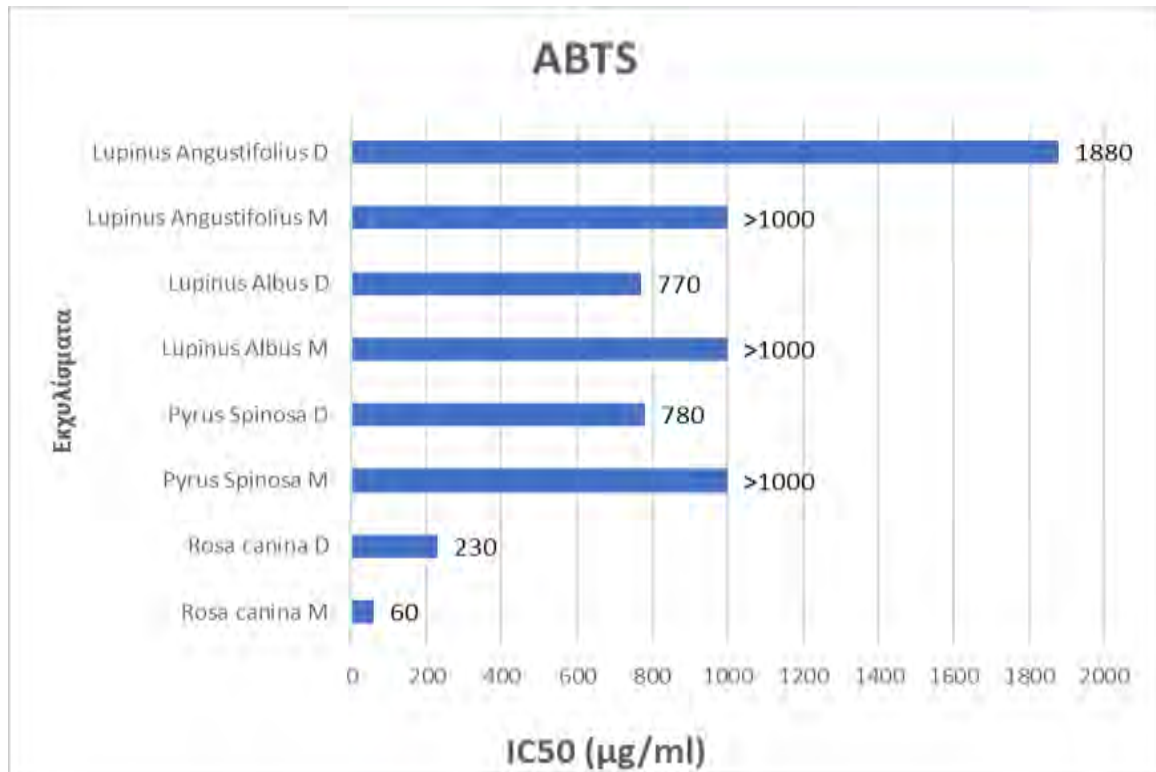


ABTS 9D



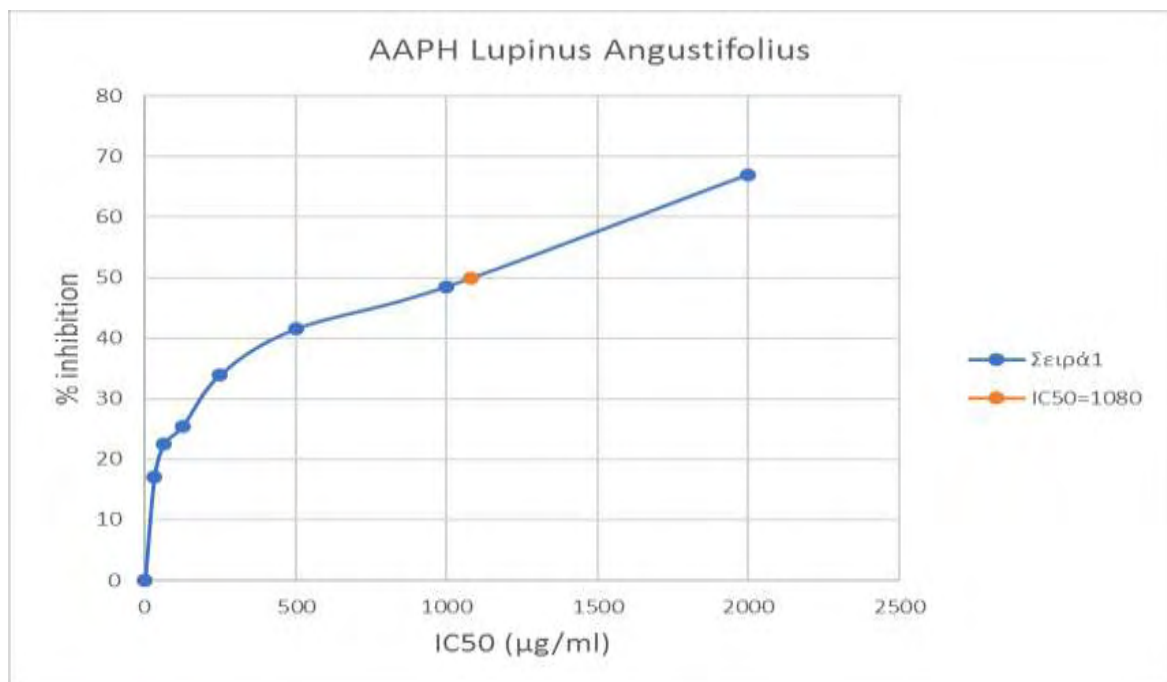
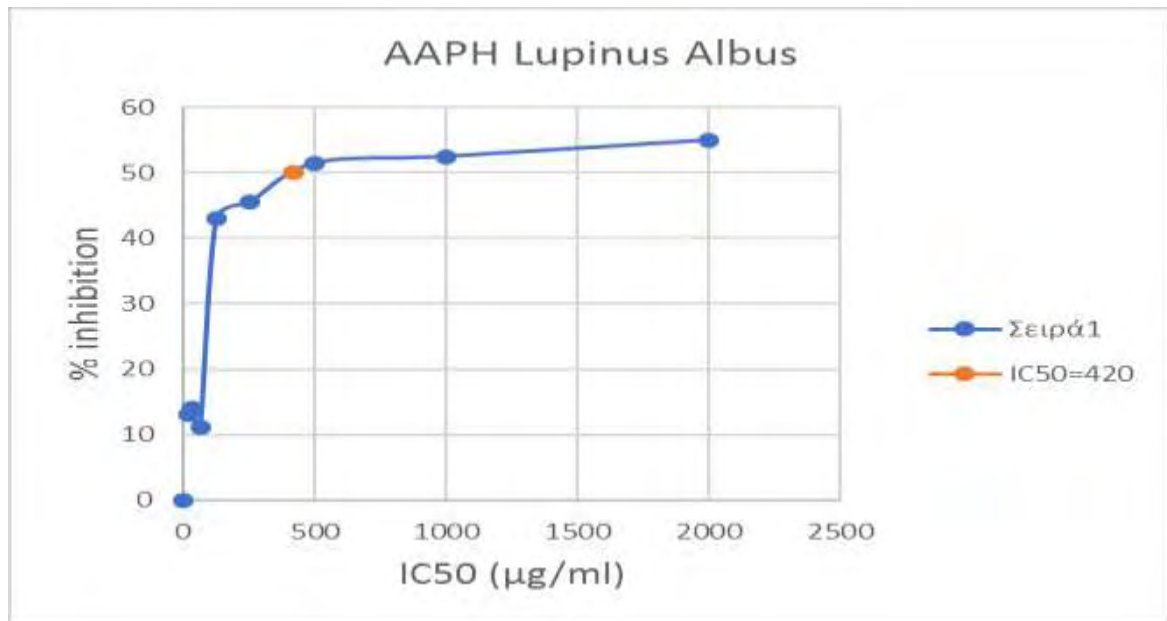
ABTS 10D

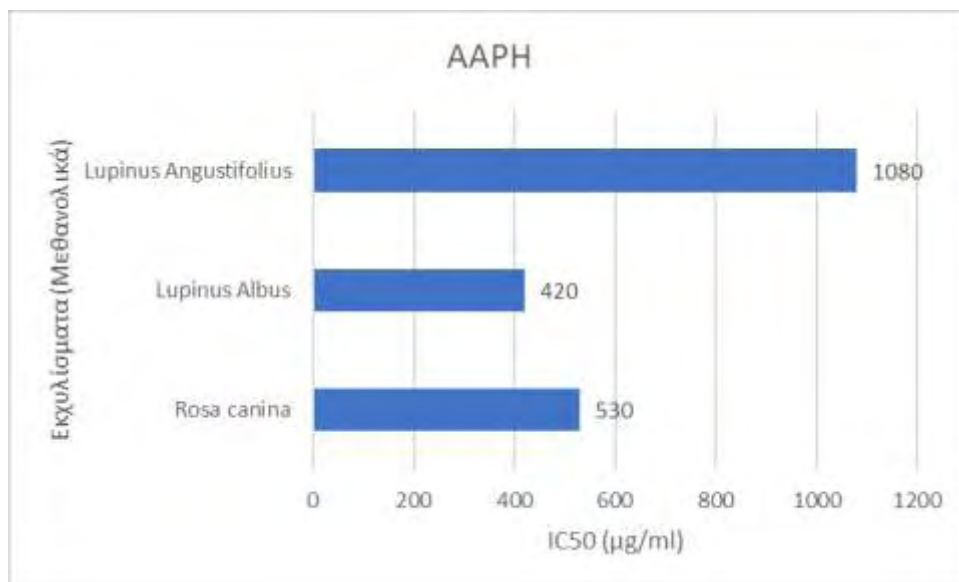
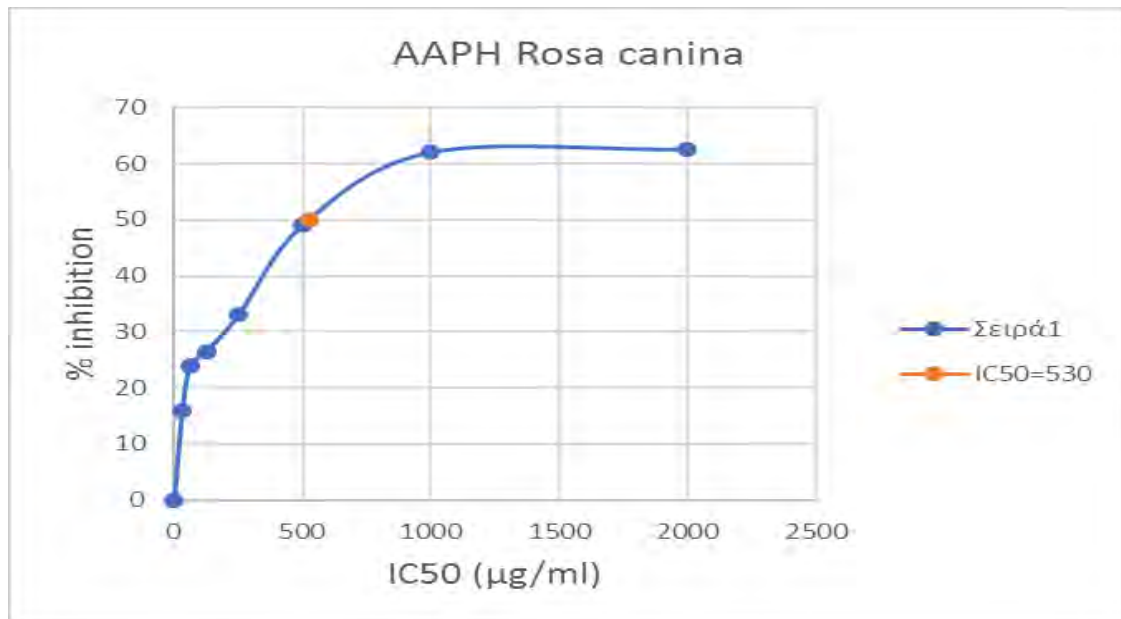




Παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι το μεθανολικό *Rosa canina* (IC50: 60μg/ml), το οποίο ήταν πιο δραστικό σε σύγκριση με το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα (IC50: 230μg/ml). Στα μεθανολικά εκχύλισματα από τα φυτά *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus spinosa* το IC50 ήταν μεγαλύτερο από 1000μg/ml.

4.3. AAPH



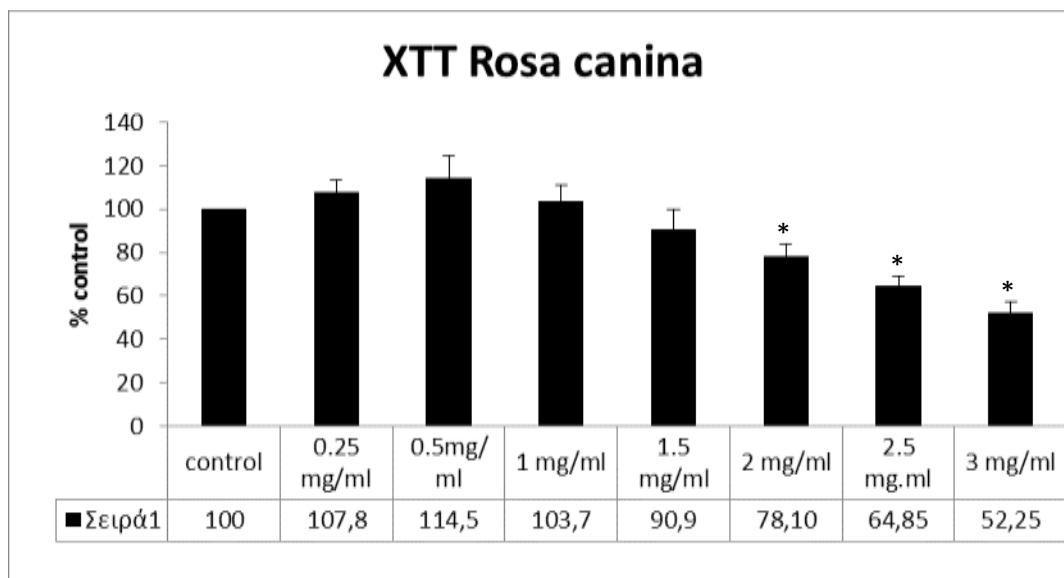


Παρατηρούμε ότι το πιο δραστικό εκχύλισμα, δηλαδή με το χαμηλότερο IC50 ήταν το μεθανολικό *Lupinus albus*. Ακολουθεί το μεθανολικό *Rosa canina* και τελευταίο είναι το μεθανολικό *Lupinus angustifolius*

Για τα διγλωρομεθανικά εκχυλίσματα, τόσο λόγω της μικρής ποσότητας εκχυλίσματος που είχαμε για κάθε φυτό, όσο και της κολλώδους φύσης τους, η οποία έκανε τον χειρισμό τους αρκετά δύσκολο, δεν είχαμε επαρκή ποσότητα ώστε να τα μελετήσουμε περαιτέρω. Το ίδιο και για το μεθανολικό εκχύλισμα *Pyrus spinosa*.

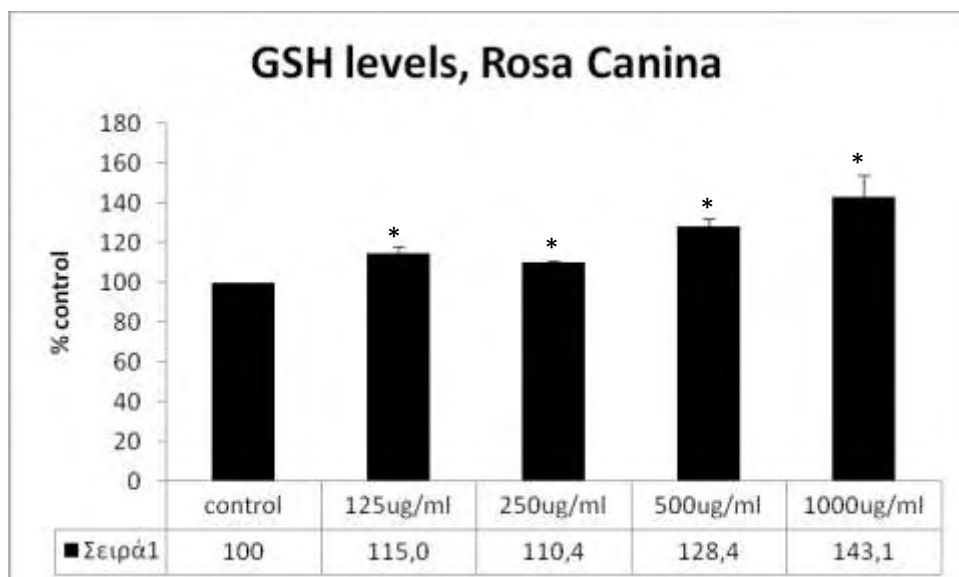
4.4 XTT

Για να προχωρήσουμε στη μέθοδο XTT και στη συνέχεια στην κυτταρομετρία ροής, επιλέξαμε το πιο δραστικό εκχύλισμα, τόσο από άποψη αντιοξειδωτικής ικανότητας, όσο και αντιμεταλλαξογόνου δράσης, καταλήγοντας στο *Rosa canina*.

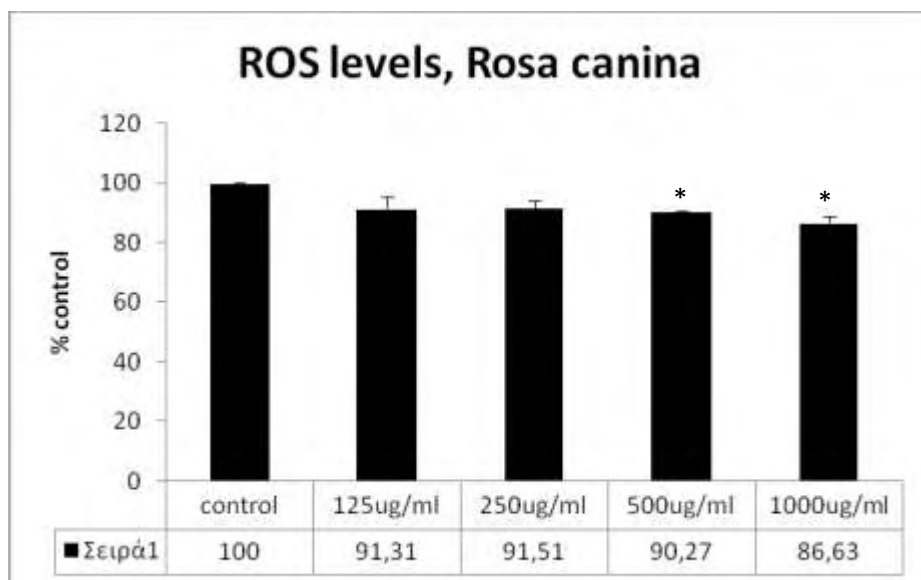


4.5. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι τα παρακάτω:



Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης σε όλες τις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, η οποία είναι δόσοεξαρτώμενη. Η αύξηση φτάνει έως και 43,1%, στη συγκέντρωση των 1000μg/ml, σε σχέση με το control.



Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών στη συγκέντρωση των 500μg/ml, όπου έχουμε μείωση σχεδόν 10%, και στη συγκέντρωση των 1000μg/ml, όπου έχουμε ακόμη μεγαλύτερη μείωση σχεδόν 13,4%.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια οι πολυφαινόλες αποτελούν ένα ενδιαφέρον και σημαντικό πεδίο έρευνας λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και της χημειοπροστατευτικής επίδρασής τους, με πολύ πιθανή την ανάμειξή τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρδιαγγειακά νοσήματα, μεταξύ άλλων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη φυτών *Rosa canina*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* και *Pyrus Spinososa*, καθώς επίσης και η μελέτη και εκτίμηση με τη χρήση μοριακών μεθόδων της αντιμεταλλαξιγόνου, χημειοπροστατευτικής δράσης που ασκούν στο DNA παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του πιο δραστικού εκχυλίσματος, το οποίο βρέθηκε ότι είναι το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Rosa Canina*, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ενδοθηλιακών κυττάρων.

Αρχικά έπρεπε να μελετήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω της εξουδετέρωσης των τεχνητών ριζών DPPH και ABTS. Πήραμε ένα εύρος τιμών IC50, για τη ρίζα DPPH από 100μg/ml (μεθανολικό *Rosa canina*) έως μεγαλύτερο των 6700μg/ml (διχλωρομεθανικό *Lupinus angostifolius*), και για τη ρίζα ABTS από 60μg/ml (μεθανολικό *Rosa canina*) έως 1880μg/ml (διχλωρομεθανικό *Lupinus angostifolius*). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να πούμε ότι έρχονται σε συμφωνία με υπάρχουσα βιβλιογραφία που δείχνουν την πολύ υψηλή σύσταση των καρπών του φυτού *Rosa canina* σε ασκορβικό οξύ. Αντίστοιχα, κατά τη δοκιμή αλληλεπίδρασης και εξουδετέρωσης της ρίζας του περοξυλίου, το μεθανολικό *Lupinus albus* ήταν το πιο δραστικό με IC50 420μg/ml, ακολούθησε το μεθανολικό *Rosa canina* με IC50 530μg/ml και τελευταίο το μεθανολικό *Lupinus angustifolius* με IC50 1080μg/ml. Τα διαφορετικά αποτελέσματα που είχαμε για κάθε φυτό, ανάμεσα στους δυο διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης, οφείλεται στην ικανότητα των διαλυτών να εκχυλίζουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις, ανάλογα με την πολικότητά τους.

Με τα παραπάνω δεδομένα αντιοξειδωτικής ικανότητας και αντιμεταλλαξογόνου δράσης, επιλέχτηκε το μεθανολικό εκχύλισμα *Rosa canina* ώστε

να προχωρήσουμε στη μελέτη της επίδρασης του στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της κυτταρικής σειράς EA.hy926, δηλαδή σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιλέχθηκαν καθώς συγκροτούν το ενδότερο τμήμα των αγγείων και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Για να χορηγηθεί το εκχύλισμα, έπρεπε πρώτα να υπολογιστούν οι κυτταροτοξικές του συγκεντρώσεις, κάτι που έγινε με τη μέθοδο ΧΤΤ. Παρατηρήσαμε ότι σε συγκεντρώσεις μέχρι 1mg/ml, το εκχύλισμα δεν είχε κυτταροτοξική δράση. Από τα 2mg/ml έχουμε πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας κάτω από το 80%.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας τη συγκέντρωση που εμφανίζεται τοξικότητα στα EA.hy926, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που θα χορηγούνταν στις καλλιέργειες ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στα επίπεδα GSH και ROS με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Επιλέξαμε να χορηγήσουμε συγκεντρώσεις εκχυλίσματος μέχρι 1000μg/ml. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε όλες τις συγκεντρώσεις από 125μg/ml έως 1000μg/ml. Παρατηρούμε ότι η αύξηση είναι γραμμική, εάν εξαιρέσουμε μια μικρή πτώση στα 250μg/ml, με μέγιστη αύξηση κατά 43,1% στη συγκέντρωση των 1000μg/ml, σε σχέση με το control. Αυτή η αύξηση της γλουταθειόνης υποδηλώνει πιθανώς αύξηση της έκφρασης του ενζύμου που συνθέτει GSH, δηλαδή της συνθετάσης της γλουταθειόνης (GSS), καθώς επίσης και αύξηση του ρυθμού αναγέννησής της από την οξειδωμένη (GSSG) στην ανηγμένη μορφή της (GSH) από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), λόγω αύξησης της έκφρασης της τελευταίας. Πολλά γονίδια αντιοξειδωτικών ενζύμων σημαντικών στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων βρίσκονται στην περιοχή ARE (Antioxidant Responsive Element) του γονιδιώματος στον πυρήνα. Στην εν λόγω περιοχή βρίσκεται και το γονίδιο της GR. Η έκφραση του ARE συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση του παράγοντα Nrf2. Ο Nrf2 βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη Keap1. Όταν υπάρξει οξειδωτικό ερέθισμα, οδηγείται σε απομάκρυνση ο μεταφορέας Keap1 και ο Nrf2 εισέρχεται στον πυρήνα όπου οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση και έκφραση γονιδίων στην περιοχή ARE. Θα μπορούσε να γίνει μια υπόθεση ότι οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο εκχύλισμα του φυτού *Rosa canina*, ενεργοποιούν τον Nrf2, όπως

υποστηρίζεται και από τη βιβλιογραφία αρκετές πολυφαινόλες ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι Nrf2/ARE (Scapagnini et al., 2011)

Τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, παρά μόνο στις συγκεντρώσεις των 500μg/ml, με μείωση σχεδόν 10%, και 1000μg/ml, όπου έχουμε ακόμη μεγαλύτερη μείωση σχεδόν 13,4%. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να πούμε ότι έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των επιπέδων GSH, καθώς στη συγκέντρωση των 1000μg/ml όπου έχουμε τα υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης έχουμε τη μεγαλύτερη μείωση των ελευθέρων ριζών. Επίσης εκτός της δράσης της γλουταθειόνης, υπάρχει ταυτόχρονα και αντιοξειδωτική δράση καθώς όπως προαναφέραμε, οι καρποί είναι πολύ πλούσιοι σε ασκορβικό οξύ. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος δεν είχαμε μείωση των ROS παρά την αύξηση της GSH. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι μπορεί να μην παρατηρείται μείωση της ελεύθερης μορφής των ROS, αλλά μπορεί η αύξηση της GSH να αναστέλλει τις βλάβες των ROS στα βιολογικά μακρομόρια. Για να εξεταστεί αυτό πρέπει να προσδιοριστεί η οξειδωτική βλάβη στα λιπίδια με τη μέθοδο TBARS και στις πρωτεΐνες με τη μέθοδο των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα αποτελέσματά μας συμβαδίζουν με υπάρχουσες μελέτες, καθώς κρασί από *Rosa canina* βρέθηκε να έχει ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, όπως έδειξε και σε Ames Test, η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη (Czyzowska, A. et al., 2015). Επίσης έχει βρεθεί σημαντική αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών του φυτού, οι οποίες οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης (Jiménez, S. et al., 2016), όπως και σημαντική ικανότητα να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των εγκεφαλικών καρκινικών κυττάρων, μάλιστα έχοντας καλύτερη δράση από γνωστά φάρμακα (Cagle et al., 2012). Συμπληρωματικά, επιβεβαιώνεται η αντιφλεγμονώδης δράση του φυτού, καθώς βρέθηκε ότι αναστέλλει την έκφραση των ενζύμων COX-1 και COX-2, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία φλεγμονής (Winther et al, 2016).

Συμπερασματικά θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκχυλίσματα από το *Rosa canina* έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση *in vitro*. Επίσης, ενίσχυσαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 με την αύξηση της GSH, ενώ παράλληλα μείωσαν τα επίπεδα

των ROS. Οπότε, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά αυτού του εκχυλίσματος, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξογόνος δράση. Επίσης, θα πρέπει να διερευνηθούν και οι μοριακοί μηχανισμοί. Οι εφαρμογές της έρευνας θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων όπως βιολειτουργικά τρόφιμα, είτε άλλου τύπου προϊόντα, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρωμάτων διατροφής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adlercreutz H, Mazur W (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 29, 95-120.
- Aikens, J. & Dix, J.A. Peroxy radical (HOO·) initiated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 15091.
- Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
- Balentine, J.D. Pathology of oxygen toxicity. 1982, Academic Press, N.Y.
- Baret, A. et al., Pharmacokinetic and anti-inflammatory properties in the rat of superoxide dismutases (CuSODs and MnSOD) from various species. *Biochem. Pharmacol.* 1984, 33: 2755.
- Bennet, R.C. & Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley review no.72. *New Phytol.* 1994, 127: 617-633.
- Barros, L., Carvalho, A.M. & Ferreira, I.C.F.R., 2011. Exotic fruits as a source of important phytochemicals: Improving the traditional use of *Rosa canina* fruits in Portugal. *Food Research International*, 44(7), pp.2233–2236.
- Biesalski, H.K., 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 10, pp.724–728.
- Brand- Williams, W.; Cuvelier, M.E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss und-Technology*, 1995, 28: 25.
- Brunetti, C. et al., 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), pp.3540–3555.
- Cagle, P. et al., 2012. Effect of Rosehip (*Rosa canina*) Extracts on Human Brain Tumor Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 3(October), pp.534–545.
- Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol.* 61, 215-226.
- Chen, B. et al., 2015. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*, 225(3), pp.R83–R99.
- Chen S, Zhu Y, Liu Z, Gao Z, Li B, Zhang D, Zhang Z, Jiang X, Liu Z, Meng L, Yang Y, Shi B (2015). Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Diabetic Bladder Dysfunction via the Activation of the Nrf2 Pathway. *PLoS One.* 2015 10(5), e0126457.

- Cheng C, Wang X, Weakley SM, Kougiass P, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010). The soybean isoflavonoid equol blocks ritonavir-induced endothelial dysfunction in porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *J Nutr.* 140(1), 12-17.
- Chun JN, Cho M, So I, Jeon JH (2014). The protective effects of Schisandra chinensis fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia.* 97, 224-33
- Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 637-46
- Cruz-Vega, D. et al., 2009. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 22(April 2008), pp.557–559.
- Czyzowska, A. et al., 2015. Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from Rosa canina L. and Rosa rugosa Thunb. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, pp.62–68.
- Daels-Rakotoarison, D.A. et al., 2002. Effects of Rosa canina fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytotherapy Research*, 16(2), pp.157–161.
- Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.
- Deliorman Orhan, D. et al., 2007. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from Rosa canina L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), pp.394–400.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (11): 1102-15.
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* 62(3), 599-603.
- Ekin, H.N. et al., 2016. Insight into anticholinesterase and antioxidant potential of thirty-four Rosaceae samples and phenolic characterization of the active extracts by HPLC. *Industrial Crops and Products*, 91, pp.104–113.
- Esatbeyoglu, T. et al., 2015. Betanin-A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(1), pp.36–47.
- Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.
- Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; 7: 66-89.
- Finaud J, Lac Gerard, Filaire E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med* 2006; 36 (4): 327-358.

- Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci.* 14(10), 19651-19669.
- Gazzani G, Daglia M, Papetti A (2012). Food components with anticaries activity. *Curr Opin Biotechnol.* 23(2), 153-159.
- Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
- Guo, W., Kong, E. & Meydani, M., 2009. Dietary Polyphenols, Inflammation, and Cancer. *Nutrition and Cancer*, 61(6), pp.807–810.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.
- Han, M.H. et al., 2016. Flavonoids Isolated from Flowers of *Lonicera japonica* Thunb. Inhibit Inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells by Suppressing TNF- α and IL-1 β Through PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathways. *Phytotherapy Research*, (January).
- Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensityintermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274.
- Higashi, Y. et al., 2014. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 24(4), pp.165–169.
- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., and Vina, J. 2006. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.*1067: 425-435.
- Ji, L.L. 2007. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 42: 582-593.
- Jiménez, S. et al., 2016. Rosa canina Extracts Have Antiproliferative and Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. *Plos One*, 11(7), p.e0159136. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159136>.
- Kiliçgün, H. & Altiner, D., 2010. Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacognosy magazine*, 6(23), pp.238–241.
- Kirkeskov, B. et al., 2011. The effects of rose hip (*Rosa canina*) on plasma antioxidative activity and C-reactive protein in patients with rheumatoid arthritis and normal controls: A prospective cohort study. *Phytomedicine*, 18(11), pp.953–958.
- Klepacka J, Fornal L (2006). Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(8), 639-647.
- Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S (2006). Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr Med Chem.* 16(30), 3943-3965.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D (2014). Flavonoids--food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 65(2), 79-85.

- Kundaković, T. et al., 2014. African Journal of Microbiology Research Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Pyrus pyrastrer* Burgsd. and *Pyrus spinosa* Forssk. (Rosaceae). , 8(6), pp.511–518. Available at: <http://www.academicjournals.org/AJMR> [Accessed November 23, 2016].
- Lampart-Szczapa, E. et al., 2003. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chemistry*, 83(2), pp.279–285.
- Lattanzio, F. et al., 2011. In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), pp.880–885.
- Lau, F.C., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J.A., 2005. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26(SUPPL.), pp.128–132.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
- Li, X. et al., 2012. Chemical composition and anti-inflammatory and antioxidant activities of eight pear cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), pp.8738–8744.
- Livrea MA, Tesoriere L, Bongiorno A, et al. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 (3): 401-9
- Lqari, H. et al., 2002. *Lupinus angustifolius* protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76(3), pp.349–356.
- Ludwig IA, Clifford MN, Lean ME, Ashihara H, Crozier A (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.* 5(8), 1695-1717.
- M, H., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47, p.3954.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability (2004). *Am J Clin Nutr.* 79(5), 727-747.
- Martínez-Villaluenga, C. et al., 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112(1), pp.84–88.
- May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. & Van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), pp.231–237.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, 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.
- Miraj, S., 2016. Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of rose hip (*Rosa canina* L.). *Der Pharma Chemica*, 8(13), pp.117–122.

- Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364.
- Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13: 295-309.
- Nabavi, S.F. et al., 2016. Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 8363(May), pp.1–20.
- Ntushelo, K., 2013. Identifying bacteria and studying bacterial diversity using the 16S ribosomal RNA gene-based sequencing techniques : A review. , 7(49), pp.5533–5540.
- Omoigui, S., 2007. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging – Role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 4(1), p.1.
- Oomah, B.D. et al., 2006. Phenolics and antioxidative activities in narrow-leafed lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(2), pp.91–97.
- Pascual-Teresa S, Moreno DA, García-Viguera C (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci*. 11(4), 1679-1703.
- Pastore, S. et al., 2011. Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *Journal of Dermatological Science*, 63(2), pp.104–114.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), pp.1035–1042.
- Powers SK, Deruisseau KC, Quindry J, Hamilton KL. Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences* 2004; 22, 81–94
- Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53, 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), pp.513–523.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
- Rahman, I., 2008. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutrition Reviews*, 66(SUPPL.1).

- Rahman, I., Biswas, S.K. & Kirkham, P.A., 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), pp.1439–1452.
- Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Martin MV, Soto MJ, Rico MC, Vallejo F, Tomas-Barberan F, Perez-de-la-Cruz AJ, Gil A, Mesa MD (2015). Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults. *J Nutr.* 145(8), 1808-1816.
- Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.
- Reinisalo, M. et al., 2015. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, p.340520.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933–956.
- Roman, I., Stănilă, A. & Stănilă, S., 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central journal*, 7(1), p.73.
- Sadeghi, H.H. et al., 2016. Hepatoprotective effect of *Rosa canina* fruit extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(2), pp.181–8.
- Santangelo, C. et al., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), pp.394–405.
- Scapagnini, G. et al., 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: A nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 44(3), pp.192–201.
- Schulz, E., Anter, E. & Keane, J.F., 2004. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), pp.1093–1104.
- Siger, A. et al., 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), pp.190–197.
- Siemieniuk E, Skrzydlewska E. (2005). Coenzyme Q10: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 150-159.
- Skrovankova, S. et al., 2015. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), pp.24673–24706.
- Soong, Y.Y. & Barlow, P.J., 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88(3), pp.411–417.

- Street, L., Sciences, N. & Street, A.I.C., 2015. the Content of Total Phenols , Flavonoids and Antioxidant Activity in Rosehip From the Spontaneous Flora From South Romania. , LVIII, pp.307–314.
- Sung MM, Dyck JR (2015). Therapeutic potential of resveratrol in heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 1348(1), 32-45.
- Tsaliki, E., Lagouri, V. & Doxastakis, G., 1999. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*). *Food Chemistry*, 65(1), pp.71–75.
- Tumbas, V.T. et al., 2012. Characterization of the free Radical Scavenging Activity of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Extract. *International Journal of Food Properties*, 15(1), pp.188–201.
- Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y.S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), pp.835–841.
- Vauzour, D. et al., 2010. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), pp.1106–1131.
- Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
- Widyarini S, Domanski D, Painter N, Reeve VE (2012). Photoimmune protective effect of the phytoestrogenic isoflavonoid equol is partially due to its antioxidant activities. *Photochem Photobiol Sci.* 11(7), 1186-1192.
- Wijeratne SS, Abou-Zaid MM, Shahidi F (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem.* 54(2), 312-8
- Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 2002; 34 (7): 795-9.
- Winther, K., Campbell-Tofte, J. & Vinther Hansen, A.S., 2016. Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, Volume 6, p.11.
- Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
- Zamora-RosR, RothwellJA, ScalbertA, KnazeV, RomieuI, SlimaniN, FagherazziG, PerquierF, TouillaudM, Molina-MontesE, HuertaJM, BarricarteA, AmianoP, MenéndezV, TuminoR, deMagistrisMS, PalliD, RicceriF, SieriS, CroweFL, KhawKT, WarehamNJ, GroteV, LiK, BoeingH, FörsterJ, TrichopoulouA, BenetouV, TsiotasK, Bueno-de-MesquitaHB, RosM, PeetersPH, TjønnelandA, HalkjærJ, OvervadK, EricsonU, WallströmP, JohanssonI, LandbergR, WeiderpassE, EngesetD, SkeieG, WarkP, RiboliE, GonzálezCA (2013). Dietary intakes and food sources of phenolic acids in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr.* 2013 110(8), 1500-1511.