



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Προσδιορισμός προστατευτικής δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων του φυτού Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*) έναντι DNA βλαβών προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες

Determination of protective action of polyphenolic extracts of the plant European chestnut (*Castanea sativa*) against DNA damage caused by free radicals

Κυπραίου Κλαύδια

Λάρισα 2019

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

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

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

Πετρωτός Κωνσταντίνος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μηχανικής Μεταποίησης Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Μηχανικής Βιο-συστημάτων – ΣΤΕΓ-ΤΕΙ Λάρισας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Δημήτριο Στάγκο, αρχικά για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και επιπλέον για την πολύτιμη βοήθεια και τον χρόνο που διέθεσε τόσο στο εργαστηριακό κομμάτι, όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του η οποία μου προσέφερε σημαντικές εμπειρίες και γνώσεις.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Λαδά για την βοήθεια και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τη πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν, καθώς και το φιλικό κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	8
1.1	Ελεύθερες Ρίζες	8
1.2	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)	9
1.2.1	OH•	10
1.2.2	O ₂ •-	10
1.2.3	ROO• και RO•	11
1.2.4	H ₂ O ₂	11
1.3	Παραγωγή ROS	12
1.3.1	Ενδοκυτταρική Παραγωγή ROS	12
1.3.2	Εξωκυτταρική Παραγωγή ROS	14
1.4	Δραστικές Μορφές Αζώτου RNS	14
1.5	Δράση ROS και RNS	15
1.5.1	Θετικές Δράσεις	15
1.5.2	Αρνητικές Δράσεις	16
1.6	Οξειδωτικό Στρες	17
1.7	Αντιοξειδωτικά	19
1.7.1	Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	20
1.7.2	Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά	21
1.8	Πολυφαινόλες	22
1.8.1	Τάξεις Πολυφαινολών	23
1.8.2	Συχνότητα και Περιεχόμενο	24
1.8.3	Βιοδιαθεσιμότητα	25
1.8.4	Πολυφαινόλες και Υγεία	25
1.9	Καστανιά	26
1.9.1	Ευρωπαϊκή Καστανιά (Castanea Sativa)	27
1.9.2	Αντιοξειδωτική ικανότητα της C. Sativa	28
2	Σκοπός	29
3	Μεθοδολογία	30
3.1	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	30
3.2	Επαγόμενη από Ρίζες Υδροξυλίου (OH•) Πρόκληση Μονοκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA	31
3.3	Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO•) Πρόκληση Μονόκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA	35
4	Αποτελέσματα	39

4.1	Επαγόμενη από Ρίζες Υδροξυλίου (OH•) Πρόκληση Μονοκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.....	39
4.2	Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO•) Πρόκληση Μονοκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.....	45
4.3	Σύγκριση Αποτελεσμάτων	50
5	Συζήτηση	51
6	Βιβλιογραφία.....	54

Περίληψη

Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται τα δραστικά είδη που κατέχουν περιττό αριθμό ηλεκτρονίων στην εξωτερική στοιβάδα, με σημαντικότερες τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Οι ROS/RNS έχουν φυσιολογικές λειτουργίες στο κύτταρο, αλλά σε περιπτώσεις υπερπαραγωγής τους έχει βρεθεί να προκαλούν οξειδωτικό στρες, το οποίο με την σειρά του έχει συσχετιστεί με μια πληθώρα ασθενειών. Για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικά που μπορεί να παράγονται ενδογενώς ή να προσλαμβάνονται από την διατροφή.

Κάποια από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται από την διατροφή είναι οι πολυφαινόλες που φυσιολογικά βρίσκονται σε φυτά και φυτικά προϊόντα. Λόγω των ουσιών αυτών, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον προς φυτά με αντιοξειδωτικές ικανότητες για χρήση στην διατροφή, στην φαρμακοβιομηχανία, καθώς και στην παραγωγή καλλυντικών.

Στην παρούσα εργασία πολυφαινολικά εκχυλίσματα από την Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*) ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα τους να προστατεύουν το DNA από βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και περοξυλίου. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φύλλων, κάστανων, ενθυλακωμένα φύλλα και κάστανα με οροπρωτεΐνη και μαλτοδεξτρίνη. Στην ρίζα περοξυλίου η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ήταν ισχυρή, ενώ στην ρίζα υδροξυλίου (λόγω της αυξημένης οξειδωτικής ικανότητας της) ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Τα φύλλα έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα και στις δύο ρίζες, ενώ τα κάστανα ήταν αρκετά πιο αδύναμα.

Τα τρία καλύτερα αποτελέσματα έναντι της ρίζας υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) τα είχαν τα σκέτα φύλλα ($\text{IC}_{50}=2124\mu\text{g/ml}$) ακολουθούμενα από την μαλτοδεξτρίνη φύλλων ($\text{IC}_{50}=7041\mu\text{g/ml}$) και την οροπρωτεΐνη φύλλων ($\text{IC}_{50}=7167\mu\text{g/ml}$). Ενώ στην ρίζα περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) πιο ισχυρά ήταν τα σκέτα φύλλα ($\text{IC}_{50}=92.33\mu\text{g/ml}$) ακολουθούμενα από τα σκέτα κάστανα ($\text{IC}_{50}=335.8\mu\text{g/ml}$) και την οροπρωτεΐνη φύλλων ($\text{IC}_{50}=672.1\mu\text{g/ml}$).

Abstract

Free radicals are called the reactive species that possess an abundance of electrons in the outer layer. The most important free radicals are the reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. ROS/RNS have physiological functions in the cell, but in cases of overproduction they have been found to cause oxidative stress, which in turn has been associated with a variety of diseases. To combat oxidative stress, the organism uses antioxidants that can be produced endogenously or absorbed through diet.

Some of the major nutritional antioxidants are the polyphenols that are normally found in plants and plant products. Because of these substances, in recent years there has been a strong interest in antioxidant crops for use in nutrition, in the pharmaceutical industry, and in the production of cosmetics.

In the present study, polyphenolic extracts from *Castanea sativa* were tested for their ability to protect DNA damage caused by hydroxyl and peroxy radicals. The extracts were from leaves and chestnuts, and leaf and chestnut extracts encapsulated with whey protein and maltodextrin. In the peroxy radical assay, the antioxidant capacity of the extracts was strong, whereas in the hydroxyl it was significantly lower due to its increased oxidation capacity. The extract from leaves showed higher protective activity than the chestnut extracts.

The three best results against the hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) were those of the leaves ($\text{IC}_{50}=2124\mu\text{g/ml}$) followed by leaves maltodextrin ($\text{IC}_{50}=7041\mu\text{g/ml}$) and leaves whey protein ($\text{IC}_{50}=7167\mu\text{g/ml}$), whereas against the peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$) the best results were offered by the leaves ($\text{IC}_{50}=92.33\mu\text{g/ml}$), the chestnut nut ($\text{IC}_{50}=335.8\mu\text{g/ml}$) and the leaves whey protein ($\text{IC}_{50}=672.1\mu\text{g/ml}$).

1 Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες, ορίζονται τα δραστικά είδη που κατέχουν περιττό αριθμό ηλεκτρονίων στην εξωτερική στοιβάδα (Wade, 2010). Η παρουσία του ασύζευκτου αυτού ηλεκτρονίου οδηγεί στην ύπαρξη κάποιων κοινών ιδιοτήτων μεταξύ των περισσότερων ριζών. Οι περισσότερες ρίζες είναι δραστικά είδη με μικρή διάρκεια ζωής. Έχουν την ικανότητα είτε να δώσουν το “περιττό” τους ηλεκτρόνιο είτε να δεχθούν ένα ηλεκτρόνιο από κάποιο άλλο μόριο, έτσι ώστε να συμπληρώσουν οκτάδα, μπορούν δηλαδή να συμπεριφέρονται και ως οξειδωτικά αλλά και ως αναγωγικά είδη (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι ρίζες παράγονται συνεχόμενα στα κύτταρα από φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες, αλλά μπορούν να παραχθούν και από εξωτερικές πηγές. Μέσα στο κύτταρο οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν ενζυμικά και μη-ενζυμικά (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010). Η ενζυμική παραγωγή ριζών περιλαμβάνει διεργασίες όπως αυτήν της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ η μη-ενζυμική παραγωγή τους μπορεί να προκύψει από διαδικασίες όπως η αλληλεπίδραση του οξυγόνου με οργανικά συστατικά, ή αντιδράσεις ιονισμού. Εξωτερικές πηγές ελεύθερων ριζών αποτελούν μεταξύ άλλων: η έκθεση στο τσιγάρο, σε ακτίνες X, στο όζον, σε ατμοσφαιρικούς ρύπους καθώς και σε βιομηχανικά χημικά.

Τα πιο σημαντικά αντιδραστήρια στη βιοχημεία των ελεύθερων ριζών σε αερόβια κύτταρα, είναι το οξυγόνο και τα ριζικά παράγωγά του, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα μεταβατικά μέταλλα. Ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται εντός κυττάρων μπορούν να οξειδώσουν βιομόρια και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή τον τραυματισμό ιστού. Οι ρίζες μπορεί να έχουν πολλούς στόχους στο σώμα συμπεριλαμβανομένου και λιπιδίων, νουκλεϊκών οξέων, αλλά και πρωτεϊνών (Lobo et al., 2010). Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια ολοκληρωμένη σειρά αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών για να εμποδίσουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών ή να περιορίσουν τα επιβλαβή τους αποτελέσματα (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι δύο κυριότερες μορφές ελεύθερων είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS).

1.1.1 Δημιουργία Ελευθέρων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν με δύο τρόπους:

- ❖ Διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού του φυσιολογικού μορίου ή ατόμου. Ο ομοιοπολικός δεσμός σχηματίζεται όταν μοιράζεται ένα ζεύγος ηλεκτρονίων. Η διάσπαση του δεσμού μπορεί να είναι “ομολυτική” ή “ετερολυτική”. Στην ομολυτική διάσπαση ο δεσμός σπάει συμμετρικά με αποτέλεσμα κάθε θραύσμα να “παίρνει” ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίζονται οι ελεύθερες ρίζες. Αυτή η αντίδραση απαιτεί αρκετή ενέργεια για την διάσπαση του δεσμού, που μπορεί να προκύψει από υψηλή θερμοκρασία, UV ακτινοβολία, ή ιονίζουσα ακτινοβολία. Στην ετερολυτική διάσπαση το ένα θραύσμα διατηρεί και τα δύο ηλεκτρόνια.
- ❖ Ηλεκτρονική μεταφορά. Αποτελεί την πιο κοινή και σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Μπορεί να είναι αντίδραση οξειδωσης όπου χάνεται ένα ηλεκτρόνιο από ένα φυσιολογικό μόριο, ή αντίδραση αναγωγής όπου προστίθεται ένα ηλεκτρόνιο.

1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Οι δύο κυριότερες μορφές ελεύθερων ριζών είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προκύπτουν από την κυτταρική οξειδοαναγωγική διαδικασία.. Οι ROS και RNS σε χαμηλά έως και μέτρια επίπεδα είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό παίζοντας σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αποκρίσεις και την σωστή ανοσολογική λειτουργία, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες, το οποίο αποτελεί μια επιβλαβή διαδικασία που μπορεί να βλάψει όλες τις κυτταρικές δομές (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008).

Λόγω της μεγάλης δραστικότητας τους, οι ROS παρατηρούνται ως ένας καταρράκτης μεταβάσεων από το ένα είδος στο άλλο (Brieger, Schiavone, Miller Jr., & Krause, 2012). Η δημιουργία ROS και RNS στα κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί ενζυμικά και μη-ενζυμικά. Στις ενζυμικές αντιδράσεις παραγωγής τους περιλαμβάνονται η φαγοκυττάρωση, η σύνθεση προσταγλαδινών και το σύστημα του κυτοχρώματος P450 (Pham-Huy et al., 2008). Οι μη-ενζυμικές αφορούν αντιδράσεις του οξυγόνου με οργανικές ενώσεις, αντιδράσεις που προκαλούνται από

ιονίζουσα ακτινοβολία, και διαρροές κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια.

Χαρακτηριστικές ROS είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), του περοξυλίου (ROO^{\cdot}), και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Παρ' όλα αυτά οι ROS δεν είναι υποχρεωτικά ελεύθερες ρίζες, αλλά μπορεί να είναι και άλλα παράγωγα του οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωρικό οξύ ($HOCl$).

Radicals:	Non-Radicals:
$O_2^{\cdot-}$ Superoxide	H_2O_2 Hydrogen peroxide
OH^{\cdot} Hydroxyl	$HOCl^{\cdot}$ Hypochlorous acid
RO_2^{\cdot} Peroxyl	O_3 Ozone
RO^{\cdot} Alkoxy	1O_2 Singlet oxygen
HO_2^{\cdot} Hydroperoxyl	$ONOO^{\cdot}$ Peroxynitrite

Figure 1: Είδη ROS

1.2.1 OH^{\cdot}

Οι ρίζες υδροξυλίου είναι δραστικά είδη και επομένως βραχύβια. Η μεγάλη τους αυτή δραστικότητα, τα καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνα για τον οργανισμό. Μπορούν να παραχθούν από την διάσπαση υδροπεροξειδίου ($ROOH$) αλλά και ως παραπροϊόν του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ρίζες αυτές, έχουν την ικανότητα να βλάψουν όλους τους τύπους μακρομορίων και δεν μπορούν να διασπαστούν ενζυμικά (Reiter et al., 1995).

1.2.2 $O_2^{\cdot-}$

Το σουπεροξειδίο παράγεται με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο. Κατά κύριο λόγο παράγεται είτε ως παραπροϊόν μέσω της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας είτε στα φαγοκύτταρα μέσω του ενζύμου οξειδάση του NADPH για την άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Hayyan, Hashim, & AlNashef, 2016). Είναι μια βραχύβια ρίζα που δεν μπορεί να διαπεράσει εύκολα την μεμβράνη

Λόγω της μεγάλης του τοξικότητας, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν τα ένζυμα δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SOD), τα οποία μετατρέπουν το σουπεροξειδίο σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο, διατηρώντας έτσι το σουπεροξειδίο σε φυσιολογικά επίπεδα.

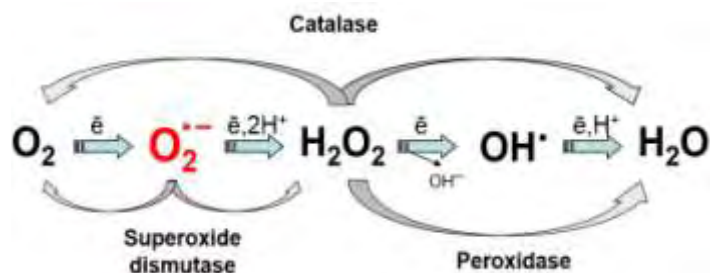


Figure 2: Παραγωγή και αποτοξικοποίηση του σουπεροξειδίου

1.2.3 ROO• και RO•

Οι ρίζες του περοξυλίου και αλκοξυλίου είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και εμπλέκονται κυρίως στην διαδικασία της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. Ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (π.χ. OH) δρα σε οργανικές ενώσεις με αποτέλεσμα την παραγωγή νέων ελεύθερων ριζών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το διάχυτο O₂ και σχηματίζουν ρίζες περοξυλίου. Στην συνέχεια, οι ROO• μετατρέπονται με την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από άλλο μόριο σε υπεροξείδια (ROOH) που μπορούν να διασπαστούν παρουσία μετάλλων μετάπτωσης και να δώσουν εκ νέου ROO• και RO•.

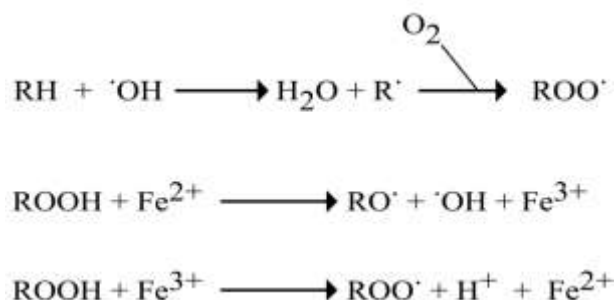


Figure 3: Δημιουργία ROO• και RO•

1.2.4 H₂O₂

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα ασταθές μόριο που αποσυντίθεται αργά παρουσία φωτός. Το H₂O₂ δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Είναι ένα αδύναμο οξειδωτικό το οποίο μπορεί να βλάψει άμεσα πρωτεΐνες και ένζυμα που έχουν ομάδες θειόλης. Παρά όλα αυτά η σημαντικότερη του ιδιότητα είναι το ότι μπορεί να περάσει εύκολα τις μεμβράνες (σε αντίθεση με το σουπεροξείδιο) και έτσι μπορεί να διανύσει σημαντική απόσταση μέχρι να αποσυντεθεί στην υψηλά δραστική ρίζα υδροξυλίου. Έτσι το H₂O₂ λειτουργεί κυρίως για την μετάδοση της ζημιάς που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες μεταξύ κυττάρων και κυτταρικών διαμερισμάτων (Young & Woodside, 2001). Το H₂O₂ μπορεί να διασπαστεί από καταλάσες και υπεροξειδάσες (Fig. 2).

1.3 Παραγωγή ROS

Τα ROS παράγονται ως αποτέλεσμα ενδοκυτταρικών αντιδράσεων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Παρά όλα αυτά, ROS μπορούν να παραχθούν και ως απόκριση σε εξωγενείς παράγοντες (Young & Woodside, 2001).

1.3.1 Ενδοκυτταρική Παραγωγή ROS

Οι ROS μπορούν να παραχθούν ενδοκυτταρικά από ένα πλήθος βιοχημικών αντιδράσεων μέσα στο κύτταρο και συγκεκριμένα μέσα σε κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξεισώματα, καθώς και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Μιτοχόνδρια:

Η παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια είναι αποτέλεσμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα ROS παράγονται σε διάφορα σημεία της κυτοχρωμικής αλυσίδας ως αποτέλεσμα “διαρροών” ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O_2 με την δράση του ενζύμου SOD. Στην συνέχεια μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

Ενδοπλασματικό Δίκτυο και Πυρήνας:

Ορισμένα υποκυτταρικά κλάσματα, όπως τα μικροσωμάτια και οι πυρήνες από διάφορους ιστούς, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 μετά από επώαση με NADPH ή NADH.

Στα μικροσωμάτια η δημιουργία $O_2^{\cdot-}$ προέρχεται από το σύστημα των κυτοχρωμάτων P-450, από όπου διαφεύγουν ηλεκτρόνια τα οποία καταλήγουν στο οξυγόνο μετατρέποντας το σε $O_2^{\cdot-}$.

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο τα ένζυμα του κυτοχρώματος P-450, b5 και η διαμίνηκη οξειδάση συμβάλλουν στο σχηματισμό του ROS. Ένα άλλο σημαντικό ένζυμο θειολικής οξειδάσης, το Ero1p καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από διθειόλες σε μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα το σχηματισμό H_2O_2 (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015).

Φαγοκυττάρωση:

Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα, έχουν την ικανότητα όταν διεγείρονται να πολλαπλασιάζουν τη φυσιολογική κατανάλωση οξυγόνου και

έτσι να παράγουν μεγάλες ποσότητες $O_2^{\bullet-}$, κάτι το οποίο ονομάζεται “αναπνευστική έκρηξη”. Το $O_2^{\bullet-}$ είναι αποτέλεσμα της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου, από ένα ηλεκτρόνιο, μέσω του ενζυμικού συμπλόκου NADPH οξειδάση.

Η NADPH οξειδάση, βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι αδρανής. Όταν τα φαγοκύτταρα διεγερθούν, η οξειδάση ενεργοποιείται και αυξάνεται έντονα η παραγωγή ROS (Babior, 2000). Η ενεργοποίηση αυτή πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης ενώσεων ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη των φαγοκυττάρων, τους TLR, οι οποίοι αναγνωρίζουν ένα πλήθος αντιγόνων που προέρχονται από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μεταβολισμός Εικοσανοειδών:

Στα εικοσανοειδή ανήκουν οι προσταγλανδίνες, τα λευκοτριένια και τα θρομβοξανία μεταξύ άλλων, διότι η βιοσύνθεσή τους ξεκινάει από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με είκοσι άτομα άνθρακα. Το σημαντικότερο απ’ αυτά τα λιπαρά οξέα είναι το αραχιδονικό οξύ, το οποίο κατά τον μεταβολισμό του προς εικοσανοειδή οδηγεί στην παραγωγή ROS.

Αιμοσφαιρίνη:

Περίπου το 3% της αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό οξειδώνεται καθημερινά από οξυαιμοσφαιρίνη σε μεθαιμοσφαιρίνη. Κατά την οξείδωση αυτή, πραγματοποιείται διαχωρισμός των ηλεκτρονίων μεταξύ του σιδήρου και του οξυγόνου της οξυαιμοσφαιρίνης, το οποίο μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να οδηγήσει στην διάσπαση και την απελευθέρωση $O_2^{\bullet-}$.

Οξειδάση της Ξανθίνης:

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης, αλλά και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, με ταυτόχρονη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 . Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι παραπάνω οξειδώσεις, καταλύονται από το ένζυμο αφυδρογονάση της ξανθίνης, το οποίο ανάγει το NAD^+ σε NADH και όχι το O_2 σε $O_2^{\bullet-}$. Η αφυδρογονάση σε συγκεκριμένες περιπτώσεις (π.χ. μετά από τραυματισμό των ιστών) μετατρέπεται σε οξειδάση και οδηγεί στην παραγωγή ROS.

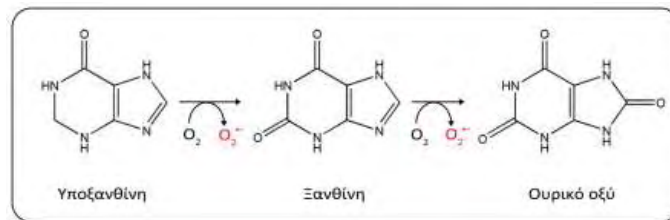


Figure 4: Στάδια οξείδωσης ξανθίνης

Αντιδράσεις Αυτό-οξείδωσης:

Πολλά μόρια με σημαντικούς βιολογικούς ρόλους (π.χ. θειολικές ενώσεις, αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη) παρουσία O₂, μπορούν να αυτό-οξειδωθούν και να σχηματίσουν O₂^{•-}. Το σχηματιζόμενο O₂^{•-} με την σειρά του, συμβάλλει στην περαιτέρω οξείδωση των εν λόγω ενώσεων. Οι αντιδράσεις αυτές ευνοούνται παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης (κυρίως σιδήρου).

1.3.2 Εξωκυτταρική Παραγωγή ROS

- ❖ Υπεριώδης ακτινοβολία (McCaughan, 1999).
- ❖ Ατμοσφαιρικοί ρύποι όπως το όζον και το διοξείδιο του αζώτου οδηγούν στον σχηματισμό ριζών και την μείωση αντιοξειδωτικών (Cross, van der Vliet, O'Neill, Louie, & Halliwell, 1994).
- ❖ Ο καπνός του τσιγάρου, ο οποίος περιέχει μικρές ποσότητες ελεύθερων ριζών καθώς και άλλες τοξίνες (Pourcelot et al., 1999).
- ❖ Φάρμακα μπορούν να προξενήσουν ανεπιθύμητες παρενέργειες, λόγω της πρόκλησης σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου στα κύτταρα.
- ❖ Διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες.

1.4 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) είναι μια οικογένεια ελεύθερων ριζών που προέρχονται από το νιτρικό οξίδιο (NO[•]) και το O₂^{•-} που παράγονται από το ένζυμο NO-συνθάση (NOS) και NADPH οξειδάση αντίστοιχα. Οι RNS μαζί με τις ROS σε χαμηλές έως και μέτριες συγκεντρώσεις είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό, όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λειτουργούν βλάπτοντας το κύτταρο.

Οι RNS παράγονται σε φυτά και ζώα. Στα φυτά παράγονται συνεχόμενα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού τους ή ως απόκριση στο στρες (Pauly et al., 2006). Στα ζώα οι RNS παράγονται αρχικά από την αντίδραση του NO[•] με το O₂^{•-} για τον σχηματισμό περοξυνιτρικού (ONOO⁻).

Το $O_2\cdot-$ αντιδρά γρήγορα με το $NO\cdot$ παράγοντας $ONOO^-$, με αποτέλεσμα την μείωση της βιοδραστικότητας του $NO\cdot$ το οποίο είναι βασικός μεσολαβητής σε διάφορες αγγειακές λειτουργίες. Το $ONOO^-$ είναι ένα πολύ δραστικό είδος που αλληλεπιδρά άμεσα με διάφορους βιολογικούς στόχους αλλά με αργό ρυθμό. Η καθυστέρηση αυτή προσφέρει στο $ONOO^-$ επιλεκτικότητα στους στόχους του. Στην συνέχεια το $ONOO^-$ μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια για να σχηματίσει άλλες RNS όπως για παράδειγμα το διοξείδιο του αζώτου ($NO_2\cdot$).

Το $ONOO^-$ μπορεί να αλληλεπιδράσει απευθείας με πρωτεΐνες που έχουν μεταβατικά μέταλλα και να τις τροποποιήσει δομικά αλλά και λειτουργικά.

1.5 Δράση ROS και RNS

1.5.1 Θετικές Δράσεις

Σε χαμηλές με μέτριες συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS είναι απαραίτητα στοιχεία για την ωρίμανση κυτταρικών δομών και μπορούν να λειτουργήσουν για την άμυνα του οργανισμού.

Στην άμυνα, τα φαγοκύτταρα απελευθερώνουν ROS για να καταστρέψουν παθογόνους οργανισμούς (Young & Woodside, 2001). Ταυτόχρονα το NO είναι σημαντικό για μη-ειδικευμένη άμυνα του οργανισμού και για την θανάτωση ενδοκυτταρικών παθογόνων και όγκων (PACHER, BECKMAN, & LIAUDET, 2007).

Οι ROS και RNS έχουν επίσης φυσιολογικούς ρόλους στην λειτουργία διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (PACHER et al., 2007). Το NO λειτουργεί ως ενδοκυτταρικό αγγειοφόρο για την ρύθμιση διαδικασιών όπως η ροή του αίματος, η θρόμβωση και η νευρική λειτουργία.

Έχει επίσης προταθεί ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οι ROS συμβάλλουν στον σχηματισμό και την αποθήκευση της μνήμης, μέσω επιγενετικών αλλαγών του DNA (Massaad & Klann, 2011).

Οι ROS επίσης, ρυθμίζουν μηχανισμούς σχετικά με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

1.5.2 Αρνητικές Δράσεις

Όταν οι ROS/RNS παράγονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να προκαλέσουν ένα φαινόμενο που λέγεται οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά τις κυτταρικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τις λιποπρωτεΐνες, καθώς και το DNA (Pham-Huy et al., 2008).

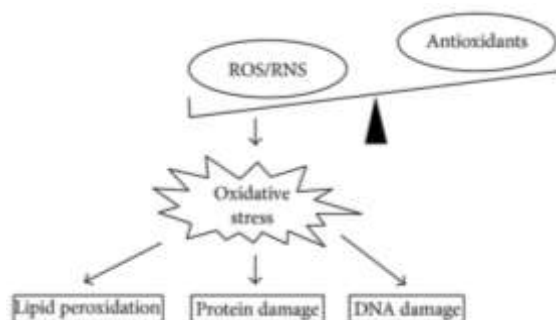


Figure 5: Οξειδωτικό στρες

Η υπερπαραγωγή ROS/RNS μπορεί να βλάψει τις κυτταρικές μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες, μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως υπεροξειδωση λιπιδίων (Pham-Huy et al., 2008). Κατά αυτήν την διεργασία οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν ηλεκτρόνια από τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την καταστροφή των κυττάρων. Η διαδικασία αυτή είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση ριζών, δηλαδή από την στιγμή που ξεκινήσει εξαπλώνεται γρήγορα και επηρεάζει έναν σημαντικό αριθμό λιπιδίων. Αποτελείται από τρία στάδια: την **έναρξη**, όπου παράγεται μια ρίζα λιπαρών οξέων ($L\cdot$) από μια ελεύθερη ρίζα (συνήθως ROS). Ακολουθεί η **διάδοση**, όπου η παραγόμενη ρίζα αλληλεπιδρά με μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας $LOO\cdot$ το οποίο με την σειρά του αλληλεπιδρά με ένα άλλο λιπαρό οξύ παράγοντας μια άλλη ρίζα λιπαρών οξέων και ένα λιπιδιακό υπεροξείδιο, ή κυκλικό υπεροξείδιο. Τέλος είναι ο **τερματισμός**, όπου αλληλεπιδρούν δύο ρίζες μεταξύ τους και παράγουν μια μη-ρίζα. Ο τερματισμός πραγματοποιείται όταν η συγκέντρωση των ριζών είναι αρκετά υψηλή. Ένας άλλος τρόπος τερματισμού είναι μέσω προστατευτικών συστημάτων των οργανισμών που εξουδετερώνουν τις ρίζες.

Οι ROS/RNS μπορούν να βλάψουν και πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα δομικές αλλαγές και απώλεια λειτουργίας (Halliwell, 2007). Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν θραύση της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλαγή του ηλεκτρικού φορτίου, σύνδεση πρωτεϊνών και οξείδωση αμινοξέων, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πρωτεόλυσης από συγκεκριμένες πρωτεάσες (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012). Οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες εμπλέκονται στους μοριακούς

μηχανισμούς μιας σειράς διαφορετικών ασθενειών, αλλά και στη φυσιολογική εξέλιξη της γήρανσης, ενώ όλες σχεδόν οι κυτταρικές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να αποτελέσουν στόχους για τις ελεύθερες ρίζες.

Οι ROS/RNS μπορούν να διαφοροποιήσουν το DNA με πολλούς τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν αποικοδόμηση βάσεων, μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα, τροποποιήσεις σε πουρίνες και πυριμιδίνες, μεταλλάξεις, διαγραφές ή μετατοπίσεις (Birben et al., 2012). Οι περισσότερες από αυτές τις τροποποιήσεις έχουν συσχετιστεί με την γήρανση, την καρκινογένεση, καθώς και πολλές άλλες ασθένειες. Η ρίζα υδροξυλίου είναι η κυριότερη ROS που προκαλεί βλάβες στο DNA. Μια από τις σημαντικότερες βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο DNA είναι ο σχηματισμός της 8-υδροξυγουανωσύνης (8-OH-G) η οποία έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο. Αυτές οι δράσεις των ROS/RNS παραβιάζουν την σωστή κυτταρική λειτουργία καταλήγοντας στον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης.

1.6 Οξειδωτικό Στρες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από την υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών. Εντούτοις, το οξειδωτικό στρες δημιουργείται όταν η ισορροπία μεταξύ ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών κλίνει προς το πρώτο. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε υπερπαραγωγής των ελεύθερων ριζών, είτε μειωμένης αντιοξειδωτικής προστασίας. Το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος βλαβών στον οργανισμό μέσω μείωσης των αμυντικών συστημάτων και οξείδωση διάφορων μοριακών στόχων κυρίως, λιπίδια (καταστροφή μεμβρανών και λύση κυττάρων), πρωτεΐνες και DNA με τους μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν.

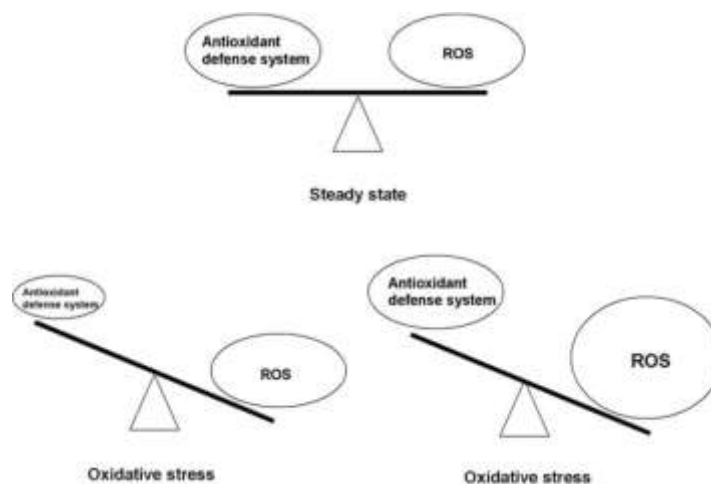


Figure 6: Δημιουργία οξειδωτικού στρες

Διάφοροι εξωτερικοί παράγοντες όπως ένα τραύμα, μια μόλυνση, η υπερβολική ζέστη, τοξίνες, καθώς η υπερβολική άσκηση, μπορούν να προκαλέσουν μικρής διάρκειας οξειδωτικό στρες (Lobo et al., 2010). Σε αυτούς του τραυματισμένους ιστούς, τα ένζυμα παραγωγής ριζών αυξάνονται (π.χ. μονοπάτι οξειδάσης της ξανθίνης), ενεργοποιούνται τα φαγοκύτταρα, ελευθερώνεται ελεύθερος σίδηρος, ελευθερώνονται ιόντα χαλκού, διαταράσσεται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, όλα με αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής ROS.

Τα αποτελέσματα του στρες σχετίζονται με το μέγεθος των αλλαγών που το προκαλούν. Μικρές διαταραχές είναι εύκολα αντιμετωπίσιμες από το κύτταρο, το οποίο επιστρέφει σύντομα στην φυσιολογική του κατάσταση. Μεγάλου βαθμού οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, ενώ ακόμη και μέτριου βαθμού οξείδωση μπορεί να ενεργοποιήσει την απόπτωση, με πιο έντονη οξείδωση να καταλήγει στην νέκρωση (Lennon, Martin, & Cotter, 1991).

Τα περισσότερα μακρόχρονα προβλήματα που δημιουργεί το οξειδωτικό στρες οφείλονται σε βλάβες που προκαλεί στο DNA (Evans & Cooke, 2004). Οι επιπτώσεις από τις βλάβες στο DNA μπορεί να είναι πολλαπλές, ανάλογα με το είδος και την ένταση των βλαβών. Συνεπώς, αν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA αποτύχουν, τότε αρχίζει η διαδικασία της απόπτωσης. Αν πάλι η βλάβη είναι τόσο εκτεταμένη ώστε να εμποδίζει και την διαδικασία της απόπτωσης, τότε γίνεται νέκρωση του κυττάρου.

Ως **απόπτωση** ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και υπό φυσιολογικές συνθήκες αποτελεί τμήμα της διαδικασίας συντήρησης και ανανέωσης των ιστών. Το αποτέλεσμα της απόπτωσης είναι η αποφυγή της μεταφοράς της κυτταρικής βλάβης στις επόμενες γενιές κυττάρων, χωρίς όμως να γίνεται νέκρωση.

Σε περιπτώσεις μη-αντιστρέψιμης βλάβης θα συμβεί **νέκρωση**. Ως νέκρωση ορίζεται ο πρόωρος θάνατος κυττάρων σε έναν ζωντανό ιστό μέσω της διαδικασίας της αυτόλυσης. Ενώ η απόπτωση μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό, η νέκρωση είναι σχεδόν πάντα αρνητική και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο.

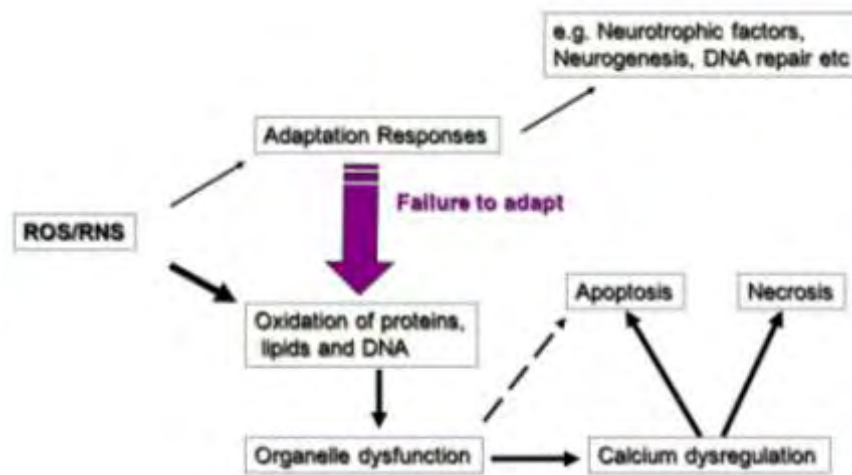


Figure 7: Απόκριση στο οξειδωτικό στρες

1.7 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικά ονομάζονται μόρια τα οποία μπορούν να εξουδετερώσουν την περίσσεια ελευθέρων ριζών ώστε να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και να συμβάλλουν στην πρόληψη των ασθενειών (Pham-Huy et al., 2008). Τα αντιοξειδωτικά καθυστερούν ή αναστέλλουν την κυτταρική βλάβη μέσω της ιδιότητας τους να βρίσκουν και να εξουδετερώνουν τις ρίζες (Halliwell, 1995). Κάποια αντιοξειδωτικά όπως είναι η γλουταθειόνη, η ουμπικινόλη και το ουρικό οξύ, παράγονται στο σώμα μέσω του μεταβολισμού (ενδογενή), ενώ άλλα, πιο ελαφρά, τα προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής (εξωγενή).

Έχουν προταθεί δύο κύριοι μηχανισμοί λειτουργίας των αντιοξειδωτικών (Rice-Evans & Diplock, 1993). Ο πρώτος είναι ένας μηχανισμός σπασίματος της αλυσίδας όπου το κύριο αντιοξειδωτικό δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα ή δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από αυτήν με αποτέλεσμα τον σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων (Young & Woodside, 2001). Ο δεύτερος μηχανισμός (δευτερεύον αντιοξειδωτικά) περιλαμβάνει την αφαίρεση των εκκινητών των ROS/RNS (Rice-Evans & Diplock, 1993). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ασκήσουν την επίδρασή τους στα βιολογικά συστήματα και με διαφορετικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της δωρεάς ηλεκτρονίων, της αποσιδήρωσης μεταλλικών ιόντων, των συν-αντιοξειδωτικών ή μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Krinsky, 1992).

Εκτός από εξωγενή και ενδογενή, τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται περαιτέρω σε ενζυμικά και μη-ενζυμικά, με τα εξωγενή (αντιοξειδωτικά που παίρνουμε από την διατροφή) να ανήκουν στην μη-ενζυμική κατηγορία..

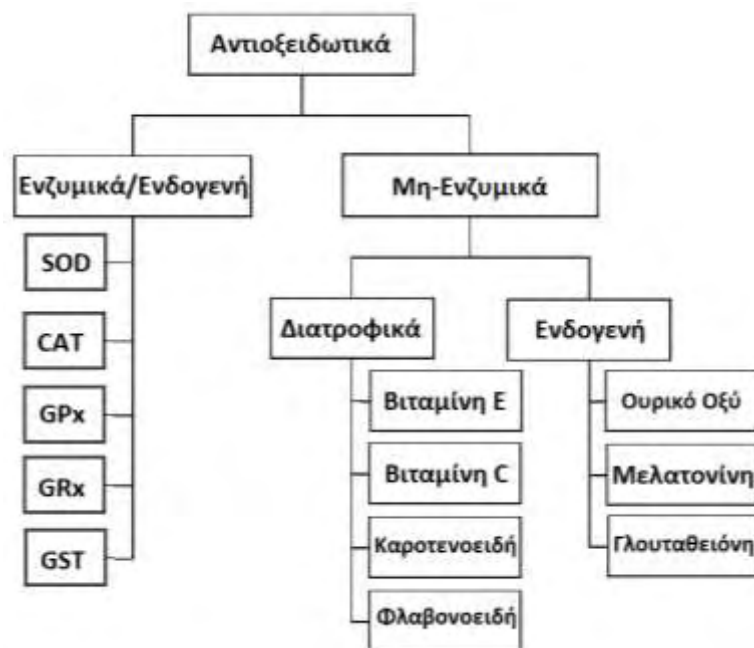


Figure 8: Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

1.7.1 Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD):

Οι SOD είναι μια τάξη ενζύμων που καταλύουν την μετατροπή του $O_2^{\cdot-}$ σε οξυγόνο και H_2O_2 και βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα αερόβια κύτταρα (Johnson & Giulivi, 2005). Ανάλογα με τον μεταλλικό συν-παραγοντα τους οι SOD χωρίζονται σε τρεις κύριες οικογένειες:

- ❖ Την SOD1/CuZnSOD: η οποία δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο και βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα.
- ❖ Την SOD2/MnSOD/FeSOD: η MnSOD δεσμεύει μαγγάνιο και βρίσκεται στα περισσότερα μιτοχόνδρια, ενώ η FeSOD βρίσκεται σε κάποια βακτήρια καθώς και σε χλωροπλάστες και δεσμεύει σίδηρο
- ❖ Την SOD3/ECSOD: η οποία δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο και είναι εξωκυτταρική.

Καταλάση:

Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο που υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται στο οξυγόνο και λειτουργεί για την διάσπαση του H_2O_2 σε οξυγόνο και νερό. Η καταλάση περιέχει ένα μόριο NADPH για την προστασία της από το H_2O_2 .

Σύστημα γλουταθειόνης:

Στο σύστημα περιλαμβάνονται η γλουταθειόνη (GSH), οι αναγωγάσες της γλουταθειόνης (GRx), οι περοξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx) και οι S-τρανσφεράσες (GST) της γλουταθειόνης. Το σύστημα αυτό βρίσκεται σε ζώα, φυτά, καθώς και μικροοργανισμούς.

- ❖ Η GPx καταλύει την διάσπαση του H_2O_2 και οργανικών υδροπεροξειδίων. Αυτό το επιτυγχάνει κατά την οξείδωση της GSH. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της είναι στο συκώτι
- ❖ Η GST έχουν μεγάλη δράση στα λιπιδιακά Σξείδια. Τα υψηλότερα τους επίπεδα είναι στο συκώτι και συμμετέχουν και στην αποτοξίνωση του μεταβολισμού (Hayes, Flanagan, & Jowsey, 2005).
- ❖ Η GRx είναι ένα ένζυμο εξαρτώμενο από νουκλεοτίδια φλαβίνης το οποίο έχει ανάλογη κατανομή στους ιστούς με την GPx.

1.7.2 Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Προσλαμβανόμενα από τη διατροφή:

Ασκορβικό οξύ – Βιταμίνη C:

Μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και αναγωγικό μέσο που δουλεύει συνεργατικά με την βιταμίνη E ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, καθώς και αναγεννά την ανηγμένη μορφή της βιταμίνης E.

Βιταμίνη E:

Μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελεί την κύρια άμυνα των μεμβρανών έναντι στο οξειδωτικό στρες (Birben et al., 2012). Η βιταμίνη E δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην ρίζα $ROO\cdot$.

Καροτενοειδή:

Είναι λιποδιαλυτές προ-βιταμίνες (γιατί μπορούν να μετατραπούν σε ενεργή βιταμίνη A) που βρίσκονται στα φυτά. Το β-καροτένιο έχει βρεθεί ότι αντιδρά με το $ROO\cdot$, το $OH\cdot$ και το $O_2\cdot^-$.

Φλαβονοειδή:

Είναι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα περισσότερα φυτά. Κάθε φυτό κατέχει διαφορετικούς συνδυασμούς φλαβονοειδών.

Ενδογενή:

Ουρικό οξύ:

Αντιστοιχεί περίπου στην μισή αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος.

Μελατονίνη:

Είναι μια ορμόνη που βρίσκεται κυρίως σε ζώα. Είναι ένα δυνατό αντιοξειδωτικό που μπορεί να διαπεράσει εύκολα μεμβράνες. Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά, η μελατονίνη από την στιγμή που οξειδωθεί δεν μπορεί να ξαναγυρίσει στην προηγούμενη της μορφή, γιατί σχηματίζει διάφορα σταθερά προϊόντα με τις ελεύθερες ρίζες.

Γλουταθειόνη:

Είναι ένα πεπτίδιο που περιέχει κυστεΐνη και βρίσκεται στους περισσότερους αερόβιους οργανισμούς. Είναι ένα αναγωγικό μέσο και ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά.

1.8 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια δομική ομάδα κυρίως φυσικών, αλλά και τεχνητών, οργανικών χημικών που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη φαινολικών ομάδων. Η φαινολική ομάδα αποτελείται από μια λειτουργική υδροξυλομάδα πάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα με ένα άτομο άνθρακα ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων.

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης και είναι σημαντικά αντιοξειδωτικά. Εμπλέκονται στην άμυνα έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, στην προστασία από παθογόνα καθώς και στην προστασία από την ελεύθερες ρίζες (Ganesan & Xu, 2017). Βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια και αφεψήματα. Στο φαγητό οι πολυφαινόλες μπορούν να σχετίζονται με την πικρία, το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα (Pandey & Rizvi, 2009).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση πολυφαινολών προσφέρει προστασία έναντι ορισμένων χρόνιων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος,

καρδιαγγειακές παθήσεις, εγκεφαλοαγγειακές παθήσεις, διαβήτης, γήρανση και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Ganesan & Xu, 2017).

1.8.1 Τάξεις Πολυφαινολών

Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις σε διάφορα φυτά. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη ή ένα στενό πρόδρομο, το σκιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την προέλευση τους, την βιολογική λειτουργία, καθώς και την χημική δομή τους. Με βάση την χημική δομή χωρίζονται ως συνάρτηση του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων που δεσμεύουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες ομάδες είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και οι λιγνάνες.

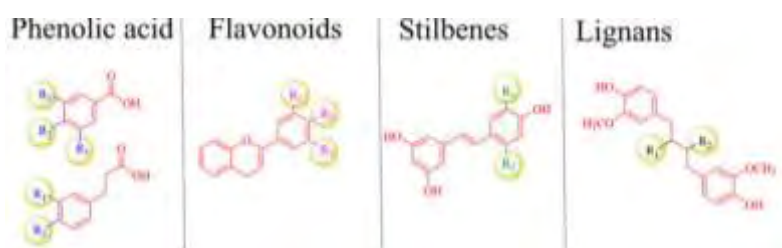


Figure 9: Κατηγορίες πολυφαινολών.

Φλαβονοειδή:

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο καλά μελετημένη ομάδα πολυφαινολών. Τα άτομα σε αυτήν την ομάδα έχουν δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Με βάση το διαφορετικό ετερόκυκλο που έχουν, τα φλαβονοειδή μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες. Σε κάθε ομάδα παρατηρούνται κάποιες διαφορές λόγω της διακύμανσης του αριθμού και της διευθέτησης των υδροξυλικών ομάδων καθώς και την έκταση της αλκυλίωσης και της γλυκοζυλίωσης (Spencer, Abd El Mohsen, Minihane, & Mathers, 2008). Τα φλαβονοειδή έχουν πιθανό ρόλο στην καταπολέμηση των ελεύθερων ριζών και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Φαινολικά οξέα:

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στα φαγητά και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: παράγωγα βενζοϊκού οξέος (υδροξυβενζοϊκά οξέα) και παράγωγα κινναμωμικού οξέος (υδροξυκινναμικά οξέα).

Στιλβένια:

Τα στιλβένια περιέχουν δύο φαινύλια που συνδέονται με γέφυρα μεθυλενίου δύο ανθράκων. Η συχνότητα των στιλβενίων στην ανθρώπινη διατροφή είναι χαμηλή με κύρια πηγή τους να είναι τα σταφύλια/κόκκινο κρασί και τα φιστίκια. Τα περισσότερα στιλβένια στα φυτά παράγονται ως απόκριση σε τραύμα ή μόλυνση (Pandey & Rizvi, 2009).

Λιγνάνες:

Οι λιγνάνες είναι διφαινολικές ενώσεις που περιέχουν μια δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου που σχηματίζεται με τον διμερισμό δύο υπολειμμάτων κινναμωμικού οξέος. Αρκετές λιγνάνες, όπως η σεκοΐσολαρσιριζίνη, θεωρούνται φυτοοιστρογόνα. Βρίσκονται σε σπόρους όπως το λινάρι, τα όσπρια, τα δημητριακά, τα φρούτα, τα άλγη και ορισμένα λαχανικά.

1.8.2 Συχνότητα και Περιεχόμενο

Η κατανομή των φαινολών στους ιστούς, στα κυτταρικά και τα υποκυτταρικά επίπεδα δεν είναι η ίδια. Κάποιες πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα, ενώ άλλες όπως οι φλαβόνες και οι ισοφλαβόνες είναι συγκεκριμένες σε κάποια τρόφιμα (Pandey & Rizvi, 2009).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα τρόφιμα περιέχουν ένα συνδυασμό πολυφαινολών. Τα εξωτερικά τμήματα των φυτών τείνουν να είναι πλουσιότερα σε φαινολικές ενώσεις από τα εσωτερικά.

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το περιεχόμενο των φυτών σε φαινόλες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ωριμότητα (όσο πιο ώριμο το φρούτο τόσο μειώνεται η περιεκτικότητα του σε φαινολικά οξέα και τόσο μεγαλώνει σε ανθοκυανίνη), περιβαλλοντικοί παράγοντες (π.χ. είδος εδάφους, έκθεση στον ήλιο, βροχή), η επεξεργασία, η μαγειρική (μείωση περιεκτικότητας) καθώς και η αποθήκευση (Pandey & Rizvi, 2009).

Κατά την αποθήκευση η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες του φυτού αλλάζει λόγω της οξειδωσης τους (Pandey & Rizvi, 2009). Οι αντιδράσεις οξειδωσης έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό περισσότερων ή λιγότερων πολυμερισμένων ουσιών, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην ποιότητα των τροφίμων, ιδίως στο χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να είναι θετικές (π.χ. μαύρο τσάι) ή αρνητικές (π.χ. φρούτα). Η αποθήκευση όμως των φυτών σε κρύες συνθήκες, έχει μικρή επίδραση στην περιεκτικότητά τους.

1.8.3 Βιοδιαθεσιμότητα

Βιοδιαθεσιμότητα ονομάζεται το ποσοστό της θρεπτικής ουσίας χωνεύεται, απορροφάται και μεταβολίζεται μέσω φυσιολογικών οδών. Η βιοδιαθεσιμότητα κάθε πολυφαινόλης διαφέρει, ενώ ταυτόχρονα δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της ποσότητας τους στο φαγητό και της βιοδιαθεσιμότητας τους στο ανθρώπινο σώμα (Pandey & Rizvi, 2009). Ο ρυθμός, η έκταση της απορρόφησης και η φύση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο πλάσμα καθορίζονται από την χημική δομή των πολυφαινολών και όχι από την συγκέντρωσή τους.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες βρίσκονται στο φαγητό σε μορφή εστέρων, γλυκοσιδίων, ή και πολυμερών και δεν μπορούν να απορροφηθούν σε αυτήν την μορφή. Για να μπορούν να απορροφηθούν αρχικά υδρολύονται από εντερικά ένζυμα ή από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Κατά την διάρκεια της απορρόφησης οι πολυφαινόλες υφίστανται αρκετές τροποποιήσεις και διαφοροποιούνται αρκετά από την μορφή που έχουν στην τροφή.

Οι βιολογικές ιδιότητες μεταξύ πολυφαινολών διαφέρουν αρκετά, όπως και τα σημεία απορρόφησης τους στον άνθρωπο (Pandey & Rizvi, 2009).

1.8.4 Πολυφαινόλες και Υγεία

Τα θετικά στοιχεία των πολυφαινολών εξαρτώνται και από την πρόσληψη αλλά και από την βιοδιαθεσιμότητα τους (D'Archivio et al., 2007).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως μια διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες μειώνει τον κίνδυνο χρόνιων ασθενειών (Scalbert, Manach, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2005). Οι φαινολικές ομάδες των πολυφαινολών μπορούν να δεχθούν ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματίσουν τις σχετικά σταθερές ρίζες φαινοξυλίου, με αποτέλεσμα να σταματούν την αλυσίδα οξειδώσεων στα κύτταρα.

Τροφές και αφεψήματα πλούσια σε πολυφαινόλες μπορούν να αυξήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Η αύξηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί:

- ❖ Με την παρουσία αναγωγικών πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα.
- ❖ Με την επίδραση τους στις συγκεντρώσεις άλλων αναγωγικών παραγόντων.
- ❖ Με την επίδραση τους στην απορρόφηση προ-οξειδωτικών συστατικών της τροφής, όπως το σίδηρο.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που στηρίζουν την θεωρία ότι μέσω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας οι πολυφαινόλες προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από

οξειδωτικές βλάβες, με αποτέλεσμα την πτώση του κινδύνου εμφάνισης διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Luqman & Rizvi, 2006).

Συμπερασματικά, οι πολυφαινόλες ή οι πλούσια σε πολυφαινόλες διατροφή παρέχουν σημαντική προστασία κατά της ανάπτυξης και της εξέλιξης πολλών χρόνιων παθολογικών καταστάσεων, όπως του καρκίνου, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών προβλημάτων και της γήρανσης (Pandey & Rizvi, 2009).

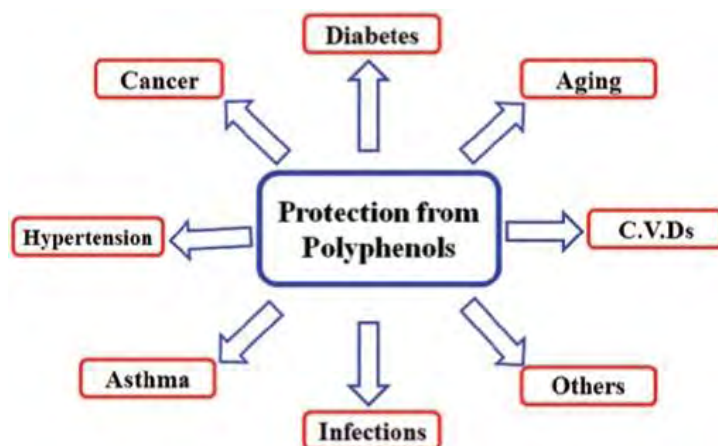


Figure 10: Θετικά πολυφαινολών στην υγεία

1.9 Καστανιά

Οι καστανιές είναι δέντρα και θάμνοι που ανήκουν στο γένος *Castanea* στην οικογένεια *Fagaceae*. Τα τέσσερα κύρια είδη *Castanea* είναι η αμερικάνικη (*Castanea dentata*, *Castanea pumila*), η ευρωπαϊκή (*Castanea sativa*), η κινέζικη (*Castanea mollissima*, *Castanea henryi*, *Castanea seguinii*) και η ιαπωνική καστανιά (*Castanea crenata*).

Το ύψος των δέντρων/θάμνων διαφέρει ανάλογα με το είδος με την Αμερικάνικη να είναι η υψηλότερη ακολουθούμενη από την ευρωπαϊκή, την κινέζικη και τέλος την ιαπωνική που έχει το χαμηλότερο ύψος. Όσον αφορά τους καρπούς, η ευρωπαϊκή έχει τους καλύτερους καρπούς, η αμερικάνικη όπως και η κινέζικη έχουν πολύ μικρούς καρπούς, ενώ η ιαπωνική εξαρτάται από την ποικιλία.

Η *Castagnu dê Centu Cavaddi* είναι η γυραιότερη (2000-4000 ετών) και μεγαλύτερη (57.9 m) καστανιά στον κόσμο. Βρίσκεται στην Σικελία και ανήκει στο είδος *Castanea Sativa*.

Οι καστανιές παράγουν καλύτερους καρπούς όταν υποβάλλονται σε ψυχρές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της αδρανοποιημένης περιόδου. Οι παγετοί και οι χιονοπτώσεις είναι επωφελείς και όχι επιβλαβείς για τα δέντρα. Δεν μπορούν να αναπαραχθούν μόνα τους, επομένως χρειάζονται τουλάχιστον δύο δέντρα για επικονίαση.

Τα κάστανα έχουν μικρή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ή λίπος και δεν περιέχουν γλουτένη, ενώ οι θερμίδες τους προέρχονται κυρίως από υδατάνθρακες. Η περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες, συγκρίνεται με αυτήν του σιταριού και του ρυζιού. Περιέχουν περίπου 8% από διάφορα σάκχαρα (π.χ. σουκρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) και έχουν και βιταμίνη C η οποία όμως μειώνεται σημαντικά με το ψήσιμο. Επίσης περιέχουν αμινοξέα (κυρίως ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ) και φαινολικές ενώσεις.

Η καστανιά βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους κλάδους, κυρίως:

- ❖ Στην διατροφή. Ο καρπός μπορεί να φαγωθεί ωμός και ψημένος, αλλά μπορεί και να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή άλλων τροφών (π.χ. ψωμιού).
- ❖ Στην ξυλεία. Συνήθως για μικρότερες κατασκευές ή για διακόσμηση
- ❖ Ως καυσόξυλο.
- ❖ Τροφή από διάφορα ζώα εκτός του ανθρώπου στην φύση.
- ❖ Στην επεξεργασία δέρματος, πριν την ανακάλυψη νέων μεθόδων.
- ❖ Επίσης στο παρελθόν η *Castanea sativa* ήταν μια πηγή φαρμάκων. Τα φύλλα, τα κλαδιά, ο φλοιός, τα κάστανα, είναι καλά στυπτικά, τα οποία προκαλούν τη σύσπαση των βλεννογόνων μεμβρανών και του δέρματος. Έτσι η καστανιά χρησιμοποιήθηκε μεταξύ άλλων για τον έλεγχο της αιμορραγίας και την επούλωση πληγών. Τα φύλλα, χρησιμοποιήθηκαν σε τσάι για να καταπραΰνουν τον ερεθισμένο λαιμό και στην ανακούφιση από συμπτώματα βήχα και κρυολογήματα. Επιπλέον έχουν αντί-μικροβιακές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην παραγωγή καλλυντικών.

1.9.1 Ευρωπαϊκή Καστανιά (*Castanea Sativa*)

Η *C. Sativa* προήλθε από την ανατολική μεσογειακή περιοχή πριν από 90.000.000 χρόνια και μετά εξαπλώθηκε στην υπόλοιπη Ευρώπη. Γύρω στο 900-700 π.Χ. ξεκίνησε η καλλιέργεια της καστανιάς σε Ασιατικές περιοχές και ακολούθησε η καλλιέργεια της *C. Sativa* στην Ελλάδα από την οποία το υιοθέτησαν οι Ρωμαίοι και

ακολούθησε η υπόλοιπη Ευρώπη. Η βασική περιεκτικότητα των κάστανων της *C. Sativa* είναι η εξής (De Vasconcelos, Bennett, Rosa, & Ferreira-Cardoso, 2010):

- ❖ Υδατάνθρακες (το κύριο συστατικό). Κυρίως άμυλο, με την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη να αποτελούν περίπου το 33% και το 67% του αντίστοιχα.
- ❖ Σάκχαρα. Με κυριότερο την σουκρόζη η οποία μπορεί να φτάσει μέχρι το ένα τρίτο των συνολικών σακχάρων του φυτού. Επίσης περιέχει και διάφορους άλλους μονο- και δι-σακχαρίτες όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη.
- ❖ Μικρές ποσότητες μόνο- (MUFA) και πολύ- (PUFA) ακόρεστων λιπαρών καθώς και ακατέργαστων πρωτεϊνών.
- ❖ Αμινοξέα. Κυρίως ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ.
- ❖ Βιταμίνες. Τα κάστανα περιέχουν βιταμίνη C που ανάλογα με την προτεινόμενη καθημερινή δόση (RDI) είναι 20.8% για τα αρσενικά και 17.3% για τα θηλυκά και βιταμίνη E με RDI 12.7% (De Vasconcelos et al., 2010). Το κάστανο περιέχει επίσης βιταμίνη A.
- ❖ Μεταλλικά στοιχεία. Η σύνθεση του κάστανου σε μεταλλικά στοιχεία, εξαρτάται από τον γενότυπο, τον καιρό και από το έδαφος. Περιέχει μακροστοιχεία (Ca, P, K, Mg, S), με κυριότερο το κάλιο και μικροστοιχεία (Fe, Cu, Zn and Mn) (De Vasconcelos et al., 2010).
- ❖ Φαινολικές ενώσεις.

1.9.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα της *C. Sativa*

Η αντιοξειδωτική ικανότητα της *Castanea Sativa* οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητα των κάστανων της σε, βιταμίνη C, βιταμίνη E και σε φαινολικές, καθώς και των φύλλων, ανθών και του φλοιού σε φαινολικές ενώσεις. Έχει βρεθεί μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του φυτού σε πολυφαινόλες και της αντιοξειδωτικής του ικανότητας (Ryan et al., 1999).

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που παρατηρούνται στα προαναφερθέντα τμήματα της *Castanea Sativa* (άνθος, φύλλο, κάστανο, φλοιός) είναι βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, φλαβονοειδή, καθώς και δομές ελλαγικού και γαλλικού οξέος (Díaz-Reinoso, Moure, Domínguez, & Parajó, 2011). Τα κύρια φλαβονοειδή των φύλλων είναι η κερκετίνη, η ρουτίνη και η απιγενίνη (Basile et al., 2000).

Τα διάφορα τμήματα του φυτού εμφανίζουν διακυμάνσεις ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Έχει βρεθεί, ότι τα λουλούδια, τα φύλλα και ο φλοιός έχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ τα κάστανα την χαμηλότερη

(João C. M. Barreira, Ferreira, Oliveira, & Pereira, 2008; Mujic et al., 2011; Živković et al., 2010). Συγκεκριμένα, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες η σειρά από την μεγαλύτερη προς την μικρότερη έχει ως εξής: εξωτερικός φλοιός > εσωτερικός φλοιός > λουλούδια > φύλλα >>> κάστανα (João C. M. Barreira et al., 2008). Επίσης έχει βρεθεί ότι το κλίμα μπορεί να επηρεάσει την πολυφαινολική σύσταση του φυτού, συγκεκριμένα το κρύο περιβάλλον είναι πιο θετικό για την πολυφαινολική σύσταση, δηλαδή καστανιές που αναπτύσσονται με πιο χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρείται να έχουν μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (Dinis et al., 2012)

2 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση, με τη χρήση μοριακών μεθόδων, της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων του φυτού “Ευρωπαϊκή καστανιά” (*C. Sativa*). Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων εξετάστηκε έναντι βλαβών στο DNA, προκαλούμενες από ελεύθερες ρίζες.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων προκαλούμενες από ρίζες περοξυλίου (ROO•) και υδροξυλίου (OH•).

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν ήταν: πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων, πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη.

3 Μεθοδολογία

3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%), το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase), το διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA), αιθανόλη 70%, προπανόλη και το θρεπτικό μέσο LB Broth. Δημιουργούνται 3 διαλύματα: το Solution 1(0.9gr glucose, 0.303gr Tris, 2ml EDTA 0.5M) Solution 2 (0.8gr NaOH, 1gr SDS) Solution 3 (29.44gr potassium acetate, 11.5ml acetic acid 28.5ml H₂O).

Αρχικά δημιουργείται σε κωνική φιάλη το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας που περιέχει 200ml H₂O, 3gr LB Broth και 2gr NaCl και ακολουθεί αποστείρωση. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται αμπικιλίνη 200μl.

Στην συνέχεια, σε δύο falcon προστίθενται από 5ml θρεπτικού και επιμολύνονται με μικρή ποσότητα βακτηρίων E. Coli. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται για τέσσερις ώρες και μετά μεταφέρονται στην μεγάλη, όπου και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές.

Η καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερα falcon των 50ml και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4°C και στις 4000 στροφές, όπου μετά το πέρας πετιέται το υπερκείμενο. Ακολουθεί προσθήκη 4ml Solution 1, διάλυση του ιζήματος μέσω ανάδευσης με πιπέτα, σύντομο vortex και τοποθέτηση σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά.

Προστίθενται 8ml Solution 2 και αναδεύονται απαλά μέχρι το εσωτερικό του falcon να γίνει διαυγές, όπου και προστίθενται 6ml Solution 3 και αναδεύονται απαλά. Ακολουθεί επώαση για 7-8λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετά το πέρας της οποίας φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στους 4°C και στις 5000 στροφές. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως και ξανά μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα με ταυτόχρονη προσθήκη 60% του όγκου του σε προπανόλη και αναδεύεται έντονα. Αφήνεται για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, απόχυση του περιεχομένου, προσθήκη 50% του όγκου του σε αιθανόλη 70% και ανάδευση. Τέλος τα falcon φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά, αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C για να στεγνώσει, όπου και διαλύεται σε TE 1.5ml στο οποίο προστίθεται RNase 10μg/ml για την διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 $\mu\text{g/mL}$ ($1\text{OD}_{260} \rightarrow 50 \mu\text{g/mL}$). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι $>1,8$ η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 $\mu\text{g/mL}$ βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C .

3.2 Επαγόμενη από Ρίζες Υδροξυλίου (OH^\cdot) Πρόκληση Μονοκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.

Πλασμιδιακό DNA και Διαμορφώσεις

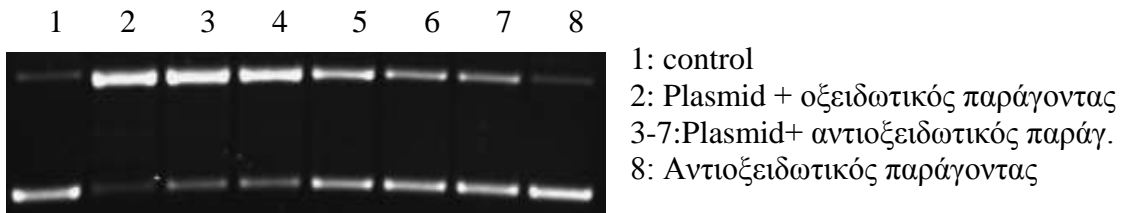
Το πλασμιδιακό DNA, είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA το οποίο βρίσκεται κυρίως σε βακτήρια και έχει την ικανότητα να αυτοδιπλασιάζεται από μόνο του. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα από πλασμιδιακό DNA τα οποία τα βοηθούν να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες, γιατί φέρουν συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Ακόμη με την βοήθεια των πλασμιδίων να μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο, δίνεται η δυνατότητα να μεταφέρονται πληροφορίες οι οποίες συμβάλλουν στην επιβίωσή τους.

Όταν το πλασμιδιακό DNA τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις.

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

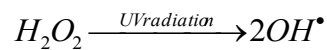
3. Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης. Επομένως το υπερελικωμένο τρέχει πρώτο, δεύτερο το γραμμικό και τρίτο το ανοιχτό κυκλικό.



Ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) και παραγωγή τους από φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

Η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂ παρουσία UV ακτινοβολίας διασπάται και δίνει ρίζες OH[•] οι οποίες είναι πολύ δραστικές προσβάλλοντας τόσο το DNA προκαλώντας σπασίματα, όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.



Πειραματική Διαδικασία

Διαλύματα

EDTA 0.5M pH = 8.0

H ₂ O	EDTA	Προσθήκη NaOH μέχρι pH = 8.0
1lt	186.1gr	~ 20gr NaOH
500ml	93.05gr	~ 10gr NaOH
250ml	46.53gr	~ 5gr NaOH

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 5x

	Tris	Boric acid	EDTA 0.5M
1000ml	54gr	27.5gr	20ml
500ml	27gr	13.75gr	10ml
200ml	10.8gr	5.5gr	4ml

Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 1x

1/5 αραιώση διαλύματος TBE 5x. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

Tris-HCl EDTA [50mM Tris-HCl 5mM EDTA (5x)]

Tris-HCl 1000mM

500ml 400ml H₂O + 60.5gr Tris

250ml 120ml H₂O + 15.12gr Tris

Προσθήκη HCl μέχρι pH = 8. Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

H₂O₂ 40mM

100μl stock 30% + 780μl H₂O (φωτοευαίσθητο) (Προέκυψε μετά από δοκιμές)

Προετοιμασία του διαλύματος πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Το stock H₂O₂ είναι φωτοευαίσθητο, διατηρείται στον πάγο.

Loading buffer

10ml 25mg Bromophenol Blue
 4gr sucrose or 30% glycerol

Διατήρηση -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Ethidium Bromide 10mg/ml

10 ml 100mg Eth. Br.

Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο, διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα

Διαδικασία

- Προετοιμασία 0,8% gel αγαρόζης σε TBE 1x

- Προετοιμασία διαλυμάτων αντίδρασης

-Προσθήκη αντιδραστηρίων. Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) είναι τα εξής:

10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=8.0)

DNA Bluescript plasmid 3,2μg

H₂O₂ 40mM

Εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον παρακάτω πίνακα:

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Εκχύλισμα	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Αρνητικό C	2 μl	6μl	-	2 μl	-	(-)
Θετικό C	2 μl	4μl	-	2 μl	2 μl	(+)
Cmax	2 μl	3μl	3 μl	2 μl	-	(-)
C1	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)
C2	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)
C3	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)
C4	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)
C5	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)
C6	2 μl	1μl	3 μl	2 μl	2 μl	(+)

Table 1: Αντιδραστήρια στην ρίζα υδροξυλίου

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (3,2μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (3,2μg πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως φαίνεται στον πίνακα. Για κάθε ουσία πραγματοποιούμε 5 αραιώσεις 1:1 με την προσθήκη 50μl της προηγούμενης συγκέντρωσης και 50μl Tris-HCl EDTA.

- Για τα σκέτα φύλλα η αρχική μας συγκέντρωση (C1) ήταν 16mg/ml.
- Για τα σκέτα κάστανα η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 32mg/ml.
- Για την οροπρωτεΐνη φύλλων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 32mg/ml.
- Για την οροπρωτεΐνη κάστανων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 32mg/ml.
- Για την μαλτοδεξτρίνη φύλλων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 32mg/ml.
- Για την μαλτοδεξτρίνη κάστανων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 32mg/ml.
- Προσθήκη των διαλυμάτων με την σειρά του πίνακα
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Τοποθέτηση κάτω από λάμπα UV (300W Osram) σε απόσταση 52cm για 3 λεπτά ακριβώς
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 70V για 1h περίπου σε gel αγαρόζης 0,8%
- Χρώση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία: οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImageLightCabinet της AlphaInnotech
- Ποσοτικοποίηση: Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

Στατιστική ανάλυση:

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH•, που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H₂O₂ υπολογίστηκαν ως εξής:

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

όπου:

S_{control}: το ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S₀: το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία)

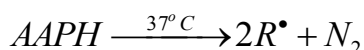
S: το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία.

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

3.3 Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO[•]) Πρόκληση Μονόκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.

Ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και παραγωγή τους από θέρμανση του AAPH

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO[•] χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO[•].



Οι ρίζες ROO[•] έχουν $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

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

Πειραματική Διαδικασία

Διαλύματα

EDTA 0.5M pH = 8.0

H ₂ O	EDTA	Προσθήκη NaOH μέχρι pH = 8.0
1lt	186.1gr	~ 20gr NaOH
500ml	93.05gr	~ 10gr NaOH
250ml	46.53gr	~ 5gr NaOH

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 5x

	Tris	Boric acid	EDTA 0.5M
1000ml	54gr	27.5gr	20ml
500ml	27gr	13.75gr	10ml
200ml	10.8gr	5.5gr	4ml

Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

TBE 1x

1/5 αραιώση διαλύματος TBE 5x. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου.

PBS pH=7,4

	1000ml	500ml
NaCl 137mM	8gr	4gr
KCl 2,7mM	0,2gr	0,1gr
Na ₂ HPO ₄ 8,1mM	1,44gr	0,72gr
KH ₂ PO ₄ 1,5mM	0,2gr	0,1gr

Αποστείρωση και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου

AAPH 100mM

2.7mg + 100μl PBS (Προέκυψε μετά από δοκιμές)

Προετοιμασία του διαλύματος πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης, διατηρείται στον πάγο.

Loading buffer

10ml 25mg Bromophenol Blue
4gr sucrose or 30% glycerol

Διατήρηση -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Ethidium Bromide 10mg/ml

10 ml 100mg Eth. Br.

Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο, διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα

Διαδικασία

- Προετοιμασία 0,8% gel αγαρόζης σε TBE 1x
- Προετοιμασία διαλυμάτων αντίδρασης

Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) είναι τα εξής:

PBS

DNA Bluescript plasmid 3,2μg

AAPH 2,5mM

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται παρακάτω πίνακα:

	PBS	Εκχύλισμα	DNA plasmid	AAPH
Αρνητικό C	8 μl	-	2 μl	-
Θετικό C	4 μl		2 μl	4 μl
Cmax	5 μl	3 μl	2 μl	-
C1	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl
C2	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl
C3	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl
C4	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl
C5	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl
C6	1 μl	3 μl	2 μl	4 μl

Table 2: Αντιδραστήρια στην ρίζα περοξυλίου

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (3,2μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (3,2μg πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως φαίνεται στον πίνακα. Για κάθε ουσία πραγματοποιούμε 5 αραιώσεις 1:1 με την προσθήκη 50μl της προηγούμενης συγκέντρωσης και 50μl PBS.

- Για τα σκέτα φύλλα η αρχική μας συγκέντρωση (C1) ήταν 2mg/ml.
- Για τα σκέτα κάστανα η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 4mg/ml.
- Για την οροπρωτεΐνη φύλλων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 8mg/ml.
- Για την οροπρωτεΐνη κάστανων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 16mg/ml.
- Για την μαλτοδεξτρίνη φύλλων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 8mg/ml.
- Για την μαλτοδεξτρίνη κάστανων η αρχική μας συγκέντρωση ήταν 8mg/ml.
- Προσθήκη των διαλυμάτων με την σειρά του πίνακα
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
- Προσθήκη 3μl loading buffer
- Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- Ηλεκτροφόρηση 70V για 1h περίπου σε gel αγαρόζης 0,8%
- Χρώση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά
- Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- Φωτογραφία: οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImageLightCabinet της AlphaInnotech
- Ποσοτικοποίηση: Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

Στατιστική ανάλυση:

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

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

όπου:

S_{control}: το ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S₀: το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 3mM AAPH)

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

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

IC₅₀

Μετά την εμφάνιση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων δημιουργήθηκαν καμπύλες για την εύρεση των IC₅₀ τιμών τους. Ως IC₅₀ ορίζεται η τιμή που αντιστοιχεί στην μοριακή συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της ενζυμικής αναστολής και χρησιμοποιείται για την αποτίμηση της ανασταλτικής δράσης. Η τιμή IC₅₀ προσδιορίζεται από την καμπύλη που προκύπτει από την απεικόνιση της δράσης (αναστολής) ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα, παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης φυσιολογικού υποστρώματος (καμπύλη δόσης-απόκρισης, dose-response curve) (Fig. 11).

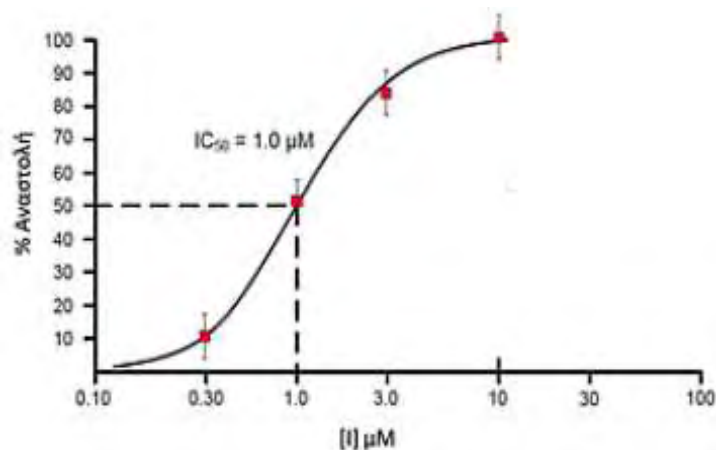


Figure 11: Καμπύλη δόσης-απόκρισης

4 Αποτελέσματα

Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν εκχυλίσματα από 6 δείγματα της *Castanea Sativa*: πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων, πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων ενθυλακωμένο σε οροπρωτεΐνη, πολυφαινολικό εκχύλισμα κάστανων ενθυλακωμένο σε μαλτοδεξτρίνη. Τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν έναντι των βλαβών που προκαλούνται σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα υδροξυλίου και περοξυλίου, δηλαδή μελετήθηκε η ικανότητά τους να εμποδίζουν τα μονόκλιωνα θραύσματα και έτσι την μετατροπή του πλασμιδιακού DNA από υπερελικωμένο σε ανοιχτό κυκλικό ή γραμμικό.

4.1 Επαγόμενη από Ρίζες Υδροξυλίου (OH•) Πρόκληση Μονοκλώνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.

Τα εκχυλίσματα από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου (OH•), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

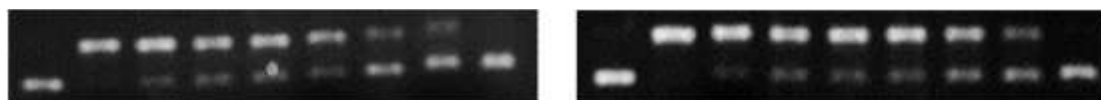


Figure 12: Αριστερά σκέτα φύλλα και δεξιά σκέτα κάστανα



Figure 13: Αριστερά οροπρωτεΐνη φύλλων και δεξιά οροπρωτεΐνη κάστανων

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + H₂O₂

Σειρά 3: DNA plasmid + H₂O₂+ 5^η αραιώση εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + H₂O₂+ 4^η αραιώση εκχυλίσματος

Σειρά 5: DNA plasmid + H₂O₂+ 3^η αραιώση εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + H₂O₂+ 2^η αραιώση εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + H₂O₂+ 1^η αραιώση εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + H₂O₂+ αρχική συγκέντρωση εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + μέγιστη (αρχική) συγκέντρωση εκχυλίσματος

Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 2124 $\mu\text{g/ml}$ για τα σκέτα φύλλα (πιο ισχυρό εκχύλισμα) μέχρι 8249 $\mu\text{g/ml}$ για τα σκέτα κάστανα (πιο ασθενές εκχύλισμα). Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται οι καμπύλες δόσης-απόκρισης των έξι εκχυλισμάτων και οι τιμές IC_{50} των τεσσάρων εκχυλισμάτων (οι οροπρωτεΐνη και μαλτοδεξτρίνη κάστανων δεν συμπεριλαμβάνονται), σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα OH^{\bullet} και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση .

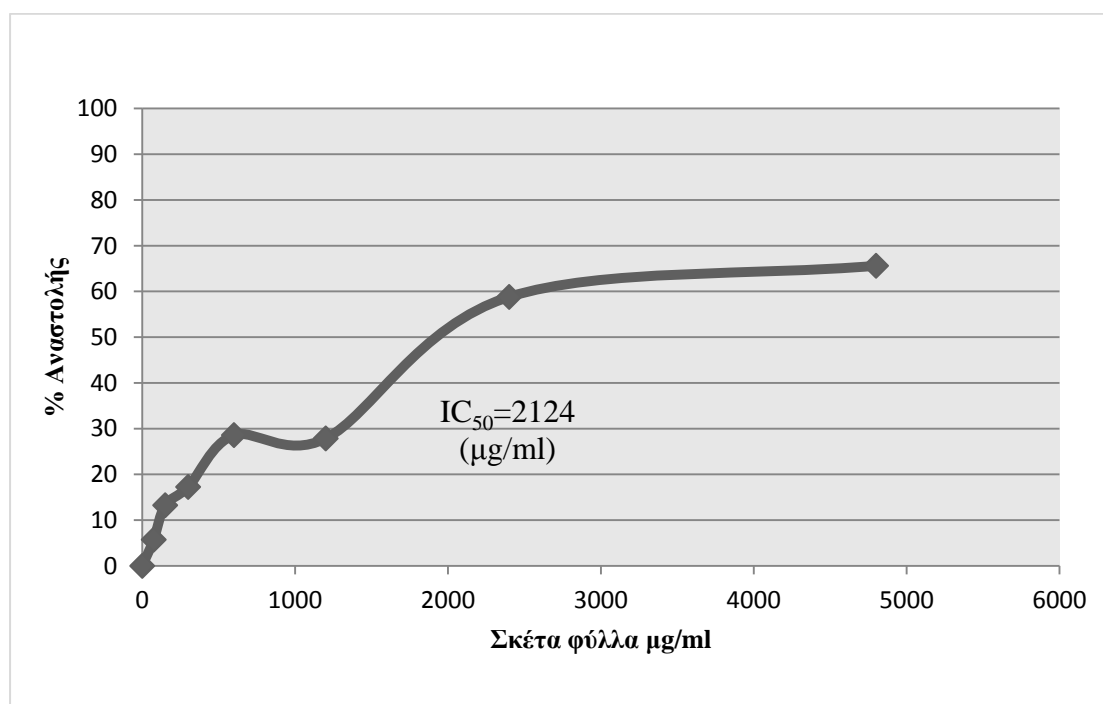


Figure 14: Η % αναστολή της ρίζας OH^{\bullet} από το εκχύλισμα των σκέτων φύλλων

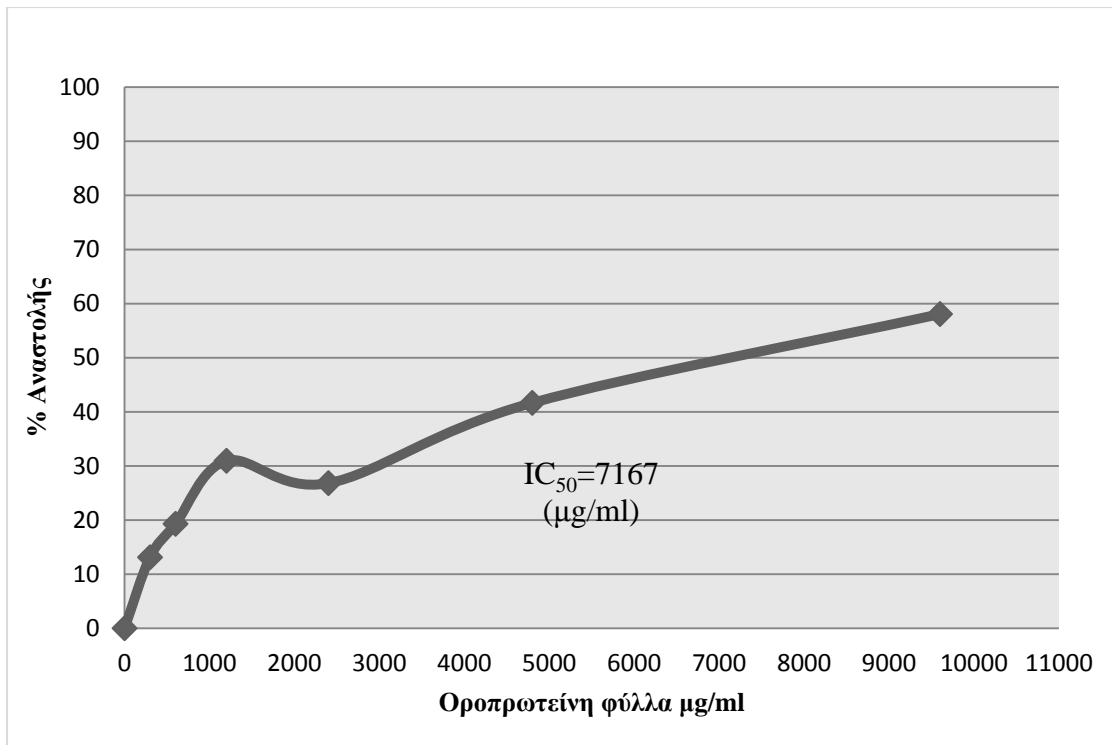


Figure 15: Η % αναστολή της ρίζας OH' από το εκχύλισμα της οροπρωτεΐνης φύλλων

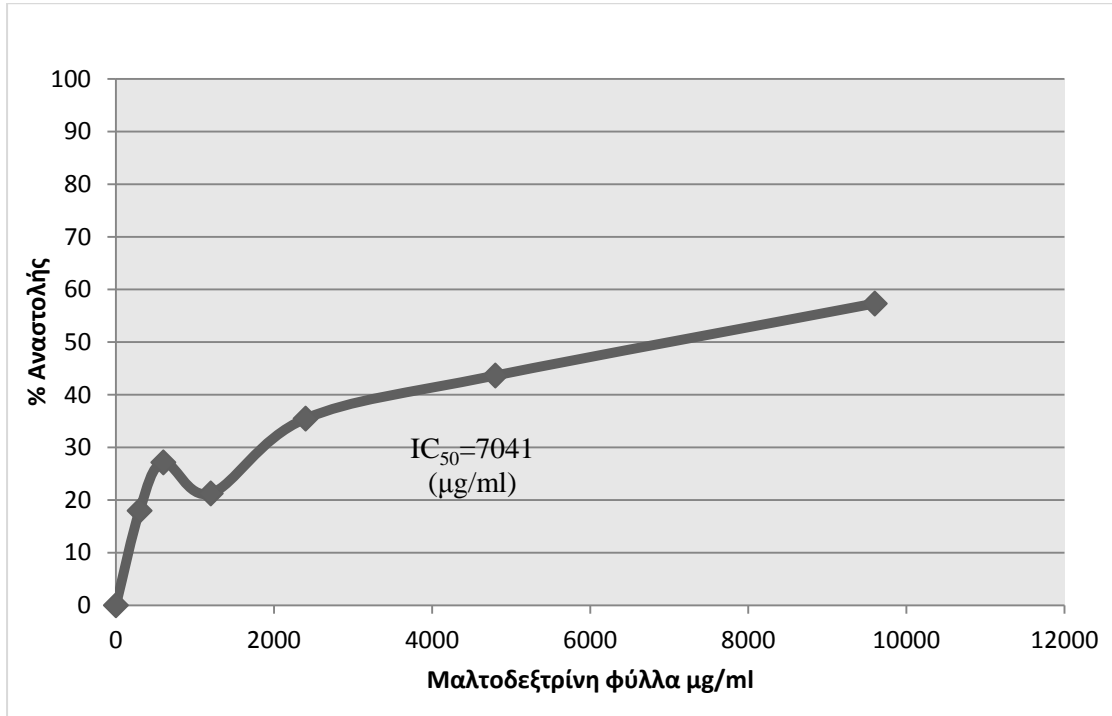


Figure 16: Η % αναστολή της ρίζας OH' από το εκχύλισμα της μαλτοδεξτρίνης φύλλων

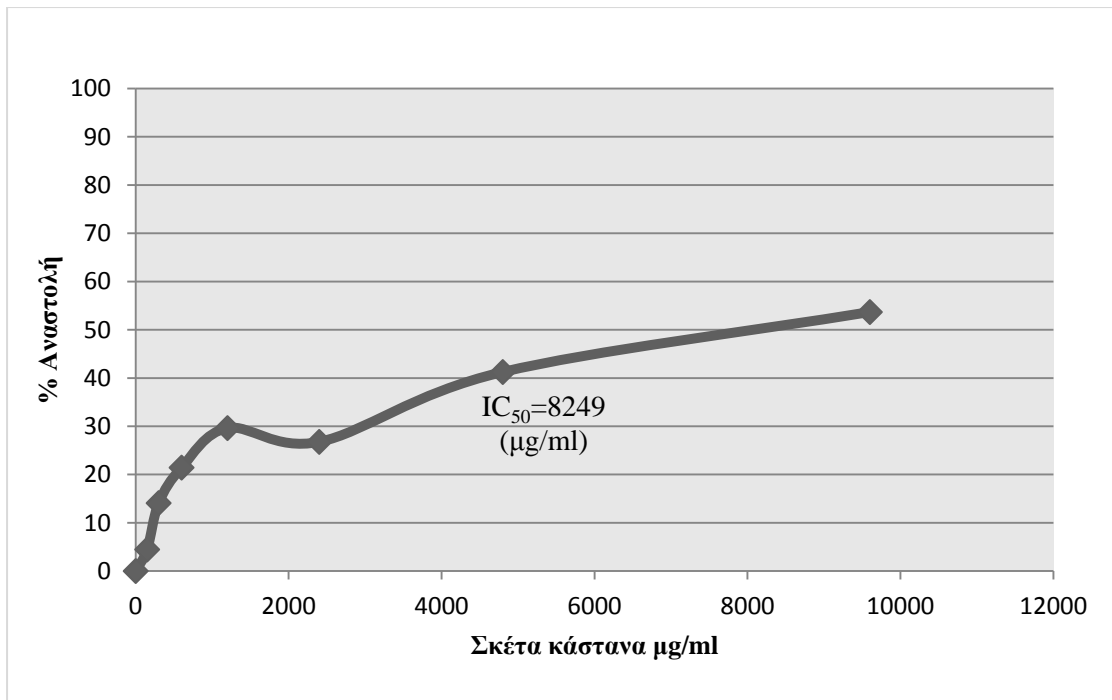


Figure 17: Η % αναστολή της ρίζας OH· από το εκχύλισμα των σκέτων κάστανων

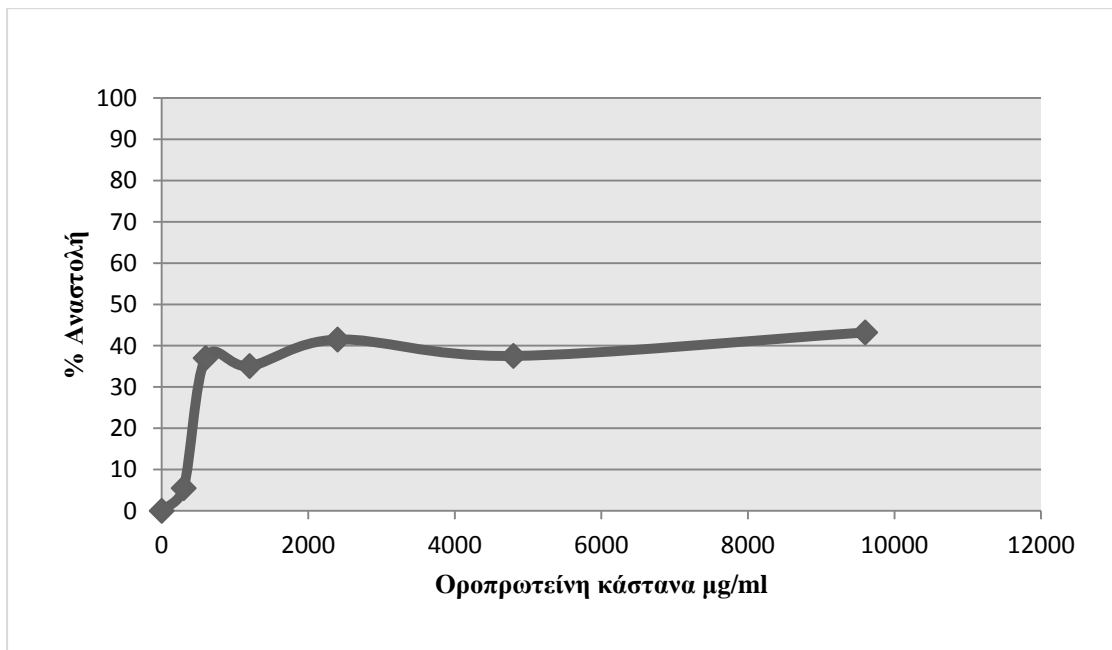


Figure 18: Η % αναστολή της ρίζας OH· από το εκχύλισμα οροπρωτεΐνης κάστανων

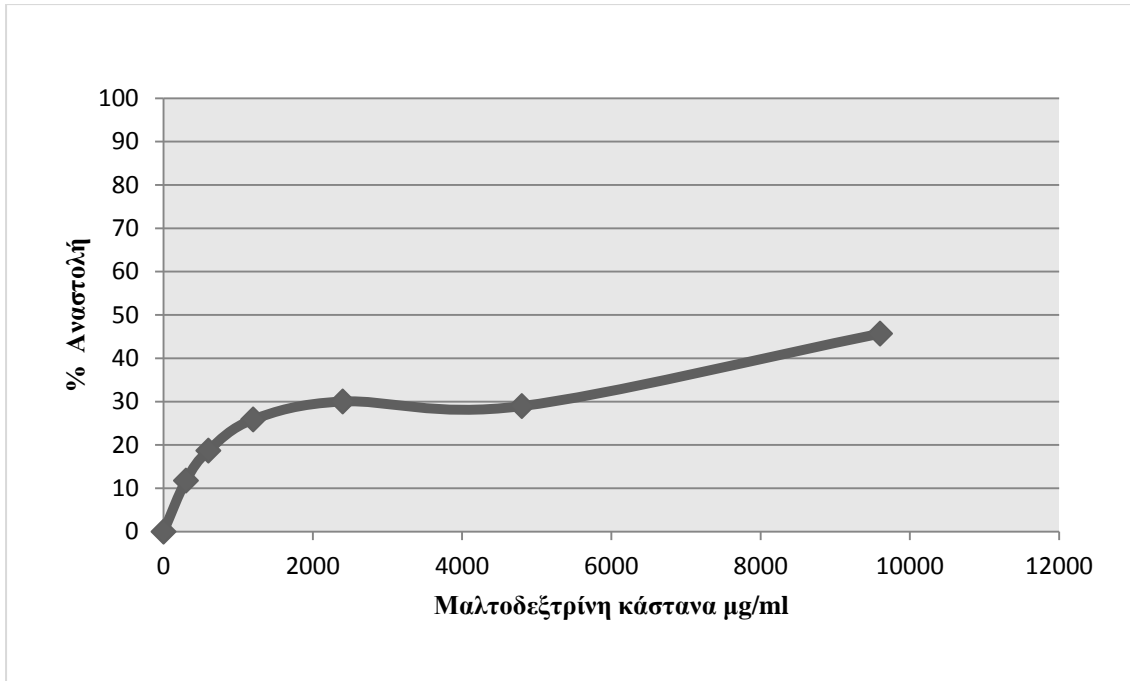


Figure 19: Η % αναστολή της ρίζας OH• από το εκχύλισμα μαλτοδεξτρίνης κάστανων

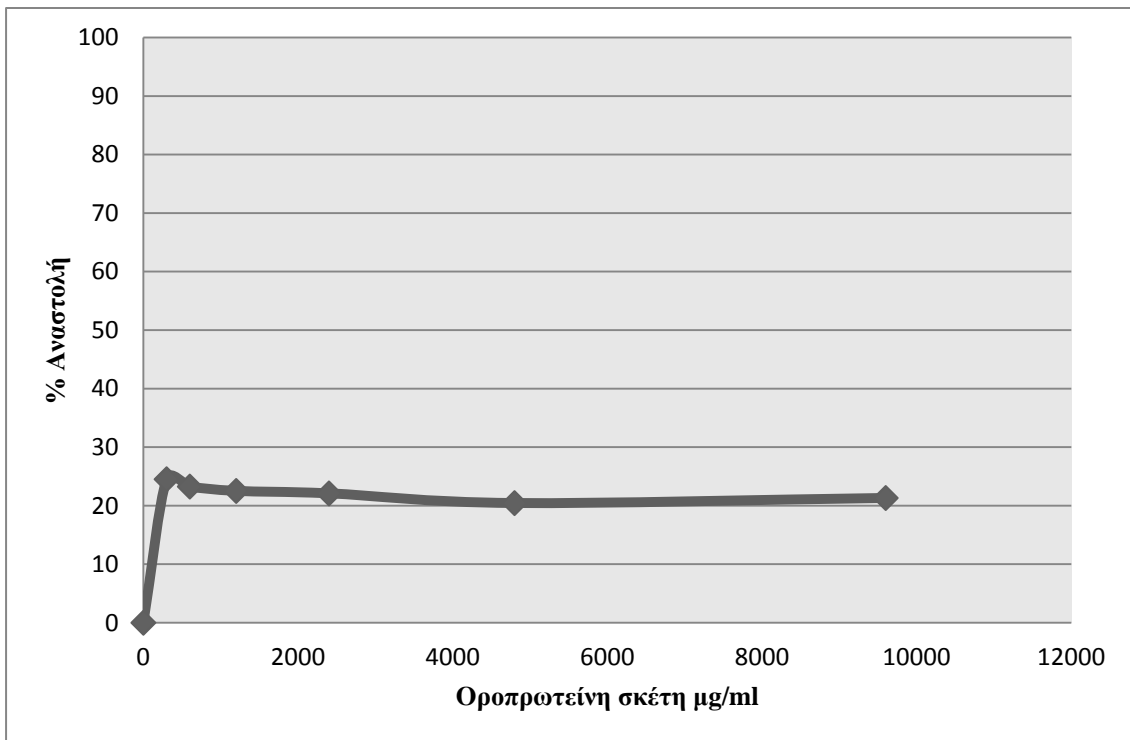


Figure 20: Η % αναστολή της ρίζας OH• από το εκχύλισμα οροπρωτεΐνης

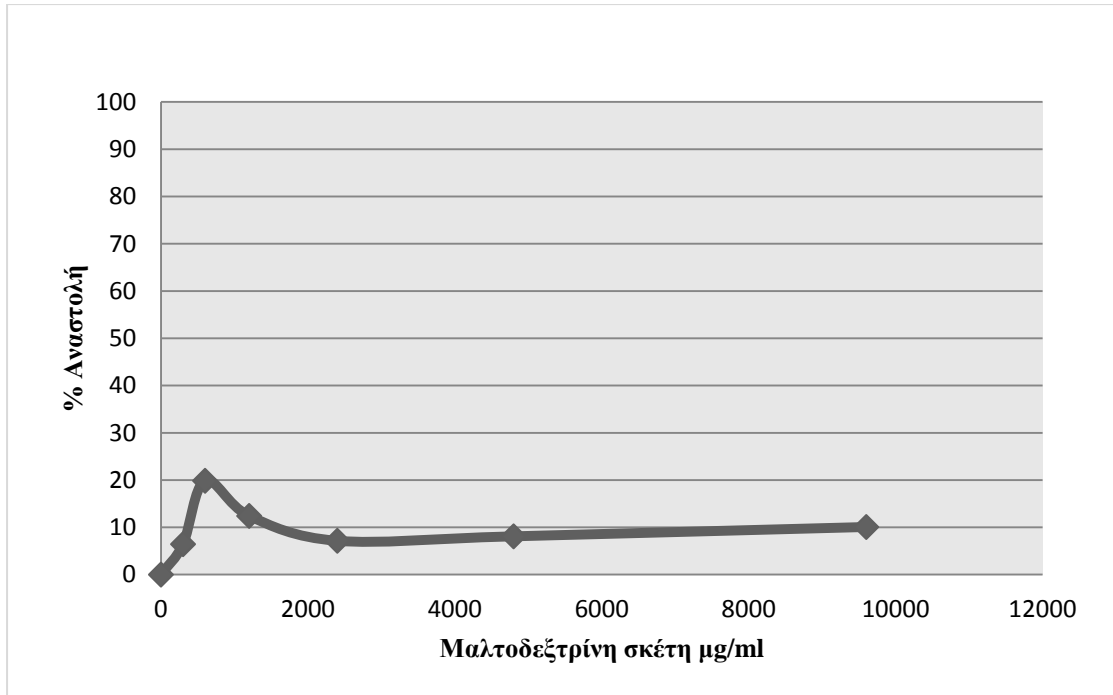


Figure 21: Η % αναστολή της ρίζας OH• από το εκχύλισμα μαλτοδεξτρίνης

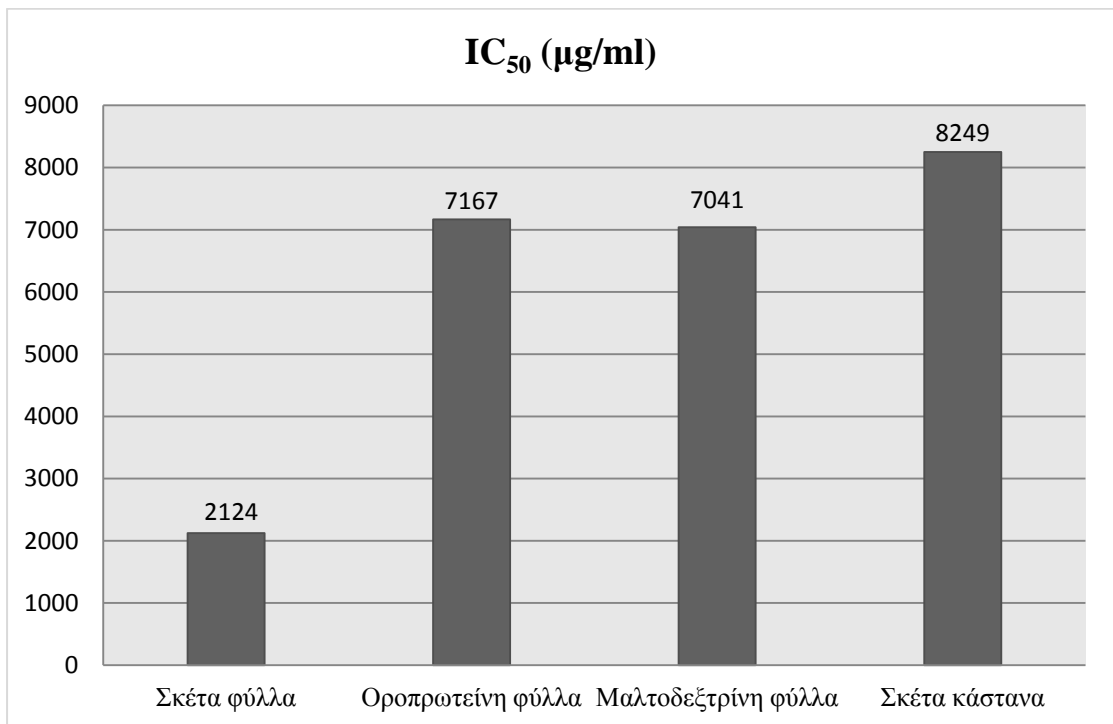


Figure 22: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων σε αλληλεπίδρασή με τη ρίζα OH•

Σκέτα φύλλα	2124 ± 148
Οροπρωτεΐνη φύλλα	7167 ± 645
Μαλτοδεξτρίνη φύλλα	7041 ± 701
Σκέτα κάστανά	8249 ± 907

4.2 Επαγόμενη από Ρίζες Περοξυλίου (ROO[•]) Πρόκληση Μονοκλωνων Θραυσμάτων σε Πλασμιδιακό DNA.

Τα εκχυλίσματα από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν και σε αυτήν την μέθοδο δοσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου (ROO[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση.



Figure 23: Αριστερά σκέτα φύλλα και δεξιά σκέτα κάστανα



Figure 24: Αριστερά οροπρωτεΐνη φύλλων και δεξιά οροπρωτεΐνη κάστανων



Figure 25: Αριστερά μαλτοδεξτρίνη φύλλα και δεξιά μαλτοδεξτρίνη κάστανων

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 5^η αραίωση εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 4^η αραίωση εκχυλίσματος

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 3^η αραίωση εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 2^η αραίωση εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 1^η αραίωση εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + αρχική συγκέντρωση εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + μέγιστη (αρχική) συγκέντρωση εκχυλίσματος

Οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 92.3 μg/ml για τα σκέτα φύλλα (πιο ισχυρό εκχύλισμα) μέχρι 1001 μg/ml για την οροπρωτεΐνη κάστανων (πιο ασθενές εκχύλισμα). Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται οι καμπύλες δόσης-απόκρισης και οι τιμές IC₅₀ των έξι εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα ROO[•] και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

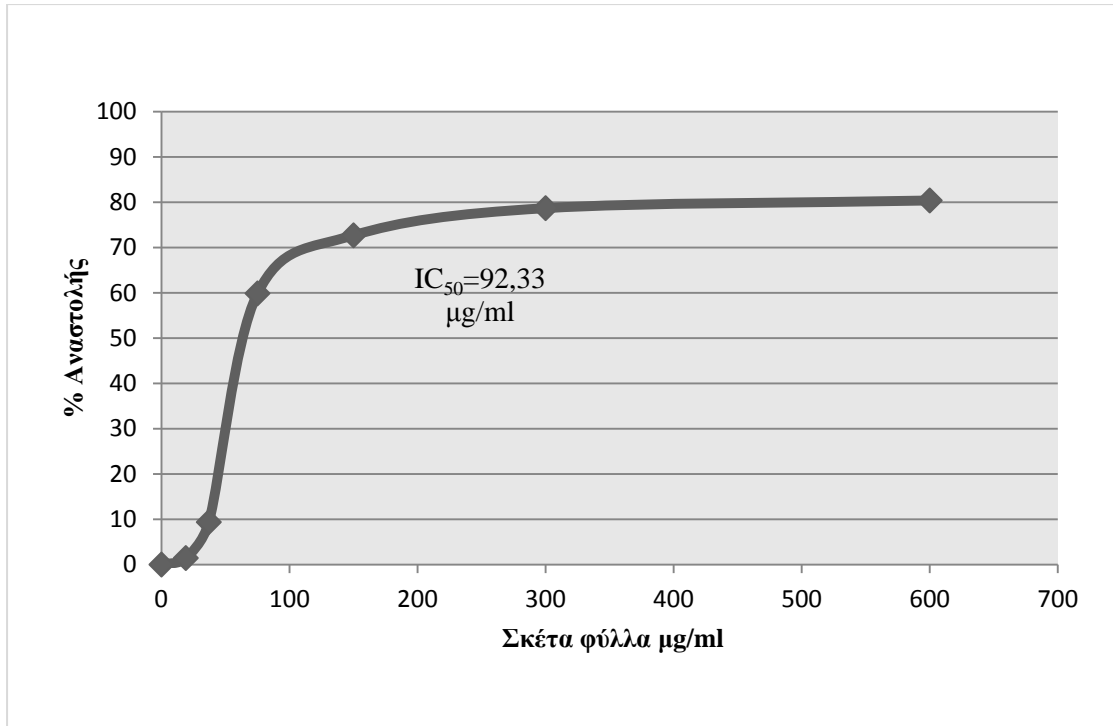


Figure 26: Η % αναστολή της ρίζας ROO' από το εκχύλισμα των σκέτων φύλλων

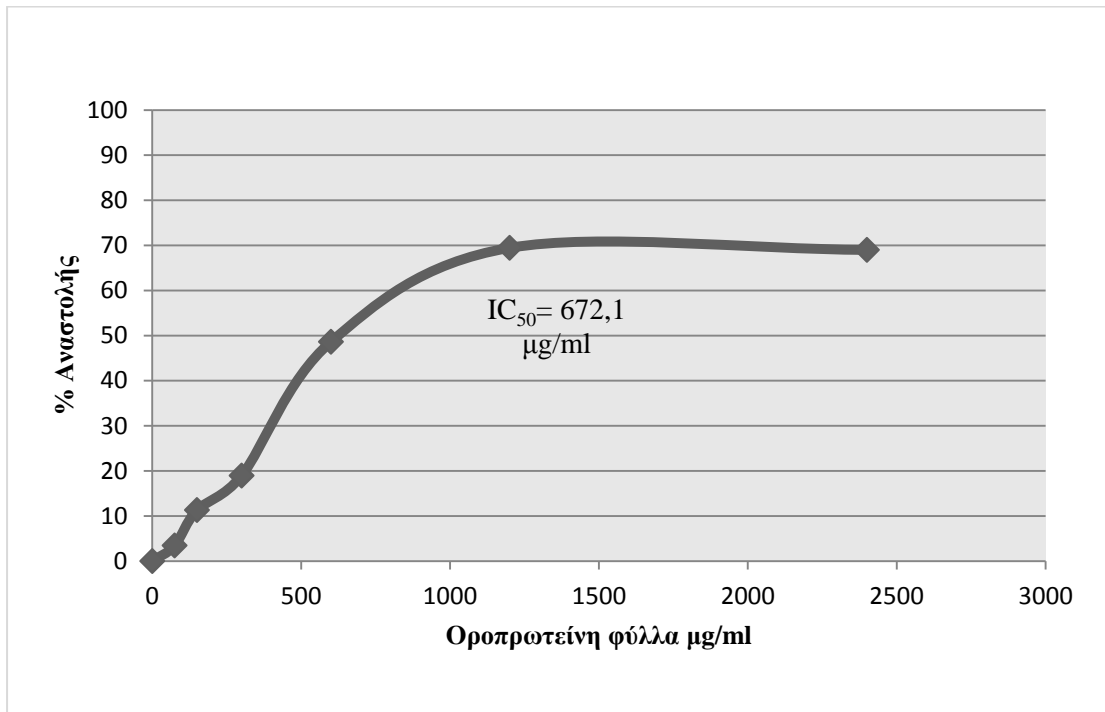


Figure 27: Η % αναστολή της ρίζας ROO' από το εκχύλισμα της οροπρωτεΐνης φύλλων

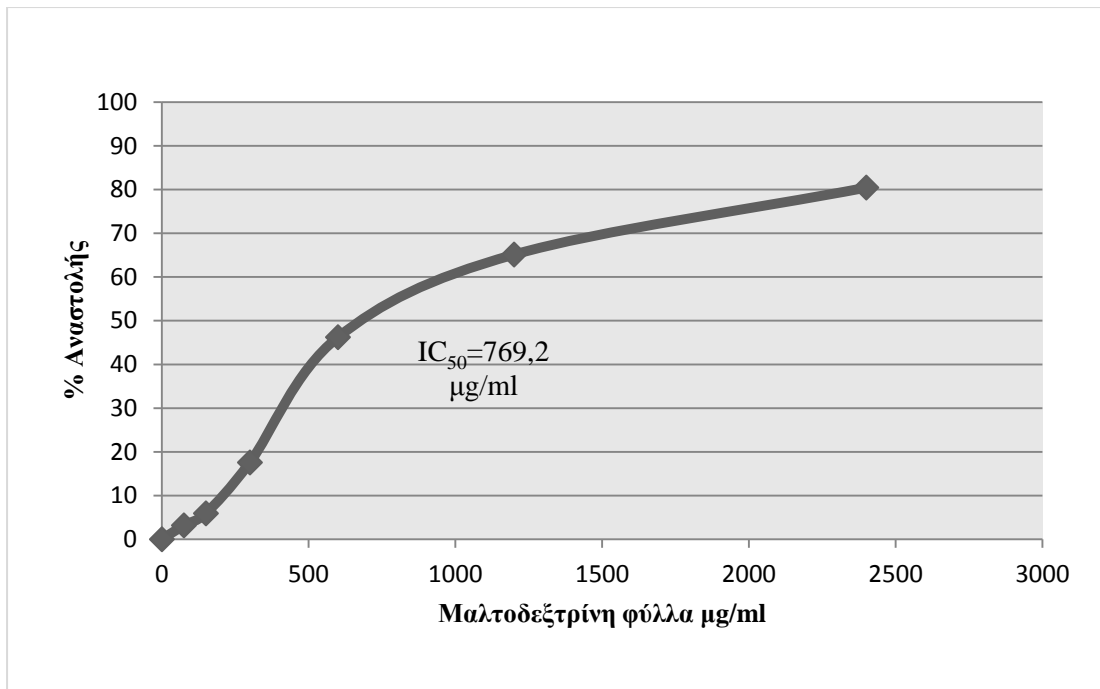


Figure 28: Η % αναστολή της ρίζας ROO' από το εκχύλισμα της μαλτοδεξτρίνης φύλλων

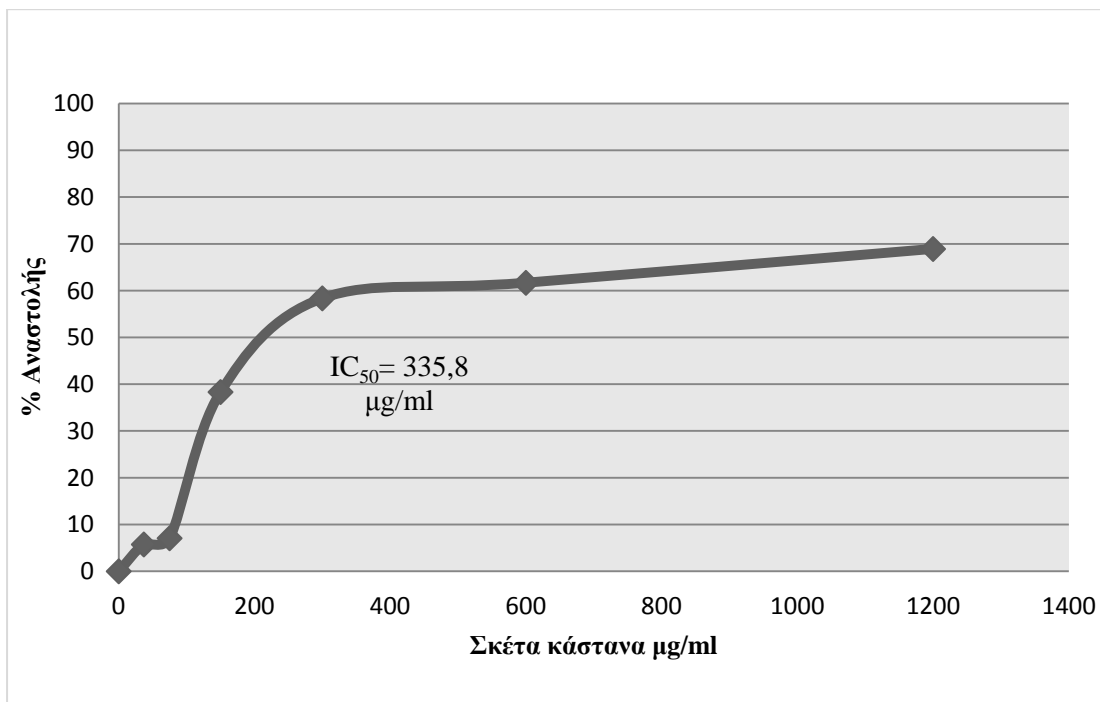


Figure 29: Η % αναστολή της ρίζας ROO' από το εκχύλισμα των σκέτων κάστανων

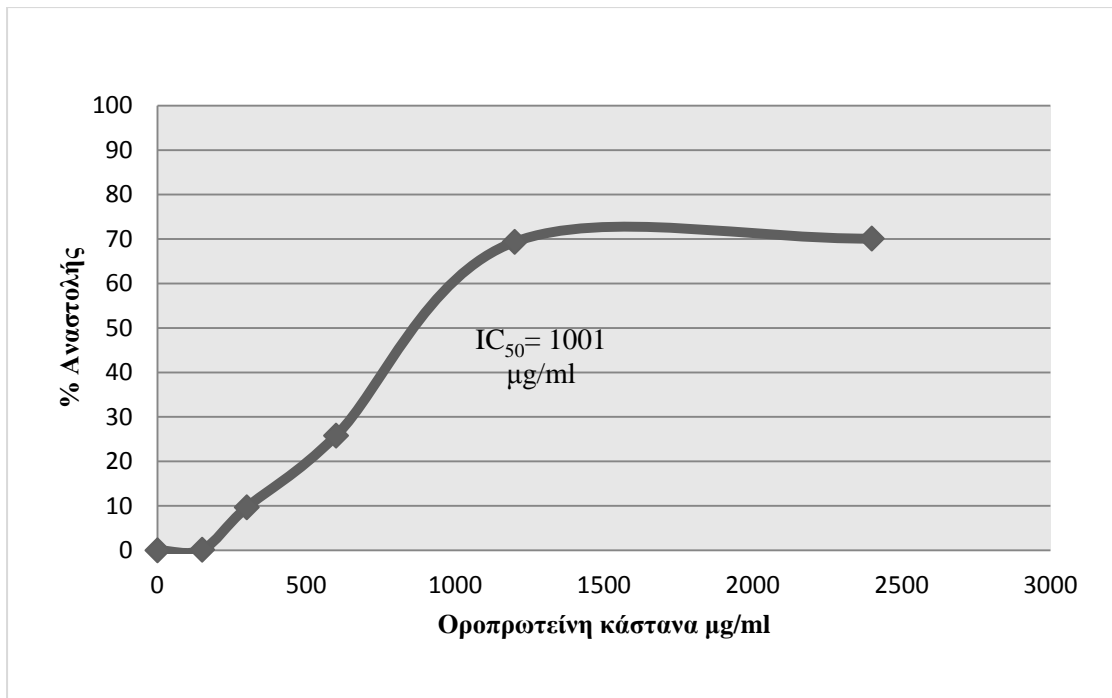


Figure 30: Η % αναστολή της ρίζας ROO από το εκχύλισμα της οροπρωτεΐνης κάστανων

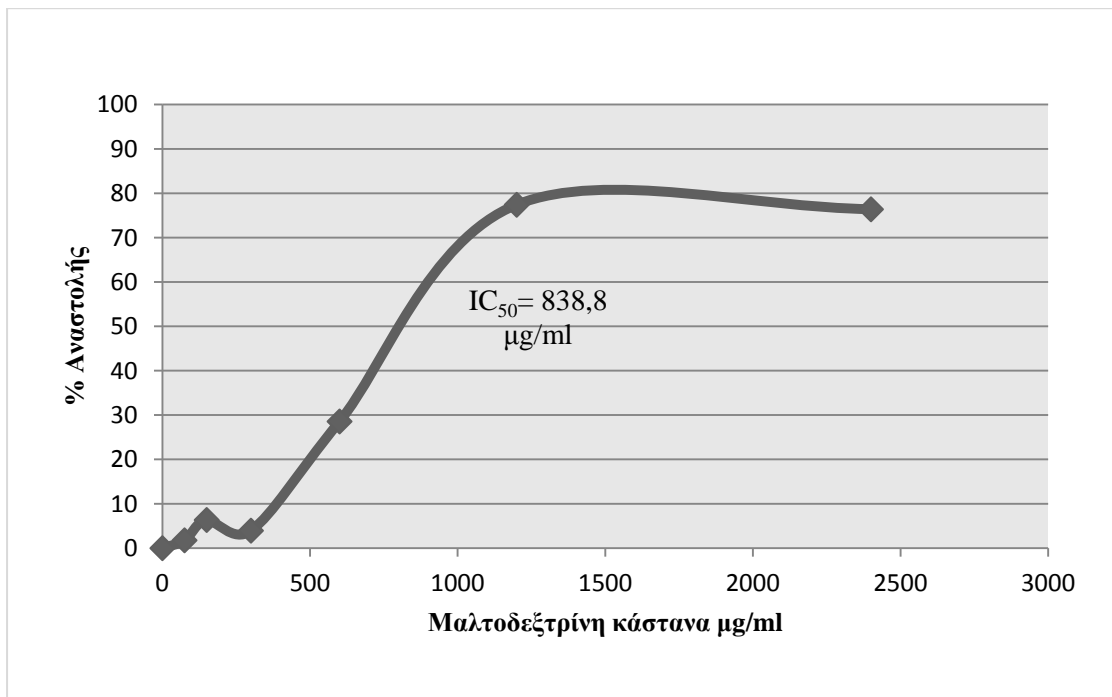


Figure 31: Η % αναστολή της ρίζας ROO από το εκχύλισμα της μαλτοδεξτρίνης κάστανων

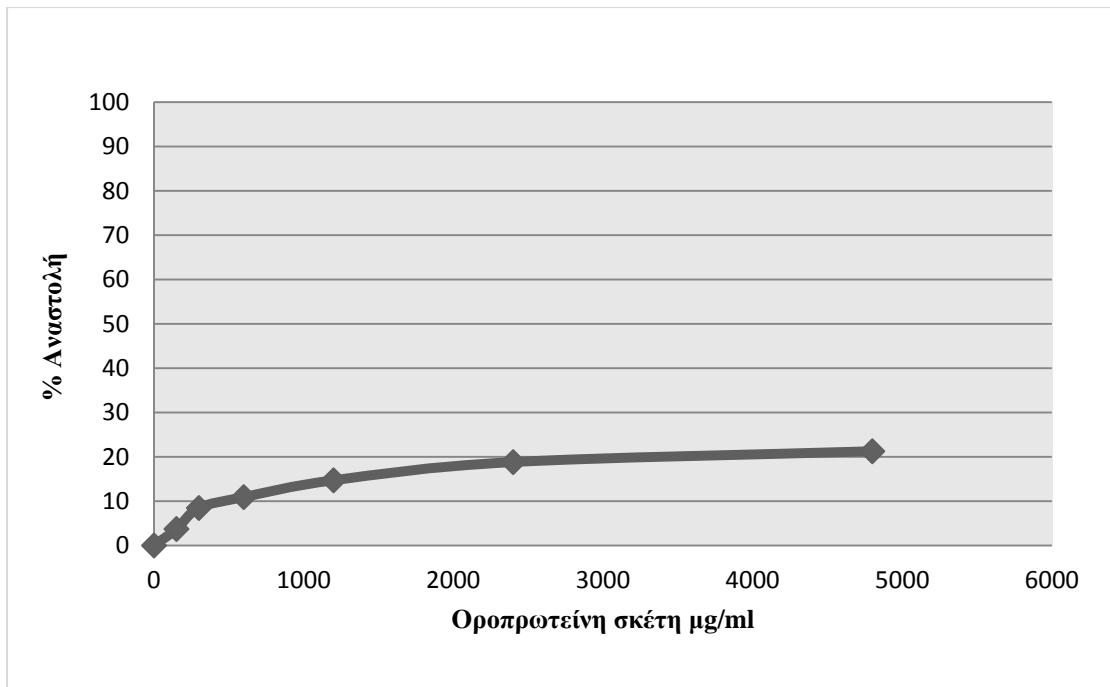


Figure 32: Η % αναστολή της ρίζας ROO από το εκχύλισμα της σκέτης οροπρωτεΐνης

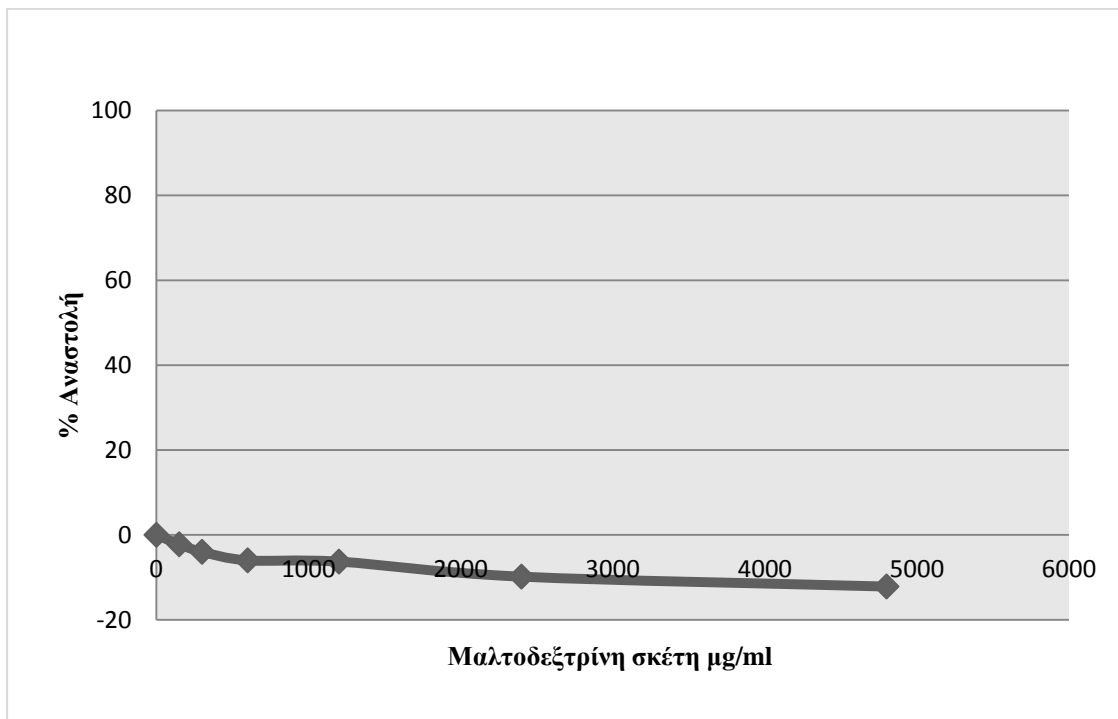


Figure 33: Η % αναστολή της ρίζας ROO από το εκχύλισμα της σκέτης μαλτοδεξτρίνης

Σκέτα φύλλα	92,33 ± 5,34
Οροπρωτεΐνη φύλλα	672,1 ± 67,2
Μαλτοδεξτρίνη φύλλα	769,2 ± 84,6
Σκέτα κάστανά	335,8 ± 26,9
Οροπρωτεΐνη κάστανά	1001 ± 140,2
Μαλτοδεξτρίνη κάστανά	833,8 ± 100

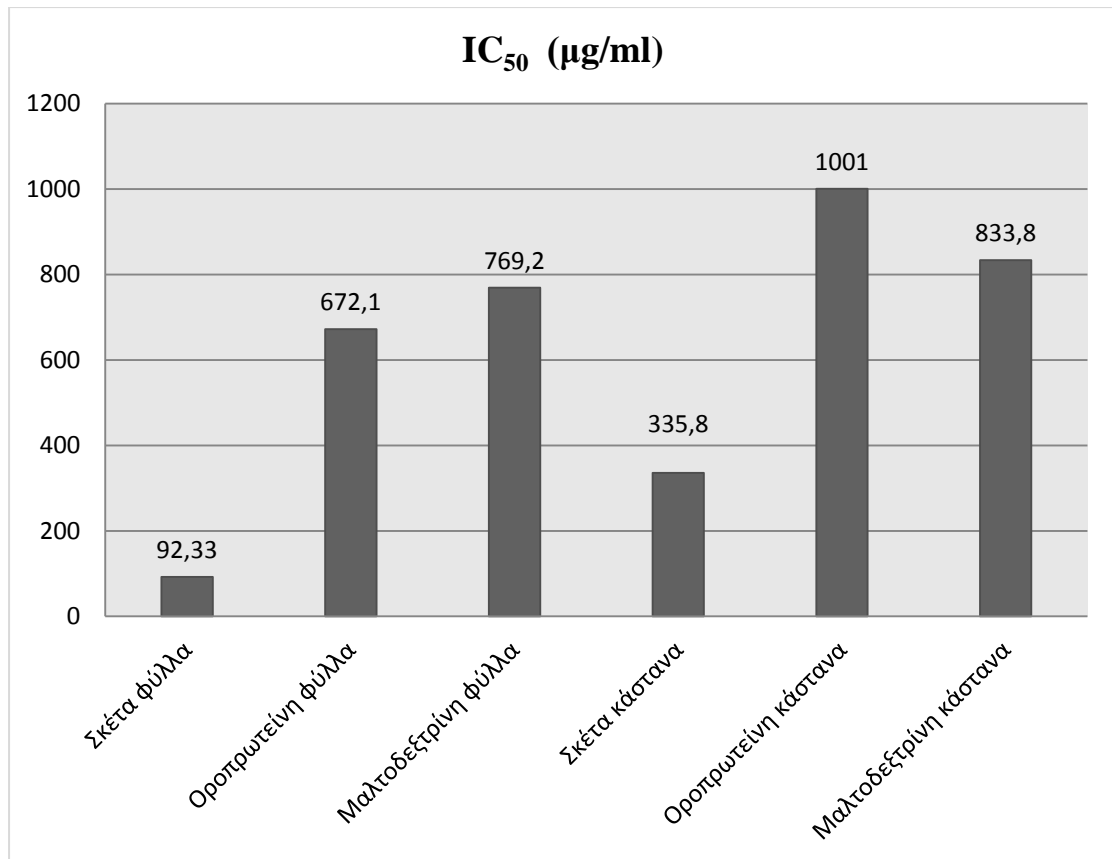


Figure 34: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων σε αλληλεπίδρασή με τη ρίζα ROO'

4.3 Σύγκριση Αποτελεσμάτων

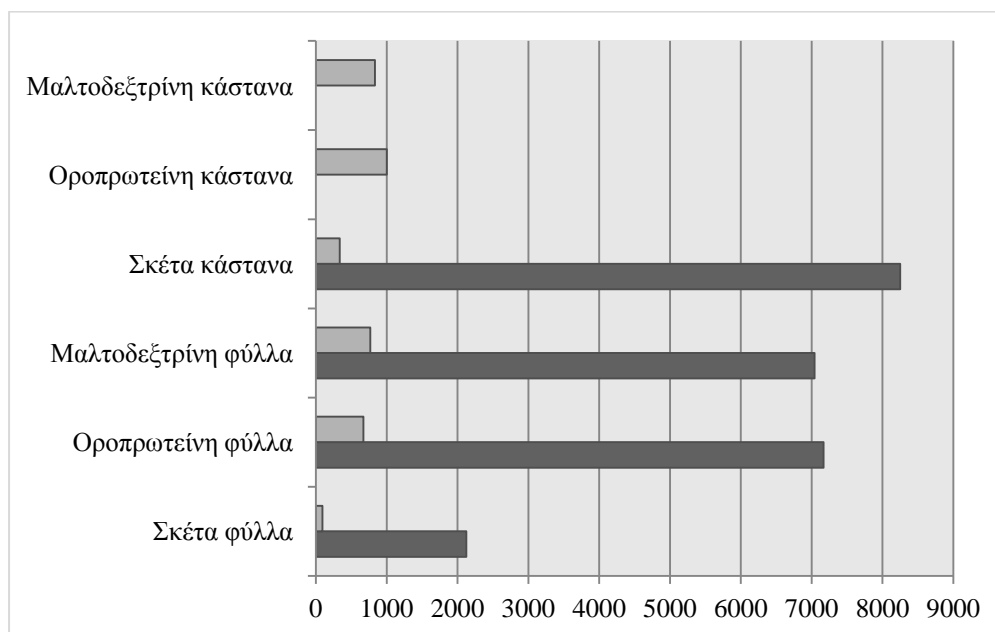


Figure 35: Πίνακας των τιμών IC₅₀ μεταξύ των δύο μεθόδων. Με ανοιχτό γκρι απεικονίζονται τα αποτελέσματα των ριζών περοξυλίου, ενώ με σκούρο γκρι αυτά των ριζών υδροξυλίου.

5 Συζήτηση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος βλαβών στον οργανισμό μέσω μείωσης των αμυντικών συστημάτων και οξείδωση διάφορων μοριακών στόχων κυρίως, λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Μέσω αυτών των βλαβών το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μια πληθώρα προβλημάτων υγείας όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευρολογικές παθήσεις (Brieger et al., 2012). Αυτή η συσχέτιση έχει οδηγήσει σε μια αυξημένη ζήτηση αντιοξειδωτικών, τα οποία καταπολεμούν και προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες. Είτε με την μορφή φαρμάκων, είτε ως τρόφιμα, αλλά και ως συμπληρώματα διατροφής, οι φυτικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι ένας κλάδος έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Με αφορμή αυτή τη ζήτηση, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα πολυφαινολικών εκχυλισμάτων του φυτού *Castanea sativa* έναντι DNA βλαβών προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες. Η *Castanea sativa* έχει βρεθεί ότι περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες κυρίως στην μορφή πολυφαινολών και βιταμινών C και E (De Vasconcelos et al., 2010). Οι ρίζες οι οποίες εξετάστηκαν ήταν η ρίζα υδροξυλίου και η ρίζα περοξυλίου. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, ήταν εκχυλίσματα φύλλων και κάστανων, καθώς και εκχυλίσματα φύλλων και κάστανων ενθυλακωμένα σε οροπρωτεΐνη και μαλτοδεξτρίνη. Η ενθυλάκωση είναι μια πολύ σημαντική διεργασία και χρησιμοποιείται για την προστασία ουσιών από οξείδωση Είναι μια διαδικασία που καθιστά το εκχύλισμα πιο εύκολα διαχειρίσιμο και σταθερό, ενώ ταυτόχρονα μειώνει το κόστος και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα.

Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων εξετάστηκε έναντι των ελεύθερων ριζών υδροξυλίου και περοξυλίου. Οι δύο ρίζες προκαλούν μονόκλινα σπασίματα στο DNA.

Η ρίζα του OH^\bullet παράχθηκε από την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία. Τα καλύτερα αποτελέσματα έναντι της ρίζας OH^\bullet τα είχαν τα σκέτα φύλλα ($\text{IC}_{50}=2124\mu\text{g/ml}$) ακολουθούμενα από την μαλτοδεξτρίνη φύλλων ($\text{IC}_{50}=7041\mu\text{g/ml}$), την οροπρωτεΐνη φύλλων ($\text{IC}_{50}=7167\mu\text{g/ml}$) και τέλος τα σκέτα κάστανα ($\text{IC}_{50}=8249\mu\text{g/ml}$). Η οροπρωτεΐνη και η μαλτοδεξτρίνη κάστανων δεν έδειξαν ανασταλτική ικανότητα.

Η ρίζα του ROO^{*} παράχθηκε από την θέρμανση του AAPH. Την πιο ισχυρή δράση την είχαν τα σκέτα φύλλα ($IC_{50}=92.33\mu\text{g/ml}$) ακολουθούμενα από τα σκέτα κάστανα ($IC_{50}=335.8\mu\text{g/ml}$), τα ην οροπρωτεΐνη φύλλων ($IC_{50}=672.1\mu\text{g/ml}$) την μαλτοδεξτρίνη φύλλων ($IC_{50}=769.2\mu\text{g/ml}$), την μαλτοδεξτρίνη κάστανων ($IC_{50}=833.8\mu\text{g/ml}$) και τέλος την οροπρωτεΐνη κάστανων ($IC_{50}=1001\mu\text{g/ml}$).

Ανάμεσα στις δύο ρίζες είναι εμφανές ότι τα εκχυλίσματα έδωσαν πολύ καλύτερα αποτελέσματα στην ρίζα περοξυλίου. Αυτό είναι λογικό δεδομένου ότι η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ πιο δραστική με το DNA και έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής, άρα είναι δύσκολο να εξουδετερωθεί. Η καλύτερη δράση αντιοξειδωτικών έναντι του περοξυλίου από ότι έναντι του υδροξυλίου έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Almeida, Fernandes, Lima, Costa, & Bahia, 2008; Díaz Reinoso et al., 2012; Spanou et al., 2007).

Το σκέτο εκχύλισμα φύλλων έδειξε και στις δύο μεθόδους την πιο ισχυρή προστατευτική δράση. Τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα των κάστανων ήταν και στις δύο περιπτώσεις τα πιο αδύναμα. Το σκέτο εκχύλισμα κάστανων στη ρίζα περοξυλίου ήταν ισχυρότερο από τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα των φύλλων, ενώ στη ρίζα υδροξυλίου ήταν πιο αδύναμο. Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα εκχυλίσματα προφανώς οφείλονται στη διαφορετική πολυφαινολική τους σύσταση καθώς και στη διαφορετική δομή και αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ελεύθερων ριζών με τα αντιοξειδωτικά του κάθε εκχυλίσματος.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα της *Castanea sativa*. Συγκεκριμένα, μελέτες σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας διάφορων τμημάτων του φυτού, βρήκαν ότι τα φύλλα έχουν αρκετά πιο έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα κάστανα, που οφείλεται στο υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενό τους, ενώ γενικά βρέθηκε μια αναλογική σχέση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (J. C. M. Barreira, Ferreira, Oliveira, & Pereira, 2010; Ivkovic et al., 2009). Η σχέση αυτή μεταξύ πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί γενικά στα φυτά σε άλλες μελέτες (Ferreira, Baptista, Boas, & Barros, 2007). Αντίθετα, τα ενθυλακωμένα δεν έδειξαν ανάλογα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μεθόδων (στην 1^η μέθοδο ήταν πιο ισχυρά από τα σκέτα κάστανα ενώ στην 2^η πιο αδύναμα), βγάζοντας το συμπέρασμα πως η ενθυλάκωση επηρεάζει την ικανότητα αλληλεπίδρασης του με την ρίζα.

Μελέτες που χρησιμοποίησαν κάστανα και φύλλα με χρήση της μεθόδου AAPH έδειξαν μεγάλη διακύμανση στην δραστικότητα των δύο εκχυλισμάτων με τα φύλλα να δίνουν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα, το οποίο είναι σύμφωνο με αποτελέσματα αυτής της μελέτης (João C. M. Barreira et al., 2008).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων της παρούσας εργασίας μελετήθηκε και σε άλλες δύο εργασίες με διαφορετικές μεθόδους (αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Στην μια μελέτη προσδιορίστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα των εκχυλισμάτων με την μέθοδο του Ames test, όπου παρατηρήθηκε πως τα φύλλα, όπως και σε αυτήν την εργασία, είχαν αρκετά καλύτερα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα και τα ενθυλακωμένα των κάστανων είχαν τη μικρότερη δράση. Επίσης στο Ames παρατηρήθηκε προ-οξειδωτική δράση που αποτελεί ένα χαρακτηριστικό που μπορούν να εμφανίσουν οι πολυφαινόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις και το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς πρέπει να διερευνηθεί η ποσότητα της εκάστοτε πολυφαινόλης, για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες για τον οργανισμό. Η ιδιότητα αυτή εμφανίστηκε και σε αυτή την μελέτη στην δοκιμασία με το AAPH, στα εκχυλίσματα φύλλων και κάστανων ενθυλακωμένα με οροπρωτεΐνη.

Στην άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι: DPPH, ABTS, αναστολή της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ και αναστολή της ρίζας OH^{\bullet} . Στην εργασία αυτή παρατηρήθηκε για άλλη μια φορά πως το εκχύλισμα των φύλλων ήταν το ισχυρότερο. Τα σκέτα κάστανα ήταν τα δεύτερα ισχυρότερα και με εξαίρεση την μέθοδο DPPH (όπου τα ενθυλακωμένα με οροπρωτεΐνη κάστανα ήταν τα τρίτα ισχυρότερα) τα ενθυλακωμένα κάστανων ήταν τα πιο αδύναμα. Επίσης παρατηρήθηκε στην αναστολή της ρίζας OH υπήρξε μικρή δράση. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις βρίσκονται σε συμφωνία με αυτή την εργασία.

Συμπερασματικά, η *Castanea sativa* δείχνει σημαντική προστατευτική δράση έναντι DNA βλαβών προκαλούμενων από ελεύθερες ρίζες, με τα φύλλα να δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα λόγω υψηλότερης πολυφαινολικής περιεκτικότητας. Τα αποτελέσματα για τα εκχυλίσματα κάστανων και φύλλων είναι σύμφωνα με υπάρχουσες μελέτες (που αναφέρονται πιο πάνω), ενώ δεν έχει δημοσιευτεί μέχρι τώρα κάποια μελέτη σχετικά με τα ενθυλακωμένα δείγματα. Πρέπει όμως να γίνουν και επιπλέον μελέτες για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων που παρατηρήθηκε.

6 Βιβλιογραφία

- Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2008). Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *91*(2), 87–95.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.02.001>
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, *109*(1), 33–44. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00481-2)
- Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos Internacional*, *16*(3), 209–216.
<https://doi.org/10.1177/1082013209353983>
- Barreira, João C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, *107*(3), 1106–1113.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.030>
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., ... Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, *71*, S110–S116.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00185-4)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr., F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, *142*(3334).
<https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*(3), 481–493.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Cross, C. E., van der Vliet, A., O'Neill, C. A., Louie, S., & Halliwell, B. (1994). Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environmental Health Perspectives*, *102*(Suppl 10), 185–191.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *43*(4), 348–361.
- De Vasconcelos, M. C., Bennett, R. N., Rosa, E. A., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(10), 1578–1589. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4016>
- Díaz Reinoso, B., Couto, D., Moure, A., Fernandes, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2012). Optimization of antioxidants – Extraction from *Castanea sativa* leaves. *Chemical Engineering Journal*, *203*, 101–109.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.122>
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2011). Membrane concentration of antioxidants from *Castanea sativa* leaves aqueous extracts. *Chemical Engineering Journal*, *175*, 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.059>

- Dinis, L.-T., Oliveira, M. M., Almeida, J., Costa, R., Gomes-Laranjo, J., & Peixoto, F. (2012). Antioxidant activities of chestnut nut of *Castanea sativa* Mill. (Cultivar 'Judia') as function of origin ecosystem. *Food Chemistry*, *132*(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.096>
- Evans, M. D., & Cooke, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, *26*(5), 533–542.
<https://doi.org/10.1002/bies.20027>
- Ferreira, I., Baptista, P., Boas, M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, *100*, 1511–1516.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.043>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/nu9050455>
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: An update. *Biochemical Society Symposium*, *61*, 73–101.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, *35*(Pt 5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51–88.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, *116*(5), 3029–3085.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- ivkovi, J., Zekovic, Z., Mujic, I., Tumbas Šaponjac, V., Cvetkovi, D., & Spasojevi, I. (2009). *Antioxidant Properties of Phenolics in Castanea sativa Mill. Extracts*.

- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4–5), 340–352.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.006>
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 200(2), 248–254.
<https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Lennon, S. V., Martin, S. J., & Cotter, T. G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24(2), 203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1991.tb01150.x>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luqman, S., & Rizvi, S. I. (2006). Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytotherapy Research: PTR*, 20(4), 303–306.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1861>
- Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(10), 2013–2054. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3208>
- McCaughan, J. S. (1999). Photodynamic therapy: A review. *Drugs & Aging*, 15(1), 49–68. <https://doi.org/10.2165/00002512-199915010-00005>
- Mujić, A., Grdović, N., Mujić, I., Mihailović, M., Živković, J., Poznanović, G., & Vidaković, M. (2011). Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut

- leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic β -cells. *Food Chemistry*, 125(3), 841–849.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.068>
- PACHER, P., BECKMAN, J. S., & LIAUDET, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., ... Puppo, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: Key players in the legume–Rhizobium symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1769–1776. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj184>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pourcelot, S., Faure, H., Firoozi, F., Ducros, V., Tripier, M., Hee, J., ... Favier, A. (1999). Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 5-(hydroxymethyl)uracil in smokers. *Free Radical Research*, 30(3), 173–180.
- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... Acuña-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence

- supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1–11.
- Rice-Evans, C. A., & Diplock, A. T. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 15(1), 77–96. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90127-g](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90127-g)
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., & Antolovich, M. (1999). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography. A*, 855(2), 529–537. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00719-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00719-0)
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Spanou, C., Stagos, D., Tousias, L., Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2007). Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Research*, 27(5A), 3403–3410.
- Spencer, J. P. E., Abd El Mohsen, M. M., Minihane, A.-M., & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *The British Journal of Nutrition*, 99(1), 12–22. <https://doi.org/10.1017/S0007114507798938>
- Wade, L. G. (2010). *Organic chemistry* (7th ed). Retrieved from <https://trove.nla.gov.au/version/208054191>
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>

Živković, J., Zekovic, Z., Mujic, I., Vidovic, S., Cvetkovič, D., Lepojević, Ž., ...

Trutic, N. (2010). Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of *Castanea sativa* Mill. Extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 61–68. <https://doi.org/10.17221/155/2009-CJFS>