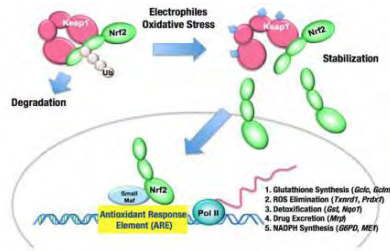




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

«Επίδραση εκχυλισμάτων ενδημικών Ελληνικών εδώδιμων φυτών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που ελέγχονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα»

«Effects of native Greek edible plant extracts on gene expression levels of Nrf2 target genes in human endothelial cells»



Μπαλαμπάνος Δημήτριος
Λάρισα 2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γρηγόριος Αμούτζιας (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν να του εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθειά του, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στάγκο και κ. Αμούτζια Γρηγόριο για την βοήθειά τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Αλέξανδρο Πρίφτη για την καθοριστική βοήθειά του και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας. Τέλος, ευχαριστίες οφείλω σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, οι οποίοι δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Περιεχόμενα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή	2
Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	8
1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)	8
1.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών	9
1.4 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα	11
1.5 Διαταραχές σχετιζόμενες με Οξειδωτικό Στρες	13
1.6 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών.....	14
1.7 Πολυφαινόλες.....	14
1.8 Γονίδια στόχοι του Nrf2 σχετιζόμενα με την αντιοξειδωτική άμυνα.....	15
1.8.1 Καταλάση (<i>cat</i>).....	15
1.8.2 Υπεροξειδική δισμουτάση (<i>sod1</i>)	17
1.8.4 Θειορεδοξίνη (<i>txn</i>).....	17
1.8.5 Οξυγενάση της αίμης (<i>hmox1</i>)	19
1.8.6 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (<i>nrf2</i>)	20
1.8.7 NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (<i>nqo1</i>)	22
1.8.8 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (<i>gclc</i>).....	23
1.8.9 Περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (<i>gpx1</i>)	24
1.8.10 Αναγωγάση της γλουταθειόνης (<i>gsr</i>)	25
1.9 Ενδημικά Εδώδια Φυτά.....	25
1.9.1 <i>Carthamus L. (GREM)</i>	26
1.9.2 <i>Cichorium Spp (KAEM/CSEM)</i>	27
1.9.2.1 <i>Cichorium intybus (KAEM)</i>	29
1.9.2.2 <i>Cichorium spinosum (CSEM)</i>	30
1.9.3 Χημική σύσταση.....	30
2. Σκοπός.....	31
3. Πειραματικό Μέρος.....	32
3.1 Φυτικά Εκχυλίσματα	32
3.1.1 Παραγωγή των εκχυλισμάτων από τα φυτά.....	32

3.2 Τεστ του Ames	33
3.2.1 Γενικά.....	33
3.2.2 Μηχανισμός δράσης του μεταλλαξιγόνου παράγοντα <i>t-BOOH</i>	34
3.2.3 Υλικά και μεθοδολογία.....	35
3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926	37
3.4 Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ..	38
3.5 Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS	40
3.6 Απομόνωση ολικού RNA και μετατροπή σε cDNA.....	43
3.7 Real-time PCR.....	44
4. Αποτελέσματα.....	46
4.1 Τεστ του Ames	46
4.2 ΧΤΤ:.....	48
4.3 Κυτταρομετρία ροής.....	49
4.3.1 <i>GSH levels</i>	49
4.3.2 <i>ROS levels</i>	49
4.4 qPCR	51
4.4.1 <i>KAEM</i>	51
4.4.2 <i>GREM</i>	52
4.4.3 <i>CSEM</i>	53
5. Συζήτηση	55
6. Βιβλιογραφία	61

Περίληψη

Η μεσογειακή διαίτα έχει συνδεθεί με ωφέλιμες επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Στην Ελλάδα ένα σημαντικό κομμάτι αυτής της διαίτας πηγάζει από την κατανάλωση των ενδημικών ειδών φυτών (*Cichorium intybus*, *Carthamus lanatus*, *Cichorium spinosum*) με την μορφή αφεψημάτων. Όντας φυτικά εκχυλίσματα, πιθανολογείται πως είναι πλούσια σε μια κατηγορία βιοδραστικών δευτερευόντων μεταβολιτών που είναι γνωστοί με τον όρο πολυφαινόλες. Αυτές οι ενώσεις επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση κι επιπροσθέτως έχει αποδειχθεί πως επάγουν την ενεργοποίηση ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Σε παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών που προέρχονται από τα ελληνικά εδάδιμα φυτά, χρησιμοποιώντας *in vitro* μοριακές μεθόδους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, επέδειξαν ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, ενάντια πλήθους αυτών (DPPH•, ABTS•+ ROO• and O2-•). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση τους μέσω τεστ του Ames καθώς και η επίδραση τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και παρατηρήθηκαν τόσο ικανότητα προστασίας του DNA στο Ames, όσο και αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) καθώς κι ελαφρώς μειωμένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα-στόχου Nrf2 και παρατηρήθηκε επαγωγή έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και αναγέννηση της γλουταθειόνης αν και υπήρξαν διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων. Εν κατακλείδι, τα εκχυλίσματα των εδάδιμων ελληνικών φυτών επέδειξαν ισχυρή *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα, όντας μια καλή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών με πιθανά ιατρικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία.

Abstract

The Mediterranean diet has been associated with beneficial health effects. In Greece, a significant part of it is the consumption of edible plant species (*Cichorium endivia*, *Carthamus lanatus*, *Cichorium spinosum*,) in the form of decoctions. Being plant extracts, they may be rich in potential bioactive secondary metabolites termed polyphenols. These compounds exert antioxidant activity and in addition they have been shown to induce endogenous antioxidant mechanisms through the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway. In a parallel study, the potential beneficial effects of polyphenols from Greek edible plants was tested using *in vitro* molecular methods. According to the results, they displayed radical scavenging activity against various free radicals (DPPH•, ABTS•+ ROO• and O₂-•). In the present study, Ames test was used to examine the extracts antimutagenic activity and in addition, their effect on endothelial cell redox status was investigated. According to the results, the extracts displayed antimutagenic activity and additionally caused increased glutathione (GSH) and slightly decreased Reactive Oxygen Species (ROS) levels. Finally, the effect of these extracts on Nrf2-target gene expression was examined and an induction in genes associated with GSH biosynthesis and regeneration was observed, even though changes were displayed between extracts. Thus, Greek edible plant displayed strong antioxidant activity *in vitro*, and so they may be a good source of dietary antioxidants with potential beneficial effects on human health.

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990).

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις).

Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge, 1990). Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών που μπορούν να έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα αλλά και άλλα μόρια.

1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

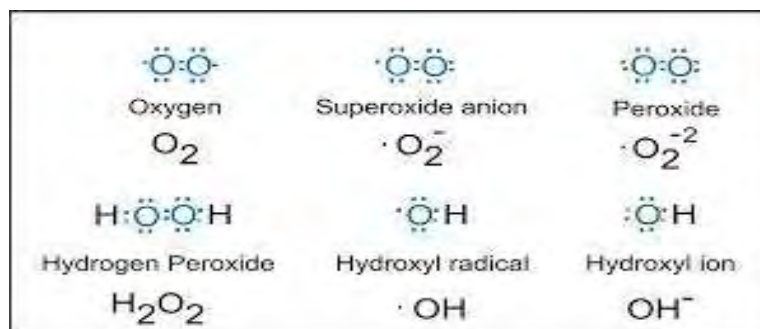
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ $HOBr$

Ρίζα Αλκοξειδίου (RO [·])	Όζον (O ₃)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO ₂ [·])	Μονήρες Οξυγόνο (¹ O ₂)

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.

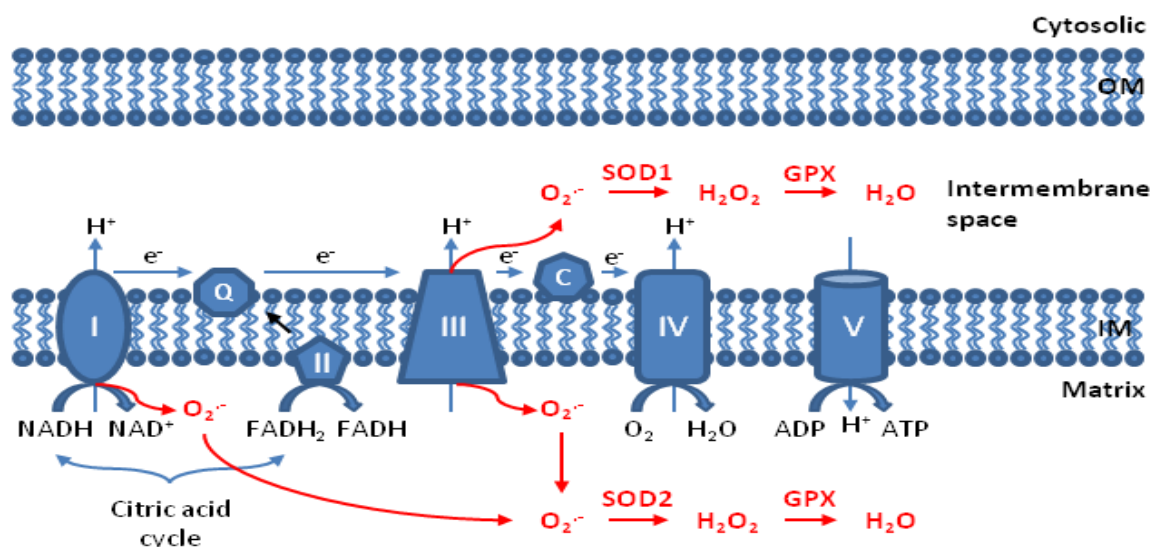


Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

1.3 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και εξωγενώς. Οι φυσιολογικές διαδικασίες για παραγωγή ελεύθερων ριζών ενδογενώς είναι οι ακόλουθες (Valko *et al.* 2006):

A) Η πιο σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγής κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ ταυτόχρονα η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται στην ATP μέσω της συνθετάσης του ATP. Αυτό αφορά το 95-99% του οξυγόνου. Το υπόλοιπο οξυγόνο διαφεύγει από τα συμπλέγματα πρωτεϊνών με τη μορφή μονήρους οξυγόνου και σουπεροξειδίου (Παπαγαλάνης, 2014).



Εικόνα 2: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια.

Β) Το υπόλοιπο οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η NADH οξειδάση, η οξειδάση του κυτταροχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η ξανθινοξειδάση. Αυτά τα ένζυμα με τη σειρά τους, μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, ώστε να μην το ανάγουν πλήρως και σε κάθε στάδιο παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Κατά συνέπεια, έχουμε σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το $O_2^{\cdot-}$, το H_2O_2 και το HO^{\cdot} (Παπαγαλάνης, 2014).

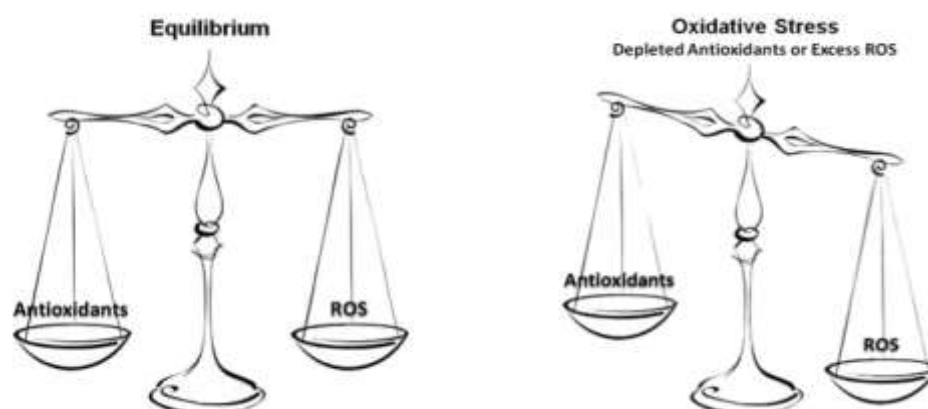
Γ) Κάποια ιόντα μετάλλων (σίδηρος, χαλκός, χρώμιο, κοβάλτιο, αρσενικό, κάδμιο, νικέλιο), που αποτελούν σημαντικούς ενζυμικούς συμπαραγόντες, όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, προκαλώντας έτσι καταστροφές.

Δ) Τέλος, η παραγωγή ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς και βιολογικά υλικά (μεταμοσχευθέντα όργανα ή ιστοί). Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και

μονοκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου που συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

1.4 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop, 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.



Εικόνα 3: Δημιουργία οξειδωτικού στρες.

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία

καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Ειδικότερα, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όσον αφορά τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, αυτά κατανέμονται ισότιμα μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκοματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Gerogianni & Gourgoulianis 2006).

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.



Εικόνα 4: Τρόπος δράσης μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.

1.5 Διαταραχές σχετιζόμενες με Οξειδωτικό Στρες

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop, 2015).

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler *et al.* 2015). Γενικότερα, σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Marian Valko *et al.*, 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, 2011).



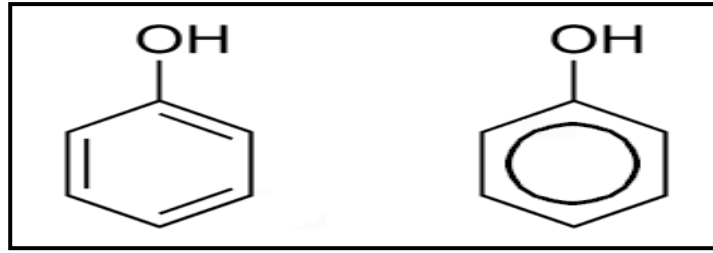
Εικόνα 5 : Διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

1.6 Ευεργετικές Επιδράσεις Ελεύθερων Ριζών

Πέρα από τις πολυάριθμες αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS και RNS θεωρούνται φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και συμμετέχουν και σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμεύουν στην άμυνα του οργανισμού, απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την ωρίμανση του ωοκυττάρου, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Είναι λοιπόν σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν είναι μόνο επιβλαβείς για τον οργανισμό, αλλά αντιθέτως αναγκαίες για φυσιολογικές του λειτουργίες και οι ευεργετικές τους δράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία τους με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι, πρέπει να είμαστε προσεκτικοί στην ημερήσια κατανάλωση αντιοξειδωτικών, ώστε αυτή να μην υπερβαίνει συγκεκριμένα όρια που θα οδηγούσαν στην πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Schieber & Chandel, 2014).

1.7 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της διαίτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων. Ο χημικός τύπος της φαινόλης είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 6 : Δομή μιας φαινόλης.

Γενικά, τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesi, Vari, Scazzocchio, & Masella, 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

Πιστεύεται ότι η συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών στα φυτά υποτιμάται, καθώς πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά και τα παράγωγά τους δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, ξεφεύγοντας από τις μεθόδους και τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η σύσταση σε πολυφαινόλες για τα περισσότερα φρούτα και αρκετών ποικιλιών σιτηρών δεν είναι ακόμα γνωστή.

Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ωστόσο έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και αντιμεταλλαξιγόνος επίδραση (Landete, 2012).

1.8 Γονίδια στόχοι του Nrf2 σχετιζόμενα με την αντιοξειδωτική άμυνα

Από την βιβλιογραφία έχει προκύψει μια πληθώρα γονιδίων που επάγουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς κι επάγονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 λόγω της παρουσίας του Antioxidant Response Elements (AREs) στους υποκινητές τους. Τα σημαντικότερα εξ αυτών παρουσιάζονται παρακάτω.

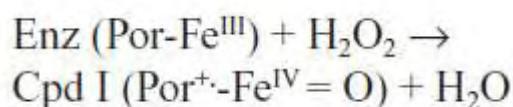
1.8.1 Καταλάση (cat)

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο που περιέχει μία προσθετική ομάδα αίμης σε κάθε υπομονάδα του ενζύμου. Η καταλάση εντοπίζεται στα

υπεροξειδιοσώματα και είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Putnam, Arvai, Bourne, & Tainer, 2000). Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ένζυμο για την προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από ενεργές μορφές οξυγόνου.

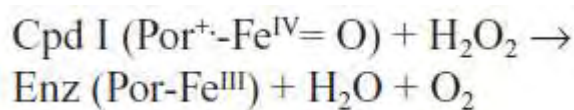


Ο μηχανισμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου αποτελείται από 2 αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση, ο σίδηρος Fe^{3+} της προσθετικής ομάδας της αίμης ανάγει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό με ταυτόχρονη παραγωγή $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$ (ένωση I).



(Chelikani, Fita, & Loewen, 2004)

Στο δεύτερο βήμα της αντίδρασης, η ένωση I οξειδώνει ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο, ενώ η ίδια μετατρέπεται σε νερό.



(Chelikani et al., 2004)

Επομένως, έχουμε συνολική παραγωγή 2 μορίων νερού και ενός μορίου μοριακού οξυγόνου (Putnam et al., 2000).

1.8.2 Υπεροξειδική δισμουτάση (*sod1*)

Η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (CuZnSOD, SOD1) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-) σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου.



Η SOD1 είναι ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και απαντάται σε διμερή μορφή. Κάθε υπομονάδα του ενζύμου περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο, καθώς και ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των υπομονάδων της (Sea et al., 2015).

Το υπεροξείδιο προκύπτει ως παραπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και είναι ικανό να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες. Συνεπώς, η SOD αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων.

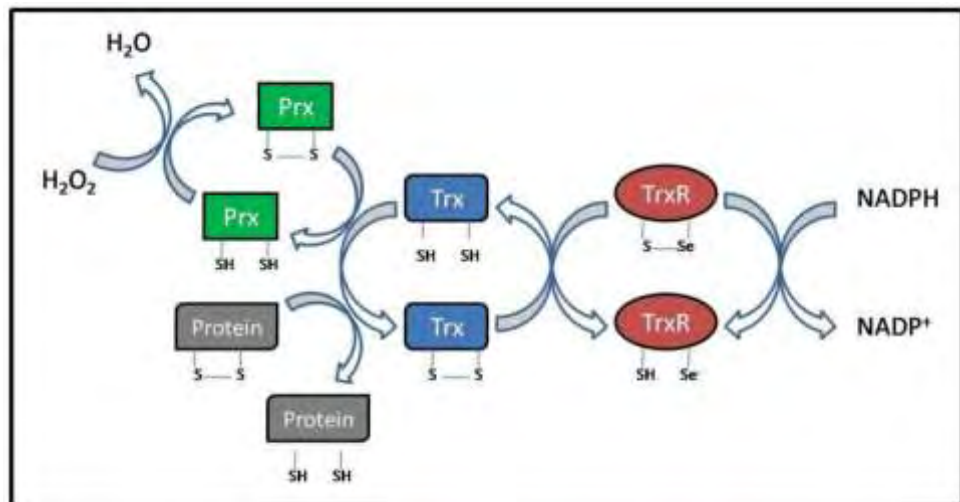
1.8.4 Θειορεδοξίνη (*txn*)

Η θειορεδοξίνη είναι μία μικρή πρωτεϊνική αναγωγάση, ο ρόλος της οποίας είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων σε πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την αναγωγή τους. Το σύστημα της θειορεδοξίνης καταλύει την αναγωγή εκτεθειμένων δισουλφιδικών δεσμών μέσω του NADPH (Holmgren, 1989).

Οι πρωτεΐνες στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ή στην επιφάνεια του κυττάρου είναι πλούσιες σε δισουλφίδια, αντανακλώντας το οξειδωτικό περιβάλλον. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες του εσωτερικού του κυττάρου βρίσκονται σε ανηγμένη μορφή και περιέχουν ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες. Η κύρια αναγωγάση δισουλφιδικών δεσμών, υπεύθυνη για την διατήρηση των πρωτεϊνών σε ανηγμένη μορφή, είναι η θειορεδοξίνη (Elias S. J. ArneÅr and Arne Holmgren, 2000). Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό μηχανισμό της μεταγωγής σήματος και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

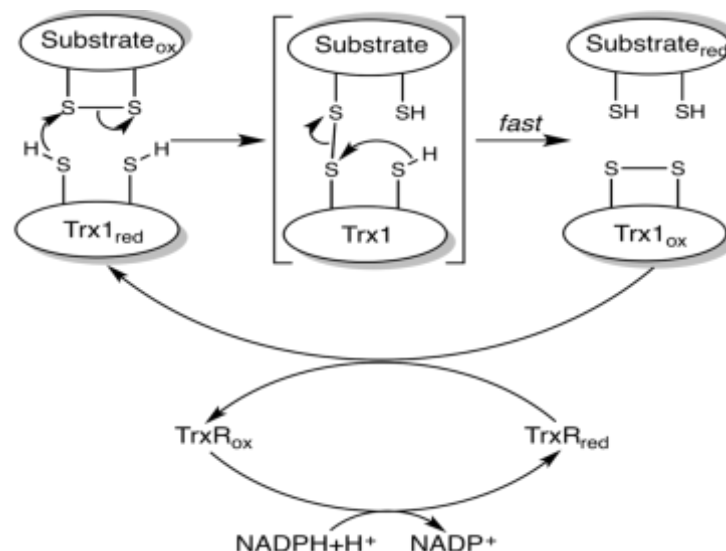
Η Trx-1 περιέχει τη συντηρημένη αλληλουχία -Cys-Gly-Pro-Cys- στο ενεργό της κέντρο, υπεύθυνη για τη δράση της ως πρωτεϊνική οξειδοαναγωγάση (Nordberg & Arner, 2001). Τα κυστεϊνικά κατάλοιπα είναι απαραίτητα για τη δράση της Trx1, ενώ τα υπόλοιπα δύο κατάλοιπα δεν απαιτούνται για τη δράση του ενζύμου, αλλά

ευθύνονται για τις θερμοδυναμικές και οξειδοαναγωγικές ιδιότητες της πρωτεΐνης (Collet & Messens, 2010).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης Trx (Karlenius & Tonissen, 2010)

Ο μηχανισμός δράσης της θειορεδοξίνης περιλαμβάνει την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, όπως η Prx (περοξυρεδοξίνη) από την ανηγμένη Trx. Κατά τη διαδικασία αυτή, η Trx οξειδώνεται και επανακυκλώνεται από την TrxR (αναγωγάση της Trx), η οποία επαναφέρει την Trx στην ανηγμένη της μορφή με την κατανάλωση NADPH (Karlenius & Tonissen, 2010).

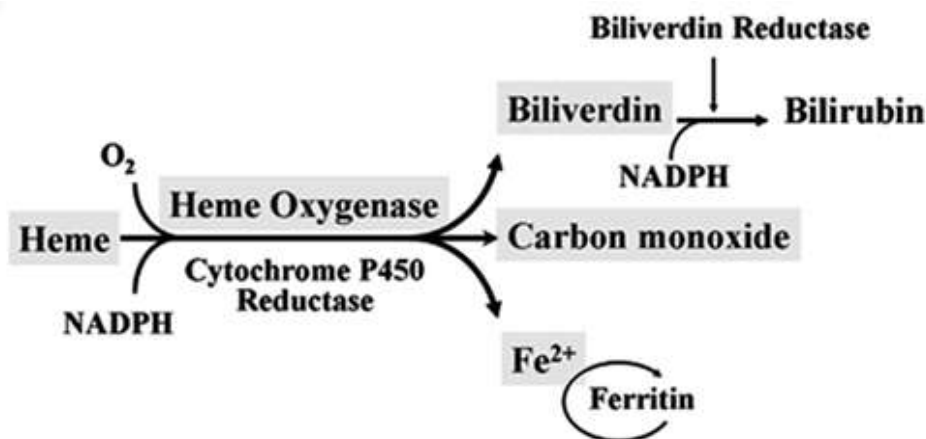


Εικόνα 8: Μεταβολές στο ενεργό κέντρο της Trx κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων
 Ο ρόλος της Trx1 είναι η αναγωγή οξειδωμένων πρωτεϊνών και η διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την «προσβολή» του δισουλφιδίου της πρωτεΐνης-στόχου από τη N-τελική θειόλη του μοτίβου CGPC της Trx1, απελευθερώνοντας μία ελεύθερη θειόλη και δημιουργώντας ένα νέο

δισουλφίδιο μεταξύ της Trx1 και της πρωτεΐνης-στόχου. Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες, το θείο της N-τελικής Cys της Trx1 υπάρχει ως θειολικό, επιτρέποντας στο κατάλοιπο να δράσει ως πυρηνόφιλο και να «επιτεθεί» σε δισουλφίδια πρωτεϊνών. Μετά το σχηματισμό δισουλφιδίου μεταξύ της Trx1 και της πρωτεΐνης-στόχου, η C-τελική θειόλη πρέπει να ενεργοποιηθεί ως θειολικό προκειμένου να προκαλέσει τη διάσπαση του συμπλόκου. Το τελευταίο βήμα της καταλυτικής δράσης του ενζύμου περιλαμβάνει την «προσβολή» της N-τελικής Cys της Trx1 από την C-τελική Cys, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ανηγμένης πρωτεΐνης-στόχου και της οξειδωμένης Trx1. Ακολούθως, η Trx1 ανάγεται από την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR) με την κατανάλωση NADPH, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο αντίδρασης (Collet & Messens, 2010).

1.8.5 Οξυγενάση της αίμης (*hmox1*)

Η οξυγενάση της αίμης (HO-1) είναι ένα επαγωγίμο ένζυμο του μονοπατιού καταβολισμού της αίμης. Το σύστημα της HO-1 αποτελείται από την HO-1 και την NADPH-cyt P450 αναγωγή και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό της αίμης (Kikuchi, Yoshida, & Noguchi, 2005).



Εικόνα 9: Προϊόντα αντίδρασης HO-1

Τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης είναι η χολοπρασίνη, το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και ο Fe²⁺. Η HO-1 λειτουργεί ως αμυντικός κυτταρικός μηχανισμός απέναντι στο οξειδωτικό στρες, καθώς η χολοπρασίνη και η χολερυθρίνη (προϊόν μεταβολισμού της χολοπρασίνης) λειτουργούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Kikuchi et al., 2005).

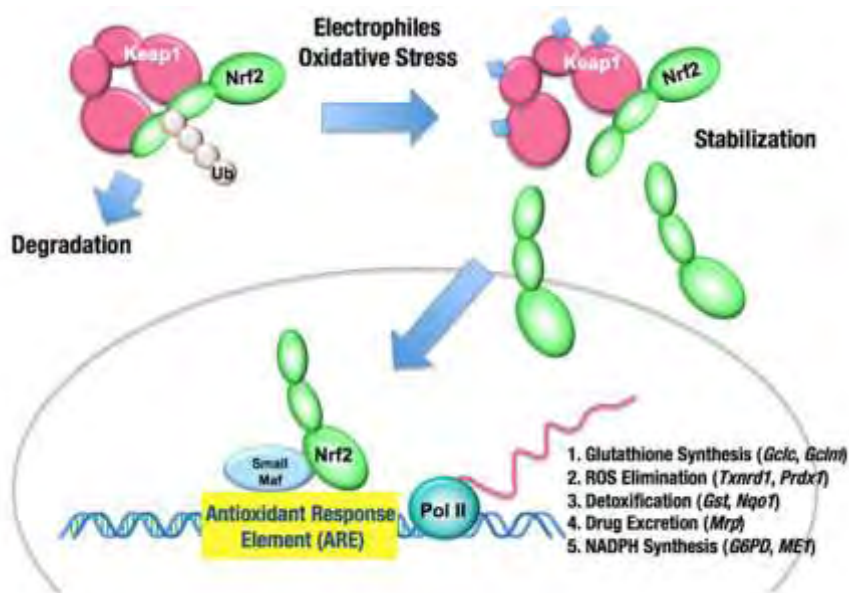
Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) είναι ένα άχρωμο και άοσμο αέριο, γνωστό για τις θανατηφόρες ιδιότητες του. Ωστόσο, χαμηλές συγκεντρώσεις CO ασκούν

διάφορες βιολογικές δράσεις, όπως δράση ως νευροδιαβιβαστής, προστασία εναντίον κυτταρικού θανάτου και οξειδωτικού στρες, δράση ως αντιφλεγμονώδες, ανοχή στη μεταμόσχευση οργάνων κ.ά. (Morse & Choi, 2005). Η χολοπρασίνη, πρόδρομο μόριο της χολερυθρίνης, έχει βρεθεί πως διαθέτει αντικές ιδιότητες και δρα ως αντιοξειδωτικό (Morse & Choi, 2005). Ο ελεύθερος Fe είναι ικανός να συμμετέχει σε διάφορες δηλητηριώδεις αντιδράσεις οξείδωσης (π.χ. αντίδραση Fenton) και γι' αυτό το λόγο πρέπει να απομακρύνεται από τα βιολογικά συστήματα. Μέσω της απελευθέρωσης Fe από την αίμη, η HO-1 συμβάλλει στη δημιουργία προοξειδωτικής κατάστασης στο κύτταρο. Ωστόσο, ο Fe που απελευθερώνεται από τη δράση της HO-1 αυξάνει τη σύνθεση φερριτίνης, η οποία αποθηκεύει τον ελεύθερο Fe και προστατεύει το κύτταρο (Morse & Choi, 2005).

Η επαγόμενη μορφή της HO-1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο σπλήνα και σε άλλους ιστούς υπεύθυνους για τον καταβολισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων (Ryter, Alam, & Choi, 2006). Η HO-1 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Ryter et al., 2006).

1.8.6 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (*nrf2*)

Το γονίδιο *nrf2* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα-μέλος της μικρής ομάδας των basic leucine zipper (bZIP) πρωτεϊνών. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο στην βασική και επαγόμενη έκφραση γονιδίων ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Mitsuishi, Motohashi, & Yamamoto, 2012).



Εικόνα 10: Μηχανισμός ρύθμισης Nrf2

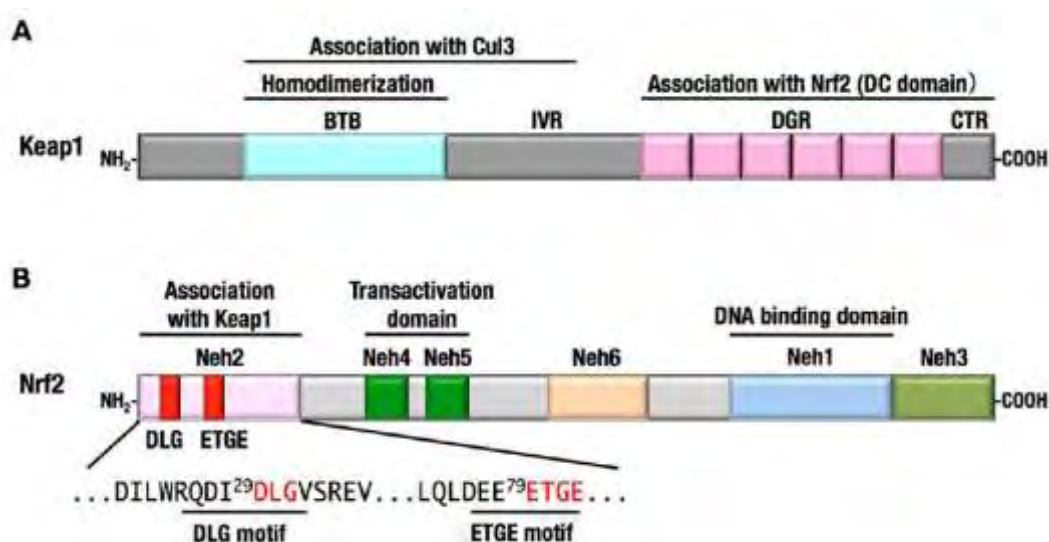
(Mitsuishi et al., 2012)

Η πρωτεΐνη Keap1 είναι πολύ σημαντική για τη ρύθμιση της ενεργότητας της Nrf2. Κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 ουβικιτινιλιώνεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της Keap1 και οδηγείται στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Μετά από έκθεση σε ηλεκτρονιόφιλα ή ROS, η Keap1 απενεργοποιείται και ο Nrf2 σταθεροποιείται. Συνεπώς, ο Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και ενεργοποιεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως NQO-1, GSTa2, HO-1 κ.ά. (Mitsuishi et al., 2012).

Τα γονίδια-στόχοι του Nrf2 εμπλέκονται στη σύνθεση γλουταθειόνης, στην εξουδετέρωση των ROS, στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών και φαρμάκων (Mitsuishi et al., 2012).

Ο Nrf2 ελέγχει την έκφραση γονιδίων μέσω των ARE περιοχών. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στους υποκινητές κυτταροπροστατευτικών και αντιοξειδωτικών γονιδίων (Itoh et al., 1999).

Μετά την είσοδο του στον πυρήνα, ο Nrf2 συνδέεται με τις μικρές Maf πρωτεΐνες προκειμένου να οδηγήσει στην ενεργοποίηση γονιδίων. Οι μικρές Maf πρωτεΐνες περιέχουν μία bZIP περιοχή σύνδεσης με το DNA και διμερίζονται, αλλά στερούνται την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης όπως οι μεγάλες Maf πρωτεΐνες. Οι μικρές Maf πρωτεΐνες δρουν ως συνενεργοποιητές για μεγάλες bZIP πρωτεΐνες και συνδέονται σε GC δινουκλεοτίδια των ARE (Qiang Ma, 2013).



Εικόνα 11: Δομή γονιδίων keap1 και nrf2 (Mitsuishi et al., 2012)



Εικόνα 12: Σύνδεση Keap1-Nrf2

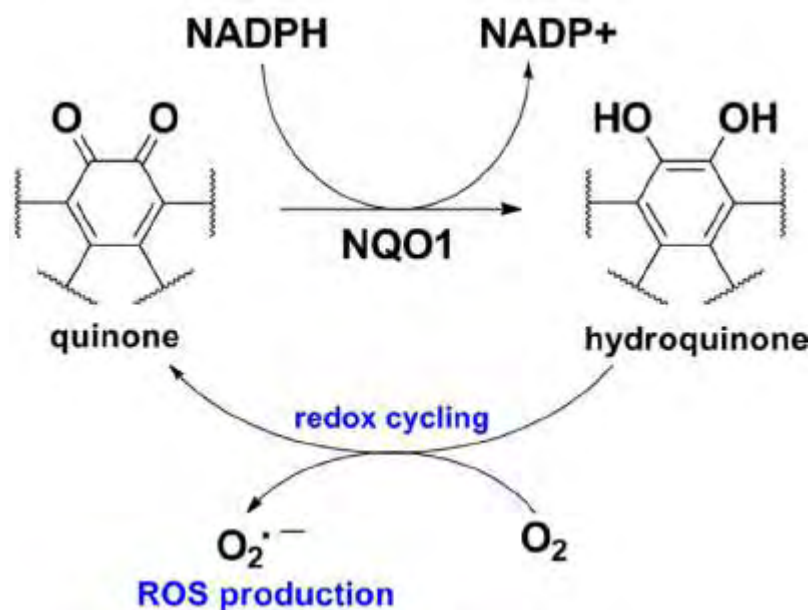
(Qiang Ma, 2013)

Μέσω των περιοχών BTB της N-τελικής περιοχής, η Keap1 συνδέεται με την E3 λιγάση. Δύο μόρια Keap1 συνδέονται και δημιουργούν ένα διμερές μέσω των BTB περιοχών της N-τελικής πλευράς, ενώ οι DC περιοχές του C-τελικού άκρου βρίσκονται σε απόσταση. Οι δύο DC περιοχές του C-τελικού άκρου του διμερούς Keap1 συνδέονται με ένα μόριο Nrf2. Η Neh2 περιοχή του N-τελικού άκρου του Nrf2 συνδέεται με τις DC περιοχές σε δύο διαφορετικά σημεία, τις ETGE και DLG μοτίβα (Mitsuishi et al., 2012). Συνεπώς, ο Nrf2 συνδέεται με την Keap1 σε αναλογία 1:2 (Ma, 2013).

Υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρονιόφιλων τροποποιούν όχι μόνο την Keap1, αλλά και πολλά κυτταρικά συστατικά, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια, γεγονός που επηρεάζει τη λειτουργία του κυττάρου. Λόγω της ύπαρξης κυστεϊνικών καταλοίπων στην Keap1, το σύστημα Keap1-Nrf2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε χαμηλά επίπεδα ηλεκτρονιόφιλων και ενεργοποιεί τους κυτταροπροστατευτικούς μηχανισμούς για την αποφυγή κυτταρικών βλαβών (Mitsuishi et al., 2012).

1.8.7 NAD(P)H- αφυδρογονάση των κινονών (*nqo1*)

Η NAD(P)H-αφυδρογονάση των κινονών (NQO-1) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο καταλύει την αναγωγή ενδογενών ή εξωγενών κινονών χρησιμοποιώντας το FAD σαν συνένζυμο. Η NQO-1 υφίσταται ως ομοδιμερές και χρησιμοποιεί το NADH ή NADPH ως αναγωγικό παράγοντα. Η έκφραση του ενζύμου ελέγχεται από το μονοπάτι Nrf2/Keap1/ARE (Atia, Alrawaiq, & Abdullah, 2014).

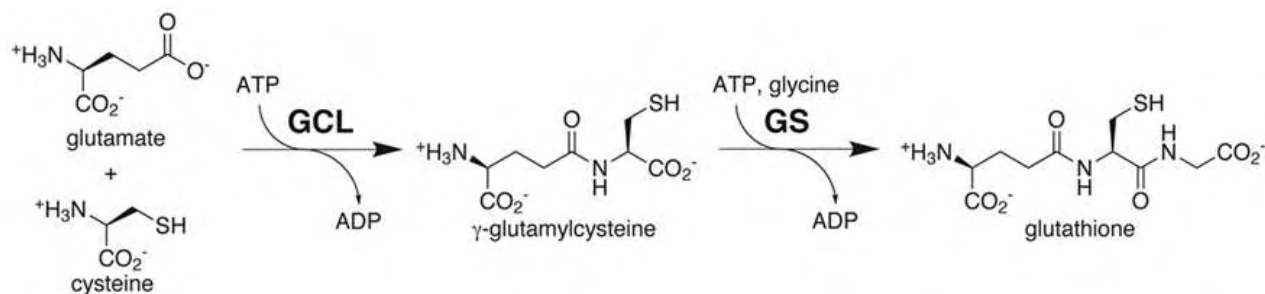


Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης NQO-1

Η NQO-1 θεωρείται ένζυμο μεταβολισμού της φάσης I. Ο ρόλος του είναι η μετατροπή των κινόνων στις λιγότερο δραστικές υδροκινόνες. Οι κινόνες είναι παράγωγα αρωματικών ενώσεων στα οποία έχουν αντικατασταθεί υδρογόνα από οξυγόνα και είναι ικανά να οδηγήσουν στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η μεταφορά 2 ή 4 ηλεκτρονίων από την NQO-1 στις κινόνες έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των υδροκινόνων, μορφές λιγότερο δραστικές. Συνεπώς, η NQO-1 προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες καθώς παρεμποδίζει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (Atia et al., 2014).

1.8.8 Λιγάση της γ-γλουτάμυλο κυστεΐνης (*gclc*)

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο αποτελούμενο από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της GSH καταλύεται από τη λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-GCL). Η γ-GCL είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο αποτελούμενο από την καταλυτική (GCLC) και τη ρυθμιστική υπομονάδα (GCLM). Οι δύο υπομονάδες του ενζύμου εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Franklin et al., 2009).

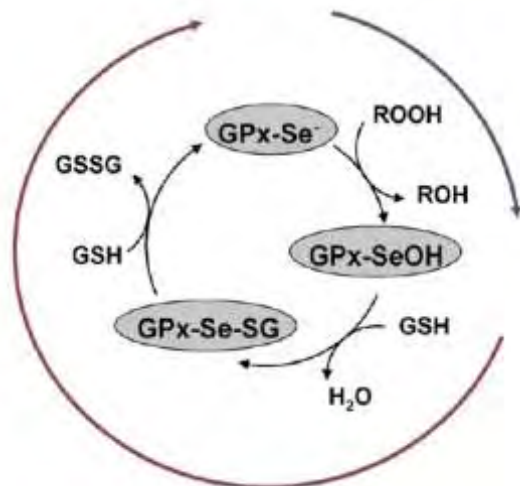


Εικόνα 14: Αντιδράσεις παραγωγής GSH

Το πρώτο και αργό βήμα της σύνθεσης της γλουταθειόνης καταλύεται από τη γ-GCL. Η σύνθεση της GSH ολοκληρώνεται με την προσθήκη γλυκίνης στη γ-γλουτάμυλοκυστεΐνη από τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS).

1.8.9 Περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (*gpx1*)

Η περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης (Gpx1) είναι ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O). Η Gpx1 είναι ένα τετραμερές ένζυμο και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (Lubos, Loscalzo, & Handy, 2011).

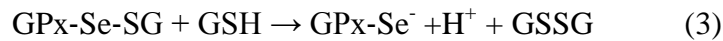
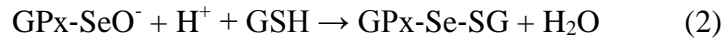


Εικόνα 15: Μηχανισμός δράσης Gpx1 (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013)

Η Gpx1 είναι μία σεληνοπρωτεΐνη με μία σεληνοκυστεΐνη (Sec) στο ενεργό της κέντρο. Η αναγωγή του H_2O_2 ή άλλων οργανικών υπεροξειδίων σε νερό πραγματοποιείται με την κατανάλωση γλουταθειόνης (GSH) ως αναγωγικό παράγοντα (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

Η αντίδραση που πραγματοποιεί η Gpx1 είναι η εξής:





1.8.10 Αναγωγή της γλουταθειόνης (*gsr*)

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα οξειδοαναγωγής των περισσότερων αερόβιων οργανισμών. Η ανηγμένη του μορφή (GSH) λειτουργεί ως πυρηνόφιλο με σκοπό τη μετατροπή ηλεκτρονιόφιλων ουσιών κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες (Deponte, 2013).

Η GR είναι μία φλαβοπρωτεΐνη. Η αντίδραση που καταλύει είναι η εξής:



Καθώς η GR μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή (GSSG) της γλουταθειόνης στην ανηγμένη (GSH), βοηθά στη διατήρηση υψηλών επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (Kamerbeek et al., 2007). Η GSH αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων βοηθώντας στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης.

1.9 Ενδημικά Εδώδιμα Φυτά

Η Μεσογειακή διατροφή βρίσκεται τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας, καθώς συντελεί αποδεδειγμένα στη διατήρηση ενός καλού επιπέδου υγείας και στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Βασικό πυλώνα της Μεσογειακής διατροφής αποτελεί η κατανάλωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, φρούτων, λαχανικών και η αποφυγή βλαβερών συνηθειών όπως η κατανάλωση ζωικών λιπών. Αναπόσπαστο τμήμα της παραδοσιακής αυτής διατροφής αποτελεί η βρώση άγριων χόρτων, τα οποία καταναλώνονται είτε βραστά με άφθονο ελαιόλαδο είτε σε πίτες είτε σε σαλάτες.

Τα βρώσιμα χόρτα αποτελούν στοιχείο της διατροφής των λαών της Μεσογείου ήδη από την αρχαιότητα. Ορισμένα εξ αυτών τα συναντάμε σε κείμενα του Θεόφραστου, του Διοσκουρίδη και του Πλήγιου ως φυτοθεραπευτικά φάρμακα, ενώ οι συνταγές για την παρασκευή τους αποτελούν μία πολύτιμη γνώση - κληροδότημα των περασμένων γενεών προς τις νεότερες. Ωστόσο, εξαιτίας των πολιτικών αναταράξεων της Ευρώπης του 20ου αιώνα και της αλλαγής των διατροφικών συνηθειών του πληθυσμού κατά την μεταπολεμική περίοδο με την πλήρη εκβιομηχανοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας, η κατανάλωση των χόρτων

συσχετίστηκε με τα χαμηλότερα κοινωνικά στρώματα και στιγματίστηκε ως «συνήθεια των φτωχών», ως δηλαδή η έλλειψη πρόσβασης σε τρόφιμα πολυτελείας.

Εν τούτοις, τα τελευταία χρόνια, χάρη στη στροφή του πληθυσμού προς έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής και χάρη στην προοδευτική αλλαγή της καταναλωτικής νοοτροπίας, τα παραδοσιακά προϊόντα, όπως τα βρώσιμα χόρτα, επανέρχονται στο προσκήνιο και αναδεικνύονται ως εδέσματα υψηλής διατροφικής αξίας. Επιπλέον, πλήθος μελετών επιβεβαιώνουν πλέον τις ευεργετικές τους ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις.

1.9.1 *Carthamus L. (GREM)*



Εικόνα 16 : Άνθη και φύλλα του φυτού *Carthamus lanatus*

Το γένος *Carthamus* ανήκει στην οικογένεια των Asteraceae (Compositae) και αποτελείται από 15 είδη, περισσότερα εκ των οποίων απαντώνται στη λεκάνη της Μεσογείου και σε μεσογειακού τύπου κλίματα. Τα φυτά του γένους *Carthamus* πιθανότατα προέρχονται από τη νότια Ασία, απ' όπου ήδη από τους προϊστορικούς χρόνους εξαπλώθηκαν στη νότια Ευρώπη και μετέπειτα στην Αμερική. Πρόκειται για ετήσια ή πολυετή φυτά, συνήθως με τη μορφή ακανθωτών θάμνων. Τα φύλλα τους είναι βελοειδή και σπάνια ολόκληρα, η κεφαλή είναι ομόγαμη ενώ τα αχάινια είναι συμπιεσμένα, σκληρά, γωνιώδη και κάποιες φορές διμορφικά. Τα βράκτια φύλλα είναι ακανθώδη και τα άνθη συνήθως είναι κίτρινα, ροζ ή σπάνια πορτοκαλί. Ο πάππος είναι διπλός και αποτελείται από δύο δακτυλίους.

Πίνακας 2: Ταξινομική κατάταξη του γένους *Carthamus*.

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Υπεράθροισμα	Εμβριόφυτα
Άθροισμα	Αγγειόσπερμα
Κλάση	Δικοτυλήδονα
Υποκλάση	Asteridae
Τάξη	Asterales
Οικογένεια	Asteraceae
Υποοικογένεια	Carduoideae
Φυλή	Cardueae
Υποφυλή	Centaureinae
Γένος	<i>Carthamus</i> L.

Εκχυλίσματα των φύλλων και των άνθων έχουν αξιοποιηθεί στην παραδοσιακή θεραπευτική πολλών λαών για την βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος, για την αντιμετώπιση γυναικολογικών προβλημάτων, του έλκους στομάχου και διαφόρων τύπων λοιμώξεων. Ορισμένα είδη του γένους και ιδιαίτερα το *C. tinctorius*, καλλιεργούνται από την αρχαιότητα ως πολύτιμες πηγές σπορέλαιου και φυσικών χρωστικών. Μάλιστα, χάρη στο έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα τους, τα άνθη του φυτού χρησιμοποιούνται εκτεταμένα ως εναλλακτική των κατά πολύ ακριβότερων στημόνων του φυτού *Crocus sativus*, με αποτέλεσμα συχνά να εντοπίζονται προβλήματα νοθείας.

1.9.2 *Cichorium* Spp (KAEM/CSEM)

Το γένος *Cichorium* ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και περιλαμβάνει 6 είδη, τα καλλιεργούμενα *C. intybus* και *C. endivia* και τα αυτοφυή *C. spinosum*, *C. calvum*, *C. bottae* και *C. pumilum*. Φυτά του γένους *Cichorium* απαντώνται κυρίως στην Ευρώπη αλλά ορισμένα είδη έχουν εισαχθεί και σε άλλα εύκρατα και ημίξηρα κλίματα. Βασικό διαγνωστικό χαρακτηριστικό του γένους αποτελεί η δομή του πάππου. Το ύψος των φυτών μπορεί να κυμαίνεται από μερικά εκατοστά έως και 2 μέτρα, ενώ ο βασικός άξονας του φυτού ανέρχεται μέσα από μία ροζέτα άμισχων, αραιών φύλλων. Οι κεφαλές είναι άμισχες και συχνά συγκεντρώνονται σε ομάδες των 2-8. Τα φυλλάρια (ή βράκτια φύλλα) είναι διαπλεκόμενα και τοποθετημένα σε δύο σειρές. Η ανθοδόχη είναι επιμήκης και αποτελείται από ένα σωλήνα και ένα δίσκο με

πέντε λοβούς. Αυτός ο τύπος στεφάνης είναι χαρακτηριστικός της φυλής Lactuceae (Cichoriae). Όπως και στα περισσότερα γένη, οι ανθήρες όλων των ειδών *Cichorium* δεν παρουσιάζουν διαγνωστικές διαφορές. Ο στύλος των *Cichorium* είναι του αποκαλούμενου «βερνονιοειδούς» τύπου, που είναι χαρακτηριστικός των φυλών *Vernoniaceae*, *Liabeae* και *Lactuceae*. Τα αχάινια των *Cichorium* είναι ωσειδή έως κυλινδρικά με ραβδώσεις στη βάση. Οι καρποί είναι συνήθως λείοι και το χρώμα τους κυμαίνεται από ανοιχτό καφέ με σκουρόχρωμες κηλίδες έως σκούρου καφέ όταν είναι ώριμοι.

Πίνακας 3: Ταξινομική κατάταξη του γένους *Cichorium*.

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Υπεράθροισμα	Εμβριόφυτα
Αθροισμα	Αγγειόσπερμα
Κλάση	Δικοτυλήδονα
Υποκλάση	Asteridae
Τάξη	Asterales
Οικογένεια	Asteraceae
Υποοικογένεια	Cichorioideae
Φυλή	Cichorieae
Υποφυλή	Cichoriinae
Γένος	<i>Cichorium</i> L.

1.9.2.1 *Cichorium intybus* (ΚΑΕΜ)

Το *Cichorium intybus*, γνωστό στην Ελλάδα και με το όνομα «ραδίκι» αποτελεί ίσως το γνωστότερο εκπρόσωπο του γένους. Πρόκειται για μία πολυετή πόα, με βλαστό ελαφρά τριχωτό ή λείο. Τα φύλλα είναι μεγάλα, λοβωτά ή οδοντωτά και τα άνθη μπλε. Η άνθιση γίνεται από το Μάιο έως τον Ιούνιο και συνήθως απαντάται σε πεδινές και ημιορεινές ζώνες. Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί 4 ποικιλίες με ελαφρώς διαφορετικά βοτανικά χαρακτηριστικά, αν και όλα παρουσιάζουν τους κοινούς δείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα διακρίνονται οι ποικιλίες «Root Chicory», «Witloof», «Pain de Sucre» και «Radicchio». Ενώ απαντάται και σε άγρια μορφή, το ραδίκι καλλιεργείται ευρέως τόσο ως εδώδιμο λαχανικό αλλά και για τη ρίζα του, η οποία εφόσον καβουρδιστεί, χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του καφέ. Επιπλέον, από τη ρίζα του *Cichorium intybus* απομονώνεται η ινουλίνη, μία φρουκτάνη με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. Οι ποικιλίες δυνατότητες αξιοποίησης του καθώς και η ευκολία που παρουσιάζει στη γενετική τροποποίηση, καθιστούν το *C. intybus* μία από τις καλλιέργειες του μέλλοντος, γύρω από την οποία αναπτύσσεται μία ολοένα αυξανόμενη αγορά.

Ωστόσο, το «ραδίκι» παρουσιάζει και ιδιαίτερο ιστορικό και εθνοφαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς αναφορές σε αυτό συναντάμε ακόμη και σε κείμενα του Θεόφραστου, του Διοσκουρίδη και του Πλήνιου. Τμήματα του φυτού ή εκχυλίσματα αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως φυτοθεραπευτικά προϊόντα για την αντιμετώπιση δερματικών λοιμώξεων, ως χολαγωγά και ευστόμαχα, ενώ στην αγιουβερδική και κινέζικη θεραπευτική εκχυλίσματα του *C. intybus* συχνά περιλαμβάνονται σε ηπατοπροστατευτικά σκευάσματα. Σύγχρονες μελέτες καταδεικνύουν τη σημαντική αντιοξειδωτική δράση του φυτού σε *in vitro* μοντέλα, καθώς και την πιθανή αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντιηπατοτοξική και υπογλυκαιμική δράση των εκχυλισμάτων του *C. intybus*.



Εικόνα 17: Άνθη και φύλλα του φυτού *Cichorium Intybus*

1.9.2.2 *Cichorium spinosum* (CSEM)

Το *Cichorium spinosum*, κοινώς «σταμναγκάθι», είναι μία πολυετής πόα, ενδημική της περιοχής της Μεσογείου, με κοντούς, ακανθωτούς βλαστούς, διακλαδισμένους από τη βάση. Τα φύλλα του φυτού είναι πτερόβολα ή οδοντωτά και τα άνθη είναι χρώματος μπλε. Πρόκειται για ένα άγριο χόρτο που ευδοκimeί σε μεγάλα υψόμετρα και παρουσιάζει ιδιαίτερη δυσκολία στη συλλογή. Η άνθιση λαμβάνει χώρα από το



Εικόνα 18: Άνθη και φύλλα του φυτού *Cichorium spinosum*

Μάιο έως τον Ιούνιο ενώ καταναλώνεται από το Μάρτιο έως το Μάιο. Αποτελεί ένα δυσεύρετο και πολύτιμο διατροφικά έδεσμα. Μάλιστα, το σταμναγκάθι παρουσιάζει υψηλότερη διατροφική αξία και από το σπανάκι καθώς είναι πλουσιότερο σε ιγχοστοιχεία, ακόρεστα λιπαρά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνη C και E.

Όσον αφορά στο φυτοχημικό προφίλ του *C. spinosum*, από τα ανώτερα τμήματα του φυτού έχουν απομονωθεί υδροξυκινναμικά οξέα, με βασικότερο το κιχορικό, γλυκοσίδια και γλυκουρονίδια των φλαβονοειδών κερκετίνη και λουτεολίνη.

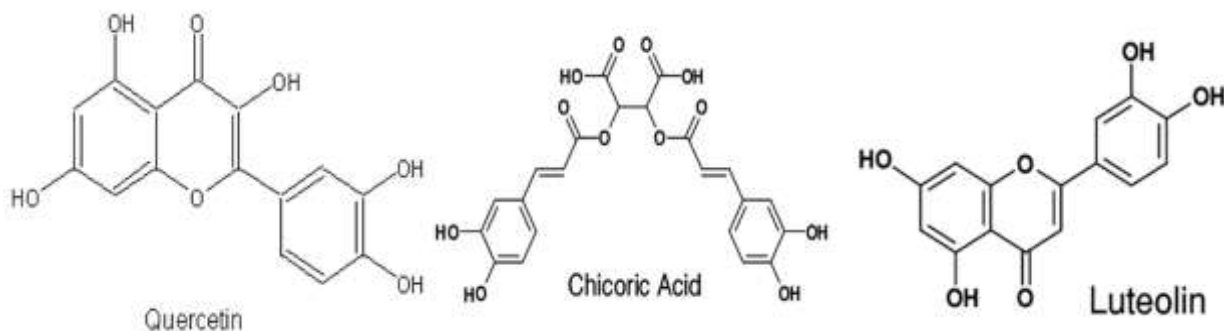
1.9.3 Χημική σύσταση

Πίνακας 4: Ποιοτική σύσταση των φυτικών εκχυλισμάτων

Εκχυλίσματα Εδώδιμων Χόρτων			
Plant	Type of extract	Extract Code	Description
<i>Carthamus spp.</i>	enriched decoction (leaves & stems)	GREM_3	Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη αλλά και σε υδροξυκινναμικά οξέα όπως το χλωρογενικό
<i>Cichorium spp.</i>	enriched decoction (leaves & stems)	KAEM_3	Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη.
<i>Cichorium spinosum</i>	decoction (leaves & stems)	CSEM_A1	Βασικό μεταβολίτη του εκχυλίσματος αποτελεί το κιχορικό οξύ, ενώ είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Μεταξύ άλλων περιέχονται επίσης σσεκιτερπενικές λακτόνες και άλλα φαινολικά οξέα.



Εικόνα 19: Χημική δομή χλωρογενικών οξέων



Εικόνα 20: Χημική δομή κερκετίνης, κιχωρικού οξέος και λουτεολίνης

2. Σκοπός

Ο σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός δράσης επιλεγμένων εκχυλισμάτων από ελληνικά εδάφιμα φυτά. Ειδικότερα εξετάστηκε η επίδρασή τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς κι η πιθανή επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Τέλος, μελετήθηκε η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Φυτικά Εκχυλίσματα

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 3 εκχυλίσματα από ενδημικά φυτά:

- Το εκχύλισμα GREM από το φυτό *Carthamus lanatus*
- Το εκχύλισμα KAEM από το φυτό *Cichorium intybus*
- Το εκχύλισμα CSEM από το φυτό *Cichorium spinosum*

3.1.1 Παραγωγή των εκχυλισμάτων από τα φυτά

Όλα τα φρέσκα χόρτα που παραλήφθηκαν, καθαρίστηκαν με άφθονο νερό, αφαιρέθηκαν οι ρίζες τους και έπειτα μαγειρεύτηκαν σύμφωνα με τον παραδοσιακό τρόπο. Συγκεκριμένα, τα χόρτα προστίθενται σε νερό που βράζει, σε αναλογία τέτοια ώστε το νερό να καλύπτει οριακά τα χόρτα (σε αναλογία περίπου 0,5 kg νωπών φύλλων/ 1 L νερού) και αφήθηκαν να βράσουν για 15 με 20 λεπτά έως ότου μαγειρευτούν. Στη συνέχεια τα χόρτα αφαιρέθηκαν και στραγγίστηκαν και το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από το βρασμό τους διηθήθηκε από διηθητικό ηθμό για να απομακρυνθούν εναπομείναντα χρώματα και φυτικά υπολείμματα. Τα εκχυλίσματα ξηράνθηκαν και το εναπομείναν φυτικό υλικό καταψύχθηκε στους -80 °C και λυοφιλοποιήθηκε.

Στην περίπτωση των GREM (*Carthamus lanatus*) και KAEM (*Cichorium intybus*) τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από το βρασμό των βρώσιμων χόρτων υπέστησαν επεξεργασία με ενεργοποιημένη πολυμερική ρητίνη προσρόφησης XAD7HP, με στόχο την απομάκρυνση της πληθώρας των σακχάρων που αυτά περιείχαν. Η συγκεκριμένη ρητίνη διαθέτει την ιδιότητα να προσροφά σχετικά πολικά συστατικά από άπολα συστήματα διαλυτών και μη αρωματικές ενώσεις από πολικά συστήματα διαλυτών. Από κάθε αρχικό εκχύλισμα παραλήφθηκαν δύο θυγατρικά εκχυλίσματα, ένα υδατικό και ένα αιθανολικό εκ των οποίων χρησιμοποιήσαμε το υδατικό.

3.2 Τεστ του Ames

3.2.1 Γενικά

Το τεστ του Ames, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Ames και τους συνεργάτες του, είναι μία μέθοδος μικρής διάρκειας (short-term), αξιόπιστη και ευαίσθητη που έχει ως σκοπό την ανίχνευση χημικών ουσιών που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι εξαρτώμενα από το αμινοξύ ιστιδίνη, δηλαδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Όταν τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης τότε είναι πιθανό να συμβούν επαναμεταλλάξεις, δηλαδή νέες μεταλλάξεις στα ήδη μεταλλαγμένα γονίδια της ιστιδίνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία. Μόνο τα κύτταρα στα οποία έχουν συμβεί επαναμεταλλάξεις μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Για το λόγο αυτό η μέθοδος ανήκει στη κατηγορία των τεστ αντιστροφής (reversion tests). Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Όταν μία μεταλλαξιγόνο ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό θα προκαλέσει αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τις καλλιέργειες στις οποίες δεν έχει προστεθεί η συγκεκριμένη ουσία.

Υπάρχουν διάφορα στελέχη *S. typhimurium*, καθένα από τα οποία είναι ευαίσθητο στην πρόκληση μεταλλάξεων από διαφορετικές κατηγορίες χημικών ουσιών. Στη συγκεκριμένα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102 το οποίο είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστιδίνης που υπάρχει σε αυτό το στέλεχος είναι η *hisG428*, η οποία είναι μία μετάλλαξη λήξης (TAA) και μπορεί να αναστραφεί από όλες τις πιθανές μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης (μεταπτώσεις ή μεταστροφές). Η μετάλλαξη *hisG428* βρίσκεται στο πλασμίδιο pAQ1 που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 με σκοπό να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις ανάστροφων μεταλλάξεων. Επίσης το πλασμίδιο pAQ1 προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Το στέλεχος TA102, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη *S. typhimurium*, φέρει χαρακτηριστικά που το καθιστούν πιο ευαίσθητο στη δράση χημικών

μεταλλαξιγόνων. Συγκεκριμένα φέρει τη μετάλλαξη *rfa* που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Επίσης, περιέχει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις μέσω ενίσχυσης του επιδιορθωτικού μηχανισμού βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη (error-prone recombinational repair pathway). Το πλασμίδιο αυτό προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευσή του.

Για να θεωρηθεί μια χημική ένωση ότι είναι μεταλλαξιγόνος σύμφωνα με το τεστ του Ames θα πρέπει να πληρούνται δύο βασικά κριτήρια:

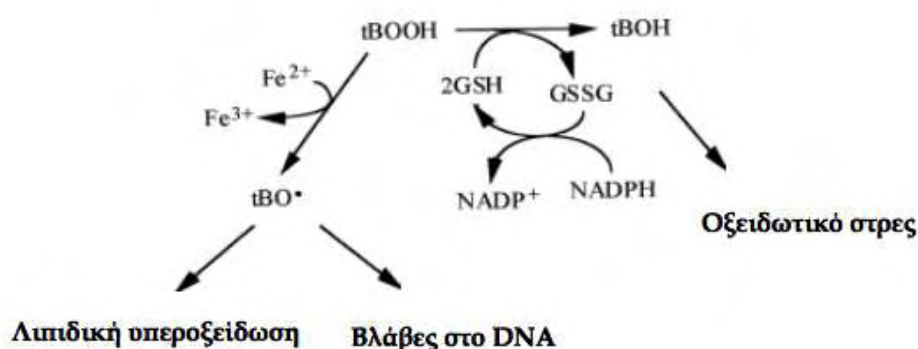
- 1) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να είναι τουλάχιστον διπλάσιος σε κάποια από τις συγκεντρώσεις της, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μάρτυρες (δηλαδή αυτές στις οποίες προστίθενται μόνο βακτήρια).
- 2) Ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών στις καλλιέργειες που έχει προστεθεί η χημική ένωση να αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης.

Επίσης, το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Για το σκοπό αυτό, σε κάποιες καλλιέργειες προστίθεται μία μεταλλαξιγόνος ουσία ενώ σε άλλες καλλιέργειες προστίθεται η μεταλλαξιγόνος ουσία μαζί με την πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο ουσία. Μείωση του αριθμού των επαναμεταλλαγμάτων στις δεύτερες καλλιέργειες σε σύγκριση με τις πρώτες είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης της ουσίας.

3.2.2 Μηχανισμός δράσης του μεταλλαξιγόνου παράγοντα *t*-BOOH

Ο οξειδωτικός παράγοντας *tert*-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (*t*-BOOH) είναι ένα οργανικό υδροπεροξειδίο. Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών στα κύτταρα (Alia, Ramos, Mateos, Bravo, & Goya, 2005; Sies & Summer, 1975). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του *t*-BOOH που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 21. Έχει παρατηρηθεί ότι ο οξειδωτικός παράγοντας *t*-BOOH οξειδώνει την

GSH, μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG (Lima, Fernandes-Ferreira, & Pereira-Wilson, 2006; Martin et al., 2001; Sies & Summer, 1975). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα τα Fe^{2+} οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών $tBOO^{\bullet}$ (Hix, Kadiiska, Mason, & Augusto, 2000; Martin et al., 2001). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες $tBOO^{\bullet}$ (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του $t-BOOH$ με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξειδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και την πρόκληση βλαβών στο DNA (Latour, Demoulin, & Buc-Calderon, 1995; Martin et al., 2001).



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του $t-BOOH$

3.2.3 Υλικά και μεθοδολογία

Διάλυμα VB salt

dH ₂ O (ml)	MgSO ₄ (gr)	Κιτρικό οξύ (gr)	K ₂ HPO ₄ (gr)	Sodium ammonium phosphate (gr)
100	1	10	50	17,5

Διάλυμα γλυκόζης 10%

dH ₂ O (ml)	Γλυκόζη (gr)
200	20

Διάλυμα Glucose minimal agar

dH ₂ O (ml)	Agar (gr)	VB salt διάλυμα (ml)	Διάλυμα γλυκόζης 10% (ml)
186	3	4	10

Διάλυμα top agar

dH ₂ O (ml)	Agar (gr)	Χλωριούχο νάτριο (gr)	Διάλυμα ιστιδίνης 0.5mM (ml)
40	0.24	0.24	4

Διάλυμα ιστιδίνης 0.5mM

dH ₂ O (ml)	Ιστιδίνη (mg)
100	9,6

Θρεπτικό υλικό (Nutrient broth)

dH ₂ O (ml)	Nutrient broth (gr)
300	2,4

- Εναιωρήσαμε τα βακτήρια της *Salmonella* σε Nutrient broth (1 δισκίο σε 100ml) και επώασαμε overnight στους 37°C. Την επόμενη μέρα φωτομετρήσαμε στα 600nm μέχρι η απορρόφηση να γίνει 1-2. Το εναιώρημα διαχωρίστηκε σε κλάσματα (frozen stock cultures) τα οποία περιέχουν 0,5ml γλυκερόλης και 0,5ml καλλιέργειας. Τα κλάσματα αυτά τα φυλάξαμε στους -80 °C για μελλοντική χρήση.
- Προσθέσαμε τα στελέχη της *Salmonella* από τα frozen stock cultures στο θρεπτικό υλικό. Σε θρεπτικό υλικό όγκου 30ml προσθέσαμε 700μl καλλιέργειας. Αφήσαμε την καλλιέργεια στους 37°C. Στη συνέχεια φωτομετρήσαμε στα 540nm μέχρι οπτική απορρόφηση να γίνει 0.1-0.2 (1-2X10⁹ CFU/ml).
- Τα μίγματα προετοιμάστηκαν σε σωλήνες falcon. Ο αριθμός των σωλήνων ήταν ίσος με τον αριθμό των καλλιεργειών και τους διατηρούνταν στους 43°-48 °C σε υδατόλουτρο. Για κάθε κατάσταση είχαμε 3 επαναλήψεις. Σε κάθε σωλήνα προσθέσαμε top agar, φυτικό εκχύλισμα, *t*-BOOH, dH₂O και βακτηριακή καλλιέργεια σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Περιεχόμενα τριβλίων test Ames

	Top Agar	Εκχύλισμα	<i>t</i> -BOOH	dH ₂ O	Overnight Culture
Control	2ml	-	-	100μl	100μl
Μόνο <i>t</i> -BOOH	2ml	-	50μl	50μl	100μl
C 1	2ml	50μl	50μl	-	100μl
C 2	2ml	50μl	50μl	-	100μl
C 3	2ml	50μl	50μl	-	100μl
C 4	2ml	50μl	50μl	-	100μl
C 5	2ml	50μl	50μl	-	100μl

- Ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας *t*-BOOH ήταν αραιωμένος κατά 1/500 το οποίο αντιστοιχεί σε 20,64 mmol σε κάθε τρυβλίο.
- Τα φυτικό εκχυλίσματα υπήρχαν σε πέντε διαδοχικές συγκεντρώσεις: 20μg/τρυβλίο, 50μg/τρυβλίο, 100μg/τρυβλίο, 200μg/τρυβλίο, 300μg/τρυβλίο.
- Μετά από ελαφριά ανάδευση το περιεχόμενο των σωλήνων επιστρώθηκε στα τρυβλία με το GM agar (25ml). Τα τρυβλία περιστράφηκαν ώστε το top agar να απλωθεί σε όλη την επιφάνεια.
- Αφού το top agar έπηξε (2-3 λεπτά) τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στους 37°C για 48 ώρες.
- Μετά την επώαση έγινε η καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε κάθε τρυβλίο.
- Τέλος, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση των τρυβλίων για τον έλεγχο πιθανής κυτταροτοξικής επίδρασης των εκχυλισμάτων.

3.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα EA.hy926 (ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου). Αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

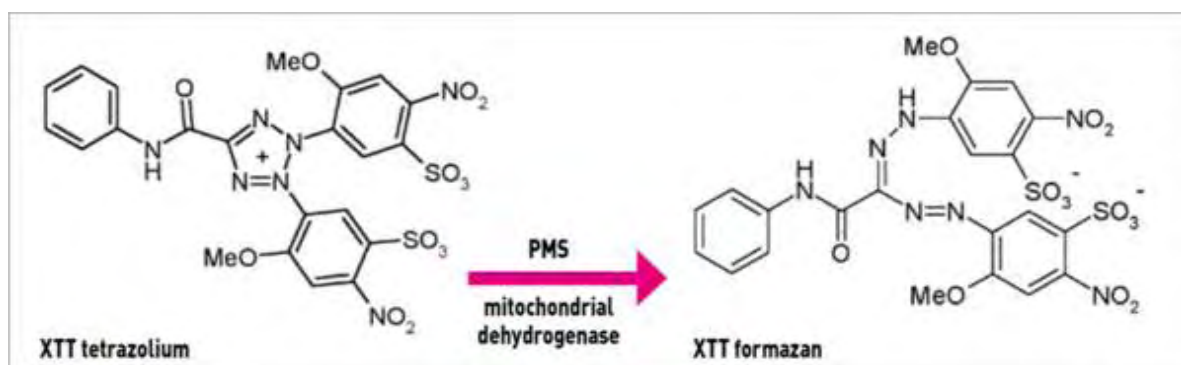
Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε

5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται 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).

3.4 Μέθοδος XTT για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων

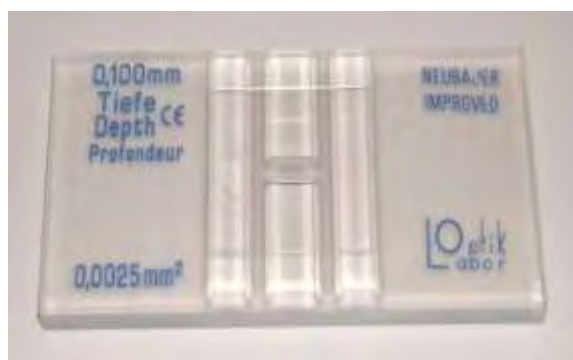
Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων στα EA.hy926 κύτταρα στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche.

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.



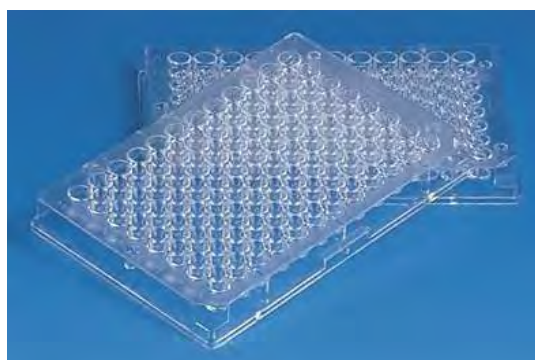
Εικόνα 22: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 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.



Εικόνα 23: Πλάκα Neubauer

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10^4 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% CO_2 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 βιοδραστικά συστατικά) συνολικού όγκου 100 μl. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια. 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 37°C και σε 5% CO_2 .



Εικόνα 24: 96-well plate

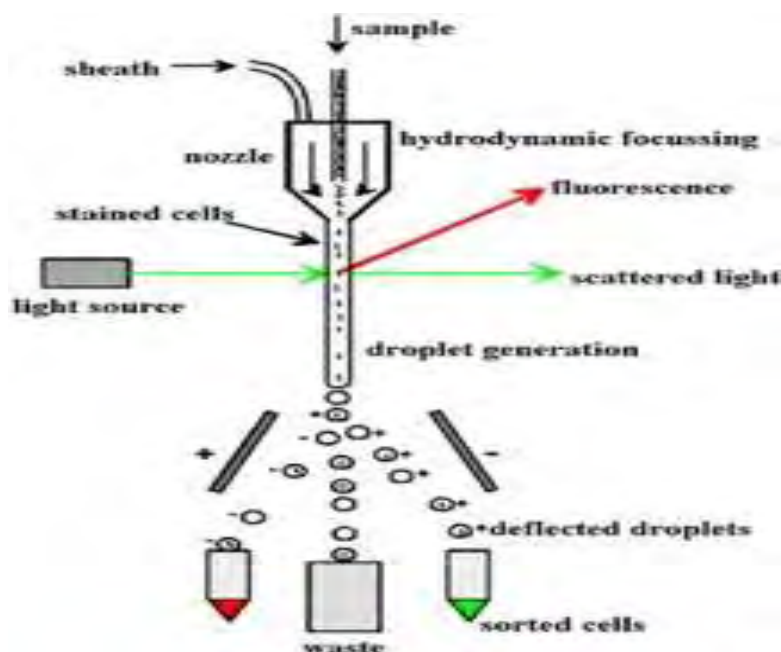
Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl από το μίγμα XTT σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. Το μείγμα του XTT προκύπτει από την ανάμιξη XTT A και XTT B (PMS), πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται αμέσως πριν την χρησιμοποίησή του. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm καθώς και στα 630nm (ως τιμή αναφοράς) με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού

Gen5 (Biotek). Η % αναστολή των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy 926 υπολογίζεται από τον τύπο:

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

3.5 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).



Εικόνα 25 : Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

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

ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο).

Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

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 προσδέεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδέεται 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 φυτικό εκχύλισμα σε τέσσερις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 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 θρυψίνη (333 μl 0,25% για τις 25cm² φλάσκες), επαναίωρηση 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 2ml PBS

(0,01 M με pH 7,4), έπειτα φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση 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.

3.6 Απομόνωση ολικού RNA και μετατροπή σε cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τις 2 κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια εμπορικών kit. Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει λύση κυττάρων με τη χρήση lysis buffer-μερκαπτοαιθανόλης, κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση αιθανόλης, κατακράτηση νουκλεϊκών οξέων σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη και προσθήκη νερού για συλλογή RNA και DNA. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην συλλογή τόσο RNA όσο και DNA λόγω του αρνητικού τους φορτίου.

Το επόμενο βήμα μετά τη συλλογή των νουκλεϊκών οξέων είναι η μετατροπή του mRNA σε cDNA. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στη χρήση των oligodTs, τα οποία συνδέονται πάνω στην poly(A) ουρά των mRNA και η αντίστροφη μεταγραφή επιμηκύνει την αλυσίδα προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα απέναντι από τα ριβονουκλεϊκά οξέα της μήτρας.

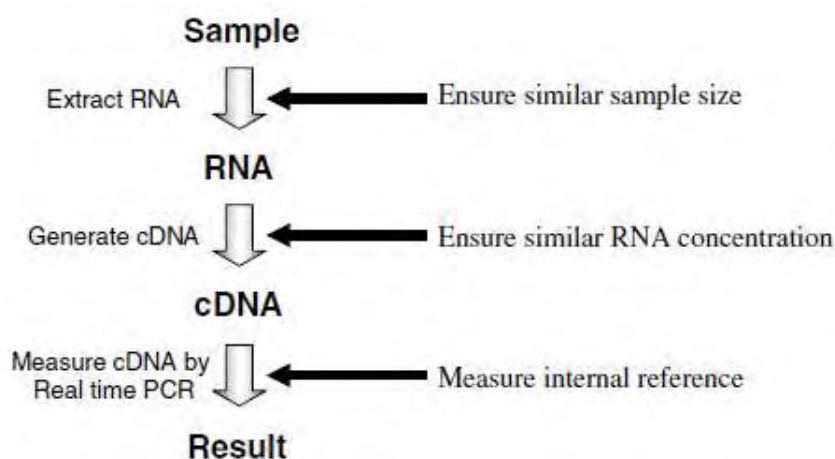
3.7 Real-time PCR

Η real-time PCR είναι μία εργαστηριακή τεχνική βασισμένη πάνω στη μέθοδο της PCR. Πρόκειται για μία καθιερωμένη τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης γονιδίων.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η τεχνική της real-time PCR με τη χρήση της SYBR-Green. Η SYBR-Green είναι μία χρωστική που διαθέτει την ικανότητα να προσδένεται πάνω σε δίκλωνο DNA. Με τη σύνδεση της πάνω στο DNA, εκπέμπει φθορισμό. Η χρωστική αυτή απορροφά στα 492nm και εκπέμπει στα 516nm.

Στα αρχικά στάδια της PCR, ο φθορισμός που εκπέμπεται από την SYBR-Green είναι αδύναμος και δεν ξεπερνάται η ουδός που απαιτείται (Ct – Cycle Threshold). Το Ct είναι ανάλογο του λογαρίθμου της αρχικής ποσότητας DNA του δείγματος. Κατά την εκθετική φάση της PCR, ο φθορισμός διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Μετά τον 35^ο κύκλο περίπου, η ένταση του σήματος φτάνει σε plateau, υποδεικνύοντας ότι έχει επέλθει κορεσμός στην PCR (Ponchel et al., 2003).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της real-time PCR περιλαμβάνει κανονικοποίηση. Η κανονικοποίηση ως προς ένα γονίδιο αναφοράς είναι μία απλή μέθοδος για τον έλεγχο εσωτερικών σφαλμάτων της real-time PCR. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς ένα housekeeping γονίδιο (γονίδιο αναφοράς). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου γονιδίου αποτελεί το GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης). Η έκφραση αυτών των γονιδίων βρίσκεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς και παραμένει ανεπηρέαστη από εξωτερικούς παράγοντες (Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005).



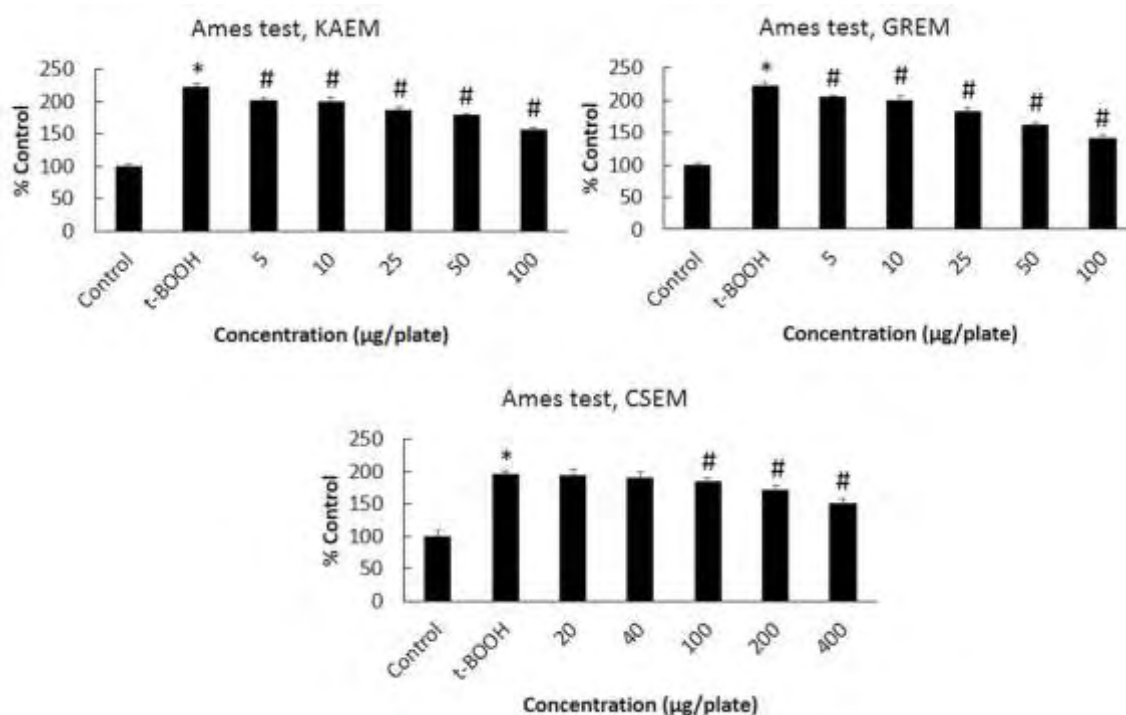
Εικόνα 26: Συνολική διαδικασία πειράματος
(Huggett et al., 2005)

Η συνολική διαδικασία αποτυπώνεται στην παραπάνω εικόνα. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η απομόνωση του ολικού RNA του κυττάρου. Το mRNA στη συνέχεια μετατρέπεται σε cDNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολουθεί η real-time PCR.

4. Αποτελέσματα

4.1 Τεστ του Ames

Τα αποτελέσματα καταμέτρησης αποικιών παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό παρατηρούμενων αποικιών των control τρυβλίων. Εκτός των control απεικονίζονται κατά σειρά τα τρυβλία που περιέχουν μόνο τον οξειδωτικό παράγοντα (*t*-BOOH), αυτά που περιέχουν τις διάφορες συγκεντρώσεις φυτικού εκχυλίσματος σε συνδυασμό με το *t*-BOOH και τέλος τα τρυβλία που περιέχουν μόνο φυτικό εκχύλισμα. Αξίζει να σημειωθεί πως σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξική επίδραση των εκχυλισμάτων έπειτα από μικροσκοπική εξέταση των τρυβλίων. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές συμβολίζονται με * όταν αφορούν τη σύγκριση με το control και με # όταν αφορούν τη σύγκριση με το *t*-BOOH.



Λιάγραμμα 1: Αποτελέσματα Test Ames των φυτικών εκχυλισμάτων

Χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 5 ως 100 µg/plate για τα εκχυλίσματα KAEM/GREM, ενώ για το CSEM που βάσει παράλληλων πειραμάτων

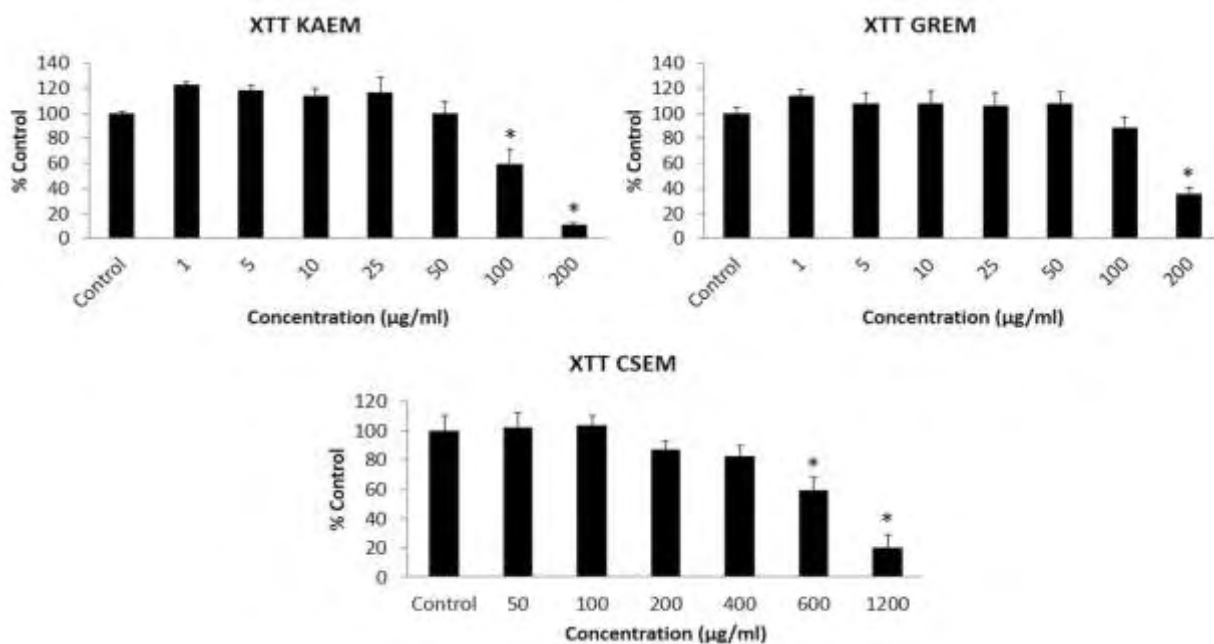
εμφάνισε ασθενέστερη αντιοξειδωτική ικανότητα, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 20 έως 400 µg/plate. Χρησιμοποιήθηκε γνωστός μεταλλαξιγόνος παράγοντας *t*-BOOH παράλληλα με την ουσία μας και αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως υπήρξε δόσοεξαρτώμενη μείωση των μεταλλάξεων, με όλα τα εκχυλίσματα να εμφανίζουν την μέγιστη προστασία DNA στην μέγιστή τους συγκέντρωση. Η % αναστολή των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκε σε κάθε συγκέντρωση αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: % Αναστολή Test Ames

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση (µg/ml)	Αναστολή (%)
KAEM	5	17,5
	10	19,1
	25	29,5
	50	35,5
	100	54,2
GREM	5	14,1
	10	19,2
	25	32,0
	50	48,5
	100	65,1
CSEM	20	-
	40	-
	100	14,9
	200	29,9
	400	57,1

4.2 XTT:

Τα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα. Σε κάθε διάγραμμα έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στις φλάσκες control. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές συμβολίζονται με * και αφορούν τη σύγκριση με το control.



Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα Test κυτταροτοξικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων

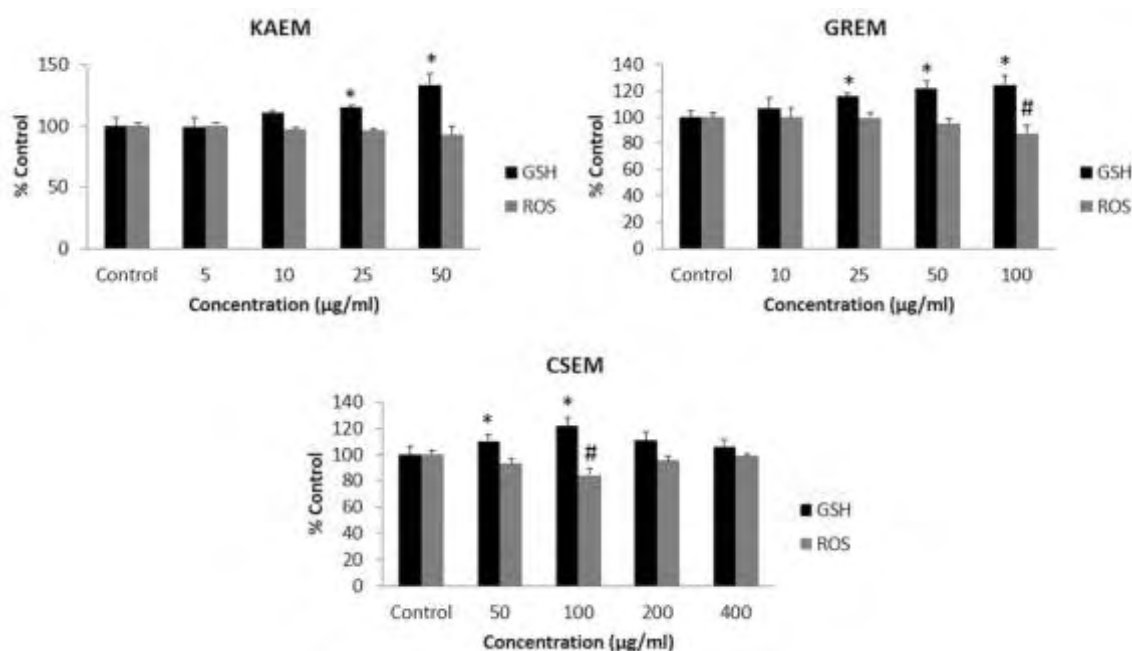
Πιο κυτταροτοξικό εκχύλισμα είναι το KAEM (*Cichorium spp.*, υδατικό εκχύλισμα από βρασμό + επεξεργασία με ρητίνη XAD) καθώς φαίνεται να μειώνει τη βιωσιμότητα στατιστικώς σημαντικά στα 100 µg/ml (άρα μπορούμε να χορηγήσουμε στα κύτταρα έως και 50 µg/ml) ενώ τα GREM (*Carthamus spp.*, υδατικό εκχύλισμα από βρασμό + επεξεργασία με ρητίνη XAD) και CSEM (*Cichorium spinosum*, υδατικό εκχύλισμα από βρασμό) εμφανίζουν τοξικότητα στα 100 και 600 µg/ml αντίστοιχα.

Πίνακας 7: Επίπεδα κυτταροτοξικότητας εκχυλισμάτων

Εκχύλισμα	Κυτταροτοξικότητα στα (µg/ml):
KAEM	100
GREM	200
CSEM	600

4.3 Κυτταρομετρία ροής

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control στα επίπεδα GSH συμβολίζονται με *, ενώ οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control στα επίπεδα ROS με #.



Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής των φυτικών εκχυλισμάτων

4.3.1 GSH levels

Το εκχύλισμα GREM αύξησε στατιστικώς σημαντικά τη γλουταθειόνη στα 25, 50 και 100 μg/ml κατά 18,6%, 18,9% και 24,7% αντίστοιχα. Το KAEM προκάλεσε αύξηση κατά 13,7% και 33,4% στα 25 και 50 μg/ml αντίστοιχα άρα βλέπουμε ότι είναι πιο δραστικό από το GREM. Τέλος, το CSEM οδήγησε σε αύξηση της GSH κατά 10,5% και 21,6% στα 50 και 100 μg/ml αντίστοιχα.

Πίνακας 8: Υψηλότερη μεταβολή επιπέδων ενδογενούς γλουταθειόνης

Εκχύλισμα	Αύξηση (%)	Συγκέντρωση
KAEM	33,4	50 μg/ml
GREM	24,7	100 μg/ml
CSEM	21,6	100 μg/ml

4.3.2 ROS levels

Το GREM μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των ROS στα 100 μg/ml κατά 12,1% ενώ το KAEM δεν εμφάνισε κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση. Το CSEM

οδήγησε σε μείωση των ROS κατά 6,83% και 15,66% στα 50 και 100 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα.

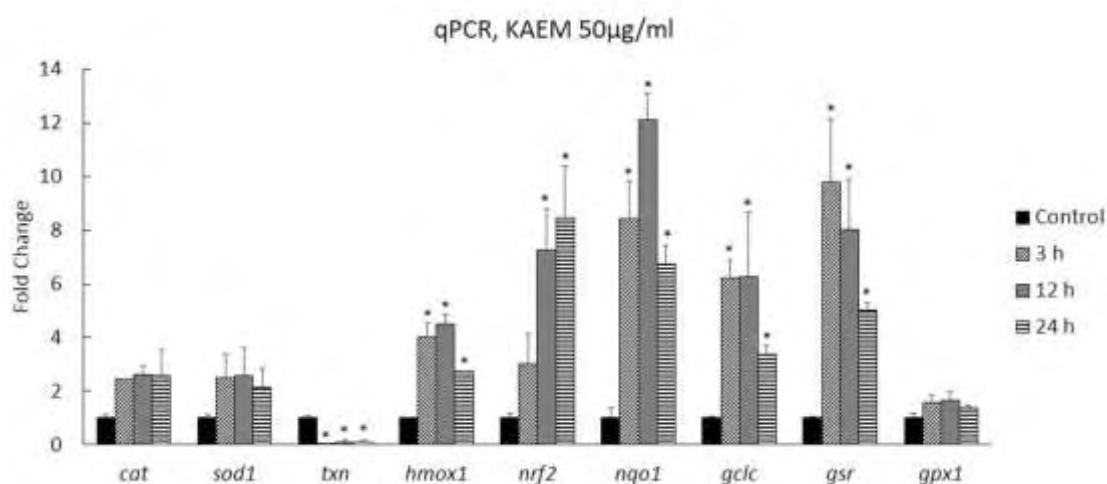
Πίνακας 9: Υψηλότερη μεταβολή επιπέδων ενδογενών ROS

Εκχύλισμα	Μείωση (%)	Συγκέντρωση
KAEM	-	-
GREM	12,1	100 $\mu\text{g/ml}$
CSEM	15,66	100 $\mu\text{g/ml}$

4.4 qPCR

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, επιλέχθηκαν αντίστοιχα για τα εκχυλίσματα ΚΑΕΜ, GREM, CSEM οι συγκεντρώσεις των 50, 100 και 100 µg/ml καθώς σε αυτές τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε η μέγιστη αύξηση των επιπέδων της GSH (+33,4%, 19,9% και 21,6% αντίστοιχα). Τα γονίδια η έκφραση των οποίων μελετήθηκε, αποτελούν στόχους του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 που σχετίζεται με την απόκριση σε οξειδωτικούς παράγοντες και κωδικοποιούν σημαντικές πρωτεΐνες της αντιοξειδωτικής άμυνας. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν τα γονίδια της καταλάσης (*cat*), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (*sod1*), της θειορεδοξίνης (*txn*), της οξυγενάσης της αίμης (*hmox1*), του ίδιου του Nrf2 (*nrf2*), της NAD(P)H-αφυδρογονάσης των κινονών (*nqo1*), της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (*gclc*), της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (*gsr*) και της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (*gpx1*). Η έκφραση του κάθε γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς την έκφραση του γονιδίου *gapdh*, που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, η έκφραση του οποίου παραμένει σταθερή.

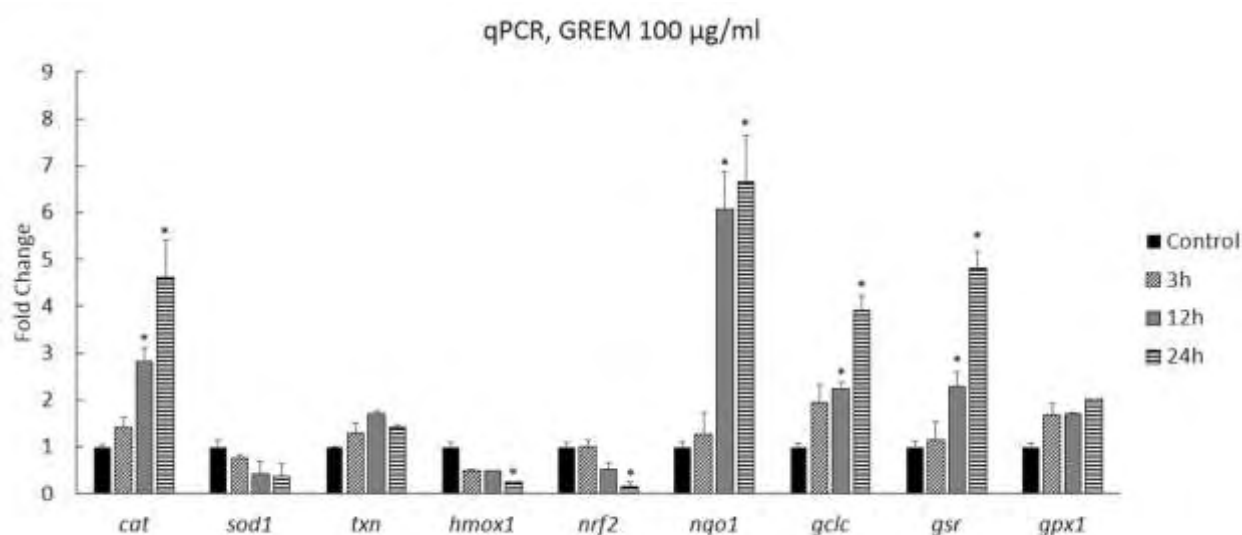
4.4.1 ΚΑΕΜ



Διάγραμμα 4: Κανονικοποιημένη έκφραση γονιδίων στην κυτταρική σειρά EA.hy926 μετά από χορήγηση εκχυλίσματος ΚΑΕΜ

Βλέπουμε πως το ΚΑΕΜ οδήγησε σε αύξηση έκφρασης των περισσότερων γονιδίων. Αναλυτικότερα, αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) η έκφραση των *hmx1*, *nrf2*, *nqo1*, *gclc* και *gsr*. Δεν επηρεάστηκε η έκφραση των *cat*, *sod1* και *gpx1* ενώ μειώθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) αυτή του *txn*. Στα γονίδια όπου παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, αυτή ήταν εμφανής σε όλες τις χρονικές στιγμές για τις οποίες το εκχύλισμα χορηγήθηκε στα κύτταρα (3 ώρες, 12 ώρες και 24 ώρες) με μόνη εξαίρεση το γονίδιο *nrf2* όπου διαφορά παρατηρήθηκε μόνο στις 12 και 24 ώρες. Η σημαντικότερη αύξηση παρατηρήθηκε για το *nqo1* ή έκφραση του οποίου αυξήθηκε κατά περίπου 12 φορές στις 12 ώρες. Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια, το *hmx1* αυξήθηκε κατά 4,00, 4,50 και 2,72 φορές σε σχέση με το control στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Το *nrf2* αυξήθηκε κατά 7,28 και 8,45 φορές στις 12 και 24 ώρες. Το *nqo1* αυξήθηκε κατά 8,41, 12,10 και 6,74 φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα ενώ το *gclc* αυξήθηκε κατά 6,23, 6,25 και 3,36 φορές στις 3, 12 και 24 ώρες. Τέλος, το *gsr* αυξήθηκε κατά 9,80, 8,03 και 5,00 φορές στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Από την άλλη, η έκφραση του *txn* μειώθηκε στο 2,80%, 9,76% και 10,90% της έκφρασης του control στις 3, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα.

4.4.2 GREM

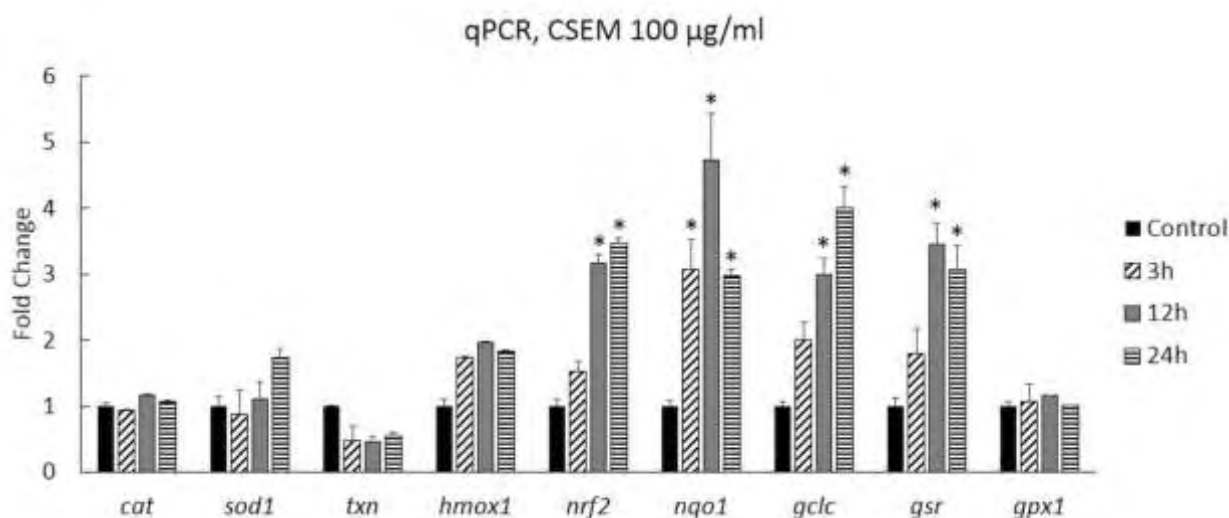


Διάγραμμα 5: Κανονικοποιημένη έκφραση γονιδίων στην κυτταρική σειρά EA.hy926 μετά από χορήγηση εκχυλίσματος GREM

Το GREM οδήγησε σε αύξηση έκφρασης ορισμένων γονιδίων. Αναλυτικότερα, αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) η έκφραση των *cat*, *nqo1*, *gclc* και *gsr*. Δεν επηρεάστηκε η έκφραση των *txn*, *sod1* και *gpx1* ενώ μειώθηκε σημαντικά

($p < 0,05$) αυτή του *nrf2* και *hmox1* μόνο στις 24 ώρες. Η σημαντικότερη αύξηση παρατηρήθηκε για το *nqo1* ή έκφραση του οποίου αυξήθηκε κατά περίπου 7 φορές στις 24 ώρες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως το εκχύλισμα δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων στις 3 ώρες, θετική ή αρνητική. Ειδικότερα, αυτό που παρατηρήσαμε για τα υπόλοιπα γονίδια είναι πως το *cat* αυξήθηκε κατά 2,80 και 4,60 φορές σε σχέση με το control στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Το *nqo1* αυξήθηκε κατά 6,00 και 6,60 φορές στις 12 και 24 ώρες, ενώ το *gclc* αυξήθηκε κατά 2,20 και 3,90 φορές στις 12 και 24 ώρες. Τέλος, το *gsr* αυξήθηκε κατά 2,28 και 4,80 φορές στις 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Από την άλλη, η έκφραση του *hmox1* μειώθηκε στο 0,24% της έκφρασης του control στις 24 ώρες και τέλος η έκφραση του *nrf2* μειώθηκε στο 0,16% της έκφρασης του control μόνο στις 24 ώρες.

4.4.3 CSEM



Διάγραμμα 6: Κανονικοποιημένη έκφραση γονιδίων στην κυτταρική σειρά EA.hy926 μετά από χορήγηση εκχυλίσματος CSEM

Το CSEM οδήγησε σε αύξηση έκφρασης 4 μόνο γονιδίων. Αναλυτικότερα, αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$) η έκφραση των *nrf*, *nqo1*, *gclc* και *gsr*. Δεν επηρεάστηκε η έκφραση των *cat*, *txn*, *sod*, *hmox1* και *gpx1*. Σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα εκχυλίσματα, το CSEM δεν κατάφερε να πετύχει στατιστικά σημαντική μείωση γονιδιακής έκφρασης σε κανένα από τα προκαθορισμένα χρονικά σημεία σε κάποιο από τα γονίδια. Η σημαντικότερη αύξηση παρατηρήθηκε κι εδώ για το *nqo1* ή έκφραση του οποίου αυξήθηκε κατά περίπου 5 φορές στις 12 ώρες. Σε γενικές γραμμές το εκχύλισμα CSEM ακολουθεί το μοτίβο επίδρασης του ΚΑΕΜ, με μικρότερη ωστόσο ισχύ. Τα αποτελέσματά μας είναι πλήρως δικαιολογήμενα, καθώς

είναι εκχυλίσματα που προέρχονται από το ίδιο γένος φυτού, με το ΚΑΕΜ ωστόσο να έχει παραχθεί με την βοήθεια ρητίνης και να έχει περίπου 3 φορές μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ειδικότερα, παρατηρήσαμε στο *nrf2* αύξηση κατά 3,16 και 3,47 στις 12 και 24 ώρες, στο *nqo1* αύξηση κατά 3,07, 4,72 και 2,90 φορές τις 3, 12 και 24 ώρες, στο *gclc* αύξηση κατά 3,00 και 4,00 φορές στις 12 και 24 ώρες και τέλος, στο *gsr*, αύξηση κατά 3,46 και 3,07 φορές στις 12 και 24 ώρες.

Με βάση τα αποτελέσματα, μπορεί να προταθεί σαν μηχανισμός δράσης των εκχυλισμάτων η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Ωστόσο δεν επηρεάζονται όλα τα γονίδια με τον ίδιο τρόπο, παρατηρείται δηλαδή πλειοτροπική δράση, καθώς κάποια αυξάνονται, κάποια δεν επηρεάζονται καθόλου και κάποια μειώνονται.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, 3 εκχυλίσματα προερχόμενα από ελληνικά εδάδιμα φυτά, επιλέχθηκαν από ένα μεγαλύτερο σύνολο εκχυλισμάτων και διερευνήθηκαν ως προς την πιθανή αντιοξειδωτική τους ικανότητα κι έγινε συσχέτιση αυτής με το πολυφαινολικό τους προφίλ. Όλα τα εκχυλίσματα είναι υδατικά και παρασκευάστηκαν ως αφεψήματα κι εν συνεχεία λυοφιλοποιήθηκαν. Επιπροσθέτως, δύο εξ αυτών (KAEM/GREM) υπέστησαν περαιτέρω μεταχείριση με την ρητίνη XAD, για επιπλέον απομόνωση των φαινολικών τους συστατικών. Σε παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε η εύρεση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC) μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Όπως αναμένονταν, τα εκχυλίσματα που είχαν μεταχειριστεί με ρητίνη παρουσίασαν αυξημένο πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Η χρωματογραφική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο, αποκάλυψε την ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα του φυτού *Carthamus lanatus* (GREM), φάνηκε πως είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη και η λουτεολίνη. Βρέθηκαν επίσης υδροξυκινναμικά οξέα όπως το χλωρογενικό οξύ. Τα άλλα δύο εκχυλίσματα προέρχονται από φυτά του γένους *Cichorium*, πιο συγκεκριμένα το φυτικό εκχύλισμα του *Cichorium intybus* με την ονομασία KAEM και το φυτικό εκχύλισμα του *Cichorium spinosum* με την ονομασία CSEM. Το τελευταίο είναι και το μοναδικό εκχύλισμα που δεν υπέστη μεταχείριση με ρητίνη. Και τα δύο εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα, όπως το κιχορικό οξύ, όπως και σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών σαν την λουτεολίνη και την κερκετίνη. Το εκχύλισμα CSEM, περιέχει επίσης σεσκιτερπενικές λακτόνες και πλήθος άλλων φαινολικών οξέων.

Πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί υποστηρίζουν την βιοδραστικότητα των προαναφερθέντων ουσιών. Για παράδειγμα, τα χλωρογενικά οξέα, είναι γνωστά αντιοξειδωτικά και γνωστοί ρυθμιστές του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και βρίσκονται σε αφθονία στον καφέ (Priftis et al., 2017; Santana-Galvez, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velazquez, 2017). Το κιχορικό οξύ επίσης επιδεικνύει τις ίδιες αντιοξειδωτικές ικανότητες (Liu et al., 2017). Ωστόσο, τα εκχυλίσματά μας αποτελούνται από πολυφαινολικά μίγματα και γι αυτόν ακριβώς τον λόγο πρέπει να

ληφθούν υπόψιν οι πιθανές συνεργιστικές δράσεις λόγω της πλειοτροπικής δράσης που επιδεικνύουν οι συγκεκριμένες ουσίες (Barrajón-Catalán et al., 2014).

Σε επόμενη φάση της παράλληλης μελέτης, το αρχικό σύνολο των εκχυλισμάτων διερευνήθηκε ως προς την ικανότητά του να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Όπως αναμένονταν, τα εκχυλίσματα που είχαν υποστεί μεταχείριση με την ρητίνη XAD, παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Τα εκχύλισματα υποβλήθηκαν και σε μια μέθοδο προστασίας από βλάβες προκαλούμενες από οξειδωτικό παράγοντα σε πλασμιδιακό DNA, με τα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα να παρουσιάζουν από 3 έως 9 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα των παράλληλων ερευνών, υποδεικνύουν πως τα υπό εξέταση εκχυλίσματα των ελληνικών εδάδιμων φυτών, έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, ιδίως τα εκχυλίσματα τα οποία υπέστησαν περαιτέρω μεταχείριση με ρητίνη XAD για πολυφαινολική απομόνωση. Σε προηγούμενες μελέτες, εκχυλίσματα ελληνικών φυτών *Leguminosae* και *Lamiaceae* sp. επίσης επέδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, γεγονός που ενισχύει την επιστημονική άποψη ότι τα ενδημικά φυτά μπορούν να ναι μια πολύτιμη πηγή ενδογενών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Spanou et al., 2007; Stagos et al., 2012).

Όσον αφορά του test Ames και τα τρία εκχυλίσματα επέδειξαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το πιο ισχυρό αντιμεταλλαξιγόνο αποδείχθηκε το εκχύλισμα GREM του φυτού *Carthamus Lanatus*, το οποίο εμφάνισε τιμή IC₅₀ της τάξης των 65μg/τριβλίο, ενάντια στις προκληθέντες από τον παράγοντα t-BOOH μεταλλάξεις. Τα εκχυλίσματα KAEM και CSEM του γένους *Cichorium*, προκάλεσαν 50% ποσοτική μείωση των αποικιών σε στα 86 και 347 μg/τριβλίο αντίστοιχα. Τα δύο εμπλουτισμένα αφεψήματα που υπέστησαν μεταχείριση με ρητίνη εμφάνισαν σαφώς ισχυρότερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση, η οποία πιθανώς οφείλεται στο μεγαλύτερο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, καθώς είναι γνωστό πως οι πολυφαινόλες έχουν την ιδιότητα να εξουδετερώνουν ρίζες που έχουν δημιουργηθεί από τον μεταλλαξιγόνο παράγοντα t-BOOH, αποτρέποντας έτσι την μεταλλαξιγόνο του δράση.

Στη συνέχεια, τα τρία εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα για να καθοριστεί η κυτταροτοξικότητά τους, χρησιμοποιώντας την μέθοδο XTT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το πιο κυτταροτοξικό εκχύλισμα είναι το

KAEM, το οποίο εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100μg/ml. Ακολούθησε το εκχύλισμα GREM που εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 200μg/ml και τέλος το εκχύλισμα CSEM στα 600μg/ml. Όπως και αναμένονταν, τα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα σε εμφανώς μικρότερες συγκεντρώσεις, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στο μεγαλύτερο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.

Στο επόμενο βήμα, επιλέχθηκαν 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για κάθε εκχύλισμα, ανάλογα με τα αποτελέσματα του XTT του καθενός. Τα εκχυλίσματα στις 4 συγκεντρώσεις χορηγήθηκαν σε ενδοθηλιακά κύτταρα με σκοπό να μελετηθεί η δράση τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, όσον αφορά τα επίπεδα GSH και ROS, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Και τα τρία εκχυλίσματα παρουσίασαν αύξηση της ανηγμένης γλουταθειώνης (GSH). Στα εκχυλίσματα KAEM και GREM παρατηρήθηκε μια δοσοεξαρτώμενη απόκριση, ενώ στο εκχύλισμα CSEM, η μέγιστη αύξηση της GSH, ακολουθήθηκε από πτώση αυτής σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του control όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα KAEM, προκάλεσε μια μέγιστη αύξηση της τάξης του 33,4% σε συγκέντρωση 50μg/ml. Το εκχύλισμα GREM παρουσίασε μέγιστη αύξηση ίση με 24,7% σε συγκέντρωση 100μg/ml, ενώ το εκχύλισμα CSEM 21,6% στην ίδια συγκέντρωση για να μειωθεί στις αμέσως μεγαλύτερες. Η αύξηση των επιπέδων της GSH είναι ένας σημαντικός δείκτης βελτίωσης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συνδέεται συχνά με αύξηση του ρυθμού της βιοσύνθεσης του τριπεπτιδίου. Το ένζυμο κλειδί στην βιοσύνθεση της GSH, η λιγάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCL), βρίσκεται κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 εξαιτίας των Antioxidant Response Elements (ARE) που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή του (Franklin et al., 2009).

Όσον αφορά τα επίπεδα ROS, το εκχύλισμα KAEM δεν είχε καμία απολύτως δράση, ενώ το εκχύλισμα GREM πέτυχε μια μικρή μείωση της τάξεως του 17,6% στην μεγαλύτερη μόνο συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (100 μg/ml). Τέλος, το εκχύλισμα CSEM μείωσε τα επίπεδα ROS κατά 15,7% στην συγκέντρωση των 100μg/ml. Καθώς δεν προστέθηκε εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας, τα επίπεδα ROS που μετρήθηκαν αντιπροσωπεύουν τα ενδογενή επίπεδα. Είναι άξιο αναφοράς πως σε φυσιολογικές συνθήκες απαιτείται ένα ελάχιστο επίπεδο ROS για την

διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και της φυσιολογικής μεταγωγής σήματος όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή.

Για να δοκιμάσουμε την υπόθεση αν η άρση της αναστολής του Nrf2 εμπλέκεται στον μηχανισμό δράσης αυτών των 3 εκχυλισμάτων, προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση Real-Time PCR χρησιμοποιώντας 9 γονίδια στόχους του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, τα οποία σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα.

Τα αποτελέσματα του ΚΑΕΜ, έδειξαν μια αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *gclc* 6 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του control. Το γονίδιο *gclc* κωδικοποιεί για την καταλυτική υπομονάδα της GCL πρωτεΐνης. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *gsr* το οποίο κωδικοποιεί για την αναγωγή της γλουταθειόνης, εμφάνισε επίπεδα έκφρασης 9,8 φορές μεγαλύτερα από αυτά του control, ενώ το γονίδιο *gpx1*, που κωδικοποιεί για την περοξειδάση 1 της γλουταθειόνης, δεν επηρεάστηκε. Συνολικά, θα μπορούσαμε να πούμε πως σε αυτές τις μεταβολές μπορεί να αποδοθεί εν μέρει η αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης, καθώς αυτό που περιμένουμε είναι αυξημένος ρυθμός δημιουργίας και αναγέννησης του τριπεπτιδίου. Για το εκχύλισμα CSEM που προέρχεται και αυτό του γένους *Cichorium*, αλλά δεν έχει υποστεί μεταχείριση με ρητίνη, αυτό που περιμέναμε ήταν ένα μοτίβο δράσης παρόμοιο με του ΚΑΕΜ, υπόθεση η οποία επαληθεύτηκε από τα αποτελέσματά μας. Η έκφραση του γονιδίου *gclc* παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά 4 φορές μεγαλύτερα από αυτά του control, ενώ όσον αφορά το γονίδιο *gsr*, η έκφρασή του αυξάνεται κατά 3,46 φορές. Οι αυξήσεις που παρατηρούνται, αν και αξιοσημείωτες, είναι σαφώς μικρότερες από τις αντίστοιχες του εκχυλίσματος ΚΑΕΜ. Ομοίως με το ΚΑΕΜ, το εκχύλισμα CSEM δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gpx1*. Όσον αφορά το εκχύλισμα GREM, περιμέναμε τα αποτελέσματά μας να είναι ελαφρώς διαφοροποιημένα καθότι προκειται για εκχύλισμα προερχόμενο από φυτό άλλου γένους (*Carthamus*), ωστόσο σε μεγάλο βαθμό έχει παρόμοια πολυφαινολική σύσταση ποιοτικά με τα δύο προηγούμενα εκχυλίσματα. Έτσι, όπως και τα ΚΑΕΜ/CSEM, το GREM αύξησε την έκφραση του *gsr* και *gclc* κατά 4,80 και 3,90 φορές αντίστοιχα συγκριτικά με το control. Το γονίδιο *gpx1* παρέμεινε ανεπηρέαστο, όπως και στην περίπτωση των άλλων εκχυλισμάτων.

Στο εκχύλισμα ΚΑΕΜ παρατηρήθηκε επίσης μια αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *hmox1*, *nrf2* και *nqo1*, η οποία άγγιξε τις 4,5, 8,4 και 12,1 φορές αντίστοιχα σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων στο control. Αυτά τα γονίδια

κωδικοποιούν για την οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1), τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 και την NAD(P)H αφυδρογονάση των κινονών. Η οξυγενάση της αίμης και ο NQO1 είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμμετέχουν στην δέσμευση και απομόνωση του σιδήρου και την εξουδετέρωση των κινονών αντίστοιχα. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών μπορεί να θεωρηθεί πως οδηγούν σε βελτίωση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 μπορούν να οδηγήσουν σε μια κατάσταση θετικής επανατροφοδότησης (Scaragnini et al., 2011). Αντίστοιχα, το εκχύλισμα CSEM δεν επηρέασε με κάποιο τρόπο τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *hmox1*, ενώ αύξησε αυτά των *nrf2* και *nqo1* κατά 3,47 και 4,72 φορές αντίστοιχα. Ωστόσο, το εκχύλισμα GREM που προέρχεται από φυτό άλλου γένους, έδρασε στην περίπτωση αυτών των γονιδίων με αρκετά διαφορετικό τρόπο. Ειδικότερα, σε πλήρη αντίθεση με τα άλλα δυο εκχυλίσματα, μείωσε στατιστικά σημαντικά την έκφραση των γονιδίων *nrf2* και *hmox1* κατά 6,25 και 4 φορές αντίστοιχα. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την επιστημονική διαλεύκανση της προαναφερθείσας κατάστασης. Στην περίπτωση του γονιδίου *nqo1*, το εκχύλισμα GREM έδρασε όπως και τα άλλα 2 εκχυλίσματα, αυξάνοντας την έκφρασή του κατά 6,60 φορές.

Τέλος, στο εκχύλισμα KAEM, τα επίπεδα του γονιδίου *txn* μειώθηκαν, ενώ τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *cat* και *sod1* δεν επηρεάστηκαν. Παρομοίως και για το εκχύλισμα CSEM, μόνο που δεν επηρέασε ούτε την έκφραση του γονιδίου *txn*. Αξίζει να σημειωθεί, πως εκ των τριών εκχυλισμάτων, μόνο το CSEM δεν επηρέασε αρνητικά την έκφραση κάποιου γονιδίου. Το εκχύλισμα GREM, όντας ελαφρώς διαφορετικό σε θέμα φαινολικής σύστασης, ήταν το μοναδικό εκ των 3 που επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της καταλάσης (*cat*) και πιο συγκεκριμένα, τα αύξησε κατά 4,60 φορές. Στην περίπτωση των γονιδίων *txn* και *sod1*, το εκχύλισμα GREM δεν είχε κάποια επίδραση. Αξίζει να σημειωθεί, πως εκ των 3 εκχυλισμάτων, το GREM χρειάστηκε τον περισσότερο χρόνο για να δράσει, καθώς είναι το μόνο που δεν επηρέασε την έκφραση των γονιδίων κατά τις πρώτες 3 ώρες (πρώτη εξεταζόμενη χρονική στιγμή).

Συνολικά, η χορήγηση (εμπλουτισμένων) αφεψημάτων από τα Ελληνικά εδώδιμα φυτά *Carthamus lanatus*, *Cichorium intybus* και *Cichorium spinosum*, οδήγησε σε άρση της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και συνεπώς επαγωγή της έκφρασης μιας πλειάδας γονιδίων που συμμετέχουν στην

αντιοξειδωτική άμυνα. Αυτή η παρατήρηση τονίζει την σημασία των φυτικών σκευασμάτων και της ικανότητάς τους όχι άπλα να εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και να δρουν ως ρυθμιστές ενδογενών μηχανισμών. Είναι άξιο αναφοράς, πως το κιχορικό οξύ, ένα πολυφαινολικό συστατικό που είναι παρόν και στα τρία εκχυλίσματα, έχει την ικανότητα να επάγει το μονοπάτι του Nrf2 *in vivo*, σε μοντέλα ποντικών (Liu et al., 2017; Zhu, Zhang, Niu, et al., 2017; Zhu, Zhang, Zhou, et al., 2017).

Η κερκετίνη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο εκχύλισμα ΚΑΕΜ, έχει επίσης δείξει πως έχει την ικανότητα να αίρει την αναστολή του Nrf2 σε HepG2 κύτταρα (Tanigawa, Fujii, & Hou, 2007), ενώ μελέτες που αφορούν την επαγωγή έκφρασης του Nrf2 από την λουτεολίνη, έχουν δώσει ανάμεικτα αποτελέσματα (Lin, Wu, Liu, Su, & Yen, 2010; Tang et al., 2011).

Εν κατακλείδι, τα ελληνικά εδώδιμα φυτά φαίνεται πως παρουσιάζουν ικανοποιητική ικανότητα εξουδετέρωσης των δραστικών μορφών οξυγόνου, με την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Επιπροσθέτως, μετά την χορήγηση των επιλεγμένων εκχυλισμάτων, παρατηρήθηκε εμφανής βελτίωση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της αύξησης των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της μείωσης των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως τα συστατικά των εκχυλισμάτων παρουσιάζουν έναν πλειοτροπικό μηχανισμό δράσης.

Η διερεύνηση της πιθανής χημειοπροστατευτικής δράσης των εδώδιμων φυτών μπορεί να συμβάλλει στην εξομάλυνση της επίδρασης που έχει ο δυτικός τρόπος ζωής στην ανθρώπινη υγεία. Οι παραδοσιακές διαίτες που βασίζονται στην συχνή κατανάλωση ενδημικών φυτών μπορούν να δράσουν τόσο θεραπευτικά όσο και προοληπτικά απέναντι σε μια πλειάδα παθήσεων και συνδρόμων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε βιοδραστικές ουσίες. Ειδικότερα, μια μεσογειακή χώρα όπως η Ελλάδα, η οποία εξαιτίας του κλίματός της, φιλοξενεί μια τεράστια ποικιλία ενδημικών φυτών, μπορεί να αποτελέσει την πρωτοπόρο στην αγορά των βιολειτουργικών τροφίμων. Εκχυλίσματα προερχόμενα από φυτά του γένους *Cichorium* και του γένους *Carthamus*, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ειδικά προϊόντα με αντιοξειδωτική δράση, τόσο με την μορφή εμπλουτισμένων τροφίμων όσο και με την μορφή συμπληρωμάτων υγείας.

6. Βιβλιογραφία

- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., & Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *19*(2), 119–128. <http://doi.org/10.1002/jbt.20061>
- Atia, A., Alrawaiq, N., & Abdullah, A. (2014). A review of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1); A multifunctional antioxidant enzyme. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *4*(12), 118–122. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2014.41220>
- Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Joven, J., Segura-Carretero, A., Alonso-Villaverde, C., Menéndez, J. A., & Micol, V. (2014). Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: Far beyond their antioxidant properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. http://doi.org/10.1007/978-3-319-7320-0_11
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Review: Glutathione peroxidases. *Cellular Functions of Glutathione*, *1830*(5), 3289–3303. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*(2), 192–208. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Collet, J.-F., & Messens, J. (2010). Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(8), 1205–1216. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342. <http://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(5), 3217–3266. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Elias S. J. ArneÅr and Arne Holmgren. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem*, *6109*, 6102–6109.

- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1–2), 86–98. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1–85.
- Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., & Augusto, O. (2000). In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(10), 1056–1064.
- Holmgren, A. (1989). Electron Transport to Reductive Enzymes. *Biochemistry*, *264*(24), 13963–13966.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–284. <http://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes and Development*, *13*(1), 76–86. <http://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>
- Kamerbeek, N. M., Zwieten, R. Van, Boer, M. De, Morren, G., Vuil, H., Bannink, N., ... Roos, D. (2007). Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells, *109*(8), 3560–3566. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-08-042531>.The
- Karlenius, T. C., & Tonissen, K. F. (2010). Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, *2*(2), 209–232. <http://doi.org/10.3390/cancers2020209>
- Kikuchi, G., Yoshida, T., & Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(1), 558–567. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.020>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 540S–542S.
- Landete, J. M. (2012). Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical Reviews in Food Science and*

- Nutrition*, 52(10), 936–948. <http://doi.org/10.1080/10408398.2010.513779>
- Latour, I., Demoulin, J. B., & Buc-Calderon, P. (1995). Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 373(3), 299–302. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01065-M](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)01065-M)
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79(21), 2056–2068. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.042>
- Lin, C. W., Wu, M. J., Liu, I. Y. C., Su, J. D., & Yen, J. H. (2010). Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-Driven HO-1 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4477–4486. <http://doi.org/10.1021/jf904061x>
- Liu, Q., Hu, Y., Cao, Y., Song, G., Liu, Z., & Liu, X. (2017). Chicoric Acid Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress via Promoting the Keap1/Nrf2 Transcriptional Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells and Mouse Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(2), 338–347. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04873>
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957–1997. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 401–426. <http://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Martin, C., Martinez, R., Navarro, R., Ruiz-Sanz, J. I., Lacort, M., & Ruiz-Larrea, M. B. (2001). tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochemical Pharmacology*, 62(6), 705–712.
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012). The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology*, 2(December), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fonc.2012.00200>
- Morse, D., & Choi, A. M. K. (2005). Heme oxygenase-1: From bench to bedside.

- American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(6), 660–670.
<http://doi.org/10.1164/rccm.200404-465SO>
- Nordberg, J., & Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11), 1287–1312.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 194586. <http://doi.org/10.1155/2011/194586>
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., ... Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 3, 18. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Priftis, A., Goutzourelas, N., Chalabalaki, M., Ntasi, G., Stagos, D., Amoutzias, G. D., ... Kouretas, D. (2017). Effect of polyphenols from coffee and grape on gene expression in myoblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.015>
- Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 295–309. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3458>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidativestressinaginghumanskin. *Biomolecules*, 5(2), 545–589. <http://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. K. (2006). Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev*, 86,

- 583–650. <http://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005>.
- Santana-Galvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velazquez, D. A. (2017). Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(3). <http://doi.org/10.3390/molecules22030358>
- Scapagnini, G., Vasto, S., Abraham, N. G., Caruso, C., Zella, D., & Fabio, G. (2011). Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 44(2), 192–201. <http://doi.org/10.1007/s12035-011-8181-5>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sea, K., Sohn, S. H., Durazo, A., Sheng, Y., Shaw, B. F., Cao, X., ... Valentine, J. S. (2015). Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2405–2418. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.588798>
- Sies, H., & Summer, K. H. (1975). Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 57(2), 503–512.
- Spanou, C., Stagos, D., Tousias, L., Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2007). Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Research*, 27(5 A), 3403–3410.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., ... Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(11), 4115–4124. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>
- Tang, X., Wang, H., Fan, L., Wu, X., Xin, A., Ren, H., & Wang, X. J. (2011). Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(11), 1599–1609.

- <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.008>
- Tanigawa, S., Fujii, M., & Hou, D. X. (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(11), 1690–1703. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.017>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Zhu, D., Zhang, N., Zhou, X., Zhang, M., Liu, Z., & Liu, X. (2017). Cichoric acid regulates the hepatic glucose homeostasis via AMPK pathway and activates the antioxidant response in high glucose-induced hepatocyte injury. *RSC Advances*, 7(3), 1363–1375. <http://doi.org/10.1039/C6RA25901D>
- Zhu, D., Zhang, X., Niu, Y., Diao, Z., Ren, B., Li, X., ... Liu, X. (2017). Cichoric acid improved hyperglycaemia and restored muscle injury via activating antioxidant response in MLD-STZ-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 138–149. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.041>
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I . Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.