

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ : ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ : ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ



Μπελή Ξένη (του Δημητρίου)

Λάρισα 2020

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΒΟΤΑΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ»

“THE EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS FROM THE REGION OF EPIRUS
ON THE REDOX STATUS OF EUKARYOTIC CELLS AFTER OXIDATIVE
STRESS”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων) : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χαρουτουιάν Σέρκος : Καθηγητής Χημείας στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σκαλτσούνης Αλέξιος-Λέανδρος : Καθηγητής Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών και Τοξικολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που μου ανέθεσε την πτυχιακή μου εργασία κατά την οποία είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε και ιδιαίτερα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Θάλεια Κερασιώτη για την πολύτιμη βοήθειά που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Η υπερβολική παραγωγή αυτών όμως δε μπορεί να εξουδετερωθεί από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη διαφόρων βιομορίων. Ο οργανισμός για να αμυνθεί σε περιπτώσεις υπερβολικής παραγωγής ελευθέρων ριζών χρησιμοποιεί αντιοξειδωτικά ένζυμα και αντιοξειδωτικές ουσίες που παράγονται είτε από τον ίδιο είτε προέρχονται από τη διατροφή. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών του οργανισμού και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν ευκαρυωτικά κύτταρα και συγκεκριμένα ενθοθηλιακά (κυτταρική σειρά EA.hy926), καθώς είναι ένας από τους ιστούς που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο οξειδωτικό στρες. Τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με εκχυλίσματα βοτάνων από την περιοχή της Ηπείρου και στη συνέχεια προκλήθηκε οξειδωτικό στρες χρησιμοποιώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Συγκεκριμένα τα βότανα που μελετήθηκαν είναι το φασκόμηλο, το δενδρολίβανο, η λουίζα και η ρίγανη.

Βασικός σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση των βοτάνων που προαναφέρθηκαν, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και με τη βοήθεια του κυτταρομέτρου μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ROS (Reactive Oxygen Species).

SUMMARY

Reactive oxygen species and reactive nitrogen species are products of the normal cell metabolism and are also useful in low to moderate concentration for many important biological functions. However, the excessive production of these can not be neutralized by the body's antioxidant defense and this can lead to damage to various biomolecules. The body uses antioxidant enzymes and antioxidants produced either by itself or from the diet to defend itself in cases of excessive production of free radicals. Oxidative stress is defined as the imbalance between pro-oxidants and antioxidants in the body and is due to either increased production of free radicals or insufficiency of antioxidant mechanisms.

In the present study eukaryotic cells and specifically endothelial cells (cell line EA.hy926) were used as it is one of the tissues that are particularly sensitive to oxidative stress. They were incubated with herbal extracts from the region of Epirus and then induced oxidative stress using hydrogen peroxide (H_2O_2). Specifically, the herbs are sage, rosemary, verbena and oregano.

The main purpose of this study was to evaluate the effect of the above-mentioned herbs on the redox status of cells after induction of oxidative stress. For this purpose total antioxidant capacity (TAC), TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) and protein carbonyls were measured. The levels of glutathione (GSH) and ROS (Reactive Oxygen Species) were also measured using a cytometer.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
SUMMARY	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες	10
1.1.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	12
1.1.2 Αρνητικές και θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	15
1.2 Οξειδωτικό στρες	18
1.3 Αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας.....	19
Η.....	21
1.3.1 Φυτοχημικά	23
1.4 Βότανα που μελετήθηκαν.....	26
1.4.1 Φασκόμηλο	26
1.4.2 Δενδρολίβανο	27
1.4.3 Λουίζα.....	28
1.4.4 Ρίγανη.....	29
2. Σκοπός.....	31
3. Υλικά και μέθοδοι.....	31
3.1 Εκχυλίσματα βοτάνων	31
3.2 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	31
3.3 Κυτταρική σειρά EA.hy926	33
3.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926.....	34
3.4 Προσδιορισμός επιπέδων ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής	35
3.4.1 Πειραματική διαδικασία	36
3.5 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	37
3.5.1 Πειραματική διαδικασία	37
3.6 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)	38
3.6.1 Πειραματική διαδικασία	38
3.6.2 Υπολογισμοί	38

3.7 Προσδιορισμός επιπέδων TBARS	38
3.7.1 Πειραματική διαδικασία	39
3.7.2 Υπολογισμοί	39
3.8 Πρωτεϊνικά καρβονύλια	40
3.8.1 Πειραματική Διαδικασία	40
3.8.2 Υπολογισμοί	41
4 Αποτελέσματα	42
4.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής	42
4.2 Αποτελέσματα της μεθόδου TAC	44
4.3 Αποτελέσματα μεθόδου TBARS	45
4.4 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	46
5 Συζήτηση	47
6 Βιβλιογραφία	49

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1 : ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	15
ΕΙΚΟΝΑ 2 : ΑΛΥΣΙΔΩΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	16
ΕΙΚΟΝΑ 3 : ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	19
ΕΙΚΟΝΑ 4 : ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ.....	20
ΕΙΚΟΝΑ 5 : ΟΙ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	24
ΕΙΚΟΝΑ 6 : SALVIA OFFICINALIS.....	26
ΕΙΚΟΝΑ 7 : SALVIA ROSMARINUS	27
ΕΙΚΟΝΑ 8 : ALOYSIA CITRODORA	28
ΕΙΚΟΝΑ 9 : ORIGANUM VULGARE	29
ΕΙΚΟΝΑ 10 : ΔΟΜΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂	32
ΕΙΚΟΝΑ 11 : Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΕΑ.ΗΥ926 ΟΠΩΣ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	33
ΕΙΚΟΝΑ 12 : ΥΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΘΑΛΑΜΟ ΡΟΗΣ...	36
ΕΙΚΟΝΑ 13 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ GSH.....	42
ΕΙΚΟΝΑ 14 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ROS.....	43
ΕΙΚΟΝΑ 15 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΑC.....	44
ΕΙΚΟΝΑ 16 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΒΑRS.....	45
ΕΙΚΟΝΑ 17 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ.....	46

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Κύρια χαρακτηριστικά των ελευθέρων ριζών είναι η μεγάλη αστάθεια και η υψηλή δραστηριότητα εξαιτίας της τάσης που παρουσιάζουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια να συζευκτούν με ηλεκτρόνια από άλλα άτομα.

Τελευταία χρησιμοποιούνται οι όροι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι όροι αυτοί δεν περιλαμβάνουν μόνο ελεύθερες ρίζες αλλά και μόρια που μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ρίζες πχ H_2O_2 .

Όταν δύο ρίζες αντιδρούν ενώνουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ τους σε αντιδράσεις που είναι κινητικά γρήγορες και οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό μη ριζών :



Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια ,τότε παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών προκαλώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση με δυσμενείς συνέπειες.

Παραδείγματα ενεργών μορφών οξυγόνου αποτελούν : το μοριακό οξυγόνο (O_2) όπου αποτελεί από μόνο του διπλή ρίζα αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων σε δύο διαφορετικά τροχιακά, το μονήρες μοριακό οξυγόνο (1O_2) όπου η διεγερμένη αυτή μορφή του οξυγόνου μπορεί να παραχθεί από διάφορες μεταβολικές οδούς όπως για παράδειγμα κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών, το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) που σχηματίζεται με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο και στον οργανισμό παράγεται ιδιαίτερα στα λευκά αιμοσφαίρια γιατί χρησιμεύει στην καταστροφή των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, το υπεροξειδίο του υδρογόνου

(H₂O₂) το οποίο δεν είναι ρίζα αλλά θεωρείται ενεργή μορφή οξυγόνου και μπορεί να μετατρέπεται σε μια πολύ δραστική ρίζα τη ρίζα υδροξυλίου που είναι μια από τις πιο ισχυρές ρίζες η οποία μπορεί να επιτεθεί σε όλα τα μόρια του σώματος όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιποειδή και DNA. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (10⁻⁹s) και γι' αυτό όταν παράγονται δρουν κοντά στο χώρο σχηματισμού τους αποσπώντας γρήγορα ηλεκτρόνια από τα γύρω μόρια.[1] Η ρίζα υδροξυλίου παράγεται από ανηγμένο σίδηρο και υπεροξειδίο του υδρογόνου κατά την διάρκεια της αντίδρασης που είναι γνωστή ως αντίδραση Haber-Weiss:



Παραδείγματα ενεργών μορφών αζώτου αποτελούν : το μονοξειδίου του αζώτου (NO) όπου συντίθεται κατά την αντίδραση οξειδωσης της L- αργινίνης προς κιτρουλλίνη, που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του NO (NOS), έχει μικρή οξειδωτική ικανότητα και είναι ένα σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών και σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να μετατραπεί σε άλλες ενεργές μορφές αζώτου και το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν (ONOO⁻) το οποίο αποτελεί την πιο δραστική ρίζα αζώτου καθώς είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και έχει τη δυνατότητα να διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και να αντιδρά με βιομόρια όπως πρωτεΐνες καταστρέφοντας ή τροποποιώντας τη λειτουργία τους, καθώς και με το CO₂ παράγοντας ασταθή προϊόντα.[1,2]

Επίσης υπάρχουν και οι δραστικές μορφές θείου (RSS) οι οποίες σχηματίζονται από αμινοξέα.

Ελεύθερες ρίζες	Μοριακός τύπος	Χρόνος ημιζωής
<i>Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)</i>		
Ιον υπεροξειδίου του οξυγόνου	$O_2^{\bullet -}$	10^{-5} sec
Οζον	O_3	σταθερή
Μονήρης κατάσταση μοριακού οξυγόνου	O_2	1μsec
Ρίζα υδροξυλίου	OH^{\bullet}	10^{-9} sec
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2	σταθερή
Υδροπεροξειδική ρίζα	HO_2^{\bullet}	
Υποχλωρικό οξύ	$HOCl$	σταθερή
Ρίζα αλκοξυλίου	RO^{\bullet}	10^{-6} sec
Ρίζα περοξυλίου	ROO^{\bullet}	7sec
Υδροπεροξύλιο	$ROOH^{\bullet}$	
<i>Δραστικές μορφές αζώτου (RONS)</i>		
Οξειδίο του αζώτου	NO^{\bullet}	
Διοξειδίο του αζώτου	NO_2^{\bullet}	1-10sec
Ανιόν του περοξυνιτρίτη	$ONOO^{\bullet -}$	0.05^{-1} sec
<i>Δραστικές μορφές θείου (RSS)</i>		
Ρίζα θείου	RS	

Πίνακας 1 : Κατηγοριοποίηση ελευθέρων ριζών

1.1.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν από ενδογενείς ή από εξωγενείς παράγοντες. Όσον αφορά τους ενδογενείς :

- Μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο σύνδεσης της ενέργειας που παράγεται από τη ροή των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα με τη δημιουργία ATP, μέσω της άντλησης πρωτονίων από τη μήτρα των μιτοχονδρίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Έχει αποδειχθεί, όμως, ότι

κατά τη ροή των ηλεκτρονίων υπάρχουν διαρροές απευθείας προς το οξυγόνο και δημιουργία ελεύθερου $O_2^{\cdot -}$, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται γρήγορα σε H_2O_2 (Cadenas and Davies, 2000; Chance, Sies et al., 1979). Μ' αυτόν τον τρόπο, τα μιτοχόνδρια αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου στους αερόβιους οργανισμούς. [3]

- Φαγοκυττάρωση

Κατά τη φαγοκυττάρωση ξένων ουσιών, βακτηρίων ή ιών, τα ενεργοποιημένα λευκά αιμοσφαίρια καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου για την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ μέσω του ενζύμου οξειδάση του NADPH. Οι ρίζες $O_2^{\cdot -}$ είναι απαραίτητες στα κύτταρα αυτά για την παραγωγή άλλων τοξικών ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου πχ H_2O_2 και $ONOO^-$ για την καταστροφή των ξένων βακτηρίων ή άλλων οργανισμών. Η μαζική παραγωγή των αντιμικροβιακών και ογκοκτόνων ROS σε ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, παρουσία οξυγόνου ονομάζεται "αναπνευστική έκρηξη" και παίζει σημαντικό ρόλο άμυνας κατά των παθογόνων μικροοργανισμών.[4]

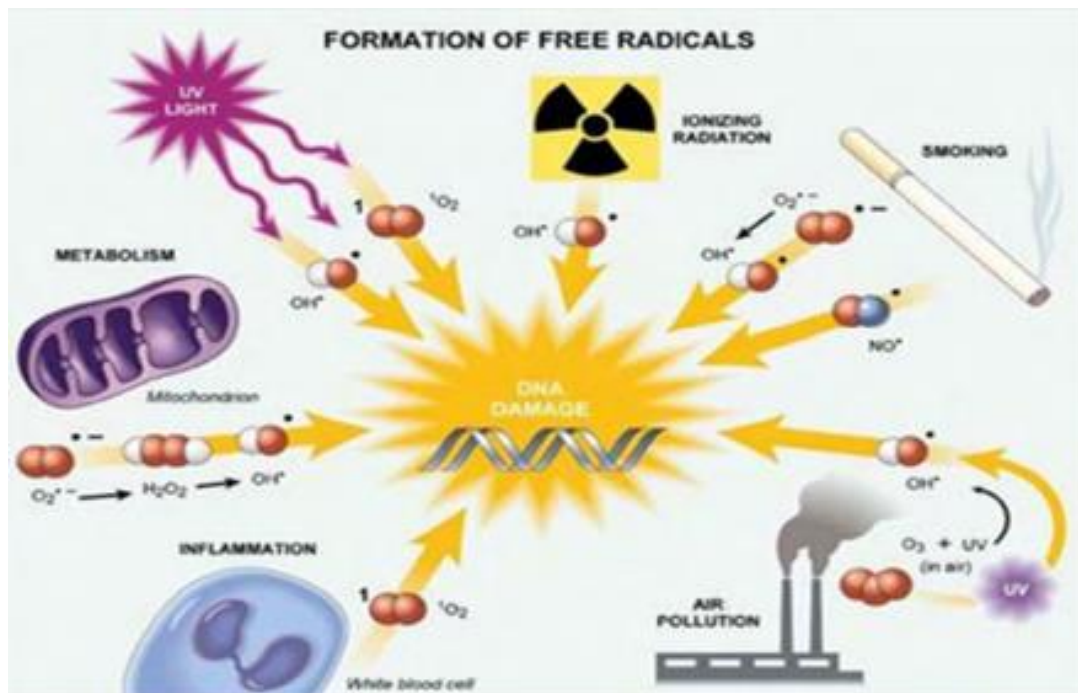
- Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης είναι μια σιδηρο-θειο-μολυβδαινοφλαβοπρωτεΐνη και υπάρχει κυρίως στο πλάσμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και υφίσταται κυρίως ως αφυδρογονάση όπου σε φυσιολογικές συνθήκες καταλύει την οξειδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ και η οποία λαμβάνει τα ηλεκτρόνια του υποστρώματος ανάγοντας το NAD^+ σε $NADH$. Όμως μπορεί, κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών καταστάσεων, να μετατραπεί σε οξειδάση. Η οξειδάση της ξανθίνης μεταφέρει ηλεκτρόνια από το οξυγόνο στα μόρια του υποστρώματος δημιουργώντας $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 . [5]

- **Κυτόχρωμα P₄₅₀**
Τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀. Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια φαίνεται να διαφεύγουν από τις φλαβίνες στο ενεργό κέντρο της αναγωγάσης του κυτοχρώματος P₄₅₀. Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας O₂^{•-} το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ και ο ρυθμός παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Επίσης, παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας O₂^{•-}.
- **Αντιδράσεις αυτοοξειδωσης**
Πολλά μόρια με σημαντικούς βιολογικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα οι θειολικές ενώσεις, ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη, οι ορμόνες αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, οι ανηγμένες φλαβοενώσεις (FMNH₂ και FADH₂) και πολλές άλλες, παρουσία O₂, έχουν την ικανότητα αυτοοξειδωσης, σχηματίζοντας O₂^{•-}.

Παραδείγματα εξωγενών παραγόντων είναι: [6, 7, 8]

- Έκθεση σε ακτινοβολία
- Μολυσμένος από ρύπους αέρας όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το διοξείδιο του αζώτου (NO₂)
- Κάπνισμα
- Αλκοόλ
- Φυτοφάρμακα κ.α.



Εικόνα 1 : Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

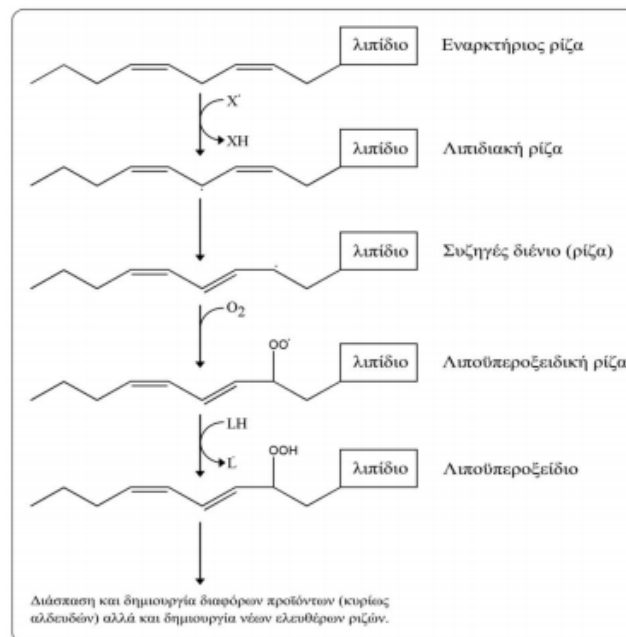
1.1.2 Αρνητικές και θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Όσον αφορά τις αρνητικές επιδράσεις :

- Λιπίδια

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και η χοληστερόλη, αποτελούν στόχο των ROS και των RNS. Το φαινόμενο καλείται “λιπιδική υπεροξειδωση”. Η αρχή της υπεροξειδωσης μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα, αρκεί να είναι τόσο δραστική, ώστε να μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από μια μεθυλομάδα. Είναι γνωστό ότι, όταν μια μεθυλική ομάδα βρίσκεται δίπλα σε έναν διπλό δεσμό και, περισσότερο, όταν βρίσκεται μεταξύ δύο διπλών δεσμών, η ισχύς του δεσμού του H με το αντίστοιχο άτομο C εξασθενεί σημαντικά για αυτό σχεδόν πάντοτε οι διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου από μεθυλομάδες που βρίσκονται μεταξύ δύο διπλών

δεσμών. Η απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η ρίζα του λιπαρού οξέος που δημιουργείται είναι πολύ ασταθής, με αποτέλεσμα τον γρήγορο ανασυνδυασμό της με ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς και τον σχηματισμό αφενός συζυγών διενίων και αφετέρου μιας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα του διπλού δεσμού. Η νέα ελεύθερη ρίζα είναι σχετικά πιο σταθερή και προλαβαίνει να αντιδράσει με μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου. Η ρίζα αυτή, με τη σειρά της, έχει την ικανότητα να αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μ' αυτόν τον τρόπο μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξείδιο του λιπαρού οξέος. Τα υπεροξείδια των λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται διασπώνται στη συνέχεια με πολύπλοκους μηχανισμούς, σχηματίζοντας μια πλειάδα προϊόντων και συντελώντας στην περαιτέρω επέκταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οι οποίες έχουν καταστρεπτικά αποτελέσματα, καθώς προκαλούν τελικά την ολική οξείδωση των μεμβρανών και τον θάνατο των κυττάρων.[9,10,11]



Εικόνα 2 : Αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στη υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

- Πρωτεΐνες

Οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας σε διάσπαση πεπτιδικών δεσμών και αλλαγές στη δομή τους με καταστροφικές συνέπειες για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να υποστούν σημαντικές οξειδωτικές τροποποιήσεις χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργικότητά τους. Μόνο όταν θιγούν απαραίτητα αμινοξέα ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο (ή σε αλλοστερικά κέντρα), επηρεάζεται η γενικότερη λειτουργία τους (Stadtman, 2006). Το $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να αντιδράσει με προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών που αποτελούνται από σύμπλοκα Fe-S και να απελευθερώσουν ιόντα σιδήρου, τα οποία στη συνέχεια καταλύουν τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών. Το H_2O_2 μπορεί να οξειδώσει ορισμένες ευαίσθητες θειολικές ομάδες σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η εν λόγω αντίδραση αποτελεί το έναυσμα για τη μεταγωγή μιας πλειάδας διαφορετικών σημάτων στα κύτταρα. Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες μεταγραφής και επιδιόρθωσης του DNA έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων.[12, 13, 14]

- DNA

Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σχάση των αλυσίδων (μονών και διπλών), ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων (sister chromatid exchange) και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι ρίζες του υδροξυλίου αποτελούν την κύρια αιτία για την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων. Η ρίζα υδροξυλίου επίσης μπορεί να επιτεθεί στην γουανίνη στην θέση C-8 και έτσι να σχηματιστεί ένα

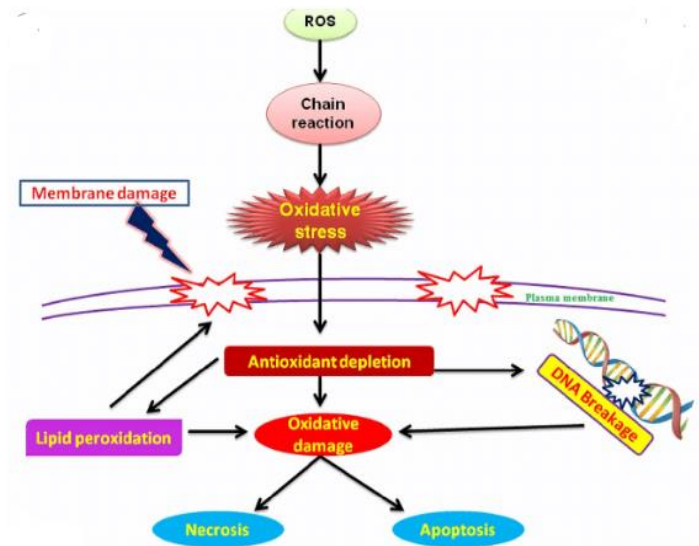
οξειδωτικό προϊόν ,η 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν τέλος, να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη.[15 ,16]

Όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις ,σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις το μονοξειδίο του αζώτου ,το ανιόν υπεροξειδίου και αρκετά είδη ενεργών μορφών οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο ως μεσολαβητές σε διαδικασίες σηματοδότησης. Πολλές από τις μεσολαβούμενες από ROS αποκρίσεις στην πραγματικότητα προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και αποκαθιστούν την «οξειδοαναγωγική ομοιόσταση». Οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει τη χρήση του μονοξειδίου του αζώτου και των ενεργών μορφών οξυγόνου ως μόρια σηματοδότησης για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες ,αυτές περιλαμβάνουν την ρύθμιση του αγγειακού τόνου, την παραγωγή ερυθροποιητίνης και μεταγωγή σήματος από μεμβρανικούς υποδοχείς σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες (Dröge,2002). Επίσης, φαίνεται ότι οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη μυϊκή συστολή. Από πειράματα βρέθηκε ότι η παρεμπόδιση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οδήγησε στη μείωση της δύναμης συστολής των μυϊκών ινών.

1.2 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ – οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών του οργανισμού και συνήθως εξουδετερώνεται από το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας του οργανισμού (Zhong et al.,2019). Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Δυστυχώς, όταν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών είναι υψηλότερα από αυτά που μπορούν να εξουδετερωθούν από το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα εμφανίζονται βλάβες στους ιστούς, ακόμη και ασθένειες καθώς οδηγούν σε οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών, DNA, αλλά και άλλων μορίων με τέτοιο τρόπο που βλάπτουν την κυτταρική λειτουργία. Σε επίπεδο οργανισμού δηλαδή, το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο

με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του.[19]

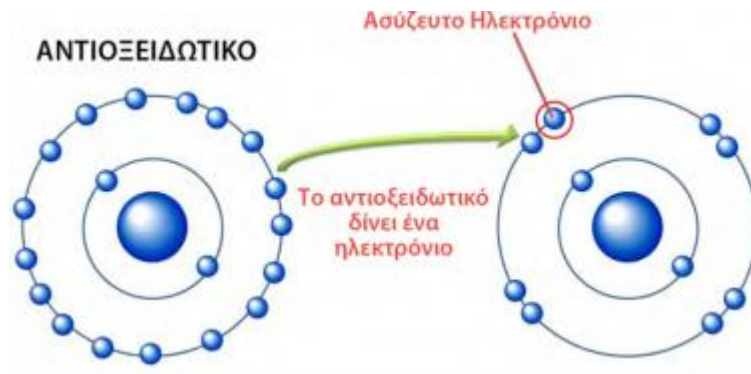


Εικόνα 3 :Αρνητικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες

1.3 Αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας.

Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα του οργανισμού έχει ως στόχο των περιορισμό των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες και γενικότερα από τις ROS είτε εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους ή εξουδετερώνοντας τες πριν αυτές αντιδράσουν με άλλα βιομόρια.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καθυστερούν ή να σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων.



Εικόνα 4 : Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

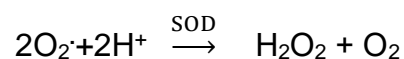
Επίσης, υπάρχουν αντιοξειδωτικά που απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μέταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες). Τέλος μπορούν να δρουν συνεργιστικά. Γενικά τα αντιοξειδωτικά συμβάλουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

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

Στα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνονται η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) , η καταλάση (CAT) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) :

- Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Πιο συγκεκριμένα μερικά από τα πιο σημαντικά :

- Γλουταθειόνη

Είναι ένα τριπεπτίδιο και αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα ένζυμα συνθεάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθεάση γλουταθειόνης, και αποτελείται από τα αμινοξέα L- γλουταμινικό, L- κυστεΐνη και γλυκίνη. Απαντά είτε στην ανηγμένη της μορφή ως GSH είτε στην οξειδωμένη GSSG. Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού. Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου όπως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης κ.α. Δεσμεύει άμεσα τη ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οργανικά υπεροξειδία με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Παρουσιάζει επίσης την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό τους μορφή σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E άμεσα ή έμμεσα.[20, 21]

- Ουρικό οξύ

Αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα βιολογικά υγρά του αλλά και εντός των κυττάρων .Μπορεί να ενεργήσει ως δότης ηλεκτρονίων σε άλλες ουσίες. Μπορεί να εκκαθαρίσει ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο και υπεροξειδία όπως το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν (ONOO⁻).

- Συνένζυμο Q10 – Ουβικινόνη

Η ουβικινόνη συντίθεται στα κύτταρα και μεταφέρει ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Έχει αποδειχθεί ότι

παρέχει υδρογόνο για την εξουδετέρωση υπεροξειδικών ριζών και επομένως αποτελεί μόριο με αντιοξειδωτικές ικανότητες.

- Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C αποτελεί συμπράγοντα σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις ενώ παράλληλα έχει και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς είναι δότης ηλεκτρονίων με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες.

- Βιταμίνη E

Αποτελεί ένα ισχυρό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Εναποτίθεται στις μεμβράνες των κυττάρων, εξουδετερώνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες που βλάπτουν τα κύτταρα, τους ιστούς και τα όργανα του σώματος. Ειδικότερα, η α-τοκοφερόλη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

- Μέταλλα

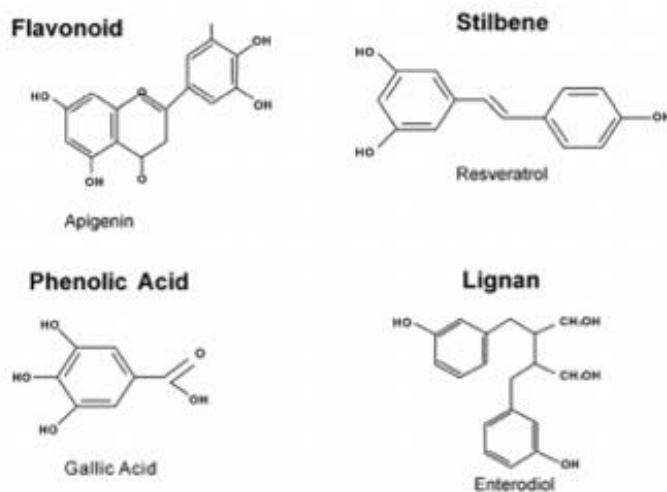
Πολλά από τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα διαθέτουν ως συμπράγοντες ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό κέντρο τους μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως ο σίδηρος, το σελήνιο, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Αυτό τα καθιστά αναπόσπαστο τμήμα της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζύμων και συμμετέχουν έτσι στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού.

1.3.1 Φυτοχημικά

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι είναι απαραίτητη η πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών από τη διατροφή για την ενίσχυση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος του οργανισμού. Μια ποικιλία φυτικών προϊόντων είναι γνωστό ότι είναι φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών, όπως βότανα, μπαχαρικά, σπόροι, φρούτα και λαχανικά καθώς περιέχουν φυτοχημικά. Τα περισσότερα

φυτοχημικά έχουν αντιοξειδωτική δράση και μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων χρόνιων παθήσεων, όπως καρδιοπάθειες, εγκεφαλικά επεισόδια, νόσος αλτσχάιμερ, ρευματοειδής αρθρίτιδα, αλλά και διάφορων τύπων καρκίνου. Οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή (που ανήκουν στα τερπένια) είναι τα δύο κύρια είδη φυτοχημικών που συμβάλλουν περισσότερο στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τροφίμων/φυτών. Επίσης στις κυριότερες ομάδες φυτοχημικών ανήκουν και οι ενώσεις οργανοθειϊκών (ινδόλια, θειοσουλφικά, ισοθειοκυανικά) και οι οργανικοί όξινοι-πολυσακχαρίτες.

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες με τον όρο αυτό εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Η ποικιλία των φυτών, η γεωγραφική περιοχή, η περίοδος καλλιέργειας και η αποθήκευση μπορούν να επηρεάσουν την συγκέντρωση των πολυφαινολών στα τρόφιμα.



Εικόνα 5 : Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών

Χωρίζονται σε δύο κύριες τάξεις: στα φλαβονοειδή και στις μη φλαβονοειδείς ομάδες.

Τα φλαβονοειδή έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτυλίους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν

οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες.

Τα μη φλαβονοειδή είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα σπιλβένια.

Οι πολυφαινόλες είναι πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την αλυσιδωτή αντίδραση, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές). Δρουν επίσης ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης και ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά.[22,23,24]

Από την άλλη πλευρά η δράση τους είναι δόσοεξαρτώμενη δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες καθώς σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προοξειδωτική ικανότητα.

Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση περισσοτέρων της μιας μονάδας ανθρακικών ενώσεων με πέντε άτομα άνθρακα (C₅) που έχουν το διακλαδισμένο ανθρακικό σκελετό του ισοπρενίου ή ισοπεντανίου C₅. Η ταξινόμησή τους γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων που περιέχουν στο μόριό τους.[25]

Τα καροτενοειδή που προαναφέρθηκαν είναι τετρατερπένια και λειτουργούν ως δευτερογενείς χρωστικές στη φωτοσυνθετική διαδικασία και προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς από τη φωτοοξειδωση. Η α-καροτίνη, η β-καροτίνη, η λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, και λυκοπαΐνη είναι τα πιο κοινά καροτενοειδή. Το α-, β-καροτένιο και μερικά άλλα μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη Α.

1.4 Βότανα που μελετήθηκαν

1.4.1 Φασκόμηλο

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Salvia*. Πρόκειται για ένα πολυετές, ξυλώδες και θαμνώδες φυτό το ύψος του οποίου φτάνει τα 50 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι επιμήκη και παχιά και έχουν χρώμα λευκοπράσινο. Τα άνθη του έχουν χρώμα μωβ, φύονται κατά σπονδύλους και ανθίζουν από το Μάιο έως τον Ιούνιο. Βρίσκεται κυρίως σε ξηρά και πετρώδη μέρη.



Εικόνα 6 : *Salvia Officinalis*

Ως προς τις θεραπευτικές του ιδιότητες, το φασκόμηλο πιστεύεται ότι έχει αντισηπτικές, αποχρεμπτικές, σπασμολυτικές, στομαχικές και καρδιοτονωτικές ιδιότητες επίσης χρησιμοποιείται κατά των νευραλγιών και κατά της αρθρίτιδας ως εμμηναγωγό, διουρητικό, υπέρτασικό, ανθιδρωτικό, μυκητοστατικό, αιμοστατικό και τοπικό αναισθητικό του δέρματος. Παρά τις θετικές του επιδράσεις στην υγεία, η χρήση του πρέπει να γίνεται με μέτρο καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δηλητηρίασης από υπερβολική κατανάλωση του, κάτι που οφείλεται σε μια ουσία που περιέχει το φασκόμηλο, τη θουγιόνη.

Η σύνθετη σύνθεση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου, λαμβάνοντας υπόψη βιοδραστικές ενώσεις όπως τα τερπένια (μονοτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια) και τις φαινολικές ενώσεις, είναι η αιτία για την δραστικότητα του στον οργανισμό. Η αντιοξειδωτική δράση του φασκόμηλου οφείλεται κυρίως στα πρωτογενή διτερπένια όπως το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη αλλά και

στα φλαβονοειδή και άλλες φαινόλες. Το καρνοσικό οξύ είναι ένα φαινολικό διτερπένιο που ανήκει στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών που ονομάζονται τερπενοειδή .Η καρνοσόλη είναι ένα ορθο-διφαινολικό διτερπένιο και ένα οξειδωτικό παράγωγο του καρνοσικού οξέος.[26]

1.4.2 Δενδρολίβανο

Το δενδρολίβανο με την επιστημονική ονομασία *Salvia rosmarinus* ανήκει στην οικογένεια των *Lamiaceae*. Ευδοκίμει κυρίως στις χώρες της Μεσογείου και σε περιοχές με εύκρατο κλίμα.



Εικόνα 7: *Salvia Rosmarinus*

Το δενδρολίβανο συνίσταται από πληθώρα δραστικών ουσιών όπως πολυφαινόλες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, μέταλλα τα οποία φέρουν αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη δράση και στα οποία οφείλεται η βιολογική δράση του φυτού. Διτερπένια όπως η καρσονόλη προστατεύουν το ήπαρ καθώς επάγουν τα ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού προάγωντας την απομάκρυνση ξενοβιοτικών και τοξικών ουσιών (ενδογενών και εξωγενών). Ακόμα, χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς εξουδετερώνει έμμεσα ή άμεσα τις ελεύθερες ρίζες, η καρνοσόλη επάγει έμμεσα αντιοξειδωτική δράση μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2.[28]

1.4.3 Λουίζα

Η λουίζα (*Aloysia citrodora* ή *Lippia citriodora*) είναι φυλλοβόλος θάμνος με ύψος μεταξύ 1,5-2 μ. και ανήκει στην οικογένεια *Verbenaceae*. Το φυτό έχει λεπτά στελέχη με μακριά ανοιχτοπράσινα φύλλα και μοβ, λευκά ή πράσινα άνθη με χαρακτηριστικό έντονο άρωμα που θυμίζει λεμόνι. Η Λουίζα ανθίζει το καλοκαίρι και συνήθως φυτρώνει σε πετρώδη εδάφη.



Εικόνα 8 : *Aloysia Citrodora*

Χρησιμοποιείται για προβλήματα του στομάχου και του πεπτικού συστήματος, όπως, δυσπεψία, νευραλγίες και κολικούς ,επίσης έχει ηρεμιστικές και τονωτικές του νευρικού συστήματος ιδιότητες. Βοηθάει στην αποτοξίνωση του οργανισμού και στην αύξηση του μεταβολισμού .Είναι αντιπυρετική ,διουρητική και συνίσταται σε περιπτώσεις νεφρολιθιάσεων, και καταπολεμά την κακοσμία του στόματος.

Περιέχει οργανικά χημικά όπως πτητικά έλαια (κιτρονελλάλη, κιράλη, λιναλόλη), τερπενοειδή, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη η οποία είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές της ιδιότητες. Το αιθέριο έλαιο που εξάγεται από τη λουίζα διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ενώσεις.

1.4.4 Ρίγανη

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiales και στο γένος *Origanum*. Είναι αρωματικό ποώδες, πολυετές, ιθαγενές και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Το φυτό έχει ύψος 20-80 εκατοστά, έχει φύλλα τοποθετημένα αντίθετα μήκους 1-4 εκατοστά. Η καταλληλότερη περίοδος ανθοφορίας της είναι από τον Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο αναλόγως της περιοχής. Η ελληνική ρίγανη, η οποία είναι αυτοφυής σε ορεινά και βραχώδη εδάφη, θεωρείται η καλύτερη παγκοσμίως από άποψη ποιότητας και έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντικά οφέλη για την υγεία.



Εικόνα 9 : *Origanum Vulgare*

Η ρίγανη χρησιμοποιείται ως αντιφλεγμονώδες, αντισπασμωδικό, βακτηριοκτόνο αλλά και ως αντιδιαρροϊκό. Υπό τη μορφή αφεψήματος, χρησιμοποιείται για την ατονία των εντέρων, ως αποχρεμπτικό για το βήχα, σε περιπτώσεις άσθματος, χρόνιας βρογχίτιδας και φυματίωσης ενώ βοηθάει στην υπέρταση και την αρτηριοσκλήρυνση. Μια άλλη εξίσου σημαντική χρήση της είναι εναντίον των ρευματικών παθήσεων αλλά και για περιπτώσεις πέτρας στους νεφρούς και την ουροδόχο κύστη και σε εξωτερικά οιδήματα.

Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριοι τύποι φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στη ρίγανη. Έχουν μελετηθεί λόγω της θεραπευτικής τους ικανότητας, η οποία έχει αποδοθεί εν μέρει στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Gutiérrez-Grijalva et al., 2017). Οι φλαβόνες είναι η πιο άφθονη υποομάδα των φλαβονοειδών στην ρίγανη ακολουθούμενες από τις

φλαβονόλες, φλαβανόνες και φλαβανόλες. Μεταξύ των πιο συνηθισμένων φαινολικών οξέων στην ρίγανη είναι παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος και υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Η ρίγανη περιέχει, επίσης, σημαντικές ποσότητες από ροσμαρινικό οξύ, α- και γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, καφεϊκό οξύ και p-κουμαρικό οξύ. Επιπλέον, η ρίγανη είναι πλούσια σε β-καροτίνη, σίδηρο και φυτικές ίνες, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα ενώ έχει αποδειχθεί ότι ανατέλλει την υπεροξειδωση του λινολεϊκού οξέος. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το αιθέριο έλαιο της είναι πλούσιο σε δύο φαινόλες, τη θυμόλη και την καρβακρόλη, που είναι ισχυρά μικροβιοκτόνες ουσίες ενώ παράλληλα συμβάλλουν και στην ικανότητα της ρίγανης να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες DPPH.[27]

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τεσσάρων αυτών βοτάνων από την περιοχή της Ηπείρου. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (EA.hy926) μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες. Τα οξειδωτικό στρες προκλήθηκε με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση του φασκόμηλου , της λουίζας , του δενδρολίβανου και της ρίγανης.

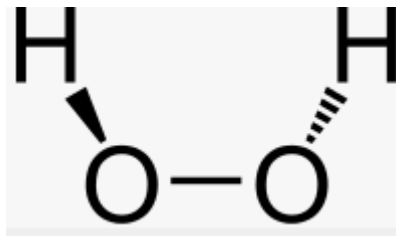
3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Εκχυλίσματα βοτάνων

Δύο γραμμάρια ξηρών φύλλων προστέθηκαν σε περίπου 200 ml νερού βρύσης, ακολούθησε βρασμός για 3 λεπτά και στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν να σταθούν για 5 λεπτά. Το προκύπτον αφέψημα διηθήθηκε και ακολούθησε λυοφιλίωση του αθροίσματος του διηθήματος. Το λυοφιλιωμένο προϊόν χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του τελικού αφεψήματος.

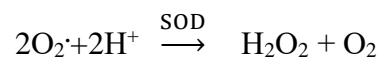
3.2 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ώστε να προκαλέσει οξειδωτικό στρες στην κυτταρική σειρά EA.hy926.



Εικόνα 10 : Δομή του H₂O₂

Είναι μια ανόργανη χημική ένωση και αποτελεί παραπροϊόν της αερόβιας ζωής των έμβιων όντων. Η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) πραγματοποιείται σε ένα όξινο περιβάλλον, με την παρουσία ριζών O₂^{•-}, ενώ η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) :



Είναι ασθενές οξειδωτικό μέσο, αλλά μπορεί να οξειδώσει αρκετά βιολογικά μόρια, κυρίως αυτά που έχουν θειολικές ομάδες (-SH), σύμπλοκα Fe-S, μόρια αίμης κ.ά. Μπορεί εύκολα να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών επειδή δεν έχει ηλεκτρικό φορτίο και αυτή είναι μια ιδιότητα πολύ σημαντική για τη φυσιολογική του δράση, αν και υπάρχει μια ειδική πρωτεΐνη (ακουαπορίνη) στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων που έχει την ικανότητα να διευκολύνει τη μεταφορά του.

Όταν προστεθεί στο θρεπτικό υλικό κυττάρων σε καλλιέργεια προξενεί βλάβες και, τελικά, επιφέρει τον θάνατο σε πολλά είδη κυττάρων. Οι περισσότερες βλάβες είναι έμμεσες, και συναντώνται κυρίως στο DNA, τα λιπίδια και τις περισσότερες πρωτεΐνες, μιας και το H₂O₂ δεν αντιδρά απευθείας με αυτά τα μόρια. Πιστεύεται ότι το H₂O₂ διαπερνά πρώτα την κυτταρική μεμβράνη και μετά αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα κέντρα μετάπτωσης (κυρίως Fe), δημιουργώντας δραστικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ή άλλους παράγοντες με παρόμοια υψηλή δραστηριότητα.

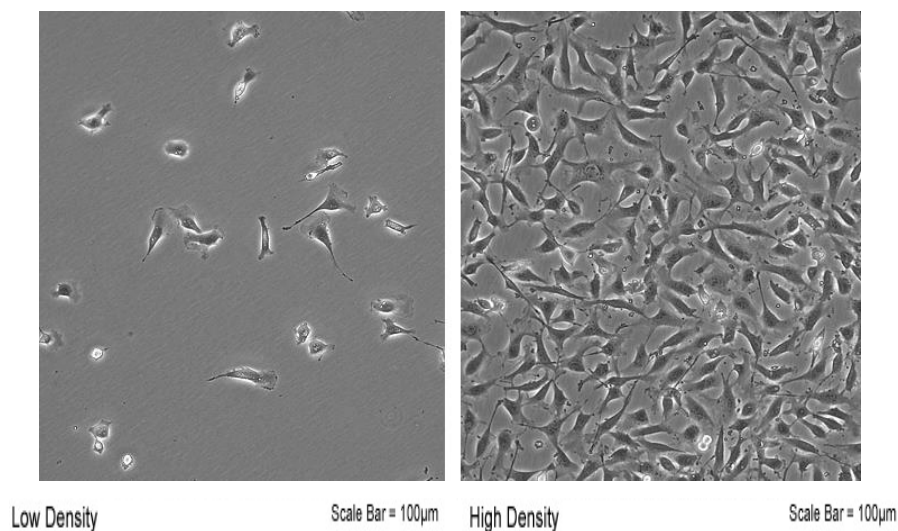
Είναι πιθανό ότι όταν το εσωτερικό των κυττάρων εκτίθεται σε συγκεντρώσεις H₂O₂ υψηλότερες από ένα ορισμένο όριο και δεν αποικοδομείται αμέσως από

τα ένζυμα καταβολισμού του, όπως η καταλάση, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ενδοκυτταρικό σίδηρο. Δεδομένου ότι τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα φαίνεται να είναι πλούσια σε σίδηρο η κύρια αλληλεπίδραση μεταξύ H_2O_2 και σιδήρου λαμβάνει χώρα πιθανώς μέσα σε αυτά τα οργανίδια, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση των μεμβρανών τους και απελευθέρωση των συστατικών τους. Τα μετεγκατεστημένα λυσοσωμικά συστατικά, όπως οι πρωτεάσες κυστεΐνης B, H και L, θεωρούνται μεσολαβητές στη διαδικασία της απόπτωσης, αν και οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστοί (Tenopoulos et al., 2005).

Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν $0,95 \mu\text{g/ml } H_2O_2$.

3.3 Κυτταρική σειρά EA.hy926

Η κυτταρική σειρά EA.hy926 δημιουργήθηκε με σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας με ανθρώπινα καρκινικά κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Η προκύπτουσα αθάνατη κυτταρική σειρά διατηρεί πολλές ιδιότητες του αγγειακού ενδοθηλίου όπως είναι η έκφραση του παράγοντα von Willebrand, του παράγοντα πήξης VIII, ενεργοποιητές πλασμινογόνου και θρομβομοντουλίνη.



Εικόνα 11 : Η κυτταρική σειρά EA.hy926 όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο

Ένας από τους ιστούς που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο οξειδωτικό στρες είναι το αγγειακό ενδοθήλιο όπου είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής της αγγειακής ομοιόστασης. Ο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων ή η δυσλειτουργία που προκαλείται από τα ROS μπορεί να είναι αιτία πολλών αγγειακών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της θρόμβωσης και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Συγκεκριμένα, τα αγγειακά κύτταρα του ενδοθηλίου είναι ευαίσθητα σε βλάβη από τα δραστικά είδη οξυγόνου καθώς αυτά προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς και μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο εσωτερικό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο ενδοθήλιο μέσω πρόσκόλλησης λευκοκυττάρων (Kerasioti et al. ,2019).

3.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικό. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φλάσκες των 25cm² και 75cm² που περιείχαν 5ml και 10ml εμπλουτισμένου θρεπτικού DMEM αντίστοιχα, σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονται στις φλάσκες έως ότου καλυφθεί το 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας οπότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Στις μεγάλες φλάσκες το θρεπτικό υλικό με 10% ορό FBS απορρίπτεται και η φλάσκα ξεπλένεται με 2ml PBS (0,01 M, pH 7,4). Στη συνέχεια προστίθεται 1ml θρυψίνης (0,25%) για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, και επώαση στον κλίβανο για 5min στους 37°C. Κατόπιν προστίθενται 5ml DMEM με 10% ορό FBS για απενεργοποίηση της θρυψίνης και επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε νέες φλάσκες με DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS. Για τις μικρές φλάσκες ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τις υποδιπλάσιες ποσότητες. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow). Πριν τη διεξαγωγή του πειράματος ο θάλαμος αποστειρωνόταν με UV 15-20min.

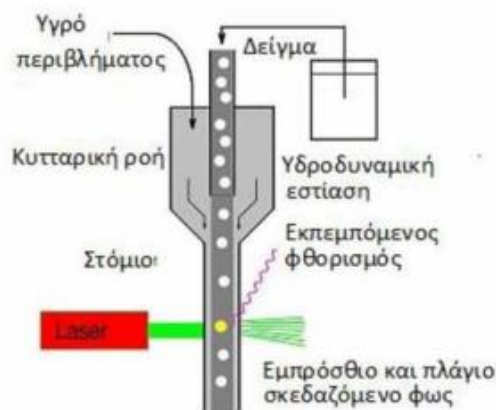
Όσον αφορά την προσθήκη των εκχυλισμάτων βοτάνων : τα εκχυλίσματα ζυγίζονταν και στη συνέχεια διαλύονταν και αραιωνόντουσαν σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού χωρίς FBS ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις και στη συνέχεια προστίθονταν στις φλάσκες. Παράλληλα , έπρεπε να διατηρηθεί και μία φλάσκα control καθώς και μία φλάσκα στην οποία θα προστιθόταν μόνο το H_2O_2 (την επόμενη μέρα). Μετά από 24 ώρες ετοιμαζόταν με αραιώση σε θρεπτικό η κατάλληλη συγκέντρωση του H_2O_2 και προστίθονταν στις φλάσκες (εκτός από τη φλάσκα control) για 1 ώρα.

3.4 Προσδιορισμός επιπέδων ROS και GSH με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Η μέθοδος αυτή αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου και προσφέρει τη δυνατότητα πολυπαραμετρικής ανάλυσης.

Ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από το υδροδυναμικό σύστημα ροής ,το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Το υδροδυναμικό σύστημα αποτελείται από την κυψελίδα ροής από την οποία περνάει το κυτταρικό εναιώρημα το οποίο περιβάλλεται από ένα αδρανές ρυθμιστικό διάλυμα .Έτσι, επιτυγχάνεται η ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από ακτινοβολία laser, από φίλτρα που διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας, και φωτοπολλαπλασιαστές που συλλέγουν τα φωτεινά σήματα. . Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με το μέγεθος των κυττάρων και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητα (π.χ. αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες οι οποίες επιλέγονται ανάλογα με το είδος του κυτταρικού πληθυσμού και της παραμέτρου που εξετάζεται. Ο

συνδυασμός σκεδαζόμενου φωτός και φθορισμού συλλέγεται από τους φωτοανιχνευτές. Το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων περιλαμβάνει τη μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε δεδομένα, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου.



Εικόνα 12: Υδροδυναμική εστίαση δείγματος μέσα από τον θάλαμο ροής

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF.

3.4.1 Πειραματική διαδικασία

Με τη βοήθεια της θρυψίνης μεταφέρουμε τα κύτταρα σε falcon και φυγοκεντρούμε στα 300 g, για 10 min, στους 4°C, πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε PBS (1:1). Φυγοκεντρούμε στα 300 g, για 10 min, στους 4°C και πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε PBS (300 μl).

Για την χρωστική mercury orange (400 μM) παρασκευάστηκε ένα στοκ διάλυμα διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF (400 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευαζόταν πριν

από κάθε πείραμα. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150 μl PBS και επωάζεται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15 μl) και της χρωστικής DCF-DA (15 μl) στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250 μl PBS και φυγοκέντρηση στα 300 g, στους 40C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250 μl PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH.

3.5 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων χρησιμοποιούμε το αντιδραστήριο Bradford και γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης.

Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm.

3.5.1 Πειραματική διαδικασία

Το αντιδραστήριο Bradford βρίσκεται σε stock και είναι φωτοευαίσθητο οπότε καλύπτεται με αλουμινόχαρτο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε tube 1.5ml. Σε κάθε tube προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford και 20μl από το ελαιώρημα των κυττάρων. Επίσης υπήρχε δείγμα blank που περιείχε 1ml αντιδραστηρίου Bradford και 20μl PBS. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm. Στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε σύμφωνα με την καμπύλη αλβουμίνης.

3.6 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος και των ιστών, να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε ένα από τα συστατικά που έχουν αντιοξειδωτική δράση συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

3.6.1 Πειραματική διαδικασία

Σε erpendorfs προστίθενται 50 μl του κάθε δείγματος (εκτός από το τυφλό), 500 μl DPPH 0,1 mM (φωτοευαίσθητο-φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος), και 450 μl Phosphate buffer 10 mM με pH 7.4 στα δείγματα και 500 μl στο τυφλό. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 1 ώρα. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 20000g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση) και μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 520nm με πλαστική κυψελίδα.

3.6.2 Υπολογισμοί

Η % μείωση της απορρόφησης εκφράζεται ως :

$$\% \text{ Abs reduction} = (\text{Abs blank} - \text{Abs δείγμα}) / \text{Abs blank} \Phi 100$$

3.7 Προσδιορισμός επιπέδων TBARS

Η μαλονδιαλδεΐδη είναι προϊόν της διάσπασης των άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων που προκύπτουν από τα πολυακόρεστα

λιπαρά οξέα εξαιτίας του οξειδωτικού στρες. Μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της είναι μία φωτομετρική μέθοδος που μας βοηθά στον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

3.7.1 Πειραματική διαδικασία

Το κυτταρικό εναιώρημα αναμείχτηκε με 500 μl διαλύματος 35% TCA και 500 μl διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθεται 1 mL Na₂SO₄ – TBA (φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος) και ακολουθεί επώαση στους 95°C για 45 min στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon) μεταφέρονται στον πάγο όπου και αφήνονται για 5 min. Προστίθεται 1 mL TCA 70% και έπειτα από την ανάδευση γίνεται μεταφορά 1 mL σε erpendorfs και φυγοκέντρηση στα 11200g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 530 nm με γυάλινη κυψελίδα.

3.7.2 Υπολογισμοί

% Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / 0,156 X συντελεστή αραίωσης
Το 0.156 αναφέρεται στον μοριακό συντελεστή απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρεμένο με 10⁻⁶ προκειμένου να μετατρέψουμε τα mol/L σε μmol/L.

*Ο μοριακός συντελεστή απόσβεσης μιας ουσίας είναι η απορρόφηση της ουσίας σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο συντελεστής αραίωσης προκύπτει αν διαιρέσουμε τον τελικό όγκο με τον όγκο του πρωτεϊνικού εναιωρήματος που προστέθηκε.

3.8 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Η καρβονυλίωση οδηγεί σε μη αναστρέψιμες βλάβες και στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλυδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλυδραζονίου).

3.8.1 Πειραματική Διαδικασία

Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται ίσος όγκος 20% TCA (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του). Προστίθεται 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL-φωτοευαίσθητο -φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος) για τα δείγματα και 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C .Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 1 mL από το 10% TCA, και κατόπιν αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και στο ακολουθεί φυγοκέντρηση πάλι στα 15000 g για 5 min στους 4°C από την οποία το υπερκείμενο απορρίπτεται. Προστίθεται 1 mL από το μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), προκειμένου να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει, και στη συνέχεια μετά από vortex γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C από όπου απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3) .Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά στο τέλος της οποίας γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για

3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε κυψελίδα χαλαζία (Quartz) στα 375 nm.

3.8.2 Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.)

Absδείγματος- Abs blank/0.022 X συντελεστή αραίωσης/Συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$

Ο συντελεστής αραίωσης προκύπτει αν διαιρέσουμε τον τελικό όγκο με τον όγκο του πρωτεϊνικού εναιωρήματος που προσθέσαμε.

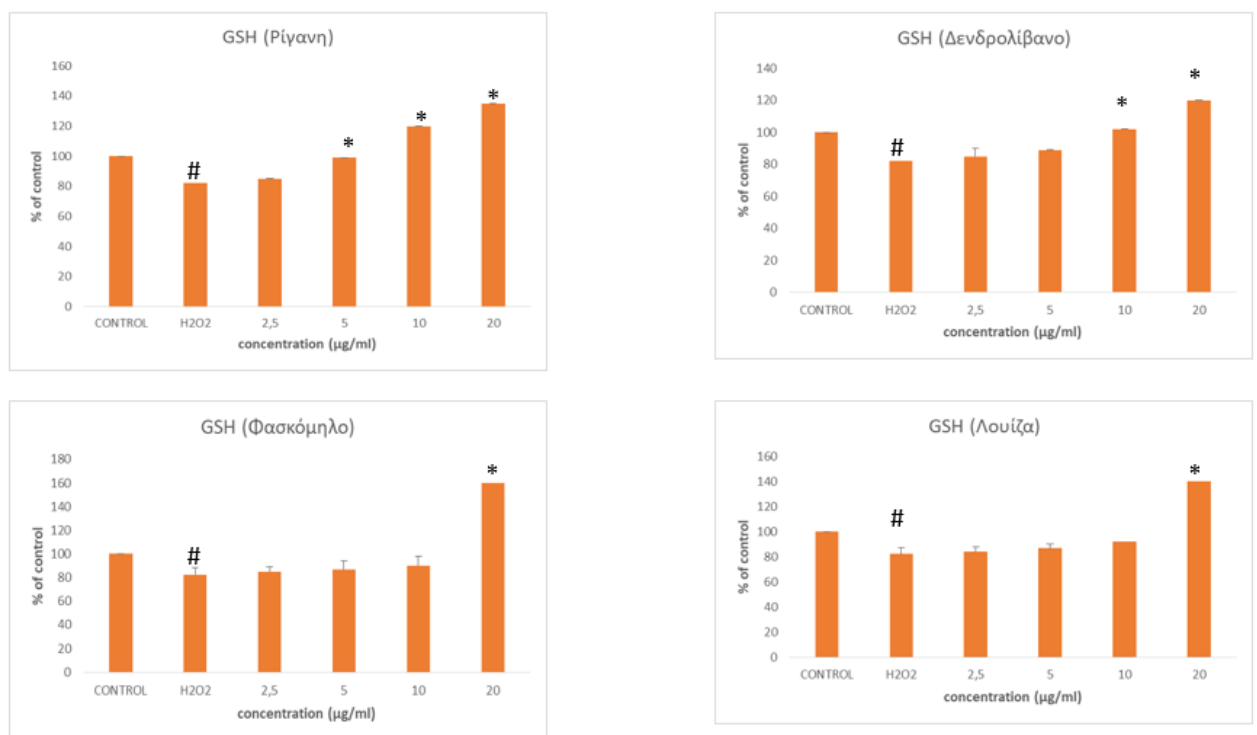
4 Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής

Με την κυτταρομετρία ροής μελετήθηκε η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων όσον αφορά τα επίπεδα των GSH και ROS.

Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής :

Για την GSH:

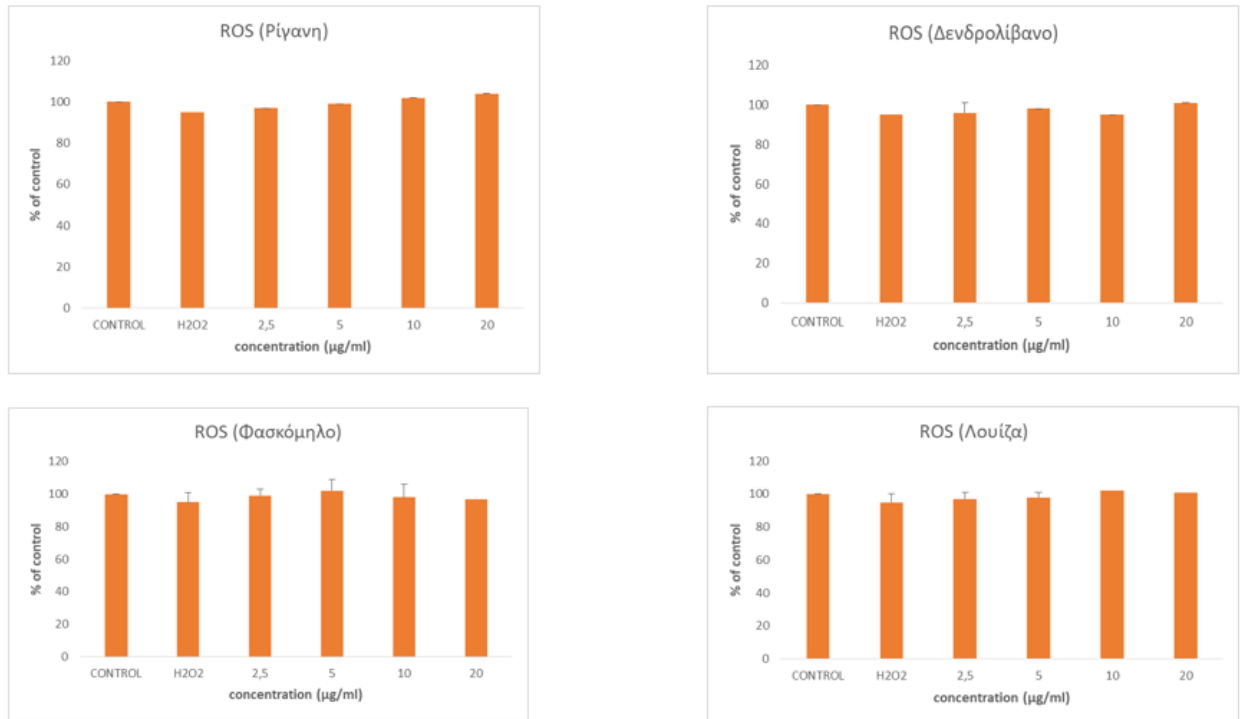


Εικόνα 13 : Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για την GSH

Παρατηρούμε στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης σε σύγκριση με το H₂O₂ όπου είχαμε πτώση της GSH κατά 17,7% σε σχέση με το control και για τα 4 βότανα αύξηση στη συγκέντρωση 20 µg /ml κατά 64%, 39.7%, 96.8% και 64% αντίστοιχα. Ενώ στην περίπτωση της ρίγανης αυτή η

αύξηση παρατηρείται και στις συγκεντρώσεις 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ κατά 19% και 45.8% αντίστοιχα και στο δενδρολίβανο στη συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ κατά 20%.

ROS:

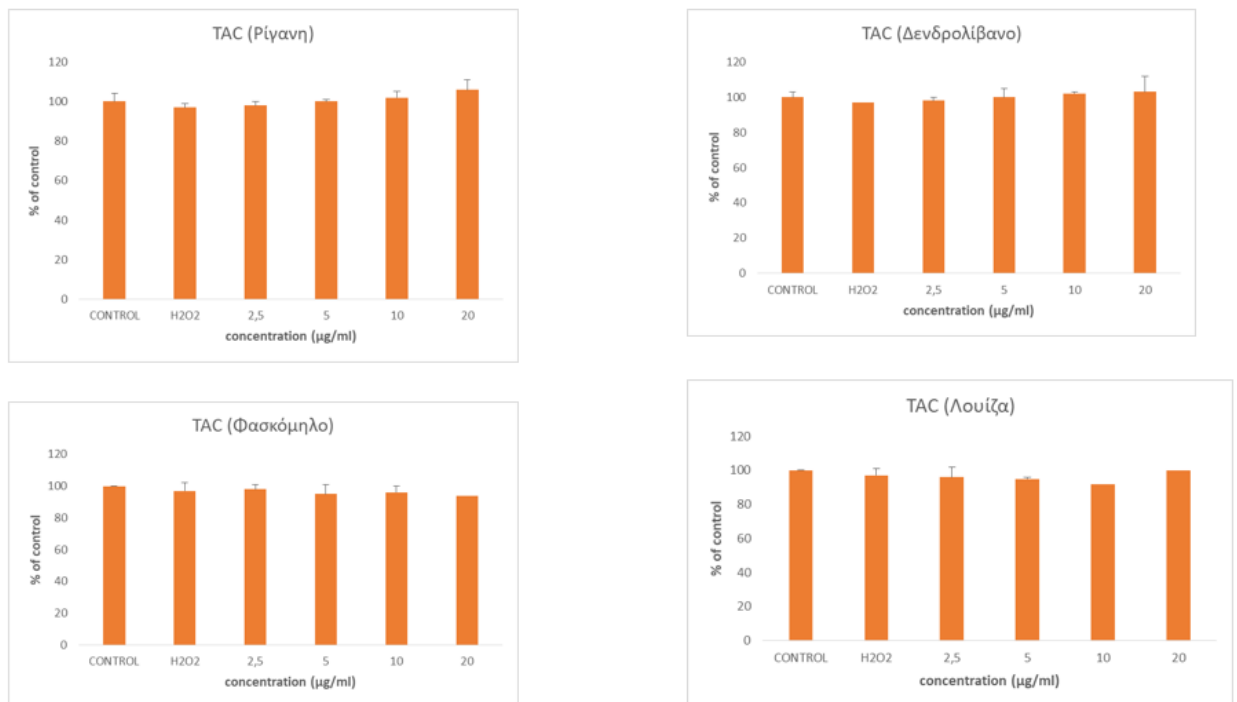


Εικόνα 14 : Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής για τα ROS

Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS δεν παρατηρήθηκε αλλαγή των ενδογενών επιπέδων μετά τη χορήγηση των 4 βοτάνων καθώς δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το control και τα αποτελέσματα του H₂O₂.

4.2 Αποτελέσματα της μεθόδου TAC

Ο προσδιορισμός της TAC έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (2,5, 5, 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες και μετά το πέρας των 24 ωρών ακολουθούσε προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 σε συγκέντρωση 0,95 $\mu\text{g/ml}$ για 1 ώρα.

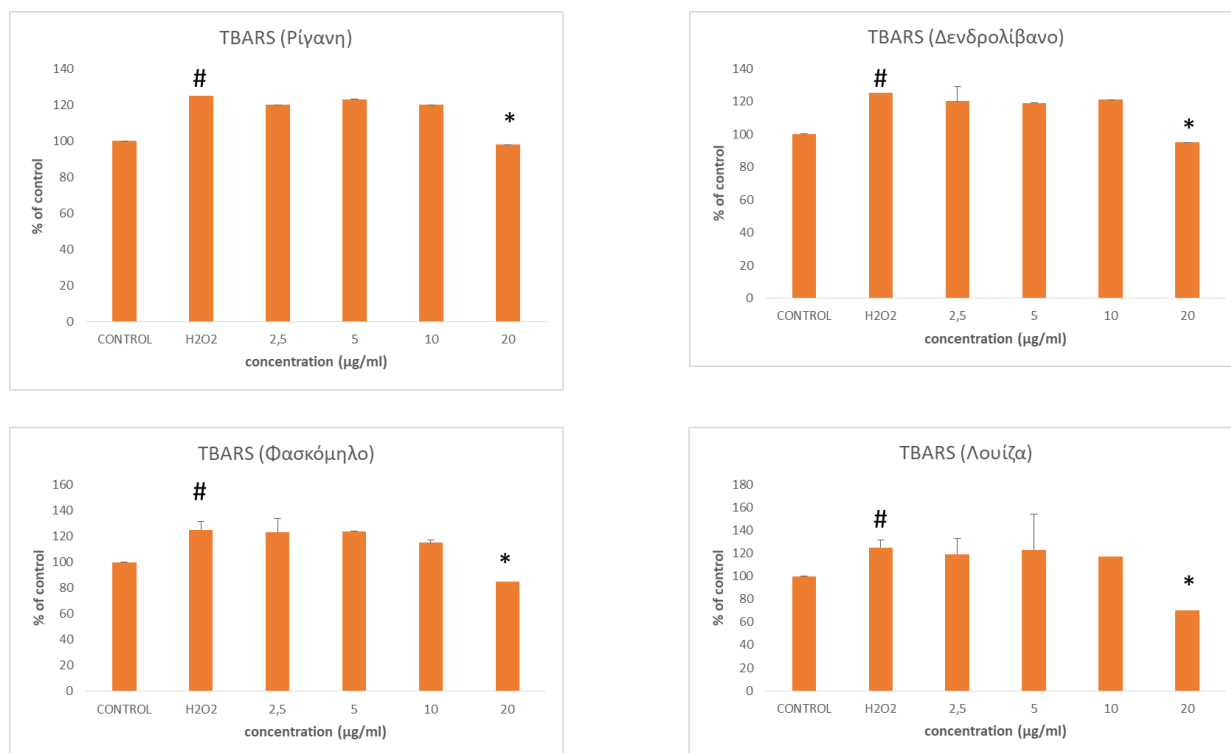


Εικόνα 15: Αποτελέσματα TAC

Τα αποτελέσματα της TAC δείχνουν πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τα control και την καλλιέργεια που είχε επωαστεί μόνο με το H_2O_2 .

4.3 Αποτελέσματα μεθόδου TBARS

Ο προσδιορισμός των TBARS έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (2,5 ,5 , 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες και μετά το πέρας των 24 ωρών ακολουθούσε προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 σε συγκέντρωση 0,95 $\mu\text{g/ml}$ για 1 ώρα.

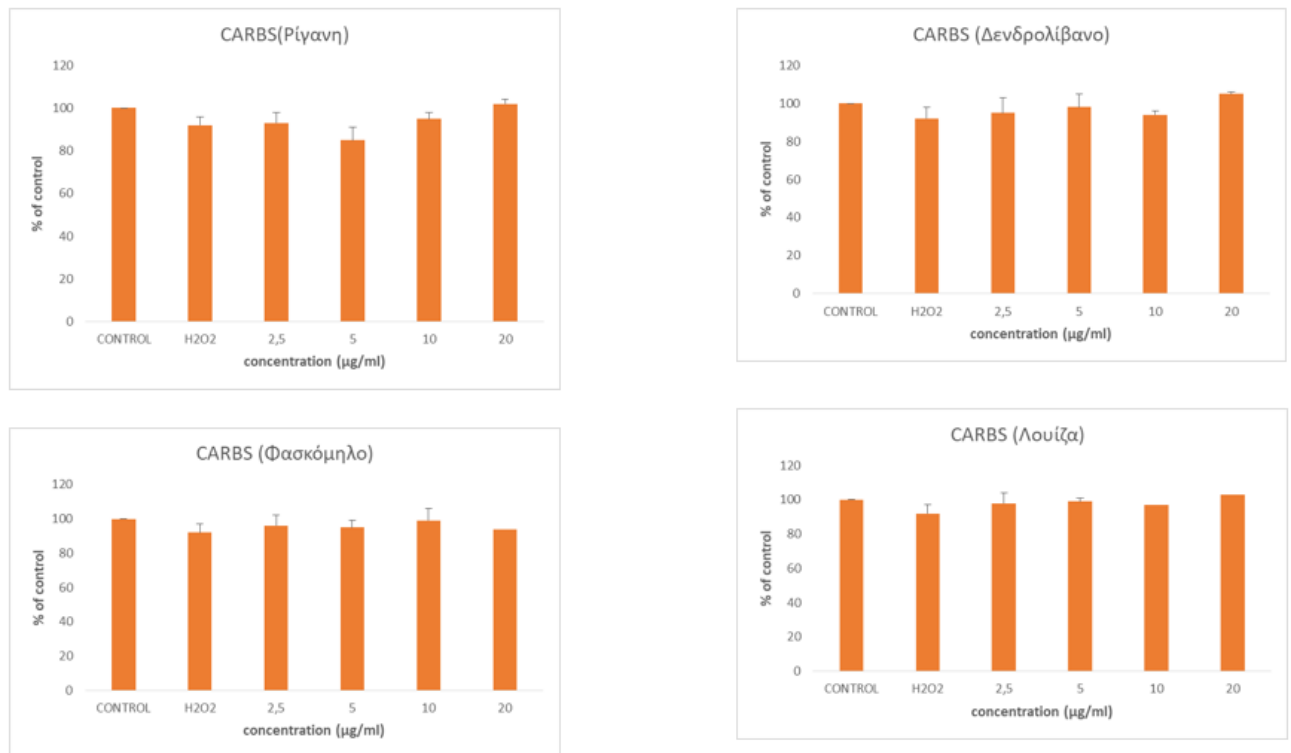


Εικόνα 16: Αποτελέσματα TBARS

Όσον αφορά τα TBARS παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση και για τα 4 βότανα στη συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$ κατά 21,6%, 24%, 32% και 44% αντίστοιχα σε σύγκριση με την καλλιέργεια που είχε επωαστεί μόνο με το H_2O_2 και τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν κατά 25%. Σχετικά με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά.

4.4 Αποτελέσματα πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων έγινε φασματοφωτομετρικά. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα εκχυλίσματα (2,5, 5, 10 και 20 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες και μετά το πέρας των 24 ωρών ακολούθησε προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 σε συγκέντρωση 0,95 $\mu\text{g/ml}$ για 1 ώρα.



Εικόνα 17: Αποτελέσματα καρβονυλίων

Τα αποτελέσματα της μεθόδου των καρβονυλίων δεν δείχνουν κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των βοτάνων, στα control και στα αποτελέσματα των καλλιεργειών που είχαν επωαστεί μόνο με τον οξειδωτικό παράγοντα.

5 Συζήτηση

Η Ελλάδα είναι μια χώρα που διαθέτει μεγάλη βιοποικιλότητα και φιλοξενεί πληθώρα φαρμακευτικών φυτών τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για την αντιμετώπιση ασθενειών, την εύρεση νέων φαρμάκων πιο οικονομικών και αποτελεσματικών. Τα φυτά μπορούν να συνθέσουν ενώσεις που καταπολεμούν το οξειδωτικό στρες και τις δυσμενείς επιδράσεις του. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται φυτοχημικές και για παράδειγμα μια κύρια κατηγορία αυτών είναι οι πολυφαινόλες που διαθέτουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Για το λόγο αυτό σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν η μελέτη φαρμακευτικών φυτών που καλλιεργούνται από διάφορους παραγωγούς στην περιοχή της Ηπείρου. Τα βότανα που μελετήθηκαν ήταν : το φασκόμηλο, το δενδρολίβανο, η λουίζα και η ρίγανη.

Στην παρούσα πτυχιακή επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της επίδρασης των τεσσάρων εκχυλισμάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 καθώς η μελέτη στα κύτταρα είναι πολύ σημαντική αφού αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* πειραμάτων. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η μελέτη έγινε μετά την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα με χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το H_2O_2 .

Εξετάστηκε η επίδραση αυτών στα επίπεδα των GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης σε σύγκριση με τα control και την καλλιέργεια που είχε επωαστεί μόνο με το H_2O_2 και για τα 4 βότανα στη συγκέντρωση 20 $\mu g / ml$. Ενώ στην περίπτωση της ρίγανης αυτή η αύξηση παρατηρείται και στις συγκεντρώσεις 5 και 10 $\mu g / ml$ και στο δενδρολίβανο στη συγκέντρωση 10 $\mu g / ml$. Αυτό δείχνει ότι τα βότανα οδήγησαν στην αύξηση της γλουταθειόνης παρά το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε δηλαδή επέδειξαν μια σημαντική αντιοξειδωτική δράση και κυρίως η ρίγανη και το δενδρολίβανο όπου οι δράση αυτή φάνηκε και σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις.

Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με το control και την καλλιέργεια στην οποία είχε προστεθεί

μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός δηλαδή, πως τα επίπεδα των ROS δεν επηρεάστηκαν από εξωτερικό οξειδωτικό παράγοντα.

Στην τελική φάση της μελέτης εξετάστηκε η επίδραση των βοτάνων στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Τα αποτελέσματα της TAC δείχνουν πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τα control και την καλλιέργεια που είχε επωαστεί μόνο με το H₂O₂. Άρα, δεν είναι ασφαλές να πούμε ότι τα βότανα παρά την πρόκληση οξειδωτικού στρες βοήθησαν στην αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ενώ όσον αφορά τα TBARS, στατιστικώς σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στην ανώτατη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και για τα 4 βότανα. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε και ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας καθώς αυξήθηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και πιθανώς αυτό οδήγησε και στην μείωση των λιπιδικών υπεροξειδίων όπως παρατηρείται από τα μειωμένα επίπεδα των TBARS. Η μειωμένη γλουταθειόνη (GSH) είναι γνωστό ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στο κυτταρικό οξειδωτικό αμυντικό σύστημα και είναι απαραίτητη για την πρόληψη της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες και το οξυγόνο. Η χημική δομή των πολυφαινολών τους δίνει τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Ο τύπος της ένωσης, ο βαθμός μεθοξυλίωσης και ο αριθμός των υδροξυλικών ομάδων είναι μερικές από τις παραμέτρους που καθορίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα δομικά χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με την αντιοξειδωτική δράση είναι: 1) ένα μόριο κατεχόλης στον Β-δακτύλιο, 2) η παρουσία ομάδων υδροξυλίου στη 3' και 5' θέση και 3) ο 2,3 διπλός δεσμός σε σύζευξη με μια καρβονυλική ομάδα στον C δακτύλιο (Bourne & Rice-Evans, 1998). Μπορούν να δρουν είτε απευθείας ως "εξουδετερωτές" των ελευθέρων ριζών ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου είτε να έχουν προσθετικό αποτέλεσμα στην ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Τα αποτελέσματα της μεθόδου των καρβονυλίων δεν δείχνουν κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των βοτάνων,

στα control και στα αποτελέσματα των καλλιεργειών που είχαν επωαστεί μόνο με τον οξειδωτικό παράγοντα άρα δεν μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα βότανα βοήθησαν στη μείωση των καρβονυλίων ,άρα ότι επέδειξαν αντιοξειδωτική δράση στη μέθοδο αυτή.

Μελλοντικά, θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό του εύρους της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτών και των φυτικών συστατικών καθώς ο κλάδος της μελέτης των φαρμακευτικών φυτών είναι πολλά υποσχόμενος και τα βότανα της Ηπείρου θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στους τομείς της κοσμητολογίας, της φαρμακοβιομηχανίας και της βιομηχανίας τροφίμων με αποτέλεσμα την οικονομική ανάπτυξη και αναβάθμιση της περιοχής. Για παράδειγμα όσον αφορά την φαρμακοβιομηχανία θα μπορούσαν να παραχθούν σκευάσματα βασισμένα στα βότανα τα οποία θα καταπολεμούν διάφορες ασθένειες αιτία των οποίων είναι το οξειδωτικό στρες και η βλάβη των βιομορίων σε κυτταρικό επίπεδο.

6 Βιβλιογραφία

1. E. Yiannakopoulou. (2009). Oxidative stress-antioxidand mechanisms: Clinical implications. *Archive of Hellenic Medicine* 26(1) : 23-35
2. Amitava Dasgupta, Kimberly Klein, (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, Prevention and Treatment of Disease*. Elsevier e-book
3. E Cadenas , K J Davies (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* Aug; 29(3-4):222-30.
4. Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1) 33-44
5. Kuppasamy P and Zweier JL (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264: 9880-9884.

6. X Y Li , P S Gilmour, K Donaldson, W MacNee (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax* Dec;51(12):1216-22
7. Subir Kumar Das , D M Vasudevan (2007) .Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* Jun 27;81(3):177-87
8. Stephen P Faux , Teresa Tai, David Thorne, Yong Xu, Damien Breheny, Marianna Gaca (2009) .The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers* Jul; 14 Suppl 1:90-6.
9. Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U (2000). Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 17: 687-693
10. Michael M Gaschler , Brent R Stockwell (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* .Jan 15; 482(3):419-425.
11. Evans Rice C., Burdon R., 1993. Free radical–lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 32, 71–110.
12. Levine RL and Stadtman ER (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol* 36: 1495-1502.
13. Earl R Stadtman (2006).Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* Dec;40(12):1250-8
14. Davis KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.
15. Chih-Chien Sung, Yu-Chuan Hsu, Chun-Chi Chen, Yuh-Feng Lin and Chia-Chao Wu .Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 301982.
16. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115. Journal Article, Review.
17. Wulf Dröge (2002).Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* Jan; 82(1):47-95.

18. Qiwu Zhong , Bin Wei , Sijia Wang , Songze Ke , Jianwei Chen , Huawei Zhang , Hong Wang (2019). The Antioxidant Activity of Polysaccharides Derived from Marine Organisms: An Overview. *Nov 29;17(12):674*
19. Halliwell B and Cross C E (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress, *Environmental Health Perspect*, 102(Suppl 10): 5–12.
20. Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27 (9–10), 922–935.
21. Anderson, M.E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 111112, 1–14.
22. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342.
23. Quideau, Stephane, Denis Deffieux, Celine Douat-Casassus, and Laurent Pouysegou. 2011. "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 50 (3). Germany: 586-621.
24. Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrient*. (2):1231-1246;
25. Sarada D Tetali (2019) .Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Jan;249(1):1-8*
26. Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves by Supercritical Fluid Extraction and Their Antioxidant and Antibacterial Activity (Miura et al., 2002 & Lee et al., 2005)
27. Erick P. Gutierrez Grijalva et al (2017). "Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits" *Plants* Dec 26;7(1):2.
28. Walsh, P. (2019). Rosemary. *J Prim Health Care*, 11(1): 82–83
29. Sies, H. 2014. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* 289(13) 8735-8741.
30. Kerasioti et al. (2019). "Polyphenolic Composition of *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* and *Pyrocantha coccinea* Extracts and Assessment of

Their Antioxidant Activity in Human Endothelial Cells” Antioxidants Apr;
8(4): 92.