ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Εργασία

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικού εκχυλίσματος φύλλων Ευρωπαϊκής καστανιάς (*Castanea sativa mill*) σε μυϊκά κύτταρα ποντικού

Ηλιοπούλου Σταυρούλα

Λάρισα 2021

UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
& BIOTECHNOLOGY

Master's Thesis

Determination of antioxidant activity of polyphenolic leaf extract from *Castanea sativa mill* in mouse muscle cells

Iliopoulou Stavroula

Larissa 2021

Τριμελής επιτροπή

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

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

Πετρωτός Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μηχανικής Τροφίμων & Βιοσυστημάτων του Τμήματος Γεωπονίας – Αγροτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέπων τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, κ. Στάγκο Δημήτριο. Θα επιθυμούσα λοιπόν να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν επιστημονικά και ηθικά στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο, επιβλέπων καθηγητή της συγκεκριμένης εργασίας, για την εμπιστοσύνη και ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση, καθώς και την πολύτιμη στήριξη και συνεισφορά όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον κ. Κουρέτα Δημήτριο για τη δυνατότητα και ευκαιρία που μου δόθηκε από τον ίδιο, να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Πετρωτό Κωνσταντίνο για την προθυμία του να είναι μέλος της τριμελής επιτροπής και να αξιολογήσει την παρούσα διπλωματική εργασία.

Θα ήθελα επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην μεταδιδάκτορα κα Κούρτη Μαρία για την ομαλή συνεργασία και βοήθεια σε ορισμένες πειραματικές διαδικασίες της παρούσας εργασίας. Ακόμη ευχαριστώ την συμφοιτήτρια μου Παπαδημητρίου Αλίκη για τη στήριξη και συνεργασία, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, η οποία με ενθαρρύνει και είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα και απόφαση και στο φιλικό μου περιβάλλον για την ψυχολογική στήριξη.

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας εικόνων

Πίνακας διαγραμμάτων

Πίνακας γραφημάτων

Περίληψη

Τα φυτικά εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, οι οποίες εμφανίζουν πληθώρα βιολογικών δράσεων. Μελέτες αποδεικνύουν ένα καλό προφίλ βιοδραστικών ενώσεων των εκχυλισμάτων φύλλων της Ευρωπαϊκής καστανιάς (*Castanea sativa*) με αντιοξειδωτική δράση, παρέχοντας ευεργετικές επιδράσεις για την ανθρώπινη υγεία και προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, το οποίο έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Η παρούσα εργασία μελετά την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων φύλλων και ενθυλακωμένων φύλλων καστανιάς σε οροπρωτεΐνη γάλακτος σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις σε μυϊκά κύτταρα C2C12. Ερευνήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), καθώς και στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής. Τέλος, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), φασματοφωτομετρικά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS και στις 4 συγκεντρώσεις των δυο εκχυλισμάτων, σε σχέση με τα κύτταρα-control. Επίσης, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα της GSH, παρουσία των 4 συγκεντρώσεων εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς αυξάνονται στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα-control και παράλληλα, παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση 1.000μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα-control, αλλά και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Όσον αφορά, τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις 31,25 και 62,5μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα-control ύστερα από επώαση με εκχύλισμα φύλλων καστανιάς, ενώ στο ενθυλακωμένο εκχύλισμα σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση 1.000μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα-control. Μια πιθανή εξήγηση είναι πως παρουσία των εκχυλισμάτων ενισχύεται η έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου. Παράλληλα παρατηρείται αύξηση της GSH, ενώ μειώνονται τα επίπεδα των ROS, καθώς εξουδετερώνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου.

Λέξεις – «κλειδιά»: Αντιοξειδωτικό, οξειδωτικό στρες, πολυφαινόλες, εκχύλισμα φύλλων Ευρωπαϊκής καστανιάς (*Castanea sativa mill*), μυϊκά κύτταρα

Abstract

Plant extracts are characterized by high content of polyphenols, which have a variety of biological activities. Studies reveal a good antioxidant profile of bioactive compounds isolated from European chestnut (Castanea sativa) leaf extracts, providing beneficial effects on human health and protection against oxidative stress, which has been associated with various pathological conditions.

The present study examined the antioxidant activity of chestnut leaf and encapsulated leaf extracts in milk seroprotein at non-cytotoxic concentrations in C2C12 muscle cells. The effect of the extracts on the levels of reactive oxygen species (ROS) as well as on the levels of endogenous reduced glutathione (GSH) by flow cytometry was tested/measured/determined. Finally, to evaluate the antioxidant activity of the extracts, the total antioxidant capacity (TAC) was determined, spectrophotometrically.

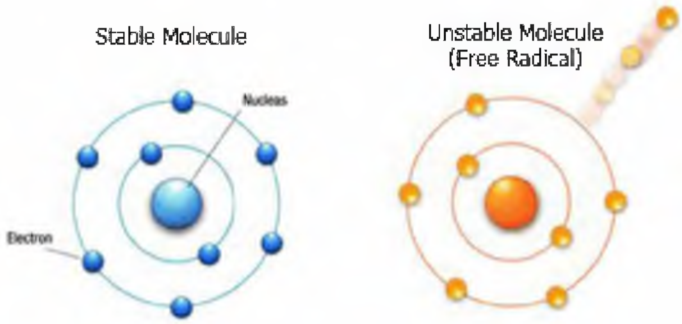
The results showed a statistically significant decrease in ROS levels at all 4 concentrations of both extracts, compared to control cells. It was also observed that GSH levels in the presence of the 4 concentrations of chestnut leaf extract increased statistically significantly compared to the control cells and at the same time, in the presence of the encapsulated extract there was a statistically significant increase in the concentration of 1,000 μg / ml compared to the control cells and the other concentrations. Regarding the levels of total antioxidant capacity, there was a statistically significant increase in the concentrations of 31.25 and 62.5μg/ml compared to the control cells after incubation with chestnut leaf extract, while in the encapsulated extract there was a statistically significant increase in the concentration of 1,000μg/ml in relation to control cells. One possible explanation is that the presence of the extracts enhances the expression of antioxidant genes, thus increasing the overall antioxidant capacity of the cell. At the same time there is an increase in GSH, while the levels of ROS decrease, as reactive oxygen species are neutralized.

Keywords: Antioxidant, oxidative stress, polyphenols, European chestnut leaf extract (*Castanea sativa mill*), muscle cells

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Το ενδιαφέρον των ερευνητών, αρκετές δεκαετίες ήδη, μονοπωλεί η δράση των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα. Οι ελεύθερες ρίζες περιεγράφηκαν για πρώτη φορά από τον *Moses Gomberg* περισσότερο από έναν αιώνα πριν (*Gomberg*, 1900). Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο, το οποίο στην εξωτερική στοιβάδα έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (e^-), αντιθέτως με τις μη – ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin) (*Sharma et al.*, 2018). Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά ασταθή μόρια με υψηλή δραστικότητα και ο χρόνος ημιζωής τους είναι μόνο μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου και για αυτό το λόγο αρχικά επικρατούσε η άποψη πως δεν υφίστανται στα βιολογικά συστήματα (*Sharma et al.*, 2018). Παρ΄ όλα αυτά, η ύπαρξη τους στα βιολογικά συστήματα επιβεβαιώθηκε το 1950 και έκτοτε άρχισαν να σχετίζονται με πλήθος παθολογικών καταστάσεων (*Gerschman et al.*, 1954). Οι ελεύθερες ρίζες προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα, αντιδρούν με άλλα μόρια για να δεσμεύσουν το ηλεκτρόνιο που τους λείπει. Αυτή η δέσμευση των ηλεκτρονίων ονομάζεται οξείδωση και οδηγεί στο σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών με δυσμενείς επιπτώσεις για τον οργανισμό.



Εικόνα 1.1: Δομή σταθερού ατόμου και ελεύθερης ρίζας.

Οι ελεύθερες ρίζες ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο μπορούν να ταξινομηθούν:

- Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ενδεικτικά: η ρίζα του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), του περοξυλίου ($ROO^{\bullet}$), του υδροϋπεροξυλίου ($HOO^{\bullet}$), του αλκοξυλίου ($RO^{\bullet}$).
- Δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Ενδεικτικά: η ρίζα του μονοξείδιου του αζώτου ($NO^{\bullet}$), του διοξείδιο του αζώτου ($NO_2^{\bullet}$)
- Δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS). Ενδεικτικά: η του ρίζα θειυλίου ($RS^{\bullet}$), του δισουλφιδίου (RSSR)

- Δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RClS): Ενδεικτικά: το άτομο του χλωρίου ($Cl^{\bullet}$), το άτομο του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) (*Surai*, 2015).

1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

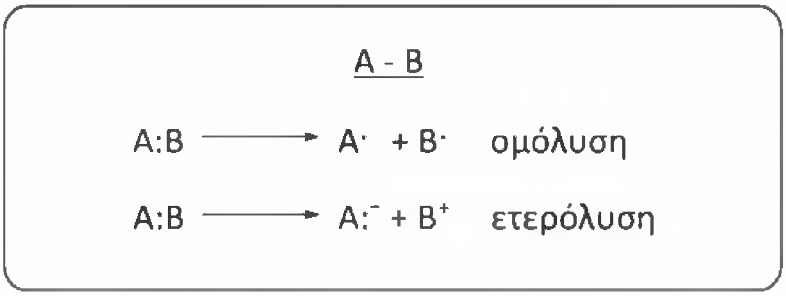
Ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να προέλθει είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, δηλαδή κατά την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από ένα κανονικό μόριο

$$\boxed{A - e^{-} \rightarrow A^{+\bullet}}$$

ή την προσθήκη ενός μόνο ηλεκτρονίου σε ένα κανονικό μόριο,

$$\boxed{A + e^{-} \rightarrow A^{\bullet -}}$$

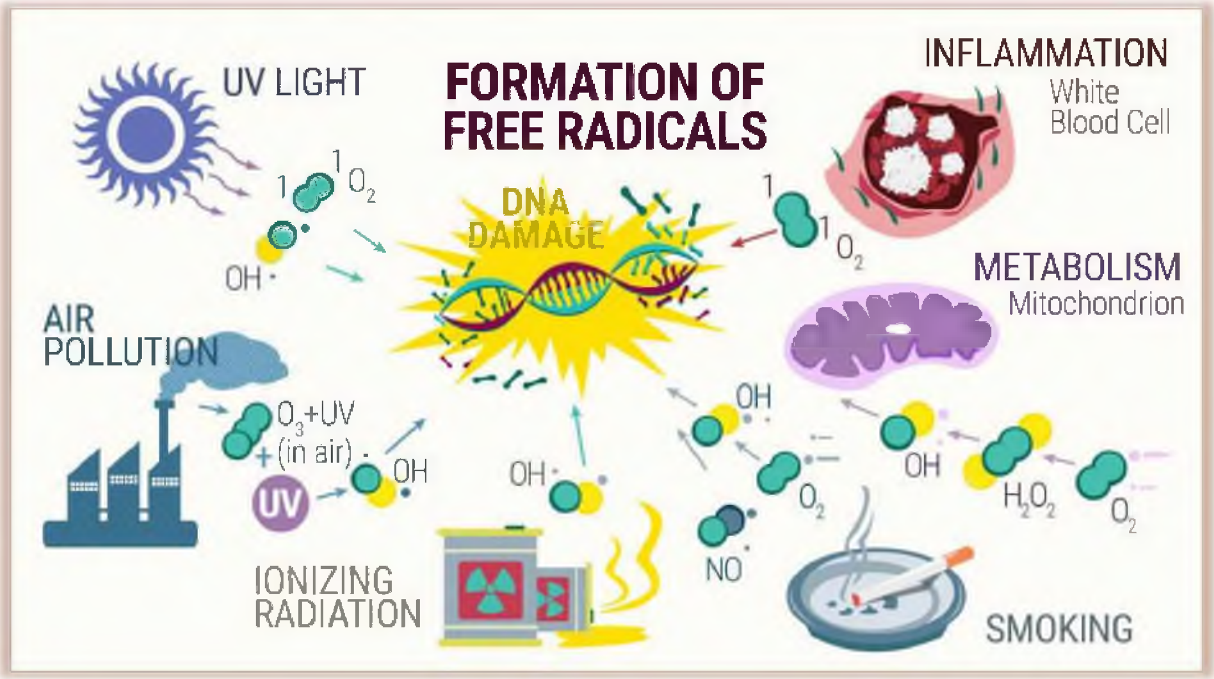
είτε από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όταν δηλαδή το ζεύγος των ηλεκτρονίων που αποτελούσαν τον δεσμό μοιραστούν από ένα σε κάθε ομάδα (*Sharma et al.*, 2018). Παρακάτω παρουσιάζεται μια απεικόνιση ομολυτικής και ετερολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού σε μια χημική ένωση A – B. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση μιας ομολυτικής αντίδρασης προκύπτουν 2 ελεύθερες ρίζες, ενώ σε μια ερετολυτική αντίδραση τα προϊόντα είναι ένα ανιόν και ένα κατιόν.



Εικόνα 1.31: Σχηματική απεικόνιση ομολυτικής και ετερολυτικής διάσπασης μιας χημικής ένωσης A – B.

1.3 Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε έναν οργανισμό είτε από ενδογενείς παράγοντες, που εξαρτώνται από διάφορες κυτταρικές διεργασίες, είτε από εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παραμέτρους.



Εικόνα 1.3: Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.

1.3.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Σε γενικές γραμμές παρατηρείται πως το οξυγόνο αποτελεί την κυριότερη και μεγαλύτερη πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS). Οι ενδογενείς πηγές ROS περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρικά όργανα όπως τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξειδιοσώματα, όπου επικρατούν υψηλές απαιτήσεις για κατανάλωση οξυγόνου. Η παραγωγή των ROS σχετίζεται επίσης με την αυτοοξείδωση ορισμένων μορίων.

1.3.1.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση – Αναπνευστική αλυσίδα

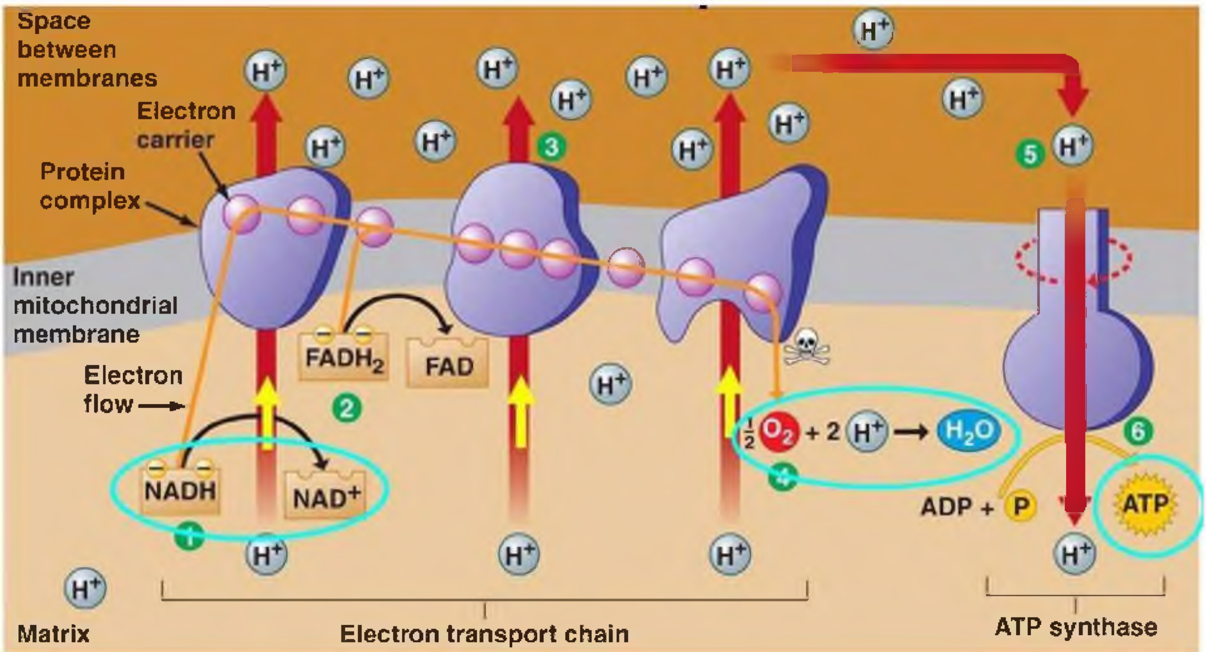
Στη Βιολογία ως οξειδωτική φωσφορυλίωση ορίζεται η χημική αντίδραση, κατά την οποία στους αερόβιους οργανισμούς παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό ενέργειας κατά την οξείδωση των τροφών. Η συγκεκριμένη διαδικασία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Το μεγαλύτερο ποσοστό ελεύθερων ριζών που παράγεται ενδογενώς σε έναν ζωντανό οργανισμό προκύπτει κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται ροή ηλεκτρονίων, μέσω άντλησης πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Αναλυτικότερα, το ATP παράγεται κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή / και το FADH προς το οξυγόνο (O_2). Η ροή αυτή προς το O_2 παράγει το ανιόν του σουπεροξειδίου

($O_2^{\bullet-}$). Συγκεκριμένα, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων παρατηρούνται 2 γνωστές θέσεις που οδηγούν στην παραγωγή $O_2^{\bullet-}$:

1. Στο σύμπλοκο I: η αναγωγάση της NADH – ουβικινόνης
2. Στο σύμπλοκο III: η αναγωγάση ουβικινόνης – κυτοχρώματος C

Στη συνέχεια, το $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από την μιτοχονδριακή δισμουτάση υπεροξειδίου (Mn – SOD) (*Finkel & Holbrook et al.*, 2000). Συνεπώς, κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP στα μιτοχόνδρια, τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα, προκαλούν την παραγωγή ελεύθερων ριζών, με τη μορφή ROS, προκαλώντας βλάβες σε ένζυμα και θέτοντας σε κίνδυνο λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.



Εικόνα 1.83: Η ροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα.

1.3.1.2 Υπεροξειδιοσώματα

Πηγή ROS εκτός από τα μιτοχόνδρια αποτελούν και τα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα υπεροξειδιοσώματα περιέχουν ένζυμα που διασπούν μέσω οξείδωσης βλαβερές ουσίες για τα κύτταρα. Κυρίως στα ηπατικά κύτταρα, η οξείδωση των λιπιδίων είναι η βασική μεταβολική διαδικασία παραγωγής ελεύθερων ριζών $O_2^{\bullet-}$ $OH^{\bullet}$ και NO και κυρίως H_2O_2. Στα υπεροξειδιοσώματα στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν ανάγουν το O_2 σε $O_2^{\bullet-}$. Δότης των ηλεκτρονίων είναι το NADPH (*Chrader & Fahimi*, 2006). Στα υπεροξειδιοσώματα κατά τη δημιουργία των ελεύθερων ριζών σημαντικό ρόλο κατέχει το κυτόχρωμα P450, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών.

1.3.1.3 Αυτοοξείδωση μορίων

Η παραγωγή των ROS σχετίζεται επίσης με την αυτοοξείδωση ορισμένων μορίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης, της μυοσφαιρίνης, της νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης, της φλαβίνης, της κατεχολαμίνης, της θειόλης που οδηγούν στη σχηματισμό ελεύθερεων ριζών οξυγόνου (*Thomas*, 2000, *Gunther et al.*, 1999).

1.3.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών εκτός από τους ενδογενείς μπορεί να οφείλεται και σε εξωγενείς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, οι εξωγενείς ελεύθερες ρίζες προκύπτουν από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, τα βαρέα μέταλλα (π.χ. Cd, Hg, Pb, Fe, As), η έκθεση σε διάφορες μορφές ακτινοβολίας (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία, UVA, UVB), φυτοφάρμακα, καθώς και πλήθος φαρμακευτικών ουσιών (π.χ. μπλεομυκίνη, κυκλοσπορίνη, γενταμικίνη). Επιπρόσθετα, το αλκοόλ, το κάπνισμα, ο τρόπος μαγειρέματος (π.χ. καπνιστό κρέας, χρησιμοποιημένο λάδι) όπως και η διατροφή όταν αυτή δεν είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στον εξωγενή σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Επομένως, αυτές οι εξωγενείς ενώσεις είτε αποσυντίθενται είτε μεταβολίζονται σε ελεύθερες ρίζες (*Pham et al.*, 2008, *Phaniendra et al.*, 2015).

Εικόνα 1.100: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.4 Αρνητικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών

Πολλά κυτταρικά συστατικά είναι ευαίσθητα στις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζοντας τη δομή και τη φυσιολογική λειτουργία τους. Οι ελεύθερες ρίζες διαταράσσουν την ισορροπία των βιολογικών συστημάτων καταστρέφοντας τα κύρια συστατικά τους, τα οποία οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Οι κύριοι στόχοι της οξειδωτικής δραστηριότητας των ελεύθερων ριζών και κυρίως ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και ελεύθερων ριζών αζώτου (RNS) είναι το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες έχουν συσχετιστεί με πλήθος ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π,χ, Parkinson, και Alzheimer).

1.4.1 Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)

Αν και η δομή του DNA είναι ιδιαίτερα σταθερή, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλλοιώσουν και να τροποποιήσουν αυτή τη δομή επηρεάζοντας τη κανονική λειτουργία του DNA με δυσμενείς επιπτώσεις. Οι βλάβες αυτές επιδρούν στις αζωτούχες βάσεις του DNA (πουρίνες, πυριμιδίνες), επηρεάζοντας τα συστήματα επιδιόρθωσης και τις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και τον ανασυνδυασμό του DNA.

Όσον αφορά τις πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), η σημαντικότερη είναι η ρίζα του υδροξυλίου (˙OH), που αλληλεπιδρά με μια σειρά συστατικών του σταθερού DNA, όπως για παράδειγμα με τις αζωτούχες βάσεις, προκαλώντας μεταλλάξεις, αλλά και με το σάκχαρο της δεοξυριβόζης οδηγώντας σε τροποποιήσεις, μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις στο DNA (*Halliwell & Gutteridge,* 1999). Αναλυτικότερα, το OH αντιδρά με τη γουανίνη (G) οδηγώντας στο σχηματισμό μιας νέας ελεύθερης ρίζας την 8 – υδρόξυγουανίνη (8 – OHG). Χρειάζεται επίσης να επισημανθεί, πως το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ασταθές και ευάλωτο σε σχέση με το πυρηνικό DNA, διότι στα μιτοχόνδρια παράγεται το μεγαλύτερο ποσοστό ελεύθερων ριζών και επομένως η συγκέντρωσή τους είναι υψηλότερη σε σχέση με τον πυρήνα. Έτσι οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνονται επηρεάζοντας τη σταθερότητα και τη δραστικότητα του μιτοχονδριακού DNA (*Barja,* 2000).

Επιπλέον, σχετικά με τις δραστικές ελεύθερες ρίζες αζώτου (RNS), υπεροξυνιτρώδες ($OONO_2$) αντιδρά με τη γουανίνη (G), οδηγώνγτας στη σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας 8 – νιτρογουανίνης, προκαλώντας ομοίως βλάβες στο DNA (*Hiraku et al.,* 2010). Όλα λοιπόν τα προϊόντα των αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών με τα διάφορα συστατικά του DNA, που προκαλούν μη αντιστρεπτές βλάβες, έχουν συσχετιστεί με τη γήρανση και την καρκινογένεση.

1.4.2 Ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA)

Το RNA είναι πιο επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες σε σχέση με το DNA (*Hofer et al.,* 2005). Πιο συγκεκριμένα, το RNA είναι πιο ασταθές λόγω της μονόκλωνης φύσης του, της απουσίας συστημάτων επιδιόρθωσης βλαβών, καθώς και γιατί εντοπίζονται σε περιοχές κοντά στα μιτοχόνδρια που όπως αναφέρθηκε τα επίπεδα των ROS είναι υψηλότερα. Συγκεκριμένα, η 7, 8-διϋδρο-8-οξυ-γουανοσίνη (8 - oxoG), αποτελεί την πιο καλά μελετημένη ελεύθερη ρίζα που προκαλεί βλάβες στο RNA, και τα επίπεδά της αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως το Alzheimer (*Abe et al.,* 2002), το Parkinson (Kikuchi et al., 2002) και οι μυοπάθειες (*Tateyama et al.,* 2003).

1.4.3 Πρωτεΐνες

Ένας ακόμη στόχος των ελεύθερων ριζών είναι οι πρωτεΐνες. Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες έχει ως αποτέλεσμα να μετουσιώνονται, να αποδιατάσσονται και να χάνουν τη φυσιολογική λειτουργία τους (*Butterfield et al.,* 1998). Οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$ (*Dean et al.,* 1997) οξειδώνουν και τροποποιούν τα αμινοξέα των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδωμένων αμινοξέων και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. (*Marí et al.,* 2010). Πιο συγκεκριμένα, η μεθειονίνη και η κυστεΐνη αποτελούν αμινοξέα πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από ROS και μετατρέπονται σε παράγωγα σουλφοξειδίου μεθειονίνης και δισουλφιδικά παράγωγα αντίστοιχα (*Brodie,* 1990, *Pryor et al.,* 1994).

Παρ΄ όλα αυτά υπάρχει η δυνατότητα οι οξειδωμένες αυτές μορφές να επιστρέψουν στην αρχική τους μορφή από τα αντίστοιχα ένζυμα της αναγωγάσης σουλφοξειδίου μεθειονίνης και αναγωγάσες δισουλφιδίου (*Berlett & Stadtman,* 1997, *Kikugawa et al.,* 1994, *Uchida & Kawakishi,* 1993, *Garrison,* 1987). Επίσης, οι οξειδωτικές βλάβες στα αμινοξέα: λυσίνη, προλίνη, θρεονίνη και αργινίνη, οδηγεί στο σχηματισμό καρβονυλικών προϊόντων και είναι μη αντιστρεπτές. Τέλος, η αύξηση των επιπέδων των καρβονυλικών πρωτεϊνών παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως, η νόσος του Alzheimer (Smith et al., 1991), η νόσος του Parkinson (*Floor & Wetzel,* 1998), η μυϊκή δυστροφία (*Murphy & Kehrer,* 1989), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (*Chapman et al.,* 1989), ο διαβήτης (*Jones & Hothersall,* 1993) και η γήρανση (*Oliver et al.,* 1987).

1.4.4 Λιπίδια

Τα λιπίδια της μεμβράνης και ειδικότερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs), τα οποία αποτελούν τα βασικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών είναι πιο ευάλωτα στην οξειδωτική βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες. Η αντίδραση των λιπιδίων της μεμβράνης με τις ελεύθερες ρίζες είναι γνωστή ως λιπιδική υπεροξείδωση και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας της μεμβράνης όπως για παράδειγμα την απενεργοποίηση ενζύμων και υποδοχέων συνδεδεμένων στη μεμβράνη (*Bast,* 1993). Η λιπιδική υπεροξείδωση ξεκινά όταν μια ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου (H) από μεθυλομάδες (CH_2) σε ένα λιπαρό οξύ, που βρίσκονται μεταξύ 2 διπλών δεσμών. Έτσι σχηματίζεται μια αλκυλόριζα ($-CH^{\bullet}-$), η οποία έπειτα αντιδρά με μοριακό οξυγόνο (O_2) και παράγεται υπεροξειδική ρίζα ($ROO^{\bullet}$) ή λιποϋπεροξειδική ρίζα ($LOO^{\bullet}$). Ακολούθως, οι $LOO^{\bullet}$, μπορούν στη συνέχεια να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου από επόμενο λιπαρό οξύ και να σχηματιστεί καινούρια αλκυλόριζα, ξεκινώντας μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης των PUFAs Τελικά, τα τοξικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης προκαλούν βλάβες στο DNA (*Aruoma,* 1998).

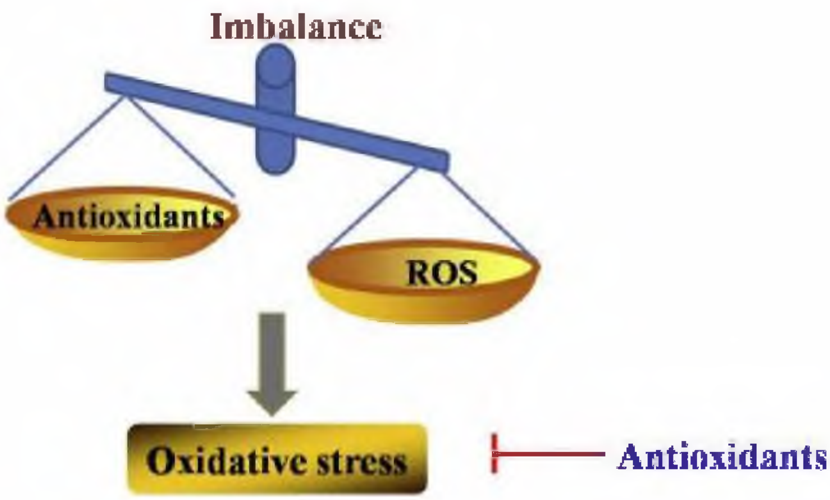
Εικόνα 1.132: Στάδια λιπιδικής υπεροξείδωσης.

1.5 Ευεργετικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες και ιδιαιτέρως οι ROS είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς έχουν καθοριστικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα καταπολεμώντας μικροοργανισμούς όπως μύκητες, βακτήρια και ιούς. Αυτό επιτυγχάνεται κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης όπου παράγεται το υποχλωριώδες οξύ (HOCL), είδος των ROS, που έχει σημαντικό ρόλο στην καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών στο ανοσοποιητικό σύστημα (*Ren et al.*, 2018). Επιπλέον, στις ευεργετικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών κατατάσσεται η συμμετοχή τους σε σηματοδοτικά μονοπάτια και συνεπώς στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στην απόπτωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα συμμετοχής των ελεύθερων ριζών σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος αποτελεί το μονοξείδιο του αζώτου (NO), που ως κυτταρικός αγγελιοφόρος συμμετέχει στη ρύθμιση της αιματικής ροής και στη δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων (*Pacher et al.*, 2007). Τέλος, η παρουσία και η παραγωγή των ROS στους μύες είναι απαραίτητη, διότι έχουν ουσιαστικό ρόλο όσον αφορά τη μυϊκή συστολή (*Smith & Reid*, 2006). Αντίθετα, τα αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν μυϊκή κόπωση (*Reid*, 2008).

1.6 Οξειδωτικό στρες

Στους αερόβιους οργανισμούς είναι αναπόφευκτη η παραγωγή οξειδωτικών μορίων και κυρίως ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), μέσω των αερόβιων διεργασιών. Σε κανονικές συνθήκες ο σχηματισμός των ROS κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα και συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα οι ROS μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις οι ROS αυξάνονται σημαντικά και αποτελούν τοξικά προϊόντα με δυσμενείς επιπτώσεις για τον οργανισμό. Επομένως, κάθε οργανισμός διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά μόρια και ένζυμα που ρυθμίζουν την παραγωγή των ROS. Όταν λοιπόν, υφίσταται διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών μορίων και αδρανοποίησής τους προκαλείται το οξειδωτικό στρες. Συμπερασματικά, ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ελέγχου ή / και μοριακής βλάβης στα βιομόρια όπως DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες (*Kouretas et al.*, 2013).



Εικόνα 1.152: Οξειδωτικό στρες.

1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες, οι οποίες όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το οξειδωμένο υπόστρωμα, έχουν ως ρόλο να καθυστερούν ή / και να παρεμποδίζουν σε σημαντικό βαθμό την οξείδωσή του. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών λοιπόν, είναι να εξουδετερώνουν τα υψηλά ποσοστά των ελεύθερων ριζών, προστατεύοντας τα κύτταρα από τις τοξικές τους επιδράσεις και συμβάλλοντας στην πρόληψη ασθενειών. Κάθε οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά μόρια για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες. Αναλυτικότερα, τα αντιοξειδωτικά αυτά μόρια διακρίνονται σε ενζυμικά, τα οποία παράγονται ενδογενώς και σε μη ενζυμικά, τα οποία σχηματίζονται εξωγενώς μέσω της πρόσληψης της τροφής.

1.7.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιέχονται: η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) τα οποία και αναλύονται παρακάτω.

1.7.1.1 Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Στα βιολογικά συστήματα η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι το σημαντικότερο ένζυμο που υπάρχει σε κάθε κύτταρο καθώς πραγματοποιεί τη μετατροπή του $O_2^{\bullet -}$ σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) Το SOD παρουσιάζει επίσης αντιοξειδωτική δράση μειώνοντας το $O_2^{\bullet}$ και προωθώντας το σχηματισμό $OH^{\bullet}$. Επίσης, η SOD, αντιπροσωπεύεται από μια ομάδα μεταλλοενζύμων, με διαφορετικές προσθετικές ομάδες. Επομένως, υπάρχουν οι αντίστοιχες μορφές SOD: η SOD που περιέχει χαλκό (CuSOD), η SOD που περιέχει ψευδάργυρο (ZnSOD), η SOD που περιέχει μαγγάνιο (MnSOD) και η SOD που περιέχει σίδηρο (FeSOD). Η MnSOD βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και οι CuSOD, ZnSOD και η FeSOD βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, το ήπαρ, τα επινεφρίδια, τα νεφρά και ο σπλήνας έχουν υψηλά επίπεδα SOD η οποία θεωρείται θεμελιώδης για την εξάλειψη των ROS (*Salles et al.*, 2012).

1.7.1.2 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) είναι ένα ένζυμο που υπάρχει στα κύτταρα φυτών, ζώων και αερόβιων βακτηρίων και αποτελεί ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά αμυντικά ένζυμα. Το ήπαρ, τα νεφρά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν υψηλά επίπεδα καταλάσης. Η CAT δρα καταλύοντας την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2). Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, αλλά βρίσκεται επίσης σε χαμηλότερες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια. Τέλος, η CAT απαιτεί σίδηρο ως συμπαράγοντα για μέγιστη αποτελεσματικότητα (*Monfared et al.*, 2009, *Powers et al.*, 2010).

1.7.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GSH), απαρτίζουν μια οικογένεια ενζύμων που χρησιμοποιούν ως συμπαράγοντα μια σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο. Οι GPx εκφράζονται στα νεφρά, στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Οι GPx είναι ένζυμα τα οποία έχουν παρόμοια δράση με την καταλάση, καθώς ομοίως καταλύουν τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O χρησιμοποιώντας την ανηγμένη GSH ως υπόστρωμα μετατρέποντας την στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Επίσης, οι GPx σταματούν την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης μετατρέποντας τα υδροϋπροξείδια στις αντίστοιχες αλκοόλες (*Kumaran & Prince*, 2010, *Chen et al.*, 2013, *Tkachenko et al.*, 2014).

1.7.1.4 Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κατά τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό χρησιμοποιεί την ανηγμένη γλουταθειόνη ως υπόστρωμα μετατρέποντας την στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Ο οργανισμός λοιπόν προκειμένου να διατηρήσει την αναλογία GSSG: GSH έχει αναπτύξει ένα μηχανισμό αναγέννησης της GSH. Η αναγέννηση της GSH από την GSSG πραγματοποιείται μέσω της εξαρτώμενης από NADPH αναγωγάση γλουταθειόνης (GR) (*Kumaran & Prince*, 2010, *Chen et al.*, 2013, *Tkachenko et al.*, 2014).

1.7.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στους μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται: το β – καροτένιο (Βιταμίνη Α), το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), η τοκοφερόλη (Βιταμίνη Ε), το ουρικό οξύ, το σελήνιο (Se), η γλουταθειόνη (GSH), κα. (*Pham-Huy et al.*, 2008), τα οποία και αναλύονται ακολούθως.

1.7.2.1 Καροτενοειδή – Βιταμίνη Α

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα φυσικών χρωστικών που αποτελείται από περίπου 600 μέλη, τα οποία συναντώνται σε φυτά και μικροοργανισμούς. Μεταξύ αυτών το β – καροτένιο, μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, είναι η πιο καλά μελετημένη ευρέως για την αντιοξειδωτική της δράση στον άνθρωπο. Η βιταμίνη Α προσλαμβάνεται από τον άνθρωπο μέσω της τροφής και συναντάται σε πολλά φρούτα, δημητριακά, λάδι (καρότα, πράσινα φυτά, σπανάκι). Το β – καροτένιο λοιπόν, λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, καθώς αντιδρά με τη ρίζα του υπεροξειδίου, υδροξυλίου και σουπεροξειδίου προστατεύοντας τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών από οξείδωση (*Willcox et al.*, 2004, *Sharma et al.*, 2018).

1.7.2.2 Ασκορβικό οξύ – Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C γνωστή και ως ασκορβικό οξύ είναι επίσης μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση κολλαγόνου και στη δράση των νευροδιαβιβαστών. Επίσης η βιταμίνη C αποτελεί αντιοξειδωτικό, που δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός και για αυτό το λόγο προσλαμβάνεται μέσω της τροφής. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη C είναι τα όξινα φρούτα, πράσινα λαχανικά, εσπεριδοειδή, πατάτες και ντομάτες. Η βιταμίνη C στα εξωκυττάρια υγρά εξουδετερώνει ROS όπως υδροξυλίου, υπεροξειδίου και υδροϋπεροξειδίου, Επιπλέον, η βιταμίνη C συμβάλλει στο μηχανισμό αναγέννησης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της βιταμίνης Ε με στόχο τη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων τους ενδοκυτταρικά (*Naidu,* 2003, *Zhao et al.,* 2016, *Starkov,* 2008).

1.7.2.3 Τοκοφερόλη – Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε αποτελεί επίσης μια λιποδιαλυτή βιταμίνη και απαρτίζεται από 8 ισομορφές γνωστές ως α, β, γ, δ, τοκοφερόλες και α, β, γ, δ, τοκοτριενόλες (*Nguyen et al.,* 2006). Η πιο βιοδραστική μορφή στον άνθρωπο είναι η α – τοκοφερόλη η οποία προσλαμβάνεται από διατροφικές πηγές όπως φυτικά έλαια, δημητριακά ολικής αλέσεως, ξηροί καρποί, φρούτα, αυγά και κρέας (*Willcox et al.,* 2004). Η βιταμίνη Ε εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και στα φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων και η κύρια αντιοξειδωτικής της δράση είναι να σταματά την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης αντιδρώντας με τη ρίζα που ξεκινά αυτή την αντίδραση προστατεύοντας τελικά τα κύτταρα από την οξείδωση των λιπιδίων (*Kumar et al.,* 2015, *Moukette et al.,* 2015, *Ahmed et al.,* 2017).

1.7.2.4 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι ένα υδρόφιλο μόριο και αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Θεωρείται επίσης, από τα πιο ισχυρά φυσιολογικά αντιοξειδωτικά του πλάσματος καθώς, αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες. Αναλυτικότερα, σε περιπτώσεις έντονης άσκησης, στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται το ουρικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια διαχέεται στα μυϊκά κύτταρα, αντιδρά με ROS και τα προστατεύει. Επιπροσθέτως, το ουρικό οξύ παρεμποδίζει τη δράση του σιδήρου και του χαλκού ως οξειδωτικά, διότι σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με αυτά τα ιόντα (*Amarnath et al.,* 2005, *Bandyopadhyay et al.,* 2000).

1.7.2.5 Σελήνιο (Se)

Το σελήνιο (Se) είναι ιχνοστοιχείο που βρίσκεται στο έδαφος, το νερό, τα λαχανικά (σκόρδο, κρεμμύδι, σπόροι, ξηροί καρποί, σόγια), θαλασσινά, κρέας, συκώτι, και μαγιά και συμβάλλει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ως συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (*Willcox et al.,* 2004).

1.7.2.6 Γλουταθειόνη (GSH)

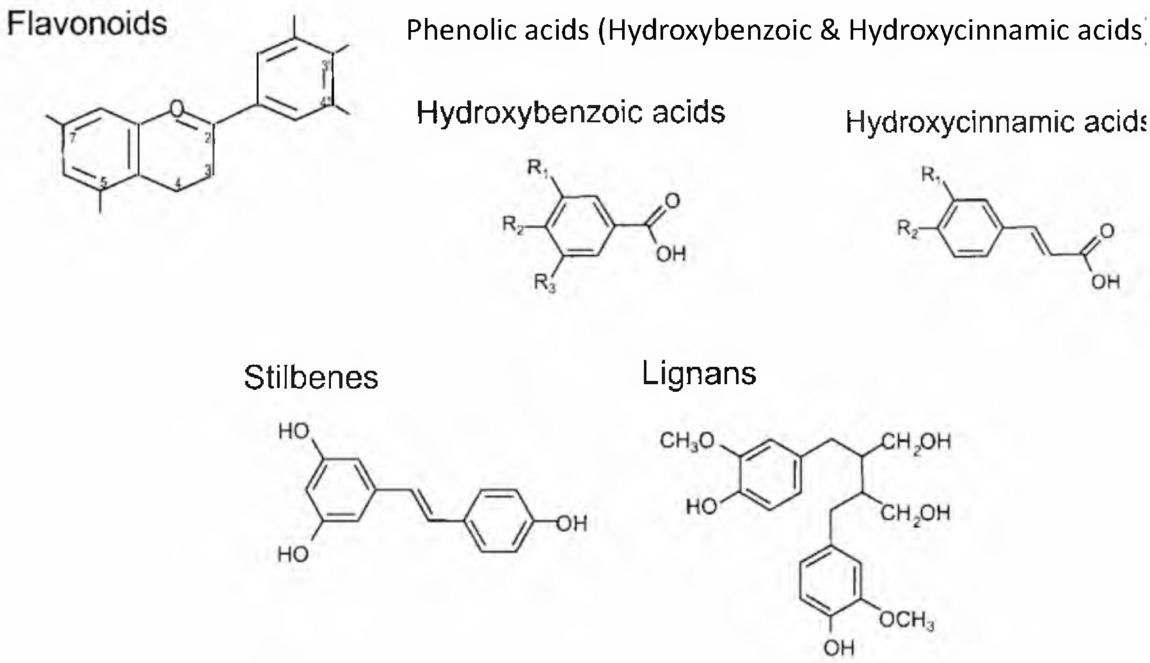
Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο αποτελείται από κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμικό οξύ και αποτελεί ενδοκυτταρικό μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό. Ως βασικό αντιοξειδωτικό του ανθρώπινου οργανισμού παρεμποδίζει την οξειδωτική βλάβη των κυττάρων που προκαλείται από τις ROS. Η γλουταθειόνη συναντάται στο πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, συντίθεται σε αρκετούς ιστούς, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό σύνθεσης της γίνεται στο ήπαρ. Γενικά, υφίσταται σε 2 μορφές την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG) και συναντάται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή. Ο λόγος αυτών των 2 μορφών πρέπει να βρίσκεται σε ισορροπία και αποτελεί δείκτη για το οξειδωτικό στρες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γλουταθειόνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) ώστε να διατηρείται αυτή η ενδοκυτταρική ισορροπία. Τέλος, η γλουταθειόνη συμβάλλει στην αναγέννηση των οξειδωμένων αντιοξειδωτικών όπως των βιταμινών C και E, στην αρχική τους μορφή, προστατεύοντας τα κύτταρα (*Tovmasyan et al.,* 2015).

1.8 Πολυφαινόλες

Η οικογένεια των πολυφαινολών περιλαμβάνει περισσότερες από 8.000 ενώσεις που αποτελούν τις πιο άφθονες χημικές ουσίες στο φυτικό βασίλειο. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες με βασικό λειτουργικό ρόλο. Οι πολυφαινόλες εμπλέκονται στο αμυντικό σύστημα των φυτών παρέχοντας προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, ιούς) και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (ακτινοβολία, ακραίες καιρικές συνθήκες), ενώ παράλληλα συμμετέχουν στην ανάπτυξη των φυτών (*Pandey et al.,* 2009).

1.8.1 Κατηγορίες πολυφαινολών

Όσον αφορά τη χημική τους δομή, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ως κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία ενός ή περισσοτέρων αρωματικών δακτυλίων, που υποκαθίστανται από μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (*Cheynier,* 2005). Σύμφωνα λοιπόν με τη χημική τους δομή, οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σε: φλαβονοειδή, πολυφαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνες (*Rocchetti et al.,* 2017). Αναλυτικότερα:



Εικόνα 1.157: Οι χημικές δομές των 4 κατηγοριών των πολυφαινολών.

- **Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι μέλη της οικογένειας των πολυφαινολών και αποτελούν την πιο καλά μελετημένη κατηγορία. Πρόκειται για την πιο κοινή ομάδα πολυφαινολών στην ανθρώπινη διατροφή με περισσότερες από 4.000 φυσικές ενώσεις που συναντώνται σε εκχυλίσματα φρούτων, λαχανικών και τσαγιού (*Harborne*, 1986). Επιπλέον, χαρακτηριστικό της χημικής τους δομής είναι οι 2 αρωματικοί δακτύλιοι, οι οποίοι συνδέονται μέσω μιας γέφυρας 3 ατόμων άνθρακα (C6 – C3 – C6) (*Szliszka & Krol*, 2011).

Ανάλογα με τη χημική τους δομή διακρίνονται σε 6 υποομάδες: τις φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ισοβλαβόνες και ανθοκυανιδίνες (*Harborne*, 1986). Αρκετές λοιπόν, μελέτες in vivo και in vitro υποδεικνύουν πως τα φλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς παρεμποδίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης των κυτταρικών μεμβρανών (*Kim et al.*, 2014). Επίσης, διαθέτουν αντιφλεγμονώδη (*Hanakova et al.*, 2017) και αντικαρκινική δράση (*Burkard et al.*, 2017, *Wang et al.*, 2017).

- **Πολυφαινολικά οξέα**

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν σημαντική κατηγορία των πολυφαινολών. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά οξέα μπορούν να ταξινομηθούν ως υδροβενζοϊκά και υδροκινναμωμικά οξέα, τα οποία αντίστοιχα προέρχονται από τα φαινολικά μόρια βενζολίου και κινναμωμικού οξέος αντίστοιχα (*Taofiq et al.*, 2015). Τα φαινολικά οξέα είναι είναι οργανικά καρβοξυλικά οξέα όπου το καθένα περιέχει C3 – C1 του ρ – υδροξυβενζοϊκού οξέος ή C6 – C3 του κινναμωμικού οξέος. Αυτά τα φαινολικά οξέα βρίσκονται στα φυτά με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών και είναι συζευγμένα με μεγάλο αριθμό φυσικών ενώσεων όπως αλκοόλες, στερόλες, τριτερπενοειδή, γλυκοζίτες φαινολών και κυκλοεξανολών. Τέλος, αναφέρεται η αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή τους δράση έναντι διαφόρων βακτηρίων (*Cho et al.,* 1998).

- **Στιλβένια**

Υπάρχουν περισσότερα από 400 φυσικά στιλβένια και είναι μια ομάδα πολυφαινολών που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη 1,2 – διφαινυλαιθυλενίου (*Shen et al.,* 2009). Ωστόσο, η βιοσύνθεση τους είναι περιορισμένη δεδομένου ότι το βασικό ένζυμο σύνθεσής τους, η συνθάση στιλβενίου, δεν εκφράζεται παντού (Rivière et al., 2012). Αυτές οι ενώσεις συναντώνται σε τρόφιμα και ποτά και έχουν δείξει μια σειρά από ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία όπως αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δραστηριότητες (*Baur,* 2006).

Η πιο καλά μελετημένη ένωση είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία περιέχεται σε προϊόντα όπως τα σταφύλια και το κόκκινο κρασί (*Jang et al.,* 1997). Αναλυτικότερα, αυτή ένωση παρουσιάζει ευνοϊκές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, διότι προκαλείται αύξηση στην παραγωγή του νιτρικού οξειδίου (NO) από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων και μείωση σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (*Gresele et al.,* 2011, *Gresele et al.,* 2008). Παράλληλα, η ρεσβερατρόλη μειώνει το οξειδωτικό στρες ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα (*Baba et al.,* 2007).

- **Λιγνάνες**

Οι λιγνάνες αποτελούν μια ομάδα φυσικών πολυφαινολών που βρίσκονται σε διάφορα είδη φυτών. Έχουν εντοπιστεί λιγνάνες σε περίπου 70 οικογένειες στο φυτικό βασίλειο όπως για παράδειγμα σε δέντρα, χόρτα, δημητριακά και λαχανικά. Ειδικότερα, οι λιγνάνες βρίσκονται σε ρίζες, ριζώματα, μίσχους, φύλλα, σπόρους και φρούτα. Έχουν μια διαφορετική δομή που αποτελείται από 2 φαινυλοπροπανικές μονάδες. Τέλος, οι λιγνάνες έχει αποδειχθεί ότι έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων όπως αντιβακτηριακές και εντομοκτόνες επιδράσεις στα φυτά, και αντικαρκινικές, αντιϊκές, αντιφλεγμονώδεις, ανοσοκατασταλτικές, αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες στα θηλαστικά (*Talaei & Pan,* 2015, *Deo et al.,* 2017, *Teponno et al.,* 2016).

1.8.2 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες είναι οι πιο άφθονες χημικές ενώσεις που υπάρχουν στα φυτά. Φρούτα όπως σταφύλια, μήλο, αχλάδι, κεράσια, μούρα και τα υποπροϊόντα τους, λαχανικά, δημητριακά, και ποτά όπως κόκκινο κρασί, τσάι, καφές αλλά και δημητριακά, σοκολάτες και ξηρά όσπρια αποτελούν τρόφιμα που περιέχουν πολυφαινόλες. Επιπλέον, πολυφαινόλες εντοπίζονται σε βότανα, μίσχους, μπαχαρικά και άνθη (*Spencer et al.,* 2008).

Η βιοδιαθεμότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από παραμέτρους όπως η πέψη, η απορρόφηση και ο μεταβολισμός τους. Αν και οι πολυφαινόλες είναι οι πιο συχνές στην ανθρώπινη διατροφή δεν είναι απαραίτητα και οι πιο δραστικές, είτε επειδή έχουν χαμηλότερη εγγενή δραστηριότητα, είτε επειδή απορροφώνται ελάχιστα από το έντερο, είτε γιατί μεταβολίζονται γρήγορα. Η πλειοψηφία των πολυφαινολών υφίστανται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοσιδίων ή πολυμερών που δεν είναι δυνατή η απορρόφησή τους στην αρχική τους μορφή. Έτσι, οι πολυφαινόλες υδρολύονται από εντερικά ένζυμα ή από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και στη συνέχεια απορροφούνται. Επίσης, κατά τη διάρκεια της απορρόφησης οι πολυφαινόλες συζευγνύονται πρώτα με κύτταρα του εντέρου και στη συνέχεια με το ήπαρ. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τροποποιήσεις όπως μεθυλίωση, θείωση και γλυκουρονιδίωση. Τέλος, οι πολυφαινόλες και τα παράγωγά τους αποβάλλονται κυρίως στα ούρα και στη χολή. Οι πολυφαινόλες εκκρίνονται μέσω της χολικής οδού στο δωδεκαδάκτυλο, όπου υπόκεινται στη δράση βακτηριακών ενζύμων, ειδικά της γλυκουρονιδάσης και τα οποία μπορεί να απορροφηθούν εκ νέου. Αυτή η εντεροηπατική ανακύκλωση μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη παρουσία πολυφαινολών στο σώμα. Να σημειωθεί πως η γνώση της βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών είναι απαραίτητη για την κατανόηση των επιπτώσεών τους στην υγεία (*Manach et al*., 2004).

1.8.3 Βιολογικές επιδράσεις πολυφαινολών και υγεία

Οι πολυφαινόλες είναι μία από τις κυριότερες κατηγορίες φυσικών ουσιών που εμφανίζουν μια σειρά βιολογικών δραστηριοτήτων. Η βιβλιογραφία τεκμηριώνει πως η κατανάλωση πολυφαινολών μέσω των τροφών παρουσιάζει πλήθος ευεργετικών επιδράσεων για την υγεία όπως για παράδειγμα με τον μειωμένο κίνδυνο καρκίνου, καρδιαγγειακών νοσημάτων, γαστρεντερικών προβλημάτων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Οι παραπάνω ασθένειες έχουν συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλείται από την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών και της εξάλειψης τους.

Μια από τις κυρίαρχες δράσεις των πολυφαινολών είναι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, καθώς δρουν ως δότες ηλεκτρονίων και εξουδετερώνουν ή παρεμποδίζουν το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών και των πρόδρομων μορίων αυτών. Πράγματι, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών περιλαμβάνουν την καταστολή του σχηματισμού των ελεύθερων ριζών είτε μέσω αναστολής των ενζύμων που εμπλέκονται στη σχηματισμό τους είτε προστατεύοντας τα αμυντικά αντιοξειδωτικά (*Mishra* *et al.,* 2013). Αναλυτικότερα, οι πολυφαινόλες έχουν τη δυνατότητα χηλικοποίησης μετάλλων κυρίως χαλκού (Cu^{+2}) και ασβεστίου (Ca^{+2}), παρεμποδίζοντας τη δημιουργία ελεύθερων ριζών (*Mishra, Kumar & Pandey,* 2013). Ακόμη, η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τη συνθάση του νιντρικού οξειδίου (NOS) μπορεί να ρυθμίσει την παραγωγή NO. Επιπλέον, η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), η οποία θεωρείται βασική πηγή ελεύθερων ριζών φαίνεται, πως αναστέλλεται από ορισμένα φλαβονοειδή (*Nijveldt et al.,* 2001).

Οι πολυφαινόλες έχουν επίσης, και ορισμένες αντιφλεγμονώδεις και αντιβιοτικές ιδιότητες και μπορούν να ενεργοποιήσουν το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, που έχει κύριο ρόλο στη προστασία των κυττάρων έναντι οξειδωτικού στρες και φλεγμονής (*Cardozo et al.,* 2013). Επιπροσθέτως, οι πολυφαινόλες και ειδικότερα τα φλαβονοειδή, αλληλεπιδρούν με ROS και RNS τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξείδωσης προστατεύοντας τα κύτταρα πριν επηρεαστεί σοβαρά η βιωσιμότητά τους (*Kumar & Pandey,* 2013). Υπάρχει πληθώρα in vitro μελετών που επισημαίνουν τις ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών. Ωστόσο, χρειάζονται και άλλες έρευνες, ώστε να διεξαχθούν ορθά και ασφαλή συμπεράσματα για τον τρόπο δράσης τους in vivo, λαμβάνοντας υπ’ όψη και άλλες παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων το χρόνο, τη δόση και τη βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών αυτών στον οργανισμό (*Ding et al.,* 2018).

1.9 Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*)

Η καστανιά είναι ένα αγγειόσπερμο, δικοτυλήδονο, φυτό και ανήκει στην οικογένεια των Φηγοειδών (*Fagaceae*). Το κάστανο διανέμεται γεωγραφικά στην Ασία με τα είδη *Castaneae crenata* (Ιαπωνία) και *Castaneae mollissima* (Κίνα και Κορέα), στη βόρεια Αμερική με το είδος *Castaneae denata* και στην Ευρώπη με το κυριότερο είδος *Castaneae sativa Mill* (*Bounous,* 2005, *Lang et al.,* 2006). Να επισημανθεί πως εδώ και λίγες δεκαετίες στην Ευρώπη έχουν προκύψει υβρίδια με διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών *Castaneae crenata* και *Castaneae mollissima,* έτσι ώστε να είναι πιο ανθεκτικά σε ασθένειες.

Η Ευρωπαϊκή καστανιά καλλιεργείται για αιώνες σε αρκετές χώρες της περιοχής της Μεσογείου (*López-Sáez et al.,* 2017) και σύμφωνα με στοιχεία του 2017 σημειώθηκε αύξηση στην παραγωγή, που αντιστοιχεί σε 151.904 τόνους σε συνολικά 17 χώρες, μεταξύ των οποίων οι κύριοι παραγωγοί ήταν η Ιταλία (34,5%), η Ελλάδα (23,7%) και η Πορτογαλία (19,7%) (*Vanessa Silva et al.,* 2020). Αναλυτικότερα, το Ευρωπαϊκό κάστανο (*Castaneae sativa Mill*) εισήλθε στην ανατολική Μεσόγειο πριν από 90 εκατομμύρια χρόνια και εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη κατά τη διάρκεια της Καινοζωικής εποχής. Αργότερα, μεταξύ 900 π.Χ. και 700 π.Χ. καλλιεργήθηκε καλλιέργεια καστάνων στις Ασιατικές περιοχές της Κασπίας και της Μαύρης θάλασσας και στη συνέχεια εξαπλώθηκε γρήγορα στην Ελλάδα (*Adua,* 1999, *Conedera et al., 2004*). Στην Ελλάδα οι καστανιές καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές της Νότιας, Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας. Η ευρεία κατανομή αυτού του φυτού παρουσιάζεται σε ημιορεινές και ορεινές περιοχές με υψόμετρο μεταξύ 250m και 1.120m. Ακόμη, πρόκειται για ένα φυλλοβόλο και ψηλό φυτό που φτάνει έως και τα 30m και η ανάπτυξη του απαιτεί υγρό και ψυχρό κλίμα (*Konstantinidis et al.*, 2007).

Εικόνα 1.173: Η Ευρωπαϊκή καστανιά *Castaneae sativa Mill.*

Όσον αφορά τις ευεργετικές ιδιότητες των καστάνων, πλήθος μελετών αποδεικνύουν ένα καλό προφίλ βιοδραστικών ενώσεων, τόσο του ίδιου του καρπού όσο και παραπροϊόντων του (φύλλα, φλοιός, κέλυφος), με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Τα κάστανα επομένως, αποτελούν για τον άνθρωπο σημαντική πηγή πρόσληψης πολλών θρεπτικών ουσιών. Τα κάστανα μπορούν να καταναλωθούν ωμά ή μαγειρεμένα (ψημένα ή βρασμένα). Ωστόσο, οι διαδικασίες μαγειρέματος αλλάζουν τη σύσταση των θρεπτικών στοιχείων των καστάνων, βελτιώνοντας τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες και τα βιοδιαθέσιμα θρεπτικά συστατικά (*De Vasconcelos et al.*, 2010, *Cruz et al.*, 2013).

Τέλος, χρειάζεται να ληφθεί υπόψη πως οι διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και ο χρόνος αποθήκευσης επηρεάζουν τη θρεπτική σύνθεση και ποιότητα του καστάνου (*Fernandes et al.,* 2011). Για τη διατήρηση της ποιότητας των καστάνων και για την προστασία τους από έντομα και μικροοργανισμούς αναπτύσσονται τεχνικές χρησιμοποιώντας για παράδειγμα ακτίνες – γ. Σε μελέτη που διεξήχθη από τους *Fernades et. al.,* οι οποίοι διατήρησαν δείγματα καστανιάς σε ακτίνες – γ, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι διατηρήθηκε η σύσταση των θρεπτικών τους συστατικών (*Fernandes et al.,* 2011, *Antonio et al.,* 2011).

1.9.1 Βιολογική δράση των εκχυλισμάτων της Ευρωπαϊκής καστανιάς

Πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι τα κάστανα και συγκεκριμένα τα κάστανα του είδους *Castaneae sativa* έχουν μεγάλη διατροφική αξία λόγω της σύστασης διαφόρων θρεπτικών συστατικών που έχουν συσχετιστεί με διάφορες ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (*De Vasconcelos et al.,* 2010, *Barreira et al.,* 2012). Ακόμη, η παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), συμβάλλουν στην πρόληψη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας των κυττάρων, παρέχοντας προστασία από παθήσεις όπως υπέρταση και αθηροσκλήρωση, και καρδιαγγειακών παθήσεων (*Ruxton et al.,* 2004, *Choque et al.,* 2014, *Penumetcha et al.,* 2012).

Τα κάστανα καθώς και τα υπόλοιπα τμήματα του φυτού περιέχουν πολυφαινόλες, που αποτελούν τα πιο σημαντικά συστατικά με ευεργετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ειδικότερα, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές πολυφαινόλες μεταξύ των οποίων: φλαβονοειδή (ισοκερκετίνη, ρουτίνη, κερκετίνη, απιγενίνη, μυκητίνη, καμφερόλη), φαινολικά οξέα (γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ, π – υδροξυβενζοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, συναπικό οξύ, βανιλικό οξύ, p – κουμαρικό οξύ) και τανίνες (*De Vasconcelos et al.,* 2010, *Dı´az Reinoso et al.,* 2012, *Va´zquez et al.,* 2012, *Tuyen et al.,* 2018). Αυτές οι ενώσεις λοιπόν, εμπλέκονται στη διαδικασία άμυνας έναντι οξειδωτικών βλαβών, προστατεύοντας από ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (*Craft et al.,* 2012, *Lu et al.,* 2010).

Επιπροσθέτως, τα κάστανα καθώς και τα παραπροϊόντα αυτών, όπως τα φύλλα, είναι πλούσια σε διάφορες βιταμίνες όπως A, B, C απαραίτητες για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς είναι σημαντικές για μια ισορροπημένη διατροφή κυρίως για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα, βασική ένωση για την ανθρώπινη υγεία, την οποία οι άνθρωποι δεν μπορούν να συνθέσουν και την προσλαμβάνουν μόνο μέσω της τροφής είναι η βιταμίνη C. O βιοχημικός και ο μοριακός ρόλος της βιταμίνης C στον άνθρωπο είναι κυρίως η αντιοξειδωτική της δράση στα μιτοχόνδρια των ανθρώπινων κυττάρων (*FAO/WHO,* 2004, *Ching & Mohamed,* 2001).

Επιπλέον, η βιταμίνη Ε, η οποία ομοίως λαμβάνεται μόνο από την τροφή έχει αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα για τα PUFA και άλλα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, προστατεύοντάς τα από οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες (*Barreira et al.,* 2012, *Niki,* 2014). Η υψηλή πρόσληψη βιταμίνης Ε έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και αποτροπή νευροεκφυλιστικών διαταραχών (*Engelhart et al.,* 2002, *De Vasconcelos et al.,* 2010).

Ακόμη, τα κάστανα περιέχουν υψηλές ποσότητες μεταλλικών στοιχείων, τα οποία είναι σημαντικά για την υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, πολλές μελέτες έχουν επισημάνει την ύπαρξη μακροστοιχείων (Ca, P, K, Mg και S), καθώς και μικροστοιχείων (Fe, Cu, Zn και Mn), τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες των κυττάρων (*De Vasconcelos et al.,* 2010).

Τέλος, είναι γνωστό πως τα φυτά παράγουν ορισμένα βιοδραστικά μόρια, τα οποία αντιδρούν με άλλους οργανισμούς στο περιβάλλον, αναστέλλοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Αντίστοιχα, μελέτες υποδεικνύουν πως εκχυλίσματα καστανιάς παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι Gram+ και Gram^- βακτηρίων. Αυτή η αντιβακτηριακή ιδιότητα προέρχεται από φλαβονοειδή (*Basile et al.,* 2000).

1.10 Μυϊκά κύτταρα και οξειδωτικό στρες

Κάθε ζωντανός οργανισμός εκτίθεται σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται από φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού, όπως ο μεταβολισμός, η φαγοκυττάρωση, η φλεγμονή, η ενδοκυτταρική σηματοδότηση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση των κυττάρων (*Halliwell,* 2001, *Reid,* 2008) και η συστολή των μυών (*Linnane et al.,* 2002). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν και από μη φυσιολογικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η κακή διατροφή, η έκθεση σε ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία (*Baudet et al.,* 2012, *Kelsen,* 2012) Επιπλέον, όπως έχει ήδη προαναφερθεί το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ελέγχου ή / και μοριακής βλάβης βιομορίων. Άρα, υπερβολική παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, μια παθοφυσιολογική κατάσταση, που εμπλέκεται σε οξειδωτική βλάβη των μακρομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) (*Halliwell,* 2001, *Mylonas & Kouretas,* 1999), ανοσολογική δυσλειτουργία (*Schneider & Tiidus,* 2007) και μυϊκή βλάβη (*Nikolaidis et al.,* 2007).

Ειδικότερα, το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται συχνά σε μυϊκούς ιστούς που εκτίθενται σε ROS. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης στους σκελετικούς μύες σημειώνεται υψηλό ποσοστό κατανάλωσης O_2, που μπορεί να προκαλέσουν ατελή αναγωγή μείωση O_2 και διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και να οδηγήσουν στη παραγωγή ROS προκαλώντας οξειδωτικό στρες και τελικά, μυϊκή κόπωση, κυτταρική βλάβη και απόπτωση (*Phaneuf & Leeuwenburgh,* 2001, *McClung et al.,* 2010)

Επιπροσθέτως, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με διάφορες αλλαγές στα μιτοχόνδρια των μυϊκών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός, παραγωγή ενέργειας (ATP), ενδοκυτταρική ρύθμιση ασβεστίου, παραγωγή ελεύθερων ριζών, κυτταρική επιβίωση και κυτταρικό θάνατο. Η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών λοιπόν, οδηγεί σε μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις όπως κυτταρικό τραυματισμό και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων (*Birben et al.,* 2012), η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (*Pieczenik et al.,* 2007, *Muller et al.,* 2007). Επομένως, μελέτες και πειράματα σε μυϊκά κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας ώστε να αποφευχθεί το οξειδωτικό στρες και οι σχετιζόμενες με αυτό μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες συμβάλλοντας στην πρόληψη ή / και θεραπεία ασθενειών που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες.

2. Σκοπός

Η Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa*) χαρακτηρίζεται από υψηλή και πλούσια διατροφική αξία λόγω της σύστασης διαφόρων θρεπτικών συστατικών με σημαντική βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, τόσο ο ίδιος ο καρπός, όσο και παραπροϊόντα της καστανιάς (φύλλα, φλοιός, κέλυφος) αποδεικνύουν ένα καλό προφίλ βιοδραστικών ενώσεων που έχουν συσχετιστεί με διάφορες ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, όπως με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς και ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σε οροπρωτεΐνη γάλακτος σε διαφορετικές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12. Ερευνήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), καθώς και στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τέλος, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), φασματοφωτομετρικά.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι

3.1 Απομόνωση εκχυλισμάτων

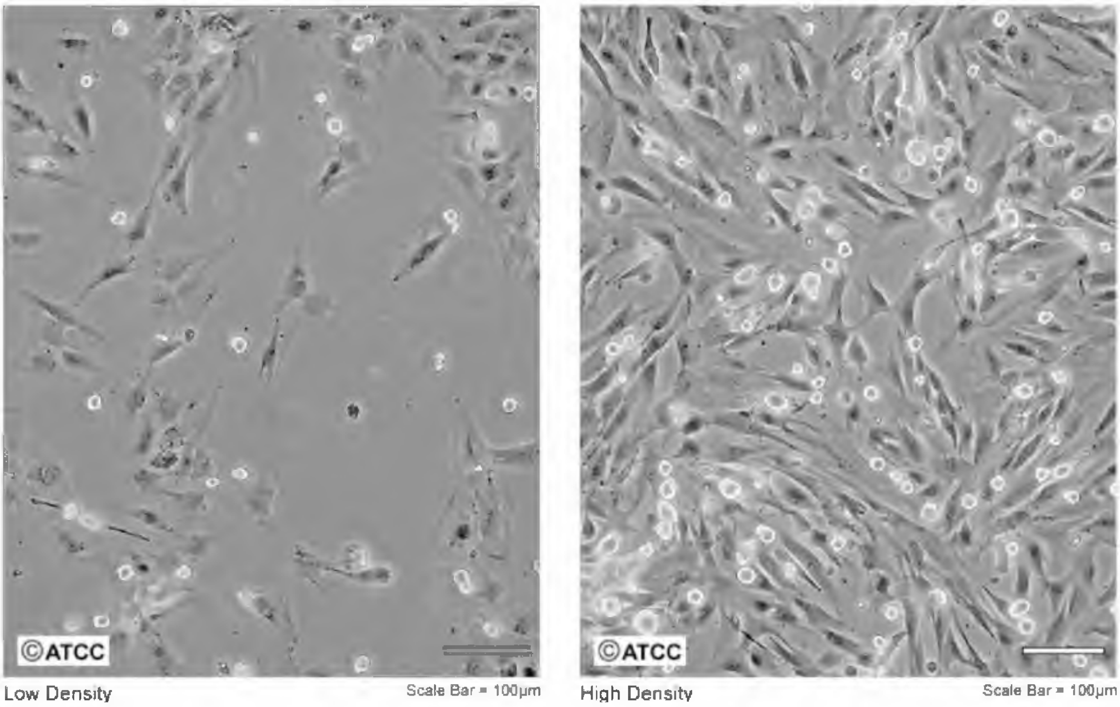
Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν εκχυλίσματα καστανιάς, τα οποία απομονώθηκαν από φύλλα Ευρωπαϊκής καστανιάς *Castanea sativa mill.* Στο σημείο αυτό χρειάζεται να επισημανθεί πως η διαδικασία απομόνωσης αυτών των εκχυλισμάτων απαρτίζει μέρος προηγούμενης μελέτης.

Αναλυτικότερα, η εκχύλιση των φύλλων καστανιάς πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής Microwave Assisted Extraction (MAE). Πρόκειται για μια μέθοδο που περιλαμβάνει την αποτελεσματική παραγωγή φυσικών ενώσεων από ακατέργαστα φυτά (slideshare.net). Επιπροσθέτως, οι εκχυλίσεις διεξήχθησαν στους 47°C, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το νερό, με αναλογία στερεού - υγρού 1:13,5 και χρόνο εκχύλισης 60 λεπτά. Στη συνέχεια, παρήχθησαν από τα παραγόμενα εκχυλίσματα, τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Τα ενθυλακωμένα προϊόντα αποτελούνται από 10% εκχύλισμα φύλλων και 90% οροπρωτεΐνη γάλακτος. Η τεχνική της ενθυλάκωσης βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία των τροφίμων, καλλυντικών και ζωοτροφών. Η ενθυλάκωση πραγματοποιείται με ποικίλες μεθόδους και παρέχει πολλά πλεονεκτήματα στο προϊόν που ενθυλακώνεται. Συγκεκριμένα, στόχος της ενθυλάκωσης είναι η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των εκχυλισμάτων μέσω της προστασίας των βιοδραστικών μορίων από οξειδώσεις. Τέλος, τα εκχυλίσματα φύλλων της Ευρωπαϊκής καστανιάς, καθώς και τα ενθυλακωμένα προϊόντα αυτών αποξηράθηκαν και μετατράπηκαν σε σκόνη μέσω της τεχνικής freeze - drying και χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

3.2 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς C2C12

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C2C12, τα οποία είναι κύτταρα που προέρχονται από το μυϊκό ιστό ποντικιών. Αναλυτικότερα, πρόκειται για έναν υπόκλωνο της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού που δημιουργήθηκε από τους *Yaffe & Saxel*. Επίσης, η κυτταρική σειρά C2C12 διαφοροποιείται γρήγορα σχηματίζοντας συσταλτικούς μυοσωλήνες και παράγοντας χαρακτηριστικές μυϊκές πρωτεΐνες (lgcstandards-atcc).

Όσον αφορά, την καλλιέργεια της προαναφερόμενης κυτταρικής σειράς χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες επιφάνειας 25cm^2 με 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% fetal bovine serum. Στη συνέχεια, η φλάσκα με τα κύτταρα χρειαζόταν να τοποθετηθεί σε ειδικό κλίβανο με θερμοκρασία στους 37°C και συγκέντρωση CO_2 5% προκειμένου να ξεκινήσει η επώαση των κυττάρων, ώστε να αναπτυχθούν. Η ανάπτυξη των κυττάρων συνεχιζόταν έως όπου τα κύτταρα καλύψουν το 70% σε πυκνότητα / πληρότητα τη φλάσκα. Έπειτα, έπρεπε να γίνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split). Ειδκότερα, η έναρξη της ανακαλλιέργειας περιλάμβανε την αφαίρεση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού και πλύση με 1ml PBS. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η προσθήκη 500μl τρυψίνης (0,25%) με στόχο την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας και τα κύτταρα επωάζονταν στον ειδικό προαναφερόμενο κλίβανο για 2 – 3 λεπτά, ώστε να δράσει η τρυψίνη. Έπειτα, πραγματοποιούταν επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων ομοίως σε πλήρες θρεπτικό υλικό, αρχικά για να σταματήσει η δράση της τρυψίνης αλλά και για να μπορέσουν τα κύτταρα να αναπτυχθούν ξανά. Τέλος, τα κύτταρα διανέμονταν σε νέες φλάσκες οι επιφάνειες των οποίων καλύπτονταν κατά 20% από τα κύτταρα. Να σημειωθεί πως η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιούνταν σε πλήρες συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar airflow) με στόχο την αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων.



Εικόνα 3.1: Απεικόνιση μορφολογίας κυττάρων C2C12 από οπτικό μικροσκόπιο.
Α: Καλλιέργεια κυττάρων με χαμηλή πυκνότητα.
Β: Καλλιέργεια κυττάρων με υψηλή πυκνότητα (lgcstandards-atcc).

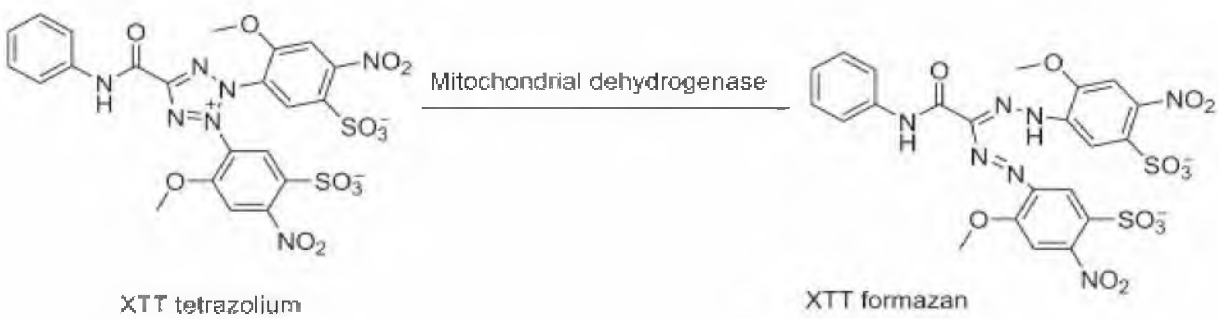
3.3 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT

Για τον προσδιορισμό αλλαγών στον αριθμό των κυττάρων και τη μεταβολική τους δραστηριότητα χρησιμοποιήθηκε μια χρωματομετρική μέθοδος, η οποία βασίζεται στο χημικό αντιδραστήριο XTT [άλας της 2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλο)-2H-τετραζολο-

5-καρβοξυανιλίνης] και πρόκειται για μια νεότερη χρωστική άλατος τετραζολίου που χρησιμοποιείται ευρέως παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη βιωσιμότητα, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων (*Roehm et al.,* 1991).

2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η χρωματομετρική αυτή μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του κίτρινου χρώματος άλατος τετραζολίου XTT προς το σχηματισμό φορμαζάνης, που αποτελεί μια υδατοδιαλυτή χρωστική ουσία με πορτοκαλί χρώμα, στα μεταβολικά ζωντανά ενεργά κύτταρα (*Zhao et al.,* 2002). Η μετατροπή αυτή καταλύεται από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 3.2 (*Wang et al.,* 2011). Το παραγόμενο προϊόν (υδατοδιαλυτή φορμαζάνη) μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωμετρικά με τη χρήση φασματοφωμέτρου, το οποίο μετρά την απορρόφηση. Η οπτική απορρόφηση που υπολογίζεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πορτοκαλί χρωστικής που παράγεται. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός πως μόνο τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ανάγουν το XTT, διότι αυτά σε αντίθεση με τα νεκρά, διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες. Συμπερασματικά, το XTT μπορεί να αξιοποιηθεί για την αξιολόγηση της επίδρασης κάποιου παράγοντα / ουσίας στην βιωσιμότητα των κυττάρων και επομένως να εκτιμηθεί η κυτταροτοξικότητα του εκάστοτε παράγοντα.



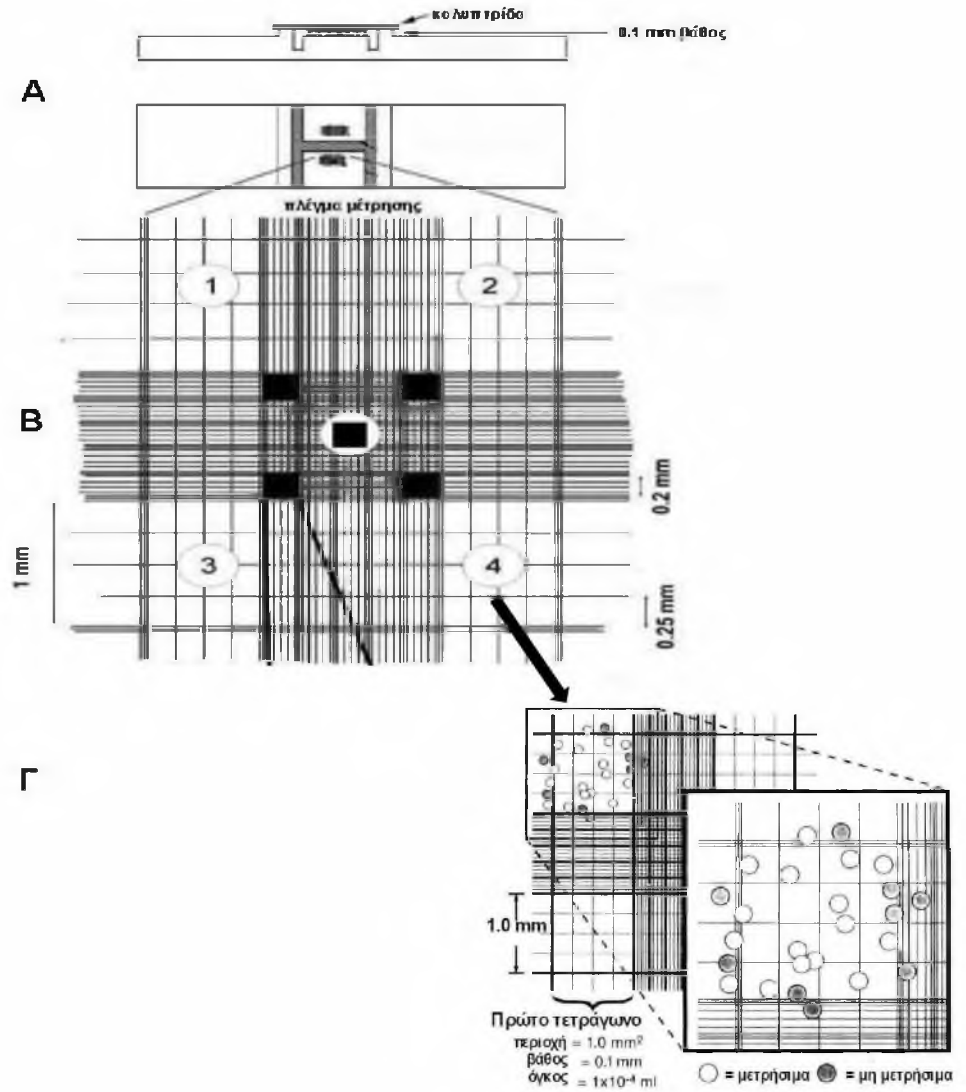
Εικόνα 3.2: Ενζυματική μετατροπή του άχρωμου XTT στο έγχρωμο προϊόν φορμαζάνης.

3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Για να ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία ενός πειράματος προσδιορισμού της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT απαιτούνται 3 μέρες.

1η μέρα: Στρώσιμο κυττάρων (παράλληλα και για τις 2 ουσίες). Διαδικασία:

- Συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα με τη διαδικασία του split όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε παράγραφο 2.2)
- Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας σε πλάκα Neubauer



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση πλάκας Neubauer.

Α: Πλάγια κάτοψη.

Β: Μεγεθυμένο πλέγμα μέτρησης.

Γ: Μεγεθυμένο τετράγωνο.

Να σημειωθεί πως για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στον αρχικό όγκο εναιωρήματος, υπολογίζεται ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν στα 4 τετράγωνά 1, 2, 3, 4 (1+2+3+4 / 4) και πολλαπλασιάζεται με το 10^4. Δηλαδή:

$$\mathbf{(1+2+3+4) / 4 \times 10^4} \textbf{ κύτταρα / mL}$$

- Τοποθέτηση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων (10^3) σε 96-well plate
- Επώαση overnight στον ειδικό κλίβανο

2^{η} μέρα: Επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα των 2 ουσιών (παράλληλα και για τις 2 ουσίες). Διαδικασία:

- Ζύγισμα των 2 ουσιών σε 2 διαφορετικά tubes
- Προσθέτω στα αντίστοιχα tubes που έχω ζυγίσει τις ουσίες, τους αντίστοιχους όγκους θρεπτικού χωρίς ορό και ακολουθεί vortex μέχρι να διαλυθεί η σκόνη της κάθε ουσίας
- Προετοιμασία των υπόλοιπων tubes στα οποία πραγματοποιούνται οι διαδοχικές αραιώσεις για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας. Σε κάθε tube γίνεται προσθήκη 600μl θρεπτικού χωρίς ορό
- Μεταφέρω από το αρχικό tube με την ουσία 500μl στο επόμενο tube και ούτω κάθε εξής (ανάμεσα σε κάθε μεταφορά γίνεται vortex)
- Αφαίρεση με πολυκάναλη πιπέτα του θρεπτικού χωρίς ορό από όλα τα wells
- Πλύση με 100μl PBS σε κάθε well
- Στα wells με το control τοποθετούνται 100μl θρεπτικού χωρίς ορό
- Στα υπόλοιπα wells τοποθετούνται 100μl από το κάθε tube της αντίστοιχης συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας
- Επώαση για 24h στον ειδικό κλίβανο

3^{η} μέρα: Προσθήκη χρωστικής ουσίας (παράλληλα και για τις 2 ουσίες). Διαδικασία:

- Παρασκευή mix χρωστικής (για 5ml XTT labeling reagent χρειάζονται 100μl electron coupling reagent)
- Προσθήκη 50μl από το mix της χρωστικής σε κάθε well
- Επώαση για 24h στον ειδικό κλίβανο

Τέλος, τα δείγματα είναι έτοιμα για φωτομέτρηση στα 450nm σε φασματοφωτόμετρο multiplate reader, με τη χρήση του λογισμικού της εταιρείας Biotech. Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα της παραπάνω τεχνικής, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τα εκχυλίσματα είναι:

- Φύλλα καστανιάς: 31,25μg/ml, 62,5μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, και τα
- Ενθυλακωμένα σε οροπρωτεΐνη φύλλα καστανιάς: 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 1.000μg/ml.

3.4 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS και της GSH με κυτταρομετρία ροής

3.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (FlowCytometry, FC) είναι μια τεχνολογία αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, η οποία παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Οι μετρήσεις αυτές γίνονται με την προϋπόθεση πως τα κύτταρα ρέουν μεμονωμένα σε ένα διάλυμα υπό την μορφή εναιωρήματος. Στα βασικά οφέλη αυτής της τεχνικής περιλαμβάνονται η ταχεία ανάλυση και η μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου ή σωματιδίου καθώς αυτό περνάει από μια δέσμη φωτός (συνήθως laser). Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο που έχει εφαρμογές στην ανοσολογία, τη μοριακή βιολογία, τη βακτηριολογία, την ιολογία, τη βιολογία του καρκίνου και την παρακολούθηση των μολυσματικών ασθενειών (*McKinnon et al.*, 2018). Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ευκαρυωτικών κυττάρων, βακτηρίων, χρωμοσωμάτων και παρ΄ όλο που όλα τα δείγματα χρειάζεται να είναι σε μορφή διαλύματος, είναι εφικτή και η ανάλυση κυττάρων από στερεούς ιστούς, που θα πρέπει ωστόσο να διαχωριστούν τα κύτταρα και να εναιωρηθούν σε κάποιο διαλύτη. Επιπλέον, στο κυτταρόμετρο αναλύονται κύτταρα ή σωματίδια μεγέθους 0,5 – 50μm και προσδιορίζεται το μέγεθός τους, η εσωτερική πολυπλοκότητά τους και η ένταση φθορισμού.

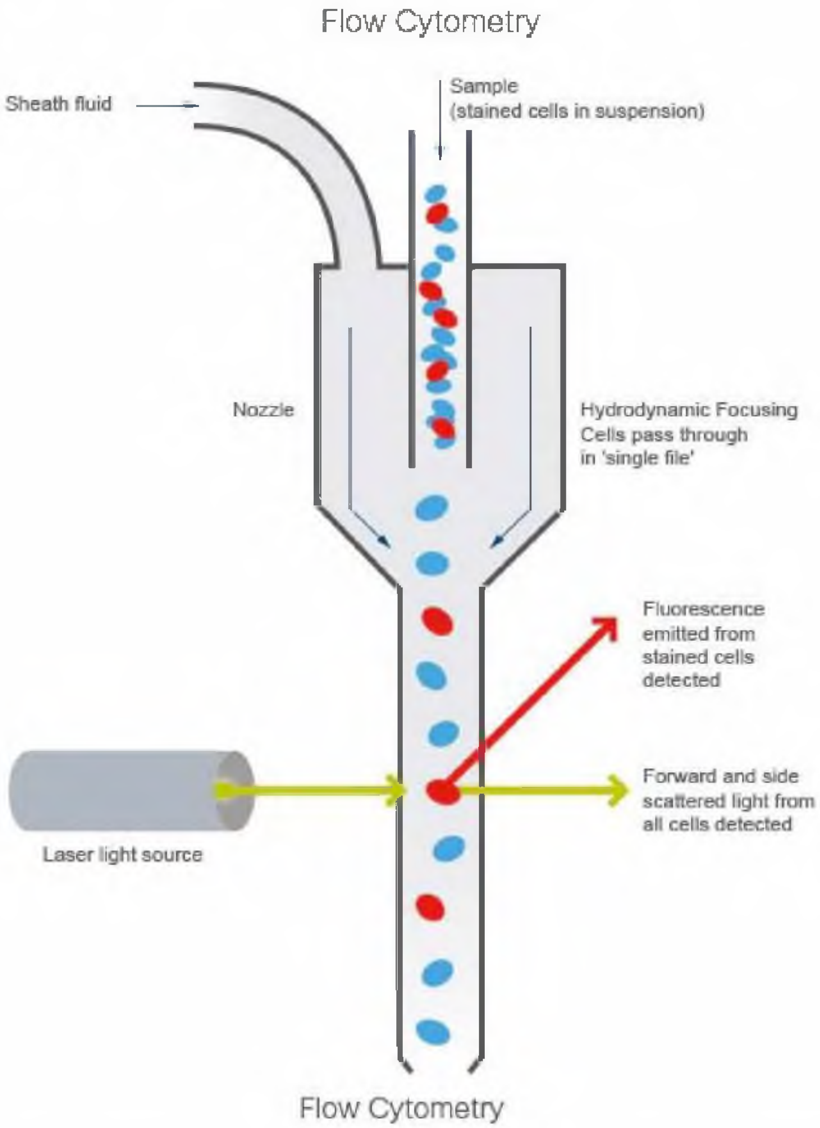
Η δέσμη laser ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού και ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Αναλυτικότερα, υπάρχει ένας ανιχνευτής ο οποίος βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία (forward scatter), ανιχνευτές που βρίσκονται σε κατεύθυνση κάθετη ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία (side scatter) καθώς και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Τα κύτταρα / σωματίδια λοιπόν διεγείρονται και εκπέμπουν φως διαφορετικού μήκους κύματος σε σχέση με αυτό της πηγής. Τόσο τα διασκορπισμένα όσο και τα φωτεινά σήματα φθορισμού διαβάζονται από τους ανιχνευτές (όπως φωτοδιόδους ή φωτοπολλαπλασιαστικούς) και στη συνέχεια αυτά τα σήματα μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά σήματα που αναλύονται από έναν υπολογιστή και με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η συλλογή των απαραίτητων πληροφοριών σχετικά με τη χημική και φυσική δομή κάθε κυττάρου. Κάθε σωματίδιο αναλύεται για:

- Σκέδαση ορατού φωτός, η οποία μετράται σε 2 διαφορετικές κατευθύνσεις:

1. Εμπρόσθιος σκεδασμός (Forward Scatter ή FSC), που εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου
2. Πλευρικός σκεδασμός (Side Scatter ή SSC), που εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου
3.

- Μία ή περισσότερες παραμέτρους φθορισμού.

Να σημειωθεί επίσης, πως η διασπορά φωτός είναι ανεξάρτητη από τον φθορισμό.



Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός κυτταρομέτρου ροής.

Επιπροσθέτως, χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατός ο προσδιορισμός διαφόρων δεικτών οξειδωτικού stress σε κύτταρα, έτσι ώστε να μπορούμε να διαπιστώσουμε το οξειδωτικό stress που προκαλείται στα κύτταρα ή ακόμα και την αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης.

Όσον αφορά, τον προσδιορισμό του επιπέδου των ROS στα κύτταρα γίνεται χρήση της χρωστικής DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), οποία αφού εισχωρήσει στα κύτταρα από-ακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε ένα μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται παρουσία των ROS σε DCF (2,7-dichlorofluorescin) (*Eruslanov & Kusmartsev,* 2010). Η DCF ανιχνεύεται από τους ανιχνευτές του κυτταρομέτρου λόγω του πράσινου σήματος που εκπέμπει. Άρα, μέσω των επιπέδων της DCF μπορούν να υπολογιστούν τα επίπεδα των ROS (όσο μεγαλύτερη η τιμή της DCF, τόσο περισσότερες οι ROS). Τέλος, για τον προσδιορισμό της GSH, η οποία παράγεται ενδογενώς στα κύτταρα και η παρουσία της δηλώνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση οξειδωτικού stress χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Thiol-Green dye, που συνδέεται με τις θειόλες του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης και της GSH και η οποία κατά τη σύνδεση φθορίζει (Intracellular GSH Assay Kit).

3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Για να ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία ενός πειράματος κυτταρομέτρου, τόσο για τον προσδιορισμό των ROS, όσο για τη GSH απαιτούνται 3 μέρες:

1η μέρα: Στρώσιμο κυττάρων σε 6-well plates (παράλληλα και για τις 2 ουσίες).

- o Για τον προσδιορισμό των ROS:
- Συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα με τη διαδικασία του split όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε παράγραφο 2.2)
- Τοποθέτηση 1,5ml πλήρες θρεπτικού μέσου σε κάθε well
- Τοποθέτηση 300μl κυττάρων σε κάθε well
- Overnight επώαση στον ειδικό κλίβανο

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τις 4 συγκεντρώσεις των 2 ουσιών για τις ROS. Άρα, χρησιμοποιούνται 2 συνολικά 6-well plates. Να σημειωθεί επίσης, πως και για τις δύο ουσίες από κάθε 6-well plate χρησιμοποιούνται μόνο τα 5 wells (1 well για το control και 5 wells για τις 4 συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας).

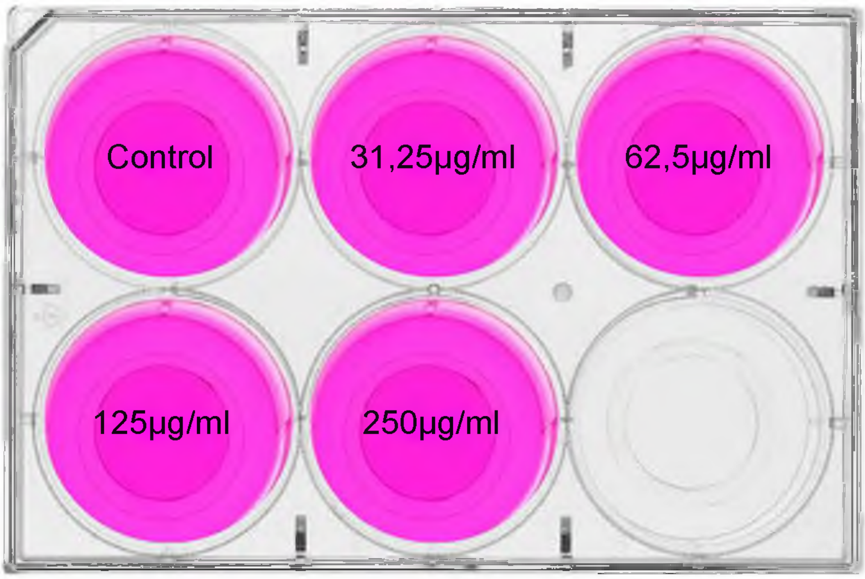
- o Για τον προσδιορισμό της GSH όσον αφορά το στρώσιμο των κυττάρων ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται για τις ROS και προκύπτουν 2 όμοια plates όπως απεικονίζεται στην εικόνα 3.5.

Εικόνα 3.5: Σχηματική απεικόνιση των 6-well plates μετά την προσθήκη των κυττάρων. 1 plate για τα φύλλα και ένα όμοιο plate για τα ενθυλακωμένα φύλλα καστανιάς.

2η μέρα: Επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα των 2 ουσιών (παράλληλα και για τις 2 ουσίες).

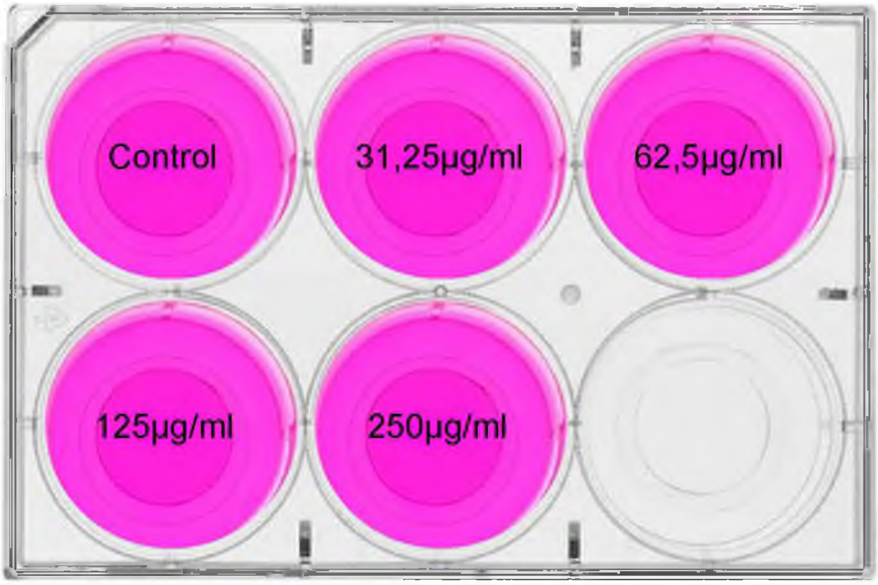
- Για τον προσδιορισμό των ROS:

- Ζύγισμα των 2 ουσιών σε 2 διαφορετικά falcons
- Προσθέτω στα αντίστοιχα falcons που έχω ζυγίσει τις ουσίες τους αντίστοιχους όγκους θρεπτικού χωρίς ορό και ακολουθεί vortex μέχρι να διαλυθεί η σκόνη της κάθε ουσίας
- Προετοιμασία των υπόλοιπων falcons στα οποία πραγματοποιούνται οι διαδοχικές αραιώσεις για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας. Σε κάθε falcon γίνεται προσθήκη 4ml θρεπτικού χωρίς ορό
- Μεταφέρω από το αρχικό falcon με την ουσία 4ml στο επόμενο falcon και ούτω κάθε εξής (ανάμεσα στην κάθε μεταφορά γίνεται vortex)
- Στα wells με το control τοποθετούνται 2ml θρεπτικού χωρίς ορό
- Στα υπόλοιπα wells τοποθετούνται 2ml από το κάθε falcon της αντίστοιχης συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας
- Επώαση για 24h σε ειδικό κλίβανο



Εικόνα 3.6: Σχηματική απεικόνιση των 6-well plates μετά την προσθήκη των αντίστοιχων συγκεντρώσεων φύλλων καστανιάς.

- Για τον προσδιορισμό της GSH όσον αφορά την επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα των ουσιών ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται για τις ROS.



Εικόνα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των 6-well plates μετά την προσθήκη των αντίστοιχων συγκεντρώσεων των ενθυλακωμένων φύλλων καστανιάς.

3η μέρα: Προσθήκη χρωστικής ουσίας (παράλληλα και για τις 2 ουσίες).

- Για τον προσδιορισμό των ROS:

- Παρασκευή mix χρωστικής 10μM DCFDA σε PBS από το αρχικό stock χρωστικής 20mM σε DMSO
- Αφαίρεση θρεπτικού χωρίς ορό από κάθε well
- Προσθήκη 1,5ml από το mix της χρωστικής σε κάθε well (πριν την αποκόλληση των κυττάρων)
- Επώαση 45 λεπτά στον ειδικό κλίβανο
- Αφαίρεση χρωστικής
- Πλύση με 0,5ml PBS σε κάθε well
- Προσθήκη 250μl τρυψίνης σε κάθε well
- Προσθήκη 800μl PBS σε κάθε well
- Μεταφορά των κυττάρων από το κάθε well σε αντίστοιχο tube
- Φυγοκέντρηση των tubes για 5 λεπτά σε 1.200rpm
- Τοποθέτηση tubes σε πάγο
- Αφαίρεση υπερκειμένου από κάθε tube
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε κάθε tube με 400μl PBS και μεταφορά στα αντίστοιχα σωληνάρια κυτταρομέτρου

- Για τον προσδιορισμό της GSH:

- Αφαίρεση θρεπτικού χωρίς ορό από κάθε well
- Πλύση με 0,5ml PBS σε κάθε well

- Προσθήκη 250μl τρυψίνης σε κάθε well
- Προσθήκη 800μl PBS σε κάθε well
- Μεταφορά των κυττάρων από το κάθε well σε αντίστοιχο tube
- Φυγοκέντρηση των tubes για 5 λεπτά σε 1.200rpm
- Αφαίρεση υπερκειμένου από κάθε tube
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε κάθε tube με 1ml PBS
- Προσθήκη 5μl χρωστικής σε κάθε tube
- Επώαση για 30 λεπτά στον ειδικό κλίβανο
- Φυγοκέντρηση των tubes για 5 λεπτά σε 1.200rpm
- Αφαίρεση υπερκειμένου από κάθε tube
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε κάθε tube με 400μl PBS και μεταφορά στα αντίστοιχα σωληνάρια κυτταρομέτρου

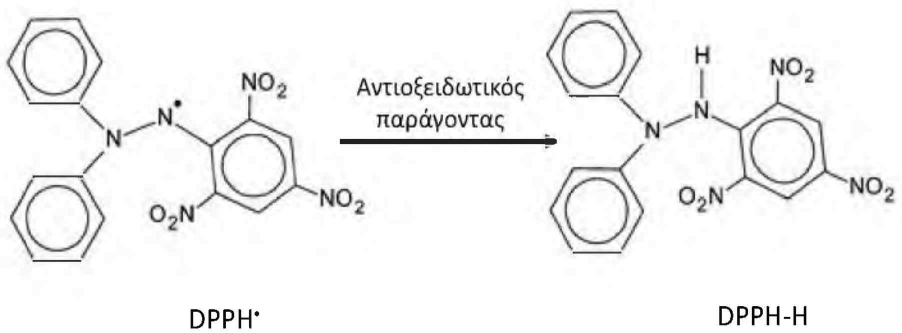
Τελικά, τα κυτταρικά εναιωρήματα είναι έτοιμα για τοποθέτηση και ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

Η ανάλυση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ρυθμό περίπου 1.000 γεγονότων (events)/ sec. Επίσης, οι αναλύσεις των επιπέδων των ROS και της GSH έγινε σε 10.000 κύτταρα/ δείγμα και η ένταση φθορισμού καταμετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

3.5 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των εκχυλισμάτων

3.5.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) βασίζεται στη μέθοδο DPPH. Αναλυτικότερα, η TAC χαρακτηρίζεται με βάση την ικανότητα της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH$^{\bullet}$), παρουσία αντιοξειδωτικού μορίου που δρα ως δότης ενός ατόμου υδρογόνου, να ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H). Σε αυτή την περίπτωση, η DPPH υπολογίζεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 520nm. Άρα, αναμένεται πως παρουσία του αντιοξειδωτικού παράγοντα η τιμή της TAC θα είναι χαμηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του δείγματος – μάρτυρα (τυφλό), το οποίο περιέχει μόνο την DPPH.



Εικόνα 3.8: Μετατροπή της DPPH$^{\bullet}$ παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα σε DPPH-H.

3.5.2 Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1^{η} μέρα: Επώαση των κυττάρων με τα εκχυλίσματα των 2 ουσιών (παράλληλα και για τις 2 ουσίες). Διαδικασία:

- Ζύγισμα των 2 ουσιών σε 2 διαφορετικά tubes
- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τις φλάσκες που καλλιεργούνται τα κύτταρα
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM απουσία ορού FBS, το οποίο περιέχει εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις για 24 ώρες

2^{η} μέρα: Προσδιορισμός της DPPH. Διαδικασία:

- Αποκόλληση και συλλογή των κυττάρων από τη φλάσκα 25cm^2 με τη διαδικασία του split όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε παράγραφο 2.2)
- Φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Πλύση των κυττάρων με 1ml PBS (αναλογία 1:3 0,01M με pH 7,4)
- Φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 150μl PBS (0,01M με pH 7,4), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Aprotinin-EDTA-PMSF, SigmaAltrich)
- Λύση των κυττάρων με υπερήχους για 70sec σε περιοδικά διαστήματα των 10sec
- Φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων για 15 λεπτά στα 10.000rcf
- Έπειτα το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για περαιτέρω μελέτη των φασματοφωτομετρικών δεικτών (Στο σημείο αυτό μπορεί να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί στους -80°C)
- Υπολογισμός συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κυτταρικού εναιωρήματος με τη μέθοδο Bradford. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1mL, όπου περιέχονται 100μl κυτταρικού αιωρήματος, 400μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (10mM με pH 7,4) και 500μl διαλύματος ρίζας DPPH$^{\bullet}$ 0,1mM (50μM τελική συγκέντρωση ρίζας)
- Τα δείγματα – control για την αντίδραση περιέχουν 400μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (10mM με pH 7,4), 500μl διαλύματος ρίζας DPPH$^{\bullet}$ 0,1mM (50μM τελική συγκέντρωση ρίζας) και 100μl PBS με αναστολείς πρωτεασών
- Ανάδευση δειγμάτων και επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 15000 cf για 3min στους 25°C

- Το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm (Μηδενισμός φασματοφωτόμετρου με αέρα)

Να σημειωθεί πως κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

3.5.3 Υπολογισμοί

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε μmol της ρίζας DPPH˙ που ανάγεται σε DPPH-H από τα αντιοξειδωτικά μόρια των δειγμάτων ανά mg πρωτεΐνης που περιέχεται σε κάθε δείγμα, σύμφωνα με το τύπο:

$$\mathbf{TAC\ (\mu mol\ DPPH^{\bullet}/mg\ πρωτεΐνης) =}$$
$$\mathbf{[(A_{τυφλού} - A_{δείγματος}) / (A_{τυφλού}) \times 0{,}05 \times 10] / C_{δ},}$$

Όπου:

- $A_{τυφλού}$: η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος – μάρτυρα (τυφλό)
- $A_{δείγματος}$: η μέση τιμή απορρόφησης του προς εξέταση δείγματος
- 0,05: η τελική συγκέντρωση της ρίζας DPPH˙ στο 1mL της αντίδρασης
- 20: ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (τελικός όγκος της αντίδρασης/μl αιωρήματος, 1.000μl/50μl) και
- $C_{δ}$: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (mg/mL) όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford

3.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων διεκπεραιώθηκε συνδυάζοντας τη μέθοδο one-way ANOVA και τη δοκιμασία Tukey. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο one-way ANOVA προσδιορίζεται αν υπάρχει μεταξύ των ομάδων προς εξέταση στατιστική σημαντική διαφορά, ενώ με τη δοκιμασία Tukey, προσδιορίζεται μεταξύ ποιων παρουσιάζεται αυτή η στατιστικά σημαντική διαφορά. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p<0{,}05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (SD, Standard Deviation).

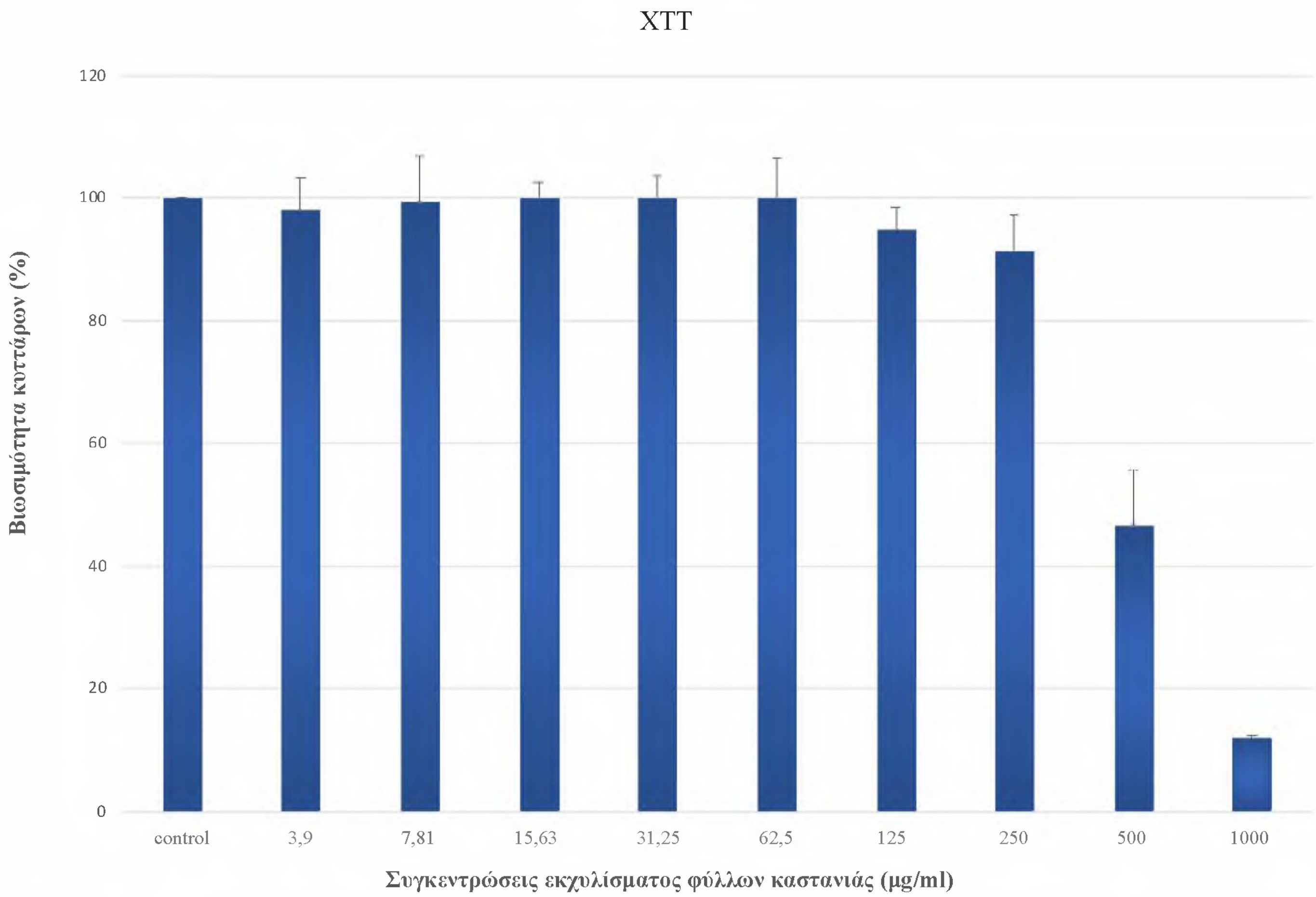
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

4.1 Η επίδραση των εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12 (XTT)

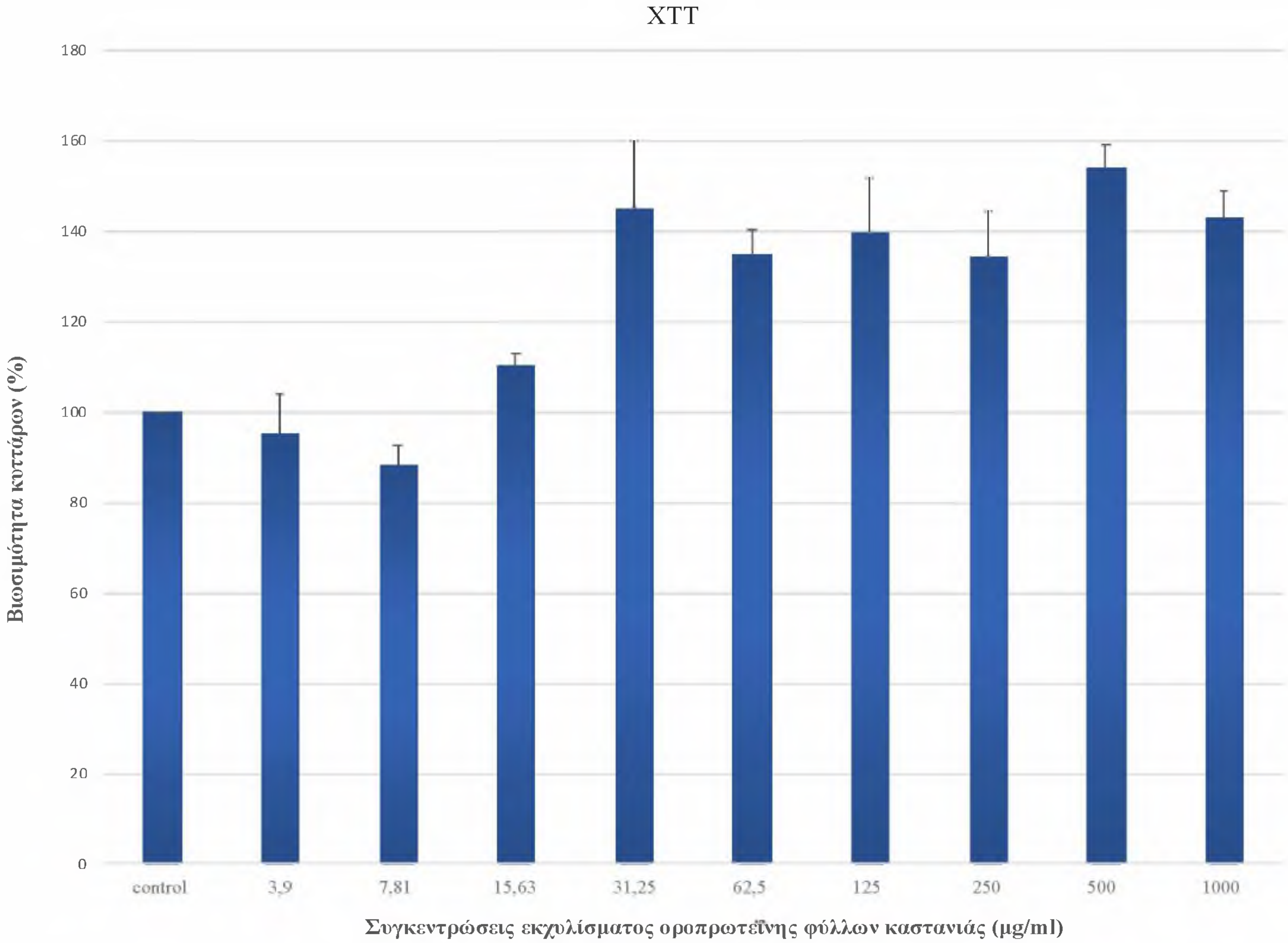
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται η επί τοις εκατό (%) αναστολή σχετικά με την βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12 ύστερα από 24ωρη επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων φύλλων καστανιάς και ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων φύλλων καστανιάς. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν για κυταρροτοξικότητα και για τα 2 εκχυλίσματα είναι οι εξής:

- 3,9μg/ml
- 7,81μg/ml
- 15,63μg/ml
- 31,25μg/ml
- 62,5μg/ml
- 125μg/ml
- 250μg/ml
- 500μg/ml
- 1.000μg/ml.

Πιο αναλυτικά, παρουσία του εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις μέχρι και 250μg/ml (Διάγραμμα 4.1). Άρα, οι 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν να αξιοποιηθούν είναι οι: 31,25, 62,5, 125 και 250μg/ml. Επίσης, παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά η βιωσιμότητα των κυττάρων ακόμα και στην πιο υψηλή συγκέντρωση (1.000μg/ml) (Διάγραμμα 4.2) και επομένως, οι 4 μη τοξικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες: 125, 250, 500, 1.000 μg/ml.



Διάγραμμα 4.1: Η επί τοις εκατό (%) βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς.



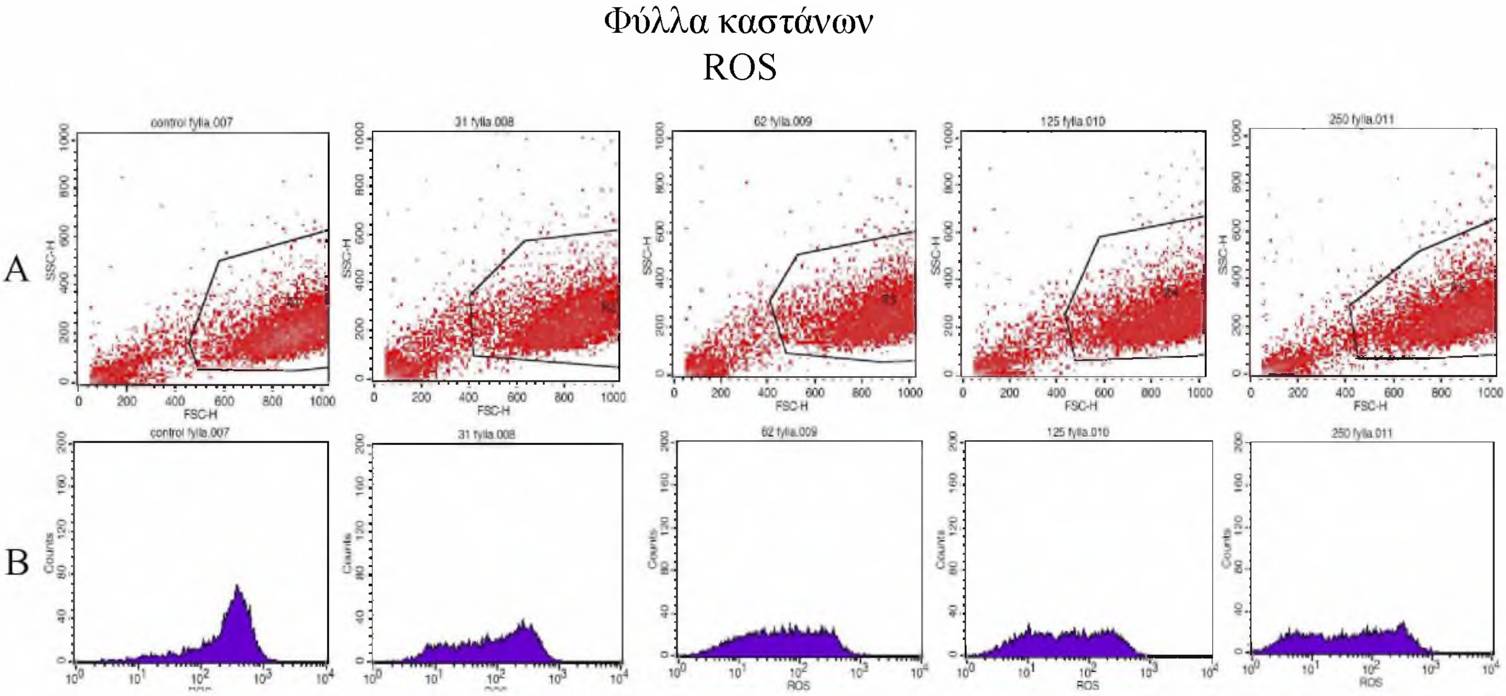
Διάγραμμα 4.2: Η επί τοις εκατό (%) βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς.

4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων των δραστικών μομφών οξυγόνου (ROS) σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12

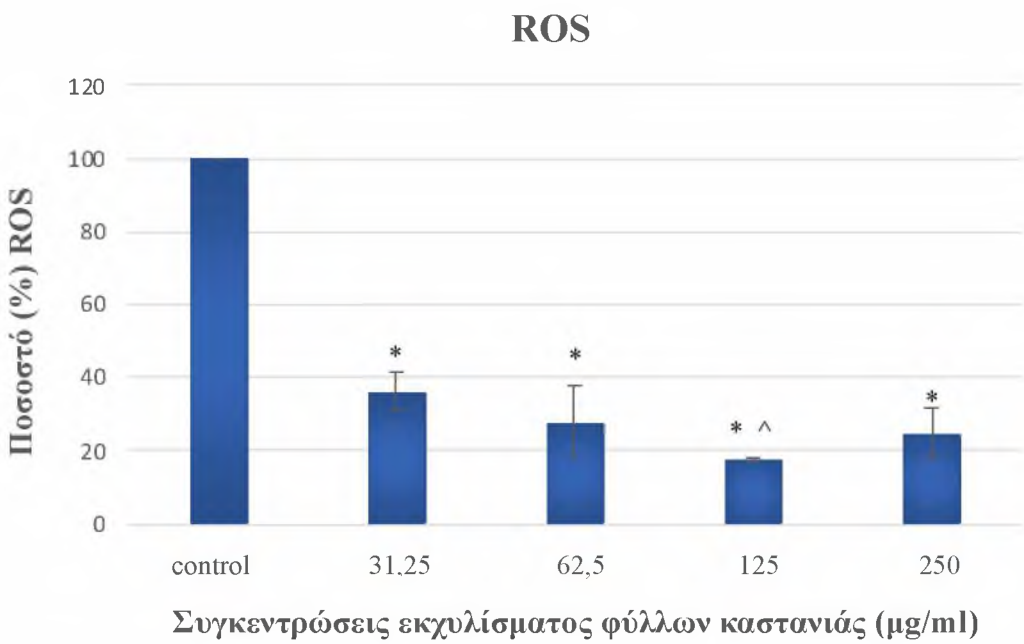
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα επίπεδα των ROS σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, ύστερα από 24ωρη επώαση με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των 2 εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, το διάγραμμα 4.3 αφορά το εκχύλισμα φύλλων καστανιάς, ενώ το διάγραμμα 4.4 το ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς. Ειδικότερα, για κάθε ένα από τα 2 εκχυλίσματα υπολογίστηκαν τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου σε κύτταρα-control (κύτταρα-ελέγχου) και σε 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, όπως αυτές καθορίστηκαν από τη διαδικασία κυτταροτοξικότητας XTT. Από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, τα οποία απεικονίζονται στα γραφήματα 4.1 και 4.2, προκύπτουν τα διαγράμματα 4.3 και 4.4 αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 4.3 παρατηρείται πως τα επίπεδα των ROS, παρουσία και των 4 συγκεντρώσεων εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), μειώνονται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα-control. Παράλληλα, επισημαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωση 125μg/ml σε σχέση με τη συγκέντρωση 31,25μg/ml.

Όσον αφορά το διάγραμμα 4.4, σημειώνεται πως παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς και στις 4 συγκεντρώσεις (125, 250, 250, 500μg/ml) μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα των ROS σε σύγκριση με τα κύτταρα-control. Επίσης, παρουσιάζεται σημαντική μείωση στη συγκέντρωση 1.000μM σε σχέση με τη συγκέντρωση 250μg/ml και με τη συγκέντρωση 125μg/ml. Τέλος, τονίζεται στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ των συγκεντρώσεων 500mg/ml και 125μg/ml.

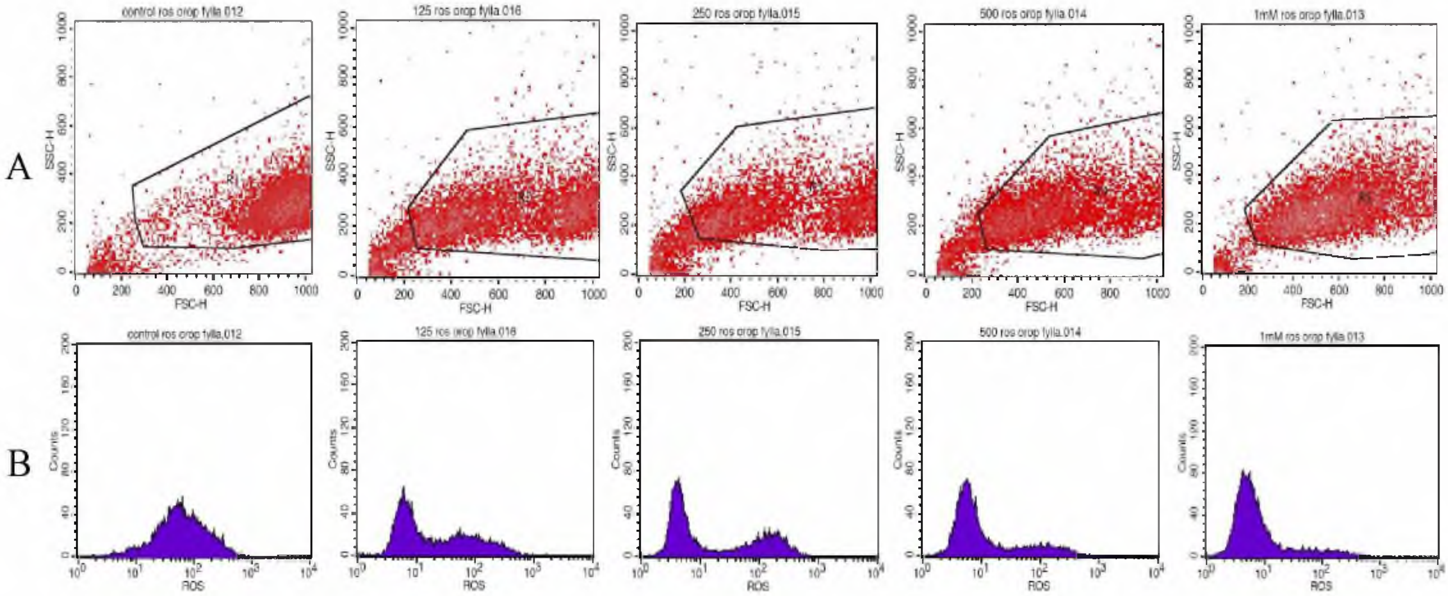


Γράφημα 4.1: Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα των ROS σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12 ύστερα από 24ωρη επώαση με εκχύλισμα φύλλων καστανιάς στις συγκεντρώσεις: 31,25, 62,5, 125, 250μg/ml. A)Τα ιστογράμματα του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων B) Τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488nm και τα 530nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.

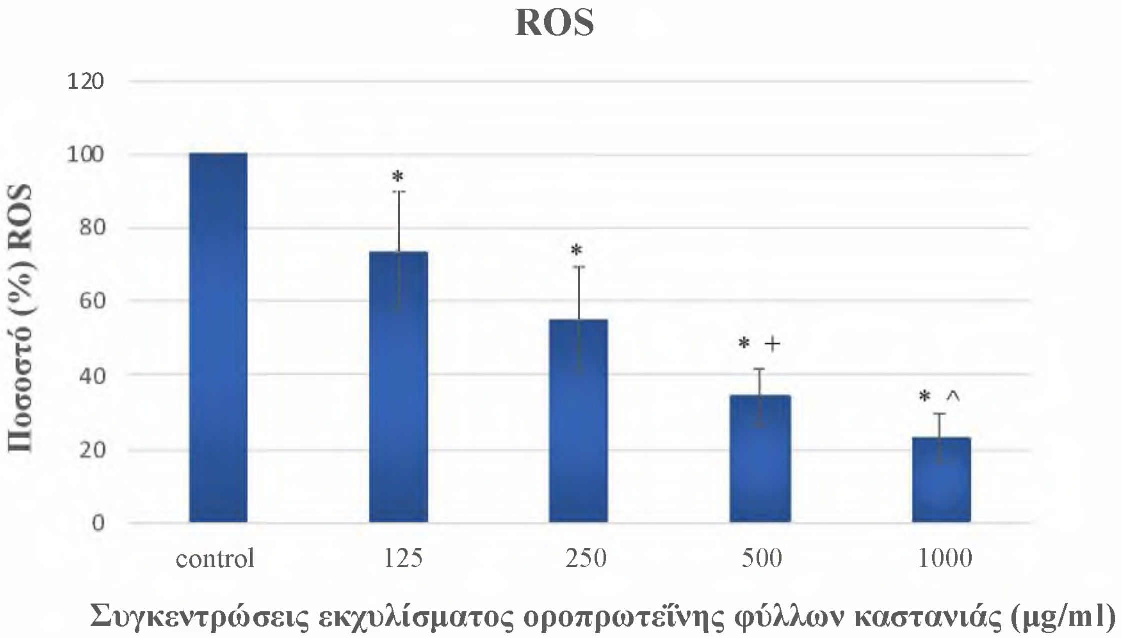


Διάγραμμα 4.3: Επίδραση εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στις 4 συγκεντρώσεις (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), στα επίπεδα ROS των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control και με ^ η στατιστικά σημαντική διαφορά με τη συγκέντρωση 31,25μg/ml.

Ενθυλακωμένα φύλλα καστάνων
ROS



Γράφημα 4.2: Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα των ROS σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12 ύστερα από 24ωρη επώαση με ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς στις συγκεντρώσεις: 125, 250, 500, 1.000μg/ml. A)Τα ιστογράμματα του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων B) Τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488nm και τα 530nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.



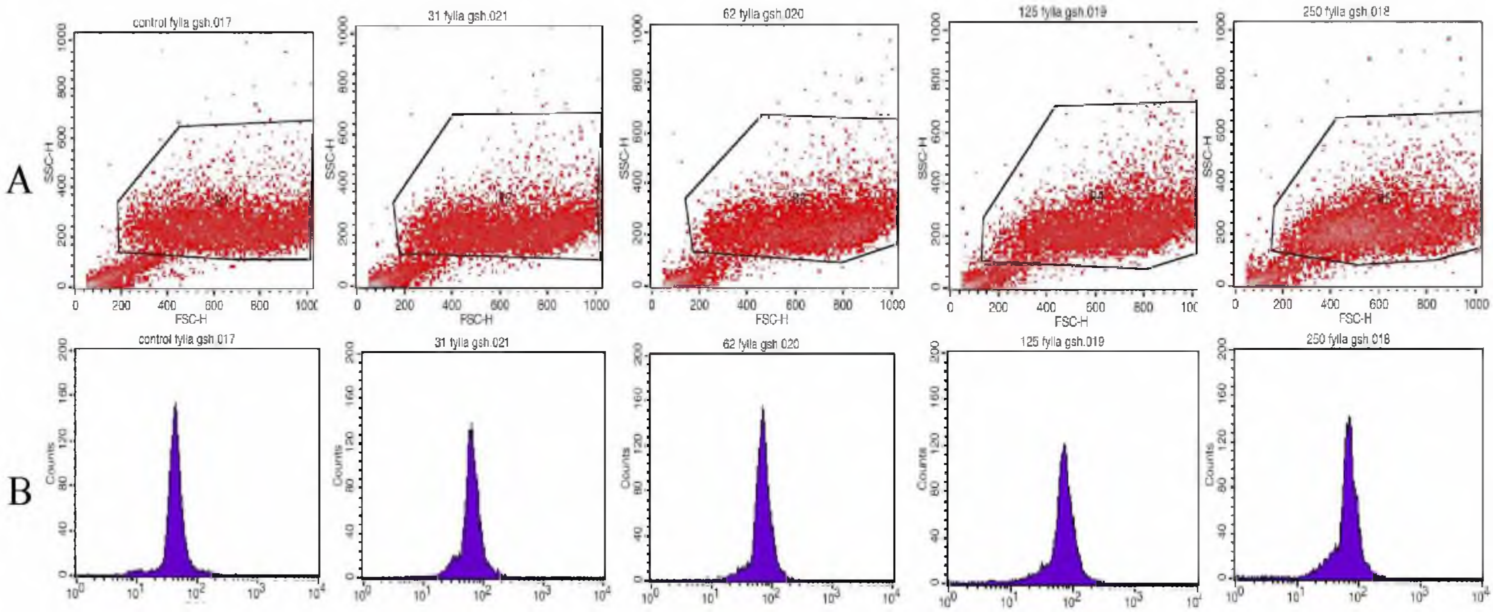
Διάγραμμα 4.4: Επίδραση ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στις 4 συγκεντρώσεις (125, 250, 500, 1.000μg/ml), στα επίπεδα ROS των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control, με ^ η στατιστικά σημαντική διαφορά με τις συγκεντρώσεις 125μg/ml και 250μg/ml και με + η στατιστικά σημαντική διαφορά με τη συγκέντρωση 125μg/ml.

4.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12

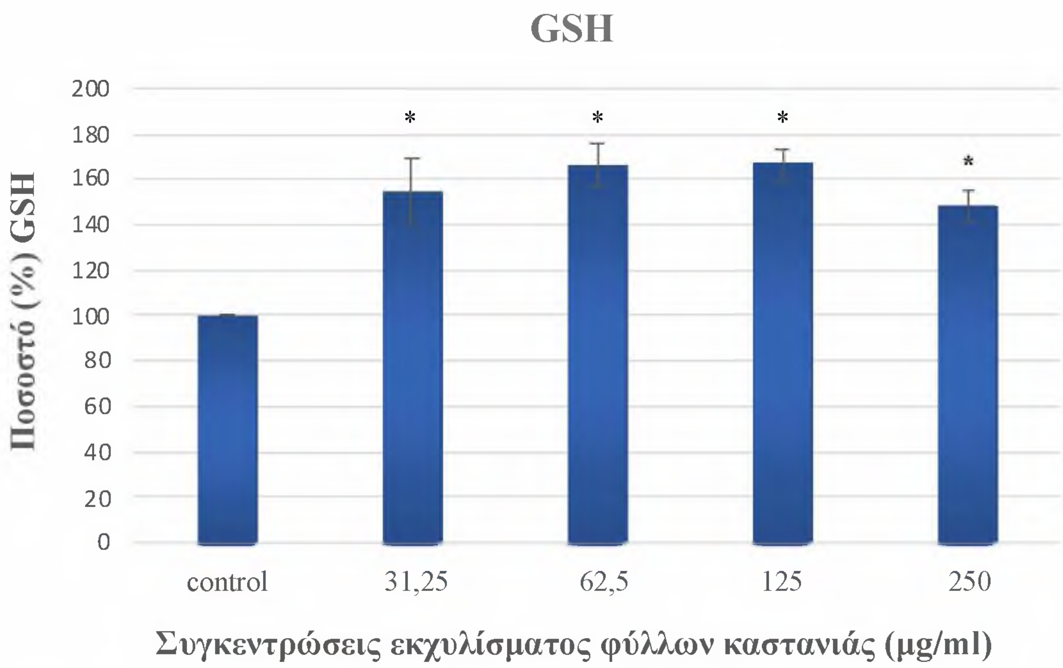
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα επίπεδα της GSH σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, ύστερα από 24ωρη επώαση με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των 2 εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, το διάγραμμα 4.5 αφορά το εκχύλισμα φύλλων καστανιάς, ενώ το διάγραμμα 4.6 το ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς. Ειδικότερα, για κάθε ένα από τα 2 εκχυσλίσματα υπολογίστηκαν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης σε κύτταρα-control (κύτταρα-ελέγχου) και σε 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, όπως αυτές καθορίστηκαν από την διαδικασία κυτταροτοξικότητας XTT. Από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, τα οποία απεικονίζονται στα γραφήματα 4.3 και 4.4, προκύπτουν τα διαγράμματα 4.5 και 4.6 αντίστοιχα.

Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα 4.5 παρατηρείται πως τα επίπεδα της GSH, παρουσία και των 4 συγκεντρώσεων εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), αυξάνονται σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα-control. Όσον αφορά το διάγραμμα 4.6, σημειώνεται πως παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στη συγκέντρωση 1.000μg/ml, αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα της GSH σε σύγκριση με τα κύτταρα-control, αλλά και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (125, 250, 500μg/ml).

Φύλλα καστάνων
GSH

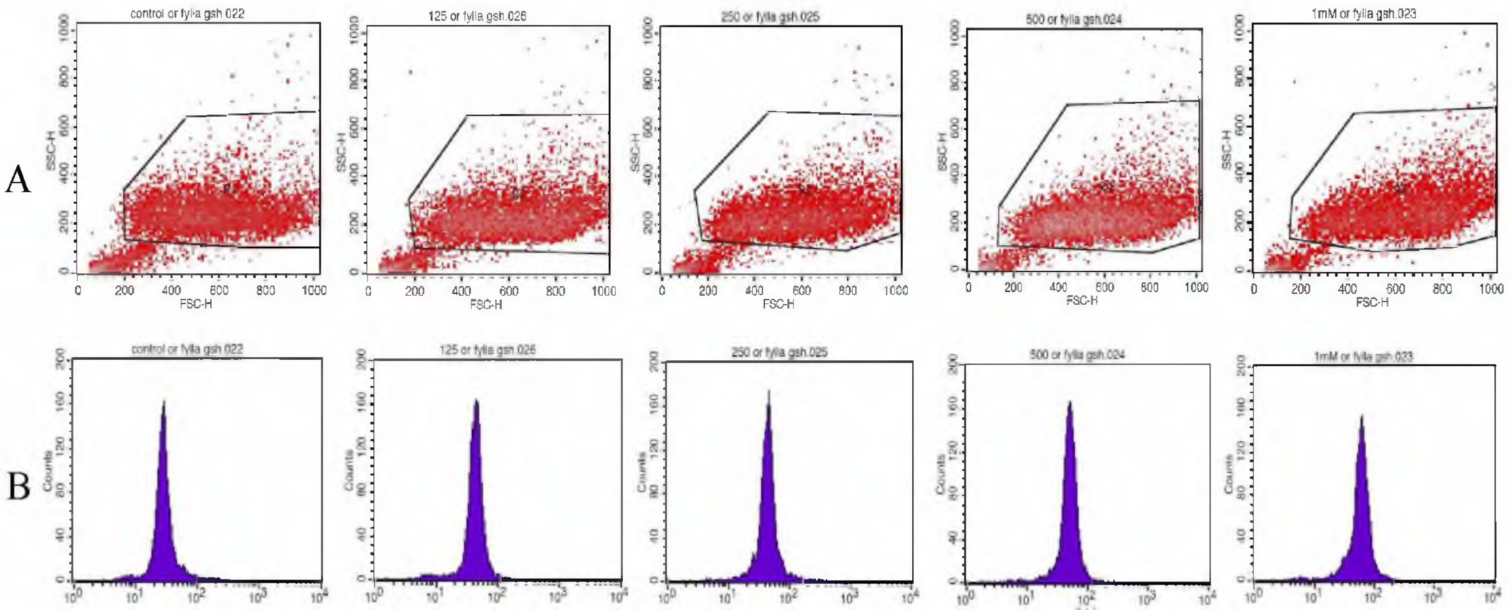


Γράφημα 4.3: Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα της GSH σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12 ύστερα από 24ωρη επώαση με εκχύλισμα φύλλων καστανιάς στις συγκεντρώσεις: 31,25, 62,5, 125, 250μg/ml. A)Τα ιστογράμματα του γραφήματος παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων B) Τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488nm και τα 530nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.

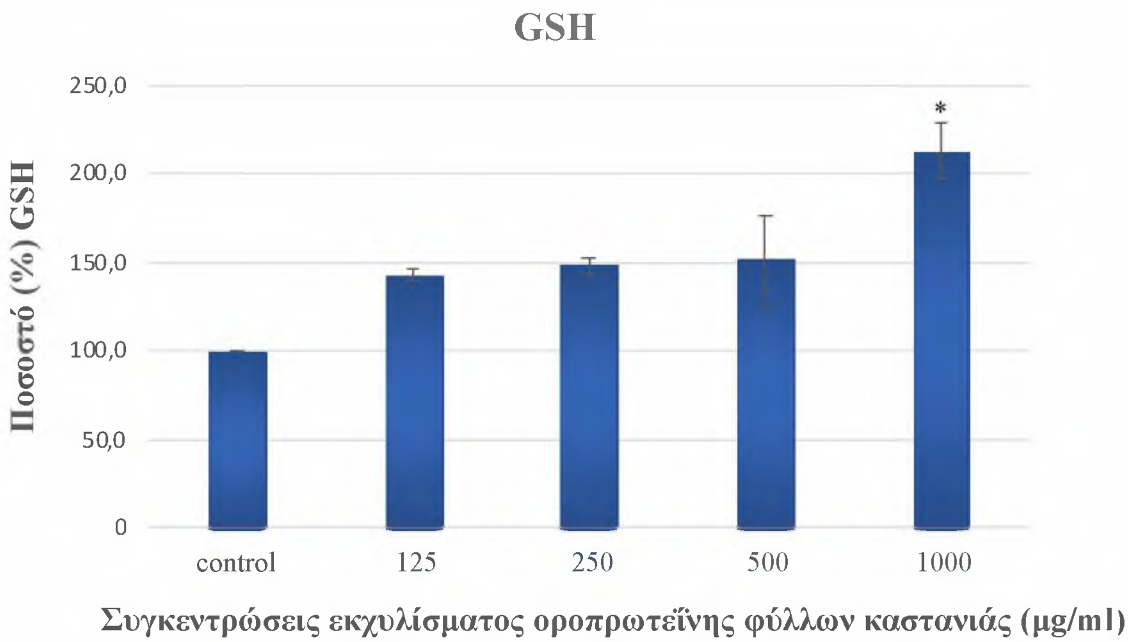


Διάγραμμα 4.5: Επίδραση εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στις 4 συγκεντώσεις (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), στα επίπεδα GSH των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Ενθυλακωμένα φύλλα καστάνων
GSH



Γράφημα 4.4: Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής στα επίπεδα της GSH σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12 ύστερα από 24ωρη επώαση με ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς στις συγκεντρώσεις: 125, 250, 500, 1.000μg/ml. Α) Τα ιστογράμματα του γραφήματος παρουσιάζουν την την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων Β) Τα ιστογράμματα στο κάτω μέρος απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10.000 κύτταρα). Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488nm και τα 530nm ως μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα.

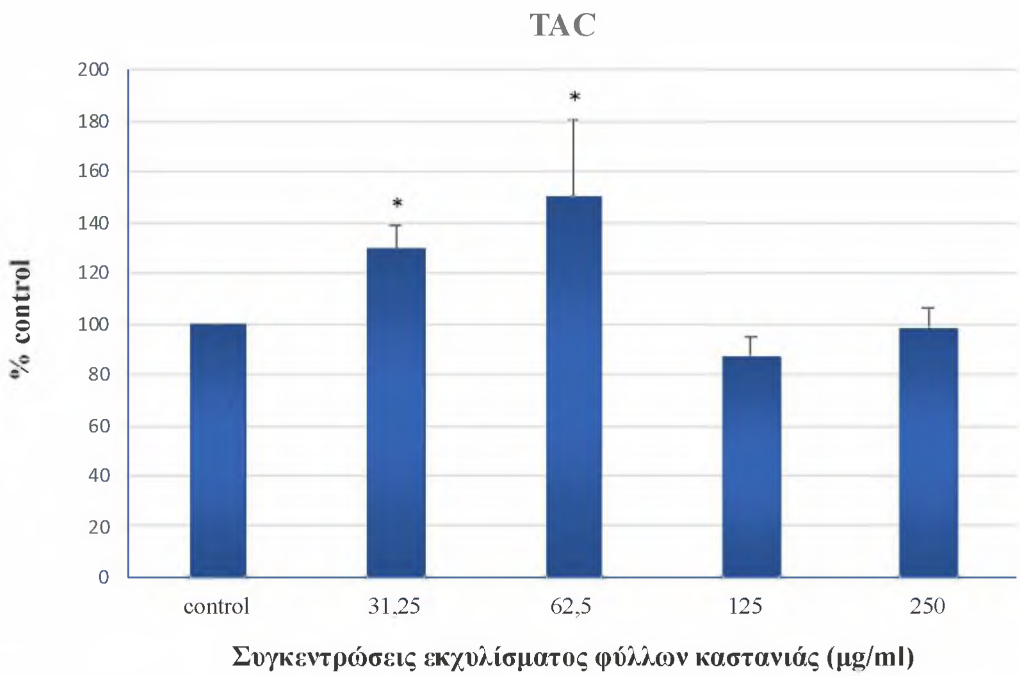


Διάγραμμα 4.6: Επίδραση ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στις 4 συγκεντρώσεις (125, 250, 500, 1.000μg/ml), στα επίπεδα GSH των μυϊκών κυττάρων της κυτταρικής σειράς C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control, αλλά και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (125, 250, 500μg/ml).

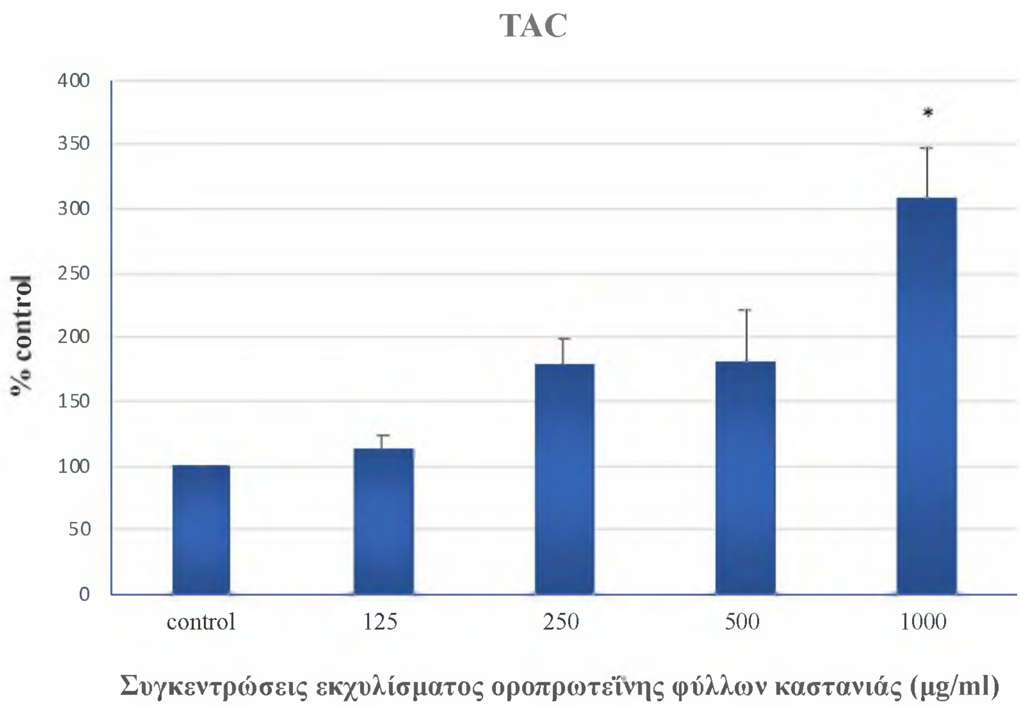
4.4 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτική ικανότητας (TAC) σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα επίπεδα της TAC σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, ύστερα από 24ωρη επώαση με συγκεκριμένες, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των 2 εκχυλισμάτων. Αναλυτικότερα, με βάση το διάγραμμα 4.7 παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων στις συγκεντρώσεις 31,25 και 62,5μg/ml σε σύγκριση με τα κύτταρα control, ύστερα από τη χορήγηση του εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς στις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (31,25, 62,5, 125, 150μg/ml).

Επίσης, στο διάγραμμα 4.8 φαίνεται πως το ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση 1.000μg/ml σε σχέση με τα κύτταρα-control στις 4 προς εξέταση συγκεντρώσεις (125, 250, 500, 1.000μg/ml).



Διάγραμμα 4.7: Επίδραση εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (31.25, 62.5, 125, 250μg/ml) στα επίπεδα της TAC, σε μυϊκά κύτταρα C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Διάγραμμα 4.8: Επίδραση ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (125, 250, 500, 1.000μg/ml) στα επίπεδα της TAC, σε μυϊκά κύτταρα C2C12. Με * επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

5. Συζήτηση

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ελέγχου ή / και μοριακής βλάβης στα βιομόρια (*Kouretas et al.,* 2013). Πρόκειται δηλαδή, για τη διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών μορίων και αδρανοποίησής τους από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρες έχει χαρακτηριστεί ως παθολογική κατάσταση με δυσμενείς επιπτώσεις για τον οργανισμό και παράλληλα έχει συσχετιστεί με πλήθος ασθενειών. Αναλυτικότερα, αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με αρκετές νόσους, όπως μυοπάθειες (*Tateyama et al.,* 2003), ρευματοειδή αρθρίτιδα (*Chapman et al.,* 1989), διαβήτη (*Jones & Hothersall,* 1993), νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) (Smith et al., 1991, *Floor & Wetzel,* 1998), διάφορους τύπους καρκίνου (*Fang et al.,* 2002, *Nichenametla et al.,* 2006), καρδιοπάθειες (αθηροσκλήρωση) (*Vatansever et al.,* 2013) και οστεοπόρωση (*Weaver & Cheong,* 2005).

Η υπερβολική παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, που εμπλέκεται σε οξειδωτική βλάβη των μακρομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) (*Halliwell,* 2001, *Mylonas & Kouretas,* 1999), ανοσολογική δυσλειτουργία (*Schneider & Tiidus,* 2007), αλλά και μυϊκή βλάβη (*Nikolaidis et al.,* 2007). Ειδικότερα, το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται συχνά σε μυϊκούς ιστούς που εκτίθενται σε ROS με αποτέλεσμα την πρόκληση μυϊκής κόπωσης, κυτταρικής βλάβης και απόπτωσης (*Phaneuf & Leeuwenburgh,* 2001, *McClung et al.,* 2010). Επίσης, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με διάφορες αλλαγές στα μιτοχόνδρια των μυϊκών κυττάρων. Ειδικότερα, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες και η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών οδηγεί σε μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις (*Birben et al.,* 2012) και συνεπώς στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (*Pieczenik et al.,* 2007, *Muller et al.,* 2007). Επομένως, μελέτες σε μυϊκά κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας, ώστε να αποφευχθεί το οξειδωτικό στρες και οι σχετιζόμενες δυσλειτουργίες συμβάλλοντας στην πρόληψη ή / και θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε αυτό.

Με αφορμή τις δυσάρεστες επιπτώσεις που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στην ανθρώπινη υγεία έχει προταθεί η αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων με τη χορήγηση και κατανάλωση αντιοξειδωτικών ουσιών, ως προστατευτικού μέσου. Για το λόγο αυτό, φυτικά αντιοξειδωτικά προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, βρίσκονται στο επίκεντρο πολλών ερευνητών. Τα φύλλα διαφόρων φυτικών προϊόντων είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και παρουσιάζουν ευεργετικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ειδικότερα, μελέτες σχετικά με την Ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea sativa mill*) αποδεικνύουν πως τα εκχυλίσματα φύλλων χαρακτηρίζονται από ένα καλό προφίλ βιοδραστικών ενώσεων, αποτελώντας για τον άνθρωπο σημαντική πηγή πρόσληψης πολλών θρεπτικών ουσιών (*Craft et al.,* 2012, *Lu et al.,* 2010).

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς και ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σε ορoπρωτεΐνη γάλακτος σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12. Σχετικά με την ενθυλάκωση, βρίσκει εφαρμογές στη φαρμακοβιομηχανία, βιομηχανία των τροφίμων, καλλυντικών και ζωοτροφών. Πραγματοποιείται με ποικίλες μεθόδους με στόχο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των εκχυλισμάτων μέσω της προστασίας των βιοδραστικών μορίων από οξειδώσεις. Αρχικά, για την εκπόνηση των πειραμάτων προσδιορίστηκαν 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τα μυϊκά κύτταρα C2C12, σε κάθε εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα φύλλων καστανιάς επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις: 31,25, 62,5, 125 και 250μg/ml ενώ, για το ενθυλακωμένο εκχύλισμα φύλλων καστανιάς αξιοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 125, 250, 500, 1.000μg/ml. Εξετάστηκε λοιπόν, η επίδραση των εκχυλισμάτων στα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), καθώς και στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τέλος, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), φασματοφωτομετρικά. Τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων πειραμάτων προέκυψαν έπειτα από σύγκριση των προς εξέταση κυττάρων, τα οποία είχαν επωαστεί με τα εκχυλίσματα, με κύτταρα – ελέγχου, δηλαδή κύτταρα που δεν είχαν υποστεί κάποια επίδραση από τα εκχυλίσματα.

Σχετικά με τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου από την κυτταρομετρία ροής προκύπτει μείωση των ROS και στα 2 εκχυλίσματα σε όλες τις προς εξέταση συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα των ROS και στις 4 συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), μειώνονται στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα-control. Επίσης, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωση 125μg/ml σε σχέση με τη συγκέντρωση 31,25μg/ml. Παράλληλα, παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σημειώθηκε σημαντική μείωση των ROS σε όλες τις συγκεντρώσεις (125, 250, 250, 500μg/ml) συγκριτικά με τα κύτταρα-control με ιδιαίτερη μείωση να σημειώνεται στη συγκέντρωση 1.000μg/ml σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί, πως σε προηγούμενη αντίστοιχη διπλωματική εργασία του εργαστηρίου, που διεξήχθη σε ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου E.A.hy926 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική δράση και των 2 εκχυλισμάτων στα επίπεδα των ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Τεριζή, 2020). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σχετικά με τα επίπεδα των ROS παρουσιάζουν συνέπεια με προηγούμενες παρόμοιες μελέτες. Συγκεκριμένα, σε in vitro μελέτη που διεξήχθη διαπιστώθηκε η προστατευτική ικανότητα εκχυλισμάτων φύλλων της *Castanea sativa*, που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, έναντι δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως υπεροξειδίου, ρίζα υδροξυλίου, ρίζα υπεροξυλίου και υπεροξείδιο υδρογόνου (*Almeida et al.,* 2008). Παράλληλα, στην ίδια έρευνα επισημαίνεται πως αυτή η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σχετίζεται με τη φαινολική σύνθεση των φλαβονοειδών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα και ειδικότερα με τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων (*Almeida et al.,* 2008). Ακόμη, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών (BAEC) επισημαίνεται πως τα εκχυλίσματα καστανιάς μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των ROS, ύστερα από χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα (*Ciampi et al.,* 2020). Ομοίως, σε in vitro μελέτη τονίζεται η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φλοιού της Ευρωπαϊκής καστανιάς σε κύτταρα μυοκαρδίου αρουραίου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες με χρήση οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2), σημαντική μείωση των ROS και βελτίωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (*Chiarini et al.,* 2013).

Επίσης, σχετικά με τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης από την κυτταρομετρία ροής προκύπτει αύξηση της GSH και στα 2 εκχυλίσματα σε όλες τις προς εξέταση συγκεντρώσεις. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε πως παρουσία και των 4 συγκεντρώσεων εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς (31,25, 62,5, 125, 250μg/ml), αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα της GSH σε σχέση με τα κύτταρα-control. Παράλληλα, σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων της GSH παρουσία του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς σε όλες τις συγκεντρώσεις με την υψηλότερη αύξηση στη συγκέντρωση 1.000μM σε σύγκριση με τα κύτταρα-control, αλλά και σχετικά με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (125, 250, 500μg/ml). Σε προηγούμενη αντίστοιχη διπλωματική μελέτη του εργαστηρίου, που πραγματοποιήθηκε σε ενδοθηλιακά κύτταρα, E.A.hy926, παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της GSH στη συγκέντρωση 16μg/ml ύστερα από επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα φύλλων καστανιάς, ενώ το ενθυλακωμένο εκχύλισμα προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH στις συγκεντρώσεις 250, 500 και 1000μg/ml. (Τεριζή, 2020). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σχετικά με τα επίπεδα της GSH έρχονται σε συνάφεια με μελέτη που αφορά εκχυλίσματα φύλλων της *Castanea sativa* σε παγκρεατικά β – κύτταρα αρουραίου. Αναλυτικότερα, επιβεβαιώθηκε η αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων της Ευρωπαϊκής καστανιάς που συνδέεται επομένως, με την αύξηση των επιπέδων της GSH και τη μείωση της οξείδωσης της (*Mujic΄ et al.,* 2011).

Όσον αφορά τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση στις 2 μικρότερες υπό εξέταση συγκεντρώσεις (31,25 και 62,5μg/ml) συγκριτικά με τα κύτταρα-control ύστερα από επώαση των κυττάρων με εκχύλισμα φύλλων καστανιάς. Παράλληλα, το ενθυλακωμένο εκχύλισμα προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC στη μεγαλύτερη υπό εξέταση συγκέντρωση (1.000μg/ml) σε σχέση με τα κύτταρα-control. Ακόμη, σε προηγούμενη παρόμοια διπλωματική εργασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο σε ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου E.A.hy926 δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική δράση και των 2 εκχυλισμάτων στα επίπεδα της TAC (Τεριζή, 2020). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σχετικά με τα επίπεδα της TAC έρχονται σε συνάφεια με έρευνα σε εκχυλίσματα φύλλων *Castanea sativa* σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε, μέσω προσδιορισμού της DPPH$^{\bullet}$, υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σε σπερματοζωάρια, στα οποία προκλήθηκε οξειδωτικό στρες με τη χορήγηση οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2) (*Biagi et al.,* 2019). Συνεπώς, πιθανώς να υπάρχει μία ιστοεξειδίκευση όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων από φύλλα καστανιάς.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν πως το πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων της *Castanea sativa* ενίσχυσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των μυϊκών κυττάρων μειώνοντας τα επίπεδα των ROS. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σε συμφωνία με την αύξηση της GSH από το εκχύλισμα. Δηλαδή, πιθανός μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος φύλλων φαίνεται να είναι η αύξηση της GSH, μέσω για παράδειγμα αύξησης της έκφρασης και δράσης των ενζύμων που τη συνθέτουν ή την αναγεννούν. Επίσης, σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό ότι η κυτταρική αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών πραγματοποιείται κυρίως μέσω τροποποίησης της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα (*Ruskovska et al.,* 2019). Ωστόσο, θα μπορούσε η αύξηση της GSH να οφείλεται στην εξοικονόμησή της λόγω της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του εκχυλίσματος. Η επίδραση του εκχυλίσματος φύλλων στην TAC ήταν επίσης σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των άλλων δύο δεικτών, δηλαδή το εκχύλισμα αύξησε την TAC στατιστικά σημαντικά, τουλάχιστον στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις. Επομένως, αυτή η αύξηση της TAC στα μυϊκά κύτταρα μπορεί να εξηγηθεί από το ότι το εκχύλισμα αύξησε αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η GSH με αποτέλεσμα την αντίστοιχη μείωση των ROS. Το γεγονός ότι στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν υπήρξε αύξηση της TAC χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, αλλά μία εξήγηση μπορεί να είναι ότι στα κύτταρα υπάρχουν πολλά αντιοξειδωτικά μόρια και όταν κάποια αυξάνονται τότε σαν προσαρμοστικός μηχανισμός κάποια άλλα μειώνονται. Επίσης, πρέπει να επισημανθεί ότι η TAC δεν προσδιορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα που οφείλεται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα των οποίων η δράση πρέπει να προσδιοριστεί για να υπάρξει μία συνολική εικόνα για την επίδραση του εκχυλίσματος στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων.

Επίσης, υπήρξε συμφωνία στα αποτελέσματα μεταξύ των τριών δεικτών οξειδωτικού στρες τουλάχιστον στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, όσον αφορά τη δράση του εκχυλίσματος φύλλων που είχε ενθυλακωθεί σε οροπρωτεΐνη τυρογάλακτος στα μυϊκά κύτταρα. Δηλαδή, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση το ενθυλακωμένο εκχύλισμα αύξησε την TAC, η οποία εξηγείται από την αύξηση στη GSH. Παράλληλα, η παρατηρούμενη αύξηση των αντιοξειδωτικών μορίων εξηγεί την προκαλούμενη από το ενθυλακωμένο εκχύλισμα μείωση των ROS. Ωστόσο, στις μικρότερες συγκεντρώσεις του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος, ενώ υπήρξε μείωση των ROS δεν υπήρξε αντίστοιχη αύξηση στην TAC ή τη GSH. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η TAC δεν προσδιορίζει τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων στα οποία μπορεί να επιδρά το εκχύλισμα και έτσι να προκαλεί μείωση των ROS. Όσον αφορά τη σύγκριση των δύο εκχυλισμάτων, του ενθυλακωμένου και του μη ενθυλακωμένου, αν λάβουμε υπόψη ότι το ενθυλακωμένο εκχύλισμα περιέχει σε ποσοστό 10% το πολυφαινολικό εκχύλισμα φύλλων τότε εμφανίζουν μία παραπλήσια δράση.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη έρευνα που προσδιορίζει την αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικού εκχυλίσματος από φύλλα Ευρωπαϊκής καστανιάς σε μυϊκά κύτταρα. Για το λόγο αυτό τα παραπάνω αποτελέσματα χρειάζονται μελλοντικά περαιτέρω έρευνα. Δεδομένου του ότι η δράση των εκχυλισμάτων φύλλων καστανιάς εξαρτάται από τη περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, είναι χρήσιμο να διεξαχθούν πειράματα με στόχο την αναγνώριση όλων των πολυφαινολών των προς εξέταση εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας για παράδειγμα τη μέθοδο High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Γνωρίζοντας λοιπόν, το πολυφαινολικό περιεχόμενο, καθώς και τη χημική δομή των βιοδραστικών ουσιών και ενώσεων θα μπορέσουν να εξαχθούν πιο τεκμηριωμένα συμπεράσματα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Ακόμη, για την καλύτερη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων χρήσιμο θα είναι να προσδιοριστούν και άλλοι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες εκτός από την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), όπως τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξείδωσης (TBARS) και η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBS). Ακόμη, είναι σημαντικό να διερευνηθούν και να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι εμπλέκονται στη μεταβολή των επιπέδων της GSH σε γονιδιακό, αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Τέλος, όλα τα προϊόντα και υπο – προϊόντα της καστανιάς, όπως τα φύλλα, ο καρπός, εσωτερικό και εξωτερικό κέλυφος παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενη αντιοξειδωτική δράση. Δεδομένου του ότι μεταξύ όλων των υποπροϊόντων, τα φύλλα χαρακτηρίζονται με την υψηλότερη φαινολική περιεκτικότητα (*Silva et al.,* 2020) και σε συνδυασμό με τα ευρήματα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, τα φύλλα καστανιάς μπορούν να αξιοποιηθούν ως θρεπτικά φαρμακευτικά προϊόντα και αντιοξειδωτικά πρόσθετα και γενικά ως καινοτόμα προϊόντα με υψηλή προστιθέμενη αξία. Τέτοια προϊόντα θα είχαν αξιοσημείωτη σημασία στις αρχές της κυκλικής οικονομίας παραγωγής και χρήσης φυσικών πόρων.

Βιβλιογραφία

Abe T, Tohgi H, Isobe C, Murata T, Sato C. Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. J Neurosci Res. 2002;70(3):447–50

Adua M, The sweet chestnut throughout history from the Miocene to the third millennium, in Proceedings of the 2nd International Symposium on Chestnut, ed. by Salesses G. ISHS 494. International Society for Horticultural Science, Leuven, pp. 29–36 (1999).

Ahmed B, Dwivedi S, Abdin MZ, Azam A, Al-Shaeri M, Khan MS, Saquib Q, Al-Khedhairy AA, Musarrat J. Mitochondria and chromosomal damage induced by oxidative stress in Zn(2+) Ions, ZnO-Bulk and ZnONPs treated Allium cepa roots. Sci Rept. 2017;7:40685.

Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C., & Bahia, M. F. (2008). Protective effect of Castanea sativa and Quercus robur leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 91(2-3), 87–95. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.02.001

Amarnath V, Amarnath K, Amarnath K, Davies S, Roberts LJ, 2nd. Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1,4-dicarbonyls. Chem Res Toxicol. 2004;17(3):410–5.

Antonio AL, Fernandes Aˆ , Barreira JCM, Bento A, Botelho ML, Ferreira ICFR. 2011. Influence of gamma irradiation in the antioxidant potential of chestnuts (Castanea sativa Mill.) fruits and skins. Food Chem Toxicol. 49(9):1918–1923.

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil chem Soc. 1998;75(2):199–212.

Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., … Kondo, K. (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. The American Journal of Clinical Nutrition, 85(3), 709–717. doi:10.1093/ajcn/85.3.709

Bandyopadhyay D, Biswas K, Bandyopadhyay U, Reiter RJ, Banerjee RK. Melatonin protects against stressinduced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical.J Pineal Res. 2000;29(3):143–51.

Barreira JC, Casal S, Ferreira IC, Peres AM, Pereira JA, Oliveira MB. 2012. Chemical characterization of chestnut cultivars from three consecutive years: chemometrics and contribution for authentication. Food and Chemical Toxicology. 50(7):2311–2317

Barja G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. Aging (Milano). 2000;12(5):342–55.

Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., … Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves. Fitoterapia, 71, S110–S116. doi:10.1016/s0367-326x(00)00185-4

Bast A. Oxidative stress and calcium homeostasis. In: Halliwell B, Aruoma OI, editors. DNA and free radicals. London: Ellis Horwood; 1993. p. 95–108.

Baudet M, Daugareil C, and Ferrieres J. Cardiovascu- lar disease prevention and life style modifications. Ann Cardiol Angeiol 2012; 61(2): 93–98.

Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature Reviews Drug Discovery, 5(6), 493–506. doi:10.1038/nrd2060

Berlett BS, Stadtman E. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Bio Chem. 1997;272(33):20313–6.

Biagi, M., Noto, D., Corsini, M., Baini, G., Cerretani, D., Cappellucci, G., & Moretti, E. (2019). Antioxidant Effect of the Castanea sativa Mill. Leaf Extract on Oxidative Stress Induced upon Human Spermatozoa. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 1–9. doi:10.1155/2019/8926075

Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal. 2012;5:9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Bounous G, The chestnut: a multipurpose resource for the new millennium, in Proceedings of the 3rd International Chestnut Congress, ed. by Abreu CG, Rosa E and Monteiro AA. ISHS 693. International Society for Horticultural Science, Leuven, pp. 33–40 (2005).

Brodie E, Reed DJ. Cellular recovery of glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase activity and thiol status after exposure to hydroperoxide. Arch Biochem Biophys. 1990;276(1):210–2.

Burkard Markus, Leischner Christian, Lauer Ulrich M., Busch Christian, Venturelli Sascha, Frank Jan. Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2017;46:1–12. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.01.006.

Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, et al. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. Ann N Y Acad Sci. 1998;854:448–62

Cardozo, L. F. M. F., Pedruzzi, L. M., Stenvinkel, P., Stockler-Pinto, M. B., Daleprane, J. B., Leite, M., & Mafra, D. (2013). Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. Biochimie, 95(8), 1525–1533. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.012

Chapman ML, Rubin BR, Gracy RW. Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rhematoid arthritis. J Rheumatol. 1989;16(1):15–8

Ciampi, F., Sordillo, L. M., Gandy, J. C., Caroprese, M., Sevi, A., Albenzio, M., & Santillo, A. (2020). Evaluation of natural plant extracts as antioxidants in a bovine in vitro model of oxidative stress. Journal of Dairy Science. doi:10.3168/jds.2020-18182

Chen S-K, Hsu C-H, Tsai M-L, Chen R-H, Drummen GPC. Inhibition of oxidative stress by low-molecular- weight polysaccharides with various functional groups in skin fibroblasts. Int J Molec Sci. 2013;14(10):19399–415.

Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American Journal of Clinical Nutrition. 2005;81(1):223S–229S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.223S.

Chiarini, A., Micucci, M., Malaguti, M., Budriesi, R., Ioan, P., Lenzi, M., … Hrelia, S. (2013). Sweet Chestnut (Castanea sativaMill.) Bark Extract: Cardiovascular Activity and Myocyte Protection against Oxidative Damage. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, 1–10. doi:10.1155/2013/471790

Ching LS and Mohamed S, Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. J Agric Food Chem 49:3101–3105 (2001).

Cho J.-Y., Moon J.-H., Seong K.-Y., Park K.-H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998;62:2273–2276. doi: 10.1271/bbb.62.2273.

Choque B, Catheline D, Rioux V, Legrand P. 2014. Linoleic acid: between doubts and certainties. Biochimie. 96:14–21.

Chrader M, Fahimi HD. Review Peroxisomes and oxidative stress. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(12):1755–1766.

Conedera M, Krebs P, Tinner W, Pradella M and Torriani D, The cultivation of Castanea sativa (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. Veg Hist Archaeobot 13:161–179 (2004).

Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. Comprehensive Reviews in Food Scince and Foof Safety. 11(2):148–173.

Cruz BR, Abraa˜o AS, Lemos AM, Nunes FM. 2013. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (Castanea sativa Mill). Carbohydr Polym. 94(1):594–602.

De Vasconcelos, M. C., Bennett, R. N., Rosa, E. A., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (Castanea sativa Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(10), 1578–1589. doi:10.1002/jsfa.4016

de Vasconcelos MCBM, Bennett RN, Quideau S, Jacquet R, Rosa EAS, Ferreira-Cardoso JV. 2010. Evaluating the potential of chestnut (Castanea sativa Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. Ind Crop Prod. 31(2):301–311.

Deo S., Utane R., Khubalkar R., Thombre S. Extraction and isolation, synthesis, physiological activity of 1-phenyl naphthalene and its derivatives: A review. Pharma Innov. J. 2017;6:21–30.

Dı´az Reinoso B, Couto D, Moure A, Fernandes E, Domı´nguez H, Parajo´ JC. 2012. Optimization of antioxidants – Extraction from Castanea sativa leaves. Chem Eng J. 203:101–109.

Ding, S., Jiang, H., & Fang, J. (2018). Regulation of Immune Function by Polyphenols. Journal of Immunology Research, 2018, 1–8. doi:10.1155/2018/1264074
Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. JAMA. 287(24):3223 –3229

Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. Methods Mol Biol. 2010;594:57-72. doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_4. PMID: 20072909.

Fang Y.Z., Yang S. and Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18: 872□879.

FAO/WHO, Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition (2nd edn). Bangkok, Thailand (2004).

Fernandes A, Barreira JC, Antonio AL, Bento A, Luisa Botelho M, Ferreira IC. 2011. Assessing the effects of gamma irradiation and storage time in energetic value and in major individual nutrients of chestnuts. Food Chem Toxicol. 49(9):2429–2432.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000;408:239–247.

Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. J Neurochem. 1998;7091:268–75.

Garrison WM. Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. Chem Rev. 1987;8792:381–98.

Gerschman R., D.L. Gilbert, S.W. Nye, P. Dwyer, W.O. Fenn, Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, Science 119 (1954) 62362–899 62366.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J. 1997;324:1–18.

Gomberg, M. (1900). AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL. Journal of the American Chemical Society, 22(11), 757–771. doi:10.1021/ja02049a006

Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., de Gaetano, G., & Violi, F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. The Journal of Nutritional Biochemistry, 22(3), 201–211. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.004

Gresele, P., Pignatelli, P., Guglielmini, G., Carnevale, R., Mezzasoma, A. M., Ghiselli, A., … Violi, F. (2008). Resveratrol, at Concentrations Attainable with Moderate Wine Consumption, Stimulates Human Platelet Nitric Oxide Production. The Journal of Nutrition, 138(9), 1602–1608. doi:10.1093/jn/138.9.1602

Gunther, M. R., Sampath, V., & Caughey, W. S. (1999). Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. Free Radical Biology and Medicine, 26(11-12), 1388–1395. doi:10.1016/s0891-5849(98)00338-4

Halliwell B: Free radicals and other reactive species in disease. In: Nature Encyclopaedia of Life Sciences. J. Wiley and Sons (eds). Nature Publishing Group, New York, 2001.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine, vol. Third edition. Midsomer Norton: Oxford University Press; 1999.

Hanakova Z, Hosek J, Kutil Z, Temml V, Landa P, Vanek T, et al. Anti-inflammatory activity of natural Geranylated flavonoids: cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. J Nat Prod. 2017;80:4. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01011.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. Prog Clin Biol Res. 1986;213 PMID:3520585.

Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestosinduced carcinogenesis. Ann NY Acad Sci. 2010;1203:15–22.

Hofer T, Badouard C, Bajak E, Ravanat JL, Mattsson A, Cotgreave IA. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. Biol Chem. 2005;386(4):333–7.

Jang M., Cai L., Udeani G. O., et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 1997;275(5297):218–220. doi: 10.1126/science.275.5297.218.

Jones RH, Hothersall JS. The effect of diabetes and dietary ascorbate supplementation on the oxidative modification of rat lens beta L crystallin. Biochem Med Metab Biol. 1993;50(2):197–209.

Kelsen SG. Respiratory epithelial cell responses to cigarette smoke: the unfolded protein response. Pulm Pharmacol Ther 2012; 25(6): 447–452.

Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Neurobiol Dis. 2002;9(2):244–8.

Kikugawa K, Kato T, Okamoto Y. Damage of amino acids and proteins induced by nitrogen dioxide, a free radical toxin, in air. Free Rad Biol Med. 1994;16(3):373–82.

Kim H. S., Quon M. J., Kim J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. Redox Biology. 2014;2:187–195. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.022.

Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa, 271–297. doi:10.1016/b978-0-12-809286-6.00010-8

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal, 2013, 1–16. doi:10.1155/2013/162750

Konstantinidis, P., Tsiourlis, G., Xofis, P., & Buckley, G. P. (2007). Taxonomy and ecology of Castanea sativa Mill. forests in Greece. Plant Ecology, 195(2), 235–256. doi:10.1007/s11258-007-9323-8

Kouretas, D., Tsatsakis, A. M., Domingo, J. L., & Wallace Hayes, A. (2013). Mechanisms involved in oxidative stress regulation. Food and Chemical Toxicology, 61, 1–2. doi:10.1016/j.fct.2013.10.016

Kumar P, Lucini L, Rouphael Y, Cardarelli M, Kalunke RM, Colla G. Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. Front Plant Sci. 2015;6:477.

Kumaran KS, Prince PSM. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. Cell Stress Chaperone. 2010;15(6):791–806. 49.

Lang P, Dane F and Kubisiak TL, Phylogeny of Castanea (Fagaceae) based on chloroplast trnT-L-F sequence data. Tree Genet Genomes 2:132–139 (2006).

Linnane, A. W., Zhang, C., & Yarovaya, N. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. Annals of the New York Academy of Sciences, 959, 396–411.

López-Sáez, J.A.; Glais, A.; Robles-López, S.; Alba-Sánchez, F.; Pérez-Díaz, S.; Abel-Schaad, D.; Luelmo-Lautenschlaeger, R. Unraveling the naturalness of sweet chestnut forests (Castanea sativa Mill.) in central Spain. Veg. Hist. Archaeobot. 2017, 26, 167–182.

Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J Cellular and Molecular Medicine. 14(4):840–860

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. doi:10.1093/ajcn/79.5.727

Marí M, Colell A, Morales A, von Montfort C, GarciaRuiz C, Fernández-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. Antiox Redox Signal. 2010;12(11):1295–331.

McClung JM, Deruisseau KC, Whidden MA, et al. Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. Experimental Physiology 2010; 95: 222–231.

McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5.1.1-5.1.11. Published 2018 Feb 21. doi:10.1002/cpim.40.

Mishra, A., Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Scientific Validation of the Medicinal Efficacy ofTinospora cordifolia. The Scientific World Journal, 2013, 1–8. doi:10.1155/2013/292934

Mishra, A., Sharma, A. K., Kumar, S., Saxena, A. K., & Pandey, A. K. (2013). Bauhinia variegate Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. BioMed Research International, 2013, 1–10. doi:10.1155/2013/915436

Monfared SSMS, Vahidi H, Abdolghaffari AH, Nikfar S, Abdollahi M. Antioxidant therapy in the management of acute, chronic and post-ERCP pancreatitis: a systematic review. World J Gastroenterol. 2009;15(36):4481–90. 47.

Moukette BM, Pieme CA, Njimou JR, Biapa CPN, Marco B, Ngogang JY. In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: Monodora myristica. Biol Res. 2015;48(1):15.

Mujic´ A, Grdovic´ N, Mujic´ I, Mihailovic ´ M, Zivkovic´ J, Poznanovic´ G, Vidakovic´ M. Antioxidative effects of phenolic extracts from chestnut leaves, catkins and spiny burs in streptozotocin-treated rat pancreatic β-cells. Food Chem. 2011;125(3):841–849.

Muller F.L., Song W., Jang Y.C., Liu Y., Sabia M., Richardson A., Van Remmen H. Denervation-Induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. American Journal Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology. 2007;293:1159–1168. doi: 10.1152/ajpregu.00767.2006.

Murphy ME, Kehrer JP. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. Biochem J. 1989;260(2):359–64.

Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo, 13, 295–309.

Naidu AK. Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. Nutr. J. 2003;2:1–10.

Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs. An overview. Int. J. Biomed. Sci. (IJBS) 2006;2:85–100.

Nichenametla S.N., Taruscio T.G., Barney D.L. and Exon J.H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. Critical Review in Food Science and Nutrition 46: 161□183.

Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition, 74(4), 418–425. doi:10.1093/ajcn/74.4.418

Niki E. 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. Free Radic Biol Med. 66:3–12.

Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A. Z., et al. (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, 32, 197–205.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. 1987;262(12):5488–91.

Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.Physiological Reviews.87: 315-424.

Pandey K. B., Rizvi S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009;2(5):270–278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

Penumetcha M, Song M, Merchant N, Parthasarathy S. 2012. Pretreatment with n-6 PUFA protects against subsequent high fat diet induced atherosclerosis—Potential role of oxidative stress-induced antioxidant defense. Atherosclerosis. 220(1):53–58.

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.

Phaneuf S and Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc 2001; 33(3): 393–396.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem. 2015;30(1):11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0

Pieczenik S.R., Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. Exp. Mol. Pathol. 2007;83:84–92. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.09.008.

Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB. Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. Int J Sport Nutr Exer Metab. 2010;20(1):2–14.

Pryor WA, Jin X, Squadrito GL. One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(23):11173–7.

Reid MB: Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. Free Radic Biol Med 44: 169-179, 2008.

Ren, M., Zhou, K., He, L., & Lin, W. (2018). Mitochondria and lysosome-targetable fluorescent probes for HOCl: recent advances and perspectives. Journal of Materials Chemistry B, 6(12), 1716–1733. doi:10.1039/c7tb03337k.

Rivière C., Pawlus A. D., Mérillon J.-M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. Natural Product Reports. 2012;29(11):1317–1333. doi: 10.1039/c2np20049j.

Rocchetti, G., Chiodelli, G., Giuberti, G., Masoero, F., Trevisan, M., & Lucini, L. (2017). Evaluation of phenolic profile and antioxidant capacity in gluten-free flours. Food Chemistry, 228, 367–373. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.142

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 1991; 142:257-65.

Ruskovska, T., Maksimova, V., & Milenkovic, D. (2019). Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. British Journal of Nutrition, 1–36. doi:10.1017/s0007114519002733

Ruxton CHS, Reed SC, Simpson MJA, Millington KJ. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. J Hum Nutr Diet. 17(5):449–459.

Salah N, Miller NJ, Paganga G et al. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Arch Biochem Biophys 322(2), 339-346.

Salles AMR, Galvao TF, Silva MT, Motta LCD, Pereira MG. Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic review. Sci World J. 2012;2012:243476.

Schneider, B. S., & Tiidus, P. M. (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: How do we resolve the controversy? Sports Medicine, 37, 837–856.

Sharma GN, Gupta G, Sharma P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2018;28(2):139-154. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258. PMID: 30055541.

Shen T., Wang X.-N., Lou H.-X. Natural stilbenes: an overview. Natural Product Reports. 2009;26(7):916–935. doi: 10.1039/b905960a. Rivière C., Pawlus A. D., Mérillon J.-M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. Natural Product Reports. 2012;29(11):1317–1333. doi: 10.1039/c2np20049j.

Silva, V., Falco, V., Dias, M. I., Barros, L., Silva, A., Capita, R., … Poeta, P. (2020). Evaluation of the Phenolic Profile of Castanea sativa Mill. By-Products and Their Antioxidant and Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria. Antioxidants, 9(1), 87. doi:10.3390/antiox9010087

Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(23):10540–3.

Smith M.A., Reid M.B. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. Respir. Physiol. Neurobiol. 2006;151:229–241. doi: 10.1016/j.resp.2005.12.011.

Spencer J. P. E., Abd El Mohsen M. M., Minihane A.-M., Mathers J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. British Journal of Nutrition. 2008;99(1):12–22. doi: 10.1017/s0007114507798938.

Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. Ann N Y Acad Sci. 2008;1147:37–52

Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. Antioxidants. 2015;4(1):204–47

Szliszka E., Krol W. The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention. European Journal of Cancer Prevention. 2011;20(1):63–69. doi: 10.1097/CEJ.0b013e32833ecc48.

Taofiq O., Calhelha R. C., Heleno S., et al. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. Food Research International. 2015;76(Part 3):821–827. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.044.

Talaei M., Pan A. Role of phytoestrogens in prevention and management of type 2 diabetes. World J. Diabetes. 2015;6:271–283. doi: 10.4239/wjd.v6.i2.271.

Tateyama M, Takeda A, Onodera Y, Matsuzaki M, Hasegawa T, Nunomura A, et al. Oxidative stress and predominant Abeta 42 (43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. Acta Neuropathol. 2003;105(6):581–5

Teponno R.B., Kusari S., Spiteller M. Recent advances in research on lignans and neolignans. Nat. Prod. Rep. 2016;33:1044–1092. doi: 10.1039/C6NP00021E.

Thomas, M. J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. Nutrition, 16(7-8), 716–718. doi:10.1016/s0899-9007(00)00343-9

Tkachenko H, Kurhaluk N, Grudniewska J, Andriichuk A. Tissue-specific responses ofoxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout Oncorhynchus mykiss during a vaccination against furunculosis. Fish Physiol Biochem. 2014;40(4):1289–300.

Tovmasyan A, Maia CGC, Weitner T, Carballal S, Sampaio RS, Lieb D, Ghazaryan R, Ivanovic-Burmazovic I, Ferrer-Sueta G, Radi R, Reboucas JS, Spasojevic I, Benov L, Batinic-Haberle I. A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox- active therapeutics. Free Rad Biol Med. 2015;86:308–21.

Tuyen, P., Xuan, T., Tu Anh, T., Mai Van, T., Ahmad, A., Elzaawely, A., & Khanh, T. (2018). Weed Suppressing Potential and Isolation of Potent Plant Growth Inhibitors from Castanea crenata Sieb. et Zucc. Molecules, 23(2), 345. doi:10.3390/molecules23020345

Uchida K, Kawakishi S. 2-oxohistidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. FEBS Lett. 1993;332(3):208–10.

Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Dua k. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(6):98589.

Va´zquez G, Ferna´ndez-Agullo´ A, Go´mez-Castro C, Freire MS, Antorrena G, Gonza´lez-A´ lvarez J. 2012. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (Castanea sativa) bur. Ind Crop Prod. 35(1):126–134.

Wang G, Wang JJ, Guan R, Du L, Gao J, Fu XL. Strategies to target glucose metabolism in tumor microenvironment on Cancer by flavonoids. Nutr Cancer. 2017;69:4.

Wang, S., Yu, H., & Wickliffe, J. K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO2. Toxicology in Vitro, 25(8), 2147–2151. doi:10.1016/j.tiv.2011.07.007

Weaver C.M. and Cheong J.M. (2005). Soy isoflavones and bone health: the relationship is still unclear. Journal of Nutrition 135: 1243□1247.

WILLCOX, J. K., ASH, S. L., & CATIGNANI, G. L. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44(4), 275–295. doi:10.1080/10408690490468489

Zhao Q, Ernst JT, Hamilton AD, Debnath AK, Jiang S. XTT formazan widely used to detect cell viability inhibits HIV type 1 infection in vitro by targeting gp41. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002 Sep 20;18(14):989-97. doi: 10.1089/08892220260235353. PMID: 12396451

Zhao Z-K, Yu H-L, Liu B, Wang H, Luo Q, Ding X-G. Antioxidative mechanism of Lycium barbarum polysaccharides promotes repair and regeneration following cavernous nerve injury. Neural Regen Res. 2016;11(8):1312–21.

Τεριζή Κ. (2020). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος φύλλων από Ευρωπαϊκή καστανιά (Castanea sativa) σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Λαρισα.

https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1772.aspx#generalinformation

https://www.slideshare.net/Nabiilah/microwave-assisted-extraction

https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/5114/1/02_chapter_1.pdf