



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ  
ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Conium  
divaricatum* ΣΕ ΗΠΙΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2**

**ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT  
ACTIVITY OF *Conium divaricatum* EXTRACT IN  
HepG2 HEPATIC CELLS**



**ΧΡΙΣΤΙΝΑ-ANNA ΚΑΜΒΟΥΚΟΥ**

**Λάρισα 2019**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

**Σέρκος Χαρουτουγιάν:** Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. ΣΤΑΓΚΟΥ Δημητρίου , Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας. Θα επιθυμούσα να τον ευχαριστήσω, θερμά, για τη συμβολή του, στην ορθή και απρόσκοπτη διενέργεια όλων των πειραματικών δοκιμών.

Ευχαριστώ, ακόμη, τον Καθηγητή κ. ΚΟΥΡΕΤΑ Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, που ανοίγει νέους ορίζοντες στο χώρο της Τοξικολογίας.

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| Περιεχόμενα εικόνων .....   | 6  |
| Περιεχόμενα γραφημάτων.....   | 7  |
| Περίληψη.....   | 8  |
| Abstract.....   | 9  |
| 1. Εισαγωγή.....  | 10 |
| 1.1. Ελεύθερες ρίζες.....   | 10 |
| 1.1.1. Μορφές ελευθέρων ριζών.....  | 11 |
| 1.1.2. Ενδογενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου .....   | 11 |
| 1.1.3. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....   | 13 |
| 1.1.4. Ευεργετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....  | 14 |
| 1.1.5. Αρνητικές επιπτώσεις ελευθέρων ριζών.....  | 14 |
| 1.1.6. Οξειδωτικό στρες.....  | 16 |
| 1.1.7. Αντιοξειδωτική άμυνα.....  | 17 |
| 1.1.8. Επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην ανθρώπινη υγεία.....   | 24 |
| 1.2. Ήπαρ και οξειδωτικό στρες.....   | 26 |
| 1.3. <i>Conium divaricatum</i> .....  | 28 |
| 1.4. Πολυφαινόλες.....  | 30 |
| 1.4.1. Φαινολικά οξέα.....  | 31 |
| 1.4.2. Φλαβονοειδή.....   | 32 |
| 1.4.3. Πολυφαινολικά αμίδια.....  | 33 |
| 1.4.4. Άλλες πολυφαινόλες.....  | 33 |
| 1.4.5. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολών.....  | 33 |
| Σκοπός.....   | 36 |
| 2. Υλικά και Μέθοδοι.....   | 37 |
| 2.1. Αντιδραστήρια.....   | 37 |
| 2.2. Εκχύλισμα.....   | 37 |
| 2.3. Ηπατικά κύτταρα HepG2.....   | 37 |
| 2.4. Καλλιέργεια των ηπατικών κυττάρων HepG2.....   | 38 |
| 2.5. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος <i>Conium divaricatum</i> ..... | 39 |
| 2.6. Φωτομετρικοί δείκτες.....  | 41 |
| 2.6.1. Προσθήκη ουσίας, αποκόλληση και επαναιώρηση κυττάρων.....  | 41 |
| 2.6.2. Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου   |    |

|   |    |
|---|----|
| Bradford.....   | 42 |
| 2.6.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs).....  | 43 |
| 2.6.4. Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS).....  | 45 |
| 2.6.5. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....  | 46 |
| 2.7. Κυτταρομετρικοί προσδιορισμοί.....   | 48 |
| 2.7.1. Προσθήκη ουσίας, αποκόλληση και απαναιώρηση κυττάρων.....  | 48 |
| 2.7.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....  | 49 |
| 2.7.3. Κυτταρομετρία ροής.....  | 49 |
| 2.8. Στατιστική ανάλυση.....  | 51 |
| 3. Αποτελέσματα.....  | 51 |
| 3.1. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος <i>Conium divaricatum</i> ..... | 51 |
| 3.2. Φωτομετρικοί δείκτες.....  | 52 |
| 3.2.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs).....  | 52 |
| 3.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS).....  | 53 |
| 3.2.3. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....  | 54 |
| 3.3. Κυτταρομετρικοί προσδιορισμοί.....   | 55 |
| 3.3.1. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH).....  | 55 |
| 3.3.2. Προσδιορισμός επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).....  | 56 |
| 4. Συζήτηση.....  | 60 |
| Βιβλιογραφία.....   | 67 |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

|  |    |
|--|----|
| <b>Εικόνα 1:</b> Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας.....                                  | 11 |
| <b>Εικόνα 2:</b> Πηγές ελευθέρων ριζών.....  | 14 |
| <b>Εικόνα 3:</b> Οξειδωτικό στρες.....   | 17 |
| <b>Εικόνα 4:</b> <i>Conium divaricatum</i> .....                                   | 29 |
| <b>Εικόνα 5:</b> Χημικές δομές Κωνειίνης και γ-κωνικεΐνης.....                     | 30 |
| <b>Εικόνα 6:</b> Αντιπυροσωπευτικές δομές φαινολικών οξέων.....                    | 32 |
| <b>Εικόνα 7:</b> Βασική δομή φλανοειδούς.....                                      | 32 |
| <b>Εικόνα 8:</b> Χημική δομή καψαικίνης.....                                       | 33 |
| <b>Εικόνα 9:</b> Δομές πολυφαινολών.....   | 33 |
| <b>Εικόνα 10:</b> Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2.....                   | 38 |
| <b>Εικόνα 11:</b> Μετατροπή τετραμμωνιακού άλατος σε φορμαζάνη.....                | 39 |
| <b>Εικόνα 12:</b> Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.....                             | 40 |
| <b>Εικόνα 13:</b> 96-well plate.....   | 40 |
| <b>Εικόνα 14:</b> Αντίδραση πρωτεΐνης με DNPH προς σύνθεση DNP-hydrazone.....      | 43 |
| <b>Εικόνα 15:</b> Αντίδραση μαλονδιαλδεύδης με θειοβαρβιτουρικό οξύ.....           | 45 |
| <b>Εικόνα 16:</b> Μετατροπή της ρίζας DPPH σε υδραζίνη, παρουσία δότη υδρογόνων... | 47 |
| <b>Εικόνα 17:</b> Κυτταρομετρία ροής.....  | 50 |

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

|   |    |
|---|----|
| <b>Διάγραμμα 1:</b> Δοκιμή ΧΤΤ στην κυτταρική σειρά HepG2.....  | 52 |
| <b>Διάγραμμα 2:</b> Επίπεδα καρβονυλίων σε σχέση με το control.....   | 53 |
| <b>Διάγραμμα 3:</b> Επίπεδα TBARS σε σχέση με το control.....   | 54 |
| <b>Διάγραμμα 4:</b> Επίπεδα TAC σε σχέση με το control.....   | 55 |
| <b>Διάγραμμα 5:</b> Επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με το control.....   | 56 |
| <b>Διάγραμμα 6:</b> Επίπεδα ROS σε σχέση με το control.....   | 57 |
| <b>Διάγραμμα 7:</b> Ενδεικτικές εικόνες γραφημάτων κυτταρομετρίας ροής σε ηπατικά κύτταρα HepG2 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH).....             | 58 |
| <b>Διάγραμμα 8:</b> Ενδεικτικές εικόνες γραφημάτων κυτταρομετρίας ροής σε ηπατικά κύτταρα HepG2 για τον προσδιορισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)..... | 59 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η ανισορροπία αντιοξειδωτικών-προοξειδωτικών μηχανισμών, που οδηγεί στον υπέρμετρο σχηματισμό ελευθέρων ριζών, είναι συνδεδεμένο, αιτιολογικά, με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Έτσι, έχει διενεργηθεί μεγάλη έρευνα αναφορικά με την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής εμπλουτισμένων με αντιοξειδωτικές ουσίες, που, δυνητικά, θα δράσουν ευεργετικά στην πρόληψη και τη θεραπευτική αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία μελετά το ενδεχόμενο αντιοξειδωτικό δυναμικό του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* σε ηπατικά κύτταρα HepG2, τα οποία, αν και καρκινικά, έχουν χρησιμοποιηθεί, εκτεταμένα, ως πρότυπα φυσιολογικών κυττάρων, λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με αυτά. Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμή XTT για τον προσδιορισμό των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η πιθανή αντιοξειδωτική δράση του μέσω προσδιορισμού του βαθμού πρωτεϊνικής οξείδωσης με τη μέθοδο των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, της λιπιδικής υπεροξείδωσης με τη μέθοδο των TBARS, καθώς και μέσω του προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC). Επιπλέον, προσδιορίστηκαν, με κυτταρομετρία ροής, τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

Ως μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος επιλέχτηκαν οι 1,5 μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml, βάσει της δοκιμής XTT. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, το εκχύλισμα, στις συγκεντρώσεις 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml προστατεύει, δόσοεξαρτώμενα, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από καρβονυλίωση και υπεροξείδωση, αντίστοιχα, ενώ μόνο η μεγαλύτερη συγκέντρωση (12μg/ml) επιδρά στην TAC, και, μάλιστα, τη μειώνοντάς την. Ακόμη, τα επίπεδα της GSH και των ROS, δεν επηρεάζονται από καμία συγκέντρωση του εκχυλίσματος.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα *Conium divaricatum* παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, αλλά κρίνεται απαραίτητη η διενέργεια περαιτέρω μελετών προκειμένου να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί της δράσης του.



## ABSTRACT

Oxidative stress, which has been described as an imbalance of antioxidant-pro-oxidant mechanisms, leading to the excessive formation of free radicals, is connected etiologically to a variety of pathological conditions. Thus, extensive research has been carried out on the production of nutritional supplements enriched with antioxidants, potentially acting beneficial in the prevention and treatment of various diseases.

In this context, this study investigated the possible antioxidant activity of the *Conium divaricatum* extract in HepG2 hepatic cells, which, although being a cancer cell line, has been extensively used as a normal cell model due to the similarities with the normal hepatic cells. In particular, an XTT assay was initially performed to determine the non-cytotoxic concentrations of the extract. The possible antioxidant activity of the extract was then investigated by determining the degree of protein oxidation by the protein carbonyl method, the degree of lipid peroxidation by the TBARS method, as well as by determining the total antioxidant capacity (TAC). In addition, glutathione (GSH) and Reactive Oxygen Species (ROS) levels were determined using flow cytometry.

Based on the XTT assay, the following four concentrations of the extract were selected as non-cytotoxic: 1,5 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml and 12 µg/ml. According to the results of the experiments, extract concentrations 3µg/ml, 6µg/ml and 12µg/ml protected proteins and lipids, in a dose-dependent manner, from carbonylation and peroxidation, respectively. The levels of glutathione and ROS were not affected by any concentration of the extract.

In conclusion, *Conium divaricatum* extract exhibited antioxidant activity, but further studies are needed to elucidate the molecular mechanisms through which this activity is exerted.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε μόριο, άτομο ή ιόν που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους και δύναται να υποστηρίξει ανεξάρτητη ύπαρξη. (Veskoukis et al., 2011)

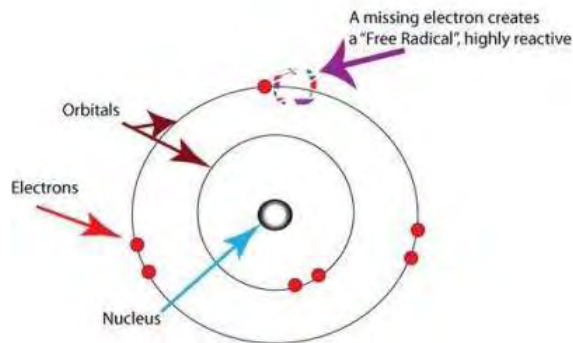
Η ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων, σε ένα χημικό είδος, το οδηγεί σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση, και ως εκ τούτου, το καθιστά ασταθές και εξαιρετικά δραστικό. Δηλαδή, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια των ελευθέρων ριζών δέχονται μεγάλη έλξη από τα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων, και έτσι, λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις ανάμεσα στα άτομα αυτά και τις ελεύθερες ρίζες, κατά τις οποίες συμβαίνει μεταφορά ηλεκτρονίων. Πρόκειται για τις λεγόμενες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που πραγματοποιούνται με στόχο τη συμπλήρωση της εξωτερικής στιβάδας των ελευθέρων ριζών, ώστε να βρεθούν σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, και, συνεπώς, να αποκτήσουν μεγαλύτερη σταθερότητα. (Σωτηρούδης) Οι αντιδράσεις αυτές χωρούν μέσω ενός αλυσιδωτού σχήματος (chain scheme) που περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές φάσεις: (Giese, 1986)

Εναρξη (initiation): Ομολυτική διάσπαση δεσμών, όπου οι πρώτες ύλες είναι μη ρίζες, ενώ τα προϊόντα, ρίζες.

Διάδοση (propagation): Αντίδραση ριζών με μη ρίζες ή αντίδραση ριζών με το  $O_2$  ή αναδιάταξη ριζών, όπου τουλάχιστον μία πρώτη ύλη και ένα προϊόν είναι ρίζες. Για καθένα από τα στάδια της φάσης αυτής, το προϊόν ρίζα είναι η πρώτη ύλη για το επόμενο στάδιο.

Τερματισμός (termination): Αντίδραση δύο ριζών για το σχηματισμό μιας μη ρίζας.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ελευθέρων ριζών κυμαίνεται από μερικά νανοδευτερόλεπτα, για τις πλέον δραστικές από αυτές, έως δευτερόλεπτα και ώρες για τις περισσότερο σταθερές ρίζες.



**Εικόνα 1:** Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

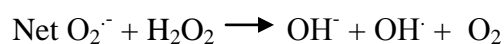
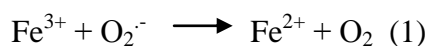
### **1.1.1.Μορφές ελευθέρων ριζών**

Ως χημική ομάδα, οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από μια ετερογένεια. Βάσει του κεντρικού τους ατόμου, κατηγοριοποιούνται στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), τις δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCIS) και τις δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS). Οι ROS συναντώνται πιο συχνά στον οργανισμό, και, κατόπιν αντίδρασης με αυτές, μπορούν να προκύψουν οι ρίζες των υπόλοιπων κατηγοριών. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου εντάσσονται οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), υδροπεροξυλίου ( $\text{HO}_2\cdot$ ), αλκοξυλίου ( $\text{RO}\cdot$ ), περοξυλίου ( $\text{ROO}\cdot$ ) και οι μη ρίζες υποχλωριώδες οξύ ( $\text{HOCl}$ ), όζον ( $\text{O}_3$ ), υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), υποβρωμιώδες οξύ ( $\text{HOBr}$ ) και μονήρες οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ). (Veskoukis et al., 2011)

### **1.1.2.Ενδογενείς πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου**

Οι περισσότερες δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται ενδογενώς, προέρχονται από τα *μιτοχόνδρια* και δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική (αδιαπέραστη) μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Μέσω της διαδικασίας αυτής, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $\text{NADH}$  και το  $\text{FADH}_2$ , στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων, καθώς και τη σύνθεση του  $\text{ATP}$ . Οι ρίζες σουπεροξειδίου παράγονται σε δύο θέσεις της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, δηλαδή στο σύμπλοκο I ( $\text{NADH}$  δεϋδρογενάση) και στο σύμπλοκο III

(ουβικινόνη-αναγωγία του κυτοχρώματος c). Συγκεκριμένα, η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I ή II, στο συνένζυμο Q, οδηγεί στο σχηματισμό της ανηγμένης μορφής του συνενζύμου Q (QH<sub>2</sub>). Αυτή η ανηγμένη μορφή QH<sub>2</sub> αναγεννά το συνένζυμο Q μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης (Q<sup>•</sup>). Το προκύπτον συνένζυμο Q, με τη σειρά του, μεταφέρει, άμεσα, ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ρίζας σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Η παραγωγή αυτής της ρίζας είναι μη ενζυμική, και, επομένως, όσο υψηλότερος ο μεταβολικός ρυθμός, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα της ρίζας που δημιουργείται. Το ανιόν σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με τη βοήθεια της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου (MnSOD). (Phaniedra et al., 2015) Επίσης, αντιδρώντας το O<sub>2</sub><sup>•-</sup> με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σχηματίζεται μια άλλη δραστική μορφή οξυγόνου, η ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) (αντίδραση Haber-Weiss (1) και Fenton(2)):



Άλλα μιτοχονδριακά συστατικά που συντελούν στο σχηματισμό ROS αποτελούν η μονοαμινοοξειδάση, η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκερόλης και το p66Shc. Το p66Shc είναι ένα σημαντικό μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας ShcA και μεσολαβεί στην παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια. Η μεγαλύτερη ποσότητα του p66Shc βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μόνο ένα μικρό κλάσμα του εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Παρουσία οξειδωτικού στρες, το p66Shc συμπράττει με το κυτόχρωμα c, οδηγώντας στην παραγωγή ROS. (Phaniedra et al., 2015)

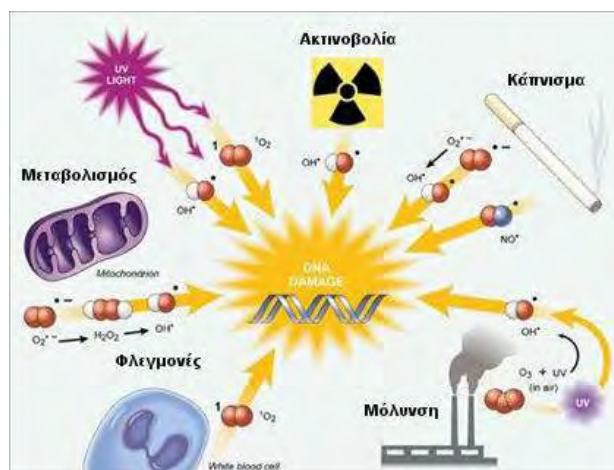
Στα υπεροξειδισώματα, λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες προς το μοριακό οξυγόνο, οδηγώντας στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), όμως η διαδικασία αυτή δε συζεύγνυται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς παραγωγή του ATP, αλλά καταλήγει στην απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή θερμότητας. Οι υπόλοιπες ελεύθερες ρίζες που παράγονται στα υπεροξειδισώματα, περιλαμβάνουν τη ρίζα σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), τη ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) και τη ρίζα μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>). Η β-οξείδωση

των λιπαρών οξέων αποτελεί την κύρια μεταβολική διαδικασία που παράγει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα υπεροξειδισώματα. Είναι, ακόμη, γνωστό πως διαφορετικά υπεροξυσωματικά ένζυμα, όπως οι οξειδάσες του ακυλίου CoA, οι D-αμινοξυ-οξειδάσες, οι L-αυδροξυ-οξειδάσες, η οξειδάση της ξανθίνης και η O-ασπαρτική οξειδάση οδηγούν στην παραγωγή διαφορετικών ειδών ROS. (Phaniedra et al., 2015)

Επιπλέον, δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) σχηματίζονται με τη βοήθεια ενζύμων του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως είναι τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα b5 ένζυμα και η διαμινο-οξειδάση. Ένα άλλο ένζυμο, το Erop1p, που αποτελεί μια θειολική οξειδάση, καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις διθειόλες προς το μοριακό οξυγόνο, οδηγώντας στη σύνθεση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ακόμη, ROS παράγονται, ενδογενώς, μέσω της σύνθεσης προσταλανδινών, της αυτό-οξειδωσης της αδρεναλίνης, της ενεργοποίησης κυττάρων του ανοσοποιητικού, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, της υπερβολικής άσκησης, της λοίμωξης, του ψυχικού στρες, της ισχαιμίας, της γήρανσης, του καρκίνου, ενώ άλλες σημαντικές ενδογενείς πηγές ROS αποτελούν οι διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται τα φαγοκύτταρα, ανηγμένη ριβοφλαβίνη, το FMNH<sub>2</sub> και το FADH<sub>2</sub>. (Phaniedra et al., 2015)

### **1.1.3. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών**

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν εξωγενώς από διάφορες καταστάσεις. Σ' αυτές εντάσσονται η ατμοσφαιρική ρύπανση καθώς και η ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα, το αλκοόλ, ο καπνός του τσιγάρου, τα μεταβατικά μέταλλα, όπως το κάδμιο (Cd), ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb), το αρσενικό (As), τα βαρέα μέταλλα, όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το κοβάλτιο (Co) και το χρώμιο (Cr), οι βιομηχανικοί διαλύτες, τα φυτοφάρμακα, οι υψηλές θερμοκρασίες, η υπεριώδης ακτινοβολία, προϊόντα διατροφής όπως το καπνιστό κρέας, το χρησιμοποιημένο λάδι και τα λιπαρά τρόφιμα, ο τετραχλωράνθρακας αλλά και κάποια φάρμακα, όπως η παρακεταμόλη, η δοξορουβικίνη, η μπλεομυκίνη και η μετρονιδαζόλη. (Phaniedra et al., 2015)



**Εικόνα 2:** Πηγές ελευθέρων ριζών

#### **1.1.4. Ενεργητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών**

Αν και οι ελεύθερες ρίζες έχουν συσχετιστεί, περισσότερο, με αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό, έχει αποδειχθεί πως συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες συνεισφέροντας στην καλή του λειτουργία. Για παράδειγμα, παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, όταν το ανιόν σουπεροξειδίου αλληλεπιδρά με λιπίδια συνδεδεμένα με την αλβουμίνη, στρατολογούνται επιπλέον φαγοκύτταρα στο σημείο της βλάβης, βοηθώντας στην απομάκρυνση των αντιγόνων. Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες διαθέτουν κρίσιμο ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς ενεργοποιούν κάποιους ανοσολογικά σχετικούς μεταγραφικούς παράγοντες και εμπλέκονται στη διαμόρφωση πολλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. (Brigelius et al., 2011) (Ray et al., 2012) Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c που διεγείρει την ενεργοποίηση των κασπασών (Orrenius et al., 2007), ενώ χρησιμεύουν στην ωρίμανση ωκυττάρων, τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, τη διαφοροποίηση κυττάρων, αλλά και τη μυϊκή συστολή. Φαίνεται, λοιπόν, πως χαμηλά επίπεδα ROS είναι απαραίτητα για πολλές φυσιολογικές διεργασίες. (Schieber, 2014)

#### **1.1.5. Αρνητικές επιπτώσεις ελευθέρων ριζών**

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να επηρεάζουν, δυσμενώς, αρκετές κυτταρικές δομές και βιολογικά μακρομόρια, όπως οι μεμβράνες, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι λιποπρωτεΐνες, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA).

### Οξειδωση Λιπιδίων

Οι διπλοί δεσμοί των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, από τα οποία απαρτίζονται οι κυτταρικές μεμβράνες, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε προσβολή από ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την απόσπαση δισ-αλλυλικών ατόμων υδρογόνου από τους δεσμούς αυτούς. Οι προκύπτουσες ρίζες αντιδρούν, ταχέως, με μοριακό οξυγόνο και τα προϊόντα της αντίδρασης μπορούν, στη συνέχεια, να διαδώσουν τη διαδικασία μέσω απόσπασης ενός α-ατόμου υδρογόνου από ένα άλλο μόριο πολυακόρεστου λιπαρού οξέος. Η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση. Καθώς οι αντιδράσεις προχωρούν και τα προϊόντα συσσωρεύονται, είναι πιθανό τα κανάλια ιόντων να επηρεάζονται, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς ή τα ένζυμα να απενεργοποιούνται και η λιπιδική διπλοστοιβάδα να γίνεται πιο άκαμπτη και διαπερατή. (Kehner & Klotz, 2015)

### Οξειδωση Πρωτεϊνών

Οι ελεύθερες ρίζες δύνανται να οξειδώσουν πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την απώλεια κρίσιμων ομάδων σουλφυδρυλίου. Ακόμη, οι τροποποιήσεις που υφίστανται τα αμινοξέα κατόπιν της αντίδρασής τους με ρίζες, μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αλδεϊδών και κετονών (δηλαδή καρβονυλικών ομάδων), υδροϋπεροξειδίων και ανηγμένων υδροξυλίων ή και σε διάσπαση του δακτυλίου σε ιστιδίνη και υπολείμματα τρυπτοφάνης. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η υποβάθμιση της σηματοδότησης, καθώς και του δομικού και λειτουργικού ρόλου των πρωτεϊνών, γεγονός με σοβαρές επιπτώσεις σε διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς. (Kehner & Klotz, 2015)

### Οξειδωση DNA

Η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με το DNA μπορεί να επηρεάσει τόσο την ακεραιότητα όσο και τη ρύθμιση ορισμένων γονιδίων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν είτε άμεση τροποποίηση του DNA μέσω οξειδωσης (που οδηγεί στην παραγωγή 8-οξο-δεοξυγουανωσίνης), είτε σχηματισμό προϊόντων προσθήκης, ή μπορεί να διαμεσολαβούνται από αλλαγές στους παράγοντες μεταγραφής ή στα ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ή επισκευής. (Kehner & Klotz, 2015)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) δύνανται να τροποποιήσουν, απευθείας, τις βάσεις του DNA. Αν οι μηχανισμοί επισκευής του γενετικού υλικού είναι ανεπαρκείς, είναι πιθανό να προκύψει μόνιμη βλάβη του (η οποία συνεπάγεται κυτταρικό θάνατο), μόνιμα αλλοιωμένες ακολουθίες DNA (μετάλλαξη) και σφάλματα στη μεταγραφή, με σοβαρές συνέπειες στη φυσιολογική λειτουργία των διαφόρων συστημάτων. (Kehner & Klotz, 2015)

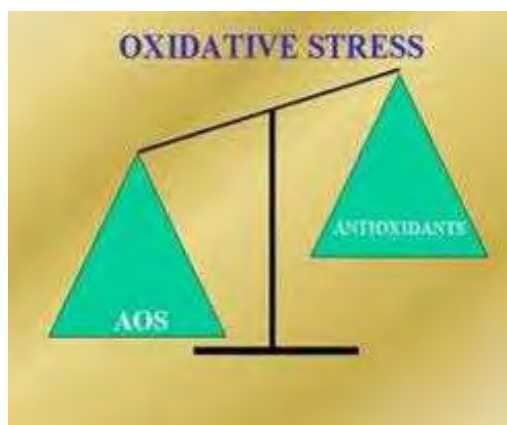
### Οξείδωση RNA

Η οξείδωση του RNA μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τη ρύθμιση των γονιδίων. Η οξείδωση των βάσεων του RNA οδηγεί, κυρίως, σε θραύσεις κλώνων και σε τροποποιήσεις βάσεων. Στην περίπτωση του RNA που εμπλέκεται στην πρωτεϊνική σύνθεση, οξείδωση του μακρομορίου από ρίζες δύνανται να οδηγήσει σε μειωμένη και μη φυσιολογική παραγωγή πρωτεϊνών (misfolding). Τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς αναγνώρισης του προβλήματος και αποδόμησης των μη φυσιολογικών πρωτεϊνών, αλλά, αν το πρόβλημα είναι εκτεταμένο ή παρατεταμένο, ενεργοποιείται η απόπτωση. (Kehner & Klotz, 2015)

#### **1.1.6. Οξειδωτικό στρες**

Ποικίλοι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε μια διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της συσσώρευσης ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Όταν αυτή η διαταραχή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ριζών σε επίπεδα μεγαλύτερα των επιτρεπτών, τότε προκαλείται το λεγόμενο «οξειδωτικό στρες». Το φαινόμενο αυτό προκύπτει είτε από υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε από ανεπάρκεια στη δράση των εγγενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. (Pizzino et al., 2017) Το πρώτο ενδεχόμενο οφείλεται σε έκθεση των κυττάρων σε μεγάλες συγκεντρώσεις ROS ή σε επίδραση παραγόντων που διεγείρουν την παραγωγή τους σε βαθμό μεγαλύτερο του φυσιολογικού. Το δεύτερο ενδεχόμενο σχετίζεται με πιθανή μείωση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής ικανότητας λόγω κάποιας παθολογικής κατάστασης, αλλά και με μεταλλάξεις που ελαττώνουν τη δραστικότητα των ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας.





**Εικόνα 3:** Οξειδωτικό στρες

### ***1.1.7. Αντιοξειδωτική άμυνα***

Αντισταθμιστικά της δράσης των οξειδωτικών δρουν κάποια μόρια που ονομάζονται αντιοξειδωτικά. Δεν υπάρχει ένας απλός ορισμός των αντιοξειδωτικών ουσιών. Σύμφωνα με τους Halliwell και Gutteridge (1995), ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «οποιαδήποτε ουσία η οποία, όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού». Ωστόσο, ο ορισμός αυτός φαίνεται ανεπαρκής σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, η αλβουμίνη του πλάσματος δεσμεύει το χαλκό και προστατεύει εξωκυττάριους στόχους, όπως είναι οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες (LDLs), από την οξειδωτική βλάβη, και, ως εκ τούτου, θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, παρά το γεγονός πως απαντάται σε σημαντική μοριακή περίσσεια, σε σύγκριση με τις LDLs. Επομένως, ευρύτερα, ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «οποιαδήποτε ουσία που καθυστερεί, εμποδίζει ή καταργεί την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο-στόχο». (Halliwell & Gutteridge, 2007)

Τα αντιοξειδωτικά, γενικά, δρουν με δύο τρόπους: (1) παρεμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή (2) σταματούν την αλυσιδωτή αντίδραση διάδοσης των ελευθέρων ριζών. (Σωτηρούδης)

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών, με μηχανισμούς δράσης που μπορεί να είναι είτε ενζυμικοί είτε μη ενζυμικοί. (Birben et al., 2012)

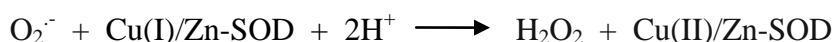
## Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

### Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή της ρίζας σουπεροξειδίου  $O_2^-$  σε υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$  και  $O_2$ .



Δεδομένου ότι η ρίζα σουπεροξειδίου είναι η πρωταρχική ρίζα που παράγεται από μια ποικιλία πηγών, γίνεται αντιληπτή η σημασία της απομάκρυνσής της από τον οργανισμό. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του  $O_2^-$  ρυθμίζονται από δύο μορφές SOD, δηλαδή την Cu/Zn-SOD και τη Mn-SOD. Το ένζυμο Cu/Zn-SOD απαντάται στο κυτοσόλιο, τα λυσοσώματα, τον πυρήνα και το διαμεμβρανικό χώρο, κυρίως στα μυϊκά κύτταρα, και ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του ακολουθεί δύο στάδια: (1) αναγωγή της οξειδωμένης μορφής Cu(II) του ενζύμου από τη ρίζα σουπεροξειδίου, απελευθερώνοντας  $O_2$  και (2) οξείδωση της προκύπτουσας ανηγμένης μορφής του χαλκού Cu(I) από ένα άλλο ανιόν σουπεροξειδίου και από δύο πρωτόνια, με αποτέλεσμα το σχηματισμό  $H_2O_2$ . Το ένζυμο Mn-SOD εκφράζεται, κυρίως, στα μιτοχόνδρια και περιέχει μαγγάνιο στο ενεργό του κέντρο, ενώ ο μηχανισμός δράσης του περιλαμβάνει κύκλους μεταξύ οξειδωμένων ( $Mn^{3+}$ ) και ανηγμένων ( $Mn^{2+}$ ) ιόντων. (Patlevic, 2016) (Birben et al., 2012)



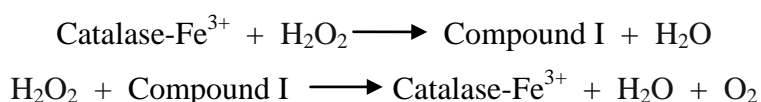
### Καταλάση (CAT)

Πρόκειται για το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  το οποίο προκύπτει από τη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης ή των οξειδασών (π.χ. ξανθινο-οξειδάση) σε νερό  $H_2O$  και μοριακό οξυγόνο  $O_2$ .



Η καταλάση είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από τέσσερα ταυτόσημα μονομερή, καθένα από τα οποία περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό του περιοχή.

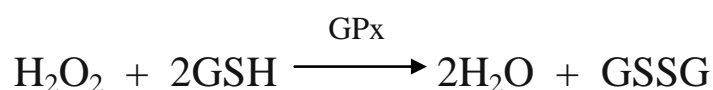
Επίσης, κάθε τετραμερές μόριο καταλασών περιέχει τέσσερα μόρια στενά συνδεδεμένου NADPH το οποίο δε φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ενζυμική μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub>, αλλά προστατεύει την καταλάση από την απενεργοποίησή της από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το ένζυμο δρα με δύο τρόπους: (1) καταλυτικά, αποσυνθέτοντας το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub> ή (2) υπεροξειδικά, με οξείδωση αλκοολών μυρμηγκικού ή νιτρικού. Ο καταλυτικός μηχανισμός είναι μια αντίδραση δύο σταδίων: Στο πρώτο στάδιο, ο τρισθενής σίδηρος της αίμης Fe<sup>3+</sup> ανάγει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και, έτσι, παράγεται Fe<sup>4+</sup> μαζί με κατιονική ρίζα πορφορίνης, που αναφέρεται ως ένωση I. Στο δεύτερο στάδιο, η ένωση I οξειδώνει ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου προς O<sub>2</sub> και απελευθερώνει τα είδη φερρυλ-οξυγόνου ως H<sub>2</sub>O. Βασικά, η αντίδραση καταλάσης είναι μια αντίδραση αποσυναρμολόγησης παρόμοια με την αντίδραση που καταλύει η SOD, αλλά χωρίς την παραγωγή ελευθέρων ριζών. (Patlevic, 2016) (Birben et al., 2012)



Η καταλάση είναι παρούσα σχεδόν σε κάθε είδους κύτταρο αλλά η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη στα ερυθροκύτταρα και στο ήπαρ. Υποκυτταρικά, εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα. Η δράση της θεωρείται εξέχουσας σημασίας για τον οργανισμό γιατί εμποδίζει τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην πολύ επιβλαβή ρίζα υδροξυλίου OH<sup>•</sup>. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η δράση της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης παρουσιάζουν μια γραμμική συσχέτιση με τη διάρκεια ζωής στα θηλαστικά. (Veskoukis et al., 2011)

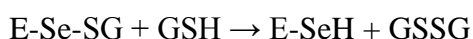
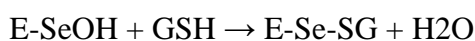
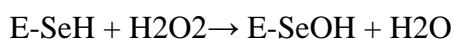
#### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Το ένζυμο αυτό καταλύει, επίσης, τη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub>, όπως και η καταλάση, αλλά, στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται η ανηγμένη γλουταθειόνη η οποία, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, οξειδώνεται. (Veskoukis et al., 2011)



Η GPx αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου ως συμπάραγοντα. Αυτή η σελινοπρωτεΐνη

καταλύει την αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη GSH ως αναγωγικό υπόστρωμα. Εν συντομία, η καταλυτική θέση του ενζύμου περιλαμβάνει υπόλειμμα σεληνοκυστεΐνης στο οποίο το σελήνιο υφίσταται κύκλο οξειδοαναγωγής που περιλαμβάνει σεληνόλη (E-SeH) ως τη δραστική μορφή που ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξείδια. Η σεληνόλη οξειδώνεται προς σεληνενικό οξύ (E-SeOH), το οποίο αντιδρά με την ανηγμένη GSH για να σχηματίσει ένα σεληνυλ-σουλφιδικό παράγωγο (E-Se-SG). Ένα δεύτερο μόριο GSH, εν συνεχεία, αναγεννά τη δραστική μορφή του ενζύμου, αντιδρώντας με το E-Se-SG για να σχηματίσει την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Έτσι, στη συνολική διαδικασία, δύο ισοδύναμα της GSH οξειδώνονται προς δισουλφίδιο και ύδωρ, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου ανάγεται στην αντίστοιχη αλκοόλη. (Patlevic, 2016)



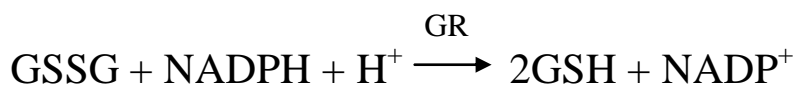
Υπάρχουν τέσσερα υποείδη GPx: Η GPx1 βρίσκεται στο κυττοσόλιο των περισσότερων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το GPx2 είναι, επίσης, κυτοσολικό ένζυμο αλλά περιορίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Το GPx3 εμφανίζεται στο πλάσμα ως γλυκοπρωτεΐνη και το GPx4 βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, όπου αλληλεπιδρά με σύνθετα λιπίδια, όπως η χοληστερόλη και οι λιπο-πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες. (Patlevic, 2016)

Επομένως, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο καθώς, απουσία του, θα υπήρχε μεγάλη ποσότητα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που θα οδηγούσε σε άμεση βλάβη του ιστού. (Patlevic, 2016) Η ενζυμική δραστικότητα τόσο της CAT όσο και της GPx εκδηλώνεται ταυτόχρονα στα περισσότερα κύτταρα. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που συντίθεται από τα υπεροξυσωματικά ένζυμα εξαλείφεται, ως επί το πλείστον, από την καταλάση, ενώ το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που προκύπτει από τα μιτοχόνδρια ή από τη δράση του κυτοσολικού Cu/Zn-SOD απομακρύνεται από τη GPx. (Patlevic, 2016)

#### Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι ένα κρίσιμο ένζυμο της αντιοξειδωτικής άμυνας, το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης, ανάγοντας το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG στη σουλφιδρυλική μορφή GSH, μέσω ενός μηχανισμού που χρησιμοποιεί το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων. Ο ρόλος

του ενζύμου είναι να διατηρήσει υψηλή την κυτταρική συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής (GSH), και χαμηλή τη συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής (GSSG). (Patlevic, 2016)



Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι μια θερμοσταθερή ομοδιμερής φλαβοπρωτεΐνη, στην οποία κάθε υπομονάδα περιέχει τέσσερις περιοχές. Η διμερής φύση του ενζύμου είναι κρίσιμη για τη λειτουργία του, διότι και οι δύο υπομονάδες συνεισφέρουν σημαντικά υπολείμματα στη σύσταση της ενεργού θέσης. Ουσιαστικά, το ένζυμο διαθέτει τρία υποστρώματα, τα NADPH, H<sup>+</sup> και GSSG, και δύο προϊόντα, τα GSH και NADP<sup>+</sup>. Ο καταλυτικός κύκλος της αναγωγής της γλουταθειόνης παρουσιάζει δύο φάσεις: μια αναγωγική και μια οξειδωτική ημιαντίδραση. Κατά τη διάρκεια της αναγωγικής ημιαντίδρασης, το δινουκλεοτίδιο φλαβίνης-αδενίνης, που αποτελεί μια προσθετική ομάδα του ενζύμου, ανάγεται από το NADPH, και τα ισοδύναμα αναγωγής μεταφέρονται σε ένα ενεργό δισουλφίδιο οξειδοαναγωγής. Στην οξειδωτική ημιαντίδραση, η προκύπτουσα διθειόλη αντιδρά με το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG, το οποίο ανάγεται για να σχηματίσει δύο μόρια ανηγμένης γλουταθειόνης GSH στην ενεργό θέση του ενζύμου. (Patlevic, 2016)

Αξίζει να σημειωθεί πως διαφορετικές μορφές του ενζύμου βρίσκονται όχι μόνο στο κυτοσόλιο, αλλά και στη μιτοχονδριακή μήτρα. (Patlevic, 2016)

### **Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά**

#### **Βιταμίνη E**

Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που συγκεντρώνεται στην υδρόφοβη εσωτερική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό άμυνας εναντίον της μεμβρανικής οξειδωτικής βλάβης που επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E και το κύριο αντιοξειδωτικό που βρίσκεται συνδεδεμένο στη μεμβράνη. Το φαινολικό υδροξύλιο της βιταμίνης συνιστά τη βάση της αντιοξειδωτικής δράσης αυτού του μορίου, καθώς προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο σε μια ρίζα υπεροξυλίου που παράγεται κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, η βιταμίνη E μετατρέπεται σε ρίζα τολοφεροξυλίου, η οποία είναι ελάχιστα δραστική, με αποτέλεσμα να τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση ριζών. Έτσι, η βιταμίνη αυτή

αναστέλλει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και, επιπλέον, επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. (Birben et al., 2012) (Kehner & Klotz, 2015)

#### Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που διαθέτει το ρόλο του συμπαραγόνα πολλών ενζύμων, όπως η προλυλ-υδροξυλάση. Μάλιστα, η δράση της ως συμπαραγόνα βασίζεται στην ικανότητά της να υποβάλλεται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυνατότητά της να αντιδρά, χημικά, με δραστικά είδη, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου, την καθιστούν ένα σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Ωστόσο, η βιταμίνη C δύναται, επίσης, να λειτουργήσει ως προοξειδωτικό (ειδικά παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων). Ως εκ τούτου, η συνολική θέση της στην κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα, όταν είναι παρούσα σε φυσιολογικά επίπεδα, παραμένει αδιευκρίνιστη. (Kehner & Klotz, 2015)

#### Καροτενοειδή

Πρόκειται για χρωστικές που απαντώνται στα φυτά. Το β-καροτένιο, έχει βρεθεί πως αντιδρά με τις ρίζες περοξυλίου (ROO<sup>•</sup>), υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) και σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Είναι πρόδρομος της βιταμίνης A και μπορεί να εξαλείψει *in vitro*, το μοριακό οξυγόνο <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, με πολύ καλή απόδοση. Τα καροτενοειδή εκδηλώνουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, αλλά ενδέχεται να παρουσιάζουν προοξειδωτικές επιδράσεις, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου. (Birben et al., 2012) (Kehner & Klotz, 2015)

Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, πως τα καροτενοειδή είναι ικανά να ρυθμίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες. Το β-καροτένιο αναστέλλει την οξειδωτικά επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, καθώς και την παραγωγή της ιντερλευκίνης (IL)-6 και του TNF-α. Ακόμη, τα καροτενοειδή επηρεάζουν την απόπτωση των κυττάρων. (Birben et al., 2012)

#### Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν μεταβολισμού της πουρίνης. Παρά τα προβλήματα που σχετίζονται με την κακή υδατοδιαλυτότητά του, υπάρχουν ενδείξεις ότι δύναται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο ως *in vivo* αντιοξειδωτικό. (Kehner & Klotz, 2015) Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, το ουρικό προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από οξειδωτική βλάβη που θα οδηγούσε σε λύση. Οξειδώνεται, από το <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, πολύ ευκολότερα, σε σχέση με τα δεοξυνουκλεοτίδια, και καταστρέφεται από τις ρίζες υδροξυλίου σε συγκρίσιμο βαθμό με αυτόν της καταστροφής των δεοξυνουκλεοτιδίων. (Ames et al., 1981) Μάλιστα, το ουρικό οξύ θεωρείται το



μείζον αντιοξειδωτικό του πλάσματος, ενώ πιστεύεται πως οξείες αυξήσεις του παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η νόσος του Parkinson και το οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο. Βέβαια, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως μπορεί να δράσει και ως προοξειδωτικό, σχηματίζοντας ρίζες σε αντιδράσεις με άλλα οξειδωτικά, οι οποίες φαίνεται να στοχεύουν, κυρίως, τα λιπίδια (LDL και μεμβράνες). (Yuri et al., 2010)

#### Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμίνη, κυστεΐνη και γλυκίνη και θεωρείται ως η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών. Η ελεύθερη ομάδα της θειόλης (-SH), στο μόριο της γλουταθειόνης, είναι πυρηνόφιλη και αντιδρά, ταχέως, με πολλά ηλεκτρονιόφιλα. Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης αυξάνει, σημαντικά, την ταχύτητα της αντίδρασης, σε μερικές περιπτώσεις, αλλά αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να συμβούν, γενικά, και χωρίς ενζυμική παρέμβαση. (Kehner & Klotz, 2015)

Συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη παρουσιάζει το αντιοξειδωτικό της αποτέλεσμα με διάφορους τρόπους: Συντελεί στην αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των υπεροξειδίων των λιπιδίων, αντιδράσεις που καταλύονται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Στην πρώτη περίπτωση, η γλουταθειόνη προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στο  $H_2O_2$ , ανάγοντάς το σε  $H_2O$  και  $O_2$ , ενώ το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) που προκύπτει, ανάγεται, ακολούθως, σε GSH, μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στη δεύτερη περίπτωση, η ανηγμένη γλουταθειόνη προσφέρει πρωτόνια στα λιπίδια της μεμβράνης, προστατεύοντάς τα από οξειδωτική βλάβη. Η GSH, λοιπόν, δρα ως συμπαράγοντας για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και την τρανσφεράση, αλλά και για πολλά άλλα ένζυμα αποτοξικοποίησης. Μπορεί, όμως, να δράσει και άμεσα, εξουδετερώνοντας, μη ενζυμικά, ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου  $OH\cdot$ . (Birben et al., 2012) (Patlevic, 2016)

Ακόμη, η GSH παίζει ρόλο στη μετατροπή των βιταμινών C και E πίσω στις δραστικές τους μορφές. Επιπλέον, προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, μέσω αλληλεπίδρασής της με τις προαποπτωτικές και τις αντιαποπτωτικές οδούς σηματοδότησης, ενώ ρυθμίζει και ενεργοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο AP-1, ο NF-Kb και ο Sp-1. (Birben et al., 2012)

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η οξειδωμένη (GSSG) και η ανηγμένη (GSH) μορφή της γλουταθειόνης βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία. Έτσι, η αναλογία GSH/GSSG χρησιμοποιείται, συχνά, ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες. Έχει προταθεί πως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου το περισσότερο οξειδωμένο περιβάλλον συντελεί στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η αναλογία GSH/GSSG είναι περίπου 1/1, σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια και το κυτοσόλιο όπου ο λόγος GSH/GSSG είναι μεγαλύτερος από 10. Βέβαια, αυτό δε θεωρείται πάντα ακριβές λόγω της συμμετοχής της γλουταθειόνης σε αρκετές διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες, όπως στη ρύθμιση της σύνθεσης του DNA και της παραγωγής πρωτεϊνών και στη δράση ενζύμων ως συμπαράγοντα. Αυτά μπορούν να επηρεάσουν το λόγο GSH/GSSG και να προκαλέσουν μετατροπή από την ανηγμένη στην οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης. Ως εκ τούτου, η χρήση του λόγου GSH/GSSG ως βιοδείκτη παρακολούθησης του οξειδωτικού στρες στερείται ακριβείας και πιθανόν να πρέπει να επανεξεταστεί. (Veskoukis et al., 2011)

#### ***1.1.8. Επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην ανθρώπινη υγεία***

##### Καρκίνος

Είναι γνωστό πως η οξειδωτική βλάβη του DNA αποτελεί ερέθισμα ανάπτυξης καρκίνου. Οι υδρολυμένες βάσεις του DNA είναι συνήθη υποπροϊόντα της οξείδωσης του DNA και παίζουν σημαντικό ρόλο στη χημική καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός τέτοιων παραγώγων βλάπτει τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων μεταβάλλοντας το φυσιολογικό μεταγραφικό προφίλ τους και προκαλώντας μεταλλάξεις γονιδίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί, επίσης, να προκαλέσει μεγάλη ποικιλία δομικών τροποποιήσεων του γενετικού υλικού, όπως βλάβες των βάσεων και των σακχάρων, διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών και ελλείψεις βάσεων. (Pizzino et al., 2017)

##### Καρδιαγγειακές παθήσεις

Τα τελευταία χρόνια, τα ερευνητικά δεδομένα απέδειξαν πως το οξειδωτικό στρες συνιστά είτε πρωτογενή είτε δευτερογενή αιτία για πολλά καρδιαγγειακά νοσήματα. Αποτελεί, κατά κύριο λόγο, διεγερτικό ερέθισμα της αθηροσκλήρωσης. Συγκεκριμένα, μια ενδοθηλιακή φλεγμονή οδηγεί στην παραγωγή ROS από τα μακροφάγα που συγκεντρώνονται στην περιοχή, με αποτέλεσμα η κυκλοφορούσα



LDL να οξειδώνεται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, οδηγώντας σε συσσώρευση λιπιδίων. Αυτή η σειρά των γεγονότων καταλήγει στο σχηματισμό μιας αθηρωματικής πλάκας. Το οξειδωτικό στρες συνιστά, επίσης, γενεσιουργό αιτία και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως η ισχαιμία, η υπέρταση, η καρδιομυοπάθεια, η καρδιακή υπερτροφία και η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. (Pizzino et al., 2017)

### Νευρολογικές ασθένειες

Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με πολυάριθμα νευρολογικά νοσήματα, στα οποία περιλαμβάνονται το Parkinson, το Alzheimer (AD), η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), η πολλαπλή σκλήρυνση, η κατάθλιψη και η απώλεια μνήμης. Η οξειδωτική βλάβη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απώλεια νευρώνων και υποθάλπτει την εμφάνιση άνοιας. Συγκεκριμένα, το β-αμυλοειδές, ένα τοξικό πεπτίδιο που εντοπίζεται, συχνά, στον εγκέφαλο των ασθενών με Alzheimer, παράγεται από τη δράση ελευθέρων ριζών και είναι, τουλάχιστον εν μέρει, υπεύθυνο για τη νευροεκφύλιση που παρατηρείται κατά την έναρξη και εξέλιξη της νόσου Alzheimer. (Pizzino et al., 2017)

### Ασθένειες του αναπνευστικού

Οι ελεύθερες ρίζες, δρώντας οξειδωτικά, ενισχύουν τη φλεγμονή, μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών κινασών που εμπλέκουν μονοπάτια και παράγοντες μεταγραφής, όπως τον NF-kappa B και τον AP-1. Με τον τρόπο αυτό, το οξειδωτικό στρες αποτελεί παράγοντα πρόκλησης άσθματος και χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, που συνοδεύονται από συστηματική και τοπική χρόνια φλεγμονή. (Pizzino et al., 2017)

### Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη διαταραχή των αρθρώσεων, που χαρακτηρίζεται από διήθηση μακροφάγων και ενεργοποιημένων T-κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες, στο σημείο της φλεγμονής, παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη αυτού του συνδρόμου, όπως αποδείχτηκε από τα αυξημένα επίπεδα ισοπροστανίου και προσταγλανδινών στο αρθρικό υγρό των ασθενών. (Pizzino et al., 2017)

## Νεφρική βλάβη

Τα νεφρά επηρεάζονται αρνητικά από το οξειδωτικό στρες, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι η παραγωγή ROS επάγει τη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, οδηγώντας σε ένα αρχικό στάδιο φλεγμονής. Σε αυτή την πρώιμη φάση, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν ο TNF- $\alpha$  και ο IL-1 $\beta$ , ως προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, καθώς και ο NF- $\kappa$ B ως μεταγραφικός παράγοντας απαιτούμενος για τη διατήρηση της φλεγμονώδους διαδικασίας. Το τελευταίο στάδιο χαρακτηρίζεται από αύξηση στην παραγωγή του TGF- $\beta$ , ο οποίος οργανώνει την εξωκυτταρική σύνθεση. Έτσι, όταν το ερέθισμα του οξειδωτικού στρες δρα, χρόνια, στους ιστούς των νεφρών, προκύπτει, αρχικά, ένα στάδιο φλεγμονής και, αργότερα, ο σχηματισμός άφθονου ινώδους ιστού που παρακωλύει τη λειτουργία των οργάνων και, ενδεχομένως, οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια. (Pizzino et al., 2017)

## Σεξουαλική ωρίμανση

Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν πως το οξειδωτικό στρες, ενδεχομένως, είναι υπεύθυνο για την καθυστερημένη σεξουαλική ωρίμανση και έναρξη της εφηβείας. (Pizzino et al., 2017)

### **1.2. Ήπαρ και οξειδωτικό στρες**

Το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, ο οποίος, κατά κύριο λόγο, επιτελείται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα ξενοβιοτικά υποβάλλονται σε πέψη δια της γαστρεντερικής οδού, και, ακολούθως, η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα απορροφώνται στην κυκλοφορία του αίματος και, μέσω της φλεβικής κυκλοφορίας, μεταφέρονται στο ήπαρ όπου μεταβολίζονται. (Rui, 2014), (Campbell, 2006) Ο μεταβολισμός αποτελεί μια σειρά χημικών μεταβολών οι οποίες συντελούνται στο μόριο των ξενοβιοτικών, με σκοπό την εύκολη απέκκρισή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μετατροπής των ουσιών αυτών σε περισσότερο υδατοδιαλυτά παράγωγα, γεγονός που τους στερεί την ικανότητα να διαχέονται, παθητικά, μέσα από βιολογικές μεμβράνες, και οδηγεί στη μη απορρόφησή τους από το πρόουρο και, συνεπώς, στην απέκκρισή τους, μέσω ενεργητικών μηχανισμών μεταφοράς. (Beierle et al., 1999) Η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων δύο Φάσεων:

Φάσης I και Φάσης II. Κατά τη Φάση I, πραγματοποιούνται αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης κ.α., και κατά τη Φάση II, η υδατοδιαλυτότητα αυξάνεται, περαιτέρω, μέσω αντιδράσεων σύζευξης με μόρια όπως η γλουταθειόνη. (Campbell,2006)

Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι αντιδράσεις του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στο ήπαρ, οι οποίες, υπό φυσιολογικές συνθήκες παραμένουν σε ελεγχόμενα επίπεδα. Ωστόσο, μια ενδεχόμενη ανισορροπία αντιοξειδωτικών-προοξειδωτικών μηχανισμών, μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη παρουσία ελευθέρων ριζών στο ήπαρ, δηλαδή στο φαινόμενο του οξειδωτικού στρες, το οποίο είναι συνδεδεμένο με την παθογένεση ποικίλων φλεγμονωδών, μεταβολικών και πολλαπλασιαστικών ασθενειών του ήπατος. (Poli, 1993), (Cichoż-Lach and Michalak, 2014) Για παράδειγμα, κύριος μηχανισμός της ηπατοκαρκινογένεσης είναι η χρόνια φλεγμονή που σχετίζεται με εκτεταμένο οξειδωτικό στρες. Πολλές έρευνες αποδεικνύουν πως οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση καρκίνου του ήπατος. (Marx, 2004) Κατά τη φάση της έναρξης της καρκινογένεσης, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν, άμεσα, με το DNA, βλάπτοντας συγκεκριμένα γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. (Adelman et al., 1988) Μπορούν, επίσης, να ενισχύσουν τη δράση καρκινογόνων ξενοβιοτικών, διευκολύνοντας την ενεργοποίησή τους σε δραστικές ενώσεις. (Ames, 1989) Στη συνέχεια, κατά τη φάση εξέλιξης της καρκινογένεσης, οι ROS δύνανται να διεγείρουν, άμεσα, την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. (Troll and Wiesner, 1985) Επιπλέον, η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) είναι συνδεδεμένη με αυξημένα επίπεδα ROS/RNS και μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, ενώ το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ROS/RNS εμπλέκεται με τους HCV-επαγόμενους καρκίνους του ήπατος. (Muriel, 2009) Ακόμη, κατά τη χορήγηση της παρακεταμόλης, ενός συνήθους φαρμάκου, σε μεγάλες δόσεις, εξαντλείται η διαθέσιμη γλουταθειόνη και, συνεπώς, ο μεταβολίτης N-ακετυλ-βενζοκινονεϊμίνη αντιδρά με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των ηπατικών πρωτεϊνών σχηματίζοντας σταθερούς ομοιοπολικούς δεσμούς με αυτές, γεγονός που αποτελεί κύρια αιτία ηπατικής νέκρωσης, η οποία περιλαμβάνει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και, σε μεγάλο βαθμό, σχηματισμό ROS και άλλων ελευθέρων ριζών. (Muriel, 2009) (Harvey and Champe, 2007)

Βέβαια, εκτός από το μεταβολισμό, υπάρχουν και άλλες αιτίες παραγωγής ελευθέρων ριζών στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, η ισχαιμία, που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μεταμόσχευσης και της ηπατικής χειρουργικής, ενεργοποιεί τα κύτταρα Kupffer του ήπατος, που αποτελούν την κύρια πηγή ROS κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, οι οποίες, με τη σειρά τους, ενισχύουν τη βλάβη των ηπατικών κυττάρων, επηρεάζοντας, άμεσα, τη βιωσιμότητά τους. (Muriel, 2009)

Συμπερασματικά, οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, εμπλέκονται στην ηπατική βλάβη, επηρεάζοντας τις ενεργειακές, αναπνευστικές και αναγεννητικές οδούς των ηπατοκυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. (Muriel, 2009) Έτσι, δεδομένου του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζει το οξειδωτικό στρες στην αιτιολογία ηπατικών διαταραχών, η χορήγηση αντιοξειδωτικών, σε συνδυασμό με την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, έχει προταθεί για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών του ήπατος. Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα αρκετών αντιοξειδωτικών έχει ήδη αποδειχθεί. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι χορήγηση ασκορβικού οξέος, λιποϊκού οξέος, και κερκετίνης (ενός αντιοξειδωτικού φλαβονοειδούς) ασκεί ευεργετική δράση σε ασθενείς με χρόνια μόλυνση από HCV. Ακόμη, είναι γνωστό πως αρκετά φαρμακευτικά φυτά διαθέτουν ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες, λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης των συστατικών τους, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή, οι λιγνάνες, τα μονοτερπένια κ.α. (Cichoż-Lach and Michalak, 2014) (Laamech et al., 2016)

### **1.3. *Conium divaricatum***

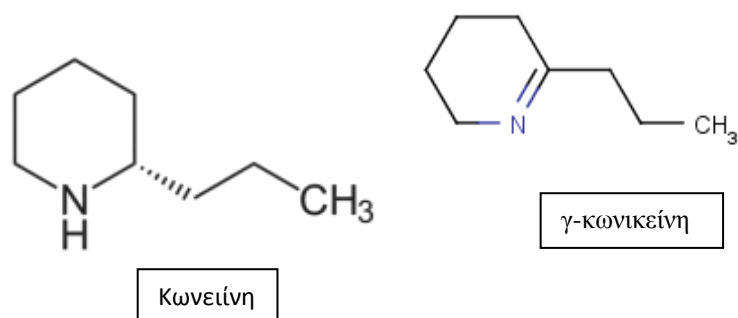
Το *Conium divaricatum* αποτελεί ένα από τα ιδιαίτερος δηλητηριώδη φυτά της οικογένειας Arisiaceae, που αυτοφύεται σε περιοχές της Ευρώπης με εύκρατο κλίμα, στη Δυτική Ασία, καθώς και στη Βόρεια Αφρική, αλλά έχει εισαχθεί και σε πολλές άλλες περιοχές, όπως η Βόρεια Αμερική, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία. (Scherp et al., 2009) Ο Αρχαίος Έλληνας φιλόσοφος Σωκράτης καταδικάστηκε, το 399 π.Χ., να πει εκχύλισμα κωνείου, ενώ τα συμπτώματα της δηλητηρίασης περιγράφηκαν από το μαθητή του, Πλάτωνα. Τα γενικά συμπτώματα δηλητηρίασης από κώνιο αφορούν την επίδρασή του στο Κ.Ν.Σ.: Διέγερση ακολουθούμενη από παράλυση των απολήξεων των κινητικών νεύρων, κατάθλιψη, έμετο, τρόμο, προβλήματα στην κίνηση, ανωμαλίες στον καρδιακό ρυθμό, ταχεία αναπνοή, ναυτία, σπασμούς, κώμα και θάνατο. (Vetter, 2004)

Πρόκειται για μια διετή πόα, ύψους 120-180 cm. Η ρίζα του είναι μακριά, διχαλωτή και έχει ανοικτό κίτρινο χρώμα, ενώ τα άνθη του είναι λευκά. Το φυτό παράγει μια βασική ροζέτα κατά το πρώτο έτος, και τους μίσχους ανθοφορίας κατά το δεύτερο έτος. Το στέλεχος έχει φωτεινό πράσινο χρώμα και είναι όρθιο, ομαλό, ελαφρώς ραβδωτό, διακλαδισμένο και κοίλο, τα φύλλα πολυάριθμα και μακρόστενα, και ο καρπός (σχιζοκαρπός) ωοειδής.



**Εικόνα 4:** *Conium divaricatum*

Το *Conium divaricatum* περιέχει πολλά αλκαλοειδή πιπεριδίνης. Συγκεκριμένα, αυτά είναι οι κορεσμένες ενώσεις κωνεΐνη, N-μεθυλοκωνεΐνη, κωνυδρίνη, ψευδοκωνυδρίνη και η μερικώς ακόρεστη γ-κωνικεΐνη. Από αυτά τα αλκαλοειδή, η κωνεΐνη και η γ-κωνικεΐνη είναι οι περισσότερο άφθονες. (Radulovic, 2011) Η γ-κωνικεΐνη αποτελεί πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση της κωνεΐνης. Η ενδομετατροπή των δύο ενώσεων αυτών αποδεικνύει πως είναι μέλη ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος (Vetter, 2004). Όλα τα μέρη του φυτού περιέχουν μεγάλες ποσότητες αλκαλοειδών, αλλά η ποσότητα και η αναλογία των διαφόρων αλκαλοειδών εξαρτάται από την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες και το στάδιο της ανάπτυξης. (Radulovic, 2011) Ακόμη, το *Conium divaricatum* παράγει, ως δευτερογενείς μεταβολίτες, φαινολικές ενώσεις (γλυκοζιτικές και μη), στεροειδή και ταννίνες. (Kiamehr, 2017)



**Εικόνα 5:** Χημικές δομές Κωνειίνης και γ-κωνικεΐνης

Το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί στην ελληνική και αραβική παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση κακοήθων όγκων, οίδημάτων και πόνων των αρθρώσεων (Reecha, 2010) (Binev, 2007) (Salma, 2015) (Perez, 2001) (Radulovic, 2011) (Mehrabi, 2015), ενώ οι βιολογικές ιδιότητες του εκχυλίσματός του (αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές) έχουν αποδειχθεί από πολλούς ερευνητές. (Kiamehr, 2017) (Gebhardt, 2005) (Hempel et al., 1999) (Nielsen et al., 1999) (Fejes et al., 2000) (Middleton et al., 2000) (Akihisa et al., 2003) (Parejo et al., 2004) Μάλιστα, αποτελεί την κύρια θεραπεία του προστάτη, ενώ χρησιμοποιείται και στην ομοιοπαθητική. (Mondal, 2014)

Στη σύγχρονη έρευνα, εκχύλισμα *Conium divaricatum* έχει μελετηθεί ως προς την ικανότητά του να επάγει τοξικότητα *in vitro* σε καρκινικά κύτταρα HeLa, οδηγώντας τα σε απόπτωση και, κατά συνέπεια, συνεισφέροντας στη θεραπεία του καρκίνου. (Mondal, 2014) Ακόμη, σε άλλη ερευνητική εργασία, εκχύλισμα φύλλων κωνείου χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση νανοσωματιδίων παλλαδίου, προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση χημικών διαλυτών και επικίνδυνων υλικών. Στη μελέτη αυτή, το αντιοξειδωτικό δυναμικό του εκχυλίσματος διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στη μετατροπή των ιόντων Pd<sup>2+</sup> σε νανοσωματίδια Pd. (Kiamehr, 2017)

#### 1.4. Πολυφαινόλες

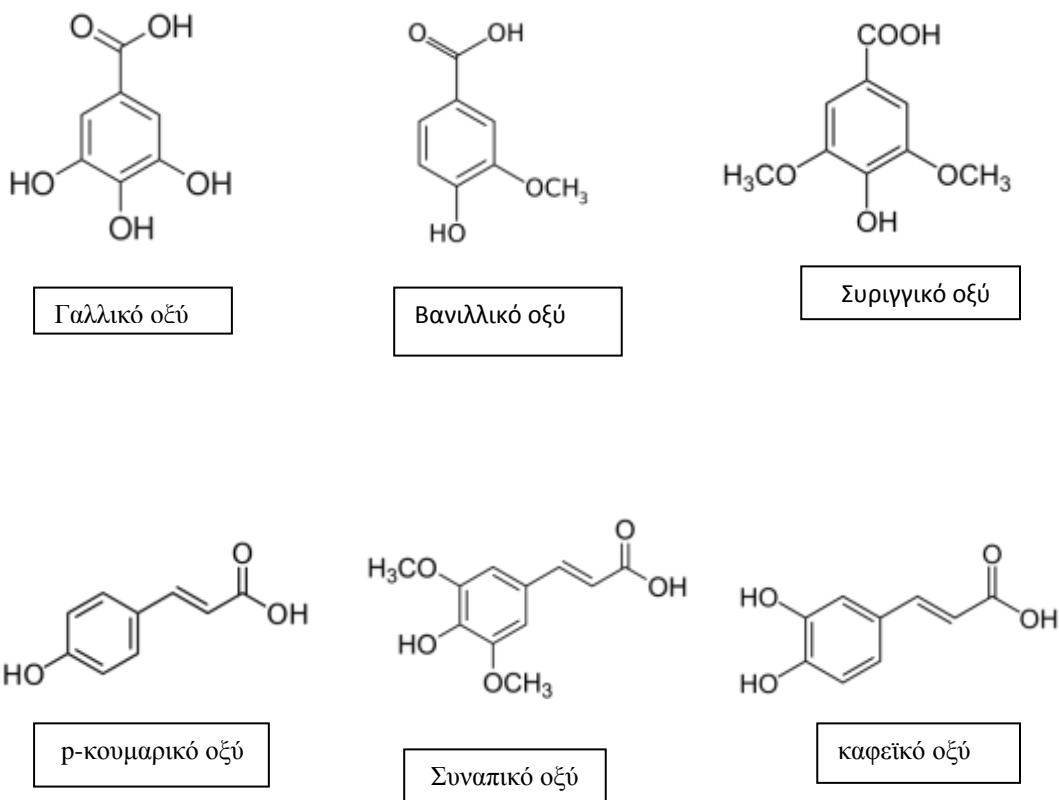
Οι πολυφαινόλες συνιστούν μια από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως διαδεδομένες ομάδες φυσικών προϊόντων στο φυτικό βασίλειο. Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και χρησιμεύουν στην προστασία αυτών από

εισβολείς. Συγκεκριμένα, τα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι, η σοκολάτα, το κρασί είναι σημαντικές πηγές των ενώσεων αυτών. (Tsao, 2010)

Ως πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται, χημικά, οι ενώσεις με φαινολικά δομικά χαρακτηριστικά, όμως υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες πολυφαινολών με διαφορετικές ιδιότητες. Η ποικιλομορφία των πολυφαινολών, καθώς και η ευρεία κατανομή τους στα φυτά οδήγησαν σε ποικίλους τρόπους ταξινόμησης αυτών των φυσικών ενώσεων. Ειδικότερα, κατηγοριοποιούνται με βάση την πηγή προέλευσής τους, το βιολογικό τους ρόλο και τη χημική τους δομή. Σε αυτό το σημείο τονίζεται πως η πλειονότητα των πολυφαινολών απαντάται, στα φυτά, υπό τη μορφή γλυκοζιτών με διαφορετικές ομάδες σακχάρου, καθώς και με ακυλιωμένα σάκχαρα σε διαφορετικά σημεία του πολυφαινολικού σκελετού. Προς απλοποίηση της κατανόησης, η ταξινόμηση των πολυφαινολών, παρακάτω, γίνεται σύμφωνα με τη χημική δομή του άγλυκου τμήματος. (Tsao, 2010)

#### **1.4.1. Φαινολικά οξέα**

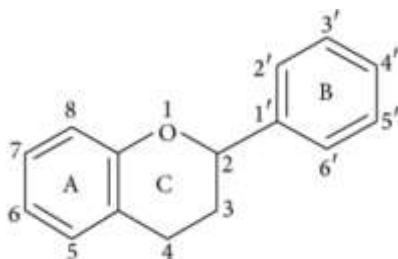
Αποτελούν πολυφαινολικές ενώσεις που δύνανται να υποδιαιρεθούν, περαιτέρω, σε δύο κύριες ομάδες: τα παράγωγα βενζοϊκού και τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος, με σκελετούς C1-C6 και C3-C6, αντίστοιχα. (Tsao, 2010) Τα πλέον άφθονα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος είναι το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το βανιλικό, το συριγγικό και το γαλλικό οξύ, ενώ στα πιο κοινά παράγωγα του κινναμωμικού οξέος περιλαμβάνονται το p-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το συναπικό οξύ. Τα παράγωγα διαφέρουν ως προς το βαθμό υδροξυλίωσης και μεθοξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου. (Vincente et al., 2014) Αντιπροσωπευτικές δομές φαινολικών οξέων παρουσιάζονται παρακάτω:



**Εικόνα 6:** Αντιπρωσπευτικές δομές φαινολικών οξέων

#### 1.4.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από το γενικό δομικό σκελετό C6-C3-C6, στον οποίο οι δύο μονάδες C6 (Δακτύλιος A και Δακτύλιος B) είναι φαινολικής φύσεως. Λόγω του προτύπου υδροξυλίωσης και των διακυμάνσεων στο Δακτύλιο C, τα φλαβονοειδή δύνανται να υποδιαιρεθούν, περαιτέρω, σε διαφορετικές υποομάδες, όπως ανθοκυανίνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβόνες, φλαβανόνες και φλαβονόλες. (Tsao, 2010)

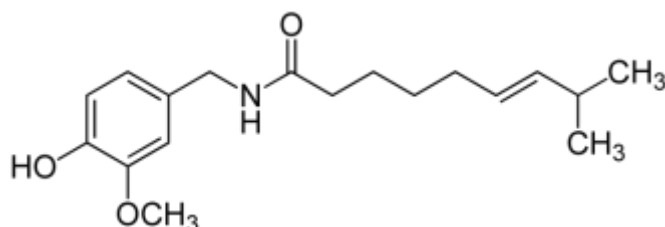


**Εικόνα 7:** Βασική δομή φλαβονοειδούς



### 1.4.3. Πολυφαινολικά αμίδια

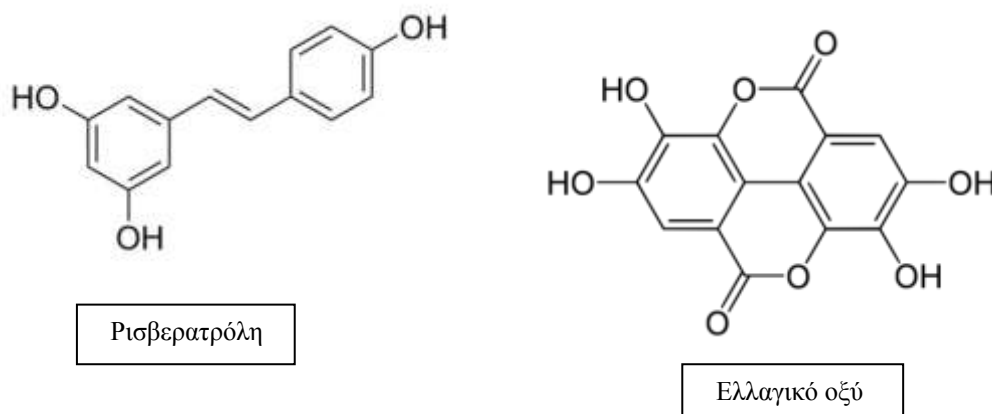
Πρόκειται για τις πολυφαινόλες με λειτουργικούς υποκαταστάτες που περιέχουν N. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα καψακινονοειδή, όπως η καψαϊκίνη, που περιέχεται στις πιπεριές τσίλι και διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. (Tsao, 2010)



Εικόνα 8: Χημική δομή καψαϊκίνης

### 1.4.4. Άλλες πολυφαινόλες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ρεσβερατρόλη, που περιέχεται στα σταφύλια και το κόκκινο κρασί, το ελλαγικό οξύ και τα παράγωγά του, που βρίσκονται σε καρπούς φρούτων και οι λιγνάνες, που απαντώνται στο σουσάμι. (Tsao, 2010)



Εικόνα 9: Δομές πολυφαινολών

### 1.4.5. Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολών

Έχει αποδειχθεί ότι πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία, καθώς, λόγω του αντιοξειδωτικού δυναμικού τους, μειώνουν τον κίνδυνο πολλών χρόνιων παθήσεων, όπως ο καρκίνος,

οι καρδιαγγειακές νόσοι, η χρόνια φλεγμονή και πολλές εκφυλιστικές ασθένειες, οι οποίες σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Milner, 1994) (Duthie and Brown, 1994)

Συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες, ως ισχυρά αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, προσφέροντας, σε αυτές, ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Το εξαιρετικά συζευγμένο σύστημα και ορισμένα πρότυπα υδροξυλίωσης, όπως η 3-υδροξυ ομάδα των φλαβονολών, συνεισφέρουν, σημαντικά, στο αντιοξειδωτικό προφίλ τους. Κατά κύριο λόγο, οι πολυφαινόλες δρουν ως «άμεσοι συλλέκτες» των ριζών που προκύπτουν από την αλυσίδα των αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συγκεκριμένα, προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα, εξουδετερώνοντάς την, και οι ίδιες καθίστανται σχετικά σταθερές (λιγότερο δραστικές) ρίζες, τερματίζοντας, έτσι, τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. (Rice-Evans et al., 1996) (Pietta, 2000) (Guo, 2009)

Βέβαια, αξίζει να τονιστεί ότι, από άποψη χημείας, τα μόρια των πολυφαινόλων, αφού καταστούν τα ίδια ελεύθερες ρίζες, μετά την προσφορά ενός ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου, εφόσον, βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση, μπορούν, δυνητικά, να ασκήσουν προ-οξειδωτικό φαινόμενο. Ωστόσο, το κατά πόσο μια τέτοια προ-οξειδωτική δράση θα εμφανιστεί *in vivo* και θα προκαλέσει βλάβη στον άνθρωπο, αποτελεί ερώτημα, η απάντηση του οποίου απαιτεί περαιτέρω έρευνα. (Tsao, 2010)

Εκτός από εξουδετερωτές ελευθέρων ριζών, οι πολυφαινόλες δρουν, επίσης, ως χηλικοί παράγοντες μετάλλων. Η χηλική δέσμευση μεταβατικών μετάλλων, όπως ο  $Fe^{2+}$ , δύναται να μειώσει, άμεσα, το ρυθμό της αντίδρασης Fenton, εμποδίζοντας, έτσι, τις οξειδωτικές επιπτώσεις που προκαλούνται από τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (Pietta, 2000) (Guo, 2009) (Perron and Brumaghim, 2009) Ακόμη, οι πολυφαινόλες δύνανται να λειτουργήσουν και ως συν-αντιοξειδωτικά, εμπλεκόμενες στην αναγέννηση των βασικών βιταμινών που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (Zhou et al., 2005)

Παραπάνω, αναφέρθηκαν οι συνηθισμένοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων. Εκτός από αυτούς, άλλοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων αυτών, όπως η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης και η αύξηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών, θεωρούνται επίσης, σημαντικοί. (Disilvestro, 2001) Οι πολυφαινόλες μπορούν να επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση, που αποσυνθέτουν τα υδροϋπεροξειδία, το υπεροξείδιο του υδρογόνου

και τα ανιόντα υπεροξειδίου, αντίστοιχα, και, ακόμη, αναστέλλουν την έκφραση ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης. (Du et al., 2007)

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να τονιστεί πως ενώ οι άμεσες και έμμεσες αντιοξειδωτικές δράσεις των πολυφαινόλων, πιθανώς, να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του οξειδωτικού στρες μέσω των προαναφερθέντων μηχανισμών, ο πραγματικός ρόλος αυτών των ενώσεων, σε κυτταρικό επίπεδο, μπορεί να είναι πιο πολύπλοκος. Υπάρχει η άποψη ότι τα φυτοχημικά, και ιδιαίτερα οι πολυφαινόλες και οι *in vivo* μεταβολίτες τους, δε δρουν ως συμβατικά αντιοξειδωτικά που προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, αλλά μπορούν να ασκήσουν ρυθμιστικές δράσεις στα κύτταρα, μέσω της επιρροής τους σε σηματοδοτικά μονοπάτια πρωτεϊνικών και λιπιδικών κινασών. (Williams et al., 2004) Πιο συγκεκριμένα, παρά τη δυνατότητα των πολυφαινόλων να απορροφώνται από το γαστρεντερικό σωλήνα, εν μέρει λόγω του ταχέως μεταβολισμού τους από τους ιστούς του ανθρώπου, οι συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα είναι χαμηλές (μικρότερες από 1μmol/L), δηλαδή είναι ανεπαρκείς για την άσκηση οποιασδήποτε σημαντικής και άμεσης αντιοξειδωτικής δράσης. (Halliwell, 2008) (Manach and Donovan, 2004) (Williamson et al., 2005) (Rechner et al., 2002) Έτσι, ορισμένοι ερευνητές θεωρούν πως είναι αδύνατο οι πολυφαινόλες να δρουν ως αντιοξειδωτικά *in vivo*. Επομένως, πρέπει να δοθεί βαρύτητα στις δράσεις τους πέρα από τις συνήθεις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. (Halliwell, 2008) (Williams et al., 2004) Ο Williams και οι συνεργάτες του προτείνουν ότι η σαφής κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φλαβονοειδών, είτε ως αντιοξειδωτικών, είτε ως διαμορφωτικών μορίων της κυτταρικής σηματοδότησης, είναι καθοριστικής σημασίας για την αξιολόγηση αυτών των ισχυρών βιομορίων ως αντικαρκινικών και καρδιοπροστατευτικών παραγόντων και αναστολέων του εκφυλισμού των νευρικών κυττάρων. (Williams et al., 2004) Η μελλοντική έρευνα σχετικά με τις πολυφαινόλες κατευθύνεται, αναμφισβήτητα, προς αυτή την κατεύθυνση.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* σε ηπατικά κύτταρα HepG2, με χρήση δεικτών οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, φωτομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της προστατευτικής δράσης του εκχυλίσματος σε πρωτεΐνες και λιπίδια από καρβονυλίωση και υπεροξείδωση, αντίστοιχα, καθώς και για τη διαπίστωση της επιρροής του εκχυλίσματος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ηπατικών κυττάρων. Τέλος, με τη βοήθεια κυτταρομέτρου, ανιχνεύτηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στα επίπεδα ROS και γλουταθειόνης.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Αντιδραστήρια**

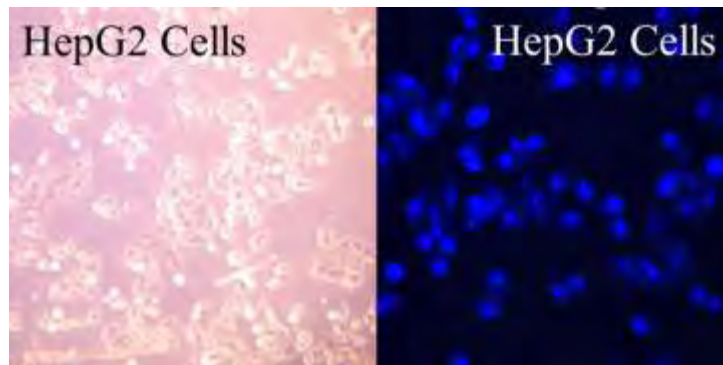
Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: PBS (phosphate buffer), θρεπτικό υλικό Medium Gibco 41966, τρυψίνη, FBS (Fetal Bovine Serum), γλουταμίνη, αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, δύο αντιδραστήρια XTT, αντιδραστήριο Bradford, Tris-HCl 200mM (Ph 7,4), διάλυμα NaSO<sub>4</sub> (2M)-TBA (55mM), TCA 35%, TCA 70%, διάλυμα DPPH 0,1 mM, διάλυμα HCl 2,5N, διάλυμα DNPH 10mM, ουρία (pH 2,3), χρωστική mercury orange, χρωστική DCFDA.

### **2.2 Εκχύλισμα**

Χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα του φυτού *Conium divaricatum*, και, συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με τον κωδικό Exd93. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ύδατος, ως διαλύτη. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### **2.3. Ηπατικά κύτταρα HepG2**

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2. Πρόκειται για μια αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά, αποτελούμενη από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν, επιτυχώς, σε μεγάλη κλίμακα και να εκκρίνουν πολλές πρωτεΐνες πλάσματος, όπως τρανσφερίνη, ινωδογόνο, πλασμιγόνο και αλβουμίνη. Τα HepG2 αποτελούν προσκολλητικά επιθηλιακά κύτταρα που αναπτύσσονται ως μονοστοιβάδες, αλλά έχουν και μεγάλη τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων, παρέχοντας χαρακτηριστική εικόνα στο μικροσκόπιο.



**Εικόνα 10:** Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2

#### **2.4. Καλλιέργεια των ηπατικών κυττάρων HepG2**

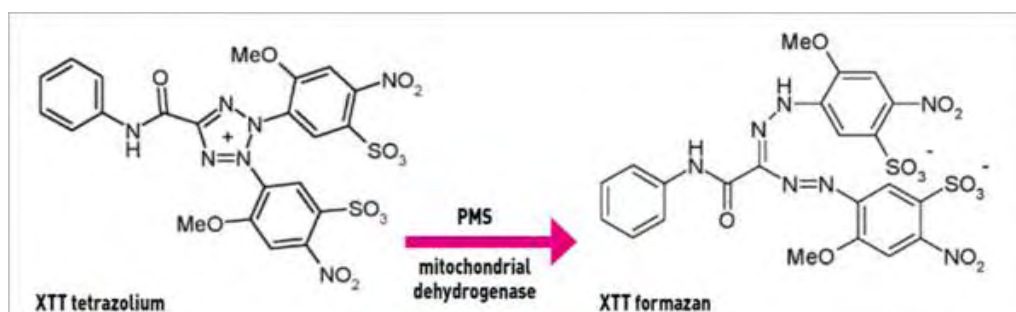
Τα κύτταρα HepG2 καλλιεργούνταν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> και 25 cm<sup>2</sup> καλλιέργειας κυττάρων, με χρήση του θρεπτικού υλικού Medium Gibco 41966 (1gr/lit D-gluc, L-glut, 25mM HEPES, pyruvate), το οποίο είχε εμπλουτιστεί με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, και τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης, με θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και παροχή 5% CO<sub>2</sub>. Στις ανωτέρω συνθήκες, τα κύτταρα αναπτύσσονταν μέχρι να καλύψουν το 80% περίπου τις επιφάνειες της φλάσκας, και, ακολούθως, πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια αυτών, μέσω αποκόλλησης τους, με τη βοήθεια τρυψίνης (0,25%). Όταν χρησιμοποιούνταν φλάσκες 75 cm<sup>2</sup>, η αποκόλληση γινόταν με την προσθήκη 1 ml τρυψίνης, ενώ όταν χρησιμοποιούνταν φλάσκες 25 cm<sup>2</sup>, προσθήκη τρυψίνης σε ποσότητα 0,5 ml ήταν αρκετή για να επιτευχθεί αποκόλληση. Και στα δύο είδη φλάσκας, τα κύτταρα επώάζονταν με τρυψίνη για 5 min στον κλίβανο (37<sup>0</sup>C) και, στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν επαναϊώρηση αυτών σε 4ml θρεπτικού υλικού, στην περίπτωση της φλάσκας 75 cm<sup>2</sup>, και σε 2ml θρεπτικού υλικού, στην περίπτωση της φλάσκας 25 cm<sup>2</sup>, ώστε να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη και, έτσι, να αποφευχθεί η θανάτωση των κυττάρων. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας πραγματοποιούνταν μέσα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αέρα (Laminar air flow) και ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν υπό άσηπτες συνθήκες.

## 2.5. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος *Conium divaricatum*

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος *Conium divaricatum* στην κυτταρική σειρά HepG2, έγινε χρήση του kit XTT assay που παρέχεται από την εταιρεία Roche.

### Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμή είναι χρωματομετρική και αποσκοπεί στην ποσοτικοποίηση, με μη ραδιενεργό τρόπο, της μεταβολικής δραστηριότητας των ζωντανών κυττάρων. Ειδικότερα, η δοκιμή βασίζεται στη δυνατότητα του κίτρινου τετραμμωνιακού άλατος (XTT) να υφίσταται μεταβολισμό από τις δευδρογονάσες που απαντώνται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, οδηγώντας, έτσι, στο σχηματισμό της φορμαζάνης ως μεταβολίτη. Οι δευδρογονάσες αποτελούν ένζυμα που αδρανοποιούνται μόλις θανατωθούν τα κύτταρα, με αποτέλεσμα η ανωτέρω μεταβολική μετατροπή να λαμβάνει χώρα αποκλειστικά σε ζώντα κύτταρα, και ως εκ τούτου, η φορμαζάνη να παράγεται κατ' αναλογία του πλήθους των ζωντανών κυττάρων του δείγματος. Ο μεταβολίτης φορμαζάνη αποτελεί μια υδατοδιαλυτή ουσία έντονου πορτοκαλί χρώματος, και, συνεπώς, παρουσιάζει απορρόφηση στα 450-500nm, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησής της, με τη χρήση φωτομέτρου. Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων του δείγματος, τόσο χαμηλότερη είναι και η απορρόφηση, αφού ο μεταβολισμός του άλατος XTT θα είναι ελαττωμένος. Με τον τρόπο αυτό, είναι εφικτός ο προσδιορισμός της επίδρασης του φυτικού εκχυλίσματος *Conium divaricatum* στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και στη βιωσιμότητά τους, στις μελετώμενες συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 11:** Μετατροπή τετραμμωνιακού άλατος σε φορμαζάνη

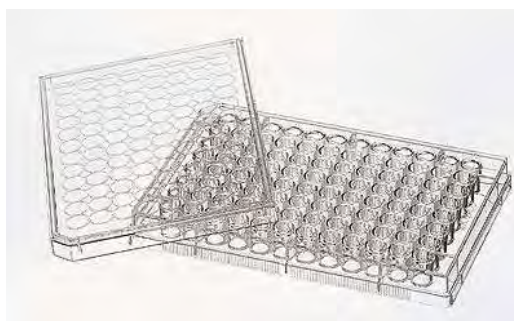
### Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη βοήθεια τρυψίνης 0,25% και επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% FBS. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer, ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός τους ανά ml.



**Εικόνα 12:** Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer

Εν συνεχεία, συγκεκριμένη ποσότητα της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε κάθε θέση ενός 96-well plate, ώστε σε καθεμία από αυτές τις θέσεις να τοποθετούνταν και να επιστρώνονταν  $10^4$  κύτταρα. Ακόμη, σε κάθε θέση του plate προστέθηκε ποσότητα θρεπτικού υλικού με 10% FBS ώστε σε καθεμία από αυτές, ο τελικός όγκος να είναι περίπου 100μl. Αμέσως μετά, το plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο ώστε τα κύτταρα να επωαστούν για μια ημέρα (24hr) στους  $37^{\circ}\text{C}$  και με παροχή 5%  $\text{CO}_2$ , προκειμένου να επιτευχθεί προσκόλληση.



**Εικόνα 13:** 96-well plate

Μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος της επώασης, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από κάθε θέση του plate, και στα προσκολλημένα,



στο plate, κύτταρα πραγματοποιήθηκε προσθήκη του εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS (προς αποφυγή αλληλεπίδρασης του FBS με τα βιοδραστικά συστατικά του εκχυλίσματος). Ο συνολικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι ήταν 100μl. Στις θέσεις που αποτελούν τα control, συντελέστηκε προσθήκη μόνο θρεπτικού χωρίς FBS, και εκχύλισμα δεν τοποθετήθηκε. Τρεις θέσεις του plate αφιερώθηκαν σε κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος, ενώ για καθεμία από τις συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε και ένα πηγαδάκι που δεν περιείχε κύτταρα, αλλά μόνο εκχύλισμα και θρεπτικό χωρίς FBS. Το πηγαδάκι αυτό αντιπροσώπευε το λεγόμενο τυφλό. Αντίστοιχο πηγαδάκι υπήρχε και για κάθε control, και περιείχε μόνο θρεπτικό χωρίς FBS. Τα τυφλά χρησίμευσαν στον προσδιορισμό των απορροφήσεων του θρεπτικού χωρίς FBS, καθώς και του εκχυλίσματος. Ακολούθως, το plate επώαστηκε για 24hr σε θερμοκρασία 37°C και με παροχή 5% CO<sub>2</sub>.

Μετά την ολοκλήρωση της περιόδου επώασης, ακολούθησε προσθήκη 50μl του μείγματος XTT σε κάθε πηγαδάκι (και στα πηγαδάκια των control και στα πηγαδάκια των τυφλών) και πραγματοποιήθηκε επώαση για χρονικό διάστημα 4 ωρών. Η παρασκευή του μείγματος XTT έγινε λίγο πριν τη χρήση του, μέσω ανάμιξης δύο αντιδραστηρίων, του XTT A και του XTT B (PMS), με αναλογία 50:1. Μετά την παρέλευση της τετράωρης επώασης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm, όπως επίσης και στα 630nm, με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου ELISA plate reader (Biotek) και τη χρησιμοποίηση του προγράμματος Gen5 (Biotek). Η % αναστολή που καταφέρνει το εκχύλισμα στην ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς HepG2, υπολογίστηκε ως εξής:

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

## **2.6. Φωτομετρικοί δείκτες**

### **2.6.1. Προσθήκη ουσίας, αποκόλληση και επαναιώρηση κυττάρων**

Με τη βοήθεια της μεθόδου XTT, επιλέχθηκαν τέσσερις (4) μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος κωνείου οι οποίες εξετάστηκαν για το αντιοξειδωτικό δυναμικό τους στην κυτταρική σειρά HepG2. Για την παρασκευή αυτών των συγκεντρώσεων, το εκχύλισμα διαλύθηκε σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) φλάσκες 75 cm<sup>2</sup>, σε καθεμία από τις οποίες προστέθηκε και η αντίστοιχη συγκέντρωση εκχυλίσματος, ενώ ο τελικός όγκος του

περιεχομένου της εκάστοτε φλάσκας ήταν 10ml. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε και μια πέμπτη φλάσκα που δεν περιείχε εκχύλισμα, αλλά μόνο 10ml θρεπτικού χωρίς FBS και αντιπροσώπευε το control. Και οι πέντε (5) φλάσκες περιείχαν κύτταρα που κάλυπταν το 60%-70%, περίπου, της επιφάνειάς τους. Τα κύτταρα παρέμειναν, στον κλίβανο, για 24hr για να επωαστούν με το εκχύλισμα. Μετά την παρέλευση του ανωτέρω χρονικού διαστήματος, πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων με τη βοήθεια 1ml τρυψίνης, στη συνέχεια, επαναιώρηση αυτών σε 4ml θρεπτικού, φυγοκέντρηση (10min) προς απομάκρυνση του θρεπτικού, και μετά, πλύση των κυττάρων με 4ml PBS, με επακόλουθη φυγοκέντρηση (10min) προς απομάκρυνση του PBS. Το προκύπτον, από κάθε φλάσκα, κυτταρικό ίζημα (pellet) επαναιωρήθηκε σε 1ml PBS, ύστερα, σε αυτό προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών και, στη συνέχεια, υπέστη τη δράση υπερήχων προς λύση των κυττάρων. Οι υπέρηχοι πραγματοποιήθηκαν σε τρεις (3) κύκλους. Ο ένας κύκλος ήταν ο εξής: 10sec υπέρηχοι, 5sec εκτός υπερήχων για τρεις (3) φορές.

### ***2.6.2. Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford***

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η ολική ποσότητα πρωτεϊνών του κάθε δείγματος προσδιορίζεται κατασκευάζοντας καμπύλη αναφοράς της πρωτεΐνης αλβουμίνης, κάνοντας χρήση ενός φωτοευαίσθητου αντιδραστηρίου που καλείται Bradford, το οποίο προτιμάται συχνά για την ποσοτική εύρεση πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Η δοκιμή στηρίζεται στην αντίδραση της Coomassie Brilliant Blue G-250, δηλαδή μιας χρωστικής του αντιδραστηρίου Bradford, με αμινοξέα πρωτεϊνών. Προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι μια χρωμογόνο ένωση μπλε χρώματος που παρουσιάζει οπτική απορρόφηση στα 595 nm και η οποία ανιχνεύεται φωτομετρικά. Έτσι, η απορρόφηση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης του εκάστοτε δείγματος.

#### *Πειραματική διαδικασία*

Σε ποσότητα 20μl κάθε δείγματος, προστέθηκε 1ml Bradford, ενώ σε κάθε τυφλό, αντί για δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 20μl PBS ως buffer ομογενοποίησης. Ακολούθησαν vortex, επώαση σε σκοτάδι (15min) και, τέλος, μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm.

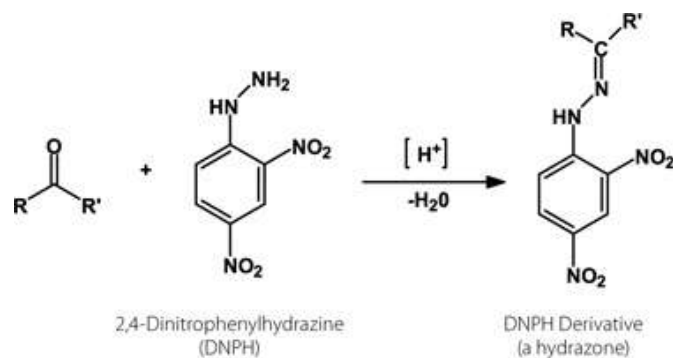
### 2.6.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs)

#### Αρχή της μεθόδου

Πρωτεΐνες και αμινοξέα αποτελούν συχνούς και εύκολους στόχους των ελευθέρων ριζών. Οι ομάδες καρβονυλίου σχηματίζονται, συνηθέστερα, σε κατάλοιπα αργινίνης, θρεονίνης, προλίνης και λυσίνης. Τα προκύπτοντα καρβονύλια των πρωτεϊνών συνιστούν έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη της οξειδωτικής διαδικασίας που υφίστανται αυτές, που παρέχει μεγάλη αξιοπιστία καθώς οι καρβονυλικές ομάδες είναι αρκετά σταθερές.

Η καρβονυλίωση προκαλεί βλάβες που δεν αναστρέφονται, με αποτέλεσμα την έκπτωση σε πολλές πρωτεϊνικές λειτουργίες ή και την πλήρη απώλεια της δράσης τους. Μάλιστα, η διαδικασία αυτή, εκτός από τις πρωτεΐνες, επιδρά, έμμεσα, και τη δραστηριότητα άλλων βιομορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η καρβονυλίωση ενζύμων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, όπως και η καρβονυλίωση των DNA-πολυμερασών, αφού δυσχεραίνουν τόσο την επισκευή του γενετικού υλικού, όσο και την αντιγραφή του με την επιθυμητή πιστότητα. Αξίζει να σημειωθεί πως οι πρωτεΐνες που υφίστανται μικρού βαθμού καρβονυλίωση, μπορούν να διασπαστούν με τη δράση του πρωτεοσώματος, αλλά εκείνες στις οποίες προκαλούνται εκτεταμένες βλάβες δεν αποσυντίθενται, αλλά συγκροτούν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους.

Η δημιουργία καρβονυλίων ταυτοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) που οδηγεί στη σύνθεση του DNP-hydrazone (2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου).



**Εικόνα 14:** Αντίδραση πρωτεΐνης με DNPH προς σύνθεση DNP-hydrazone

### Πειραματική διαδικασία

Σε φιαλίδια erpendorf, τοποθετήθηκαν X μl αιωρήματος κυττάρων (όπου X η ποσότητα του αιωρήματος που χρειάζεται ώστε να ενυπάρχει ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 30μg, βάσει τη δοκιμής Bradford, για κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση), ύστερα, προστέθηκαν (400-X)μl PBS και ακολούθησε ανάδευση vortex. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν, ενώ για κάθε δείγμα υπάρχουν 2 τυφλά. Στη συνέχεια, στα erpendorf των δειγμάτων προστέθηκε 0,5ml από το αντιδραστήριο DNPΗ 1mM (το οποίο είχε διαλυθεί σε 2,5N HCl), ενώ σε εκείνα των τυφλών προστέθηκε 0,5ml 2,5N HCl. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση και, μετά, επώαση, σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου, για χρονικό διάστημα 1 ώρας. Στη συνέχεια, συντελέστηκε φυγοκέντρηση διάρκειας 5min στα 15000g, σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C. Έγινε απομάκρυνση του υπερκείμενου και, ύστερα, προστέθηκαν 100μl από το 100% TCA, πραγματοποιήθηκε ανάδευση, και δεύτερη φυγοκέντρηση, στις ίδιες συνθήκες. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, έγινε προσθήκη 1ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (αναλογίας 1:1 v/v). Ακολούθησε vortex και, ύστερα, τρίτη φυγοκέντρηση, στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε, άλλη μία φορά, η προσθήκη του μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα, η ανάδευση vortex και η φυγοκέντρηση. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, προστέθηκε 1ml ουρίας 5M, με pH 2,3, και πραγματοποιήθηκε ανάδευση και, μετά, επώαση διάρκειας 15min, σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C. Σκοπό της προσθήκης ουρίας αποτελεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών, που επιτυγχάνεται μέσω ρήξης των ομοιοπολικών δεσμών και οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητάς τους. Η διαδικασία συνεχίστηκε με φυγοκέντρηση διάρκειας 3min στα 15000g και σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C. Τέλος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 370nm.

### Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των καρβονυλίων των πρωτεϊνών εκφράστηκε αναφορικά με την ποσότητα πρωτεΐνης, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Πρωτεϊνικά Καρβονύλια (nmol/mg πρωτεΐνης)} = [(Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}) / 0,022 * (1000/X)] / C_{\delta}$$

Abs<sub>δείγματος</sub> : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος

Abs<sub>τυφλού</sub> : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε τυφλού

0,022 : ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ σε nmol/ml

X : η ποσότητα του αιωρήματος που χρειάζεται ώστε να ενυπάρχει, στο erpendorf, ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 30μg

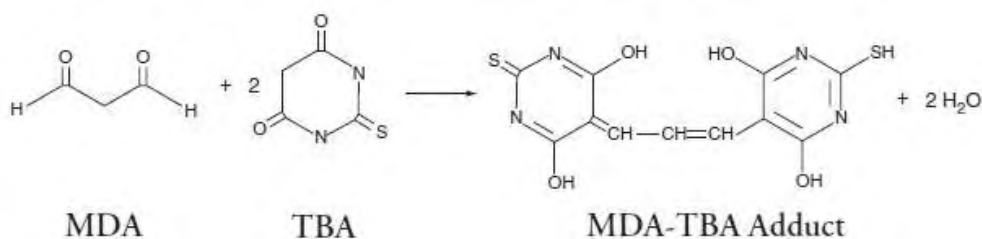
(1000/X) : ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (1000μl στην κυψελίδα / Χμl δείγματος)

C<sub>δ</sub> : η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford σε mg/ml

#### 2.6.4. Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

##### Αρχή της μεθόδου

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών είναι τα λιπίδια. Έτσι, η αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, καταλήγει στην παραγωγή υπεροξειδίων των λιπιδίων, τα οποία, λόγω μειωμένης σταθερότητας, είναι εξαιρετικά δραστικά, με αποτέλεσμα να διασπώνται οδηγώντας στη σύνθεση μαλονδιαλδεύδης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτής της ένωσης επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Τα TBARS, λοιπόν, θεωρούνται ισοδύναμα μαλονδιαλδεύδης, καθώς η ένωση που προκύπτει από την αντίδραση, χαρακτηρίζεται από αναλογία μαλονδιαλδεύδης : θειοβαρβιτουρικού οξέος 1:2. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μαλονδιαλδεύδης πραγματοποιείται φωτομετρικά και αποσκοπεί στην ταυτοποίηση της έκτασης στην οποία συντελείται η υπεροξειδωση των λιπιδίων.



**Εικόνα 15:** Αντίδραση μαλονδιαλδεύδης με θειοβαρβιτουρικό οξύ

##### Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15ml), προστέθηκαν X μl αιωρήματος κυττάρων (όπου X η ποσότητα του αιωρήματος που είναι απαραίτητη για να ενυπάρχει ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 30μg, βάσει της δοκιμής Bradford, για κάθε μελετώμενη συγκέντρωση). Η εξέταση κάθε δείγματος έγινε εις τριπλούν. Δύο άλλα falcon, που χρησίμευαν ως τυφλά, περιείχαν μόνο PBS σε

ποσότητα ίση περίπου με τον μέσο όρο της ποσότητας αιωρήματος που προστέθηκε στα falcon των δειγμάτων. Στη συνέχεια, σε κάθε falcon (δείγματος και τυφλού), προστέθηκαν 500μl Tris-HCl και 500μl 35% TCA. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση και, μετά, επώαση διάρκειας 15min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml διαλύματος Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-TBA και έγινε επώαση διάρκειας 45min στους 95<sup>0</sup>C σε υδατόλουτρο. Ακολούθησε μεταφορά των falcon στον πάγο όπου παρέμειναν για 5min, ώστε να πέσει η θερμοκρασία τους. Μετά, προστέθηκε 1ml TCA 70% και έγινε ανάδευση. Ύστερα, μεταφέρθηκε 1ml από κάθε falcon σε φιαλίδια erpendorf, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στα 11200g (10000 rpm) σε θερμοκρασία 25<sup>0</sup>C για χρονικό διάστημα 3min. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 539nm, κάνοντας χρήση γυάλινης κυψελίδας.

#### Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS εκφράστηκε σε σχέση με την ποσότητα της πρωτεΐνης, με τη βοήθεια του τύπου:

$$\text{TBARS (nmol/mg πρωτεΐνης)} = [(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0,156 * (3000 / X)] / C_{\delta}$$

Abs<sub>δείγματος</sub> : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος

Abs<sub>τυφλού</sub> : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε τυφλού

0,156 : ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεύδης MDA σε μM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

X : η ποσότητα του αιωρήματος που χρειάζεται ώστε να ενυπάρχει, στο erpendorf, ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 30μg

(3000/X) : ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (3000μl στην κυψελίδα / Xμl δείγματος)

C<sub>δ</sub> : η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος σύμφωνα με τη μέθοδο Bradord σε mg/ml

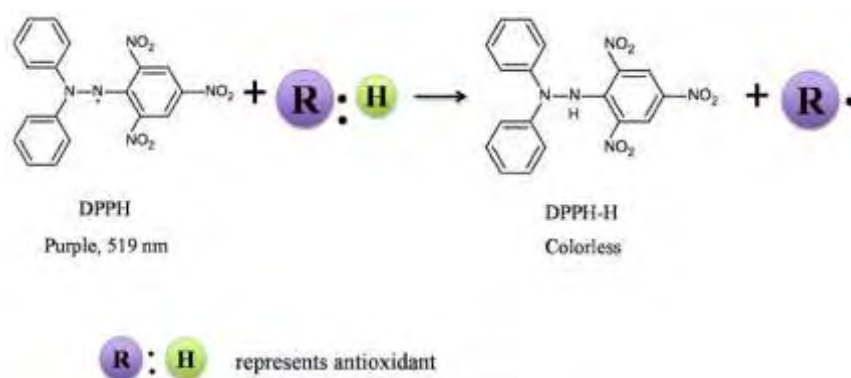
#### **2.6.5. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)**

##### Αρχή της μεθόδου

Η συνολική αντιοξειδωτική ισχύς (TAC) αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα που έχουν τα συστατικά που περιέχονται στο πλάσμα αίματος και ιστών, να αδρανοποιούν τις κυκλοφορούσες ρίζες. Καθένα από τα συστατικά διαθέτει αντιοξειδωτική ισχύ, αλλά ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχει στη συνολική

αντιοξειδωτική δύναμη που παρουσιάζει το πλάσμα, είναι μοναδικός. Μάλιστα, η αντιοξειδωτική δυνατότητα του πλάσματος είναι ενδεικτική της ικανότητας του οργανισμού, ως συνόλου, να αντιμετωπίζει τους οξειδωτικούς παράγοντες.

Η TAC μπορεί να υπολογιστεί με διάφορες μεθόδους. Στην παρούσα εργασία, υπολογίζεται με τη βοήθεια της ρίζας DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Αν υπάρχει, στον ορό, ένας δότης υδρογόνων, η ρίζα αυτή, ανάγεται, οδηγώντας στην παραγωγή μιας υδραζίνης, συγκεκριμένα της 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine. Αυτός ο μετασχηματισμός της ρίζας προσδιορίζεται φωτομετρικά. Η μέτρηση πραγματοποιείται στα 520nm, καθώς η DPPH<sup>•</sup> είναι ιώδους χρώματος που απορροφά σ' αυτό το μήκος κύματος.



**Εικόνα 16:** Μετατροπή της ρίζας DPPH<sup>•</sup> σε υδραζίνη, παρουσία δότη υδρογόνων

### Πειραματική διαδικασία

Σε φιαλίδια erpendorf, προστέθηκαν X μl αιωρήματος κυττάρων (όπου X η ποσότητα του αιωρήματος που είναι απαραίτητη για να ενυπάρχει ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 30μg, βάσει της δοκιμής Bradford, για κάθε μελετώμενη συγκέντρωση). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν. Στα erpendorf των δειγμάτων προστέθηκαν, ακολούθως, (500-X) μl Phosphate buffer (10mM, pH 7,4), καθώς και 500μl DPPH<sup>•</sup>. Σε δύο άλλα erpendorf, που αντιπροσώπευαν τα τυφλά, προστέθηκαν, κατά σειρά, 500μl Phosphate buffer (10mM, pH 7,4) και 500μl DPPH<sup>•</sup>. Ακολούθησε ανάδευση vortex και, στη συνέχεια, επώαση σε σκοτεινό μέρος, για χρονικό διάστημα 60min. Μέσα στο χρονικό διάστημα αυτό, τα αντιοξειδωτικά που ενυπήρχαν στο φυτικό εκχύλισμα, αδρανοποίησαν τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>, οδηγώντας στο μετασχηματισμό της σε σταθερή υδραζίνη. Ύστερα, εκτελέστηκε φυγοκέντρηση διάρκειας 3min στα 20000g και σε θερμοκρασία 25<sup>0</sup>C, προκειμένου να καθιζάνουν

σωματίδια ικανά για αύξηση απορρόφησης). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 520nm.

### Υπολογισμοί

Η TAC μπορεί να εκφραστεί με τους ακόλουθους τρόπους:

- (i) % μείωση της απορρόφησης των δειγμάτων σε σχέση με την απορρόφηση του τυφλού, δηλαδή

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs}_{\text{τυφλού}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}}) / \text{Abs}_{\text{τυφλού}} * 100$$

$\text{Abs}_{\text{δείγματος}}$  : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε δείγματος

$\text{Abs}_{\text{τυφλού}}$  : ο μέσος όρος της οπτικής απορρόφησης κάθε τυφλού

- (ii)  $\text{mmol DPPH} \cdot \text{ που απομακρόνθηκαν} / \text{mg πρωτεΐνης} = [(\% \text{Abs}_{\text{μείωση}} / 100) * 50 * (1000/X) / 1000] / C_{\delta}$

- Διαίρεση με το 100 ώστε να επιτευχθεί μετατροπή της ποσοστιαίας μείωσης της απορρόφησης σε απλή μείωσή της
- Πολλαπλασιασμός με 50 επειδή η συγκέντρωση της ρίζας στην κυψελίδα είναι: 50μmol/l της κυψελίδας
- Πολλαπλασιασμός με (1000/X) γιατί αυτός είναι ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος (1000μl στην κυψελίδα / Xμl δείγματος)
- Διαίρεση με 1000 ώστε να μετατραπούν τα L του κυτταρικού αιωρήματος σε ml ορού
- Διαίρεση με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος ( $C_{\delta}$ ), όπως αυτή προκύπτει από τη δοκιμή Bradford σε mg/ml

## **2.7. Κυτταρομετρικοί προσδιορισμοί**

### **2.7.1. Προσθήκη ουσίας, αποκόλληση και επαναιώρηση κυττάρων**

Και στους προσδιορισμούς κυτταρομέτρου, εξετάστηκαν οι τέσσερις (4) συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που προέκυψαν από τη δοκιμή XTT. Για την παρασκευή αυτών των συγκεντρώσεων, το εκχύλισμα διαλύθηκε σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) φλάσκες 25 cm<sup>2</sup>, σε καθεμία από τις οποίες προστέθηκε και η αντίστοιχη συγκέντρωση εκχυλίσματος, ενώ ο τελικός όγκος του περιεχομένου της εκάστοτε φλάσκας ήταν 5ml. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε



και μια πέμπτη φιάσκα που δεν περιείχε εκχύλισμα, αλλά μόνο 5ml θρεπτικού χωρίς FBS και αντιπροσώπευε το control. Και οι πέντε (5) φιάσκες περιείχαν κύτταρα που κάλυπταν το 60%-70%, περίπου, της επιφάνειάς τους. Τα κύτταρα παρέμειναν, στον κλίβανο, για 24hr για να επωαστούν με το εκχύλισμα. Μετά την παρέλευση του ανωτέρω χρονικού διαστήματος, πραγματοποιήθηκε αποκόλληση των κυττάρων με τη βοήθεια 0,5ml τρυψίνης, στη συνέχεια, επαναιώρηση αυτών σε 2ml θρεπτικού, φυγοκέντρηση (10min) προς απομάκρυνση του θρεπτικού, και μετά, πλύση των κυττάρων με 2ml PBS, με επακόλουθη φυγοκέντρηση (10min) προς απομάκρυνση του PBS. Το προκύπτον, από κάθε φιάσκα, κυτταρικό ίζημα (pellet) επαναιωρήθηκε σε 300μl PBS.

### **2.7.2. Προετοιμασία δειγμάτων**

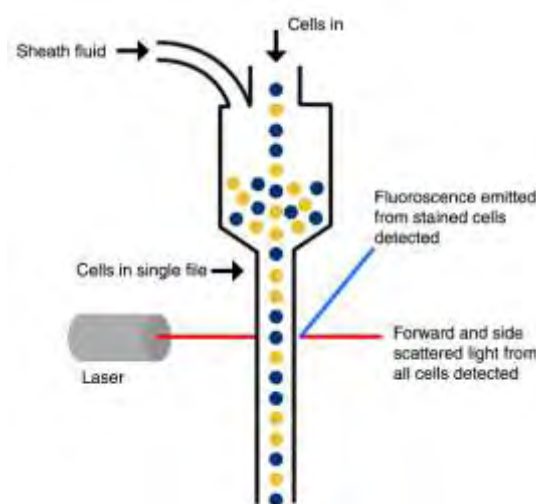
Τα κυτταρικά εναιωρήματα είχαν όγκο 300μl έκαστο. Έτσι, από κάθε εναιώρημα, τα 150μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης και τα υπόλοιπα 150μl για τον προσδιορισμό των επιπέδων ROS. Για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης, στα 150μl κυτταρικού εναιωρήματος, προστέθηκαν 15μl χρωστικής mercury orange, ενώ για τον προσδιορισμό ROS, στα υπόλοιπα 150μl κυτταρικού εναιωρήματος, προστέθηκαν 15μl χρωστικής 2,7-διχλωροφθοροσκεΐνη (DCF-DA). Ακολούθως, εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία για όλα τα δείγματα. Συγκεκριμένα: Πραγματοποιήθηκε επώαση διάρκειας 30min σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και με παροχή 5% CO<sub>2</sub>, στη συνέχεια, προσθήκη 250μl PBS, μετά, φυγοκέντρηση (400rcf, 5min, 5<sup>0</sup>C) με ακόλουθη απομάκρυνση υπερκειμένου και, τέλος, επαναιώρηση των κυττάρων σε 250μl PBS.

### **2.7.3. Κυτταρομετρία ροής**

#### Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτόματη τεχνική ανάλυσης που εφαρμόζεται για να μετρηθούν και να χαρακτηριστούν πολύ μικρά σωματίδια τα οποία ρέουν εντός υγρού. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να είναι πυρήνες, χρωμοσώματα, ολόκληρα κύτταρα κ.λ.π. Συγκεκριμένα, δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας διαπερνά μια υδροδυναμικά συγκλίνουσα ροή υγρού, ενώ γύρω από το σημείο διαπέρασης τοποθετούνται διάφοροι ανιχνευτές. Υπάρχει ανιχνευτής που ευθυγραμμίζεται με τη δέσμη ακτινοβολίας, άλλοι που βρίσκονται σε κάθετη θέση ως

προς αυτήν, καθώς και άλλοι ανιχνευτές που ανήκουν στην κατηγορία των ανιχνευτών φθορισμού. Καθένα από τα σωματίδια διαστάσεων 0,2μm έως 150μm, που αιωρείται εντός του υγρού, και συναντά τη δέσμη ακτινοβολίας, πραγματοποιεί σκεδασμό του φωτός προς μια κατεύθυνση. Ταυτόχρονα, χημικά που φθορίζουν και εντοπίζονται στο σωματίδιο ή στην επιφάνειά του, δύνανται να διεγερθούν, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός μήκους κύματος διαφορετικού από εκείνο της πηγής. Αυτά τα δύο είδη ακτινοβολίας που προκύπτουν από την πρόσκρουση της δέσμης φωτός στα σωματίδια, συνδυάζονται και λαμβάνονται από τους υπάρχοντες ανιχνευτές. Ακολουθούν αναλύσεις που δίνουν πληροφορίες χημικής και φυσικής φύσεως για κάθε σωματίδιο ξεχωριστά. Υπάρχουν 2 είδη σκέδασης: η εμπρόσθια “FSC”, η οποία παρέχει στοιχεία σχετικά με τον όγκο του κυττάρου, καθώς και η πλάγια “SSC” που πληροφορεί για την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει, εσωτερικά, το σωματίδιο.



**Εικόνα 17:** Κυτταρομετρία ροής

### Πειραματική διαδικασία

Τα κυτταρικά αιωρήματα των δειγμάτων μετρήθηκαν, το ένα μετά το άλλο, στο κυτταρόμετρο ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), καθώς και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) των κυττάρων σε κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση εκχυλίσματος. Πριν τη μέτρηση, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται σε μορφή αιωρήματος και να μην καθιζάνουν.

## 2.8. Στατιστική Ανάλυση

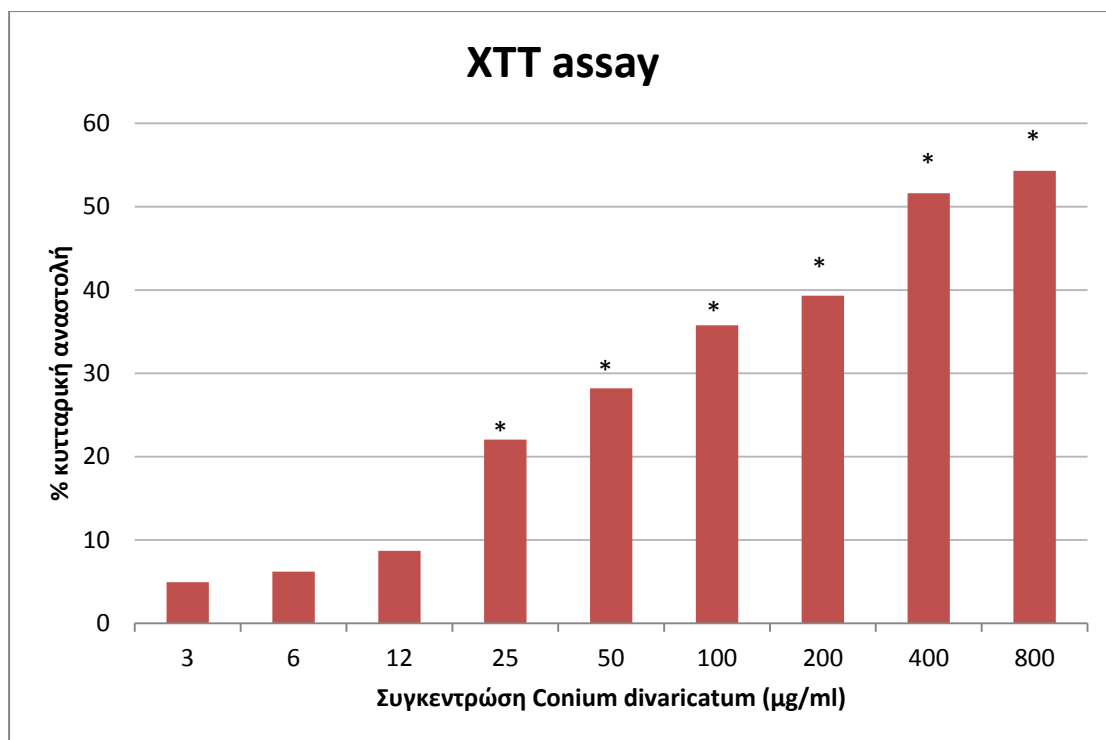
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναλύθηκαν βάσει της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα 1-way ANOVA. Συγκεκριμένα, οι ζευγαρωτές συγκρίσεις στηρίχτηκαν στο τεστ του Tukey, ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0,05$ . Το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) εφαρμόστηκε στις στατιστικές αναλύσεις όλων των πειραμάτων, με τα δεδομένα να εμφανίζονται ως  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ .

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος *Conium divaricatum*

Η δοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθούν οι κυτταροτοξικές και οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος *Conium divaricatum*, ώστε, στη συνέχεια, να πραγματοποιηθούν τα πειράματα επιλέγοντας συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για τα ηπατικά κύτταρα HepG2.

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (HepG2) επώαστηκε με τις εξής συγκεντρώσεις εκχυλίσματος exd93 από το φυτό *Conium divaricatum*: 1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml, 200μg/ml, 400μg/ml, 800μg/ml. Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, οι οποίες και επιλέχτηκαν ήταν οι εξής: 1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml. Και οι τέσσερις (4) συγκεντρώσεις δεν προκάλεσαν κυτταρική αναστολή στατιστικά σημαντική. Ειδικότερα, οι συγκεντρώσεις 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική κυτταρική αναστολή, ενώ η αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος (25μg/ml) ανέστειλε στατιστικώς σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 22%. Τα αποτελέσματα της δοκιμής XTT παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:

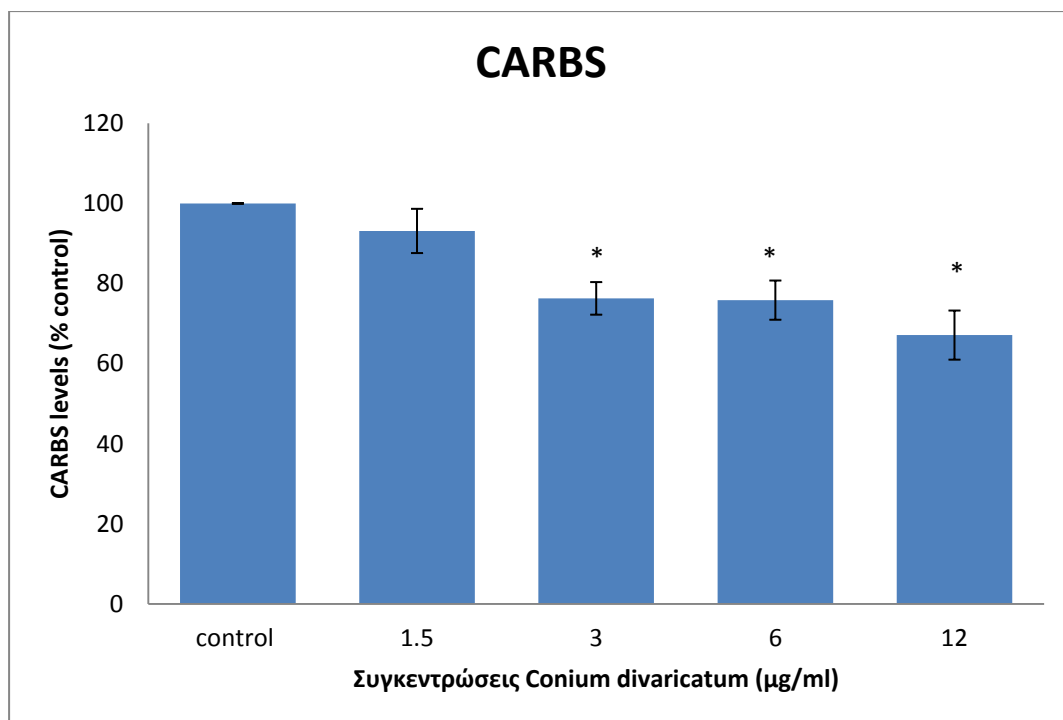


**Διάγραμμα 1:** Δοκιμή XTT στην κυτταρική σειρά HepG2.

### 3.2. Φωτομετρικοί δείκτες

#### 3.2.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs)

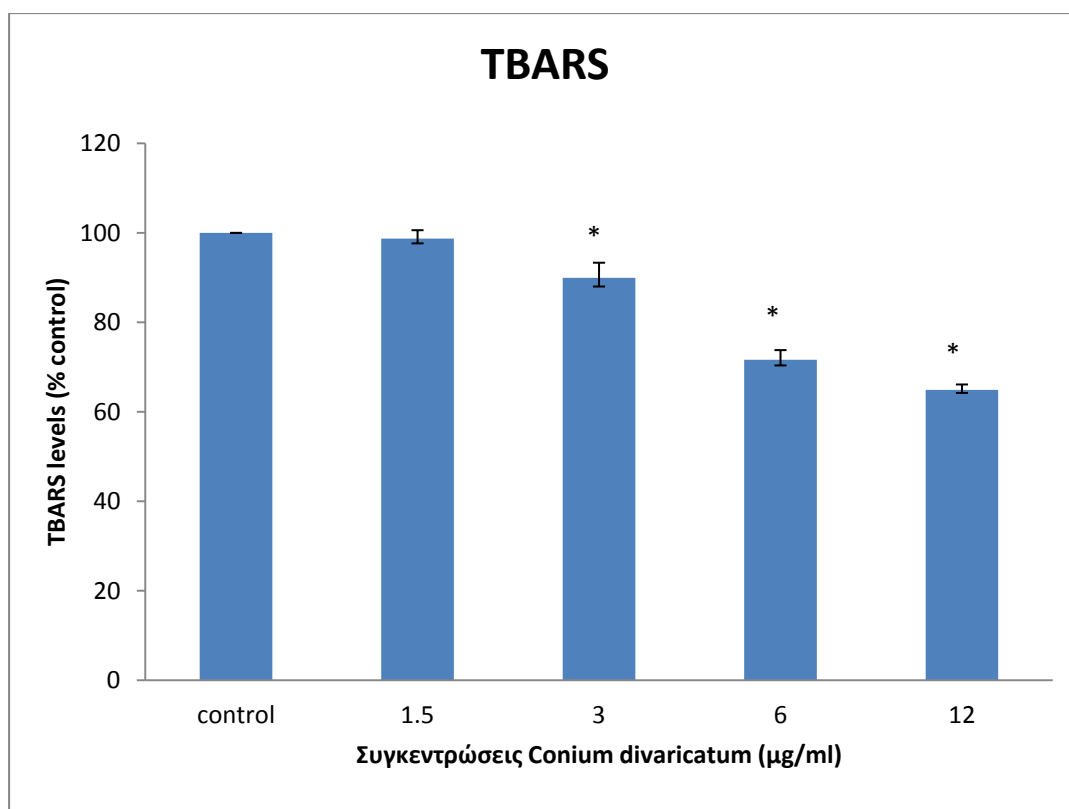
Το εκχύλισμα κωνείου εξετάστηκε σε τέσσερις (4) συγκεντρώσεις: 1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml. Με σημείο αναφοράς το control, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, θεωρώντας πως στο control, που δεν περιείχε εκχύλισμα, η καρβονυλίωση είναι 100%, στη μικρότερη συγκέντρωση (1,5μg/ml) εμφανίστηκε καρβονυλίωση κατά 93,13%, στη συγκέντρωση (3μg/ml) παρατηρήθηκε πρωτεϊνική καρβονυλίωση κατά 76,30%, στη συγκέντρωση (6μg/ml) κατά 75,85% και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (12 μg/ml) κατά 67,13%. Ωστόσο, σύμφωνα με την ανάλυση ANOVA, στατιστικώς σημαντικά κρίθηκαν τα αποτελέσματα στις συγκεντρώσεις 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml. Συνεπώς, σε αυτές τις 3 συγκεντρώσεις, εμφανίζεται ικανή προστασία των πρωτεϊνών από τη μη αναστρέψιμη βλάβη της καρβονυλίωσης. Η εκατοστιαία πρωτεϊνική καρβονυλίωση για τις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, καθώς και για το control, φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα, ενώ, με αστερίσκο, σημειώνονται οι συγκεντρώσεις με στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα:



**Διάγραμμα 2:** Επίπεδα καρβονυλίων σε σχέση με το control

### 3.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

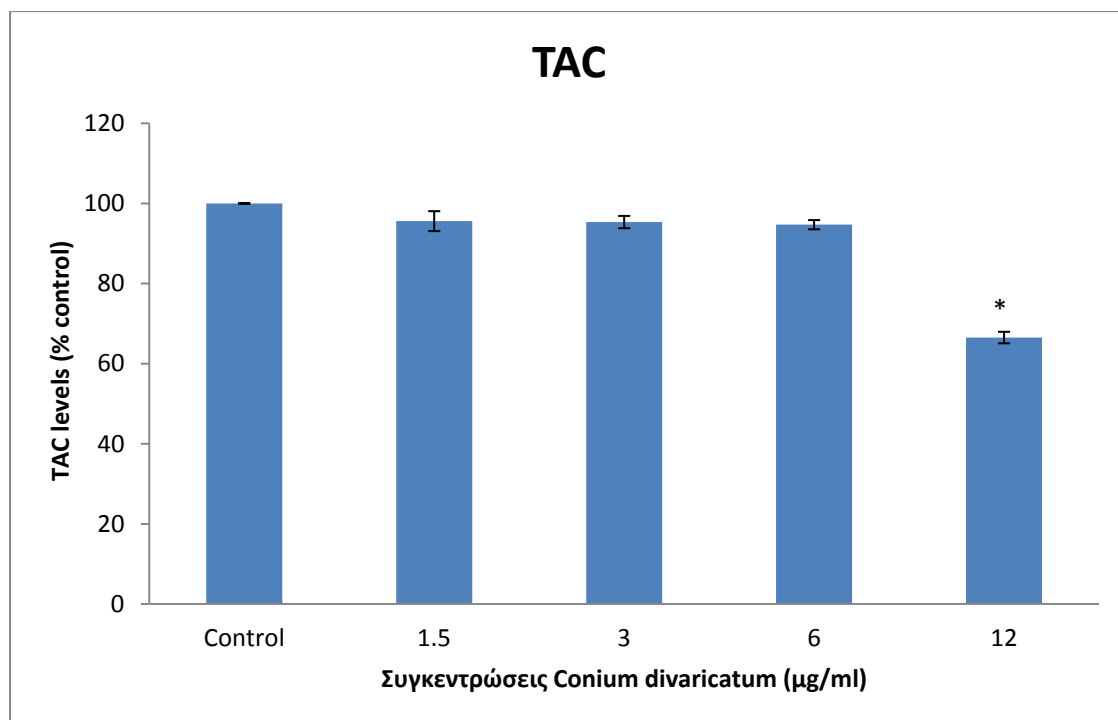
Μελετήθηκαν τέσσερις (4) συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος κωνείου: 1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml. Συγκριτικά με το control, παρατηρήθηκε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα, θεωρώντας πως στο control, που δεν περιείχε εκχύλισμα, η λιπιδική υπεροξειδωση είναι 100%, στη μικρότερη συγκέντρωση (1,5μg/ml), λιπιδική υπεροξειδωση εμφανίστηκε κατά 98,74%, στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, 3μg/ml και 6 μg/ml, υπεροξειδωση λιπιδίων παρατηρήθηκε κατά 90% και 72%, αντίστοιχα, και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (12μg/ml) κατά 65%. Αξίζει να σημειωθεί, όμως, πως η ανάλυση ANOVA, έδειξε ότι στατιστικώς σημαντικά είναι τα αποτελέσματα στις συγκεντρώσεις 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml. Κατά συνέπεια, σε αυτές τις 3 συγκεντρώσεις, η λιπιδική υπεροξειδωση αναστέλλεται ικανοποιητικά. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα, και, με αστερίσκο, σημειώνονται οι συγκεντρώσεις που προσφέρουν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα:



**Διάγραμμα 3:** Επίπεδα TBARS σε σχέση με το control

### 3.2.3. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Το εκχύλισμα κωνείου μελετήθηκε σε τέσσερις (4) συγκεντρώσεις: 1,5µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12µg/ml. Θεωρούμε πως, στο control, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν 100% και, με σημείο αναφοράς αυτό, καταλήγουμε σε συμπεράσματα αναφορικά με την TAC των μελετώμενων συγκεντρώσεων. Έτσι, στις συγκεντρώσεις 1,5µg/ml, 3µg/ml και 6µg/ml, η TAC δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά, ενώ στη συγκέντρωση 12µg/ml, μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά. Συγκεκριμένα, στις συγκεντρώσεις 1,5µg/ml, 3µg/ml και 6µg/ml, η TAC ήταν 95,6%, 95,35% και 94,7%, αντίστοιχα, ενώ, στη συγκέντρωση 12µg/ml, η TAC ήταν 67%. Το εκχύλισμα, δηλαδή, στα 12µg/ml, προκαλεί μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων, συγκριτικά με το control. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα που ακολουθεί:

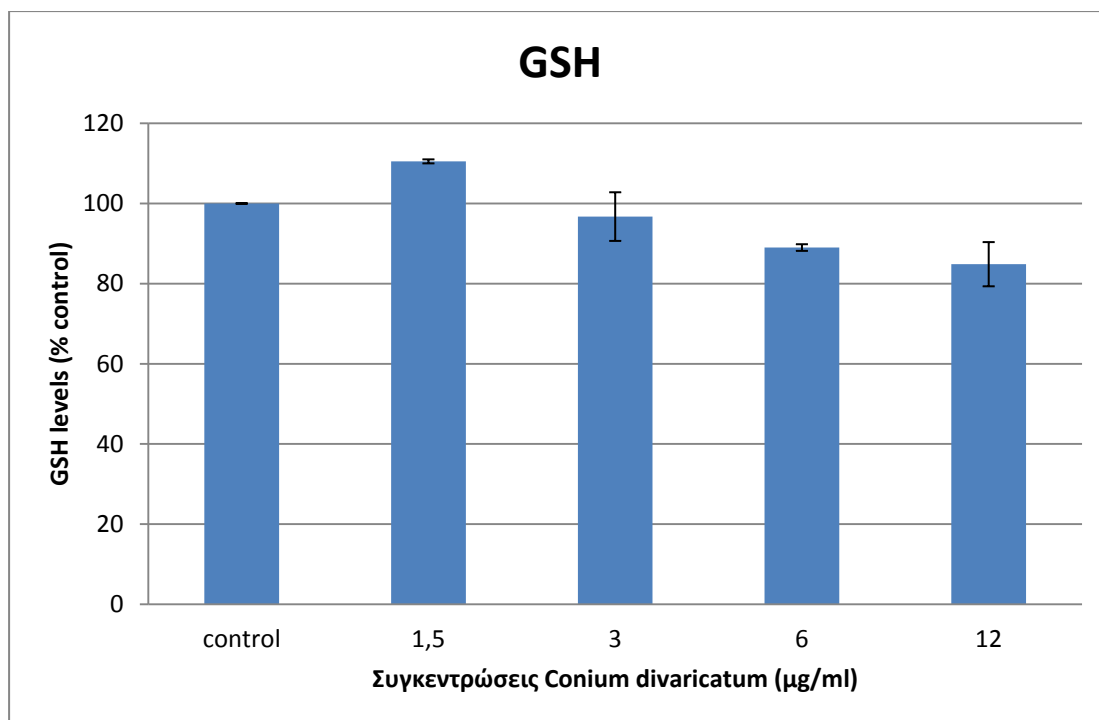


Διάγραμμα 4: Επίπεδα TAC σε σχέση με το control

### 3.3. Κυτταρομετρικοί προσδιορισμοί

#### 3.3.1. Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης (GSH)

Μελετώνται τέσσερις (4) συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος κωνείου: 1,5µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12µg/ml. Θεωρείται ότι, στο control, τα επίπεδα γλουταθειόνης είναι 100%, και, με βάση το control, εκτιμώνται τα επίπεδα GSH στις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Στη μικρότερη συγκέντρωση (1,5µg/ml), παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση των επιπέδων GSH συγκριτικά με το control, ενώ, αυξανόμενης της συγκέντρωσης εκχυλίσματος, τα επίπεδα GSH μειώθηκαν, διαδοχικά. Ωστόσο, τόσο η αύξηση, όσο και οι διαδοχικές μειώσεις, ήταν πολύ μικρές, και, έτσι, σύμφωνα με την ανάλυση ANOVA, κανένα από τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:

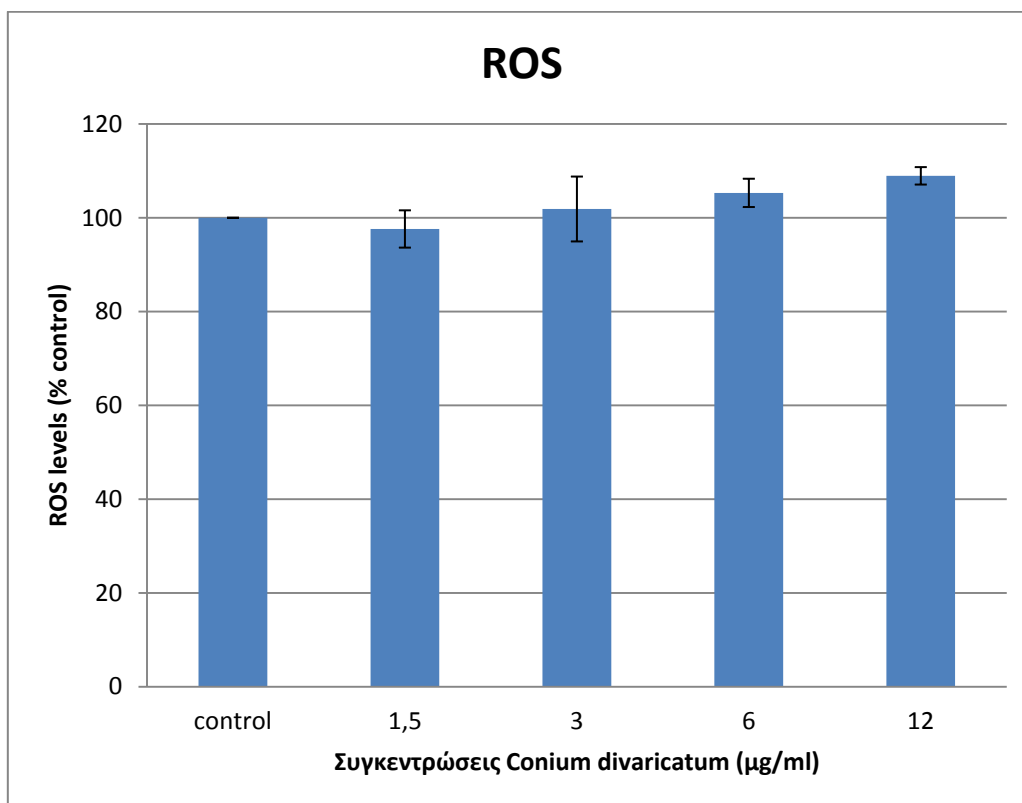


**Διάγραμμα 5:** Επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με το control

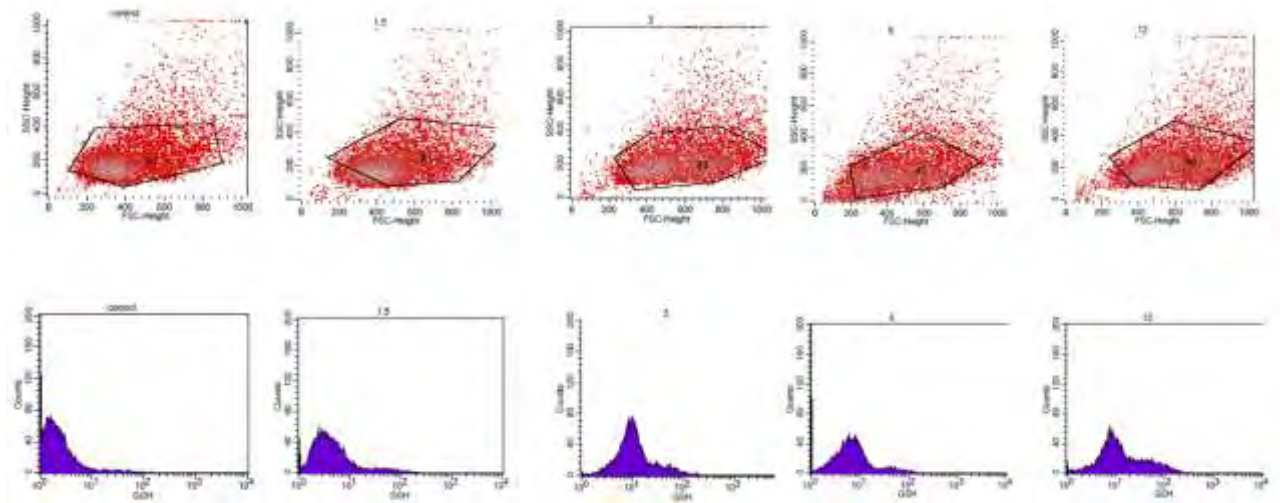
### 3.3.2. Προσδιορισμός επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Πραγματοποιήθηκε μελέτη τεσσάρων (4) συγκεντρώσεων εκχυλίσματος κωνείου: 1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12μg/ml. Έγινε η παραδοχή ότι στο control, τα επίπεδα ROS ανέρχονταν στο 100%, και με σημείο αναφοράς αυτό, εξετάστηκαν τα επίπεδα ROS στις διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Σε όλες τις συγκεντρώσεις, τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, ήταν σχεδόν όμοια με εκείνα του control, με μια μικρή τάση δόσοεξαρτώμενης αύξησης των ROS, που σύμφωνα όμως με την ανάλυση ANOVA, δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά, παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί:





**Διάγραμμα 6:** Επίπεδα ROS σε σχέση με το control

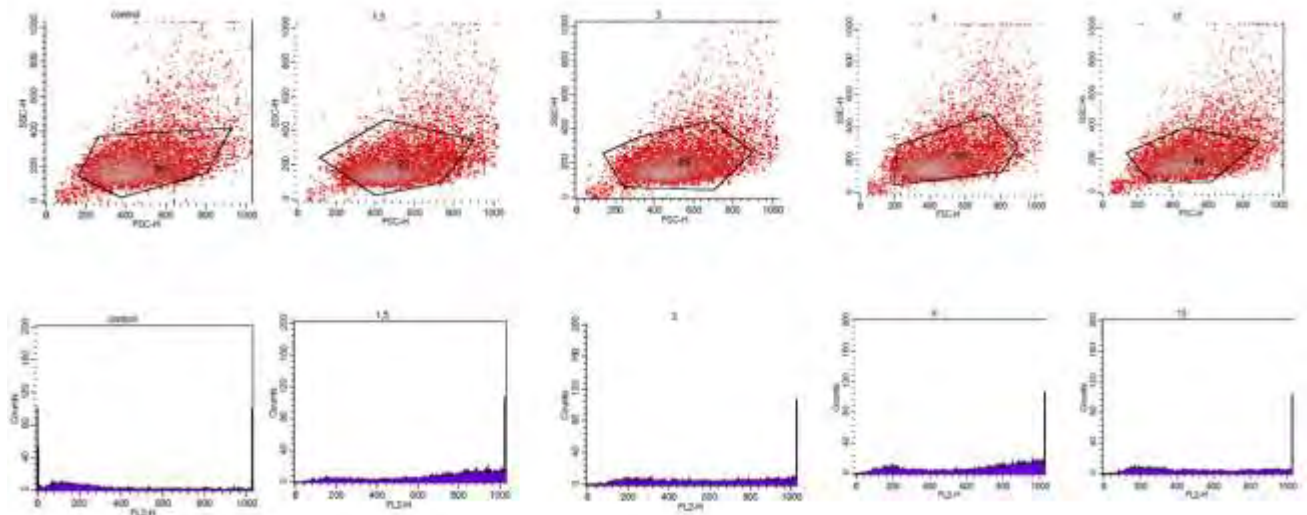


**Διάγραμμα 7:** Ενδεικτικές εικόνες γραφημάτων κυτταρομετρίας ροής σε ηπατικά κύτταρα HepG2 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH)

(A) Διαγράμματα που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) συναρτήσει του μεγέθους (FSC) των κυττάρων HepG2.

(B) Διαγράμματα που δείχνουν τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα HepG2.

Τα κύτταρα μελετήθηκαν τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), όσο και υπό την επίδραση τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος *Conium divaricatum* (1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12 μg/ml), ενώ η χρώση τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της χρωστικής Mercury Orange.



**Διάγραμμα 8:** Ενδεικτικές εικόνες γραφημάτων κυτταρομετρίας ροής σε ηπατικά κύτταρα HepG2 για τον προσδιορισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

- (A) Διαγράμματα που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) συναρτήσει του μεγέθους (FSC) των κυττάρων HepG2.
- (B) Διαγράμματα που δείχνουν τη μεταβολή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα HepG2.

Τα κύτταρα μελετήθηκαν τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), όσο και υπό την επίδραση τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος *Conium divaricatum* (1,5μg/ml, 3μg/ml, 6μg/ml, 12 μg/ml), ενώ η χρώση τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της χρωστικής 2,7-διχλωροφθοροσκεΐνη (DCF-DA). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488nm και 580nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πολυφαινολικού εκχυλίσματος από το *Conium divaricatum* σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, τα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται ως μοντέλο για βιοχημικές και διατροφικές μελέτες, καθώς και για *in vitro* μελέτες ηπατικού μεταβολισμού και τοξικότητας ξеноβιοτικών, (Knasmuller, 1998) (Chiu, 2013), καθώς το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο που διεκπεραιώνει το μεταβολισμό ουσιών. Ακόμη, χρησιμοποιούνται σε μελέτες ανίχνευσης περιβαλλοντικών και διατροφικών κυτταροτοξικών και γενotoξικών (και, συνεπώς, κυτταροπροστατευτικών και αντιγενotoξικών) παραγόντων, όπως και στην κατανόηση της καρκινογένεσης του ήπατος, και σε μελέτες στοχευμένης δράσης φαρμάκων. (Mersch-Sundermann et al., 2004) Αυτό το εύρος χρήσεων της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς οφείλεται στο γεγονός πως τα κύτταρα HepG2, αν και καρκινικά, διατηρούν τη μορφολογία και τις περισσότερες από τις λειτουργίες των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων, και, ως εκ τούτου, ενδείκνυται η χρήση τους ως μοντέλων μελέτης φυσιολογικών ηπατικών κυττάρων. (Alia et al., 2006) (Knasmuller, 1998)

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, τα ηπατικά κύτταρα HepG2 επιλέχθηκαν λόγω του καίριου ρόλου που διαδραματίζει το ήπαρ στο μεταβολισμό των ξеноβιοτικών και την αποτοξίνωση του οργανισμού από τοξικές ουσίες. Λόγω των λειτουργιών αυτών που επιτελεί το ήπαρ, υφίσταται, στοχευμένα, την τοξική δράση πολλών ξеноβιοτικών, ή και των δραστικών μεταβολιτών τους. (Jaeschke et al., 2002) Αυτά τα ξеноβιοτικά δύνανται να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως ROS, στα ηπατοκύτταρα, κατά τη διάρκεια της μεταβολικής τους επεξεργασίας. Τα ηπατικά κύτταρα χρησιμοποιούν, φυσιολογικά, τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ως δευτερεύοντες αγγελιοφόρους, που κρίνονται απαραίτητοι στις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. (Valko et al., 2007) Ωστόσο, μια ανισορροπία, ανάμεσα στην παραγωγή και την απομάκρυνση των ROS, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, το οποίο εμπλέκεται στην αιτιολογία ποικίλων ηπατικών ασθενειών, όπως των φλεγμονωδών και των ινωδογόνων διεργασιών του ήπατος. (Loguercio et al., 2003) (Vitaglione et al., 2004) Έτσι, κατάλληλα επίπεδα ενδοκυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες και των

επιπτώσεων, του κρίνονται εξαιρετικά σημαντικά. Στο σημείο αυτό, η από του στόματος χορήγηση φυσικών φυτοχημικών ουσιών, που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, προτείνονται ως αποτελεσματικοί παράγοντες θεραπευτικής αντιμετώπισης ηπατικών ασθενειών οι οποίες σχετίζονται με οξειδωτικό στρες. Στο πλαίσιο αυτό, εξετάστηκε το εκχύλισμα *Conium divaricatum* στα ηπατικά κύτταρα HepG2 για ενδεχόμενη αντιοξειδωτική δράση. Αξίζει να τονιστεί, επίσης, ότι οι πολυφαινόλες του εκχυλίσματος απορροφώνται, μεν, από το έντερο, αλλά η βιομετατροπή τους, μετά την απορρόφηση, λαμβάνει χώρα, κυρίως, στο ήπαρ (Tutino et al., 2012), γεγονός που ενισχύει την ενδεχόμενη συμβολή του υπό μελέτη εκχυλίσματος στην αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων του ήπατος.

Πριν από τη διερεύνηση των πιθανών διατροφικών και θεραπευτικών εφαρμογών του εκχυλίσματος κωνείου, ζωτικής σημασίας κρίνεται η διασφάλιση της μη τοξικότητάς του στα κύτταρα HepG2, στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις. Έτσι, προκειμένου να βρεθούν οι συγκεντρώσεις που δεν επιδρούν τοξικά στην κυτταροκαλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε δοκιμή ΧΤΤ, από την οποία προέκυψε πως οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, που θα μελετηθούν, είναι οι: 1,5μg/ml , 3μg/ml , 6μg/ml , 12μg/ml. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, έχει αποδειχτεί πως τα κύτταρα HepG2 είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές, καθώς τοξικότητα στα HepG2 εμφανίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, συγκριτικά με τις σειρές αυτές. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική απορρόφηση και στο διαφορετικό μεταβολισμό των ξеноβιοτικών, καθώς και στους διαφορετικούς μεμβρανικούς υποδοχείς μεταξύ των ποικίλων κυτταρικών σειρών. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί πως τα HepG2 χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταβολική ικανότητα, καθώς είναι σχεδιασμένα να εκφράζουν ηπατικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP), όπως τα CYP3A4, CYP2E1, που εμπλέκονται, ενεργά, στο μεταβολισμό ουσιών, ενώ οι μη ηπατικές κυτταρικές σειρές δεν έχουν χαρακτηριστεί για τη μεταβολική τους ικανότητα. (Garcia-Canton et al., 2013)

Έτσι, το εκχύλισμα κωνείου εξετάστηκε στις παραπάνω συγκεντρώσεις ως προς την προστασία των πρωτεϊνών από καρβονυλίωση, και των λιπιδίων από υπεροξειδωση, ως προς τη συνεισφορά του στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των κυττάρων, καθώς και ως προς την επίδρασή του στα επίπεδα γλουταθειόνης και ROS.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την προστασία από πρωτεϊνική καρβονυλίωση έδειξαν πως οι συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml επέφεραν μια στατιστικώς σημαντική και δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των CARBS, σε σχέση με το control, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις ασκούν ικανοποιητική προστατευτική δράση των πρωτεϊνών από οξείδωση. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, δεν είναι εφικτό να επιδιορθωθούν από κυτταρικά ένζυμα, και, ως εκ τούτου, τείνουν να συσσωρεύονται οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. (Fedorova et al., 2013)

Η ικανότητα αποτροπής της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης, από πολυφαινολικές ενώσεις και αλκαλοειδή, αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Έρευνα έχει αποδείξει πως τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν, άμεσα, την πρωτεϊνική καρβονυλίωση, μέσω του σχηματισμού χηλικών ενώσεων με μέταλλα, όπως ο σίδηρος, αναστέλλοντας, έτσι, το σχηματισμό ROS. (Jho, 2007), (Puntarulo, 2005) Σύμφωνα με άλλη μελέτη, οι πολυφαινόλες εκχυλίσματος σταφυλιού μειώνουν, σημαντικά, τα επίπεδα καρβονυλίων, σε σχέση με το control, σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μυϊκά κύτταρα C2C12, (Goutzourelas et al., 2014), ενώ πρόσθετες μελέτες αποδεικνύουν πως συμπληρώματα διατροφής, εμπλουτισμένα με πολυφαινόλες, ελαττώνουν, αξιοσημείωτα, τα επίπεδα των CARBS στο πλάσμα και τους ιστούς χοιριδίων και κοτόπουλων, γεγονός που υποδηλώνει πως οι πολυφαινολικές ενώσεις παρεμποδίζουν την οξείδωση των πρωτεϊνών. (Gerasopoulos et al., 2015)

Ως δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης, χρησιμοποιούνται τα TBARS. Στη μέθοδο αυτή, τα προκύπτοντα, από τις ελεύθερες ρίζες, υπεροξειδία των λιπιδίων διασπώνται σχηματίζοντας κυρίως μηλονική διαλδεύδη (MDA), της οποίας τα επίπεδα ανιχνεύονται φωτομετρικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 3μg/ml, 6μg/ml και 12μg/ml μειώνουν, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, τα TBARS, σε σχέση με το control, και, μάλιστα πρόκειται για μείωση στατιστικώς σημαντική, γεγονός που σημαίνει πως, σε αυτές τις συγκεντρώσεις, το εκχύλισμα αναστέλλει, ικανοποιητικά, την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Τα λιπίδια, και ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) των κυτταρικών μεμβρανών, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη από τις ROS, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της διαπερατότητας και της δομής των μεμβρανών και, κατ' επέκταση, τον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η προστασία που παρέχει το εκχύλισμα κωνείου, στα λιπίδια, είναι ιδιαίτερος σημαντική. (Kong, 2016)

Η ικανότητα εκχυλισμάτων πλούσιων σε αλκαλοειδή και πολυφαινόλες, όπως του εκχυλίσματος *Conium divaricatum*, να μειώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων σε κυτταρικές σειρές, έχει αποδειχτεί και από ποικίλες άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, η έρευνα δείχνει ότι τα αλκαλοειδή του *Nelumbinis plumula* οδηγούν σε αξιοσημείωτη προστασία των λιπιδίων από υπεροξειδωση, στα HepG2 κύτταρα. (Xie, 2013) Ακόμη, πλούσια σε πολυφαινόλες εκχυλίσματα, όπως αυτό της γλυκοπατάτας και του φασκόμηλου, προστατεύουν, σημαντικά, τα λιπίδια ηπατικών κυττάρων HepG2, από υπεροξειδωση. (Hwang et al., 2011) (Lima et al., 2007) Σύμφωνα με άλλη έρευνα, κύτταρα HepG2 που υπέστησαν τη δράση γαλλικού οξέος, εμφάνισαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα μηλονικής διαλδευδης, και, συνεπώς, μειωμένη λιπιδική υπεροξειδωση. (Kong, 2016) Επίσης, έχει βρεθεί πως φαινολικά εκχυλίσματα σταφυλιού προστατεύουν ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα από λιπιδική υπεροξειδωση (Goutzourelas et al., 2014), καθώς και ότι πολυφαινολικά εκχυλίσματα ελιάς, και συγκεκριμένα της ελληνικής ποικιλίας *Olea europaea*, ελαττώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων τόσο σε ηπατικά κύτταρα HepG2, όσο και σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, κύτταρα HeLa και μυϊκά κύτταρα C2C12. (Kouka, 2018) Έχει προταθεί πως ένας πιθανός μηχανισμός, βάσει του οποίου, οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, είναι η ικανότητα των υδροξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου, να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τη λιπιδική περοξυ-ρίζα, εμποδίζοντάς την να λάβει μέρος στην αλυσιδωτή αντίδραση, γεγονός που τερματίζει τη διαδικασία σχηματισμού ελευθέρων ριζών. (Tejero, 2007)

Παρατηρείται, λοιπόν, μια μείωση τόσο στα TBARS, όσο και στα CARBS. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμβατά μεταξύ τους διότι τα υποπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης οδηγούν στην οξειδωση των πρωτεϊνών, και, κατά συνέπεια, τα μειωμένα επίπεδα καρβονυλίων μπορεί να οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα TBARS. (Kim et al., 1997) Συγκεκριμένα, κάποια από τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, μέσω κυκλοποίησης, β-σχάσης και αποικοδόμησης, οδηγούν στο σχηματισμό R,β-ακόρεστων αλδευδών, που, συνήθως, είναι ηλεκτρονιόφιλες. Κατά κύριο λόγο, δηλαδή, δημιουργούνται η 4-υδροξυνοενάλη (4-HNE), η μηλονική διαλδεύδη (MDA) και η ακρολεΐνη (ACR). Αυτές οι ενώσεις παραμένουν μέσα στο κύτταρο για περισσότερο από 2 λεπτά, χρονικό διάστημα αρκετό ώστε να διαχυθούν ενδοκυτταρικά, προκαλώντας ομοιοπολική τροποποίηση του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων ολόκληρου του κυττάρου, και, κατ'

επέκταση, αλλοιωμένη κυτταρική σηματοδότηση. (Petersen and Doorn, 2004) (Yuichiro et al., 2010)

Αναφορικά με τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων HepG2, ύστερα από την επίδραση εκχυλίσματος κωνείου, μόνο η μεγαλύτερη συγκέντρωση 12μg/ml επέφερε μια στατιστικώς σημαντική μεταβολή, και συγκεκριμένα προκάλεσε μείωση της TAC, σε σχέση με το control. Δηλαδή, παρά το γεγονός πως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (1,5μg/ml , 3μg/ml , 6μg/ml) άσκησαν αντιοξειδωτική δράση σε πρωτεΐνες και λιπίδια, αυτό δεν εκφράστηκε από την επίδραση των συγκεντρώσεων αυτών στην TAC. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι το εκχύλισμα ενίσχυσε ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι δεν επιδρούν όμως στην τιμή της TAC. Επιπλέον, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση στα 12μg/ml παρατηρήθηκε μείωση της TAC. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς συνδέεται με τις προ-οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων, καθώς οι ενώσεις αυτές, σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να δράσουν προ-οξειδωτικά. (Prochazkova et al., 2011) (Park, 2012). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα 12μg/ml ήταν η κρίσιμη συγκέντρωση πέρα από την οποία εμφανίστηκε κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος.

Είναι γνωστό πως οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση, προσφέροντας, στις ελεύθερες ρίζες, ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου, μια διαδικασία στην οποία παίζει σημαντικό ρόλο το εξαιρετικά συζευγμένο τους σύστημα. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, μόλις προσφέρουν ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου, καθίστανται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, και, έτσι, δυνητικά, μπορούν να επάγουν το προ-οξειδωτικό φαινόμενο. (Tsao, 2010) Συγκεκριμένα, το άμεσο προ-οξειδωτικό δυναμικό τους βασίζεται στο σχηματισμό μιας ασταθούς αροξυλ-ρίζας ή ενός ασταθούς οξειδοαναγωγικού συμπλέγματος με ένα μεταλλικό κατιόν. Αυτή η αροξυλ-ρίζα δύναται να αντιδρά με το οξυγόνο, οδηγώντας στο σχηματισμό του  $O_2^-$ , και, ακόμη, μπορεί να οδηγεί στη δημιουργία τριμερών ενώσεων ανάμεσα στο DNA, το χαλκό και τα φλαβονοειδή. (Hodnick et al., 1988) Επιπλέον, τα φλαβονοειδή, σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενισχύουν το σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου, προκαλώντας, έτσι, θραύση της έλικας του DNA. (Prochazkova et al., 2011) Ακόμη, η προ-οξειδωτική δράση ορισμένων φαινολικών ενώσεων ενισχύεται παρουσία μεταβατικών μετάλλων, μέσω της αναγωγής των μεταλλικών ιόντων και την προώθηση σχηματισμού ριζών υδροξυλίου ως προϊόντων της αντίδρασης Fenton. (Gonzalez, 2016) Το προ-



οξειδωτικό δυναμικό των πολυφαινολών εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, και από τη δομή τους. Για παράδειγμα, η παρουσία υδροξυλομάδας είναι απαραίτητη (Rice-Evans et al., 1995), και, μάλιστα, όσο περισσότερες οι ομάδες υδροξυλίου, τόσο ισχυρότερη η επαγόμενη από το χαλκό, προ-οξειδωτική ικανότητα. (Guo et al., 1997). Ο συσχετισμός της προ-οξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών με τη συγκέντρωσή τους, υποστηρίζεται από τη διεθνή βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως σε μικροσωμικό κλάσμα ήπατος αρουραίου, φαινολικές ενώσεις ενισχύουν, σημαντικά, το σχηματισμό υδροξυ-ρίζας. (Laughton et al., 1989) Σύμφωνα με άλλη μελέτη, χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων προστατεύουν τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα από οξειδωτική βλάβη, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών μεγεθύνουν τη βλάβη. (Prochazkova et al., 2011) Ακόμη, έχει αποδειχτεί πως οι φλαβανόλες του κακάο, αν και παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όταν βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, μπορούν να λειτουργήσουν και ως προ-οξειδωτικά σε κυτταροκαλλιέργειες, οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη. (Lapidot et al., 2002) (Azam et al., 2004)

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των ROS και της γλουταθειόνης, υπάρχει μια τάση αύξησης των ROS και μείωσης της γλουταθειόνης, σε σχέση με το control, που, ενισχύει την παρουσία προ-οξειδωτικού φαινομένου στην υψηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος. Ωστόσο, τα αποτελέσματα, τόσο στη μελέτη των επιπέδων της γλουταθειόνης, όσο και των ROS, δεν είναι στατιστικώς σημαντικά, και, ως εκ τούτου, δε μπορούν να ληφθούν υπ' όψιν. Αξίζει να τονιστεί πως οι τιμές αυτές αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα GSH και ROS που υπάρχουν φυσικά στα υπό μελέτη κύτταρα, ύστερα από την επίδραση του εκχυλίσματος κωνείου, καθώς κανένας άλλος εξωτερικός οξειδωτικός παράγοντας δεν προστέθηκε στην κυτταροκαλλιέργεια. Και σε άλλες ερευνητικές εργασίες, έχει βρεθεί πως πολυφαινολικά εκχυλίσματα καφέ και ελιάς, αν και άσκησαν αντιοξειδωτική δράση, δεν επηρέασαν, σημαντικά, τα επίπεδα των ROS. (Priftis, 2015) (Kouka et al., 2017) Πράγματι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι αλλαγές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες και στους γενικότερους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, δεν αντικατοπτρίζονται, πάντα, στα επίπεδα των ROS. (Kerasioti et al., 2014) (Goutzourelas et al., 2014) (Priftis et al., 2015). Μία εξήγηση για αυτό θα μπορούσε να είναι ότι τα αντιοξειδωτικά του συγκεκριμένου εκχυλίσματος μπορούν να προστατεύουν από τις βλαβερές επιδράσεις των ROS στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες όπως έδειξαν οι μέθοδοι των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αλλά δεν μπορούν να αντιδρούν με τις ελεύθερες μορφές των ROS.

Επίσης, σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα η γλουταθειόνη δεν φαίνεται να εμπλέκεται στον μηχανισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος στα ηπατικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα κωνείου προστατεύει τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες από οξειδωτική βλάβη στα ηπατικά κύτταρα, Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση του δεν αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα γλουταθειόνης και ROS, γεγονός που είναι σύνηθες στη διεθνή βιβλιογραφία. Ως εκ τούτου, περαιτέρω έρευνα αναφορικά με τη διαλεύκανση των μηχανισμών της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, κρίνεται απαραίτητη ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα και να παραχθούν από αυτό το εκχύλισμα συμπληρώματα διατροφής ή βιολειτουργικά τρόφιμα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία:

Σωτηρούδης Θεόδωρος Γ., Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά και υγεία. Κοινωνία και Υγεία III

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία:

Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Iizuka M., Schneider S., Ogasawara K., Mukainaka T., Iwatsuki K., Suzuki T., Nishino H. (2003) Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Lett.* 201, 133-137

Adelman R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2706–2708

Alia M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano A.B., Bravo L., Goya L. (2006) Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 110-118.

Ames BN. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutagen* 1989, 16:S66–S77

Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov; 78(11):6858-62.

Azam S., Hadi N., Khan N.U., Hadi S.M. (2004) Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol. In Vitro*, 18, 555–561

Beierle I, Meibohm B & Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 37:529–547, 1999

Binev R., Mitev J., Miteva T. (2007) Intoxication with poison hemlock (*Conium maculatum* L.) in calves. *Trakia J. Sci.*, 5, pp. 40-50

Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5:9-19

Brigelius F.R., Flohe L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* 15:2335-2381

Campbell I. (2006), Liver: metabolic functions. *ANAESTHESIA AND INTENSIVE CARE MEDICINE* 7:2

Chiu Y.-W., Lo H.-J., Huang H.-Y., Chao P.-Y., Hwang J.-M., Huang P.-Y., Huang S.-J., Liu J.-Y., Lai T.-J. (2013) The antioxidant and cytoprotective activity of *Ocimum gratissimum* extracts against hydrogen peroxide-induced toxicity in human HepG2 cells. *Journal of food and drug analysis* 21 253-260

- Cichoż-Lach H., Michalak A. (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*
- Disilvestro R.A. Flavonoids as Antioxidants. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*; Wildman, R.E.C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2001, Chapter 8, pp. 127-142
- Du Y., Guo H., Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1695-1701
- Duthie G.G., Brown, K.M. Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*; Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1994, pp. 19-38
- Fedorova M., Bollineni R.C., et al. (2013) Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 33 (2), 79–97
- Fejes S., Blazovics A., Lemberkovics E., Petri G., Szoke E., Kery A. (2000) Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) nym. ex A.W. Hill. *Phytother. Res.* 14, 362-365
- Garcia-Canton C., Minet E., Anadon A., Meredith C. (2013), Metabolic characterization of cell systems used in *in vitro* toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol. In vitro* 27, 1719-1727
- Gebhardt Y., Witte S., Forkmann G., Lukacin R., Matern U., Martens S. (2005), Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae. *Phytochemistry* 66, 1273-1284
- Gerasopoulos K., Stagos D., Petrotos K., Kokkas S., Kantas D., Goulas P., Kouretas D. (2015a) Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem Toxicol.* 86, 319-327
- Giese B. (1986) *Radicals in Organic Synthesis: Formation of carbon-carbon bonds.* Oxford, UK: Pergamon Press
- Gonzalez A.L., Auger C., Schini-Kerth V. (2016) Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, *et al* (2014) Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol* 33: 1099-1112
- Guo, J.-J., Hsieh H.-Y., Hu C.-H. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 15699-15708

Guohua G., Emin S., Ronald L. (1997) “Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships” *Free Radical Biology and Medicine*, vol.22, no.5, pp.749–760

Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 476, 107-112

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007), *Free radicals in biology and medicine*, 4<sup>th</sup> edn. Clarendon, Oxford

Halliwell B, Gutteridge JMC (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18:125-126

Harvey R.-A., Champe P.-C. (2007) *Φαρμακολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις Παριστιανού Α. Ε.* 3<sup>η</sup> έκδοση, σελ. 556

Hempel J., Pforte H., Raab B., Engst W., Bohm H., Jacobasch G. (1999) Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. *Nahrung* 43, 201-204

Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS. (1988) Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:2607-11

Hwang YP, Choi JH, Choi JM, Chung YC, Jeong HG (2011) Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 49:2081-2089

Jaeschke H., Gores G.J., Cederbaum A.I., et al. (2002) Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 65:166-76.

Jhoo J.-W. *ACS Symp. Ser.* 2007, 956, 215–225

Kehner James P., Klotz Lars-Oliver (2015), *Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health*

Kiamehr M., Alipour B., Nasrollahzadeh M., Mohammad S.S. (2017) Catalytic reduction of 2,4-dinitrophenylhydrazine by cuttlebone supported Pd NPs prepared using *Conium maculatum* leaf extract. *IET Nanobiotechnology* doi: 10.1049/iet-nbt.2017.0005

Kim J.G., Sabbagh F., Santanam N., Wilcox J.N., Medford R.M., Parthasarathy S. (1997) Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 251-259

Kerasioti E., Stagos D., Priftis A., Aivazidis S., Tsatsakis A.M., Hayes A.W., Kouretas D. (2014) Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem* 155: 271-278

Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Williamson G., Hietsch, G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A.T. (1998) Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and anti-mutagens. *Mutat. Res.* 402, 185–202

Kong K.W., Mat-Junit S., Aminudin N., Abdulrahman H.F., Ismail A., Abdul A. A. (2016), Protective effects of the extracts of *Barringtonia racemosa* shoots against oxidative damage in HepG2 cells. doi 10.7717/peerj.1628

Kouka P., Priftis A., Stagos D., Angelis A., Stathopoulos P., Xinos N., Skaltsounis A.L., Mamoulakis C., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A., Kouretas D. (2017), Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea Europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine* 40: 703-712

Kouka P., Chatziefraimidi G.A., Raftis G., Stagos D., Angelis A., Stathopoulos P., Xynos N., Skaltsounis A.L., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2018), Antioxidant Effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea Europea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine*

Laamech J., El-Hilaly J., Fetoui H., Chtourou Y., Gouitaa H., Tahraoui A., Lyoussi B. (2016) *Berberis vulgaris* L. effects on oxidative stress and liver injury in lead-intoxicated mice. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2016; 20150079

Lapidot T., Walter M., Kanner J. (2002), Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic-cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7220–7225.

Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Robin J., Hoult S. (1989), Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects of lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 38:2859–64

Lima C.F., Valentao PCR, Andrade P.B., Seabra R.M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. (2007), Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* 167:107-115

Loguercio C, Federico A. (2003) Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 34:1-10

Manach C., Donovan J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* 2004, 38, 771-785

Marx J. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 2004;36:966–1008

Mehrabi R., Bagheri G., Alipour F. (2015) Anticancer effects of Anbuta and Vinoblastin on breast cancer cell line ZR 75-1. *J. Entomol. Zool. Stud.* 3, (2), pp. 208-210

- Mersch-Sundermann V., Knasmuller S., Wu X.-J., Darroudi F., Kassie F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198, 329-340.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751
- Milner J.A. Reducing the risk of cancer. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*; Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1994, pp. 39-70
- Mondal J., Panigrahi A.K., Khuda-Bukhsh A.R. (2014) Anticancer potential of *Conium maculatum* extract against cancer cells *in vitro*: Drug-DNA interaction and its ability to induce apoptosis through ROS generation. *Pharmacogn Mag.* Aug; 10(Suppl 3): S524–S533
- Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int* (2009) 3:526–536
- Nielsen S.E., Young J.F., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Sandstrom B., Dragsted L.O. (1999) Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br. J. Nutr.* 81, 447-455
- Orrenius S. Godvadge V., Zhivotovsky B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:143-183
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschmann G., Burillo J., Codina C. (2004) Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1890-1897
- Park EJ, Pezzuto JM. (2012) Flavonoids in cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem.* 12:836-51
- Patlevic Peter, Vaskova Janka, Svork Jr Pavol, Vasko Ladislav, Svork Pavol (2016) Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Interg med res*, 250-258
- Perez R.M. (2001) Anti-inflammatory activity of compounds isolated from plants. *Sci. World J.* 1, pp.713-784
- Perron N.R., Brumaghim J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 2009, 53, 75-100
- Petersen, D.R., Doorn, J. A. (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radical Biol. Med.* 37, 937–945
- Phaniedra A., Jestadi D., Periyasamy L. (2014) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* (Jan-Mar 2015) 30(1):11-26

- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1035-1042
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 13
- Poli G. Liver damage due to free radicals. *BrtiUh Medical Bulletin* (1993) Vol 49, No 3, pp. 604-620
- Priftis A., Stagos D., Konstantinopoulos K., Tsitsimpikou C., Demetrios A. Spandidos, Tsatsakis A.M., Tzatzarakis M.N., Kouretas D. (2015) Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports* 12: 7293-7302
- Prochazkova D., Busova I., Wilhelmova N. (2011), Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82 (2011) 513-523
- Radulovic N., Dordevic N., Denic M., Gomes Pinheiro M.M., Fernandes D.P., Boylan F. (2011) A novel toxic alkaloid from poison hemlock (*Conium Maculatum* L. Apiaceae): Identification, synthesis and antinociceptive activity. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 274-279
- Radulovic N., Dordevic N., (2011), Steroids from poison hemlock (*Conium maculatum* L.): a GC-MC analysis. *J. Serb. Chem. Soc.*
- Ray P.D., Huang B-W, Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell signal* 24:981-990
- Rechner A.R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G.P., Moore K.P., Rice-Evans C.A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol. Med.* 2002, 33, 220-235
- Reecha M., Bikramjit S., Suresh K. (2010) *J. Pharm. Biomed. Sci.*, 1, p.18
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995) "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids," *Free Radical Research*, vol.22, no.4, pp.375–383
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20, 933-956
- Rui L. (2014), Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014 January ; 4(1): 177–197. doi:10.1002/cphy.c130024
- Salma B.B., Mastan M. (2010) Phytochemical Screening, Chromatographic analysis of Chloroform extract of *Conium maculatum*. *Int. Res J. Biol. Sci.*, 4, (3), pp. 27-29
- Sautin Y.Y., Johnson R.J. (2010) URIC ACID: THE OXIDANT–ANTIOXIDANT PARADOX. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(6): 608–619
- Schep L.J., Slaughter R.J., Beasley D.M. (2009) Nicotinic plant poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 47, 771-781



Schieber M., Navdeep C.S. (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24, 453-462

Susana Puntarulo (2005) Iron, oxidative stress and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 299-312

Tejero I., Gonzalez-Garcia N., Gonzalez-Lafont A., Lluch J. M. J. (2007) *Am. Chem. Soc.* 129, 5846–5854

Troll W, Wiesner R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25: 509–528

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010, 2, 1231-1246;doi:10.3390/nu2121231

Tutino V., Caruso M. G., Messa C., Perri E., Notarnicola M. (2012) Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. *Anticancer Res.* 32,5371-5377

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84

Veskoukis A., Tsatsakis A., Kouretas D. (2011), Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell stress and chaperones* (2012) 17:11-21

Vetter J. (2004) Poison hemlock (*Conium maculatum* L.). *Food and Chemical Toxicology* 42 1373-1382

Vincente A.R., Manganaris G.A., Ortiz C.M. , Sozzi G.O., Crisosto C.H. (2014), *Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. Postharvest Handling (Third Edition) A Systems Approach, Chapter 5, Pages 69-122*

Vitaglione P., Morisco F., Caporaso N., et al. (2004) Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:575-86

Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36, 838-849

Williamson G., Barron D., Shimoi K., Terao J. *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Radic. Res.* 2005, 39, 457-469.

Xie Y., Zhang Y., Zhang L.-T., Zeng S.-X., Guo Z.-B., Zheng B.-D. (2013) Protective effects of alkaloid compound from *Nelumbinis Plumula* on *tert*-Butyl Hydroperoxide-induced oxidative stress, *Molecules* 18, 10285-10300

Yuichiro J., Suzuki M., Garini D., Butterfield A. (2010) Protein Carbonylation. *Antioxidant and Redox Signaling*, Volume 12, number 3

Zhou B., Wu L.-M., Yang L., Liu Z.-L. Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 38, 78-84