



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

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



*Μυρτώ Χαρούλη του Ιωάννη*

**ΛΑΡΙΣΑ 2021**

*“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 και Βιοτεχνολογίας.

**Στάγκος Δημήτριος :** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

**Βεσκούκης Αριστείδης :** Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα πρωτίστως, να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση μίας ενδιαφέρουσας πτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Στάγκο Δημήτριο και τον κ. Βεσκούκη Αριστείδη που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη μου Μακρή Σωτηρία για την βοήθεια, το ενδιαφέρον και τις γνώσεις της, τόσο κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τη φιλική διάθεση και την προθυμία να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου.

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ήδη από τα αρχαία χρόνια, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη, η χρήση πληθώρας φυτών για θεραπευτικούς σκοπούς. Τέτοια φυτικά είδη περιέχουν διάφορα φυτοχημικά τα οποία προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες, με τις πολυφαινόλες να αποτελούν μία από τις κύριες κατηγορίες των συστατικών αυτών. Οι πολυφαινόλες έχουν διεγείρει το ενδιαφέρον των ερευνητών και μελετητών, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμεταλλαξιγόνων ιδιοτήτων που κατέχουν, ασκώντας την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω του τερματισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης που επάγεται από την οξείδωση των ελευθέρων ριζών. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου. Τα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, ήταν τα *Alkanna tinctoria* (*Αλκάννα η βαπτική*) (ρίζες), *Stachys cretica subsp. lesbiaca* (*Στάχος ο κρητικός*), *Anthyllis hermanniae* (*Ανθυλλίς η ερμάνειος-αλογοθύμαρο*) (ρίζες) και *Helichrysum stoechas* (*Αμαράντος*) (υπέργειο τμήμα). Αρχικά, προσδιορίστηκε ποσοτικά το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Πλουσιότερο φαινολικό περιεχόμενο εμφάνισε το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τους μέσω της μεθόδου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• και με τη ρίζα ABTS•<sup>+</sup>. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω των μεθόδων της αναγωγικής δύναμης, της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> καθώς και με τη ρίζα OH•. Τέλος, μέσω της επαγόμενης από τις ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, παρατηρήθηκε ότι και τα 4 εκχυλίσματα δύναται να προστατέψουν το DNA από βλάβες προκαλούμενες από τη ρίζα αυτή. Επίσης, όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική ικανότητα, εφόσον όλα ήταν ικανά να εξουδετερώσουν σε ένα βαθμό τις ρίζες. Στις 5 από τις 7 μεθόδους που εφαρμόστηκαν, δραστικότερο εκχύλισμα ήταν το *Helichrysum stoechas*. Μόνο στις μεθόδους αλληλεπίδρασης με τις ρίζες O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> και OH• μεγαλύτερη δραστικότητα εμφάνισε το εκχύλισμα *Alkanna Tinctoria* (ρίζες), ακολουθούμενο από το *Helichrysum Stoechas* (υπέργειο τμήμα). Τα εκχυλίσματα *Stachys Cretica subsp. Lesbiaca* και *Anthyllis Hermanniae* (ρίζες) ήταν τα λιγότερο δραστικά στο σύνολο των μεθόδων. Συμπερασματικά, τα φυτικά εκχυλίσματα του Βορείου Αιγαίου που μελετήθηκαν παρουσίασαν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση καθώς και υψηλή

περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις (πολυφαινολικό περιεχόμενο), η κατανάλωση των οποίων επωφελεί την ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα αυτά, μπορούν να αποτελέσουν πηγές φυσικών φαρμακευτικών προϊόντων. Επομένως, με επιπλέον μελέτες σαν και αυτή, αναφορικά με διάφορα φαρμακευτικά φυτά της Ελλάδας, θα είναι δυνατή η μείωση της βιομηχανικής παραγωγής των χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στα σύγχρονα φάρμακα.

## ABSTRACT

Since ancient times, the use of a multitude of plants for therapeutic purposes was particularly widespread. These plants contain various phytochemicals which confer beneficial properties, with polyphenols being a main category of these components. Polyphenols have stimulated the interest of researchers due to the antioxidant and antimutagenic properties they possess, exerting their antioxidant activity, by ending the chain reaction caused by the oxidation of free radicals. The purpose of this study was to determine the antioxidant and antimutagenic activity in extracts of medicinal plants in the North Aegean. The herbal extracts studied were *Alkanna tinctoria* (roots), *Stachys cretica* subsp. *lesbiaca*, *Anthyllis hermaniae* (roots) and *Helichrysum stoechas* (above-ground plant). Initially, the total polyphenolic content of the extracts was quantified by using the Folin-Ciocalteu method. Richer in polyphenolic content was the extract *Helichrysum stoechas* (above-ground plant). The antioxidant capacity was then assessed through the method of interaction with the DPPH• and ABTS •<sup>+</sup> radicals. In addition, an assessment of the antioxidant activity of the extracts was carried out through the methods of reducing power, of interaction with the O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> radical as well as with the OH• radical. Finally, through the radical-induced (ROO•) fragments in plasmid DNA method, it was observed that all 4 extracts can protect the DNA against damage caused by this radical. Also, all the extracts showed antioxidant activity, since all of them were capable of neutralizing the radicals, to a certain extent. Of the 7 methods used, in 5 of those the most active extract was *Helichrysum stoechas* (above-ground plant). Only in the methods of interaction with the O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> and OH radicals the *Alkanna tinctoria* (roots) extract exerted the highest antioxidant activity, followed by *Helichrysum stoechas* (above-ground plant). *Stachys cretica* subsp. *lesbiaca* and *Anthyllis hermaniae* (roots) extracts were the least active in all of the methods. In conclusion, North Aegean's plant extracts studied, showed antioxidants and antimutagenic activity, as well as a high content of bioactive compounds (polyphenolic content), the consumption of which benefits human health. Hence, these extracts can be sources of natural medicinal products. Therefore, with additional studies like this, regarding various medicinal plants in Greece, it will be possible to reduce the industrial production of chemical compounds used in modern medicines.

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| <i>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</i> .....   | 2  |
| <i>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</i> .....   | 3  |
| <i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i> .....  | 4  |
| <i>ABSTRACT</i> .....  | 6  |
| <i>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</i> .....   | 7  |
| <i>ΠΙΝΑΚΕΣ</i> .....   | 11 |
| <b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....  | 13 |
| <i>1.1 Τα φαρμακευτικά φυτά Βορείου Αιγαίου</i> .....  | 13 |
| <i>1.2 Οι ελεύθερες ρίζες</i> .....  | 17 |
| <i>1.3 Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών</i> .....  | 20 |
| <i>1.4 Η βιολογική δράση δραστηκών μορφών οξυγόνου</i> .....   | 23 |
| <i>1.4.1 Θετικές επιδράσεις</i> .....  | 23 |
| <i>1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις</i> .....  | 24 |
| <i>1.5 Το οξειδωτικό στρες</i> .....   | 27 |
| <i>1.6 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες</i> .....  | 28 |
| <i>1.7 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί</i> .....  | 31 |
| <i>1.8 Φυτικές Πολυφαινόλες</i> .....  | 33 |
| <b>2 ΣΚΟΠΟΣ</b> .....  | 36 |
| <b>3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....   | 37 |
| <i>3.1 Φυτικά εκχυλίσματα</i> .....  | 37 |
| <i>3.2 Μέθοδοι</i> .....   | 38 |
| <i>3.2.1. Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu</i> ..... | 38 |



|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• .....   | 39        |
| 3.2.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS• <sup>+</sup> .....   | 41        |
| 3.2.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητάς τους να ανάγουν τον τρισθενή σίδητο σε δισθενή (αναγωγική ισχύς). ..... | 43        |
| 3.2.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....                             | 45        |
| 3.2.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•.....   | 48        |
| 3.2.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου ( ROO• ) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....   | 50        |
| <b>4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>  | <b>52</b> |
| <i>4.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.....</i>                           | <i>52</i> |
| <i>4.2 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• .....</i>                                  | <i>53</i> |
| <i>4.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•<sup>+</sup> .....</i>                                 | <i>54</i> |
| <i>4.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής δύναμης .....</i>  | <i>56</i> |
| <i>4.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O<sub>2</sub><sup>-</sup>.....</i>                           | <i>58</i> |
| <i>4.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH• .....</i>   | <i>60</i> |
| <i>4.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA .....</i>   | <i>62</i> |
| <b>5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>73</b> |

## Εικόνες

|   |    |
|---|----|
| <i>Εικόνα 1. Alkanna tinctoria</i> .....  | 14 |
| <i>Εικόνα 2. Stachys cretica</i> .....  | 15 |
| <i>Εικόνα 3. Anthyllis hermanniae</i> .....   | 15 |
| <i>Εικόνα 4. Hellichrysum stoechas</i> .....  | 16 |
| <i>Εικόνα 5. Παράδειγμα ενός σταθερού μορίου (όλα τα ηλεκτρόνια μέσα στο τροχιακό σε ζεύγη) και μια ελεύθερη ρίζα (τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό) (Evans &amp; Omaye, 2017)</i> ..... | 17 |
| <i>Εικόνα 6. Ηλεκτρονιακές δομές των πιο κοινών ελεύθερων ειδών οξυγόνου. Η• υποδεικνύει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο</i> .....  | 18 |
| <i>Εικόνα 7. Σχηματική παρουσίαση εξωγενών και ενδογενών πηγών δραστικών ειδών οξυγόνου. (Sharifi-Rad et al., 2020)</i> .....   | 20 |
| <i>Εικόνα 8. Παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας.(Li et al., 2013)</i> ....  | 21 |
| <i>Εικόνα 9. Ενδοκυτταρικές πηγές ROS.(Di Meo et al., 2016)</i> .....   | 22 |
| <i>Εικόνα 10. Θετικές επιδράσεις των ROS/RNS.(Sies et al., 2017)</i> .....  | 24 |
| <i>Εικόνα 11. Επίδραση των ROS/RNS στα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια)(Singh et al., 2019).</i> .....  | 24 |
| <i>Εικόνα 12. Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου (OH•) με τη γουανίνη. (M. Valko et al., 2006)</i> .....  | 25 |
| <i>Εικόνα 13. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της λιπιδικής υπεροξειδωσής (Wang et al., 2017)</i> .....   | 27 |
| <i>Εικόνα 14. Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS/RNS (Kawamura &amp; Muraoka, 2018)</i> .....  | 28 |
| <i>Εικόνα 15. Ελεύθερες ρίζες και ασθένειες. (Phaniendra et al., 2015)</i> .....  | 29 |
| <i>Εικόνα 16. Σύνδεση μεταξύ οξειδωτικού στρες και καρκινογένεσης. (Chikara et al., 2018)</i> .....   | 30 |
| <i>Εικόνα 17. Δράση αντιοξειδωτικού.(Jamshidi-kia et al., 2020)</i> .....   | 31 |
| <i>Εικόνα 18. Βασική δομή φλαβονοειδών.(Fraga et al., 2019)</i> .....   | 34 |
| <i>Εικόνα 19. Μεθοδος Folin- Ciocalteu.(Bibi Sadeer et al., 2020)</i> .....   | 38 |
| <i>Εικόνα 20. Αναγωγή της ρίζας DPPH• σε DPPH-H και μεταβολή του χρώματος της.(Becker et al., 2019)</i> .....   | 40 |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Εικόνα 21. Παραγωγή της ρίζας του ABTS<sup>•+</sup> μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Johannes et al., 2006).....</i>   | <b>42</b> |
| <i>Εικόνα 22. Αντίδραση αναγωγής της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> σε ABTS και αποχρωματισμός της. (Boligon, 2014) .....</i>  | <b>42</b> |
| <i>Εικόνα 23. Αναγωγή του σιδήρου και αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.(Bibi Sadeer et al., 2020).....</i>   | <b>44</b> |
| <i>Εικόνα 24. Η μετατροπή του NBT σε φορμαζάνη μέσα από το σύστημα PMS-NADH. (Santos &amp; Silva, 2020).....</i>  | <b>46</b> |
| <i>Εικόνα 25. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH<sup>•</sup>. (Tremel &amp; Šmejkal, 2016) .....</i>  | <b>48</b> |
| <i>Εικόνα 26. Η % αναστολή της ρίζας DPPH<sup>•</sup> από τα εκχυλίσματα A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i>(ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i>(υπέργειο τμήμα). .....</i>             | <b>53</b> |
| <i>Εικόνα 27. Η % αναστολή της ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από τα εκχυλίσματα A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i> (ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i>(υπέργειο τμήμα).....</i>             | <b>55</b> |
| <i>Εικόνα 28. Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i> (ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i> (υπέργειο τμήμα).....</i>                                    | <b>57</b> |
| <i>Εικόνα 29. Η % αναστολή της ρίζας O<sub>2</sub><sup>•-</sup> από τα εκχυλίσματα A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>Lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i> (ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i> (υπέργειο τμήμα). .....</i> | <b>59</b> |
| <i>Εικόνα 30. Η % αναστολή της ρίζας OH<sup>•</sup> από τα εκχυλίσματα A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i> (ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i> (υπέργειο τμήμα). .....</i>             | <b>61</b> |
| <i>Εικόνα 31. Η% αναστολή της ρίζας ROO<sup>•</sup> από τα εκχυλίσματα A) <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες), B) <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i>), C) <i>Anthyllis hermanniae</i>(ρίζες) D) <i>Helichrysum stoechas</i>(υπέργειο τμήμα). .....</i>               | <b>63</b> |

## Πίνακες

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου. ....</i>   | <i>19</i> |
| <i>Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου. Δραστικές Μορφές Αζώτου.....</i>   | <i>19</i> |
| <i>Πίνακας 3. Μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου. Μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου .....</i>  | <i>19</i> |
| <i>Πίνακας 4. Εκχυλίσματα Περιφέρειας Βορείου Αιγαίου. ....</i>   | <i>37</i> |
| <i>Πίνακας 5. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>   | <i>39</i> |
| <i>Πίνακας 6. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>   | <i>40</i> |
| <i>Πίνακας 7. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>   | <i>43</i> |
| <i>Πίνακας 8. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>   | <i>45</i> |
| <i>Πίνακας 9. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>   | <i>47</i> |
| <i>Πίνακας 10. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>  | <i>49</i> |
| <i>Πίνακας 11. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....</i>  | <i>51</i> |
| <i>Πίνακας 12. Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Πίνακας 13. Συνολικός πίνακας αποτελεσμάτων.....</i>   | <i>65</i> |

## Διαγράμματα

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Διάγραμμα 1. Η % αναστολή της ρίζας DPPH• συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση.....</i>           | <i>54</i> |
| <i>Διάγραμμα 2. Η % αναστολή της ρίζας ABTS•+ συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση.....</i>          | <i>56</i> |
| <i>Διάγραμμα 3. Η αναγωγική δύναμη συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. ....</i>                    | <i>58</i> |
| <i>Διάγραμμα 4. Η % αναστολή της ρίζας O<sub>2</sub>•- συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση.....</i> | <i>60</i> |
| <i>Διάγραμμα 5. Η % αναστολή της ρίζας OH• συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση.....</i>             | <i>62</i> |
| <i>Διάγραμμα 6. Η % αναστολή της ρίζας ROO• συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση.....</i>            | <i>64</i> |

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Τα φαρμακευτικά φυτά Βορείου Αιγαίου

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί από πολυάριθμους πολιτισμούς, όχι μόνο στη διατροφή αλλά και για την αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας από την αρχαιότητα έως και σήμερα. Ήδη από το 2800 π.Χ., τα βότανα και τα καρυκεία χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικούς σκοπούς κυρίως εμπειρικά (Ritchie, 2007). Φαρμακευτικό καλείται ένα φυτό, το οποίο περιέχει ένα ή και περισσότερα δραστικά συστατικά με την ικανότητα να προλαμβάνουν ασθένειες ή να ανακουφίζουν από τα συμπτώματά τους (Srivastava et al., 1996). Έχει αποδειχθεί πλέον ότι τα ωφέλιμα αποτελέσματα που έχει η χρήση αυτών των φυτικών προϊόντων οφείλονται στα χημικά συστατικά που περιέχουν, τα οποία είναι γνωστά ως *φυτοχημικά*. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με τα φαρμακευτικά φυτά και τις πολλαπλές χρήσεις τους (Pant, 2014). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πληρέστερη γνώση αναφορικά με τις ιδιότητες και τα συστατικά τους, που τα καθιστούν τόσο ωφέλιμα για την υγεία μας (Visioli Francesco et al., 2000). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει, ότι πολλά συστατικά που εμπεριέχονται τόσο στα φρούτα όσο και στα λαχανικά δύναται να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα, από βλάβες που μπορεί να προκληθούν λόγω αυξημένων δραστικών μορφών οξυγόνου. Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση φυσικών αντιοξειδωτικών είναι πιθανώς ωφέλιμη για την υγεία και γι' αυτό υπήρξε σημαντικό ενδιαφέρον για εύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών από φυτικά υλικά. Τα φυτικά αντιοξειδωτικά (αιθέρια έλαια, φλαβονοειδή, πολυφαινόλες, κ.α.) δύναται να αναστείλουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται λόγω υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών, λειτουργώντας ως δότες κατιόντων στις ελεύθερες ρίζες (A et al., 1998). Επιπλέον, η χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών έχει αμφισβητηθεί, εξαιτίας της τοξικότητάς που προκαλείται από αυτά (Ozer et al., 2010). Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, αποτελούν σημαντικό μέρος της ελληνικής χλωρίδας, διότι οι εδαφικές και κλιματικές συνθήκες ευνοούν την καλλιέργειά τους, αποδίδοντας εξαιρετικής ποιότητας προϊόντα. (Πιάδου et al., 2014) Τα ελληνικά νησιά του Βορείου Αιγαίου (Λήμνος, Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ικαρία, Ψαρά, Άγιος Ευστράτιος, Φούρνοι, Οινούσες) είναι νησιά στα οποία καλλιεργείται πληθώρα φαρμακευτικών φυτών. Οι κάτοικοι των νησιών παρά την πρόσβαση τους σε σύγχρονα φάρμακα, συνεχίζουν να χρησιμοποιούν φαρμακευτικά φυτά για την καταπολέμηση

πολλών ασθενειών, εξαιτίας του χαμηλού τους κόστους και της βιολογικής τους προέλευσης (Axiotis et al., 2018). Ορισμένα από αυτά τα φυτά είναι τα *Alkanna tinctoria*, *Stachys cretica* subsp. *lesbiaca*, *Anthyllis hermanniae* και *Helichrysum stoechas*.

Η ρίζα ***Alkanna tinctoria*** ή Αλκάνα ανήκει στην οικογένεια των Βοραγινιδών (*Boraginaceae*) και προέρχεται από ένα φυτό γνωστό από την αρχαιότητα. Πρόκειται για μία διετή ή πολυετή πόα, ύψους έως 50 εκατοστών, με επιμήκη φύλλα, ιωδοκυαννά ερμαφρόδιτα άνθη και μεγάλη ρίζα, από τον φλοιό της οποίας παράγεται μία κόκκινη βαφή (Zs et al., 2001). Η ανθοφορία και συγκομιδή του φυτού, γίνονται τον Ιούνιο, ενώ τα άνθη του ξεχωρίζουν για το ιδιαίτερο μπλε-μωβ χρώμα τους και η ρίζα για το βαθύ κόκκινο (Salimikia et al., 2015). Από την ρίζα παράγεται μία ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως ως φυσική χρωστική σε καλλυντικά (ρουζ, κραγιόν, αλοιφές, κρέμες, σαπούνια, βερνίκια) και κρασιά, αλλά και για τη βαφή ξύλου, πέτρας κ.τ.λ. Ο αρχαίος βοτανολόγος Θεόφραστος, αργότερα ο Διοσκουρίδης, αλλά και ο Ιπποκράτης, περιγράφουν τις ιδιότητες του φυτού και προτείνουν συνταγές για τη χρήση του. Οι δραστικές του ουσίες, λαμβάνονται από την ρίζα του φυτού και είναι διαλυτές σε έλαια και αλκοόλ. Το φυτό εμφανίζει αντιμικροβιακές (κατά του *Staphylococcus aureus* και του *Staphylococcus epidermidis*), αντιφλεγμονώδεις, και επουλωτικές ιδιότητες. Συνιστάται για τη θεραπεία των γαστρικών ελκών, των αιμορροΐδων, του βήχα και της βρογχικής καταρροής. Εφαρμόζεται εξωτερικά στο δέρμα για την αντιμετώπιση διαφόρων δερματικών παθήσεων, των κισμών, των πληγών, του κνησμού, των εξανθημάτων, των τραυμάτων και των εγκαυμάτων (A. Assimopoulou et al., 2004; Ozer et al., 2010; Semerdjieva et al., 2020) (εικόνα 1).



*Εικόνα 1. Alkanna tinctoria*

Το **Stachys Cretica** ή αλλιώς στάχυς ο κρητικός, είναι ένα πολυετές φαρμακευτικό φυτό που αναπτύσσεται και ανθίζει την άνοιξη. Το ύψος του φτάνει έως και τα πενήντα εκατοστά. Ευδοκιμεί γενικά σε άγονες πλαγιές και φρυγανότοπους (Bahadori & Kirkan, 2019) (εικόνα 2).



*Εικόνα 2. Stachys cretica*

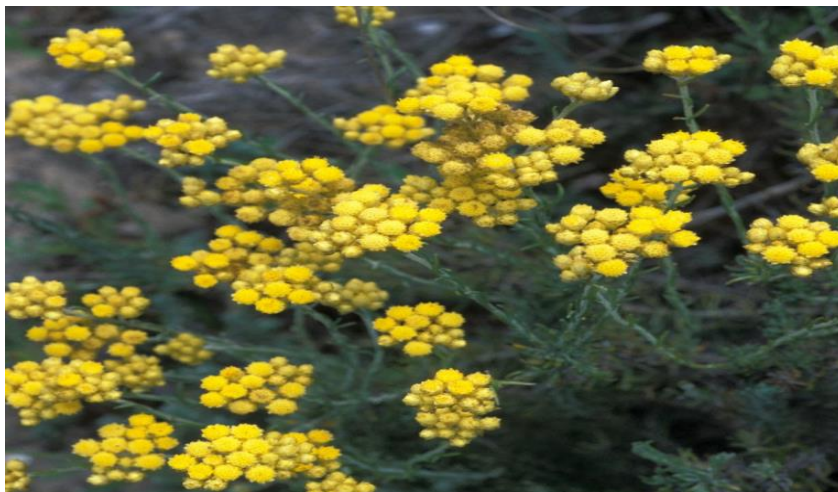
Το **Anthyllis hermanniae** είναι ένας χαμηλός πολυετής θάμνος που εξαπλώνεται σε αρκετά είδη οικοτόπων. Φύεται σε φρυγανότοπους, σε πετρώδεις τοποθεσίες, και δεν είναι αγκαθωτός. Τα πολύ μικρά φύλλα του έχουν χνούδι στην κάτω επιφάνεια, για τη μείωση της διαπνοής. Τα κίτρινα άνθη του εμφανίζονται τον Απρίλιο και τον Μάιο (Giusso del Galdo, 2009). Άλλες ονομασίες του φυτού κατά τόπους είναι, αλογοθύμαρο, σμυρνιά ή ασμυριά. Ο θάμνος αυτός παρουσιάζει σταθερότητα στην ανάπτυξη, ειδικά σε παραθαλάσσιες περιοχές. Τα άνθη του προτιμώνται από πλήθος εντόμων, μέλισσες και πεταλούδες, με συνέπεια την εύκολη γονιμοποίηση και τη μεταφορά της γύρης από τα αρσενικά στα θηλυκά λουλούδια (Yin Yang et al., 2014) (εικόνα 3).



*Εικόνα 3. Anthyllis hermanniae*



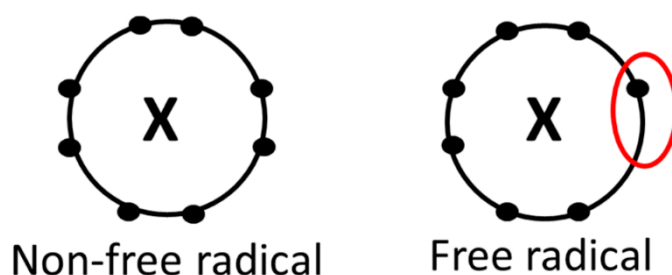
Τέλος, ο αμάραντος ή Μάης με επιστημονική ονομασία **Helichrysum stoechas** – Ελίχρυσος ο πολύτιμος είναι αγριολούλουδο της ελληνικής υπαίθρου. Ανήκει στην οικογένεια των Αστεροειδών (Asteraceae). Στεφάνια από ελίχρυσο πρόσφεραν οι αρχαίοι Έλληνες στους αθάνατους θεούς. Ο Θεόφραστος το ονόμασε χρυσάνθεμο και ελίχρυσο και το εκτιμούσε ιδιαίτερα, για την καταπραϋντική επίδραση που είχε στο θυμικό του ανθρώπου. Η ανθοφορία και συγκομιδή γίνονται στις αρχές της άνοιξης (Ríos et al., 1991). Ο αρωματικός ημίθαμος, φύεται σε ακαλλιέργητους τόπους τόσο σε ηπειρωτικά όσο και σε παραθαλάσσια μέρη. Τα άνθη του είναι μικρά κίτρινα και ο βλαστός του λεπτός (Carini et al., 2001). Όταν ξεραθεί, το φυτό κρατάει το σχήμα του και οι κορυφές των λουλουδιών το κίτρινο χρώμα τους – για αυτό και φημολογούνται ως «αθάνατα» ή «αμάραντα». Οι ανθοί του διακοσμούν ανθοδέσμες και στεφάνια, αλλά τους μαζεύουν ακόμη και για γούρι, καθώς πιστεύεται ότι φέρνουν τύχη. Όλα τα μέρη του φυτού περιέχουν δραστικές ουσίες, κάποιες από τις οποίες είναι αιθέρια έλαια, τερπένια, φλαβονοειδή, κ.α. Οι βλαστοί και τα άνθη του φυτού εμφανίζουν εφιδρωτικές και καθαρτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος. Το αιθέριο έλαιο του φυτού έχει επουλωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Συνιστάται για τη θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων (έγκωμα, ακμή, έρπης, πληγές). Έχει αποδειχθεί επίσης, η έντονη αντιοξειδωτική και καρκινοκατασταλτική δράση του φυτού, εξαιτίας των περιεχόμενων σε αυτό, φαινολικών ενώσεων (Eroğlu et al., 2009; Haddouchi et al., 2014) (εικόνα 4).



*Εικόνα 4. Helichrysum stoechas*

## 1.2 Οι ελεύθερες ρίζες

Τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου περιστρέφονται σε τροχιακά γύρω από τον πυρήνα του ατόμου. Ένα ατομικό τροχιακό, δύναται να περιέχει το μέγιστο δύο ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά, βρίσκονται σε ζεύγη στα τροχιακά και κάθε ζεύγος έχει αντιπαράλληλη στροφορμή (spin). Εάν σε ένα τροχιακό υπάρχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο τότε αυτό καλείται ασύζευκτο (Yiannakopoulou, 2009). Το ηλεκτρόνιο αυτό ασκεί μεγάλη έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων, προκαλώντας χημικές αντιδράσεις μεταξύ ατόμων ή μορίων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (redox). Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε πρόσληψη ηλεκτρονίων από ένα άτομο. Ένα άτομο ή μόριο, με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Phaniendra et al., 2015) (εικόνα 5).

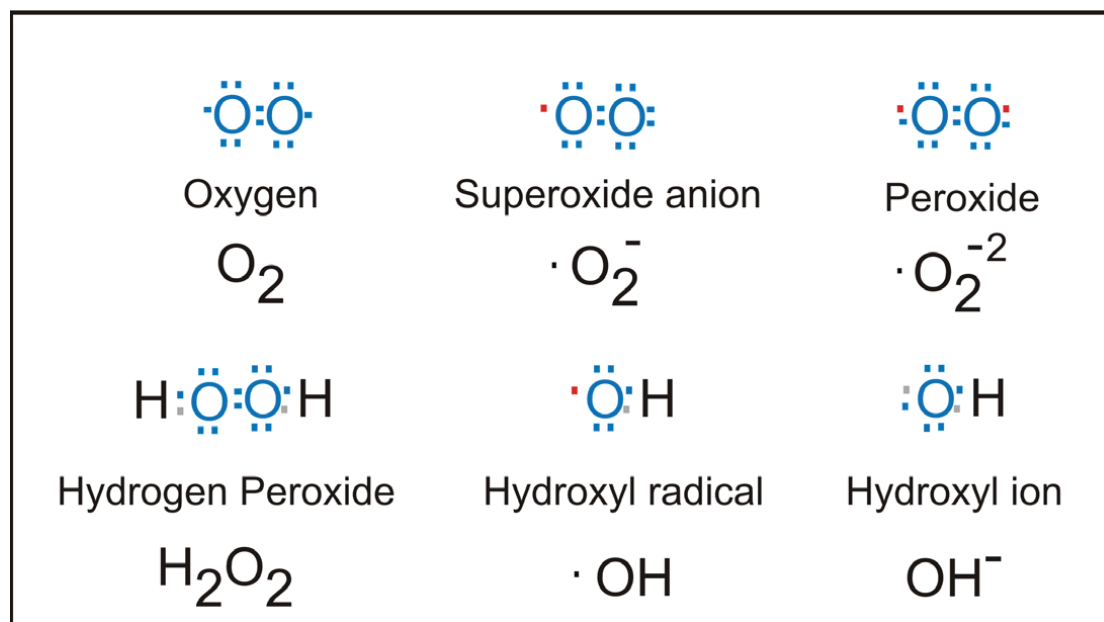


*Εικόνα 5. Παράδειγμα ενός σταθερού μορίου (όλα τα ηλεκτρόνια μέσα στο τροχιακό σε ζεύγη) και μια ελεύθερη ρίζα (τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό) (Evans & Omaye, 2017)*

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν, είτε με προσθήκη, είτε με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Έναν ακόμη τρόπο σχηματισμού ελεύθερων ριζών αποτελεί και η ομολυτική διάσπαση, δηλαδή η διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού μίας χημικής ένωσης, όπου μετά τη διάσπαση, ένα ηλεκτρόνιο από το κοινό ζεύγος παραμένει σε κάθε άτομο (Barry Halliwell & Gutteridge, n.d.-a). Εξαιτίας της παρουσίας του ασύζευκτου ηλεκτρονίου οι ρίζες αντιδρούν εύκολα με τα γειτονικά τους μόρια, δίνοντας ή λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από αυτά, με συνέπεια την έναρξη αλυσιδωτών

αντιδράσεων, οι οποίες συνεχίζονται μέχρι την παραγωγή ενός μη δραστικού προϊόντος (Jamshidi-kia et al., 2020).

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο, το άζωτο ή τον άνθρακα. Τα μόρια που έχουν το οξυγόνο ως κεντρικό άτομο, ονομάζονται *δραστικές μορφές οξυγόνου* (Reactive Oxygen Species, ROS). Ομοίως, αυτά με κεντρικό άτομο το άζωτο, ονομάζονται *δραστικές μορφές αζώτου* (Reactive nitrogen species, RNS)(Fang et al., 2002). Το ατομικό υδρογόνο θεωρείται η πιο απλή ρίζα, γιατί διαθέτει μόνο ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Aruoma, 1998). Οι όροι ενεργές μορφές αζώτου και ενεργές μορφές οξυγόνου, δεν περιλαμβάνουν μόνο τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και μόρια που δεν είναι ρίζες, όμως έχουν την ικανότητα να μετατραπούν εύκολα σε ρίζες -π.χ. H<sub>2</sub>O (Fang et al., 2002). Παραδείγματα των ROS, είναι η ρίζα του υδροξυλίου, του αλκοξυλίου, του σουπεροξειδίου, του περοξυλίου και του υδροπεροξυλίου, το όζον (πίνακας 1) (εικόνα 6) καθώς και τα μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι ρίζες θείου και τριχλωρομεθυλίου και τα υποχλωριώδη οξέα (πίνακας 3), ενώ των RNS είναι το μονοξειδίο, το διοξειδίο του αζώτου και τα νιτρικά υπεροξειδία (πίνακας 2) (Cheeseman & Slater, 1993; Dröge, 2002; Lobo et al., 2010).



Εικόνα 6. Ηλεκτρονιακές δομές των πιο κοινών ελεύθερων ειδών οξυγόνου. Η• υποδεικνύει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου.

| Δραστικές μορφές Οξυγόνου  | Σύμβολα                           |
|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Ρίζα Υδροξυλίου</b>     | <b>OH•</b>                        |
| <b>Ρίζα αλκοξυλίου</b>     | <b>RO•</b>                        |
| <b>Ρίζα σουπεροξειδίου</b> | <b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b> |
| <b>Ρίζα περοξυλίου</b>     | <b>ROO•</b>                       |
| <b>Ρίζα υδροπεροξυλίου</b> | <b>HO<sub>2</sub>•</b>            |
| <b>Όζον</b>                | <b>O<sub>3</sub></b>              |

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου.

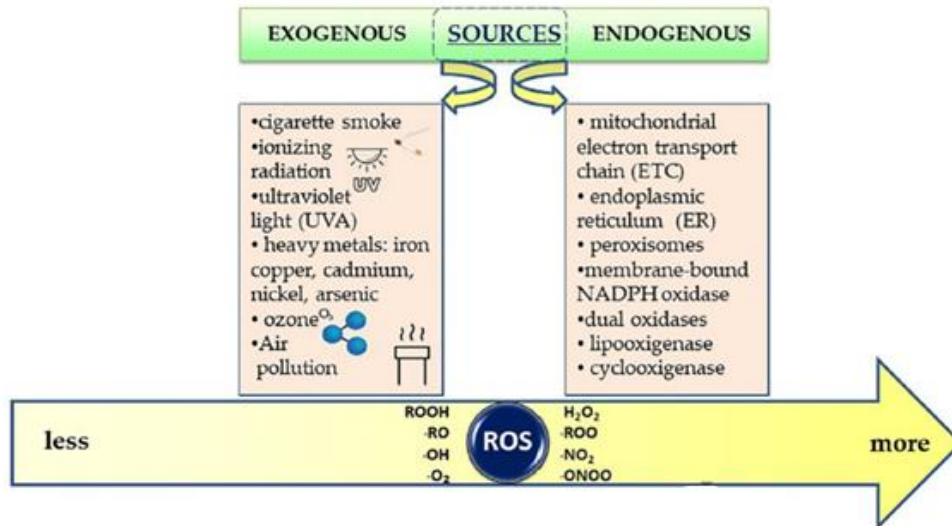
| Δραστικές Μορφές Αζώτου      | Σύμβολα                 |
|------------------------------|-------------------------|
| <b>Μονοξειδίο του Αζώτου</b> | <b>NO•</b>              |
| <b>Διοξειδίο του Αζώτου</b>  | <b>NO<sub>2</sub></b>   |
| <b>Νιτρικό Υπεροξείδιο</b>   | <b>ONOO<sup>-</sup></b> |

Πίνακας 3. Μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου.

| Μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου      | Σύμβολα                           |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Υπεροξείδιο του υδρογόνου</b> | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> |
| <b>Ρίζες θείου</b>               | <b>RS•</b>                        |
| <b>Ρίζες τριχλωρομεθυλίου</b>    | <b>CCl<sub>3</sub>•</b>           |
| <b>Υποχλωριώδη οξέα</b>          | <b>COCl</b>                       |

### 1.3 Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες αναπτύσσονται είτε ενδογενώς στον οργανισμό, από ένα σύνολο ενζυμικών ή μη αντιδράσεων, είτε από εξωτερικούς παράγοντες. (εικόνα 7)



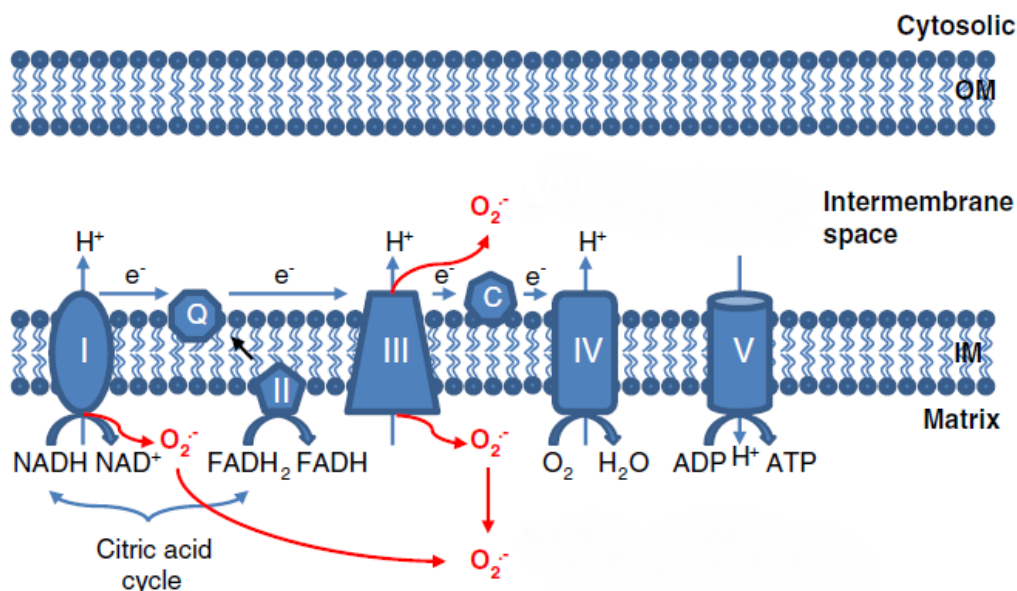
Εικόνα 7. Σχηματική παρουσίαση εξωγενών και ενδογενών πηγών δραστικών ειδών οξυγόνου. (Sharifi-Rad et al., 2020)

Ενδογενείς πηγές αποτελούν οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που καταλύονται από ένζυμα ή πραγματοποιούνται μη ενζυμικά παρουσία προ-οξειδωτικών μετάλλων καθώς και η διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα. Σε κάποιες από αυτές τις αντιδράσεις, οι ενεργές μορφές αποτελούν το κύριο προϊόν της αντίδρασης, ενώ σε άλλες είναι παραπροϊόντα αυτών. Πιο συγκεκριμένα:

#### ❖ Οξειδωτική φωσφορλίωση

Αποτελεί την κύρια ενδογενή πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Μέσω αυτής τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται, έχοντας ως τελικό αποδέκτη το οξυγόνο το οποίο ανάγεται πλήρως σε νερό, ενώ η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων, αποθηκεύεται ως ATP, μέσω της ATP συνθάσης. Το οξυγόνο το οποίο δεν καταλήγει σε νερό, μετατρέπεται σε δραστικές μορφές. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κλειστό κύκλωμα, χωρίς την απελευθέρωση δραστικών ενδιάμεσων. Τα ηλεκτρόνια που παρέχονται από το NADH και FADH<sub>2</sub>, μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αποτελείται από τρία

συμπλέγματα πρωτεϊνών, το σύμπλεγμα NADH διϋδρογενάσης [NADH dehydrogenase complex (I)], το σύμπλεγμα αναγωγής κυτοχρώματος c [cytochrome c reductase complex (III)], το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c [cytochrome c oxidase complex (IV)] και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c)(Zorov et al., 2014). Τα συμπλέγματα I και III, είναι οι κύριες θέσεις παραγωγής  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το  $FADH_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\bullet-}$  (Chance et al., 1979). Ένα ποσοστό του  $H_2O_2$  διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιεί συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς(Παπαγαλάνης & Paragalanis, 2015) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας.(Li et al., 2013)

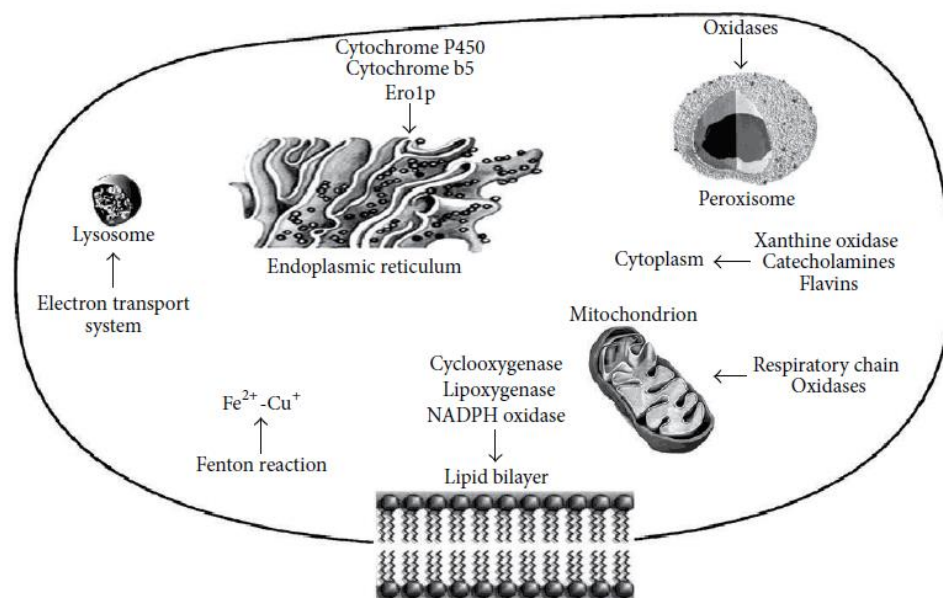
#### ❖ Φαγοκυττάρωση

Κατά τη φαγοκυττάρωση ξένων ουσιών, βακτηρίων ή ιών, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μακροφάγα) προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που παράγονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα, απελευθερώνοντας λυτικά ένζυμα και  $O_2^{\bullet-}$ . Οι ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  είναι απαραίτητες προκειμένου να παραχθούν άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (πχ  $H_2O_2$  και  $ONOO^-$ ) που είναι τοξικές και συμβάλλουν στην καταστροφή των μικροοργανισμών(Stocker & Keaney, 2004; Tabima et al., 2012; Vatanserver et al., 2013). Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό

και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου (Sugamura & Keaney, 2011).

❖ Επιπρόσθετα ενζυμικά συστήματα παραγωγής ελεύθερων ριζών

Το οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα και χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Τέτοια ένζυμα είναι η οξειδάση του κυτοχρώματος-P450, το σύστημα μονοξυγενάσης, η οξειδάση της ξανθίνης, η συνθάση νιτρικού οξειδίου και η NADPH οξειδάση. Τα ένζυμα αυτά, οδηγούν βαθμιαία ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, χωρίς να το ανάγουν πλήρως, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων σε κάθε στάδιο. Τελικά, γίνεται βαθμιαία η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι -κατά σειρά παραγωγής τους- το  $O_2^{\bullet-}$ , το  $H_2O_2$  και το  $OH^{\bullet}$  (Auten & Davis, 2009; Dröge, 2002; Marian Valko et al., 2007; S. Yang & Lian, 2020; Παπαγαλάνης & Papagalanis, 2015) (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ενδοκυτταρικές πηγές ROS. (Di Meo et al., 2016)

❖ Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών

Ωστόσο ελεύθερες ρίζες παράγονται και από εξωγενείς παράγοντες (ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όζον, ατμοσφαιρική ρύπανση, καπνός του τσιγάρου,

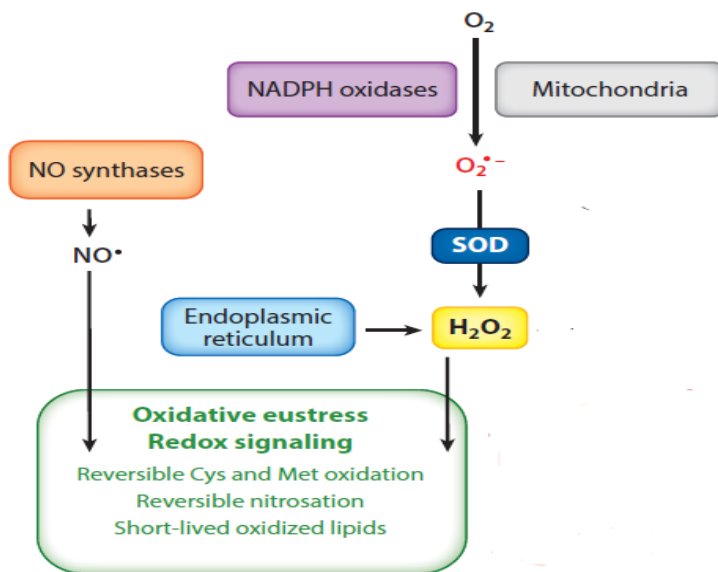
βιομηχανικά απόβλητα) (Koren, 1995). Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998) και άλλων ξενοβιοτικών ουσιών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και την έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια) (Jones et al., 2000). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Phaniendra et al., 2015).

## **1.4 Η βιολογική δράση δραστικών μορφών οξυγόνου**

### **1.4.1 Θετικές επιδράσεις**

Οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως η έκφραση γονιδίων, η μεταγωγή σήματος και η ρύθμιση της δραστηριότητας της διαλύτης γουανιλικής κυκλάσης στα κύτταρα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη βιολογική εξέλιξη. (Fang et al., 2002). Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS είναι πολλαπλές, μερικές από αυτές είναι μεταγραφικοί παράγοντες (όπως είναι ο Nrf2 και ο Nf-κβ), MAP κινάσες καθώς και φωσφατάσες (Kamata & Hirata, 1999). Επιπρόσθετα, συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Rendra et al., 2019). Τέλος, ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Mittler, 2017) (εικόνα 10).

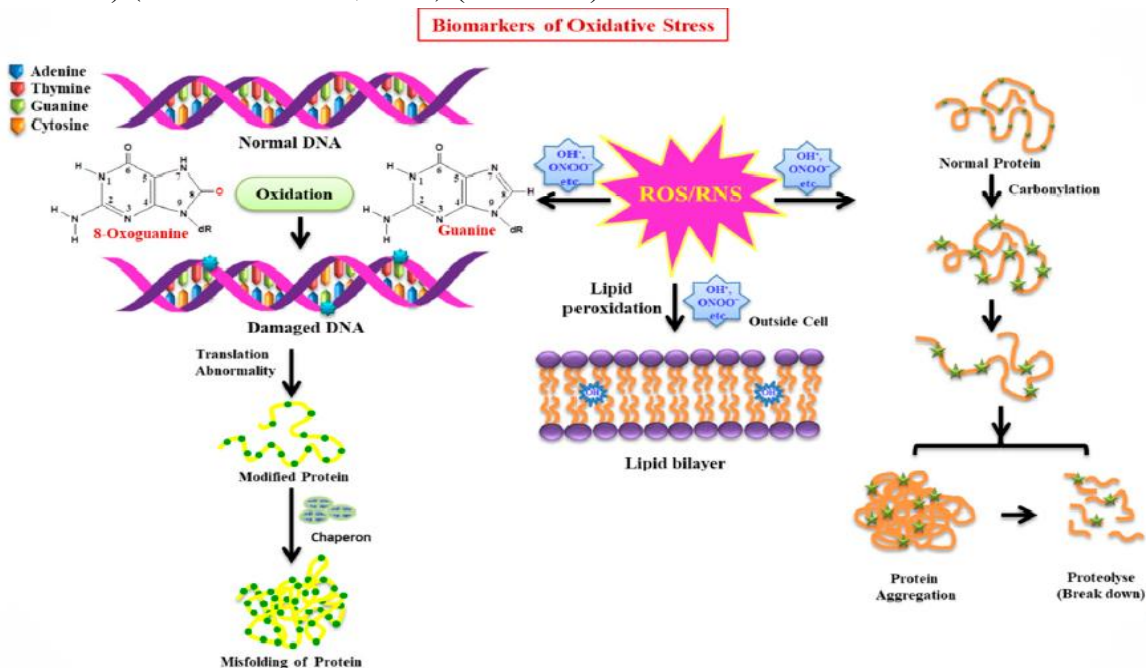




Εικόνα 10. Θετικές επιδράσεις των ROS/RNS. (Sies et al., 2017)

### 1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις

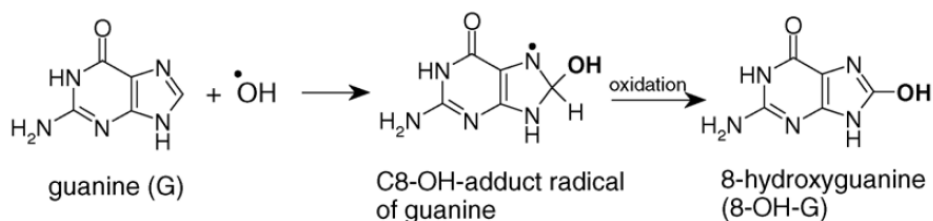
Δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικές, σε περίπτωση διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS/RNS) και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, υπέρ των πρώτων, μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να βλάψουν και τις τρεις σημαντικές κατηγορίες βιομορίων (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια) (Phaniendra et al., 2015) (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Επίδραση των ROS/RNS στα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) (Singh et al., 2019).

#### ❖ Βλάβες στο DNA

Το μόριο του DNA είναι εξαιρετικά σταθερό και πολύ καλά προστατευμένο, ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την φυσιολογική του λειτουργία με καταστροφικά αποτελέσματα. Το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο από το πυρηνικό, καθώς βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από την κύρια θέση παραγωγής ROS. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA, αλλαγές στις βάσεις, βλάβες στη δομή του DNA, αλλά και στο σύστημα επιδιόρθωσης (B. Halliwell, 2007). Για παράδειγμα, η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 σχηματίζοντας ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8- υδροξυγουανίνη (8-OHdG) (εικόνα 12). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις, όπως η αδενίνη, για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη (Ames, 1986; Dizdaroglu et al., 2002). Η 8-υδροξυγουανίνη αποτελεί δείκτη οξείδωσης του DNA και εμπλέκεται στη μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και τη γήρανση. Τα επίπεδα της 8-OHdG είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό, απ' ό τι στο πυρηνικό DNA (Barja, 2000).



Εικόνα 12. Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) με τη γουανίνη. (M. Valko et al., 2006)

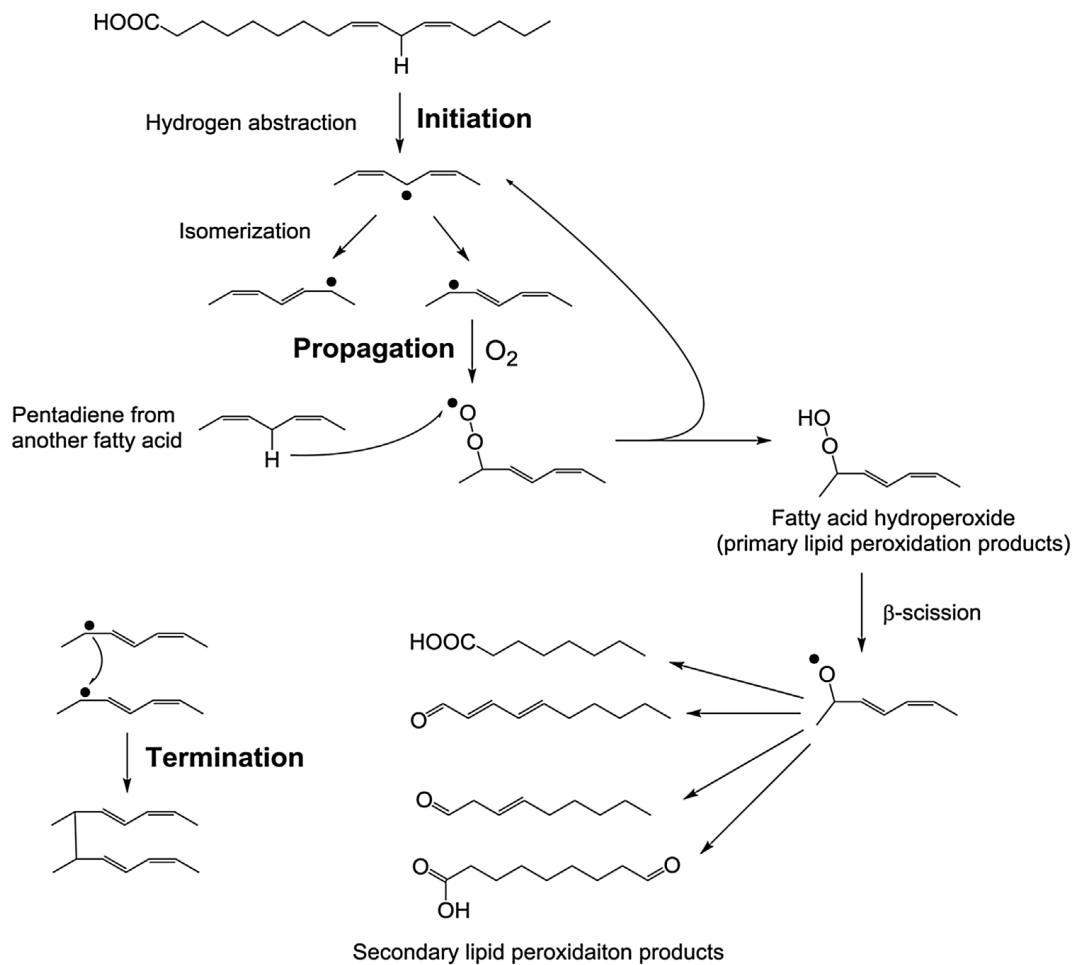
#### ❖ Βλάβες στις πρωτεΐνες

Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες προκαλεί τροποποίηση αμινοξέων, διάσπαση πεπτιδίων καθώς και σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αλλοιώσεις και τροποποιήσεις στη δομή τους και αναστολή της φυσιολογικής τους λειτουργίας, η οποία μπορεί να επηρεάσει και τη δραστηριότητα ενζύμων, υποδοχέων και διαμεμβρανικών μεταφορέων (Butterfield et al., 1998; Lobo et al., 2010). Η οξείδωση των πρωτεϊνών εξαρτάται από το είδος των αμινοξέων που περιέχουν. Τα πιο ευάλωτα αμινοξέα στην οξείδωση, είναι κυρίως αυτά που περιέχουν θειούχες ομάδες και ακόρεστους δεσμούς (πχ κυστεΐνη, μεθειονίνη) (Salvi et al., 2001). Επίσης, κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών παράγονται πρωτεϊνικά καρβονύλια

αποτελώντας σημαντικό δείκτη οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες (Chevion et al., 2000).

❖ Βλάβες στα λιπίδια

Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την δημιουργία αλυσιδωτών αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης (My Ionas & Kouretas, 1999). Μία ελεύθερη ρίζα ( $R\bullet$ ) μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH) και στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών. Η διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων, αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (εικόνα 13). Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να επηρεάσει τη ρευστότητα, τη διαπερατότητα και τη λειτουργικότητα της κυτταρικής μεμβράνης και μπορεί να οδηγήσει σε αδρανοποίηση των ενζύμων και των υποδοχέων που δεσμεύονται σε αυτή. Επιπλέον, προκαλεί ανοσολογική απόκριση, με απόρροια τη μετατροπή των λιπιδίων σε φωσφολιπίδια, και σταδιακά την πρόκληση κυτταρικού θανάτου (Gaschler & Stockwell, 2017; Santanam et al., 1998). Στην υπεροξειδωση λιπιδίων, παράγονται πολλές ενώσεις όπως αλκάνια, μαλονδιαλδεΰδη και ισοπροστάνες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια (Aruoma, 1998; Lobo et al., 2010).



Εικόνα 13. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Wang et al., 2017).

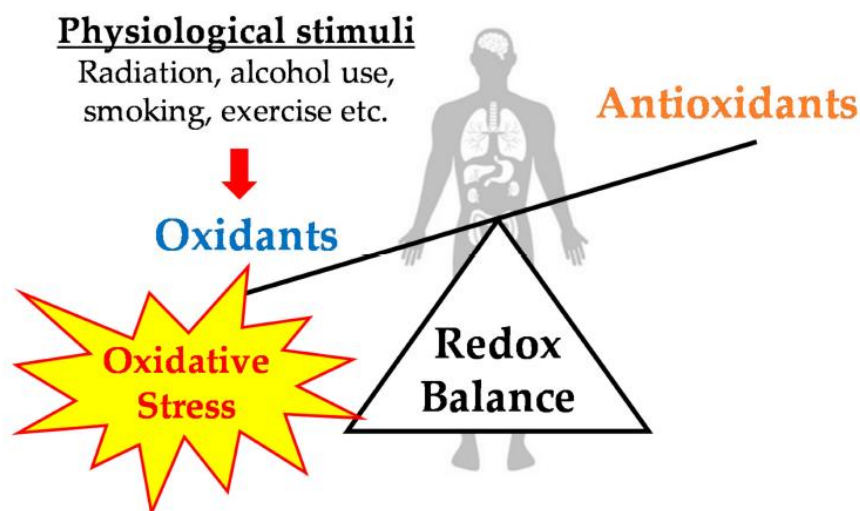
## 1.5 Το οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της εξουδετέρωσης ROS και RNS. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Pisoschi & Pop, 2015). Το οξειδωτικό στρες ορίστηκε αρχικά από τον Helmut Sies ως "διαταραχή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ του πρώτου". Αφορά τη διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και τη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού (Veskoukis et al., 2012). Λόγω της προόδου της σύγχρονης έρευνας και της συσσώρευσης γνώσεων, ο Dean Jones το 2006 εισήγαγε έναν νέο ορισμό του οξειδωτικού στρες στην επιστημονική κοινότητα ως τη "διαταραχή προοξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ή/και σε μοριακή βλάβη" (εικόνα 14).

Ο ορισμός αυτός συσχετίζει το οξειδωτικό στρες με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, μια βιολογική διαδικασία απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων (Dr, 2006; Veskoukis et al., 2020). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επέλθει ως αποτέλεσμα :

- ❖ αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) με φυσιολογική αντιοξειδωτική λειτουργία του οργανισμού
- ❖ φυσιολογικής παραγωγής ROS, αλλά μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας
- ❖ συνδυασμού των δύο παραπάνω

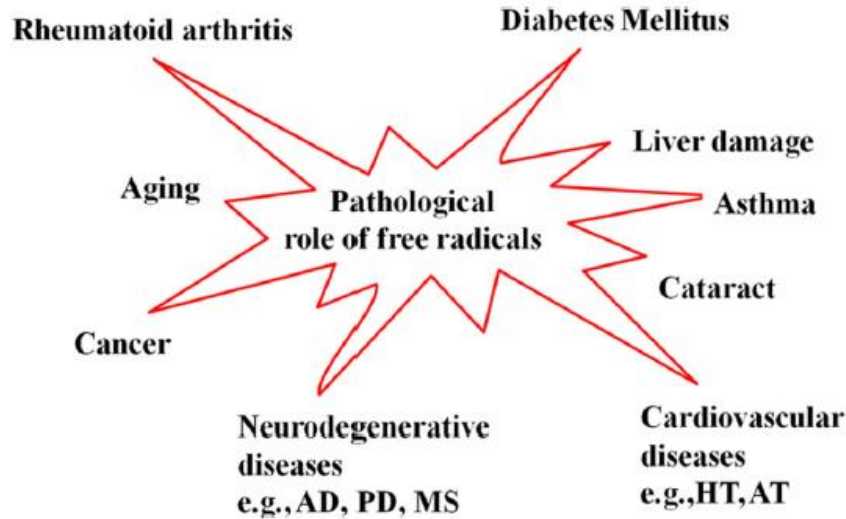
Τέλος, μπορεί να οφείλεται και σε μία πιθανή ανισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Deaton & Marlin, 2003; Lichtenberg & Pinchuk, 2015).



Εικόνα 14. Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS/RNS (Kawamura & Muraoka, 2018)

## 1.6 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

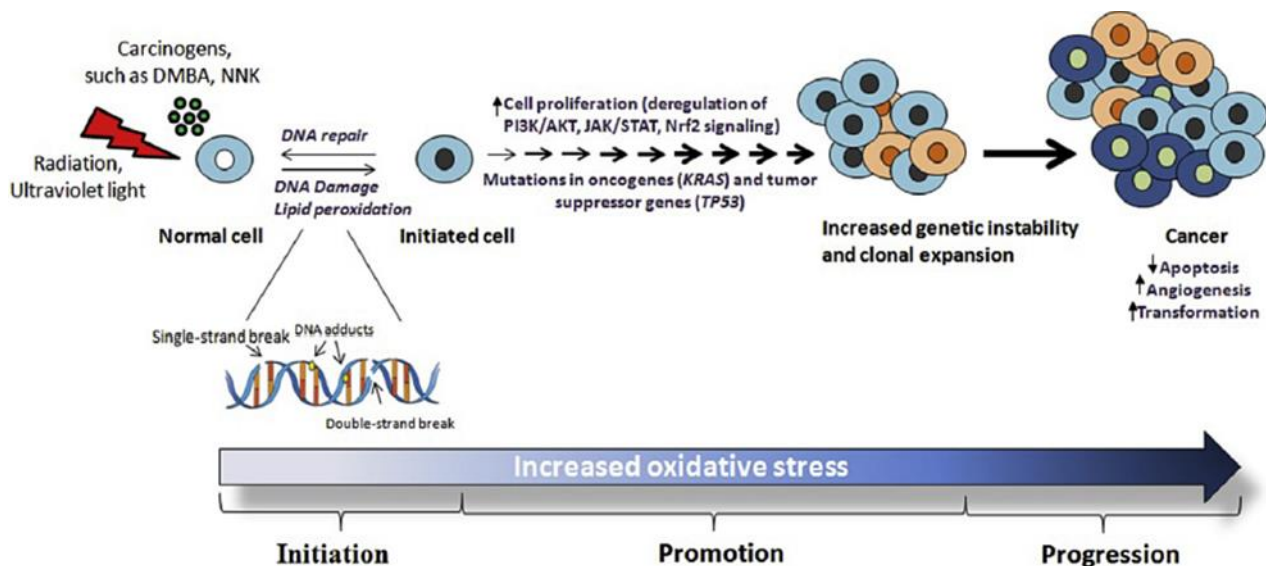
Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση παθογόνων καταστάσεων και η σχέση τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως αμφίδρομη. Πιο συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες δύναται να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών, αλλά και η εκδήλωση τέτοιων ασθενειών μπορεί πιθανόν να οδηγήσει σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Pham-Huy et al., 2008) (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ελεύθερες ρίζες και ασθένειες. (Phaniendra et al., 2015)

❖ Οξειδωτικό στρες και καρκίνος

Πολλοί τύποι καρκίνου συνδέονται με το οξειδωτικό στρες όπως ο καρκίνος του μαστού, των πνευμόνων, των ωοθηκών και η λευχαιμία. Ο καρκίνος αποτελεί μία διαδικασία, η οποία εξελίσσεται σε πολλαπλά στάδια (έναρξη, προώθηση, εξέλιξη). Δύο μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης, οι οποίοι σχετίζονται με οξειδωτική βλάβη. Ο πρώτος αφορά τις γενετικές αλλαγές, που επάγονται από τις δραστικές μορφές, οι οποίες δημιουργούν γονιδιακές μεταλλάξεις και δομικές αλλαγές, σχετιζόμενες με την έναρξη της καρκινογένεσης και ο δεύτερος αφορά την ανώμαλη γονιδιακή έκφραση, στην οποία συμβάλλουν οι ROS κατά το στάδιο της προώθησης, με αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Moloney & Cotter, 2018; Prasad et al., 2017; Srinivas et al., 2019; Yuhui Yang et al., 2016) (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Σύνδεση μεταξύ οξειδωτικού στρες και καρκινογένεσης. (Chikara et al., 2018)

❖ Οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλιστικές ασθένειες

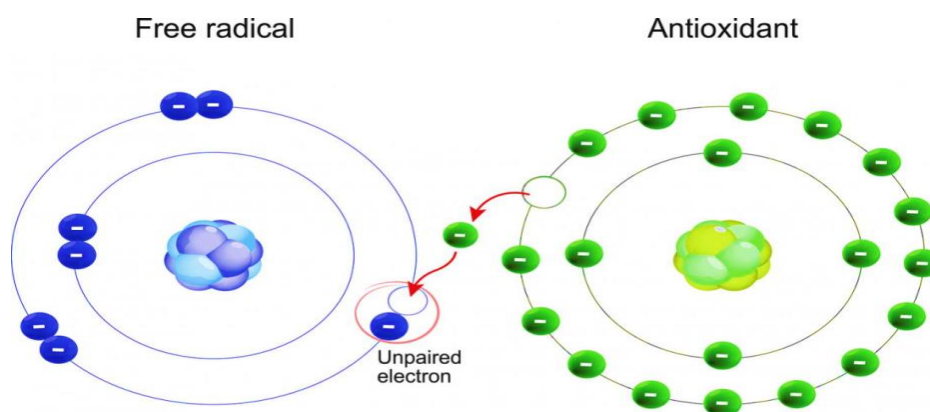
Το οξειδωτικό στρες συνδέεται άμεσα με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Alzheimer, Parkinson, και Huntington), καθώς υπάρχουν ενδείξεις για οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, σε περιοχές του εγκεφάλου, αλλά και σε περιφερικούς ιστούς ατόμων που νοσούν. Επιπρόσθετα οι νευρώνες είναι μεταμιτωτικά κύτταρα, στα οποία σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, συσσωρεύονται βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα την αύξηση των βλαβών στη δομή και την λειτουργία των νευρώνων, όσο αυξάνεται η ηλικία (Gandhi & Abramov, 2012; Pizzino et al., 2017; Marian Valko et al., 2007; S. Yang & Lian, 2020).

❖ Οξειδωτικό στρες και σακχαρώδης διαβήτης

Ολοένα και περισσότερες ενδείξεις από κλινικές μελέτες, δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και των δύο τύπων σακχαρώδη διαβήτη (τύπου I και τύπου II). Ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, έχουν ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα δεικτών του οξειδωτικού στρες στον ορό, τα ούρα και σε άλλα σωματικά υγρά (Ahmad et al., 2017; Luc et al., 2019; Madamanchi et al., 2005; Rasines-Perea & Teissedre, 2017; Rehman & Akash, 2017).

## 1.7 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται μία ουσία η οποία δύναται να δώσει το ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας σε ένα μόριο το οποίο διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, εξουδετερώνοντας το (εικόνα 17). Η αντιοξειδωτική ουσία, βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και έχει την δυνατότητα να καθυστερεί ή να αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Barry Halliwell & Gutteridge, n.d.-a; Krinsky, 2002).



Εικόνα 17. Δράση αντιοξειδωτικού. (Jamshidi-kia et al., 2020)

Για να προστατευθούν τα κύτταρα και τα οργανικά συστήματα του σώματος έναντι των ελεύθερων ριζών, οι αερόβιοι οργανισμοί, έχουν εξελίξει ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας. Πρόκειται για μια ποικιλία συστατικών, τόσο ενδογενούς (από τον οργανισμό) όσο και εξωγενούς (κυρίως μέσω της διατροφής) προέλευσης, που ο ρόλος τους είναι να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Aguoma, 1998). Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας μπορούν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες, ενώ η διαθεσιμότητα τους διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς και κύτταρα:

- ❖ Ένζυμα απομάκρυνσης των ROS (καταλάση, υπεροξειδάσες).
- ❖ Πρωτεΐνες με ικανότητα περιορισμού της διαθεσιμότητας ιόντων σιδήρου και χαλκού, τα οποία λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά.
- ❖ Πρωτεΐνες προστασίας βιομορίων από οξειδωτικές βλάβες (heat-shock proteins).
- ❖ Χαμηλού μοριακού βάρους μόρια, τα οποία αντιδρούν με ROS προκειμένου να οδηγήσουν σε μη επιβλαβή προϊόντα, τερματίζοντας έτσι αλυσιδωτές



αντιδράσεις παραγωγής οξειδωτικών μορίων (γλουταθειόνη, βιταμίνη E, μελανίνες) (Fang et al., 2002).

Μέσα στον οργανισμό οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας διαχωρίζονται σε **ενζυμικούς και μη ενζυμικούς**.

**Ενζυμικοί μηχανισμοί** αντιοξειδωτικής άμυνας θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) λειτουργεί ως βιολογικός καταλύτης της αντίδρασης μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, εξουδετερώνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες του  $O_2^{\bullet-}$ . Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, η SOD θεωρείται ένζυμο πρώτης γραμμής της αντιοξειδωτικής άμυνας (Hao & Liu, 2019; Veal et al., 2018). Ένα ακόμη σημαντικό ένζυμο, αποτελεί η καταλάση (CAT). Το συγκεκριμένο ένζυμο βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Καταλύει την διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$ . (Glorieux & Calderon, 2017; He et al., 2017). Δύο ακόμη ένζυμα, άξια αναφοράς, είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Η κυριότερη αντίδρασή στην οποία συμμετέχει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αφορά τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$ , με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH) (Pisoschi & Pop, 2015). Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG/GSH στο εσωτερικό του κυττάρου (Steinbrenner et al., 2016; M. Valko et al., 2006).

Οι **μη ενζυμικοί μηχανισμοί** αντιοξειδωτικής άμυνας έχουν την ικανότητα εξουδετέρωσης αλυσιδωτών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (π.χ. την αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων). Στις αντιδράσεις που συμμετέχουν, λαμβάνουν ή δίνουν ηλεκτρόνια σε μία ρίζα, προκειμένου να σχηματιστεί ένα σταθερό παραπροϊόν. Είναι μόρια είτε υδατοδιαλυτά, π.χ. βιταμίνη C, γλουταθειόνη (GSH), είτε λιποδιαλυτά, π.χ. βιταμίνη E, καροτενοειδή (Benzie & Strain, 2005). Η γλουταθειόνη είναι το πιο σημαντικό, μη ενζυμικό, ενδογενές αντιοξειδωτικό και ρυθμίζει την ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική κατάσταση. Εντοπίζεται στο κύτταρο είτε σε ανηγμένη (GSH) είτε σε οξειδωμένη (GSSG) μορφή, δεσμεύει άμεσα την ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο, ενώ εξουδετερώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου

και τα υπεροξειδία των λιπιδίων με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. (Homma & Fujii, 2015).

Παρόλο που τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του σώματος είναι πολύ αποτελεσματικά, συχνά, δεν είναι επαρκή. Επομένως, είναι απαραίτητη η πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής για την ενίσχυση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος του οργανισμού. Κύριες πηγές των αντιοξειδωτικών της διατροφής του ανθρώπου, αποτελούν τα τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα μπαχαρικά, το τσάι, ο καφές, η σοκολάτα, οι ξηροί καρποί, τα βότανα και το κόκκινο κρασί. Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά της διατροφής είναι η βιταμίνη C και η βιταμίνη E. Εκτός από αυτά, χιλιάδες αντιοξειδωτικές ενώσεις βρίσκονται στα φυτά και είναι γνωστές ως φυτοχημικά.

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι η μοναδική υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων και συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας ή δότης ηλεκτρονίων, εξουδετερώνοντας ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου). Η βιταμίνη E έχει ως κύρια αντιοξειδωτική δράση την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. (Barry Halliwell & Gutteridge, n.d.-b).

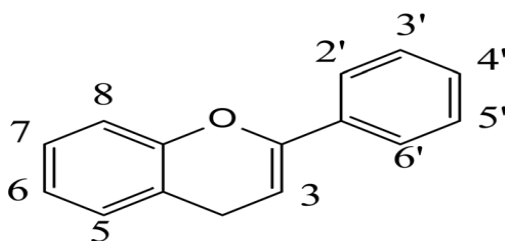
## **1.8 Φυτικές Πολυφαινόλες**

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη της δράσης των φυτικών πολυφαινολών έχει προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων, λόγω της σημασίας τους στην ανθρώπινη υγεία, δεδομένου ότι πρόκειται για ουσίες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Manach et al., 2004). Είναι μία ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία, τουλάχιστον ενός, αρωματικού δακτυλίου, που φέρει έναν ή περισσότερους υποκατάστατες υδροξυλίου. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και περιέχουν πολλές υποομάδες φαινολικών ενώσεων (Pandey & Rizvi, 2009). Βρίσκονται στα φυτά, όπου αποτελούν δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού αυτών και έχουν σκοπό να ενισχύουν τη φυσική άμυνα του φυτού και να τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες (μικροβιακές μολύνσεις, υπεριώδης ακτινοβολία, κ.α.) (Kouka et al., 2019). Πολυφαινόλες περιέχονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε τρόφιμα

φυτικής προέλευσης όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, ο καφές, το τσάι, η σοκολάτα και το κόκκινο κρασί. Επίσης, επειδή έχουν έντονο χρώμα και οσμή προσελκύουν τα έντομα συμβάλλοντας στην αναπαραγωγή των φυτών. (Scalbert & Williamson, 2000). Σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 8000 πολυφαινολικές ενώσεις ως συστατικά των φυτικών οργανισμών (Tsaο, 2010). Σε αντίθεση με τις βιταμίνες και τα μέταλλα δεν είναι απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, εφόσον ο ανθρώπινος οργανισμός δεν τα απαιτεί για τη διατήρηση της ζωής, όμως μπορούν να ασκήσουν ευεργετικές δράσεις. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους, τη βιολογική τους λειτουργία και τη χημική τους δομή, διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες (LAZAR, 2003):

❖ Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα φυτικών συστατικών, με περισσότερους από 5.000 τύπους που απαντώνται σχεδόν σε όλα τα φρούτα και τα λαχανικά, αποτελώντας τη μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών (εικόνα 18). Λόγω της ύπαρξης διαφόρων τύπων υδροξυλίωσης στο δακτύλιο C, προκύπτουν υποκατηγορίες των φλαβονοειδών: οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες (Manach et al., 2004).



Εικόνα 18. Βασική δομή φλαβονοειδών. (Fraga et al., 2019)

❖ Φαινολικά οξέα

Μπορούν να διαχωριστούν σε 2 υποκατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C1-C6) και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (C3-C6). Έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το καφεϊκό, το κουμαρικό και το γαλλικό οξύ (Liu, 2004).

❖ Στιλβένια

Πρόκειται για μη στεροειδή οιστρογόνα, τα οποία εντοπίζονται στο φυτικό βασίλειο και συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Κύρια

αντιπρόσωπος είναι η ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στα σταφύλια και στο κόκκινο κρασί. (Gupta et al., 2002)

❖ Λιγνάες

Βρίσκονται σε σπόρους όπως λινάρι, όσπρια, δημητριακά, φρούτα και ορισμένα λαχανικά (Peterson et al., 2010).

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο προσδιορισμός και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης από εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου και πιο συγκεκριμένα των *Alkanna Tinctoria*, *Stachys Cretica* subsp. *lesbiaca*, *Anthyllis Hermanniae* και *Helichrysum Stoechas*. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης *in vitro*, προσδιορίστηκε η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH•, ABTS•<sup>+</sup>, σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), υδροξυλίου (OH•) αλλά και της αναγωγικής τους ικανότητας. Επιπλέον, η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε μέσω της ικανότητάς τους να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από βλάβες επαγόμενες από ρίζες περοξυλίου (ROO•).

### 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Φυτικά εκχυλίσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τα εκχυλίσματα των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου που παρατίθενται στον πίνακα 4 :

Πίνακας 2. Εκχυλίσματα Περιφέρειας Βορείου Αιγαίου.

| Φυτικά εκχυλίσματα | Είδος                                    | Τμήμα φυτού    | Διαλύτης εκχύλισης             |
|--------------------|--|----------------|--------------------------------|
| 1                  | <i>Alkanna tinctoria</i>                 | ρίζες          | EtOH /H <sub>2</sub> O (50:50) |
| 2                  | <i>Stachys cretica (subsp. lesbiaca)</i> | υπέργειο τμήμα | EtOH /H <sub>2</sub> O (50:50) |
| 3                  | <i>Anthyllis hermanniae</i>              | ρίζες          | EtOH /H <sub>2</sub> O (50:50) |
| 4                  | <i>Helichrysum stoechas</i>              | υπέργειο τμήμα | EtOH /H <sub>2</sub> O (50:50) |

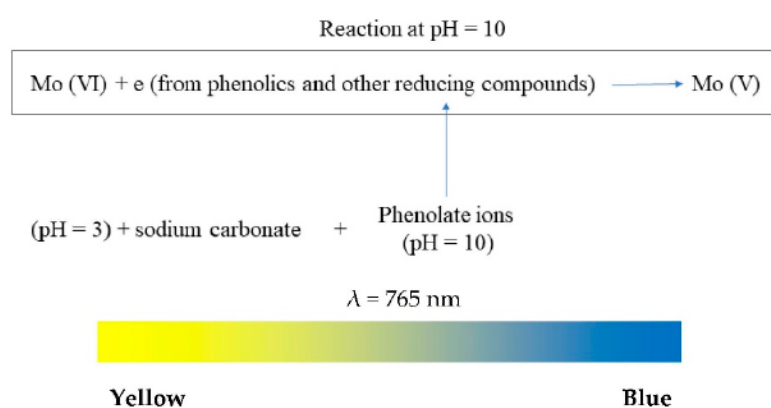
## 3.2. Μέθοδοι

### 3.2.1. Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

#### Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο, η οποία μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) χρησιμοποιείται για την μέτρηση και τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των 4 εκχυλισμάτων των φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου, χωρίς να διακρίνονται τα φαινολικά συστατικά μεταξύ τους. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων τα οποία σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm (εικόνα 19). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων, ενώ δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα, δηλαδή όσο πιο έντονο είναι το μπλε χρώμα που εμφανίζεται τόσο μεγαλύτερο είναι το πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Chemical reaction:



Εικόνα 19. Μέθοδος Folin- Ciocalteu. (Bibi Sadeer et al., 2020)

### Πειραματική διαδικασία

Αφού πραγματοποιηθούν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων με εύρος συγκεντρώσεων από 2 mg/ml έως και 10 mg/ml ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα 5.

Σε tube των 2ml προστίθενται τα παρακάτω:

*Πίνακας 3. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.*

|  | Blank  | Cn      | Negative Control Cn |
|--|--------|---------|---------------------|
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                      | 1020μl | 1000 μl | 1100 μl             |
| <b>Folin-Ciocalteu</b>                     | 100 μl | 100 μl  | -                   |
| <b>Δείγμα</b>                              | -      | 20 μl   | -                   |
| <b>Επώαση 3min σε θερμοκρασία δωματίου</b> |        |         |                     |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>        | 280 μl | 280 μl  | 280 μl              |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                      | 600 μl | 600 μl  | 600 μl              |
| <b>Ντελ</b>                                | 2ml    | 2ml     | 2ml                 |

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων ακολουθεί ανάδευση και επώαση του μίγματος για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάζεται εις τριπλούν. Εξετάζεται ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία στη συνέχεια αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

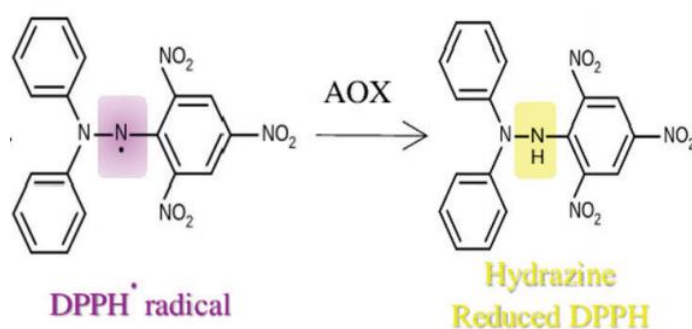
### **3.2.2. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•**

#### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή, αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου η οποία αρχικά περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995). Βασίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Εικόνα 1). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μωβ χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά



στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH• ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (εικόνα 20), μία ουσία η οποία δίνει κίτρινο χρώμα στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub>. Η τιμή IC<sub>50</sub> είναι εκείνη η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αναστέλλει τη ρίζα στο 50% και όσο χαμηλότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας που εξετάζεται.



Εικόνα 20. Αναγωγή της ρίζας DPPH• σε DPPH-H και μεταβολή του χρώματος της.(Becker et al., 2019)

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιούνται οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων με εύρος συγκεντρώσεων από 12,5 µg/ml έως 800 µg/ml. Στη συνέχεια, σε tubes 1,5 ml προστίθενται τα διαλύματα με τη σειρά και σε ποσότητες όπως περιγράφονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 4. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

|                         | Blank   | Positive Control | C <sub>n</sub> | Negative control C <sub>n</sub> |
|-------------------------|---------|------------------|----------------|---------------------------------|
| <b>Εκχύλισμα</b>        | -       | -                | 50 µl          | 50 µl                           |
| <b>Μεθανόλη</b>         | 1000 µl | 950 µl           | 900 µl         | 950µl                           |
| <b>DPPH•</b>            | -       | 50 µl            | 50 µl          | -                               |
| <b>V<sub>τελ.</sub></b> | 1 ml    | 1 ml             | 1 ml           | 1 ml                            |

Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων ακολουθεί ανάδευση με vortex, επώαση του μίγματος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 517 nm. Τέλος, επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά στα 517 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.

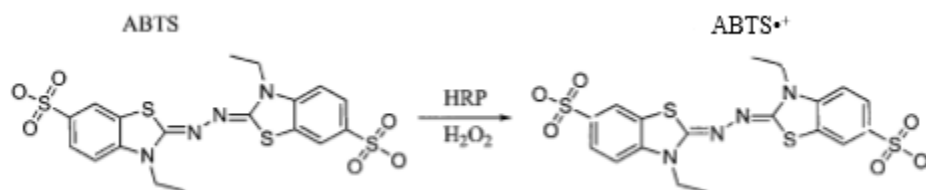
Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα:

$$\% \text{ εξουδετέρωσης του DPPH}\bullet = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

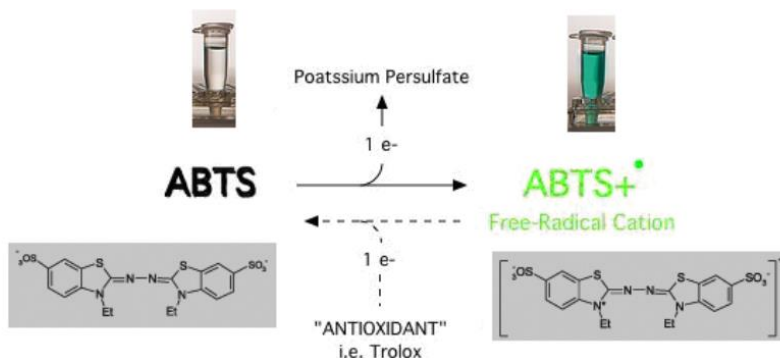
### **3.2.3 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>**

#### **Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ουσίας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS<sup>•+</sup>. Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (εικόνα 21). Η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του ABTS<sup>•+</sup> ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (εικόνα 22). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub>. Η τιμή IC<sub>50</sub> είναι εκείνη η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αναστέλλει τη ρίζα στο 50% και όσο χαμηλότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας που εξετάζεται.



Εικόνα 21. Παραγωγή της ρίζας του  $ABTS^{\bullet+}$  μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία  $H_2O_2$ . (Johannes et al., 2006)



Εικόνα 22. Αντίδραση αναγωγής της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  σε  $ABTS$  και αποχρωματισμός της. (Boligon, 2014)

### Πειραματική διαδικασία

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά tube 1.5 ml, σε όγκο 1 ml στο οποίο εμπεριέχονται  $ABTS$  1 mM,  $H_2O_2$  30  $\mu M$  και  $HRP$  6  $\mu M$ . Το εύρος των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων κυμάνθηκε από 0,75  $\mu g/ml$  μέχρι 200  $\mu g/ml$ . Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 5. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

| 3x                            | Blank  | Positive Control | C <sub>n</sub> | Negative control C <sub>n</sub> |
|-------------------------------|--------|------------------|----------------|---------------------------------|
| H <sub>2</sub> O              | 450 μL | 400 μL           | 400 μL         | 450 μL                          |
| ABTS                          | 500 μL | 500 μL           | 500 μL         | 500 μL                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 50 μL  | 50 μL            | 50 μL          | 50 μL                           |
| HRP                           | -      | 50 μL            | 50 μL          | -                               |
| Υτελ.                         | 1 mL   | 1 mL             | 1 mL           | 1 mL                            |
| Εκχύλισμα                     | -      | -                | 50 μL          | 50 μL                           |

Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος όπως φαίνεται στον πίνακα 7. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά από μόνη της στα 730 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα:

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

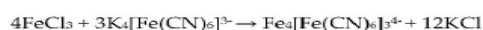
### 3.2.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητάς τους να ανάγουν τον τρισθενή σίδητο σε δισθενή (αναγωγική ισχύς).

#### Αργή μεθόδου

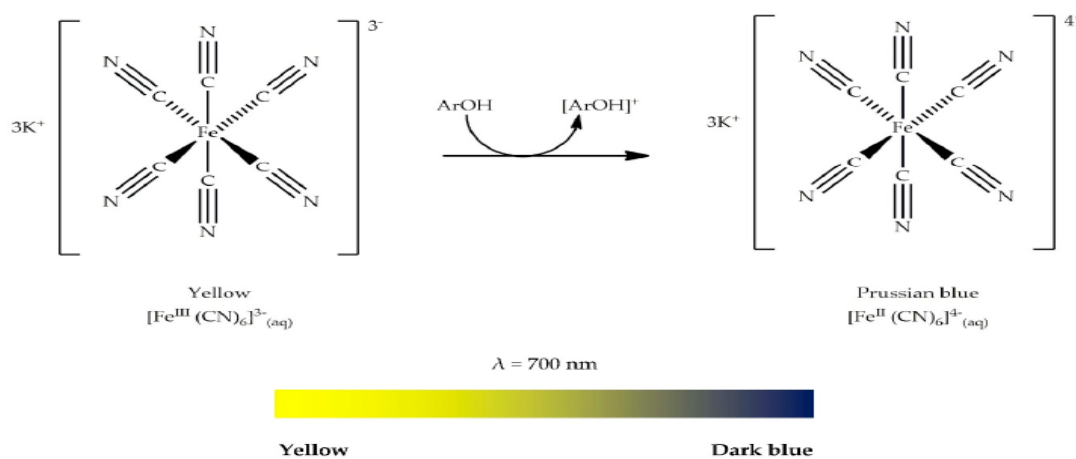
Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της αναγωγικής ισχύος κατά την οποία οι ενώσεις που διαθέτουν αναγωγική δύναμη, αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν κατά την λιπιδική υπεροξείδωση, δρώντας έτσι είτε ως πρωταρχικές είτε ως δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Οι ουσίες με

αναγωγική δύναμη μπορούν να ανάγουν το  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$ , αυτό με την σειρά του μπορεί να αλληλεπιδράσει με χλωριούχο σίδηρο με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου με απορρόφηση στα 700nm. Στη 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 23).

Chemical reaction:



Mechanism of reaction:



Εικόνα 23. Αναγωγή του σιδήρου και αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. (Bibi Sadeer et al., 2020)

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιούνται αραιώσεις των προς εξέταση εκχυλισμάτων σε phosphate buffer, με εύρος συγκεντρώσεων από 1,56  $\mu\text{g}/\text{ml}$  έως 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Ακολουθεί η προσθήκη των αντιδραστηρίων με τη σειρά που φαίνεται στον πίνακα 8.

Πίνακας 6. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

|   | Blank   | Positive Control | Cn      | Negative Control<br>Cn |
|---|---------|------------------|---------|------------------------|
| <b>Sample</b>                                 | -       | -                | 50 µl   | 50 µl                  |
| <b>Phosphate buffer (0.2M, pH 6.6)</b>        | 500 µl  | 250 µl           | 200 µl  | 450 µl                 |
| <b>Potassium ferricyanide</b>                 | -       | 250 µl           | 250 µl  | -                      |
| <b>Επώαση στους 50 °C για 20 λεπτά</b>        |         |                  |         |                        |
| <b>TCA</b>                                    | 250 µl  | 250 µl           | 250 µl  | 250 µl                 |
| <b>Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά</b> |         |                  |         |                        |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>                        | 250 µl  | 250 µl           | 250 µl  | 250 µl                 |
| <b>Ferric chloride</b>                        | 50 µl   | 50 µl            | 50 µl   | 50 µl                  |
| <b>Ντελ.</b>                                  | 1000 µl | 1000 µl          | 1000 µl | 1000 µl                |

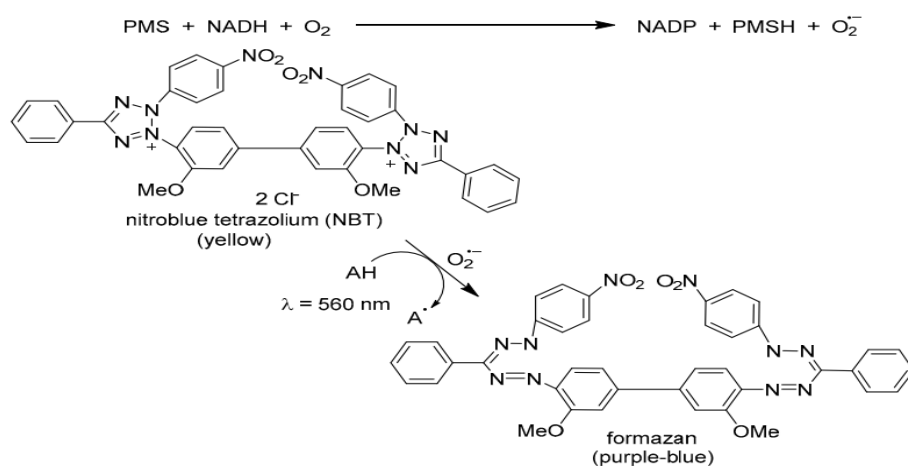
Με το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγουμε το υπερκείμενο (700 µl) και το μεταφέρουμε σε νέο tube στο οποίο προστίθενται το H<sub>2</sub>O και το Ferric chloride. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση 10 λεπτών στο σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 700 nm. Επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά στα 700 nm θα πρέπει να γίνει μέτρηση της απορρόφησης κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του potassium ferricyanide.

### 3.2.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

#### Αρχή Μεθόδου

Η ρίζα O<sub>2</sub><sup>•-</sup> έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο, απενεργοποίηση ενζύμων καθώς και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS- NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της αναστολής του σχηματισμού του

NBT. Το  $O_2^{\bullet-}$  μειώνει την ένταση του κίτρινου χρώματος που προέρχεται από το  $NBT_2^+$  με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μέσω οξειδωσης NBT, που είναι υπεύθυνο για την μπλε χρώση του διαλύματος, το οποίο μετράται φωτομετρικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του NBT (Santos & Silva, 2020) (εικόνα 24). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής  $IC_{50}$ . Η τιμή  $IC_{50}$  είναι εκείνη η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αναστέλλει τη ρίζα στο 50% και όσο χαμηλότερη η τιμή  $IC_{50}$ , τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας που εξετάζεται.



Πίνακας 7. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

|  | Blank   | Positive Control | Cn      | Negative control Cn |
|--|---------|------------------|---------|---------------------|
| <b>Δείγμα</b>                          | -       | -                | 50 μl   | 50 μl               |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>                 | -       | 50 μl            | -       | -                   |
| <b>Tris-HCl<br/>(16mM, pH<br/>8.0)</b> | 800 μl  | 625 μl           | 625 μl  | 750 μl              |
| <b>NBT (300μM)</b>                     | 125 μl  | 125 μl           | 125 μl  | 125 μl              |
| <b>NADH<br/>(468μM)</b>                | 125 μl  | 125 μl           | 125 μl  | 125 μl              |
| <b>PMS (60μM)</b>                      | -       | 125 μl           | 125 μl  | -                   |
| <b>Υτελ.</b>                           | 1050 μl | 1050 μl          | 1050 μl | 1050 μl             |

Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ανιόντων σουπεροξειδίου. Οι μετρήσεις θα γίνουν εις τριπλούν. Τα δείγματα χωρίς PMS αποτελούν το τυφλό. Τέλος, επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά στα 560 nm θα πρέπει να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς τη προσθήκη PMS.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

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

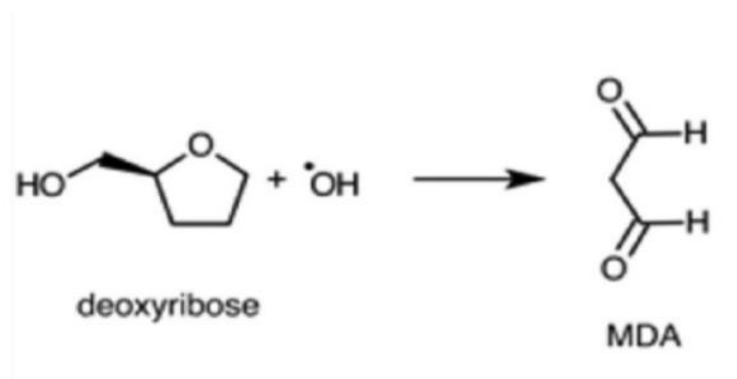
RSC = radical scavenging capacity



### 3.2.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH•

#### Αρχή μεθόδου

Η ρίζα υδροξυλίου είναι μια εξαιρετικά δραστική ρίζα που μπορεί να προκαλέσει σημαντικές 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 φανερώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκάστοτε εκχυλισμάτων. Οι ρίζες υδροξυλίου (που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton) οξειδώνουν την 2-δεοξυριβόζη και την διασπούν σε μαλονδιαλδεΐδη (MDA) (εικόνα 25). Συνεπώς, η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώσουν την ρίζα υδροξυλίου, μετράται με την αναστολή οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας εκτιμάται με υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub>. Η τιμή IC<sub>50</sub> είναι εκείνη η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αναστέλλει τη ρίζα στο 50% και όσο χαμηλότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας που εξετάζεται.



Εικόνα 25. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH•. (Tremel & Šmejkal, 2016)

#### Πειραματική διαδικασία

Αφού γίνουν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα 10. Το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε είναι από 25μg/ml έως 800μg/ml.

Πίνακας 8. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

|   | Blank   | Positive Control | Cn      | Negative Control Cn |
|---|---------|------------------|---------|---------------------|
| <b>Phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)</b>  | 225 μl  | 225 μl           | 225 μl  | 225 μl              |
| <b>2-deoxyribose 10 mM</b>              | 75 μl   | 75 μl            | 75 μl   | 75 μl               |
| <b>FeSO<sub>4</sub>-EDTA 10 mM</b>      | 75 μl   | 75 μl            | 75 μl   | 75 μl               |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM</b> | -       | 75 μl            | 75 μl   | -                   |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>                  | 375 μl  | 345 μl           | 250 μl  | 325 μl              |
| <b>Δείγμα</b>                           | -       | -                | 50 μl   | 50 μl               |
| <b>Επώαση 1 h στους 37°C (κλίβανος)</b> |         |                  |         |                     |
| <b>TCA 2.8%</b>                         | 375 μl  | 375 μl           | 375 μl  | 375 μl              |
| <b>TBA 1%</b>                           | 375 μl  | 375 μl           | 375 μl  | 375 μl              |
| <b>Ντελ</b>                             | 1500 μl | 1500 μl          | 1500 μl | 1500 μl             |

Όταν προστεθεί και το δείγμα γίνεται επώαση για 1 h στους 37°C και στη συνέχεια προσθήκη 375 μl TCA 2.8 % και 375 μl TBA 1 %. Έπειτα βράζουμε το μίγμα για 10 λεπτά και κρυώνουμε σε πάγο. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 520 nm. Τα δείγματα χωρίς H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελούν το τυφλό. Τέλος, έγινε έλεγχος αν η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm.

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH<sup>•</sup> :

$$\% \text{ Hydroxyl radical scavenging activity (αναστολή)} = \frac{A_0 - A_\delta}{A_0} \times 100$$

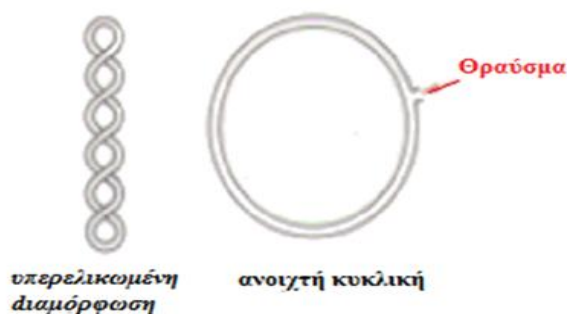
Όπου A<sub>0</sub> → η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm και A<sub>δ</sub> → η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm.

### 3.2.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

#### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση και εκτίμηση της αντιμεταλλαξινόνου και προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών απέναντι στην επαγόμενη από ROS πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Το πλασμίδιο είναι ένα κυκλικό μόριο DNA μικρού μεγέθους, το οποίο μπορεί να απομονωθεί εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο πλεονέκτημα που φέρει το πλασμιδιακό DNA, το οποίο είναι η εμφάνιση διαφορετικών διαμορφώσεων ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του, κατά την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Οι διαμορφώσεις αυτές είναι (εικόνα 26):

- ❖ Η υπερελικομένη διαμόρφωση (supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και αποτελεί την πιο συμπτυκνωμένη του μορφή.
- ❖ Η ανοιχτή κυκλική (open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλιωνα σπασίματα από παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες .
- ❖ Η γραμμική διαμόρφωση (linear conformation) η οποία δημιουργείται όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.



Εικόνα 26. Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα και εύκολα διαπερνά τους πόρους στο gel αγαρόζης. Επομένως η υπερελικομένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική, με την πρώτη να εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αγαρόζης.

### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ρίζας στην οποία προκαλείται θραύση του πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το gel αγαρόζης 0,8% σε TBE1x και πραγματοποιήθηκε αραιώση των εκχυλισμάτων. Οι αραιώσεις είχαν εύρος από 25μg/ml μέχρι και 1,2mg/ml. Ακολούθησε προσθήκη των διαλυμάτων με τη σειρά που φαίνεται στον πίνακα 11, ανάδευση (spin-vortex-spin) και επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Έπειτα έγινε προσθήκη 3μl loading buffer, ανάδευση (spin-vortex-spin) και ηλεκτροφόρηση 70V για περίπου μία ώρα σε gel αγαρόζης 0,8%. Εν συνεχεία, λαμβάνει χώρα χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και 30 λεπτά και αμέσως μετά πλύση με H<sub>2</sub>O για λεπτά. Τέλος, γίνεται λήψη φωτογραφίας των αποτελεσμάτων και ποσοτικοποίηση τους. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας μετράται με υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub>. Η τιμή IC<sub>50</sub> είναι εκείνη η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που αναστέλλει τη ρίζα στο 50% και όσο χαμηλότερη η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της ουσίας που εξετάζεται.

Πίνακας 9. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

|                  | Negative Control                                       | Positive Control                                       | Cn    | Cn max concentration |
|------------------|--|--|-------|----------------------|
| <b>PBS</b>       | 8 μl   | 4 μl   | 1 μl  | 5 μl                 |
| <b>Εκχύλισμα</b> | -  | -  | 3 μl  | 3 μl                 |
| <b>DNA</b>       | 2μl (εξαρτάται από την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA) |  |       |                      |
| <b>APPH</b>      | -  | 4μl (εξαρτάται από την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA) |       | -                    |
| <b>Βτελ.</b>     | 10 μl  | 10 μl  | 10 μl | 10 μl                |

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Ο προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων μέσω του αντιδραστηρίου *Folin-Ciocalteu*

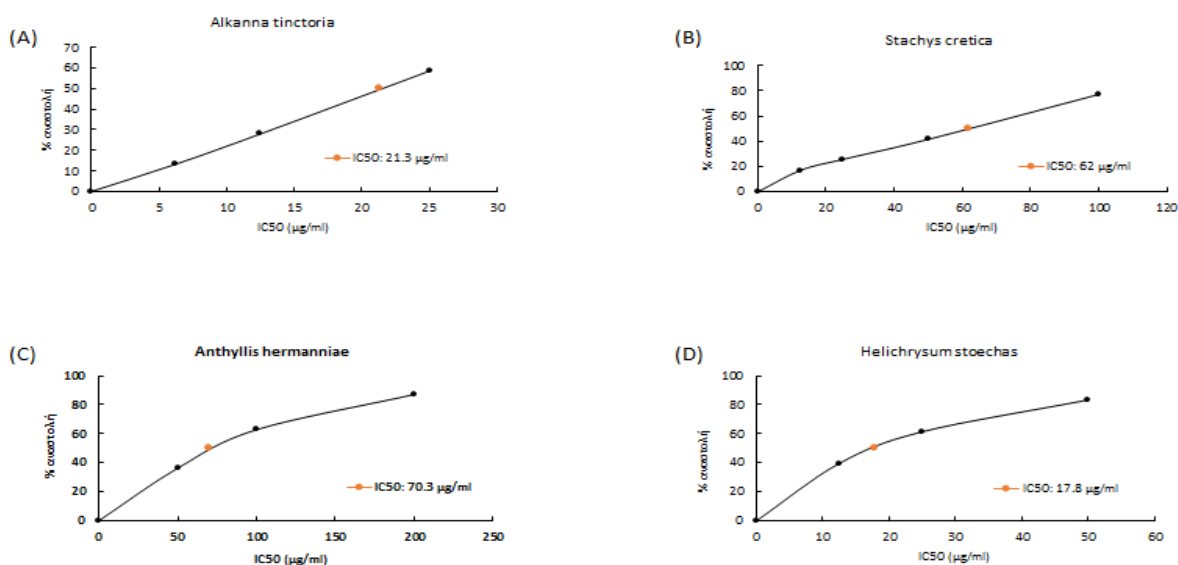
Μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu έγινε υπολογισμός του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν (πίνακας 12). Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων εκφράζεται ως mg γαλλικού οξέος / g εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ταξινόμηση κατά φθίνουσα περιεκτικότητα πολυφαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα, είναι η ακόλουθη: *Helichrysum stoechas* (125,6 mg GA / g εκχυλίσματος) > *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) (64,0 mg GA / g εκχυλίσματος) > *Alkanna tinctoria* (27,1 mg GA / g εκχυλίσματος) > *Anthyllis hermanniae* (26,3 mg GA / g εκχυλίσματος).

Πίνακας 10. Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο *Follin-Ciocalteu*.

| Όνομασία δείγματος   | Ολικό Πολυφαινολικό Περιεχόμενο (mg GAE/ g εκχυλίσματος) |
|--|--|
| <i>Alkanna tinctoria</i> (ρίζες)                                     | 27.1   |
| <i>Stachys cretica</i> (subsp. <i>lesbiaca</i> )<br>(υπέργειο τμήμα) | 64.0   |
| <i>Anthyllis hermanniae</i> (ρίζες)                                  | 26.3   |
| <i>Helichrysum stoechas</i> (υπέργειο τμήμα)                         | 125.6  |

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

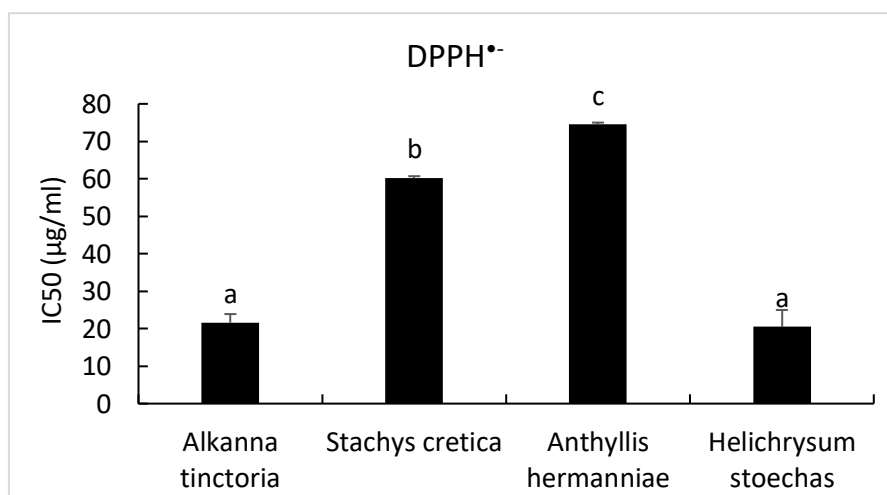
Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH• έγινε χρήση της τιμής IC<sub>50</sub>. Το IC<sub>50</sub> είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην οποία η ρίζα αναστέλλεται κατά 50%. Επομένως είναι αντιληπτό πως όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο πιο δραστικό είναι το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH•, το οποίο με σειρά δραστικότητας από το περισσότερο προς το λιγότερο δραστικό είναι: *Helichrysum stoechas* (IC<sub>50</sub> = 17,8 μg / ml) > *Alkanna tinctoria* (IC<sub>50</sub> = 21,3 μg / ml) > *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) (IC<sub>50</sub> = 62 μg / ml) > *Anthyllis hermanniae* (IC<sub>50</sub> = 70,3 μg / ml). (εικόνα 27)



Εικόνα 26 Η % αναστολή της ρίζας DPPH• από τα εκχυλίσματα A) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), B) *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*), C) *Anthyllis hermanniae*(ρίζες) D) *Helichrysum stoechas*(υπέργειο τμήμα).

Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και των 4 φυτικών εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH συγκριτικά με τα *Stachys cretica* (p=0,02) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) (p=0,00), αλλά παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) (p=0,989). Επιπλέον, και το εκχύλισμα

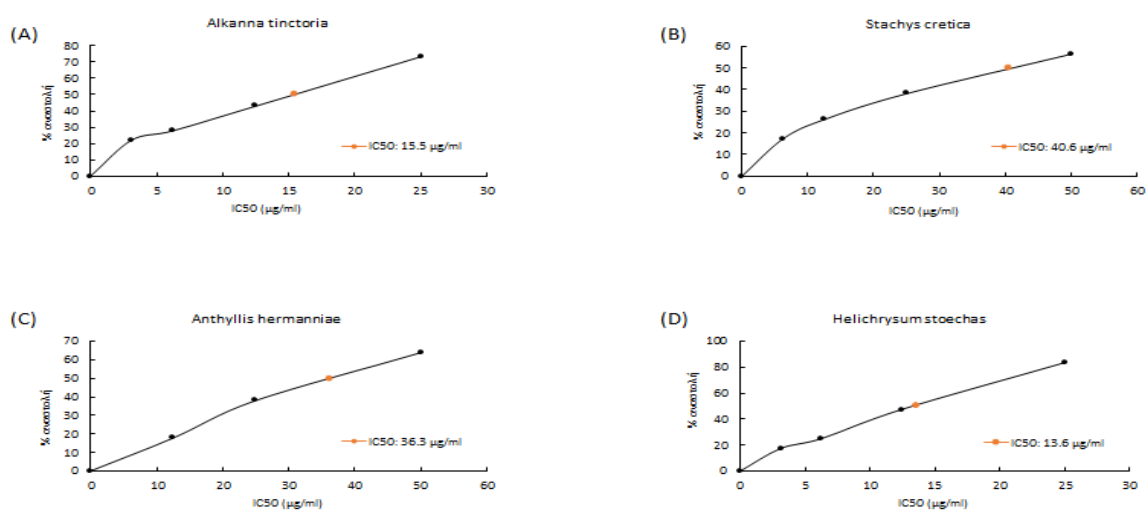
*Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) έχει καλύτερη δυνατότητα εξουδετέρωσης της ρίζας συγκριτικά με το *Stachys cretica* ( $p=0,01$ ) και το *Anthyllis Hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ ) καθώς διέφεραν στατιστικώς σημαντικά. Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα στο εκχύλισμα *Stachys cretica* και *Anthyllis Hermanniae* (ρίζες) ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,056$ ), με το πρώτο να είναι πιο δραστικό (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Η % αναστολή της ρίζας DPPH• συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a-c</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p<0,05$ ).

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

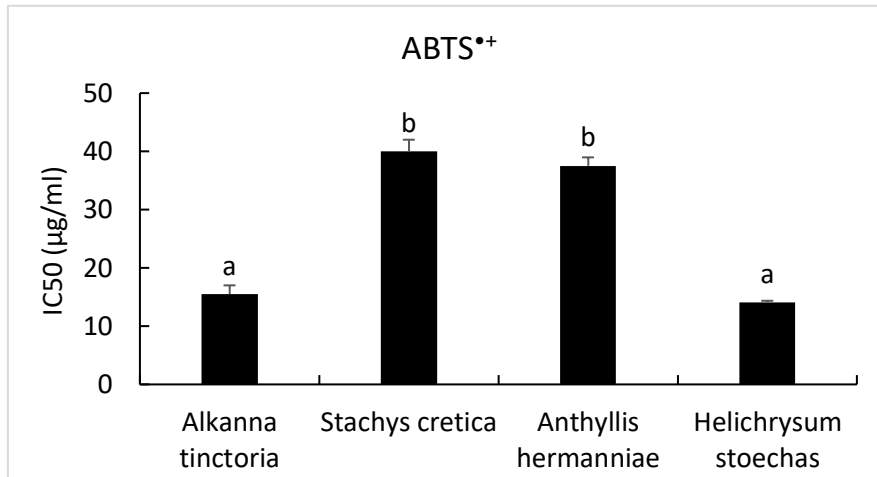
Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων που ανέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•<sup>+</sup> χρησιμοποιήθηκε η τιμή IC<sub>50</sub>. Η συγκεκριμένη τιμή εκφράζει τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος η οποία αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Άρα, όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του IC<sub>50</sub> τόσο πιο δραστικό είναι το εκχύλισμα που εξετάζεται. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα ABTS•<sup>+</sup> με την ακόλουθη σειρά φθίνουσας δραστηριότητας: *Helichrysum stoechas* (IC<sub>50</sub> = 13,6 µg / ml) > *Alkanna tinctoria* (IC<sub>50</sub> = 15,5 µg / ml) > *Anthyllis hermanniae* (IC<sub>50</sub> = 36,3 µg / ml) > *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) (IC<sub>50</sub> = 40,6 µg / ml) (εικόνα 27).



Εικόνα 27. Η % αναστολή της ρίζας ABTS•+ από τα εκχυλίσματα Α) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), Β) *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*), Γ) *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) Δ) *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα).

Έπειτα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν την ρίζα ABTS•+, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) είχε παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,902$ ), αφού οι τιμές των IC<sub>50</sub> δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά. Όμως η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•+ του *Alkanna tinctoria* (ρίζες) ήταν υψηλότερη από αυτή των εκχυλισμάτων *Stachys cretica* ( $p=0,001$ ) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,001$ ), καθώς οι τιμές των IC<sub>50</sub> διέφεραν στατιστικώς σημαντικά. Επιπροσθέτως, τα εκχυλίσματα *Stachys cretica* και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,653$ ) δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους και άρα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ήταν πιο δραστικό, αφού εμφάνισε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα εκχυλίσματα *Stachys cretica* ( $p=0,001$ ) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,001$ ) με τις τιμές τους να διαφέρουν σημαντικά (διάγραμμα 2).

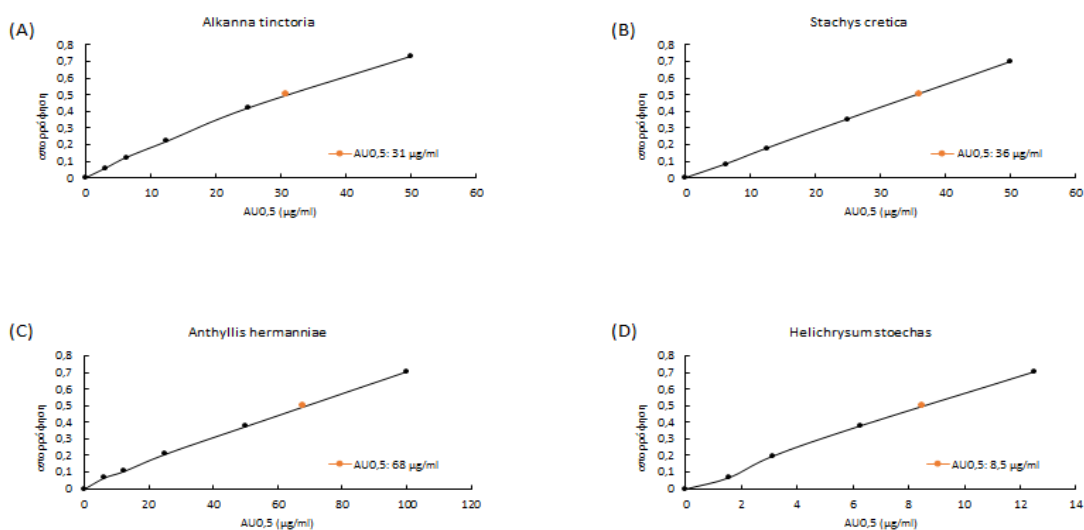




Διάγραμμα 2. Η % αναστολή της ρίζας ABTS•+ συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a- b</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

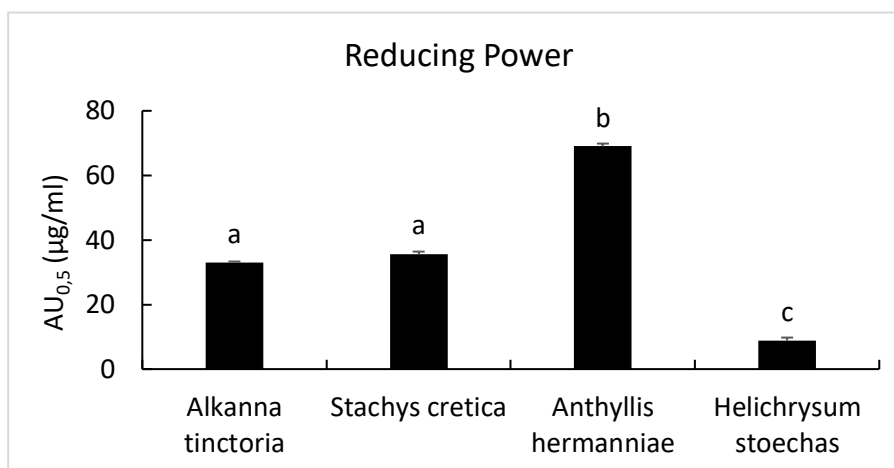
#### 4.4 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου της αναγωγικής δύναμης

Μέσω της ικανότητας των εκχυλισμάτων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, έγινε η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας υπολογίζοντας την αναγωγική τους ισχύ, μέσω της τιμής  $AU_{0,5}$ . Πρόκειται για τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος η οποία αντιστοιχεί σε τιμή απορρόφησης ίση με 0,5 στα 700 nm. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $AU_{0,5}$  τόσο αυξάνεται η δραστηριότητα του εκχυλίσματος. Όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα εμφάνισαν αναγωγική δύναμη με την σειρά φθίνουσας δραστηριότητας να είναι : Helichrysum stoechas ( $AU_{0,5}=8,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Alkanna tinctoria ( $AU_{0,5}= 31 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Stachys cretica (subsp. lesbiaca) ( $AU_{0,5}= 36 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Anthyllis hermanniae ( $AU_{0,5}= 68 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) (εικόνα 28).



Εικόνα 28. Η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων Α) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), Β) *Stachys cretica* (*subsp. lesbiaca*), Γ) *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) Δ) *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα).

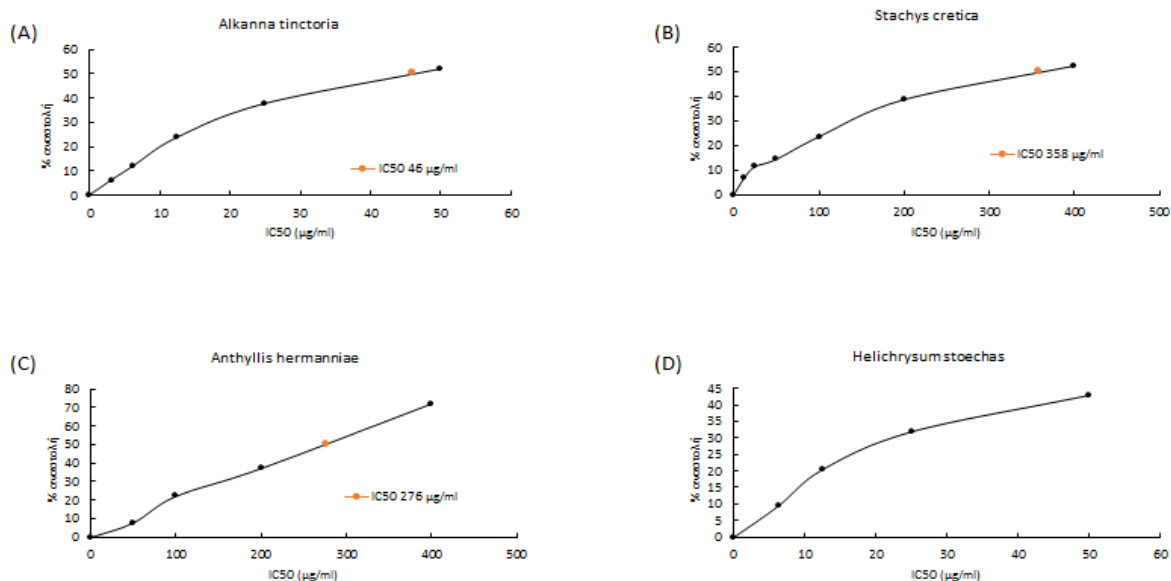
Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μεθόδου, φάνηκε ότι το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά από το *Stachys cretica* ( $p=0,222$ ) και άρα έχουν παρόμοια αναγωγική δύναμη. Όμως το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* έχει τιμές που είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές συγκριτικά με τα εκχυλίσματα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ ) και *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,00$ ). Πιο συγκεκριμένα το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* είναι πιο δραστικό συγκριτικά με το *Anthyllis hermanniae*, αλλά παρουσιάζει χαμηλότερη αναγωγική ισχύ σε σχέση με το *Helichrysum stoechas*. Ακόμη, το εκχύλισμα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) έχει χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα εκχυλίσματα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) ( $p=0,00$ ), *Stachys cretica* ( $p=0,00$ ) και *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,00$ ), με τις τιμές τους να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα [*Alcanna tinctoria* (ρίζες) ( $p=0,00$ ), *Stachys cretica* ( $p=0,00$ ) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ )], καθώς οι μεταξύ τους τιμές ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένες σε σχέση με το *Helichrysum stoechas* (διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Η αναγωγική δύναμη συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a-c</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

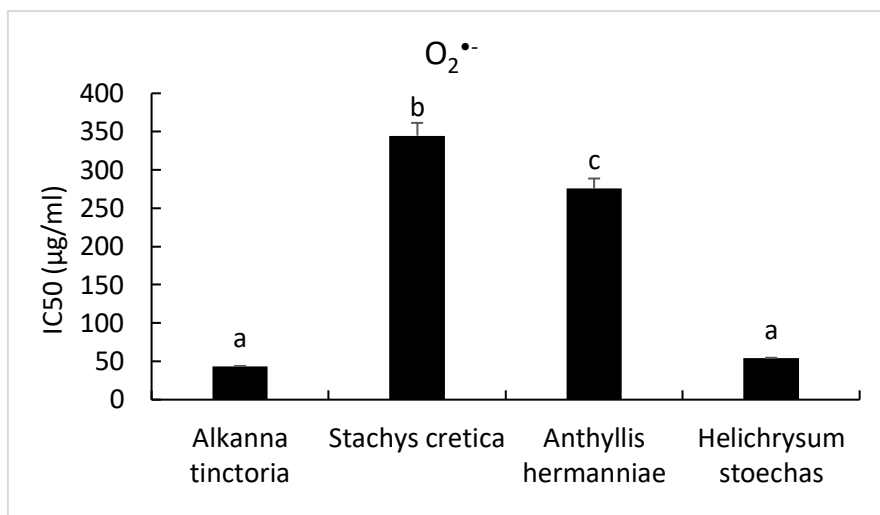
#### 4.5 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O<sub>2</sub>•-

Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας O<sub>2</sub>•- υπολογίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub>. Η τιμή αυτή δείχνει εκείνη τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην οποία η ρίζα αναστέλλεται κατά 50%. Συνεπώς μικρή τιμή του IC<sub>50</sub> συνεπάγεται υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση του εξεταζόμενου εκχυλίσματος. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα O<sub>2</sub>•- με πιο δραστικό να είναι το Alkanna tinctoria (ρίζες) (IC<sub>50</sub> = 46 µg / ml). Ακολουθεί το εκχύλισμα Helichrysum stoechas (υπέργειο τμήμα) (IC<sub>50</sub> = 54,03 µg / ml), το εκχύλισμα Anthyllis hermanniae (ρίζες) (IC<sub>50</sub> = 276 µg / ml) και τέλος το εκχύλισμα Stachys cretica (subsp. lesbiaca) (IC<sub>50</sub> = 358 µg / ml) (εικόνα 29).



Εικόνα 29. Η % αναστολή της ρίζας  $O_2^{\bullet-}$  από τα εκχυλίσματα A) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), B) *Stachys cretica* (subsp. *Lesbiaca*), C) *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) D) *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα).

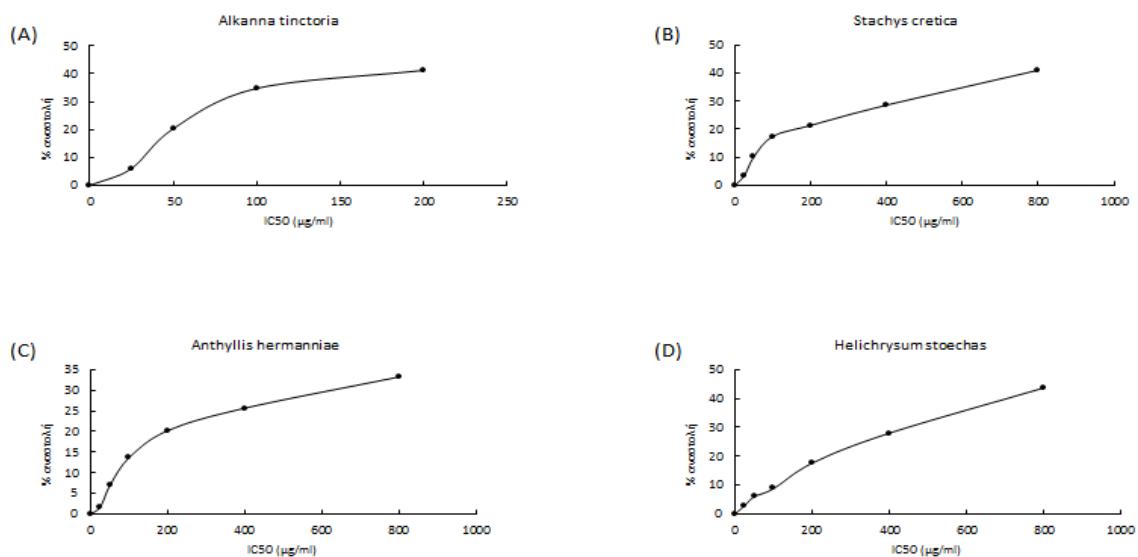
Έπειτα από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) έχει παρόμοια ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας  $O_2^{\bullet-}$  με το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,892$ ), αφού δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά και παράλληλα είναι πιο δραστικό από τα *Stachys cretica* ( $p=0,00$ ) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ ), καθώς έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Επιπλέον, το εκχύλισμα *Stachys cretica* είναι λιγότερο δραστικό συγκριτικά με τα εκχυλίσματα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,033$ ) και *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,00$ ), αφού η τιμή IC<sub>50</sub> ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα άλλα δυο. Τέλος, το εκχύλισμα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) εμφάνισε χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,00$ ), με στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές τιμές IC<sub>50</sub> (διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Η % αναστολή της ρίζας  $O_2^{\bullet-}$  συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a-c</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

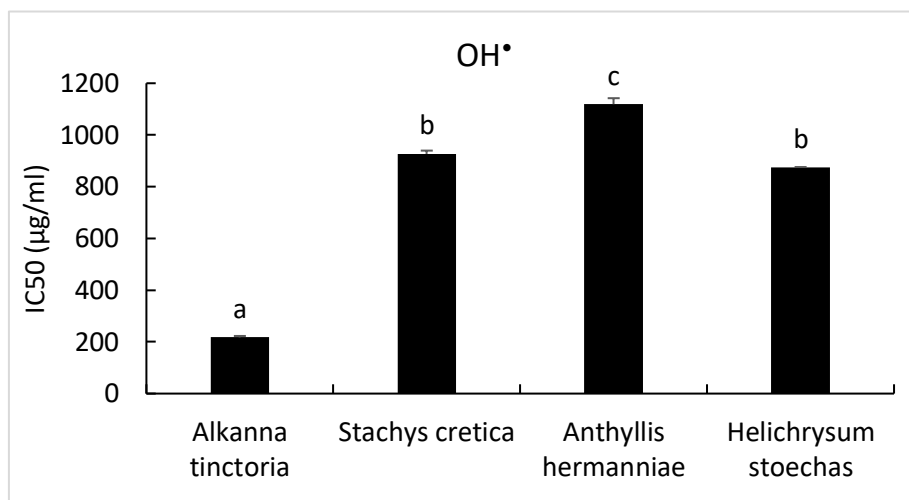
#### 4.6 Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $OH^{\bullet}$

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ένας ακόμη τρόπος εξέτασης ενός εκχυλίσματος με πιθανή αντιοξειδωτική δράση. Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου έγινε η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του υπολογισμού της τιμής  $IC_{50}$ , δηλαδή, εκείνης της συγκέντρωσης στην οποία το κάθε δείγμα εξουδετερώνει τη ρίζα  $OH^{\bullet}$  κατά 50%. Τα εκχυλίσματα με χαμηλή τιμή  $IC_{50}$  έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, δηλαδή είναι πιο δραστικά. Όλα τα φυτικά εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας, τα οποία με σειρά δραστικότητας από το περισσότερο προς το λιγότερο δραστικό είναι: Alkanna tinctoria ( $IC_{50} = 217 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Helichrysum stoechas ( $IC_{50} = 874 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Stachys cretica (subsp. lesbiaca) ( $IC_{50} = 926 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > Anthyllis hermanniae ( $IC_{50} = 1119 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) (εικόνα 30).



Εικόνα 30. Η % αναστολή της ρίζας OH• από τα εκχυλίσματα A) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), B) *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*), C) *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) D) *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα).

Ύστερα από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) είναι το πιο δραστικό συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, η τιμή του *Alkanna tinctoria* (ρίζες) διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις τιμές των *Stachys cretica* ( $p=0,00$ ), *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ ) και *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,00$ ), με το πρώτο να εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Επίσης, το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) διαφέρει σημαντικά όσον αφορά την αντιοξειδωτική του δράση, εμφανίζοντας υψηλότερη δραστικότητα από το εκχύλισμα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,001$ ), αλλά όχι από το εκχύλισμα *Stachys cretica* ( $p=0,157$ ), με το οποίο έχει παρόμοια ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Επιπροσθέτως, το εκχύλισμα *Stachys cretica* παρουσιάζει τιμές που έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά από το εκχύλισμα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,002$ ), με το πρώτο να είναι πιο δραστικό (διάγραμμα 5).

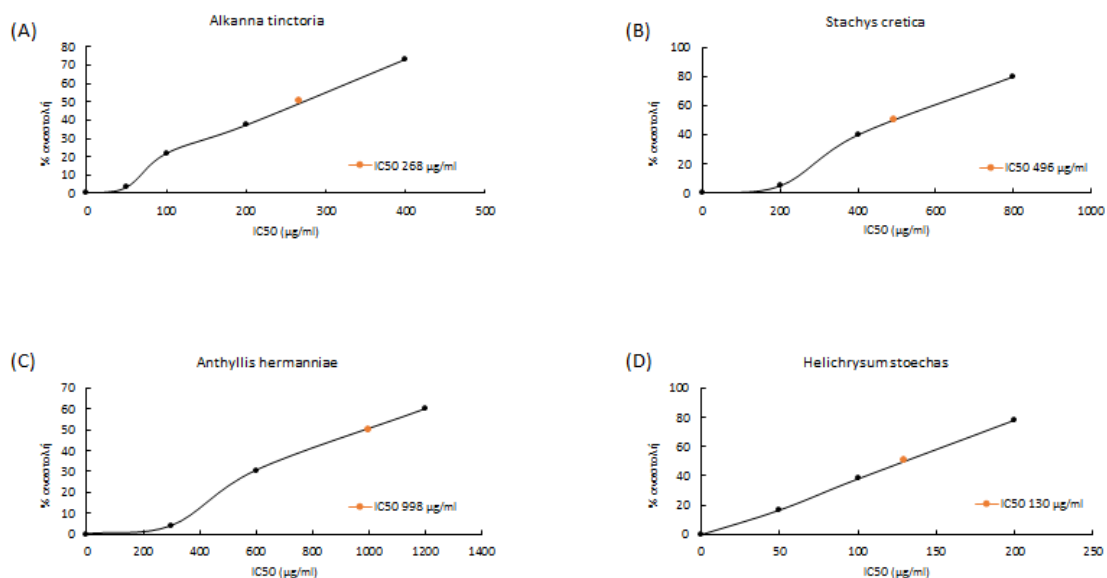


Διάγραμμα 5. Η % αναστολή της ρίζας  $OH^\bullet$  συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a-c</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου ( $ROO^\bullet$ ) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Με την μέθοδο αυτή, προσδιορίστηκε η ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του  $ROO^\bullet$ . Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε η τιμή  $IC_{50}$ , κατά την οποία εκφράζεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Συνεπώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $IC_{50}$  τόσο πιο δραστικό είναι το προς εξέταση εκχύλισμα. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα  $ROO^\bullet$  με την σειρά φθίνουσας δραστικότητας να είναι η παρακάτω: *Helichrysum stoechas* ( $IC_{50}$

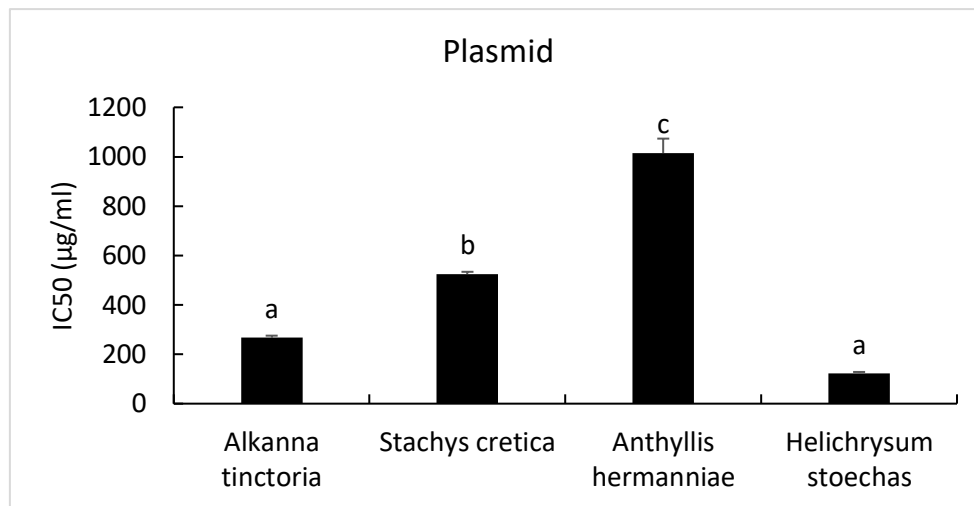
= 130  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) > *Alkanna tinctoria* ( $\text{IC}_{50} = 268 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) ( $\text{IC}_{50} = 496 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) > *Anthyllis hermanniae* ( $\text{IC}_{50} = 998 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) (εικόνα 31).



Εικόνα 31. Η% αναστολή της ρίζας ROO• από τα εκχυλίσματα A) *Alkanna tinctoria* (ρίζες), B) *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*), C) *Anthyllis hermanniae*(ρίζες) D) *Helichrysum stoechas*(υπέργειο τμήμα).

Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων σχετικά με την ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από θραύσεις που προκαλούν οι ρίζες περοξυλίου, παρατηρήθηκε ότι παρόμοια ικανότητα προστασίας εμφανίζει το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* με το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ( $p=0,088$ ). Όμως, η ικανότητα προστασίας του *Alkanna tinctoria* είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή των εκχυλισμάτων *Stachys cretica* ( $p=0,012$ ) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) ( $p=0,00$ ), εφόσον οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Συμπληρωματικά, το εκχύλισμα *Stachys cretica* παρουσιάζει τιμές με στατιστικώς σημαντική διαφορά από το *Anthyllis hermanniae*(ρίζες) ( $p=0,001$ ), με το πρώτο να είναι το πιο δραστικό. Τέλος, το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) έχει μεγαλύτερη δυνατότητα προστασίας του πλασμιδιακού DNA, συγκριτικά με τα *Stachys cretica* ( $p=0,002$ ) και *Anthyllis hermanniae*(ρίζες) ( $p=0,00$ ), των οποίων οι τιμές είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές (διάγραμμα 6).





Διάγραμμα 6. Η % αναστολή της ρίζας ROO• συγκεντρωτικά και στα 4 εκχυλίσματα μετά από στατιστική ανάλυση. <sup>a-c</sup>: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ).

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πίνακας 11. Συνολικός πίνακας αποτελεσμάτων

| Φυτό<br>Μέθοδος                               | <i>Alkanna tinctoria</i><br>(ρίζες) | <i>Stachys cretica</i><br>(subsp. <i>lesbiaca</i> ) | <i>Anthyllis</i><br><i>hermonniae</i> (ρίζες) | <i>Helichrysum</i><br><i>stoechas</i> (υπέργειο<br>τμήμα) |
|---|-------------------------------------|---|---|---|
| DPPH•<br>(IC <sub>50</sub> µg/ml)             | 21,57 ± 2,33                        | 60,28 ± 0,42  | 74,5 ± 0,5                                    | 20,5 ± 4,5  |
| ABTS•+<br>(IC <sub>50</sub> µg/ml)            | 15,5 ± 1,5                          | 40 ± 2  | 37,52 ± 1,45                                  | 14,12 ± 0,23  |
| OH•<br>(IC <sub>50</sub> µg/ml)               | 217,2 ± 5,58                        | 926,8 ± 12,76                                       | 1119,1 ± 23,2                                 | 874 ± 1,98  |
| O <sub>2</sub> •-<br>(IC <sub>50</sub> µg/ml) | 43,5 ± 0,5                          | 344,75 ± 16,6                                       | 275,66 ± 13,1                                 | 54,03 ± 0,66  |
| ROO•<br>(IC <sub>50</sub> µg/ml)              | 266,6 ± 8,66                        | 525,1 ± 8,67  | 1015,1 ± 58,2                                 | 123,76 ± 4,5  |
| Reducing Power<br>(AU <sub>0,5</sub> µg/ml)   | 33,08 ± 0,25                        | 35,65 ± 0,74  | 69 ± 0,85                                     | 8,77 ± 1  |
| Folin-Ciocalteu<br>(mg GAE/g sample)          | 27,1                                | 64,01   | 26,26   | 125,63  |

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται τόσο από φυσιολογικές δραστηριότητες στα ανθρώπινα κύτταρα (μεταβολισμός, φλεγμονή) όσο και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. κάπνισμα, UV ακτινοβολία). Αν και η παραγωγή ελεύθερων ριζών υπό φυσιολογικές συνθήκες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος, όταν παράγονται υπερβολικές ποσότητες αυτών ο οργανισμός οδηγείται σε μία κατάσταση, η οποία ονομάζεται *οξειδωτικό στρες*. Αυτή η κατάσταση αντιπροσωπεύει μια επιβλαβή διαδικασία που μπορεί να αλλάξει καταστρεπτικά τις δομές των βιομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA). Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε κυτταρική βλάβη, μετάλλαξη γονιδίων και καρκινογένεση, συμβάλλοντας έτσι στην παθογένεση πολλών ασθενειών (Jamshidi-kia et al., 2020).

Η συνεχής έκθεση στις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης και μέτρα προστασίας για τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η δυσμενής κατάσταση

που προκαλείται λόγω υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών στον οργανισμό, αντιμετωπίζεται είτε με ενδογενή παραγωγή αντιοξειδωτικών είτε με πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της κατανάλωσης συγκεκριμένων τροφών. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών που προκαλείται από τις χημικές αντιδράσεις από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Yiannakopoulou, 2009). Μία σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών είναι οι πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών που εμπλέκονται στην άμυνα αυτών. Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορεί να επηρεάζουν το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα του προϊόντος. Έχει διερευνηθεί και αποδειχθεί ότι αυτά τα μόρια δρουν σαν αντιοξειδωτικά, αφού έχουν τη δυνατότητα τερματισμού των αλυσιδωτών αντιδράσεων που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Προς το τέλος του 20ου αιώνα, επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η μακροπρόθεσμη κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυτικές πολυφαινόλες είχε ως αποτέλεσμα προστασία όσον αφορά την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη, οστεοπόρωσης και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Pandey & Rizvi, 2009).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τεσσάρων εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών του Βορείου Αιγαίου. Τα φαρμακευτικά φυτά που μελετήθηκαν είναι τα *Alkanna Tinctoria* (ρίζες), *Stachys Cretica* subsp. *lesbiaca*, *Anthyllis Hermanniae* (ρίζες) και *Helichrysum Stoechas* (υπέργειο τμήμα). Η επιλογή αυτών των εκχυλισμάτων έγινε γιατί διαθέτουν ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό το οποίο αφορά την περιεκτικότητα τους σε πολυφαινολικές ενώσεις και παράγωγα αυτών. Τα φυτά, αφού συλλέχθηκαν υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διάλυση των εκχυλισμάτων σε διαλύτη νερό/αιθανόλη (50:50).

Προκειμένου να γίνει σύγκριση μεταξύ αυτών, ώστε να βρεθεί το πιο δραστικό και αποτελεσματικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκαν 7 διαφορετικές μέθοδοι. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων. Συνεχίζοντας, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH• και ABTS•<sup>+</sup>. Ακόμη, καθορίστηκε η δυνατότητα τους να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, δηλαδή η αναγωγική δύναμη που διαθέτουν. Επιπλέον, με εφαρμογή των μεθόδων superoxide και hydroxyl radical scavenging activity μελετήθηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώσουν τις σταθερές

και πολύ δραστικές ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  και  $OH^{\bullet}$ . Με την τελευταία μέθοδο, έγινε *in vitro* εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ικανότητα τους να προστατέψουν το πλασμιδιακό DNA από μονόκλιωνα θραύσματα προκαλούμενα από δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως οι ρίζες περοξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ). Με εξαίρεση την μέθοδο Folin-Ciocalteu και την μέθοδο αναγωγικής δύναμης, στις υπόλοιπες μεθόδους έγινε προσδιορισμός της τιμής  $IC_{50}$ . Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ως  $IC_{50}$  ορίζεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος κατά την οποία εξουδετερώνεται το 50% της ρίζας. Επομένως, όσο μικρότερη τιμή  $IC_{50}$  εμφανίζει ένα φαρμακευτικό εκχύλισμα, τόσο πιο δραστικό είναι. Στις μεθόδους αυτές, μετά από ποσοτικοποίηση, πραγματοποιήθηκε διεξαγωγή των αποτελεσμάτων σε μορφή γραφημάτων, στα οποία φαίνεται η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσον αφορά τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης, μετά από ποσοτικοποίηση έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε μορφή γραφημάτων. Στα γραφήματα αυτά υπολογίστηκε η τιμή  $AU_{0,5}$ , που είναι εκείνη η συγκέντρωση που έχει τιμή απορρόφησης ίση με 0,5 στα 700 nm, σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

Όλα τα εκχυλίσματα διέθεταν πολυφαινολικές ενώσεις και εμφάνισαν τόσο αντιοξειδωτική όσο και αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Μετά από υπολογισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu παρατηρήθηκε ότι από τα 4 εκχυλίσματα που εξετάστηκαν αυτό με το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο ήταν το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ακολουθούμενο από τα *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*), *Alkanna tinctoria* (ρίζες), *Anthyllis hermanniae* (ρίζες). Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν στην μέθοδο DPPH $\bullet$  το εκχύλισμα που διαθέτει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα). Το αμέσως επόμενο ήταν το *Alkanna tinctoria* (ρίζες) με μικρή διαφορά στην τιμή του  $IC_{50}$ . Εν συνεχεία, ήταν το *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) και τέλος το λιγότερο δραστικό εκχύλισμα ήταν το *Anthyllis hermanniae* (ρίζες). Επιπλέον, μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων από την μέθοδο ABTS $\bullet^+$ , η οποία θεωρείται πιο αξιόπιστη καθώς μέσω αυτής ανιχνεύονται υδρόφιλα και λιπόφιλα μόρια, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα που εμφάνιζε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν για ακόμη μία φορά το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) με πολύ μικρή διαφορά από το *Alkanna tinctoria* (ρίζες). Τα δύο λιγότερο δραστικά ήταν τα εκχυλίσματα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) και *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο αναγωγικής δύναμης ήταν

σύμφωνα με τις προηγούμενες μεθόδους αναφορικά με τα δυο πιο δραστικά εκχυλίσματα. Το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ήταν πάλι το εκχύλισμα που εμφάνισε την μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη και άρα το πιο δραστικό. Το επόμενο σε σειρά δραστικότητας ήταν το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες). Τέλος, τα λιγότερο δραστικά εκχυλίσματα ήταν το *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες).

Όπως παρατηρούμε στις μεθόδους που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής το εκχύλισμα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είναι και το πιο δραστικό. Σε αντίθεση με το εκχύλισμα *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) το οποίο δεν εμφανίζει μεγάλη δραστικότητα συγκριτικά με το αρκετά υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο που ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Το γεγονός αυτό, μπορεί να σχετίζεται με την ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών, την χρονική περίοδο συλλογής του δείγματος, τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής καθώς και τη μέθοδο επεξεργασίας του.

Η ρίζα  $O_2\bullet^-$  όπως και η ρίζα  $OH\bullet$  είναι δύο πολύ δραστικές ρίζες με δυνατότητα πρόκλησης σημαντικών βλαβών. Για τον λόγο αυτό, μέσα από τις μεθόδους superoxide και hydroxyl radical scavenging activity εξετάστηκε αν τα 4 εκχυλίσματα έχουν την ικανότητα να εξουδετερώσουν αυτές τις σταθερές ρίζες. Όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα  $O_2\bullet^-$  με το πιο δραστικό να είναι το *Alkanna tinctoria* (ρίζες). Ακολουθεί το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα), το εκχύλισμα *Anthyllis hermanniae* (ρίζες) και τέλος το εκχύλισμα *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*). Αναφορικά με τα αποτελέσματα από τη μέθοδο hydroxyl το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν το *Alkanna tinctoria* (ρίζες). Η σειρά φθίνουσας δραστικότητας των υπόλοιπων εκχυλισμάτων είναι *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα), *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες). Ο λόγος που στις δύο αυτές μεθόδους πιο δραστικό είναι το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) και όχι το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ίσως έχει να κάνει με τη μεγάλη περιεκτικότητα του πρώτου στις ουσίες αλκαννίνη και σικονίνη (Kourounakis et al., 2002). Πιθανόν η αντιοξειδωτική ικανότητα που εμφανίζεται στα αποτελέσματα να επηρεάζεται και από τις δύο αυτές ουσίες, καθώς πρόκειται για δύο εναντιομερείς υδροξυ-ναφθοκινόνες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι σε ενεργά ήδη οξυγόνου (Ozer et al., 2010).

Στη συνέχεια, με την τελευταία μέθοδο, μελετήθηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των 4 εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε αν τα 4 αυτά εκχυλίσματα είχαν

την ικανότητα να προστατεύσουν το πλασμιδιακό DNA από βλάβες, δηλαδή από μονόκλωνα θραύσματα τα οποία προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι η ρίζα ROO•. Μεγαλύτερη ικανότητα προστασίας εμφάνισε το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα). Ακολουθούν τα *Alkanna tinctoria* (ρίζες), *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες).

Με βάση τα αποτελέσματα από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των φαρμακευτικών φυτών, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) και *Alkanna tinctoria* (ρίζες) είναι πιο ωφέλιμοι και αποτελεσματικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες συγκριτικά με τα *Stachys cretica* (subsp. *lesbiaca*) και *Anthyllis hermanniae* (ρίζες).

Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί, ότι στις 5 από τις 7 μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων φυτικών εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) ήταν το πιο δραστικό από τα άλλα 3 φυτικά εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, αυτό παρατηρήθηκε στις μεθόδους DPPH•, ABTS•<sup>+</sup>, reducing power και στη μέθοδο του πλασμιδίου, αφού οι τιμές των IC<sub>50</sub> σε αυτές τις μεθόδους ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερες από τα άλλα τρία εκχυλίσματα (μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> σημαίνει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα). Το γεγονός αυτό, πιθανόν να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα πολυφαινολών του συγκεκριμένου εκχυλίσματος όπως φάνηκε και από τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, αφού σύμφωνα με αυτά είχε την υψηλότερη τιμή πολυφαινολικού περιεχομένου. Ωστόσο, όσον αφορά τις μεθόδους εξουδετέρωσης των ριζών O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> και OH•, το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) ήταν το πιο δραστικό εκχύλισμα, με υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης των συγκεκριμένων ριζών. Το αποτέλεσμα αυτό, έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι οι ρίζες O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> και OH• παράγονται ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό ενώ οι ρίζες που χρησιμοποιήθηκαν στις υπόλοιπες μεθόδους είναι τεχνητές. Επομένως, είναι πιθανό το εκχύλισμα *Alkanna tinctoria* (ρίζες) να έχει πιο ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* (ρίζες) συγκριτικά με το *Helichrysum stoechas* (υπέργειο τμήμα) μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική ποιοτική σύσταση πολυφαινολών στα εκχυλίσματα, καθώς, η σύσταση των πολυφαινολών επηρεάζεται τόσο από κλιματικούς και εδαφικούς παράγοντες (όπως είναι το χώμα, η έκθεση στον ήλιο και η βροχή) όσο και από το τμήμα του φυτού

που εξετάζεται (Pandey & Rizvi, 2009). Ακόμη, η υψηλή δραστηριότητα του εκχυλίσματος *Alkanna tinctoria* (ρίζες) στις συγκεκριμένες μεθόδους, δύναται να οφείλεται στην περιεκτικότητα της ρίζας του φυτού σε ενώσεις με δομή υδροκινόνης/κινόνης όπως είναι οι λιπόφιλες ενώσεις αλκαννίνη, σικονίνη και τα παράγωγα τους. Οι ενώσεις αυτές, εμφανίζουν υψηλή ικανότητα εξουδετέρωσης - ειδικά της ρίζας  $\text{OH}^\bullet$ - καθώς και ικανότητα δημιουργίας χηλικών ενώσεων με  $\text{Fe}^{2+}$ , συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό, στην αναστολή της αντίδρασης Fenton (A. N. Assimopoulou & Papageorgiou, 2005; Kourounakis et al., 2002).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας με αποτελέσματα από μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκαν ανάλογες μέθοδοι σε φυτικά εκχυλίσματα ίδιου γένους με αυτά που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική, παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Στις μελέτες αυτές τα εκχυλίσματα προήλθαν από διαφορετικές περιοχές και χρησιμοποιήθηκε ποικιλία διαλυτών. Αρχικά, σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα φλοιός ρίζας του φυτού *Alkanna tinctoria* από την Παλαιστίνη χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικοί πολικοί διαλύτες (νερό, μεθανόλη, ακετόνη). Αποτελέσματα από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu δείχνουν μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων και στα 3 δείγματα συγκριτικά με αυτά της παρούσας εργασίας. Στη μέθοδο DPPH το δείγμα με διαλύτη την ακετόνη εμφάνισε μεγαλύτερη δραστηριότητα, αλλά τα άλλα δύο έδωσαν τιμές παρόμοιες με αυτές της παρούσας εργασίας (Jaradat et al., 2018). Πιθανόν οι συγκεκριμένοι διαλύτες να διατηρούν καλύτερα το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος, καθώς έχουν υψηλή πολικότητα. Επιπλέον, αποτελέσματα από δείγματα υπέργειου τμήματος του *Alkanna tinctoria* διαλυμένα σε νερό, έδειξαν πως ήταν λιγότερο δραστικά συγκριτικά με τα δείγματα από τη ρίζα του φυτού (Guemmaz et al., 2020). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι δεν διαθέτουν την ίδια ποσοτική ή ποιοτική σύσταση πολυφαινολών όλα τα μέρη του φυτού. Ακόμη, εκχυλίσματα από τη ρίζα 4 διαφορετικών φυτικών ειδών του γένους *Alkanna* από το Ιράν, εμφάνισαν μειωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Salimikia et al., 2015). Επίσης, σε έρευνα που μελετήθηκαν εκχυλίσματα διαφορετικών υποειδών του *Stachys cretica* τα οποία εμφανίζονται στην Τουρκία, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μεθόδους DPPH και ABTS δείχνουν ότι το υποείδος *lesbiaca* εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με άλλα υποείδη του συγκεκριμένου φυτού (Bahadori & Kirkan, 2019). Η μειωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με τα παρόντα εκχυλίσματα πιθανόν να

οφείλεται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά που μπορεί να υπάρχουν ανάμεσα στα είδη του φυτού, αλλά και στην διαφορετικότητα των κλιματικών συνθηκών και του εδάφους. Τέλος, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με εκχυλίσματα φύλλων και ανθών του *Helichrysum stoechas* από την Αλγερία, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών. Για τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε διαλύτης νερό/μεθανόλη (50:50). Τα εκχυλίσματα εμφάνισαν υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο, αλλά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στη μέθοδο ABTS, συγκριτικά με το εκχύλισμα *Helichrysum stoechas* που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία (Haddouchi et al., 2014). Πιθανόν η χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη να είναι καλύτερη για τη διατήρηση του πολυφαινολικού περιεχομένου, όμως η μέθοδος ABTS<sup>•+</sup> θεωρείται πιο αξιόπιστη καθώς ανιχνεύει τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια (Bibi Sadeer et al., 2020).

Επιπροσθέτως, σε μελέτη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βρώσιμων ελληνικών βοτάνων με παρόμοιες μεθόδους, οπότε είναι δυνατόν να γίνει μια σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής, για τη διαμόρφωση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αυτά να είναι πιο δραστικά συγκριτικά με τα φυτικά εκχυλίσματα του Βορείου Αιγαίου της συγκεκριμένης διπλωματικής (Mikropoulou et al., 2018). Όμως, έρευνα που αφορούσε εκχυλίσματα από άνθη ελιάς, έδειξε τα εκχυλίσματα αυτά να εμφανίζουν παρόμοιες τιμές με τα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή, στις μεθόδους Folin-Ciocalteu και εξουδετέρωσης των ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> (Kouka et al., 2019). Οπότε τα εκχυλίσματα αυτά έχουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με τα φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία (Kouka et al., 2019). Τέλος, εκχυλίσματα από φυτά όπως *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* και *Ryrocantha coccinea* που μελετήθηκαν από την ομάδα του εργαστηρίου, παρουσίασαν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των φαρμακευτικών φυτών *Alkanna Tinctoria*(ρίζες), *Stachys Cretica subsp. lesbiaca*, *Anthyllis Hermanniae*(ρίζες) και *Helichrysum Stoechas*(υπέργειο τμήμα) (Kerasioti et al., 2019).

Συμπερασματικά, από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, κυρίως τα *Helichrysum Stoechas* (υπέργειο τμήμα) και *Alkanna Tinctoria* (ρίζες) που εμφάνισαν αρκετά μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων βιοδραστικών προϊόντων, όπως είναι τα τρόφιμα και τα ροφήματα. Επίσης, με κατάλληλη επεξεργασία μπορούν να αποτελέσουν συστατικά



φαρμάκων αλλά και συμπληρωμάτων διατροφής για την βελτιστοποίηση της υγείας του ανθρώπου.

Αφού μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων *in vitro* με χρήση φωτομετρικών μεθόδων και η αντιμεταλλαξιγόνος δράση μέσω της ικανότητας προστασίας του πλασμιδιακού DNA από βλάβες, σαν μελλοντική εργασία προτείνεται η μελέτη αυτών των εκχυλισμάτων *in vivo* με τη χορήγησή τους σε κυτταρικές σειρές. Οι φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι χρήσιμα εργαλεία προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητα των φυτικών ενώσεων σχετικά με τη μεταβολή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για πιο ολοκληρωμένη μελέτη των φυτικών εκχυλισμάτων του Βορείου Αιγαίου, καθώς είναι μία γέφυρα μεταξύ *in vitro* και *in vivo* διαδικασιών και μπορούν να προσομοιάσουν τις αποκρίσεις ενός ιστού. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ελέγξουμε τόσο την τοξικότητα που μπορεί να προκληθεί από μια ουσία στα κύτταρα όσο και να διαπιστώσουμε, μέσω της κυτταρομετρίας ροής τα επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη (GSH), ενώ συγχρόνως, μπορούν να προσδιοριστούν και τα επίπεδα δυνητικά επιβλαβών μορίων, όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

Η οικονομία της Ελλάδας βασίζεται στη γεωργία σε αρκετά μεγάλο βαθμό και μπορεί να επωφεληθεί από την καλλιέργεια τέτοιων φαρμακευτικών φυτών. Επομένως, ανάλογες μελέτες για φυτικά εκχυλίσματα με ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου ιδιότητες, μπορούν να τα καταστήσουν πιο αναγνωρίσιμα και να συμβάλλουν στην παραγωγή φυτικών προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία. Συνεπώς, αποτελεί μεγάλη ανάγκη η εκμετάλλευση των υπαρχόντων φυσικών πόρων με ταυτόχρονη αξιοποίηση των γνώσεων που διαθέτουμε μέσω της έρευνας, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών με βάση τα φυτικά προϊόντα.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A, D., C, P., P, K., & D, B. (1998). Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 31(5), 351–354. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(98\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(98)00086-6)
- Ahmad, W., Ijaz, B., Shabbiri, K., Ahmed, F., & Rehman, S. (2017). Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: Mechanisms behind ROS/ RNS generation. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0379-z>
- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>
- Assimopoulou, A., Boskou, D., & Papageorgiou, V. P. (2004). Antioxidant activities of alkannin, shikonin and *Alkanna tinctoria* root extracts in oil substrates. *Food Chemistry*, 87, 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.017>
- Assimopoulou, A. N., & Papageorgiou, V. P. (2005). Radical scavenging activity of *Alkanna tinctoria* root extracts and their main constituents, hydroxynaphthoquinones. *Phytotherapy Research: PTR*, 19(2), 141–147. <https://doi.org/10.1002/ptr.1645>
- Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatric Research*, 66(2), 121–127. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb>
- Axiotis, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2018). An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in the Greek Islands of North Aegean Region. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00409>
- Bahadori, M. B., & Kirkan, B. (2019). Phenolic ingredients and therapeutic potential of *Stachys cretica* subsp. *Smyrnaea* for the management of oxidative stress, Alzheimer's disease, hyperglycemia, and melasma. *Industrial Crops and Products*, 127, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.066>
- Barja, G. (2000). The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milan, Italy)*, 12(5), 342–355. <https://doi.org/10.1007/BF03339859>
- Becker, M., Nunes, G., Ribeiro, D., Silva, F., Catanante, G., & Marty, J. (2019). Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (2005). Antioxidants | Diet and antioxidant defense. In *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 117–131). <https://doi.org/10.1016/B0-12-226694-3/00017-X>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, *9*(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Boligon, A. A. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, *4*(7). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188>
- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., & Carney, J. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *854*, 448–462. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09924.x>
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., & Facino, R. M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *24*(3), 517–526. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00431-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00431-3)
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, *59*(3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*(3), 481–493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Chevion, M., Berenshtein, E., & Stadtman, E. R. (2000). Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, *33* Suppl, S99-108.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, *413*, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.002>
- Deaton, C. M., & Marlin, D. J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, *2*(3), 278–291. [https://doi.org/10.1053/S1534-7516\(03\)00070-2](https://doi.org/10.1053/S1534-7516(03)00070-2)

- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00826-2)
- Dp, J. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Eroğlu, H. E., Aksoy, A., Hamzaoğlu, E., Budak, U., & Albayrak, S. (2009). Cytogenetic effects of nine *Helichrysum* taxa in human lymphocytes culture. *Cytotechnology*, 59(1), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9193-0>
- Evans, L. W., & Omaye, S. T. (2017). Use of Saliva Biomarkers to Monitor Efficacy of Vitamin C in Exercise-Induced Oxidative Stress. *Antioxidants*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/antiox6010005>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)00916-4)
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012, May 16). *Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration* [Review Article]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Giusso del Galdo, G. (2009). Taxonomic Remarks on the *Anthyllis hermanniae* L. (Fabaceae, Faboideae) Species Complex of the Mediterranean Flora. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 16, 304–314. [https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2006\)16\[304:TROTAH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2006)16[304:TROTAH]2.0.CO;2)

- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- Guemmaz, T., Arrar, L., & Baghiani, A. (2020). Total Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Algerian *Alkanna tinctoria* aerial part Extracts. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10, 39–44. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4349>
- Gupta, Y. K., Briyal, S., & Chaudhary, G. (2002). Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 71(1–2), 245–249. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00663-3](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00663-3)
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z., & Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *Saxatile*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415–422. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60065-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60065-0)
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (n.d.-a). Free Radicals in Biology and Medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Retrieved December 29, 2020, from <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
- Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (n.d.-b). Free Radicals in Biology and Medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Retrieved December 29, 2020, from <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
- Hao, M., & Liu, R. (2019). Molecular mechanism of CAT and SOD activity change under MPA-CdTe quantum dots induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 220, 117104. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.05.009>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>

- Homma, T., & Fujii, J. (2015). Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Current Drug Metabolism*, 16(7), 560–571. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151015114515>
- Iliadou, E., Kallimanis, A. S., Dimopoulos, P., & Panitsa, M. (2014). Comparing the two Greek archipelagos plant species diversity and endemism patterns highlight the importance of isolation and precipitation as biodiversity drivers. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-16>
- Jamshidi-kia, F., Wibowo, J. P., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhasanzadeh, Z., & Lorigooini, Z. (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(3), 191–199. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.25>
- Jaradat, N. A., Zaid, A. N., Hussien, F., Issa, L., Altamimi, M., Fuqaha, B., Nawahda, A., & Assadi, M. (2018). Phytoconstituents, antioxidant, sun protection and skin anti-wrinkle effects using four solvents fractions of the root bark of the traditional plant *Alkanna tinctoria* (L.). *European Journal of Integrative Medicine*, 21, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.07.003>
- Johannes, T. W., Woodyer, R. D., & Zhao, H. (2006). High-throughput Screening Methods Developed for Oxidoreductases. *Enzyme Assays: High-Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting*, 77–93. <https://doi.org/10.1002/3527607846.ch3>
- Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J., Lynn, M. J., & Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(4), 625–635. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00275-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00275-0)
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*, 11(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(98)00037-0)
- Kawamura, T., & Muraoka, I. (2018). Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/antiox7090119>
- Kerasioti, E., Apostolou, A., Kafantaris, I., Chronis, K., Kokka, E., Dimitriadou, C., Tzanetou, E. N., Priftis, A., Koulocheri, S. D., Haroutounian, S. A., Kouretas, D., & Stagos, D. (2019). Polyphenolic Composition of *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* and *Pyrocantha coccinea* Extracts and Assessment of Their Antioxidant Activity in Human Endothelial Cells. *Antioxidants*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antiox8040092>
- Koren, H. S. (1995). Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl 6, 235–242. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s6235>

- Kouka, P., Tekos, F., Valta, K., Mavros, P., Veskokoukis, A. S., Angelis, A., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncology Reports*, *42*(6), 2814–2825. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7386>
- Kourounakis, A. P., Assimopoulou, A. N., Papageorgiou, V. P., Gavalas, A., & Kourounakis, P. N. (2002). Alkannin and Shikonin: Effect on Free Radical Processes and on Inflammation - A Preliminary Pharmacochemical Investigation. *Archiv Der Pharmazie*, *335*(6), 262–266. [https://doi.org/10.1002/1521-4184\(200208\)335:6<262::AID-ARDP262>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4184(200208)335:6<262::AID-ARDP262>3.0.CO;2-Y)
- Krinsky, N. I. (2002). Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 540S-542S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.540S>
- LAZAR, T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, *91*(6), 750–751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(3), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, *134*(12 Suppl), 3479S-3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., & Mikolajczyk, T. P. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *70*(6). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13>

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mikropoulou, E. V., Vougiotiannopoulou, K., Kalpoutzakis, E., Sklirou, A. D., Skaperda, Z., Houriet, J., Wolfender, J.-L., Trougkos, I. P., Kouretas, D., Halabalaki, M., & Mitakou, S. (2018). Phytochemical Composition of the Decoctions of Greek Edible Greens (Chórta) and Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071541>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.05.023>
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, *13*(3), 295–309.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, *43*(9 Suppl), 30S-34S.
- Ozer, M., Tepe, B., & Can, Ş. (2010). Essential Oil Composition and Antioxidant Activities of Alkanet (*Alkanna tinctoria* subsp. *Tinctoria*). *Food Science and Biotechnology*, *19*, 1177–1183. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0168-x>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–278.
- Pant, B. (2014). Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *808*, 25–39. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9_3)
- Papageorgiou, D., Bebeli, P. J., Panitsa, M., & Schunko, C. (2020). Local knowledge about sustainable harvesting and availability of wild medicinal plant species in Lemnos island, Greece. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *16*. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00390-4>
- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., & McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: Physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*, *68*(10), 571–603. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00319.x>



- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>
- Rasines-Perea, Z., & Teissedre, P.-L. (2017). Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010068>
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(11), 3577–3585. <https://doi.org/10.1002/jcb.26097>
- Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D. M., Sevastyanova, T., Harmsen, M. C., & Kzhyskowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*, 224(2), 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.11.010>
- Ríos, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1991). Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Ethnopharmacology*, 33(1–2), 51–55. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90160-f](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90160-f)
- Ritchie, M. R. (2007). Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: What do we know about their pattern of usage? *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(4), 479–482. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005794>
- Salimikia, I., Yazdinezhad, A. R., Golfakhrabadi, F., & Esfahani, H. R. M. (2015). In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of four *Alkanna* species growing in

- Iran. *Pharmacognosy Research*, 7(1), 100–104. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.147218>
- Salvi, A., Carrupt, P., Tillement, J., & Testa, B. (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: Assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*, 61(10), 1237–1242. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00607-4)
- Santanam, N., Ramachandran, S., & Parthasarathy, S. (1998). Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 16(4), 275–280. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1016287>
- Santos, C. M. M., & Silva, A. M. S. (2020). The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids. *Molecules*, 25(3), 696. <https://doi.org/10.3390/molecules25030696>
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S–2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- Semerdjieva, I., Petrova, G., Yankova-Tsvetkova, E., Doncheva, T., Kostova, N., Nikolova, R., & Zheljazkov, V. D. (2020). Genetic diversity, reproductive capacity and alkaloids content in three endemic *Alkanna* species. *PLoS ONE*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233516>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Srivastava, J., Lambert, J., & Vietmeyer, N. (1996). Medicinal Plants: An Expanding Role in Development. In *Papers* (No. 320; Papers). World Bank - Technical Papers. <https://ideas.repec.org/p/fth/wobate/320.html>

- Steinbrenner, H., Speckmann, B., & Klotz, L.-O. (2016). Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *595*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.06.024>
- Stocker, R., & Keane, J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, *84*(4), 1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>
- Sugamura, K., & Keane, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *51*(5), 978–992. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>
- Tabima, D. M., Frizzell, S., & Gladwin, M. T. (2012). Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology & Medicine*, *52*(9), 1970–1986. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.041>
- Treml, J., & Šmejkal, K. (2016). Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(4), 720–738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Valko, Marian, Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vatanever, F., de Melo, W. C. M. A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N. A., Yin, R., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—Bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(6), 955–989. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026>
- Veal, E., Jackson, T., & Latimer, H. (2018). Role/s of “Antioxidant” Enzymes in Ageing. *Sub-Cellular Biochemistry*, *90*, 425–450. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_14)
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A., & Kouretas, D. (2020). Approaching reactive species in the frame of their clinical significance: A toxicological appraisal. *Food and Chemical Toxicology*:

- An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 138, 111206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111206>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones*, 17(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>
- Visioli Francesco, Galli Claudio, Plasmati Elena, Viappiani Serena, Hernandez Alicia, Colombo Claudio, & Sala Angelo. (2000). Olive Phenol Hydroxytyrosol Prevents Passive Smoking–Induced Oxidative Stress. *Circulation*, 102(18), 2169–2171. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.18.2169>
- Wang, W., Yang, H., Johnson, D., Gensler, C., Decker, E., & Zhang, G. (2017). Chemistry and biology of  $\omega$ -3 PUFA peroxidation-derived compounds. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 132, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.12.004>
- Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03667-9>
- Yang, Yin, Battesti, M.-J., Paolini, J., & Costa, J. (2014). Pollen diversity and volatile variability of honey from Corsican Anthyllis hermanniae L. habitat. *Chemistry & Biodiversity*, 11(12), 1900–1913. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400042>
- Yang, Yuhui, Karakhanova, S., Hartwig, W., D’Haese, J. G., Philippov, P. P., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 231(12), 2570–2581. <https://doi.org/10.1002/jcp.25349>
- Yiannakopoulou, E. (2009). Oxidative stress - Antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Archives of Hellenic Medicine*, 26, 23–35.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Zs, P., J., B., & J., H.-B. (2001). Introduction of alkanet (*Alkanna tinctoria* (L.) Tausch), a traditional dye plant into cultivation. *International Journal of Horticultural Science*, 7. <https://doi.org/10.31421/IJHS/7/2/264>
- Παπαγαλάνης, Ν., & Παπαγαλάνης, Ν. (2015). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ΙΙΙ. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών—Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. ΙΙΙ. Reactive species toxicity. *Ελληνική Νεφρολογία* -

*Hellenic Nephrology*, 27(1), Article 1.  
[https://www.ene.gr/eneojs\\_new/index.php/en/article/view/277](https://www.ene.gr/eneojs_new/index.php/en/article/view/277)