



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Εκτίμηση αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων
φαρμακευτικών φυτών Βορείου Αιγαίου.»*

Αϋλίν Χαλήλ Ογλού (του Αχμέτ)

ΛΑΡΙΣΑ 2020

*“Εκτίμηση αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων
φαρμακευτικών φυτών Βορείου Αιγαίου.”*

*“Comparison of antioxidant and antimutagenic potential of extracted medicinal
plants of the Northern Aegean.”*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών
Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μητάκου Σοφία: Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών
Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σκαλτσούνης Αλέξιος – Λεάνδρος: Καθηγητής του Τομέα Φαρμακογνωσίας και
Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα που, με εμπιστοσύνη, μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω μια τόσο ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία στο εργαστήριο της Φυσιολογίας των Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και χάρη στον οποίο έμαθα τόσα πράγματα.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την υπεύθυνη μου Κερασιώτη Ευθαλία και όλη την ομάδα του εργαστηρίου που πάντα ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν και με τους οποίους μοιράστηκα αυτή την εμπειρία.

Ένα ακόμη ευχαριστώ στο εργαστήριο του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και δη στον υποψήφιο διδάκτορα Βαγγέλη Αξιώτη για την παρασκευή των εκχυλισμάτων.

Τέλος, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου που στάθηκαν πάντα δίπλα μου και με στήριξαν σε οτιδήποτε χρειαζόμουν για να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Εδώ και πολλά χρόνια, πολλά φυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για θεραπευτικούς σκοπούς. Πρόκειται για φυτά που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Χάρη σε αυτές τις ιδιότητες, ενισχύουν σημαντικά το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες που μπορεί να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου (*Fritillaria pontica*, *Melissa officinalis*, *Paeonia mascula*). Αρχικά, μέσω της μεθόδου Folin Ciocalteu έγινε η εκτίμηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων. Το εκχύλισμα του φυτού *Melissa officinalis* εμφάνισε το πλουσιότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο (**200.5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**) και ακολουθούν τα *Paeonia mascula* (**137.5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**), *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (**25 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**) και *Fritillaria pontica* (βολβοί) (**24 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**). Όσον αφορά την μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH· όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας *Fritillaria pontica* (βολβοί) (**IC50 = 345 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (**IC50 = 140 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**IC50 = 24,5 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 18,5 µg / ml**). Επίσης στη μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS·⁺ όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας *Fritillaria pontica* (βολβοί) (**IC50 = 290 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (**IC50 = 172 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 11 µg / ml**) *Paeonia mascula* (**IC50 = 7,2 µg / ml**).

Στη μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O₂⁻, μόνο το *Fritillaria pontica* (βολβοί) δεν εξουδετέρωσε τη ρίζα O₂⁻ ενώ τα υπόλοιπα 3 εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (**IC50 = 760 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 30 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**IC50 = 24 µg / ml**). Όσον αφορά τη μέθοδο αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH·, κανένα εκχύλισμα δεν εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα. Επιπρόσθετα και τα 4 εκχυλίσματα εμφάνισαν αναγωγική δύναμη με την ακόλουθη σειρά αυξημένης δραστηριότητας *Fritillaria pontica* (βολβοί) (**RP_{0.5AU} = 173**

$\mu\text{g} / \text{ml}$) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) ($\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 53 \mu\text{g} / \text{ml}$) < *Paeonia mascula* ($\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 33 \mu\text{g} / \text{ml}$) < *Melissa officinalis* ($\text{RP}_{0.5\text{AU}} = 15 \mu\text{g} / \text{ml}$). Τέλος, και τα 4 εκχυλίσματα προστατεύουν το DNA από βλάβες επαγόμενες από ρίζες ROO· με την ακόλουθη σειρά αυξημένης δραστηριότητας *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) ($\text{IC}_{50} = 1030 \mu\text{g} / \text{ml}$) < *Fritillaria pontica* (βολβοί) ($\text{IC}_{50} = 790 \mu\text{g} / \text{ml}$) < *Paeonia mascula* ($\text{IC}_{50} = 250 \mu\text{g} / \text{ml}$) < *Melissa officinalis* ($\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Abstract

For many years, many plants have been widely used for medicinal purposes. These plants are rich in polyphenols and have strong antioxidant and antimutagenic properties. Thanks to these properties, they are antioxidants and chemoprotective factors that significantly strengthen the antioxidant system of the human body, neutralizing the free radicals that are created during oxidative stress. The purpose of this study was to determine the antioxidant and antimutagenic potential in extracts of medicinal plants of Northern Aegean (*Fritillaria pontica*, *Melissa officinalis* and *Paeonia mascula*). Initially, the method Folin Ciocalteu was used to estimate the phenolic content of the extracts. The plant extract of *Melissa officinalis* showed the richest polyphenolic content (**200.5 mg gallic acid / g extract**) followed by *Paeonia mascula* (**137.5 mg gallic acid / g extract**), *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**25 mg gallic acid / g extract**) and the *Fritillaria pontica* (bulbs) (**24 mg gallic acid / g extract**). Regarding the method of interaction with the radical DPPH· all the extracts showed neutralizing ability with the following sequence of increasing activity *Fritillaria pontica* (bulbs) (**IC50 = 345 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**IC50 = 140 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**IC50 = 24,5 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 18,5 µg / ml**). Also in the method of interaction with the radical ABTS•⁺ all the extracts showed neutralizing ability with the following sequence of increasing activity *Fritillaria pontica* (bulbs) (**IC50 = 290 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**IC50 = 172 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 11 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**IC50 = 7,2 µg / ml**). In the method of interaction with the radical O₂⁻, only *Fritillaria pontica* (bulbs) did not neutralize the radical O₂⁻ while the remaining 3 extracts showed neutralizing ability with the following sequence of increasing activity *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**IC50 = 760 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**IC50 = 30 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**IC50 = 24 µg / ml**). Regarding the method of interaction with the radical OH·, no extract showed neutralizing ability against the radical. In addition, all 4 extracts showed reducing power with the following sequence of increasing activity *Fritillaria pontica* (bulbs) (**RP_{0.5AU} = 173 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**RP_{0.5AU} = 53 µg / ml**) < *Paeonia mascula* (**RP_{0.5AU} = 33 µg / ml**) < *Melissa officinalis* (**RP_{0.5AU} = 15 µg / ml**). Finally, all 4 extracts protect the DNA from damage caused by free radicals ROO• with the following sequence of increasing activity *Fritillaria pontica* (crown imperial) (**IC50 = 1030 µg / ml**) < *Fritillaria pontica* (bulbs)

**(IC₅₀ = 790 µg / ml) < *Paeonia mascula* (IC₅₀ = 250 µg / ml) < *Melissa officinalis*
(IC₅₀ = 100 µg / ml).**

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Οι Ελεύθερες ρίζες	14
1.2 Η Παραγωγή των ελεύθερων ριζών	16
1.3 Η Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου	18
1.4 Αντιοξειδωτικά	20
1.5 Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του	23
1.6 Οι Φυτικές Πολυφαινόλες	25
1.7 Τα Φαρμακευτικά φυτά Βορείου Αιγαίου	26
2. ΣΚΟΠΟΣ	27
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	28
3.2 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•	29
3.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS• ⁺	31
3.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής ισχύος	34
3.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ ⁻	37
3.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•	39
3.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	41
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44

<i>4.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu</i>	<i>44</i>
<i>4.2 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•</i>	<i>45</i>
<i>4.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•⁺</i>	<i>46</i>
<i>4.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής δύναμης</i>	<i>47</i>
<i>4.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O₂⁻</i>	<i>48</i>
<i>4.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•</i>	<i>49</i>
<i>4.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA</i>	<i>49</i>
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

Εικόνες

Εικόνα 1. Αντίδραση Fenton (Shih-Shin L. et al., 2013).	14
Εικόνα 2. Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (James & Leonid, 2017).	17
Εικόνα 3. Η ενδογενής και εξωγενής παραγωγή ελεύθερων ριζών (Ahmad S. et al., 2017).	18
Εικόνα 4. Μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το αντιοξειδωτικό στην ελεύθερη ρίζα (Fatemeh et al., 2020)	21
Εικόνα 5. Η σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικό στρες (Liu M. et al., 2017 ...	24
Εικόνα 6. Τα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (Maria et al., 2017).	26
Εικόνα 7. Αναγωγή της DPPH• σε DPPH-H και μεταβολή του χρώματος της (Jose et al., 2013)	30
Εικόνα 8. Παραγωγή της δραστικής ρίζας ABTS• ⁺ (Tyler et al., 2006)	32
Εικόνα 9. Αναγωγή της ρίζας ABTS• ⁺ σε ABTS (Pannala et al., 2011)	33
Εικόνα 10. Μετατροπή του Fe ³⁺ στο αντίστοιχο σύμπλοκο	35
Εικόνα 11. Μετατροπή του χρώματος κατά την αντίδραση	35
Εικόνα 12. Η μετατροπή του NBT σε φορμαζάνη μέσω του συστήματος PMS-NADH (Graciliana Lopes, 2014)	37
Εικόνα 13. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA (Jakub Treml & Karel Smejkal, 2016)	40
Εικόνα 14. Οι 3 διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA και η διάκριση τους σε τζελ αгарόζης (Kudo et al., 2015)	42

Πίνακες

<i>Πίνακας 1. Οι δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Συμβολισμοί</i>	<i>15</i>
<i>Πίνακας 2. Τα μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου και Συμβολισμοί.....</i>	<i>15</i>
<i>Πίνακας 3. Οι δραστικές Μορφές Αζώτου και Συμβολισμοί</i>	<i>16</i>
<i>Πίνακας 4. Οι Ενζυμικοί και μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες</i>	<i>23</i>
<i>Πίνακας 5. Οι διάφορες ασθένειες που προκαλούνται απο το οξειδωτικό στρες.</i>	<i>24</i>
<i>Πίνακας 6. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν ...</i>	<i>29</i>
<i>Πίνακας 7.Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν</i>	<i>30</i>
<i>Πίνακας 8. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.....</i>	<i>31</i>
<i>Πίνακας 9. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν ...</i>	<i>33</i>
<i>Πίνακας 10. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων</i>	<i>34</i>
<i>Πίνακας 11. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν .</i>	<i>36</i>
<i>Πίνακας 12. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων</i>	<i>36</i>
<i>Πίνακας 13. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν .</i>	<i>38</i>
<i>Πίνακας 14. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.....</i>	<i>38</i>
<i>Πίνακας 15. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν .</i>	<i>40</i>
<i>Πίνακας 16. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.....</i>	<i>41</i>
<i>Πίνακας 17.Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν ..</i>	<i>43</i>

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος.....	44
Διάγραμμα 2. Η % αναστολή της ρίζας DPPH• απο τα εκχυλίσματα A) Fritillaria pontica (βολβοί), B) Fritillaria pontica (υπέργειο τμήμα), C) Paeonia mascula, D) Melissa officinalis.....	45
Διάγραμμα 3. Η % αναστολή της ρίζας ABTS•+ από τα εκχυλίσματα A) Fritillaria pontica (βολβοί), B) Fritillaria pontica (υπέργειο τμήμα), C) Paeonia mascula, D) Melissa officinalis.....	46
Διάγραμμα 4. Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων A) Fritillaria pontica (βολβοί), B) Fritillaria pontica (υπέργειο τμήμα), C) Paeonia mascula, D) Melissa officinalis.....	47
Διάγραμμα 5. Η % αναστολή της ρίζας O ₂ ⁻ απο τα εκχυλίσματα A) Fritillaria pontica (υπέργειο τμήμα), B) Melissa officinalis, C) Paeonia mascula.....	48
Διάγραμμα 6. Η % αναστολή της ρίζας ROO• απο τα εκχυλίσματα A) Fritillaria pontica (βολβοί), B) Fritillaria pontica (υπέργειο τμήμα), C) Melissa officinalis, D)Paeonia mascula.....	50

1.Εισαγωγή

1.1 Οι Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα χημικά είδη (μόρια, άτομα και ιόντα) που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα εξωτερικά τους τροχιακά (Sergio D.M & Paola V., 2020). Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια είναι αυτά που καθορίζουν την δραστικότητα σε μια ελεύθερη ρίζα (M.Valko et al., 2006).

Ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να γίνει:

- a) μέσω ομολυτικής διάσπασης του ομοιοπολικού δεσμού ενός μορίου
- b) μέσω αφαίρεσης ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο
- c) μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου σε ένα μόριο

Πρόκειται για μόρια πολύ δραστικά και ασταθή (Fatemeh et al., 2020). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια κυττάρων (μη ελεύθερες ρίζες) και να προκαλέσουν βλάβες σε ιστούς ή να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο και έτσι να θέτουν σε κίνδυνο ολόκληρο τον οργανισμό (V.Lobo, A.Patil, A.Phatak, N.Chandra, 2010). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλες ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να εξουδετερωθούν και πλέον να μην αποτελούν ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al.1993, Wilson, 1978). Τέλος, η πρώτη αντίδραση που αφορούσε τις ελεύθερες ρίζες ήταν η αντίδραση του Fenton το 1894,στην οποία ένα ιόν σιδήρου (Fe^{2+}) αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) για να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα δίνει ρίζα υδροξυλίου (OH^*) και ανιόν υπεροξειδίου (Shih-Shin L. et al., 2013) (Εικόνα 1.).



Εικόνα 1. Αντίδραση Fenton (Shih-Shin L. et al., 2013).

Οι πιο απλές ρίζες είναι τα άτομα υδρογόνου διότι περιέχουν ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο ενώ αυτές που έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο ή το άζωτο αποτελούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) ή τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen Species, RNS) και είναι οι πιο συνήθεις ελεύθερες ρίζες (Robert et al., 2016f). Παραδείγματα των ROS είναι η ρίζα του υδροξυλίου, του αλκοξυλίου, του σουπεροξειδίου, του περοξυλίου και του υδροπεροξυλίου, το Όζον (Πίνακας 1) καθώς και τα μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι ρίζες θείου και τριχλωρομεθυλίου και τα υποχλωριώδη οξέα (Πίνακας 2) ενώ των RNS είναι το μονοξειδίο, το διοξειδίο του αζώτου και τα νιτρικά υπεροξειδία (Okezie I., 1998, Lobo et al., 2010, Wulf Dröge, 2002) (Πίνακας 3).

Πίνακας 1. Οι δραστικές Μορφές Οξυγόνου και Συμβολισμοί

Δραστικές μορφές Οξυγόνου	Σύμβολα
Ρίζα Υδροξυλίου	OH•
Ρίζα αλκοξυλίου	RO•
Ρίζα σουπεροξειδίου	O ₂ •
Ρίζα περοξυλίου	ROO•
Ρίζα υδροπεροξυλίου	HO ₂ •
Όζον	O ₃

Πίνακας 2. Τα μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου και Συμβολισμοί

Μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου	Σύμβολα
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H ₂ O ₂
Ρίζες θείου	RS•
Ρίζες τριχλωρομεθυλίου	CCl ₃ •
Υποχλωριώδη οξέα	COCl

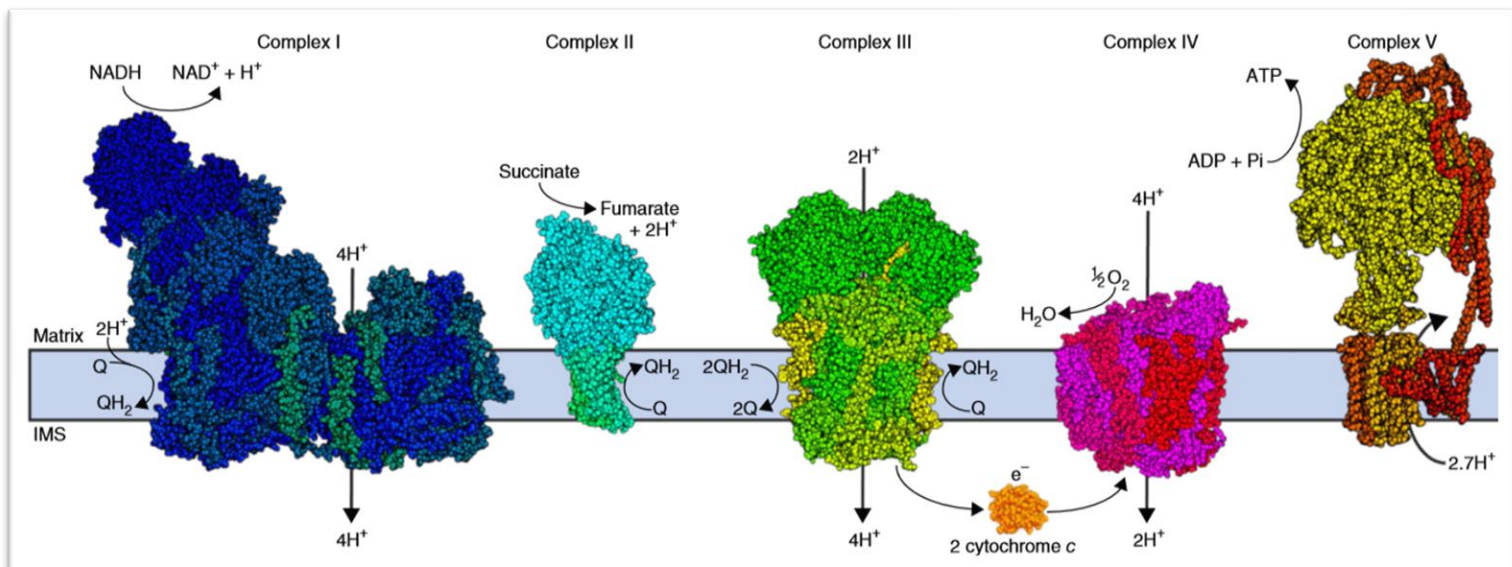
Πίνακας 3. Οι δραστικές Μορφές Αζώτου και Συμβολισμοί

Δραστικές Μορφές Αζώτου,	Σύμβολα
Μονοξείδιο του Αζώτου	NO•
Διοξείδιο του Αζώτου	NO ₂
Νιτρικό Υπεροξείδο	ONOO•

1.2 Η Παραγωγή των ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών μέσα στον οργανισμό μπορεί να γίνει είτε ενδογενώς είτε από εξωγενείς παράγοντες. Ενδογενώς μπορεί να γίνει μέσω:

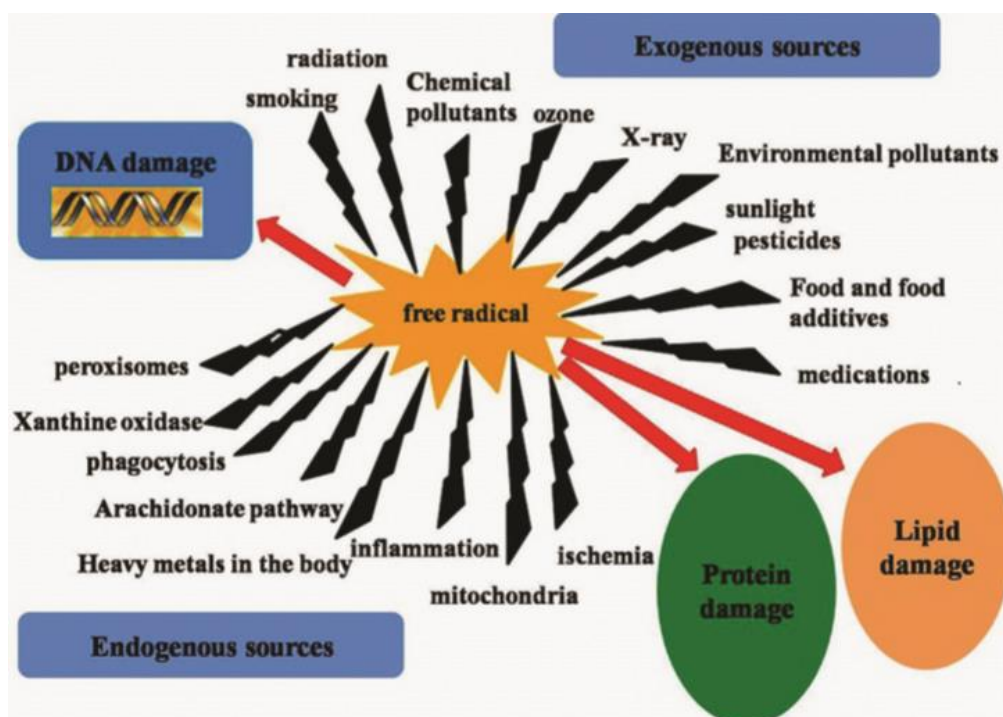
- Της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας ή οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την οποία παράγονται ROS. Η αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από πέντε μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (Complex I-V) και είναι αυτά που μετατρέπουν την ενέργεια της τροφής σε ATP. Αρχικά, τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν κατά τον μεταβολισμό της τροφής (Κύκλος του Krebs) μεταφέρονται μέσω του NADH στο σύμπλοκο I (αναγωγή του ζεύγους NADH-Q) και μέσω του FADH₂ στο σύμπλοκο II (ηλεκτρική αφυδρογονάση). Από εκεί μέσω της ουβικινόνης, ένα διαχεόμενο μόριο, στο σύμπλοκο III (αναγωγή του κυτοχρώματος c), έπειτα στο σύμπλοκο IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) μέσω ενός άλλου διαχεόμενου μορίου, του κυτοχρώματος c και τέλος στο O₂ το οποίο ανάγεται σε H₂O. Τέλος, το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) εκμεταλλεύεται την βαθμίδωση πρωτονίων και παράγει ATP (Εικόνα 2). Αν όμως το O₂ δεν αναχθεί τελικά σε H₂O τότε θα μετατραπεί σε ROS (James & Leonid, 2017).



Εικόνα 2. Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (James & Leonid, 2017).

- Της φλεγμονώδους αντίδρασης κατά την οποία τα ουδετερόφιλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προστατεύουν τον οργανισμό από βακτήρια. Κατά την εισβολή ενός βακτηρίου τα ουδετερόφιλα κύτταρα απελευθερώνουν O_2^- για να καταστρέψουν το βακτήριο. Όμως το O_2^- που απελευθερώνεται μπορεί να δώσει διάφορες μορφές ROS, που είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό (Victor et al., 2004).
- Της δράσης άλλων κυτταρικών συστατικών, όπως ενζύμων του ενδοπλασματικού δικτύου, του κυτταροπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης, που θα αναγνωρίσουν το O_2 ως υπόστρωμα το οποίο δεν φτάνει στα μιτοχόνδρια. Τέτοια ένζυμα είναι η οξειδάση του CYT-P450, το σύστημα μονοξυγενάσης, η οξειδάση της ξανθίνης, η συνθάση νιτρικού οξειδίου, η NADPH οξειδάση και πολλά άλλα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην διεργασία φλεγμονής (κυκλοξυγενάση και λιποξυγενάση) που θα αυξήσουν την παραγωγή διάφορων μορφών ROS (Richard L.A & Jonathan M.D, 2009, Fatma Vatansever et al., 2013).

Οι εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι το όζον, η διατροφή, το κάπνισμα, η υπερϊώδης και η ηλιακή ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, η υπερβολική άσκηση, η δράση φαρμάκων, χημικές ουσίες και φυτοφάρμακα (Fatemeh et al., 2020, Ahmad S. et al., 2017) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η ενδογενής και εξωγενής παραγωγή ελεύθερων ριζών (Ahmad S. et al., 2017).

1.3 Η Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου

Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορεί να έχουν και θετική και αρνητική επίδραση.

Θετικά μπορεί να επιδράσουν, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή για την καταπολέμηση βακτηρίων. Επίσης, αποτελώντας χημικούς αγγειοφόρους (NO) για την μεταφορά σημάτων από κύτταρο σε κύτταρο. Τέλος, παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύνθεση κάποιων κυτταρικών δομών καθώς και βοηθούν τα αμυντικά συστήματα ξενιστών για να καταπολεμήσουν παθογόνα (Gabriele et al., 2017, Victor et al., 2004, Rimbach et al., 1999).

Αρνητικά μπορεί να επιδράσουν σε υψηλές συγκεντρώσεις, θέτοντας σε κίνδυνο τα κύτταρα του οργανισμού. Συγκεκριμένα, μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή

να επηρεάσουν πολλές βασικές λειτουργίες κυττάρων και έτσι ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν διάφορες ασθένειες (Golden et al., 2002). Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια και στο DNA και να οδηγήσουν έτσι σε καρκινογένεση και γήρανση (Lobo et al., 2010).

Στα Λιπίδια:

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει μια πηγή δευτερογενών ελεύθερων ριζών που μπορεί να δράσει είτε ως δεύτερος αγγελιοφόρος είτε να αλληλεπιδράσει άμεσα με άλλα βιομόρια, ενισχύοντας τις βιοχημικές βλάβες. Λαμβάνει χώρα στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και προχωρά ως μια αλυσιδωτή αντίδραση ελεύθερων ριζών. Κατά την οποία αντίδραση, μια ρίζα υδροξυλίου αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου με αποτέλεσμα να παραχθεί έτσι μια ρίζα λιπιδίου, ενώ η ίδια $\text{OH}\cdot$ μετατρέπεται σε ένα συζευγμένο διένιο, στο οποίο αν προστεθεί οξυγόνο θα δώσει μια ρίζα λιπιδικού υπεροξυλίου ($\text{LOO}\cdot$). Αυτή η ρίζα $\text{LOO}\cdot$ με την σειρά της αφαιρεί από άλλα μόρια λιπιδίων άτομα υδρογόνου και δίνει έτσι τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH) και μια νέα ρίζα. Στην υπεροξειδωση λιπιδίων παράγονται πολλές ενώσεις όπως αλκάνια, μαλονδιαλδεΐδη και ισοπροστάνες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες σε πολλές ασθένειες όπως στον διαβήτη, ισχαιμικές βλάβες και νευρογενετικές ασθένειες (Lobo et al, 2010). Τέλος, η υπερβολική υπεροξειδωση λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει μεγάλες αλλαγές σε φυσικές ιδιότητες των κυτταροπλασματικών μεμβρανών όπως για παράδειγμα στην ρευστότητα τους (Michael M. Gaschler, Brent R. Stockwell, 2017).

Στο DNA:

Οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA αλλοιώνοντας είτε τις βάσεις του, είτε καταστρέφοντας το επιδιορθωτικό του σύστημα και είτε προκαλώντας σε αυτό θραύσεις (Ames, 1986). Σε περιπτώσεις, γήρανσης και καρκίνου έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση του οξειδωτικού νουκλεοτιδίου 8 υδροξυ-2'-γουανοσίνη (8-OHdG) το οποίο παράγεται από την προσβολή της ρίζας υδροξυλίου στο άτομο άνθρακα της γουανοσίνης που βρίσκεται στην θέση 8 (M. Valko et al., 2006, Lobo et al., 2010).

Στις πρωτεΐνες:

Η οξειδωση των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες μπορεί να προκαλέσει την τροποποίηση ένα συγκεκριμένου αμινοξέος, την διάσπαση πεπτιδίων και τον σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. Αποτέλεσμα όλων είναι η αλλαγή της δομής της πρωτεΐνης και επομένως και της λειτουργίας της. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως αργινίνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη και κυστεΐνη είναι πιο ευάλωτες στην οξειδωση. Επίσης η τροποποίηση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες αυξάνει την ευαισθησία τους στην πρωτεόλυση καθώς και την παραγωγή καρβονυλίων (Lobo et. Al. 2010). Τέλος, η καταστροφή των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει στα κύτταρα μεγάλες βλάβες διότι μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα πολλών ενζύμων, υποδοχέων και μεμβρανικών μεταφορέων (Aline et al., 2001).

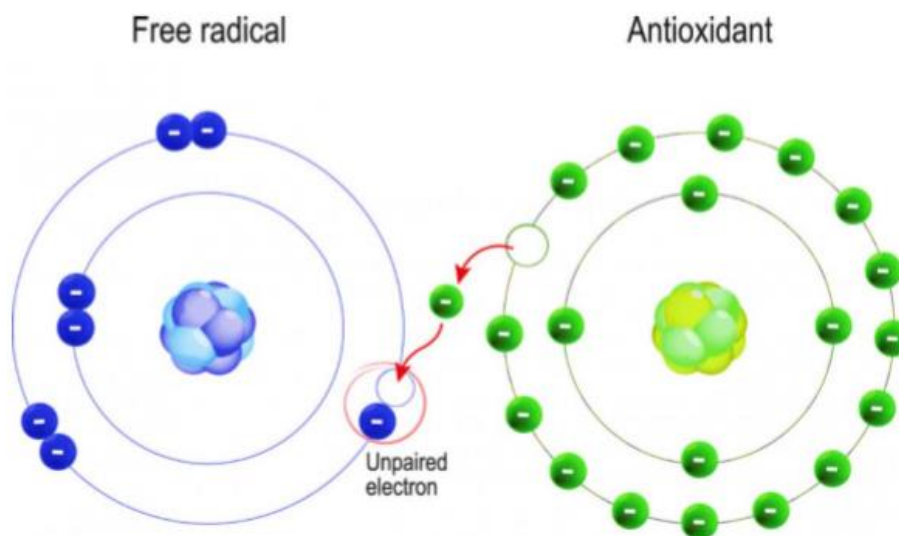
1.4 Αντιοξειδωτικά

Οποιαδήποτε ουσία που μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των ROS, να εμποδίσει τον σχηματισμό τους ή να επιδιορθώσει τις βλάβες που προκαλούν, ορίζεται ως αντιοξειδωτικός παράγοντας (Robert et al., 2016,).

Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες δρουν με τρεις τρόπους:

1. Καταστρέφουν άμεσα τα ROS που έχουν ήδη σχηματιστεί
2. Αναστέλλουν τον σχηματισμό νέων ROS
3. Απομακρύνουν ή επιδιορθώνουν τις βλάβες ή τις τροποποιήσεις που προέκυψαν από τα ROS

Τις παραπάνω λειτουργίες τις επιτελούν εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, δηλαδή δίνοντας σε αυτές το ηλεκτρόνιο που τους λείπει, με αποτέλεσμα να μετατραπούν τα ίδια σε λιγότερες δραστικές ελεύθερες ρίζες (Fatemeh et al., 2020) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το αντιοξειδωτικό στην ελεύθερη ρίζα (Fatemeh et al., 2020)

Υπάρχουν ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες (αυτοί που υπάρχουν μέσα στον οργανισμό φυσιολογικά) και εξωγενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες (αυτοί που προέρχονται από την τροφή).

Μέσα στον οργανισμό τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς παράγοντες (Lobo et al., 2010) (Πίνακας 4). Στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες, η Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σχεδόν σε όλα τα αερόβια κύτταρα και στο εξωκυτταρικό υγρό και αποτελεί την κύρια άμυνα στις ρίζες σουπεροξειδίου διότι μετατρέπει τις $O^{\cdot -}$ σε H_2O_2 . Η Καταλάση (CAT) είναι ένα κοινό ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για να πραγματοποιήσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που είναι ένα επιβλαβές υποπροϊόν πολλών φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών. Για να αποφευχθεί η βλάβη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 που παράγεται σε νερό και οξυγόνο που είναι λιγότερο επικίνδυνα (Lobo et al., 2010). Η Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) θεωρείται ότι είναι πιο σημαντική από την καταλάση ως σύστημα αφαίρεσης του H_2O_2 στους ανθρώπους (Okezie, 1998). Βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτοσόλιο, ανάγει το H_2O_2 ή το $ROOH$ σε H_2O και αλκοόλη χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων τη GSH η οποία μετατρέπεται σε GSSG (Bjornstedt et al., 1997, Callahan et al., 2001). Τέλος, η Αναγωγή της

γλουταθειόνης (GR) διατηρεί την γλουταθειόνη μέσα στα κύτταρα σε ανηγμένη μορφή, μετατρέποντας τη GSSG σε 2 μόρια GSH (C.V Balasubrahmanya Prasad et al., 2008).

Στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες, η βιταμίνη E αποτελεί το πιο ισχυρό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό που μπορεί να υπάρξει σε πολλές ισομορφές (τοκοφερόλες), με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο καλά μελετημένη και ενεργή. Ο ρόλος της α-τοκοφερόλης είναι να αλληλοεπιδράσει με τις ελεύθερες ρίζες για να εμποδίσει την λιπιδική υπεροξείδωση και να προστατέψει τις μεμβράνες από την οξείδωση. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) αποτελεί έναν αναγωγικό παράγοντα που έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS, επειδή όμως δεν μπορεί να συντεθεί στον άνθρωπο, η λήψη της γίνεται μέσω της διατροφής (Lobo et al. 2010). Η βιταμίνη A αποτελεί επίσης ένα λιπόφιλο αντιοξειδωτικό και προκύπτει από το β-καροτένιο με έναν άγνωστο μηχανισμό. Η βιταμίνη A καθώς και το β-καροτένιο έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδράσουν με τις βιταμίνες E και C για να προστατέψουν τα κύτταρα από ROS (Livrea et al., 1995). Τα Φλαβονοειδή επιτελούν τις εξής λειτουργίες: α) αναστείλουν την σύνθεση των ROS, β) αναστέλλουν ένζυμα ή την χηλίωση ιχνοστοιχείων που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία ελεύθερων ριζών, γ) σαρώνουν ROS και δ) βελτιώνουν τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες (Gabriele et al., 2017). Το συνένζυμο Q₁₀ που βρίσκεται στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση του ATP και εξουδετερώνει τις ρίζες υπεροξυλίου είτε άμεσα, είτε έμμεσα με αναγέννηση των βιταμινών C και E (Witt et al., 1992, Crane, 2001). Η γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να διατηρεί σε ανηγμένη κατάσταση το ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, εξουδετερώνει την ρίζα OH[·] και το O₂ ανάγοντας το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξείδια, ενώ αναστέλλει την λιπιδική υπεροξείδωση ανάγοντας τις ρίζες βιταμίνης E (Niki et al., 1985). Τέλος, τα μικροσυστατικά (Cu, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺) δρουν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες για ένζυμα όπως το SOD (Lobo et al. 2010).

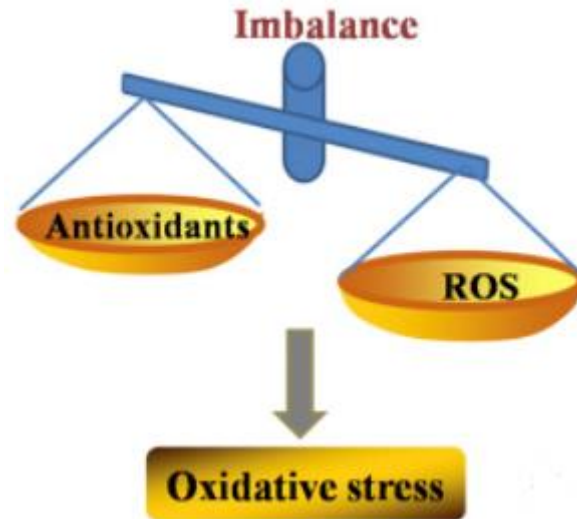
Πίνακας 4. Οι Ενζυμικοί και μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	Μη Ενζυμικά αντιοξειδωτικά
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Βιταμίνη A,C,E
Καταλάση (CAT)	Φλαβονοειδή
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP _x)	Θειόλες (γλουταθειόνη, συνένζυμο Q ₁₀)
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)	Μικροσυστατικά: Cu, Fe, Zn, Mg (ενζυμικοί συμπαράγοντες)

1.5 Το οξειδωτικό στρες και οι επιπτώσεις του

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μέσα στον οργανισμό μεταξύ παραγωγής ROS και δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Okezie, 1998) (Εικόνα 5). Η εμφάνιση του οξειδωτικού στρες μπορεί να γίνει όταν :

- Υπάρχει μειωμένη παραγωγή αντιοξειδωτικών λόγω τοξικών παραγόντων ή μεταλλάξεων που επηρεάζουν αντιοξειδωτικά ένζυμα.
- Υπάρχει αυξημένη παραγωγή ROS και RNS λόγω έκθεσης του οργανισμού σε τοξίνες είτε λόγω παραγωγής τους από ενδογενή συστήματα (Sies, 1991).



Εικόνα 5. Η σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικό στρες (Liu M. et al., 2017)

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη και κυτταρικό θάνατο, ενώ εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 (Okezie, 1998).

Πίνακας 5. Οι διάφορες ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες

Διάφορες ασθένειες που προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες
Καρκίνος
Νόσος του Parkinson
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα
Αθηροσκλήρωση
Καταρράκτης

1.6 Οι Φυτικές Πολυφαινόλες

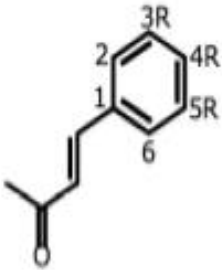
Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που έχει αποδειχθεί ότι ασκούν σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις (Gessner, Ringseis & Eder, 2016).

Κατά το οξειδωτικό στρες επειδή υπάρχει αυξημένη παραγωγή των ROS χρησιμοποιούνται πολυφαινόλες οι οποίες μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης αναστέλλουν συγκεκριμένα ένζυμα, όπως την οξειδάση της ξανθίνης ή την NADPH οξειδάση ενώ από την άλλη ενεργοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως την καταλάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την υπεροξειδική δισμουτάση, για να μειώσουν έτσι τα αυξημένα επίπεδα των ROS. Ενώ, η αντιφλεγμονώδης τους δράση οφείλεται στο γεγονός ότι αναστέλλουν και ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή εικοσανοειδών, όπως κυκλοοξυγενάσες, λιποξυγενάσες και φωσφολιπάσες A2, μειώνοντας έτσι την παραγωγή προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, άρα και την φλεγμονή (Nour Yahfoufi et al., 2018).

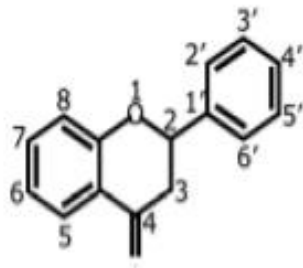
Το κοινό χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι ότι αποτελούνται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτύλιους πάνω στους οποίους υπάρχει τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα. Ανάλογα με την δομή τους διακρίνονται σε φλαβονοειδή και σε φαινολικά οξέα, λιγνάνια, στυλβένια, που είναι μη φλαβονοειδή (Yue Zhou et al., 2016) (Εικόνα 6). Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται στο ότι έχουν την ιδιότητα να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες καθώς και χηλικά μέταλλα. Συγκεκριμένα, αποτελούν δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων για τις ελεύθερες ρίζες δημιουργώντας φαινολικές ρίζες (Blochina et al., 2003, Ferguson, 2001).

Polyphenols

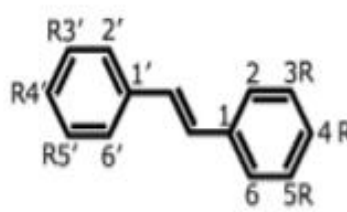
Phenolic acids



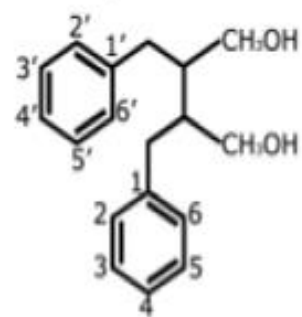
Flavonoids



Stilbenes



Lignans



Εικόνα 6. Τα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (Maria et al., 2017).

1.7 Τα Φαρμακευτικά φυτά Βορείου Αιγαίου

Τα ελληνικά νησιά του Βορείου Αιγαίου (Λήμνος, Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ικαρία, Ψαρά, Άγιος Ευστράτιος, Φούρνοι, Οινούσσειες) είναι νησιά στα οποία εξακολουθεί να γίνεται η παραδοσιακή χρήση φαρμακευτικών φυτών. Οι κάτοικοι των νησιών παρά την πρόσβαση τους στα σημερινά φάρμακα εξακολουθούν να χρησιμοποιούν φαρμακευτικά φυτά για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών και λόγω του χαμηλού τους κόστους αλλά και λόγω της βιολογικής τους προέλευσης (Axiotis, Halabalaki, Skaltsounis, 2018). Ορισμένα από αυτά τα φαρμακευτικά φυτά είναι τα *Fritillaria pontica*, *Melissa officinalis*, *Paeonia mascula*. Το *Fritillaria pontica* χαρακτηρίζεται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα πολυφαινολών, συγκεκριμένα φλαβονοειδών που περιέχει και χρησιμοποιείται ως αναλγητικό και ηρεμιστικό (Ilkay Orhan et al., 2009). Το *Melissa officinalis* χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα λόγω αυξημένων επιπέδων φλαβονοειδών, ροσμαρικού και γαλλικού οξέος, καθώς και άλλων φαινολικών ενώσεων. Ονομάζεται και διαφορετικά βάλαμο λεμονιού και λόγω των πεπτικών, αντισπασμωδικών, αναλγητικών, ηρεμιστικών, τονωτικών, διουρητικών και

αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων χρησιμοποιείται ευρέως για θεραπευτικούς σκοπούς (Sepide Miraj, 2016) . Το *Paeonia mascula* ήταν γνωστό από την αρχαιότητα ως βασίλισσα των βοτάνων λόγω της ομορφιάς των ανθών του και λόγω της φαρμακευτικής του φήμης. Επιπλέον, στην μυθολογία αναφέρεται ότι χάρη σε αυτό το φυτό, οι θεοί του Ολύμπου ο Άδης και ο Άρης θεραπεύτηκαν μετά από τραυματισμό τους σε μάχη της Τροίας. Πρόκειται για ένα φυτό με αντιβακτηριακή δράση έναντι σε 2 Gram αρνητικά βακτήρια (*E.Coli* & *Enterobacter clocae*) και 2 Gram θετικά βακτήρια (*Staphylococcus aureus* & *epidermidis*) αλλά και με αντιμυκητιακή δράση έναντι σε παθογόνους μύκητες (*Candila albicans* & *tropicalis*). Τέλος, χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό, αναλγητικό, ηρεμιστικό, για τον καθαρισμό πληγών και για θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων (Vasiliki Papandreou et al., 2002).

2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο προσδιορισμός και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου επίδρασης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου (*Fritillaria pontica*, *Melissa officinalis*, *Paeonia mascula*). Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους *in vitro* έγινε μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH·, ABTS·⁺, σουπεροξειδίου (O₂⁻), υδροξυλίου (OH·) και της αναγωγικής τους ικανότητας ενώ η αντιμεταλλαξιγόνος δράση προσδιορίστηκε μέσω της ικανότητας των εκχυλισμάτων να προστατέψουν το πλασμιδιακό DNA από βλάβες επαγόμενες από ρίζες περοξυλίου (ROO·).

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τα εκχυλίσματα των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 6. Εκχυλίσματα Περιφέρειας Βορείου Αιγαίου

Φυτικά εκχυλίσματα	Είδος	Τμήμα Φυτού	Διαλύτης εκχύλισης
1	<i>Fritillaria pontica</i>	Βολβοί	EtOH /H ₂ O (50:50)
2	<i>Fritillaria pontica</i>	Υπέργειο	EtOH /H ₂ O (50:50)
3	<i>Melissa officinalis</i>	Υπέργειο	EtOH /H ₂ O (50:50)
4	<i>Paeonia mascula</i>	Υπέργειο	EtOH /H ₂ O (50:50)

3.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Είναι μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική μέθοδος, η οποία μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) χρησιμοποιείται για την μέτρηση και τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν μέσα στα 4 εκχυλίσματα των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου, χωρίς να διακρίνονται τα φαινολικά συστατικά μεταξύ τους. Το αντιδραστήριο Folin- Ciocalte αποτελείται από σύνθετα πολυμερή ιόντα που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Συγκεκριμένα, τα ετερομερή οξέα του αντιδραστηρίου οξειδώνουν τα φαινολικά ιόντα των εκχυλισμάτων με ταυτόχρονη αναγωγή τους, δίνοντας ένα προϊόν που είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου και βολφραμίου (Mo-W) και έχει χαρακτηριστικό μπλέ χρώμα, που φωτομετρικά μετριέται

σε μήκος κύματος 765 nm. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Πειραματικό διαδικασία

Αφού γίνει η σωστή αραιώση των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Δείγματα εκχύλισμα</i>	<i>με Αρνητικό Control</i>
<i>H₂O</i>	<i>1.020μl</i>	<i>1000μl</i>	<i>1.100μl</i>
<i>Folin-Ciocalteu</i>	<i>100μl</i>	<i>100μl</i>	<i>-</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	<i>-</i>	<i>20μl</i>	<i>20μl</i>
<i>Επώαση 3 min σε θερμοκρασία δωματίου</i>			
<i>Na₂CO₃</i>	<i>280μl</i>	<i>280μl</i>	<i>280μl</i>
<i>H₂O</i>	<i>600μl</i>	<i>600μl</i>	<i>600μl</i>

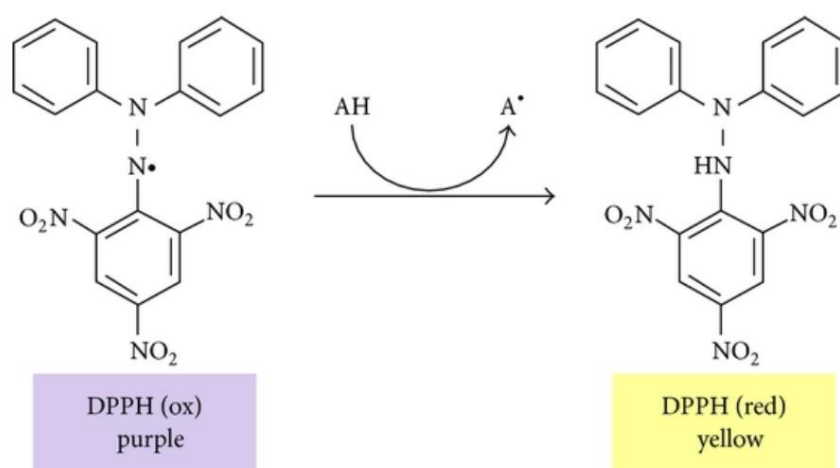
Μετά την προσθήκη ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μίγματος για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τέλος, η μέθοδος ολοκληρώνεται με φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 765nm.

3.2 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για μια μέθοδο (Brand-Williams et al.,1995) που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών φαρμακευτικών εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, είναι μια μέθοδος που δείχνει αν τα αντιοξειδωτικά μόρια των εκχυλισμάτων έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδράσουν με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), το διάλυμα της οποίας έχει

χαρακτηριστικό μωβ χρώμα και μπορεί να φωτομετρηθεί στα 517nm. Η προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) ή ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση της σταθερής ρίζας DPPH•. Με την προσθήκη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας η ρίζα DPPH• μπορεί να αναχθεί σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη και έτσι από μωβ χρώμα να μετατραπεί σε κίτρινο, με αποτέλεσμα τη μείωση της οπτικής απορρόφησης (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Αναγωγή της DPPH• σε DPPH-H και μεταβολή του χρώματος της (Jose et al., 2013)

Πειραματική διαδικασία

Αφού γίνουν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Control</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	-	-	50μl
<i>Μεθανόλη</i>	1000μl	950μl	900μl
<i>DPPH•</i>	-	50μl	50μl
<i>Ντελ.</i>	1ml	1ml	1 ml

Μετά την προσθήκη ακολουθεί ανάδευση, επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 517 nm. Τέλος και των δειγμάτων στα οποία δεν υπάρχει DPPH•. Τέλος, επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στα 517 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 8).

Πίνακας 9. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων

<i>Δείγματα</i>	
<i>Εκχύλισμα</i>	<i>500μl</i>
<i>Μεθανόλη</i>	<i>950μl</i>
<i>Υπελ.</i>	<i>1ml</i>

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα:

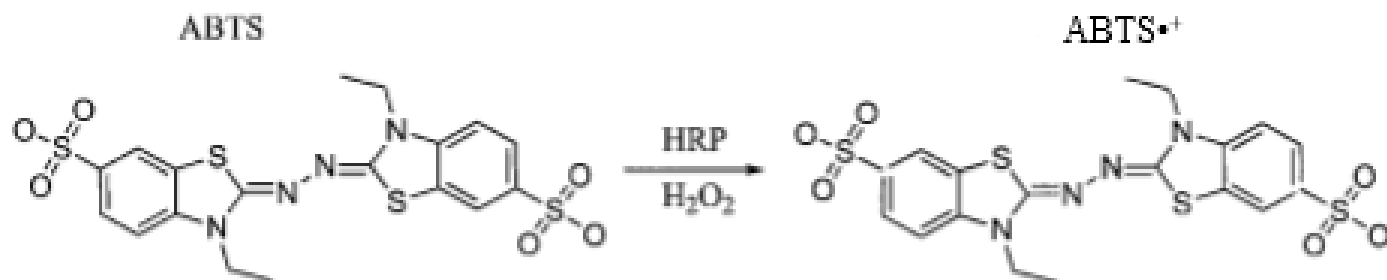
% εξουδετέρωσης του DPPH •

$$= \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

3.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•⁺

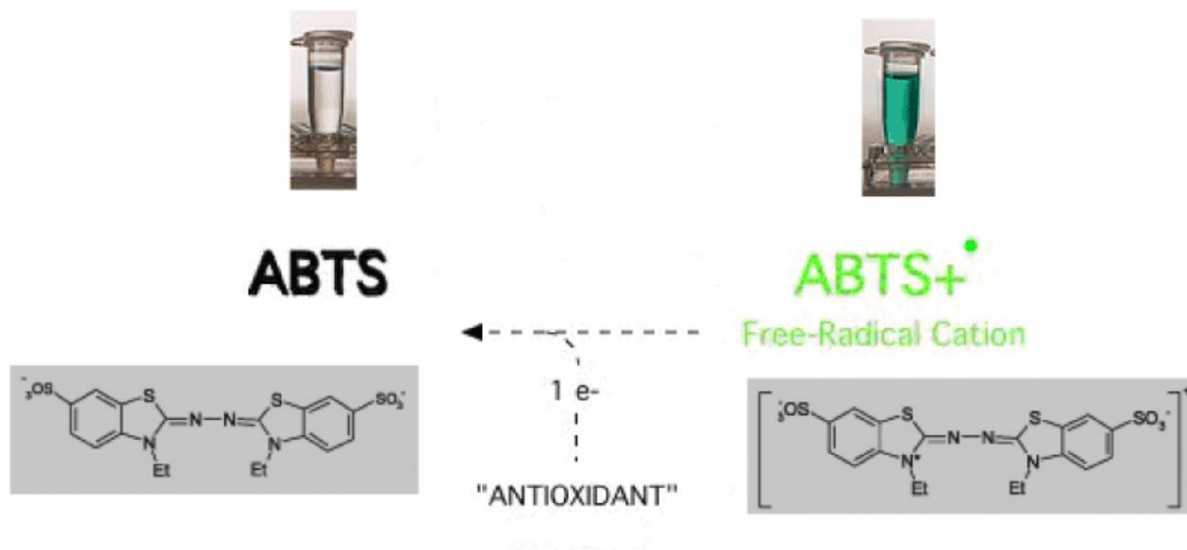
Αποτελεί μια επιπλέον μέθοδο (Miller et al., 1993) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου. Συγκεκριμένα, δείχνει αν τα αντιοξειδωτικά μόρια των εκχυλισμάτων έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδράσουν με την σταθερή ρίζα

ABTS^{•+}, το διάλυμα της οποίας έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730nm. Οξείδωση του ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) μέσω του ενζύμου περοξειδάση (HRP) και παρουσία H₂O₂ οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Παραγωγή της δραστηκής ρίζας ABTS^{•+} (Tyler et al., 2006)

Προηγείται ο σχηματισμός της ρίζας και έπειτα γίνεται η προσθήκη της αντιοξειδωτικής ουσίας, όπου η προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου μπορεί να οδηγήσει σε αναγωγή της ρίζας ABTS^{•+} (Εικόνα 9), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος και τη μείωση της οπτικής απορρόφησης. Ο αποχρωματισμός του διαλύματος είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (Εικόνα 10).



Εικόνα 9. Αναγωγή της ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ σε $ABTS$ (Pannala et al., 2011)

Αφού γίνει οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Control</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>H₂O</i>	<i>450 μl</i>	<i>400 μl</i>	<i>400 μl</i>
<i>ABTS</i>	<i>500 μl</i>	<i>500 μl</i>	<i>500 μl</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>50 μl</i>	<i>50 μl</i>	<i>50 μl</i>
<i>HRP</i>	<i>-</i>	<i>50 μl</i>	<i>50 μl</i>
<i>Υτελ.</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>50 μl</i>

Μετά την προσθήκη των παραπάνω ακολουθεί ανάδευση, επώαση του μίγματος για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος.

Τέλος, αφού γίνει ανάδευση ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 730 nm. Επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στα 730 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 10.).

Πίνακας 11. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων

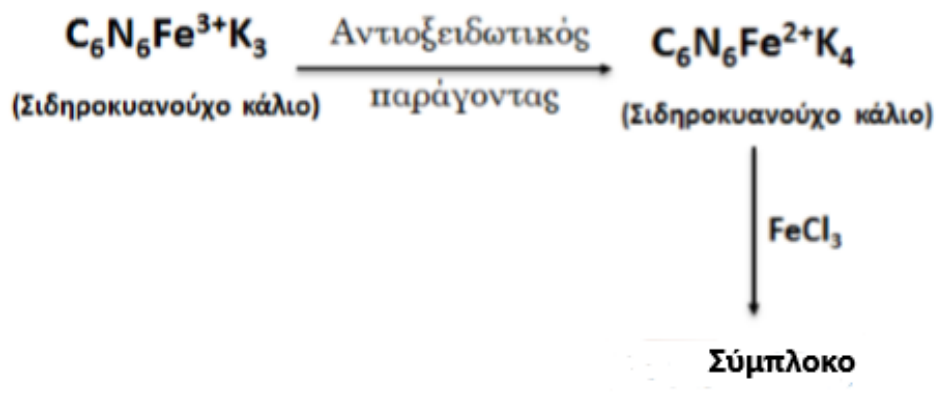
	<i>Δείγμα</i>
<i>H₂O</i>	<i>450 μl</i>
<i>ABTS</i>	<i>500 μl</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>50 μl</i>
<i>Ντελ.</i>	<i>1 ml</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	<i>-</i>

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα:

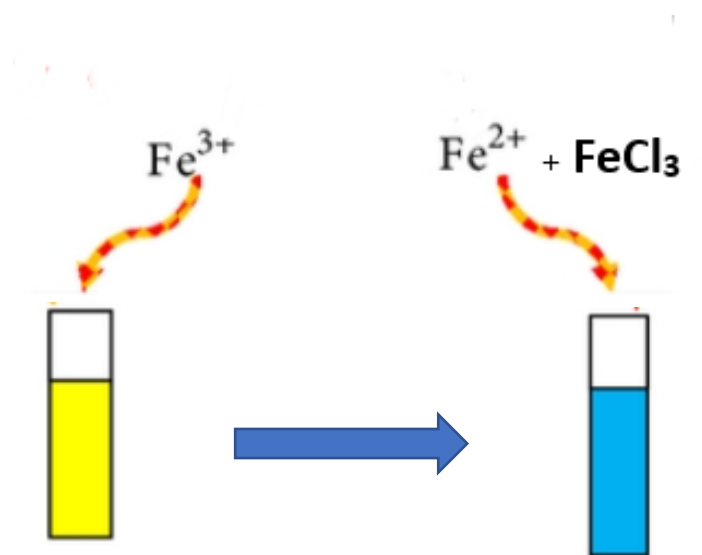
$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση της ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

3.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής ισχύος

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της αναγωγικής ισχύος (Yen & Duh, 1994) όπου ενώσεις που διαθέτουν αναγωγική δύναμη, αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν κατά την λιπιδική υπεροξειδωση, δρώντας έτσι είτε ως πρωταρχικές είτε ως δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Οι ουσίες με αναγωγική δύναμη μπορούν να ανάγουν το Fe³⁺ σε Fe²⁺, αυτό με την σειρά του μπορεί να αλληλοεπιδράσει με χλωριούχο σίδηρο και να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που απορροφά στα 700nm (Εικόνα 11). Στην συνέχεια, το διάλυμα που έχει κίτρινο χρώμα μπορεί να αλλάξει, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη που διαθέτει η κάθε εξεταζόμενη ουσία, σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε (Εικόνα 12).



Εικόνα 10. Μετατροπή του Fe^{3+} στο αντίστοιχο σύμπλοκο



Εικόνα 11. Μετατροπή του χρώματος κατά την αντίδραση

Αφού γίνουν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Control</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>Sample</i>	-	-	<i>250 μl</i>
<i>Phosphate buffer (0,2 M,pH 6,6)</i>	<i>500 μl</i>	<i>250 μl</i>	-
<i>Potassium ferricyanide</i>	-	<i>250 μl</i>	<i>250 μl</i>
<i>Επώαση στους 50° C για 20 λεπτά και μεταφορά για 5 λεπτά στον πάγο</i>			
<i>TCA</i>	<i>250 μl</i>	<i>250 μl</i>	<i>250 μl</i>
<i>Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25° C</i>			
<i>dH₂O</i>	<i>250 μl</i>	<i>250 μl</i>	<i>250 μl</i>
<i>Ferric chloride</i>	<i>50 μl</i>	<i>50 μl</i>	<i>50 μl</i>

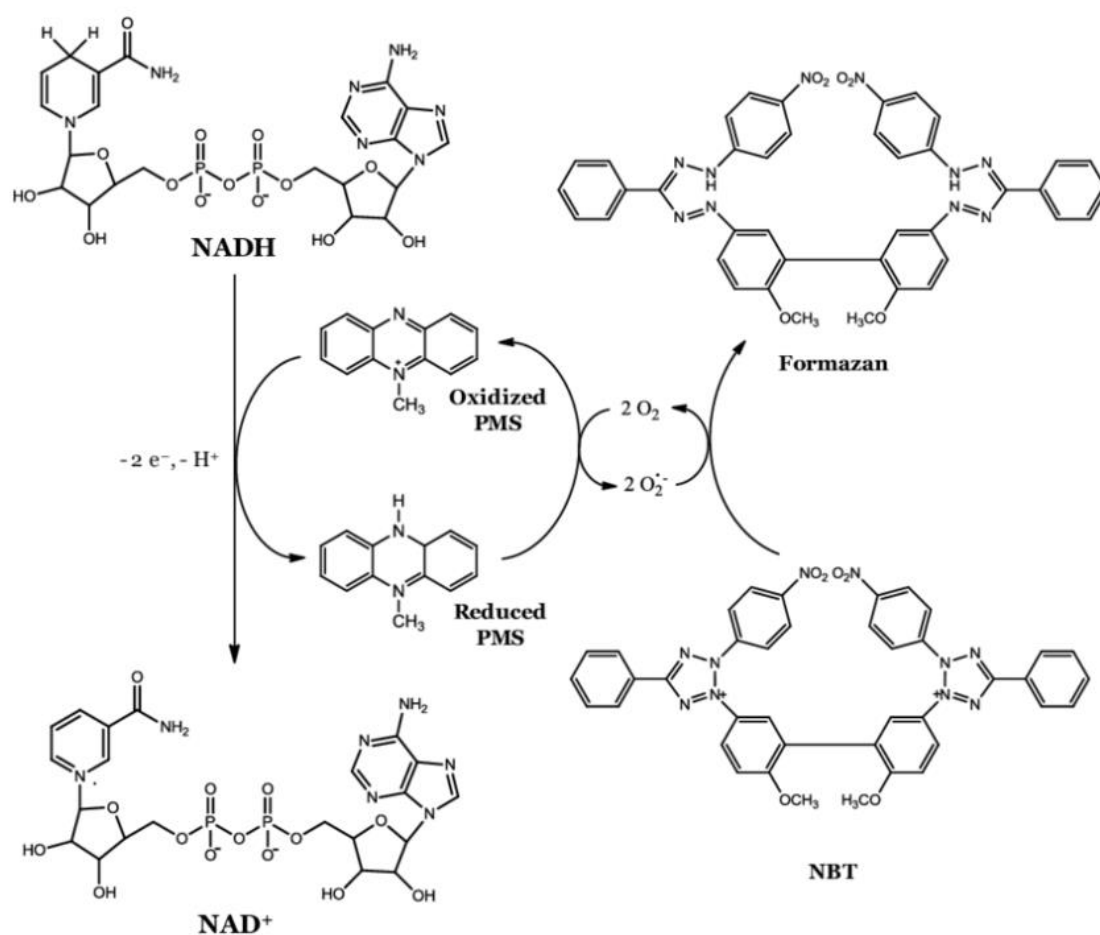
Τέλος, ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά και φωτομέτρηση στα 700nm. Επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στα 700 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του Potassium ferricyanide (Πίνακας 12).

Πίνακας 13. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων

	<i>Δείγμα</i>
<i>Sample</i>	<i>250 μl</i>
<i>Phosphate buffer (0,2 M,pH 6,6)</i>	-
<i>TCA</i>	<i>250 μl</i>
<i>Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά</i>	
<i>dH₂O</i>	<i>250 μl</i>
<i>Ferric chloride</i>	<i>50 μl</i>

3.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

Η συγκεκριμένη μέθοδος (Gülçin et.al, 2004) παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$. Πρόκειται για μια ρίζα που προκαλεί κυτταρικό θάνατο, αδρανοποίηση ενζύμων, αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών και του DNA και καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Η προέλευση των ριζών σουπεροξειδίου γίνεται από το σύστημα μεθοσουλφονική φαιναζίνη – νικοτιναμίδιο αδενινονουκλεοτίδιο (PMS-NADH), μέσω οξείδωσης του NADH. Η ανάλυση των ριζών μετριέται με την μείωση του NBT. Το NBT^{2+} που έχει κίτρινο χρώμα μπορεί αλληλεπιδρώντας με την ρίζα $O_2^{\cdot-}$ να μετατραπεί σε φορμαζάνη που έχει μπλε χρώμα, το οποίο μπλε χρώμα απορροφά στα 560nm. Η αλληλεπίδραση της ρίζας με το NBT μπορεί να παρεμποδιστεί από αντιοξειδωτικές ουσίες (Εικόνα 13).



Εικόνα 12. Η μετατροπή του NBT σε φορμαζάνη μέσω του συστήματος PMS-NADH (Graciliana Lopes, 2014)

Αφού γίνουν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 14. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Control</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	-	-	<i>50 μl</i>
<i>dH₂O</i>	-	<i>50 μl</i>	-
<i>Tris-HCl</i> (<i>16mM. pH=8</i>)	<i>800 μl</i>	<i>625 μl</i>	<i>625 μl</i>
<i>NBT</i>	<i>0.125 ml</i>	<i>0.125 ml</i>	<i>0.125 ml</i>
<i>NADH</i>	<i>0.125 ml</i>	<i>0.125 ml</i>	<i>0.125 ml</i>
<i>PMS</i>	-	<i>0.125 ml</i>	<i>0.125 ml</i>

Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του PMS. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25⁰ C και φωτομέτρηση στα 560 nm. Τα δείγματα χωρίς PMS αποτελούσαν το τυφλό. Τέλος, επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στα 560 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς PMS (Πίνακας 14).

Πίνακας 15. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων

	<i>Δείγμα</i>
<i>Εκχύλισμα</i>	<i>50 μl</i>
<i>dH₂O</i>	-
<i>Tris-HCl</i> (<i>16mM. pH=8</i>)	<i>750 μl</i>
<i>NBT</i>	<i>0.125 ml</i>
<i>NADH</i>	<i>0.125 ml</i>

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$:

$$\% \text{ Scavenging effect (αναστολή)} = \frac{(A_0 - A_d)}{A_0} \times 100$$

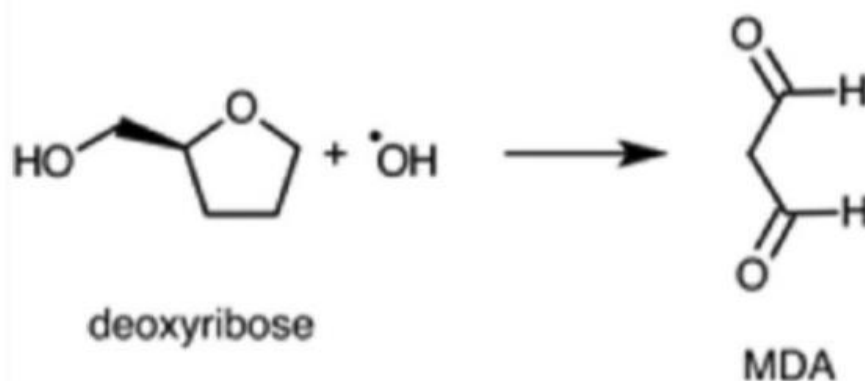
Όπου :

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

A_d : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

3.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH^{\cdot}

Η μέθοδος αυτή (Chung et al., 1997) επιτελεί σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό εξουδετέρωσης της ρίζας OH^{\cdot} . Πρόκειται για μια εξαιρετικά δραστική ρίζα που μπορεί να προκαλέσει μεγάλες βλάβες στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρώντας με τα νουκλεοτίδια του DNA οδηγεί στο σπάσιμο των αλυσίδων και άρα σε μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα των ουσιών να εξουδετερώσουν την ρίζα υδροξυλίου σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Οι ρίζες υδροξυλίου (που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton) οξειδώνουν την 2-δεοξυριβόζη και την διασπούν σε μαλονδιαλδεΰδη (MDA)(Εικόνα 14). Τέλος, η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώσουν την ρίζα υδροξυλίου, μετρήθηκε με την αναστολή οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης.



Εικόνα 13. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA (Jakub Treml & Karel Smejkal, 2016)

Αφού γίνουν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

	<i>Τυφλό</i>	<i>Control</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>Phosphate buffer (0.2M,pH7.4)</i>	<i>225 μl</i>	<i>225 μl</i>	<i>225 μl</i>
<i>2-deoxyribose 10 mM</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>
<i>FeSO₄-EDTA 10 mM</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>
<i>H₂O₂ 10 mM</i>	<i>-</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>
<i>dH₂O</i>	<i>375 μl</i>	<i>300 μl</i>	<i>250 μl</i>
<i>Δείγμα</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>50 μl</i>
<i>Επώαση για μία ώρα στους 37° C</i>			
<i>TCA 2.8%</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>
<i>TBA 1%</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>
<i>Βράσιμο για 10 λεπτά στους 95° C, κατάψυξη για 5 λεπτά, φυγοκέντρωση στους 3000 rpm για 5 min</i>			

Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 520 nm. Τα δείγματα χωρίς H₂O₂ αποτελούσαν το τυφλό. Τέλος, έγινε έλεγχος αν η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm.

Πίνακας 17. Έλεγχος απορρόφησης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων

	<i>Τυφλό</i>	<i>Δείγμα</i>
<i>Phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4)</i>	<i>225 μl</i>	<i>225 μl</i>
<i>2-deoxyribose 10 mM</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>
<i>FeSO₄-EDTA 10 mM</i>	<i>75 μl</i>	<i>75 μl</i>
<i>H₂O₂ 10 mM</i>	<i>-</i>	<i>-</i>
<i>dH₂O</i>	<i>375 μl</i>	<i>325 μl</i>
<i>Δείγμα</i>	<i>-</i>	<i>50 μl</i>
<i>TCA 2.8%</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>
<i>TBA 1%</i>	<i>375 μl</i>	<i>375 μl</i>

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] :

$$\% \text{ Hydroxyl radical scavenging activity (αναστολή)} = \frac{(A_o - A_d)}{A_o} \times 100$$

Όπου :

A_o: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm

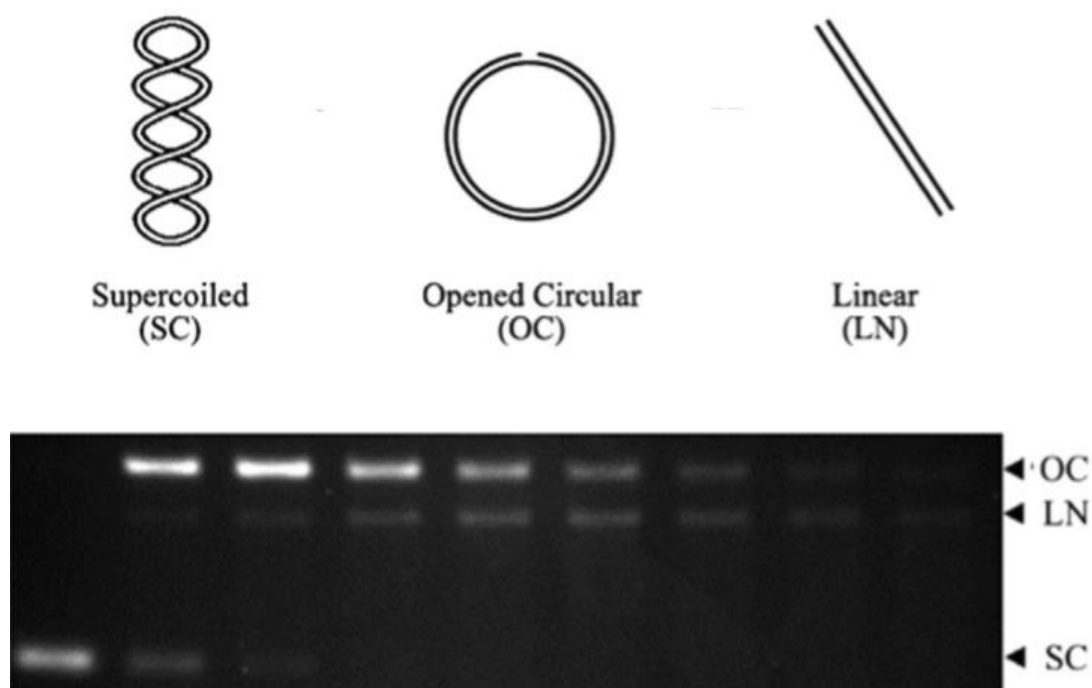
A_d: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm

3.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των φαρμακευτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο το πλασμιδιακό DNA. Σε αυτή τη μέθοδο μετριέται η ικανότητα των φαρμακευτικών εκχυλισμάτων να προστατεύσουν το DNA από μονόκλινα θραύσματα που δημιουργούνται από ROS. Το πλασμίδιο είναι ένα κυκλικό μόριο DNA μικρού μεγέθους, το οποίο μπορεί να απομονωθεί εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Το πλεονέκτημα που φέρει το πλασμίδιο είναι ότι κατά την ηλεκτροφόρηση σε τζελ αгарόζης μπορεί να εμφανιστεί σε 3 διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσης του. Οι 3 διαμορφώσεις είναι:

1. Η υπερελικωμένη διαμόρφωση (δεν έχει σπασίματα και είναι η πιο συμπυκνωμένη μορφή)
2. Η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση (δημιουργείται από μονόκλιωνα σπασίματα που προκαλούνται από ενζυμικούς παράγοντες ή ελεύθερες ρίζες)
3. Η γραμμική διαμόρφωση (σχηματίζεται όταν φέρει δίκλιωνα θραύσματα)

Η διαμόρφωση που έχει το μικρότερο μέγεθος τρέχει με μεγαλύτερη ταχύτητα σε ένα τζελ αгарόζης διότι διαπερνά πιο εύκολα τους πόρους που υπάρχουν σε αυτό. Όποτε σε ένα τζελ αгарόζης πρώτα τρέχει η υπερελικωμένη διαμόρφωση έπειτα η γραμμική και τέλος η ανοιχτή κυκλική (Εικόνα 14.).



Εικόνα 14. Οι 3 διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA και η διάκριση τους σε τζελ αгарόζης (Kudo et al., 2015)

Αφού οριστεί η συγκέντρωση της ρίζας μας που κόβει το πλασμιδιακό DNA και αφού προετοιμαστεί το τζελ αγαρόζης 0.8% σε TBE 1x θα γίνει η σωστή αραιώση των εκχυλισμάτων και θα ακολουθήσει η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18. Οι ποσότητες και η σειρά των αντιδραστηρίων που προστέθηκαν

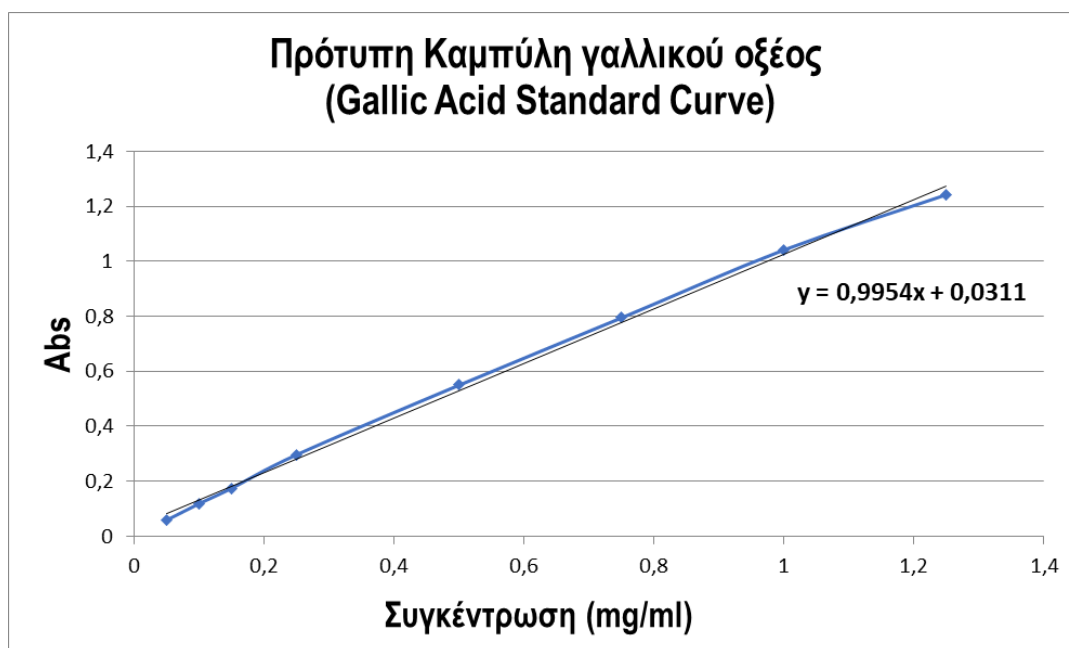
	<i>PBS</i>	<i>Δείγμα</i>	<i>Πλασμιδιακό DNA</i>	<i>AAPH</i>
<i>Control</i>	<i>7 μl</i>	-	<i>3 μl</i>	-
<i>AAPH</i>	<i>3 μl</i>	-	<i>3 μl</i>	<i>4 μl</i>
<i>Δείγμα</i>	<i>1 μl</i>	<i>2 μl</i>	<i>3 μl</i>	<i>4 μl</i>
<i>Αρνητικό Control</i>	<i>5 μl</i>	<i>2 μl</i>	<i>3 μl</i>	-

- Ακολουθεί ανάδευση spin-vortex-spin
- Επώαση για 45 λεπτά στους 37 ° C
- Προσθήκη του 3 μl Loading buffer
- Ανάδευση spin-vortex-spin
- Φόρτωση δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για μια ώρα στα 100V
- Χρώση του τζελ με βρωμιούχο αιθίδιο
- Προσθήκη 250 ml και ξέπλυμα για 30 λεπτά
- Δεύτερη προσθήκη 250 ml και ξέπλυμα για 10 λεπτά
- Ποσοτικοποίηση

4.Αποτελέσματα

4.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

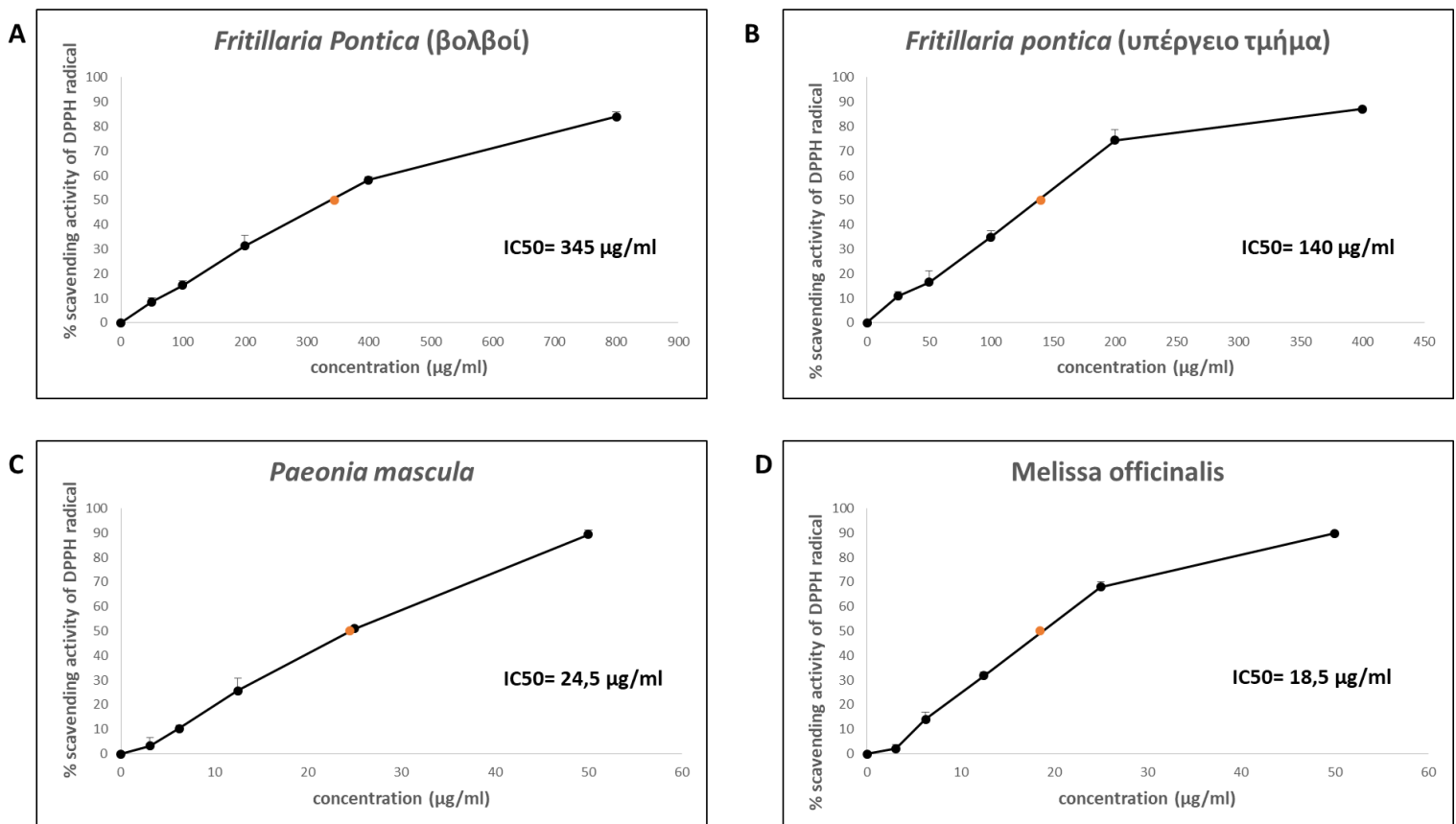
Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 1), σύμφωνα με την οποία η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων εκφράζεται ως mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η σειρά αυξανόμενου πολυφαινολικού περιεχομένου είναι η ακόλουθη: *Fritillaria pontica* (βολβοί) (**24 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (**25 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**) < *Paeonia mascula* (**137,5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**) < *Melissa officinalis* (**200,5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος**).



Διάγραμμα 1. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος

4.2 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

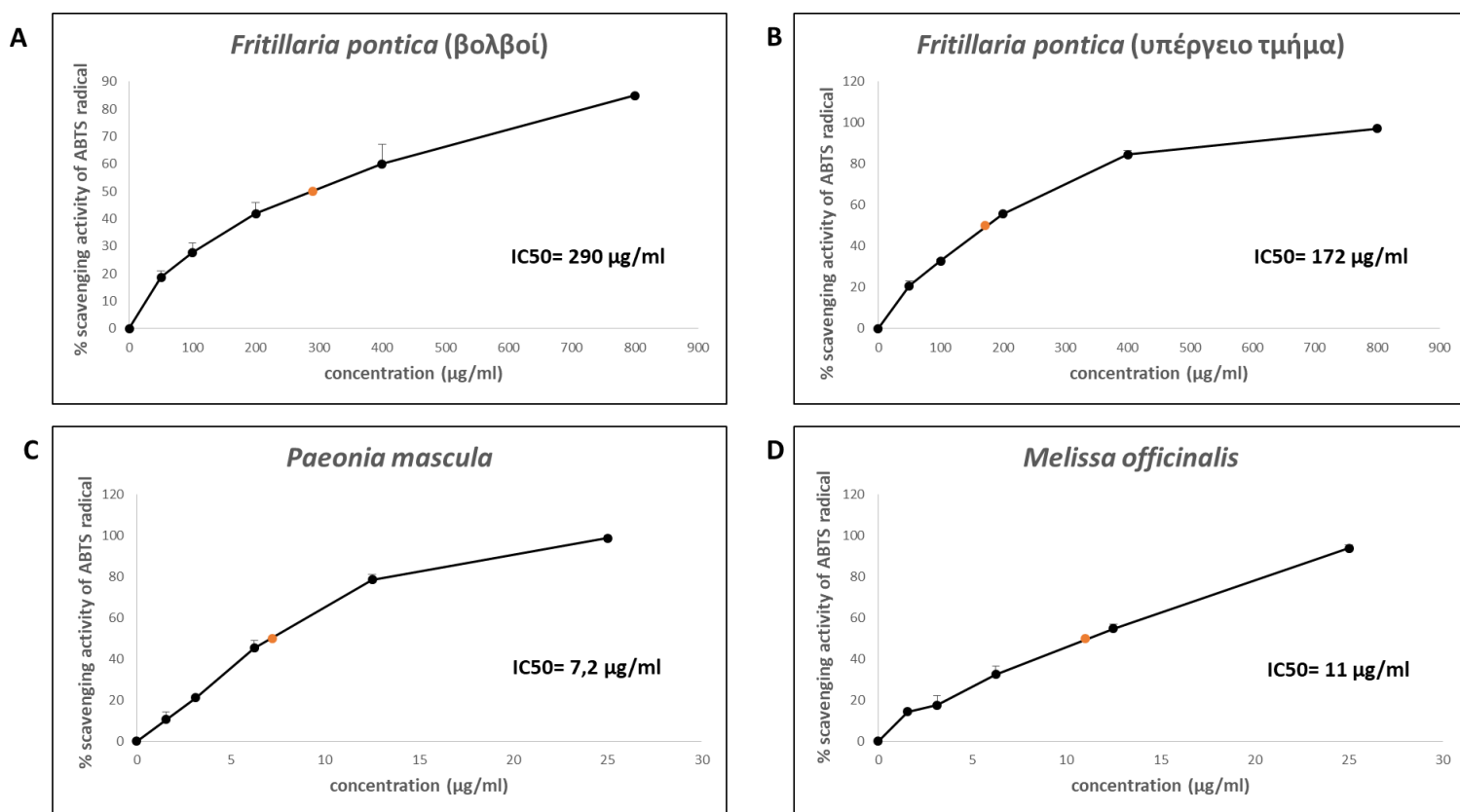
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC₅₀. Το IC₅₀ είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH• με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστικότητας: *Fritillaria pontica* (βολβοί) (IC₅₀ = 345 μg / ml) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (IC₅₀ = 140 μg / ml) < *Paeonia mascula* (IC₅₀ = 24,5 μg / ml) < *Melissa officinalis* (IC₅₀ = 18,5 μg / ml) (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Η % αναστολή της ρίζας DPPH• από τα εκχυλίσματα A) *Fritillaria pontica* (βολβοί), B) *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα), C) *Paeonia mascula*, D) *Melissa officinalis*.

4.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•⁺

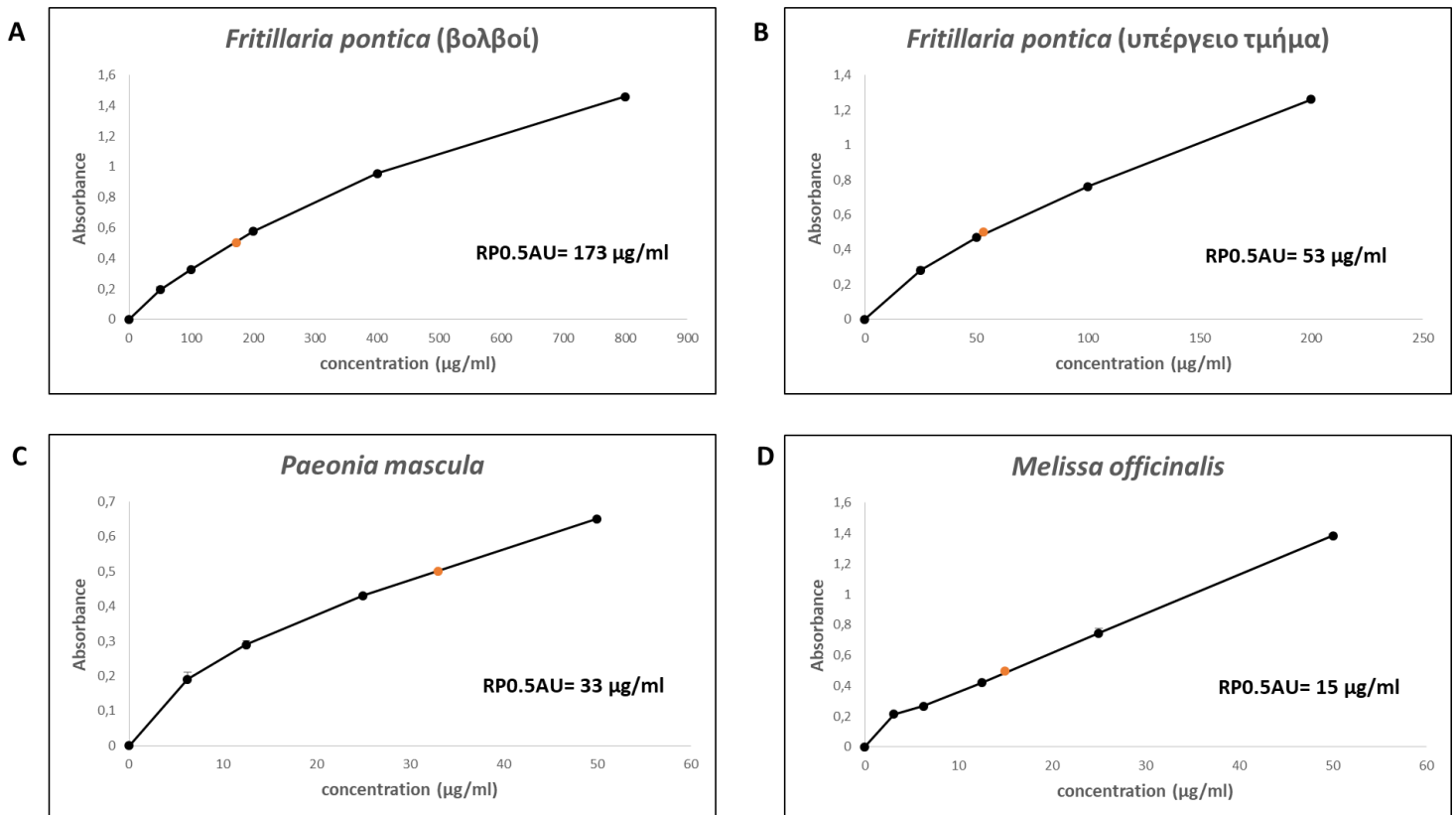
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•⁺ χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC₅₀. Το IC₅₀ είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα ABTS•⁺ με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας: *Fritillaria pontica* (βολβοί) (IC₅₀ = 290 μg / ml) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (IC₅₀ = 172 μg / ml) < *Melissa officinalis* (IC₅₀ = 11 μg / ml) *Paeonia mascula* (IC₅₀ = 7,2 μg / ml) (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Η % αναστολή της ρίζας ABTS•⁺ από τα εκχυλίσματα A) *Fritillaria pontica* (βολβοί), B) *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα), C) *Paeonia mascula*, D) *Melissa officinalis*.

4.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής δύναμης

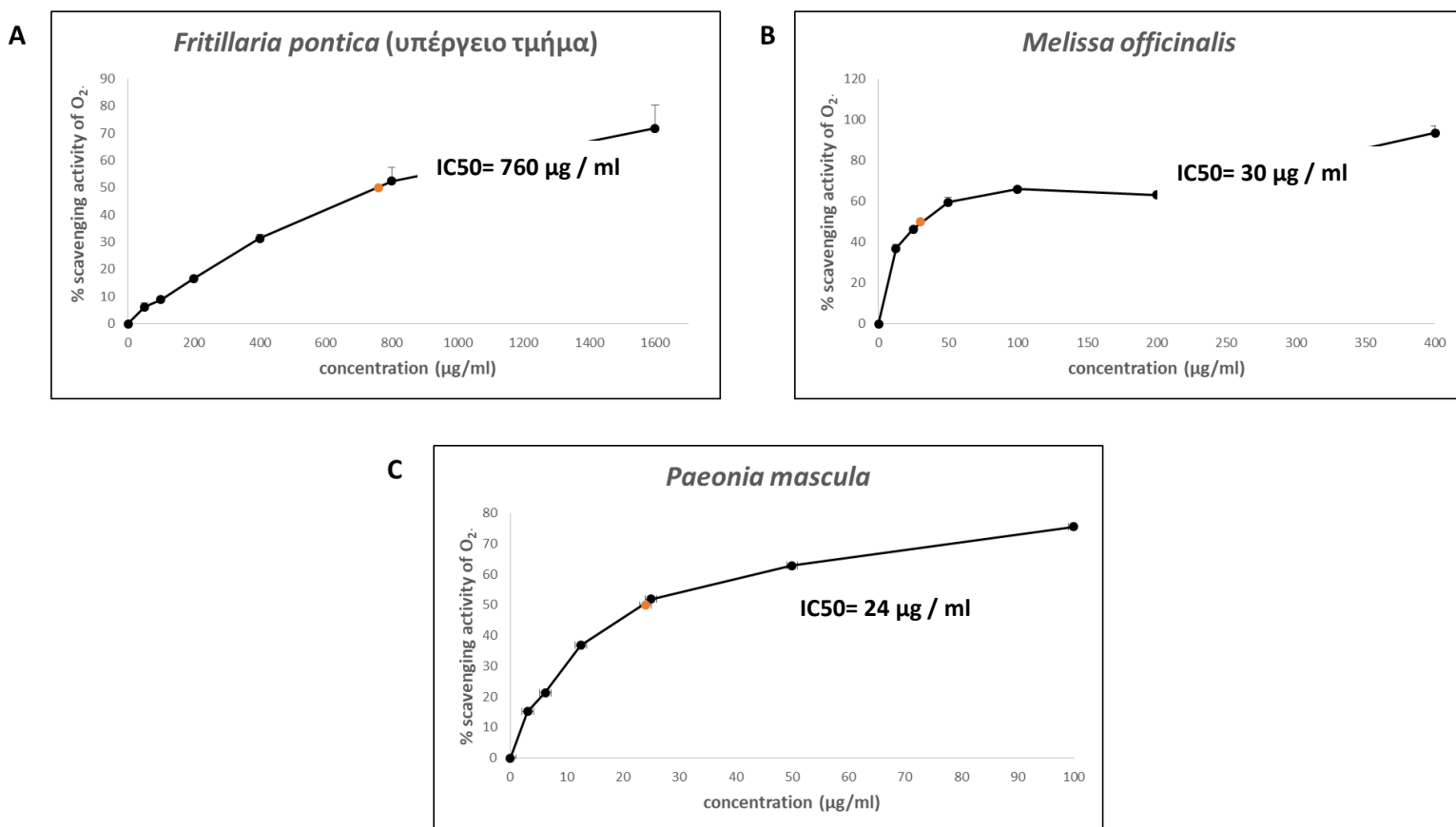
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο της αναγωγικής δύναμης υπολογίστηκε η τιμή RP (reducing power) 0.5 AU δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης 0,5 στα 700 nm. Όσο μικρότερη η τιμή $RP_{0.5AU}$ τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αναγωγική δύναμη με την ακόλουθη σειρά αυξημένης δραστηριότητας: *Fritillaria pontica* (βολβοί) ($RP_{0.5AU} = 173 \mu\text{g/ml}$) < *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) ($RP_{0.5AU} = 53 \mu\text{g/ml}$) < *Paeonia mascula* ($RP_{0.5AU} = 33 \mu\text{g/ml}$) < *Melissa officinalis* ($RP_{0.5AU} = 15 \mu\text{g/ml}$) (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων A) *Fritillaria pontica* (βολβοί), B) *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα), C) *Paeonia mascula*, D) *Melissa officinalis*.

4.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC50. Το IC50 είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC50 τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εκτός από το *Fritillaria pontica* (βολβοί) εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστηριότητας: *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (IC50 = 760 $\mu\text{g} / \text{ml}$) < *Melissa officinalis* (IC50 = 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$) < *Paeonia mascula* (IC50 = 24 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Διάγραμμα 5).



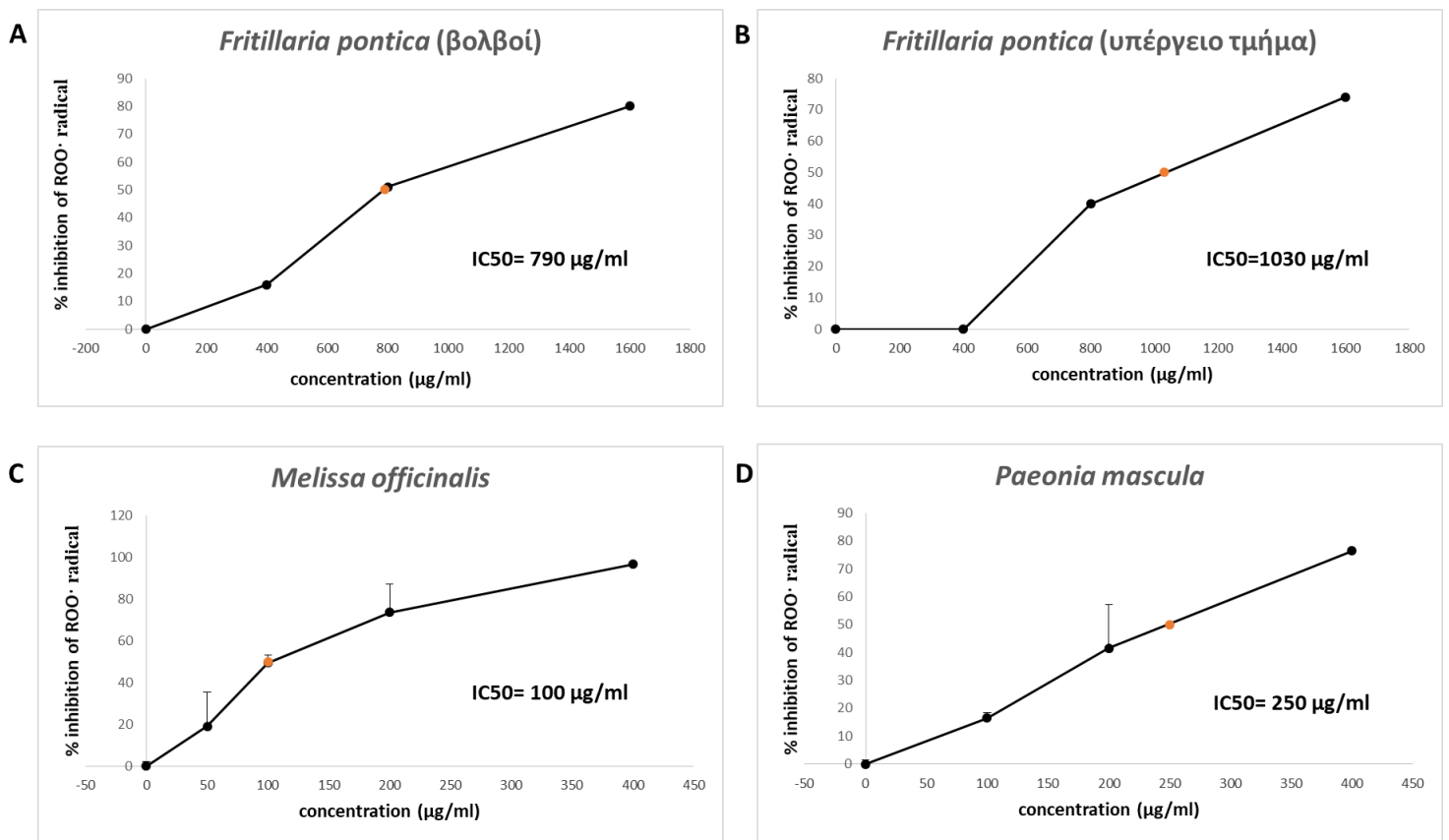
Διάγραμμα 5. Η % αναστολή της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ από τα εκχυλίσματα A) *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα), B) *Melissa officinalis*, C) *Paeonia mascula*.

4.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ΟΗ•

Τα 4 φυτικά εκχυλίσματα του Βορείου Αιγαίου *Fritillaria pontica* (βολβοί), *Melissa officinalis*, *Paeonia mascula* και *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) εξετάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις αλλά δεν εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου.

4.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας ROO• χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC₅₀. Το IC₅₀ είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα ROO• με την ακόλουθη σειρά αυξανόμενης δραστικότητας: *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) (IC₅₀ = 1030 μg / ml) < *Fritillaria pontica* (βολβοί) (IC₅₀ = 790 μg / ml) < *Paeonia mascula* (IC₅₀ = 250 μg / ml) < *Melissa officinalis* (IC₅₀ = 100 μg / ml) (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Η % αναστολή της ρίζας ROO• από τα εκχυλίσματα A) *Fritillaria pontica* (βολβοί), B) *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα), C) *Melissa officinalis*, D) *Paeonia mascula*.

5. Συζήτηση

Η αυξημένη παραγωγή των ROS μέσα σε έναν οργανισμό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες με την σειρά του μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στα κύτταρα και διάφορες ασθένειες, όπως καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Alzheimer, καταρράκτη, ρευματοειδή αρθρίτιδα και αθηροσκλήρωση (Okezie, 1998). Για την αντιμετώπιση τόσο των ROS όσο και του οξειδωτικού στρες, οι οργανισμοί διαθέτουν κατάλληλους μηχανισμούς άμυνας, τους ενδογενούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες, βέβαια σημαντικό ρόλο επιτελούν και οι εξωγενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες των οποίων η πρόσληψη γίνεται μέσω της τροφής ή σε μορφή συμπληρώματος (Fatemeh et al., 2020).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε *in vitro* η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση τεσσάρων φυτικών, φαρμακευτικών εκχυλισμάτων του Βορείου Αιγαίου. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που διαθέτουν αυτά τα φυτά είναι

οι πολυφαινολικές ενώσεις καθώς και προϊόντα αυτών που ασκούν σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις σε κυτταρικές καλλιέργειες (Gessner, Ringseis & Eder, 2016). Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα *Melissa officinalis* περιέχει φλαβονοειδή, όπως ραμνοκιτρίνη, πολυφαινολικές ενώσεις, όπως ροσμαρινικό και καφεϊκό οξύ και τανίνες (Sepide Miraj et al., 2016). Τα εκχυλίσματα *Paeonia mascula* και *Fritillaria pontica* (βολβοί, υπέργειο τμήμα) περιέχουν κυρίως φλαβονοειδή όπως ρυτίνη (Vasiliki et al., 2002, Orhan et al., 2009).

Στην συνέχεια, έγινε σύγκριση μεταξύ αυτών των 4 εκχυλισμάτων με τη χρήση 7 μεθόδων για την εύρεση του πιο δραστικού και πιο αποτελεσματικού εκχυλίσματος, το οποίο στην συνέχεια θα αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο τόσο για την πρόληψη ασθενειών αλλά και για την εύρεση νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων, νέων φαρμάκων και για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων και ροφημάτων.

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος Folin-Ciocalteu, με την οποία έγινε η *in vitro* εκτίμηση του συνολικού αριθμού των φαινολικών ενώσεων στα 4 εκχυλίσματα των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου. Με τις επόμενες 5 μεθόδους, προσδιορίστηκε η *in vitro* αντιοξειδωτική ικανότητα των 4 εκχυλισμάτων, συγκεκριμένα με τις μεθόδους DPPH•, ABTS^{•+}, Superoxide και Hydroxyl radical scavenging activity μελετήθηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώσουν τις σταθερές ρίζες DPPH•, ABTS^{•+}, O₂^{•-}, OH• ενώ με την μέθοδο Reducing power εξετάστηκε η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων, η οποία δείχνει ότι οι ουσίες αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια δηλαδή να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο και έτσι να δρουν ως πρωτογενή και δευτερογενή αντιοξειδωτικά. Με την τελευταία μέθοδο, έγινε η *in vitro* εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων, που πραγματοποιήθηκε μέσω εξέτασης της ικανότητας των εκχυλισμάτων να προστατέψουν το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνα θραύσματα που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως τις σταθερές ρίζες ROO•.

Πέρα από την μέθοδο Folin-Ciocalteu και την μέθοδο Reducing power, στους υπόλοιπους μεθόδους έγινε προσδιορισμός του IC₅₀. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (ενότητα 4.7) ως IC₅₀, ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που χρειάζεται για να εξουδετερώσει το 50% της ρίζας. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ασθενέστερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει το φαρμακευτικό εκχύλισμα,

ενώ όσο μικρότερη τιμή έχει το IC₅₀ τόσο ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το εκχύλισμα. Σε αυτές τις μεθόδους η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε σε μορφή γραφημάτων, στις οποίες φαίνεται η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Στην μέθοδο Reducing power η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε πάλι σε μορφή γραφημάτων, στις οποίες φαίνεται η απορρόφηση σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, ενώ στην Folin-Ciocalteu η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε μέσω κατασκευής μιας πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος, διότι οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να εκφραστούν σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος.

Από την μέθοδο Folin-Ciocalteu παρατηρήθηκε ότι από τα 4 εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, το εκχύλισμα *Melissa officinalis* περιείχε το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο ίσο με 200,5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος. Ακολουθεί το εκχύλισμα *Paeonia mascula* με 137,5 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος, το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) με 25 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος και τέλος το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) με 24 mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος.

Έπειτα στην μέθοδο DPPH• το εκχύλισμα *Melissa officinalis* θεωρήθηκε το πιο δραστικό εκχύλισμα και αυτό με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα διότι εμφάνιζε IC₅₀ ίσο με 18,5 μg/ml. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες με IC₅₀ = 22,67 μg/ml (Monica R. et al., 2017). Με μικρή διαφορά το επόμενο πιο δραστικό ήταν το εκχύλισμα *Paeonia mascula* με IC₅₀ ίσο με 24,5 μg/ml. Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι το IC₅₀ για το συγκεκριμένο εκχύλισμα ισούται με 29,81 μg/ml (Ilkay Orhan et al., 2009). Ακολουθεί το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) με IC₅₀ ίσο με 140 μg/ml και τέλος το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) με IC₅₀ ίσο με 345 μg/ml. Σε άλλες μελέτες, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τα 2 αυτά εκχυλίσματα, το IC₅₀ που βρέθηκε ήταν από 7,6 έως 28,7 (Ilkay Orhan et al., 2009).

Αντίθετα με τις 2 προηγούμενες μεθόδους, με την μέθοδο ABTS^{•+}, που είναι πιο αξιόπιστη διότι με αυτή ανιχνεύονται και υδρόφιλα και λιπόφιλα μόρια, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα που εμφάνιζε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν το εκχύλισμα *Paeonia mascula* με IC₅₀ ίσο με 7,2 μg/ml. Ακολουθεί το εκχύλισμα *Melissa officinalis* με IC₅₀ ίσο με 11 μg/ml, το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο

τμήμα) με IC₅₀ ίσο με 172 μg/ml και τέλος το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολοβοί) με IC₅₀ ίσο με 290 μg/ml.

Ο λόγος που το εκχύλισμα *Paeonia mascula* είναι πιο δραστικό από το εκχύλισμα *Melissa officinalis* στη μέθοδο ABTS^{•+} σε σύγκριση με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, πιθανότατα να είναι λόγω της ποιοτικής και όχι τόσο της ποσοτικής σε πολυφαινόλες σύστασης που έχει το εκχύλισμα *Paeonia mascula* σε σχέση με το εκχύλισμα *Melissa officinalis*, διότι η ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών παίζει επίσης έναν βασικό ρόλο στον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης που θα έχει το εκχύλισμα. Ο λόγος που το εκχύλισμα *Paeonia mascula* θεωρείται πιο δραστικό στην μέθοδο ABTS^{•+} από ότι στην μέθοδο DPPH[•], πιθανόν να είναι λόγω της διαφορετικής χημικής δομής που εμφανίζουν οι ρίζες ABTS^{•+} και DPPH[•] με τις οποίες αλληλοεπιδρούν οι πολυφαινολικές ενώσεις, που υπάρχουν μέσα στα 2 εκχυλίσματα ή, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, λόγω της διαφορετικής ποιοτικής σύστασης σε πολυφαινόλες που μπορεί να έχει το κάθε εκχύλισμα. Ίσως σε αυτή τη διαφορά να παίζει κάποιο ρόλο και το κλίμα της περιοχής από την οποία προέρχονται τα φυτικά αυτά εκχυλίσματα.

Με βάση τα αποτελέσματα από τις προηγούμενες 3 μεθόδους, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο Reducing power ήταν αναμενόμενα. Το εκχύλισμα *Melissa officinalis* ήταν πάλι αυτό με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και δραστικότητα διότι εμφάνιζε την μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη με RP_{0,5AU} ίσο με 15 μg/ml. Την επόμενη πιο μεγάλη αναγωγική δύναμη την εμφάνιζε το εκχύλισμα *Paeonia mascula* με RP_{0,5AU} ίσο με 33 μg/ml. Ακολουθεί το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) με RP_{0,5AU} ίσο με 53 μg/ml και τέλος το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολοβοί) με RP_{0,5AU} ίσο με 173 μg/ml.

Η ρίζα O₂^{•-} είναι μια πολύ δραστική ρίζα διότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο, αδρανοποίηση ενζύμων, αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών και του DNA και καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Μια άλλη πολύ δραστική ρίζα αποτελεί η ρίζα υδροξυλίου, η οποία επίσης προκαλεί μεγάλες βλάβες σε μακρομόρια όπως λιπίδια, αμινοξέα και υδατάνθρακες και στο DNA καταστρέφοντας τους κλώνους του, οδηγώντας έτσι σε μεταλλαξιγένεση, καρκίνο και γήρανση (Lobo et al., 2010). Για αυτόν τον λόγο με τις μεθόδους Superoxide και Hydroxyl radical scavenging activity εξετάστηκε αν τα 4 εκχυλίσματα έχουν την ικανότητα να εξουδετερώσουν αυτές τις σταθερές ρίζες O₂^{•-} και OH[•] για να αποφευχθούν τα παραπάνω προβλήματα.

Στην μέθοδο Superoxide, το εκχύλισμα *Paeonia mascalua* ήταν το πιο δραστικό με IC₅₀ ίσο με 24 μg/ml ακολουθεί το εκχύλισμα *Melissa officinalis* με IC₅₀ ίσο με 30 μg/ml. Το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) εμφάνισε μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και ήταν λιγότερο δραστικό με IC₅₀ ίσο με 760 μg/ml, ενώ το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) σε αυτή τη μέθοδο δεν λαμβάνεται υπόψιν διότι δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα, λόγω έλλειψης της ικανότητας να εξουδετερώσει τη ρίζα O₂^{•-}. Όσον αφορά τη μέθοδο Hydroxyl radical scavenging activity, κανένα από τα 4 εκχυλίσματα δεν εμφάνισε δραστικότητα διότι δεν είχαν την ικανότητα να εξουδετερώσουν την πολύ δραστική ρίζα OH•.

Ο λόγος που δεν υπήρχε διεξαγωγή αποτελεσμάτων όσον αφορά τα 4 εκχυλίσματα στην μέθοδο Hydroxyl radical scavenging activity και όσον αφορά το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) στην μέθοδο Superoxide, ίσως να σχετίζεται με την χημική δομή που έχουν οι δραστικές ρίζες OH• και O₂^{•-}, με τις οποίες οι πολυφαινολικές ενώσεις των εκχυλισμάτων να μην μπορούν να αλληλοεπιδράσουν και έτσι να μην εξουδετερώνονται. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα 4 αυτά εκχυλίσματα δεν είναι κατάλληλα για την εξουδετέρωση ριζών OH•. Επίσης, το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) δεν είναι κατάλληλο ούτε για την εξουδετέρωση της ρίζας O₂^{•-}.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε μέθοδο, τα εκχυλίσματα *Melissa officinalis* και *Paeonia mascalua* λόγω υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας και δραστικότητας που εμφάνισαν κάθε φορά, με εξαίρεση τη μέθοδο Hydroxyl radical scavenging activity, θα μπορούσαν να θεωρηθούν χρήσιμοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ενώ τα εκχυλίσματα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) και *Fritillaria pontica* (βολβοί) όχι.

Στην συνέχεια, με την τελευταία μέθοδο, μελετήθηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των 4 εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε αν τα 4 αυτά εκχυλίσματα είχαν την ικανότητα να προστατέψουν το πλασμιδιακό DNA από βλάβες, δηλαδή από μονόκλωνα θραύσματα τα οποία προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι η ρίζα ROO•.

Στην συγκεκριμένη μέθοδο, το εκχύλισμα *Melissa officinalis* με IC₅₀ ίσο με 100 μg/ml, εμφάνισε την μεγαλύτερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση και άρα και την μεγαλύτερη ικανότητα να προστατέψει το πλασμιδιακό DNA από βλάβες. Ακολουθεί το εκχύλισμα

Paeonia mascalua με με IC₅₀ ίσο με 250 μg/ml, το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (βολβοί) με IC₅₀ ίσο με 790 μg/ml και τέλος το εκχύλισμα *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα) με IC₅₀ ίσο με 1030 μg/ml.

Το τελικό συμπέρασμα που βγαίνει από όσα ειπώθηκαν είναι ότι, πέρα από την μέθοδο Hydroxyl radical scavenging activity που δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα για κανένα εκχύλισμα, τα φαρμακευτικά φυτά *Paeonia mascalua* και *Melissa officinalis* αντίστοιχα, είναι αυτά που εμφανίζουν υψηλότερη in vitro αντιοξειδωτική δράση και in vitro αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Επίσης, είναι αυτά που μπορούν να εξουδετερώσουν σε μεγάλο βαθμό τις ελεύθερες ρίζες άρα και να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες, αυτό ίσως να οφείλεται στο μεγάλο πολυφαινολικό περιεχόμενο που διαθέτουν. Οπότε, αυτά τα 2 εκχυλίσματα θα μπορούσαν στο μέλλον να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αγορά, τόσο στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων βιοδραστικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα βιοδραστικών τροφίμων και ροφημάτων, αλλά και για την παραγωγή νέων φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής. Τέλος, τα φαρμακευτικά φυτά *Fritillaria pontica* (υπέργειο τμήμα και βολβοί), όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα, εμφάνισαν μειωμένη έως και καθόλου αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση με αποτέλεσμα να μην αποτελούν κατάλληλους αντιοξειδωτικούς και αντιμεταλλαξιγόνους παράγοντες. Άρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοδραστικών προϊόντων.

6.Βιβλιογραφία

Aline Salvi, Pierre-Alain Carrupt, Jean-Paul Tillement, Bernard Testa (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*, 61, 1237-1242

Ames B.N (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, 3-32

Axiotis, Maria Halabalaki and Leandros A. Skaltsounis (2018). An ethnobotanical study of medicinal plants in the Greek islands of North Aegean region. *Frontiers in Pharmacology*, volume 9, article 400

Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan* 91, 179-194.

Bjornstedt M., Kumar S., Bjorkhem L., Spyrou G., Holmgren A. (1997). Selenium and thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed. Environ. Sci.* 10, 271 – 279.

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

Callahan L.A, Stofan D.A, Szweda L.I, Nethery D.E, G.S Supinski, G.S (2001). Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 129- 138.

Cheeseman K.H., Slater T.F (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, vol.49, 481-93

Chung S.K, Osawa T., Kawakishi S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 118-123

Crane F.L (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 591-598.

C.V Balasubrahmanya Prasad, Mallikarjun V. Kodiwadmath, Grija Basavaraj Kodiwadmath (2008). Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. *Journal of Infection*. 56, 469-473.

Dröge Wulf (2001). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, vol 82

Fatemeh Jamshidi-Kia, Joko Priyanto Wibowo, Mostafa Elachouri, Rohollah Masumi, Alizamen Salehifard-Jouneghani, Zohreh, Zahra Lorigooini (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 9, 191-199

Fatma Vatansever, Wanessa C.M.A de Melo, Pinar Avci, Daniela Vecchio, Magesh Sadasivam, Asheesh Gupta, Rakkiyappan Chandran, Mahdi Karimi, Nivaldo A. Parizotto, Rui Yin, George P. Tegos and Michael R. Hamblin (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species-bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37, 955-989

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

Gabriele Pizzino, Natasha Irrera, Mariapaola Cucinotta, Giovanni Pallio, Federica Mannino, Vincenzo Arcoraci, Francesco Squadrito, Domenica Altavilla and Alessandra Bitto (2017). Oxidative stress : Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and cellular longevity*

Gessner D.K, Ringseis R., Eder K. (2016). Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory process in farm animals. *Journal of animal physiology and animal nutrition*

Golden T.R, Douglas A. Hinerfeld, Simon Melov (2002). Oxidative Stress and aging: beyond correlation. *Aging cell*, 1, 117-23

Graciliana Lopes (2014). Seaweeds from the Portuguese coast: Chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity. *Research Gate*

Gülçin I, Küfrevioğlu O.I, Oktay M., Büyükokuroğlu M.E (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J.Ethnopharmacol.*, 90, 205-215

Ilkay Orhan, Murat Kartal, Mahmoud Abu-Asaker, F.Sezer Şenol, Gülderen Yilmaz, Bilge Şener (2009). Free radicals scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chemistry*, 114, 276-281

Jakub Tremland, Karel Smejkal (2016). Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol 15

James A. Letts & Leonid A. Sazanov (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*, vol. 24

JoseTeixeira, Alexandra Gaspar, E. Manuela Garrido, Jorge Garrido and Fernanda Borges (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*

Ken-ichi Kudo, Hironori Ito, Satoshi Ihara, Hiroaki Terato (2015). Quantitative analysis of oxidative DNA damage induced by high-voltage pulsed discharged with cavitation. *Journal of Electrostatics*, 73, 131-139

Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*

Livrea M.A, Tesoriere L., Bongiorno A, Pintaudi A.M, Ciaccio M., Riccio A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 401-409.

Maria Losada-Echeberria, Maria Herranz-Lopez, Vicente Micol and Enrique Barrajon-Catalan (2017). Polyphenols as Promising Drugs against main breast cancer signatures. *Antioxidants*, 6 , 88

M. Liu, F. Chen, T. Liu, F. Chen, S.Liu, J.Yang (2017). The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes and infection*

M. Valko, C.J Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40

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

Michael M. Gaschler, Brent R. Stockwell (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482, 419- 425

Monica R. Garcia-Risco, Lamia Mouhid, Lilia Salas- Perez, Alexis Lopez- Padilla, Susana Santoyo, Laura Jaime, Ana Ramirez de Molina, Guillermo Regler and Tiziana Fornari (2017). Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. *Plant foods for human nutrition*, 72, 96-102.

Niki E., Kawakami A., Saito M., Yamamoto Y., Tsuchiya J., Kamiya Y. (1985). Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* 25, 2191-2196.

Nour Yahfoufi, Nawal Alsadi, Majed Jambi and Chantal Matar (2018). The Immunomodulatory and Anti- Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10, 1618

Okezie I. Auroma (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*, vol.75, no.2

Richard L. Auten and Jonathan M. Davi (2009). Oxygen Toxicity and reactive oxygen species: The Devil is in the details. *Pediatric research*, vol. 66, No.2

Rimbach G., Hohler D., Fischer A., Roy S., Virgili F., Pallauf J., Packer L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung*, 203-222

Robert Li, Zhenquan Jia, Michael A. Trush (2016). Defining ROS in Biology and Medicine, 1, 9-21

Saheem Ahmad, Hamda Khan, Uzma Shahab, Shahnawaz Rehman, Zeeshan Rafi, Mohd Yasir Khan, Ahsanullah Ansari, Zeba Siddiqui, Jalauddin Mohammad Ashraf, Saleh M.S Abdullah, Safia Habib, Moin Uddi (2017). Protein oxidation: an overview of metabolism of Sulphur containing amino acid, cysteine. *Frontiers in bioscience*, 9, 71-87

Sergio Di Meo and Paola Venditti (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1-32

Sepide Miraj, Mahmoud Rafiean Kopae and Sara Kiani (2016). *Melissa officinalis* L.: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 1-10

Shih-Shin Liang, Yow Shiue, Chao-JenKuo, Su-ErGuo, Wei- TingLiao and Eing-Mei Tsai (2013). Online Monitoring Oxidative Products and metabolites of nicotine by free radical generation with Fenton reaction in tandem mass spectrometry. *The Scientific World Journal*, 1-8

Sies H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69, 965-968

Tyler W. Johannes, Ryan D. Woodyer and Huimin Zhao (2006). High-throughput Screening methods developed for oxidoreductases. *Enzyme Assay*, 77-93

Vasilik Papandreou, Prokopios Magiatis, Ioanna Chinou, Eleftherios Kalpoutzakis, Alexios-Leandros Skaltsounis, Anthony Tzarbopoulos (2002). Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia taxa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 101-104

Victor M. Victor, Milagros Rocha, Monica De la Fuente (2004). Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology* , 4, 327-347

Wilson R.L (1978). Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In *biochemical mechanism of liver injuries*. New York academic press: 123-224

Witt E.H, Reznick A.Z, Viquie C.A, Starke- Reed P., Packer L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* 122, 766-773.

Yen G.C Duh (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J. Africult. Food Chem.*,42, 629-632

Yue Zhou, Jie Zheng, Ya Li, Dong-Ping Xu, Sha Li, Yu-Ming Chen and Hua-Bin Li (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8, 515