



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σύγκριση αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξογόνου δράσης του *Sideritis siphylea*, μετά από δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης.»



ΒΑΣΣΗ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

***‘Σύγκριση αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξογόνου δράσης του
Sideritis sipylea, μετά από δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης’***

ΒΑΣΣΗ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Κουρέτας Δημήτριος
Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

***Comparison of Antioxidant and antimutagenic potential of Sideritis
sipylea extract, after two different extraction procedures***

VASSI ELENI

Supervisor Professor: Kouretas Dimitrios
Laboratory of animal physiology

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Χαλαμπαλάκη Μαρία: Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και
Χημείας Φυσικών Προϊόντων Τμήμα Φαρμακευτικής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να αναλάβω μια τόσο σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία καθώς και για την καθοδήγηση του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Κούκα Παρασκευή για την βοήθεια της κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας, καθώς και όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να βοηθήσουν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Το τσάι του βουνού , ή αλλιώς Σιδερίτης, είναι ένα αρκετά διαδομένο αφέψημα με ευεργετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων για διάφορα προβλήματα υγείας. Το τσάι είναι πλούσιο σε πονυφαινόλες , γεγονός που του χαρίζει και τις αντιοξειδωτικές και τις αντιμεταλλαξιγόνες του ιδιότητες. Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική καθώς και την αντιγενετοξική επίδραση δύο εκχυλισμάτων *Sideritis siphylea* μετά από δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης του εκχυλίσματος WE είναι νερό/αιθανόλη (50:50) ενώ του EtoAc οξικός αιθυλεστέρας. Είναι πολύ σημαντικό ότι το συγκεκριμένο είδος *Sideriti* δεν έχει ξαναμελετηθεί. Μέσω της μελέτης αυτής θα δούμε ποιο από τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα προκειμένου να γίνεται η χρήση μεθόδων εκχύλισης που θα αποφέρουν το βέλτιστο πολυφαινολικό περιεχόμενο στα εκχυλίσματα, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία βιολετουργικών ροφημάτων, τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Στην παρούσα μελέτη ,λοιπόν ,υπολογίστηκε αρχικά *in vitro* το σύνολο των φαινολικών ενώσεων μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu και στη συνέχεια η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο εκχυλισμάτων *Sideritis* μέσω των μεθόδων DPPH ,ABTS*+ καθώς και reducing power. Παράλληλα, προσδιορίσαμε την ικανότητα των δύο εκχυλισμάτων να προστατεύουν το πλασμαδικό DNA από μονόκλωνα θραύσματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης με το τεστ του Ames. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση που είχαν τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό σε μυϊκά κύτταρα ποντικού, κυτταρική σειρά C2C12.Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε, το εκχύλισμα WE φάνηκε να είναι πιο δραστικό σε σχέση με το EtoAc. Γιατί εκτός από την αντιοξειδωτική ικανότητα, έδειξε ότι προστατεύει σε μεγαλύτερο βαθμό το DNA και τα κύτταρα C2C12 από επαγόμενες από τις ρίζες βλάβες. Συνεπώς, η εκχύλιση με νερό και αιθανόλη φαίνεται να βοηθά στα πιο δραστικά πολυφαινολικά μόρια από το τσάι.

Abstract

Mountain tea, or Sideritis, is a quite widespread beverage with beneficial properties. It is used since ancient times because of its therapeutic properties. Mountain tea is rich in polyphenols, which give its antioxidant and antimutagenic properties. The purpose of this study is to compare antioxidant and antigenotoxic effect of Sideritis sipylea extract, after two different extraction procedures. Specifically, the extract WE has as a solvent ethanol/water(50:50) while , the extract EtoAc has ethyl acetate. This study is very essential because this species of siderite hasn't been studied before. A holistic *in vitro* approach was made in order to obtain evidence that will be useful in relevant *in vivo* experimental designs, with ultimate goal to contribute to the production of potential biofunctional foods rich in blossom polyphenols. In the present study, the two extracts of Sideritis sipylea have been assessed *in vitro*. Specifically, an assessment of the polyphenolic content with Folin-Ciocalteu assay was performed. After, the antioxidant potency of the extracts was assessed with the DPPH, ABTS and reducing power assays. Also, an evaluation of the protective effect of the extracts against the induction of single-stranded DNA fragments, by ROO• radicals. Additionally, the antimutagenic potential of the extracts was assessed using the AMES test. Finally, the redox status of C2C12 cell lines (mouse myoblasts cell line), in terms of GSH and ROS, was evaluated using flow cytometry. According to the results, the WE extract seems to have greater antioxidant and antimutagenic activity. So, the ethanol as a solvent gives the maximum polyphenolic content.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract.....	6
1.Εισαγωγή.....	13
1.1 Ελεύθερες ρίζες	13
1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών	14
1.3Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου	16
1.3.1Θετικές επιδράσεις.....	16
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις	16
1.4 Οξειδωτικό στρες.....	18
1.5 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες	18
1.6 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	19
1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	19
1.8 Πολυφαινόλες.....	21
1.9 Τσάι του βουνού	22
2. Σκοπός.....	25
3. Μέθοδοι και υλικά.....	26
3.1 Συλλογή και εκχύλιση	26
3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος με την μέθοδο Folin-Ciocalteu	26
3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH*	27
3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητα δέσμευσης της ρίζας ABTS**.....	29
3.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων με την μέθοδο reducing power	31

3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	32
3.7 Επαγόμενη από ρίζες Περοξύλιου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραύσματος σε πλασμιδιακό DNA	34
3.8 Κυτταροκαλλιέργια – Κυτταρομετρία ροής.....	36
3.8.1 Κυτταρική σειρά C2C12	37
3.8.2 Καλλιέργεια κυττάρων.....	37
3.8.3 Δοκιμασία ΧΤΤ	38
3.8.4 Προσδιορισμός επιπέδων GSH με κυτταρομετρία ροής.....	40
3.7.5 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής.....	41
3.9 Τεστ του Ames	41
3.8.1 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμεταλλαξιόνου δράσης του Sideriti Siplyea.....	43
3.9 Στατιστική ανάλυση	44
4. Αποτελέσματα	44
4.1 Προσδιορισμός ολικών πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	44
4.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας DPPH	45
4.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	46
4.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων με την μέθοδο reducing power	47
4.5 Επαγόμενη από ρίζες Περοξύλιου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραύσματος σε πλασμιδιακό DNA – μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA	48
4.6 Τεστ του Ames	50
4.7Κυτταροκαλλιέργειες.....	51
4.7.1 ΧΤΤ.....	51
5.Συζήτηση	61
6. Βιβλιογραφία	69

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 . Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οξειδωτική φωσφορυλίωση	14
Εικόνα 2 . Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών.....	15
Εικόνα 3 . Οξειδωτικό στρες.....	18

Εικόνα 4. Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.....	18
Εικόνα 5. Δράση αντιοξειδωτικώνμορίων	19
Εικόνα 6. Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	20
Εικόνα 7. Βιοχημικά αναπαράσταση γλουταθειόνης.....	20
Εικόνα 8. Εξωγενή αντιοξειδωτικά.....	20
Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών	21
Εικόνα 10. Βασική δομή πολυφαινολών.....	22
Εικόνα 11. Τσάι του βουνού.....	22
Εικόνα 12. Είδη Σιδερίτη	23
Εικόνα 13 .Χημική δομή ένωσης DPPH• και DPPH-H	27
Εικόνα 14. Μεταβολή χρώματος λόγω προσθήκης αντιοξειδωτικού.	28
Εικόνα 15. Παραγωγή της ρίζας ABTS ^{•+} μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O.....	29
Εικόνα 16. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα ABTS ^{•+}	29
Εικόνα 17. Μεταβολή χρώματος λόγω προσθήκης αντιοξειδωτικού.	30
Εικόνα 18. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικού (Reducing power)	31
Εικόνα 19. Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδίου	33
Εικόνα 20. Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA.....	35
Εικόνα 21. Πήκτωμα αγαρόζης	35
Εικόνα 22. Αναπαράσταση κυτταρομετρία ροής.....	36
Εικόνα 23. Κύτταρα C2C12 σε οπτικό μικροσκόπιο.....	37
Εικόνα 24. Μετατροπή ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζάνη.	38
Εικόνα 25. Μέτρηση σε πλάκα Neubauer.....	39
Εικόνα 26. Πλάκα 96 θέσεων	40
Εικόνα 27. Τριβλία με αποικίες Salmonellaστο τεστ του Ames A) ControlB) Τριβλία με μεταλλαξιγόνο παράγοντα Γ) Τριβλία με μεταλλαξιγόνο παράγοντα και αντιοξειδωτικό.....	41
Εικόνα 28. Μηχανισμός δράσης tBOOH	42
Εικόνα 29. . Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. WE, IC ₅₀ :15 μg εκχυλίσματος Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).	48
Εικόνα 30. Πηκτή ηλεκτροφόρησης WE.....	49
Εικόνα 31. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. EtoAc, IC ₅₀ :29 μg εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).	49
Εικόνα 32. Πηκτή ηλεκτροφόρησης EtoAc.....	50
Εικόνα 33. Επίδραση WE στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον <i>φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα</i>	

κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.	55
Εικόνα 34. Επίδραση WE στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.	56
Εικόνα 35. Επίδραση EtoAc στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.	59
Εικόνα 36. Επίδραση EtoAc στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.	60
Εικόνα 37. Φαινολικό περιεχόμενο εκχυλίσματος WE.....	62
Εικόνα 38. Υγρή χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας(LC-MS) για το εκχύλισμα WE.....	63
Εικόνα 39. Φαινολικό περιεχόμενο εκχυλίσματος EtoAc.....	63
Εικόνα 40. Υγρή χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας(LC-MS) για το εκχύλισμα EtoAc.....	64
Εικόνα 41. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2.....	66

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου	13
Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου.....	13
Πίνακας 3. Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	19
Πίνακας 4. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων (Folin-Ciocalteu)	27
Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων (DPPH)....	28
Πίνακας 6. Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (DPPH).....	28
Πίνακας 7. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων (Μέθοδος ABTS•+)	30
Πίνακας 8. Προσθήκη διαλυμάτων καμπύλης ουσίας (Μέθοδος ABTS•+).....	30
Πίνακας 9. Σειρά και ποσότητα προσθήκης διαλυμάτων (Προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης).....	32
Πίνακας 10. Προσθήκη διαλυμάτων καμπύλης ουσίας(Προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης).....	32

Πίνακας 11. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων(μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA)	36
Πίνακας 12. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων (Τεστ του Ames).....	43

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος	45
Διάγραμμα 2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM (n=2).....	46
Διάγραμμα 3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+} . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM(n=2) * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων (p<0,05)	47
Διάγραμμα 4. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης μέσω της μεθόδου Reducingpower. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM(n=2). * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων (p<0,05).....	48
Διάγραμμα 5. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50 και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων.	50
Διάγραμμα 6. Προσδιορισμός αντιγενετοξικής δράσης των εκχυλισμάτων Sideriti με το τεστ του Ames.Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Η διαφορά δεν είναι στατικά σημαντική.....	51
Διάγραμμα 7. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος WE στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.	52
Διάγραμμα 8. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος EtoAc στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=6). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.	52
Διάγραμμα 9. Επίδραση εκχυλίσματος WE, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12 , μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τοcontrol.	53
Διάγραμμα 10. Επίδραση εκχυλίσματος WE στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12 , μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε	

εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).
*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.....54

Διάγραμμα 11. Επίδραση εκχυλίσματος EtoAc, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12 , μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).
*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.....57

Διάγραμμα 12. Επίδραση εκχυλίσματος EtoAc στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12 , μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).
*p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.....58

1.Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται ως μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης (Barry Halliwell & Gutteridge, 1990) και μπορούν να δημιουργηθούν είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στιβάδα. (Mylonas & Kouretas, 1999) Τα μόρια αυτά λόγω της αστάθειας τους είναι ιδιαίτερα δραστικά και μπορούν να προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια και εν τέλει να δημιουργήσουν βλάβες στη λειτουργία του κυττάρου και κατά επέκταση του οργανισμού. (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010) Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο.

Οι πιο σημαντικές και συνήθεις ελεύθερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Πίνακας 1) καθώς και ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο (Πίνακας 2) (Sengupta et al., 2004).

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	Σύμβολο
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	OH •
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	O ₂
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	O ₂ • ⁻
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxy Radical)	RO •
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxy Radical)	ROO •
Όζον (Ozone)	O ₃
Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H ₂ O ₂
Υδροϋπεροξείδιο (Hydroperoxide)	ROOH

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές αζώτου

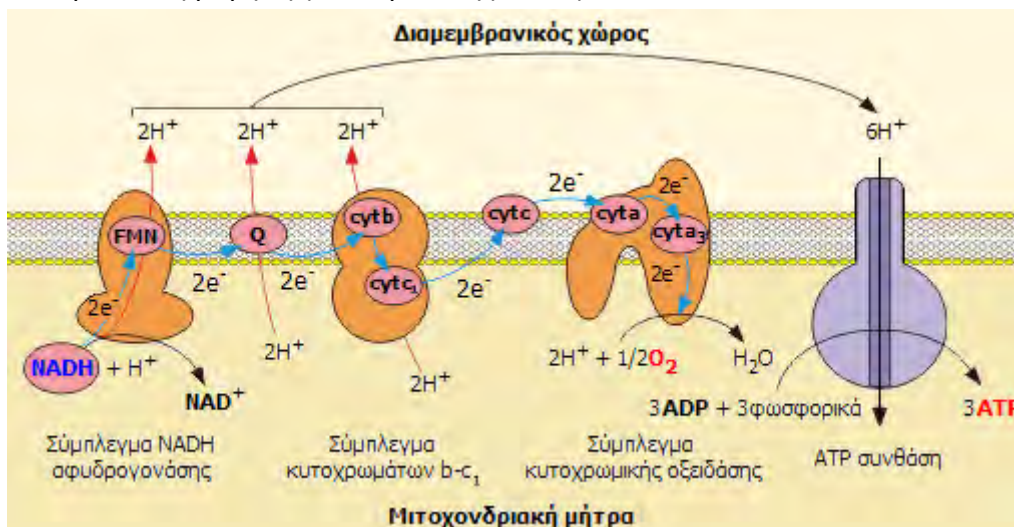
Δραστικές Μορφές Αζώτου	Σύμβολο
Περοξυνιτρίτης (Peroxy nitrite)	ONOO ⁻
Μονοξείδιο του Αζώτου (Nitric Oxide)	NO •
Διοξείδιο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	NO ₂
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxy nitrous Acid)	ONOOH

1.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών

Ελεύθερες ρίζες είναι δυνατόν να σχηματιστούν στον οργανισμό μας τόσο ενδογενώς όσο και λόγω εξωγενών παραγόντων.

Οι ενδογενείς πηγές ROS:

- ✚ Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί την κύρια ενδογενή πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Τα ηλεκτρόνια του NADH και FADH₂ μεταφέρονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (σύμπλεγμα NADH δεϋδρογονάσης, σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c, σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c) και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια (ουβικινόνη, κυτόχρωμα c), όπως φαίνονται και στην Εικόνα 2, μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια. Τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων είναι το μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται πλήρως προς νερό, ενώ η ενέργεια που δημιουργείται κατά τη μετακίνηση των πρωτονίων αποθηκεύεται ως ATP μέσω της συνθάσης του ATP. Το οξύγνο το οποίο δεν καταλήγει σε νερό θα μετατραπεί σε δραστικές μορφές. (Παπαγαλάνης, 2014)



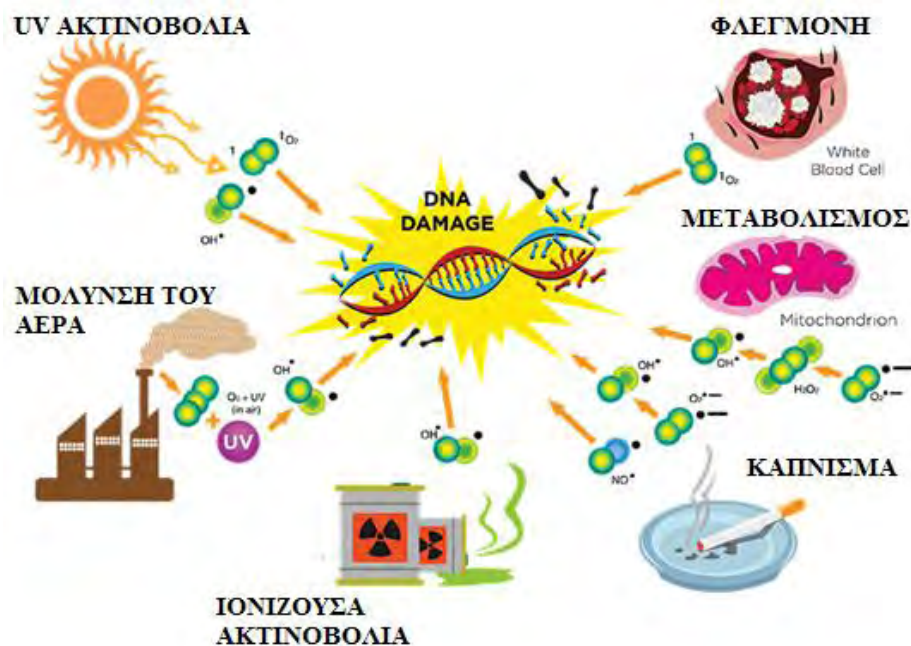
Εικόνα 1 . Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

- ✚ Το οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία στον οργανισμό αλλά δεν καταλήγει στα μιτοχόνδρια, λειτουργεί σαν υπόστρωμα για ενζυμικά συστήματα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. NADH-οξειδάση, οξειδάση του CYT-P450, κυκλοξυγενάση και οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν ένζυμα που σταδιακά μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο και κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται παραπροϊόντα

όπως το σουπεροξειδίο($O_2^{\bullet-}$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου(H_2O_2) και η ρίζα υδροξυλίου(HO^{\bullet}) . (Παπαγαλάνης, 2014)

- ✚ Ακόμα, κάποια ιόντα μετάλλων όπως ο σίδηρος(Fe) και ο χαλκός(Cu), είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα σε βιολογικά συστήματα είναι σε θέση να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια και να οδηγήσουν στην καταστροφή τους όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπη και το DNA. (6) (Barrera, 2012)
- ✚ Τέλος, ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού αποτελούν πηγή ελεύθερων ριζών καθώς παράγουν ρίζες προκειμένου να καταπολεμήσουν εξωγενείς παράγοντες όπως βακτήρια.(Knight, 2000)

Ωστόσο ελεύθερες ρίζες παράγονται και από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η περιβαλλοντική ρύπανση, το κάπνισμα(Koren, 1995). Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων (Naito, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998) άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ (Elsayed, Omaye, Klain, & Korte, 1992)(Obata, Yamanaka, Kinemuchi, & Orelan, 2001) Σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή (Ames, 1986)(Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015)



Εικόνα 2 . Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελεύθερων ριζών

1.3 Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου

1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Παρόλο που οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνταν μόνο επιβλαβείς πλέον γνωρίζουμε ότι είναι απαραίτητες διότι συμμετέχουν σε σημαντικές διαδικασίες στον οργανισμό. Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι (Rimbach et al., 1999) και συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Finaud, Lac, & Filaire, 2006). Αυτοί είναι δύο από τους πιο σημαντικούς τους ρόλους.

1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις

Όμως οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν αρνητικές επιδράσεις καθώς αλλάζουν τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν (Cooper, Vollaard, Choueiri, & Wilson, 2002). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις θεωρούνται επιβλαβείς για τα συστατικά του κυττάρου. Είναι υπεύθυνες για την οξειδωτική των λιπιδίων, του DNA και των πρωτεϊνών. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού, που προκλήθηκε από οξειδωτική βλάβη, αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση, την μεταλλαξιγένεση και την γήρανση. (Lobo et al., 2010) (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006) (Leaf, Kleinman, Hamilton, & Barstow, 1997)

Βλάβες στο DNA

Οι ROS αλληλεπιδρούν με το DNA και μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές, όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών καθώς και στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Παρόλο που το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA είναι συνεχές, οι τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν από τις δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν ως συνέπεια την οξείδωση του DNA που οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση. (Ames, 1989)

Επιβλαβείς επιδράσεις τις πρωτεΐνες

Η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί δισουλφιδικές γέφυρες, αλλάζει την στροφή τους στο χώρο και εν τέλει επηρεάζει τη λειτουργία τους. Το μέγεθος της καταστροφής των πρωτεϊνών εξαρτάται από τη θέση της πρωτεΐνης σε σχέση με τον τόπο παραγωγής των ROS, αλλά και από την σύστασή τους και τη δομή τους.

Ορισμένα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, είναι πιο επιρρεπή στην οξείδωση. Γενικά οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη δευτεροταγή όσο και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών.(Dröge, 2002)Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αυξήσεις στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων.(Rodney L. Levine, 2002)(R. L. Levine, Moskovitz, & Stadtman, 2000)Οι ROS έχουν, επίσης, την ικανότητα να αλλάζουν το λυσοσωμικό σύστημα και το πρωτεάσωμα, δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών.(Szweda, Friguet, & Szweda, 2002)

Επιβλαβείς Επιδράσεις στα Λιπίδια

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στα λιπίδια των μεμβρανών μέσω της λιπιδιακής υπεροξειδωσης .(Land, 1990)

Πολύ επιρρεπή στην επίδραση των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Μόλις σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να μετατραπούν μέσω διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξειδία (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΐδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξειδωσης αποτελεί η μαλονδιαλδεΐδη (MDA).(Wang et al., 1996)(Marnett, 1999)

Επίσης, η καταστροφή των λιπιδίων μπορεί να έχει συνέπειες στη λειτουργία και στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι λιγότερο ανθεκτικά στην οξείδωση σε σχέση με τα μονοακόρεστα ή τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, ώστε η ποικιλία σε PUFA στις μεμβράνες είναι δυνατόν να επηρεάσει και την αναλογία της οξειδωτικής καταστροφής. (Hulbert, Pamplona, Buffenstein, & Buttemer, 2007)

1.4 Οξειδωτικό στρες



Εικόνα 3. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίστηκε αρχικά από τον Helmut Sies ως "διαταραχή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ του πρώτου". Αφορά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, με αποτέλεσμα είτε να υπάρχει πλεόνασμα

ελευθέρων ριζών είτε να υπάρχει μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. (Εικόνα 3)(H., n.d.)

Όμως αυτός ο ορισμός με την πάροδο του χρόνου φάνηκε ότι είναι ασαφής και όχι καλά χαρακτηρισμένος. Έτσι, ο Dean Jonesto 2006 εισήγαγε έναν νέο ορισμό στην επιστημονική κοινότητα, "Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης". Αυτός θεωρείται ο πλέον ακριβής και αποδεκτός ορισμός μέχρι σήμερα. (Jones, 2006)

1.5 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

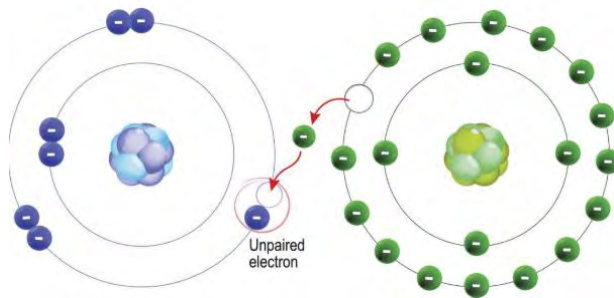
Υπάρχουν πολλές αναφορές για το οξειδωτικό στρες και ενδεχόμενες παθήσεις τις οποίες προκαλεί. Πλέον είναι γνωστό ότι συμβάλλει σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται κάποιες από τις ασθένειες που υποστηρίζεται ότι προκαλεί: (Lobo et al., 2010)

Ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες
Ασθένεια Alzheimer
Νόσος του Πάρκινσον
Μυϊκή δυστροφία
Καταρράκτης
Καρδιακή προσβολή
Καρκίνο
Γαστρικά έλκη
Σπειραματονεφρίτιδα
Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας

Εικόνα 4. Ασθένειες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες

1.6 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το μόριο υδρογόνου (Εικόνα 5), που τους λείπει και με αυτόν τον τρόπο είτε εμποδίζουν τη δράση τους, είτε ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά



συστήματα του οργανισμού. Τα ίδια τα αντιοξειδωτικά στη συνέχεια μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες αλλά δεν είναι ιδιαίτερα δραστικές μορφές και δεν προκαλούν κάποια σοβαρή βλάβη μέχρι κάποια συγκέντρωση. (B Halliwell, 2001)

Εικόνα 5. Δράση αντιοξειδωτικών μορίων

1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

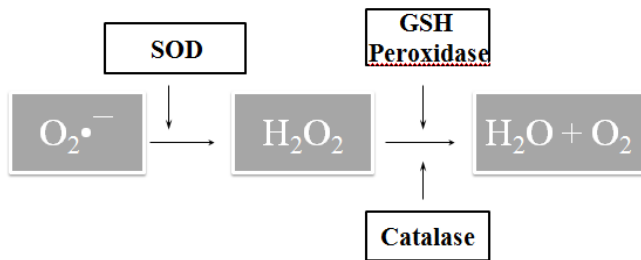
Αντιοξειδωτικά υπάρχουν τόσο φυσιολογικά στον οργανισμό μας, τα οποία χαρακτηρίζονται ως ενδογενή, αλλά προσλαμβάνουμε και από την διατροφή μας, εξωγενή.

Οι μηχανισμοί, με τους οποίους δρουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους **ενζυμικούς** και στους **μη ενζυμικούς**. (Lobo et al., 2010)

Πίνακας 3. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

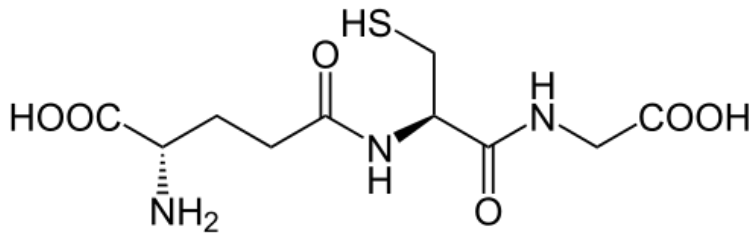
Αντιοξειδωτικά ένζυμα	Αντιοξειδωτικά που δρουν με μη ενζυμικό μηχανισμό
υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)
καταλάση (CAT)	Ουβικινόλη
υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	ουρικό οξύ

Στην εικόνα παρουσιάζονται οι αντιδράσεις οι οποίες καταλύουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα.



Εικόνα 6. Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Η γλουταθειόνη είναι το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό καθώς έχει μεγάλη δράση. Βιοχημικά είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. (Εικόνα 7) Μέσα στους οργανισμούς η ουσία υπάρχει σε δύο μορφές: την ανηγμένη και την οξειδωμένη. Με τις μορφές αυτές, έχει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου.



Εικόνα 7. Βιοχημικά αναπαράσταση γλουταθειόνης

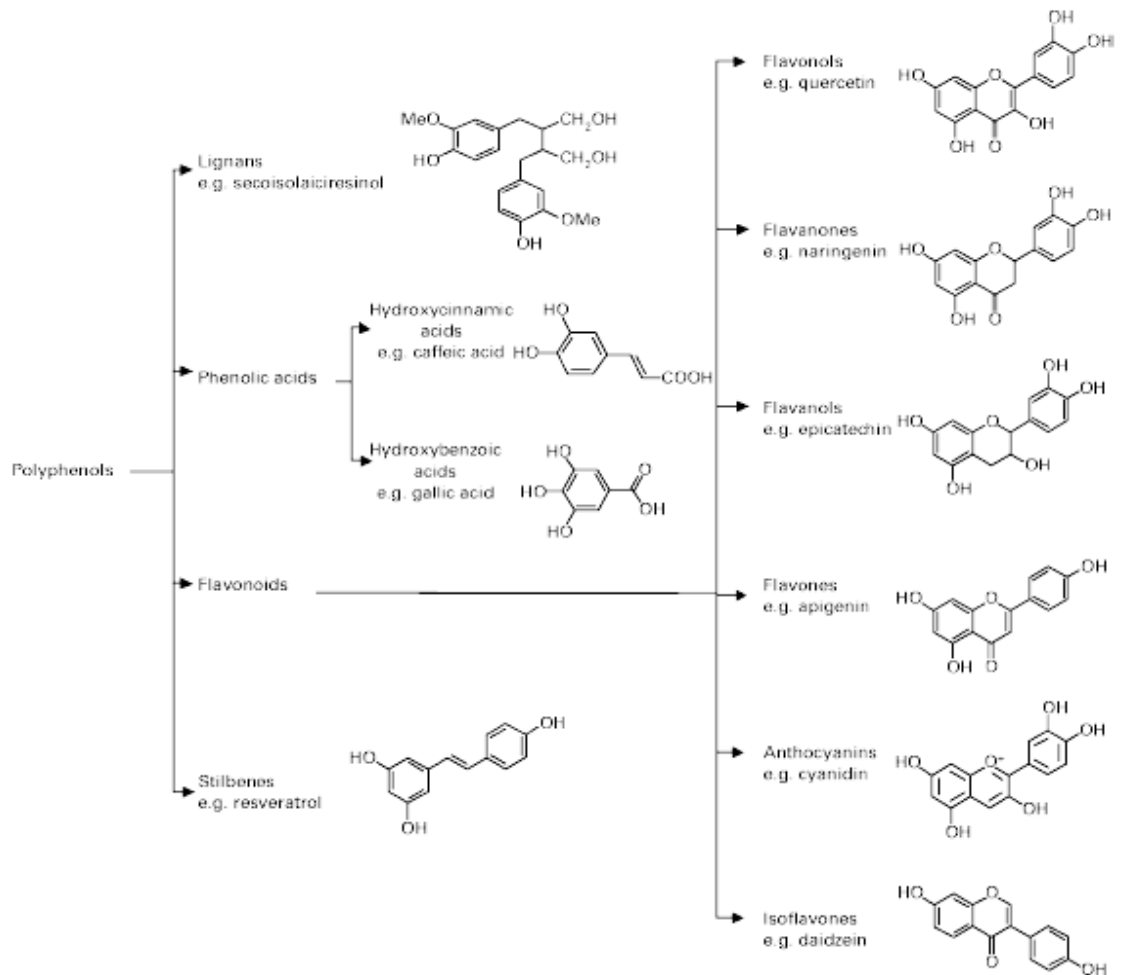
Ενώ κάποια εξωγενή αντιοξειδωτικά καταγράφονται στην Εικόνα 8 (Lobo et al., 2010)

Εξωγενή αντιοξειδωτικά
βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)
βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)
B-καροτένιο
σελήνιο
φλαβονοειδή
ανθοκυανίνες
φαινόλες

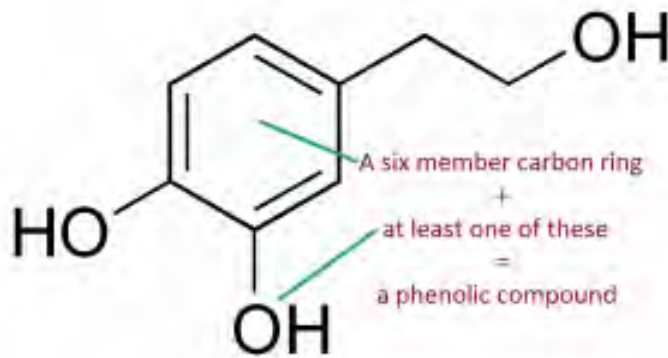
Εικόνα 8. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

1.8 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων και αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών.(Ding, Yao, Yao, Fai, & Zhang, 2013) Προστατεύουν τα φυτά από την υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές καταπονήσεις και την προσβολή από παθογόνα. Το χρώμα, η γεύση, η οσμή και η οξειδωτική σταθερότητα είναι ιδιότητες των τροφών που οφείλονται στις πολυφαινόλες. (Pandey & Rizvi, 2009) Στην Εικόνα 9 απεικονίζονται οι πιο σημαντικές κατηγορίες πολυφαινολών. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ομάδων των πολυφαινολών είναι ότι διαθέτουν μια κοινή δομή, έναν αρωματικό δακτύλιο (ή και περισσότερους) υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα. (Duthie, Gardner, & Kyle, 2003)(Εικόνα 10)



Εικόνα 9. Κατηγορίες πολυφαινολών



Εικόνα 10. Βασική δομή πολυφαινολών

Όσον αφορά την δράση τους, οι πολυφαινόλες έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας τον σχηματισμό τους ή απενεργοποιώντας τον, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό οξείδωσης βιολογικών μορίων. Κυρίως, εξουδετερώνουν άμεσα τις ρίζες των αλυσιδωτών αντιδράσεων της λιπιδικής υπεροξείδωσης, προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου, με αποτέλεσμα να καθίστανται οι ίδιες σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές), διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Guo, Hsieh, & Hu, 2009). Επίσης είναι γνωστές ως χηλικοί παράγοντες μετάλλων. Η χηλικοποίηση μετάλλων όπως του Fe^{2+} μπορεί να μειώσει άμεσα τον ρυθμό αντίδρασης Fenton, εμποδίζοντας έτσι την οξείδωση που προκαλείται από τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (Pietta, 2000)(Perron & Brumaghim, 2009). Τέλος, κάποιες πολυφαινόλες επάγουν την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων in vivo όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.(Croft, 2016)

1.9 Τσάι του βουνού

Από τα 350.000 διαφορετικά είδη που περιλαμβάνει το φυτικό βασίλειο, εντοπίζονται περίπου 60.000 είδη φαρμακευτικών και 18.000 είδη αρωματικών φυτών. Πολλά από τα αρωματικά φυτά περιέχουν ουσίες με ιδιότητες θεραπευτικές



και χαρακτηρίζονται και ως φαρμακευτικά, ενώ κοινό γνώρισμά τους είναι ότι περιέχουν αιθέρια έλαια στα διάφορα φυτικά όργανά τους (Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., Λάζαρη, Δ., και Κρίγκας,

Εικόνα 11. Τσάι του βουνού

2013)

Η χρήση τους ήταν γνωστή από την αρχαιότητα λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Από τα πιο γνωστά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της Ελλάδας είναι το τσάι του βουνού.

Το τσάι του βουνού ή αλλιώς Σιδερίτης του Διοσκουρίδη είναι γνωστό βότανο το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα στις Μεσογειακές χώρες ως αφέψημα. Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από τη λέξη σίδηρος. Σύμφωνα με μία εκδοχή, δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα, ενώ άλλη εκδοχή υποστηρίζει ότι αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος. Μια τρίτη άποψη, υποστηρίζει ότι η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης. Τα είδη του Σιδερίτη που μας ενδιαφέρουν, αυτοφύονται στις παραμεσόγειες περιοχές και κυρίως στη χώρα μας. (Σαμαρά, n.d.) (A., n.d.)

Από το τσάι του βουνού παρασκευάζεται το ομώνυμο αφέψημα, γνωστό στην παραδοσιακή ιατρική για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Ο *Sideritis* ανήκει στην *Lamiaceae* και περιλαμβάνει 150 περίπου είδη, που φύονται στις παραμεσόγειες χώρες, τις Καναρίους νήσους και την Βόρειο Ασία. Τα πιο κοινά είδη που εκφύονται στην Ελλάδα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα: (Kalivas et al., 2014)

Είδη Σιδερίτη στην Ελλάδα
<i>Sideritis Sipylea</i> Boiss
<i>Sideritis syriaca</i> L. spp <i>syriaca</i>
<i>Sideritis raeseri</i> spp. <i>Raeseri</i> (Boiss & Heldr)
<i>Sideritis raeseri</i> spp. <i>Attica</i> (Heldr)
<i>Sideritis clandestine</i> ssp. <i>Clandestine</i>
<i>Sideritis clandestine</i> ssp. <i>Peloponnesiaca</i> (Boiss & Heldr)
<i>Sideritis Euboea</i> Heldr
<i>Sideritis scardica</i> Griseb
<i>Sidertitis perfoliata</i> spp. <i>Perfoliata</i>
<i>Sideritis perfoliata</i> spp. <i>Athoa</i>

Εικόνα 12. Είδη Σιδερίτη

Τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτενώς η χημική σύσταση πολλών ειδών *Sideritis* και έχει προσδιοριστεί ότι περιέχουν αιθέρια έλαια, διτερπένια, φαινολικές ουσίες, φλαβονοειδή, μεταλλικά ιχνοστοιχεία κ.ά, στα οποία οφείλεται η βιολογική

δραστικότητα και διατροφική τους αξία. Αποτέλεσμα μελετών δείχνουν ότι τα διάφορα είδη Sideritis διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές καθώς και αναγηλικές ιδιότητες.(González-Burgos, Carretero, & Gómez-Serranillos, 2011)(Fokialakis et al., 2007)

Ένα πολύ σημαντικό ζήτημα είναι η αυξημένη χρήση των φαρμακευτικών φυτών στα νησιά του Αιγαίου στα οποία και εκφύονται .Ο τοπικός πληθυσμός πρέπει να αναγνωρίσει την επικινδυνότητά να εξαφανιστούν και να τα καλλιεργήσει, προκειμένου να προστατεύσει τους πληθυσμούς από την εξαφάνιση. Η αποδάσωση στη Λέσβο, τη Χίο και τη Σάμο είχαν ως αποτέλεσμα γενική υποβάθμιση των οικοσυστημάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εξαφάνιση πολλών ειδών. Συμπερασματικά, από αυτή τη σύντομη έκθεση είναι σαφές ότι τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν σημαντικό στοιχείο του ιθαγενικού ιατρικού συστήματος των νησιών του Βορειοανατολικού Αιγαίου. Παρά το γεγονός ότι ο τοπικός πληθυσμός έχει πρόσβαση σε σύγχρονα φάρμακα, πολλοί εξακολουθούν να εξαρτώνται, τουλάχιστον για τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών, σε φυτικές θεραπείες. Αυτές οι θεραπείες αντιπροσωπεύουν για πολλούς τοπικούς γιατρούς μια εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους.(Axiotis, Halabalaki, & Skaltsounis, 2018)

2. Σκοπός

Στις μέρες μας η κοινωνία τείνει όλο και περισσότερο να γίνει φαρμακοκεντρική. Ασθένειες φαίνεται να κυριεύουν τον κόσμο και τα φάρμακα θεωρούνται ως η μόνη λύση. Ωστόσο, η πραγματική λύση βρίσκεται στη διατροφή μας και σε φυτικά προϊόντα που μας δίνει η φύση και έχουν φαρμακευτική-θεραπευτική δράση. Ένα από αυτά είναι και το τσάι του βουνού. Συνεπώς, η μελέτη αυτή έγινε προκειμένου να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική καθώς και την αντιμεταλλαξιγόνο δράση του *Sideritis siphylea* ύστερα από δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης και να συγκρίνουμε την δράση τους ώστε να γίνεται θεραπευτικά η χρήση του πιο δραστικού και λιγότερο τοξικού.

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 2 εκχυλίσματα *Sideritis siphylea*. Τα εκχυλίσματα αυτά προέκυψαν μετά από εκχύλιση με νερό/αιθανόλη(50:50)(WE) και οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Αρχικά έγινε προσδιορισμός των πολυφαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Ύστερα για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητα πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH, ABTS και reducing power. Στην συνέχεια, έγινε έλεγχος της αντιγενotoξικής δράσης των εκχυλισμάτων αυτών με το τεστ του Ames. Ενώ τέλος, τα εκχυλίσματα αυτά ελέγχθηκαν σε μία κυτταρική σειρά (C2C12) για τον έλεγχο της επίδρασης τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου, μέσω της μέτρησης των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής.

3. Μέθοδοι και υλικά

3.1 Συλλογή και εκχύλιση

Υπέργεια τμήματα του φυτού συλλέχθηκαν από τη Λέσβο, νησί του Βορείου Αιγαίου, από τον Δρ. Ευάγγελο Αξιώτη. Το ξηρό υλικό κονιοποιήθηκε σε μηχανή μύλου και εκχυλίστηκαν ξεχωριστά 15 g με ένα μείγμα νερού / αιθανόλης (50:50) (WE) και οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν υπό μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χρησιμοποιώντας 1 λίτρο διαλύτη κάθε φορά. Μετά τη διήθηση, οι συλλεγόμενοι διαλύτες εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και τα υπολείμματα ζυγίστηκαν, με αποτέλεσμα 1,02 g εκχυλίσματος (WE) και 0,60 g εκχυλίσματος EtOAc. Το εκχύλισμα WE, το οποίο λαμβάνεται με λυοφιλοποίηση.

Ως WE, θα αναφέρεται το εκχύλισμα που έχει για διαλύτη νερό/ αιθανόλη(50:50) ενώ EtOAc με τον οξικό αιθυλεστέρα.

3.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του Σιδερίτη από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου.

Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

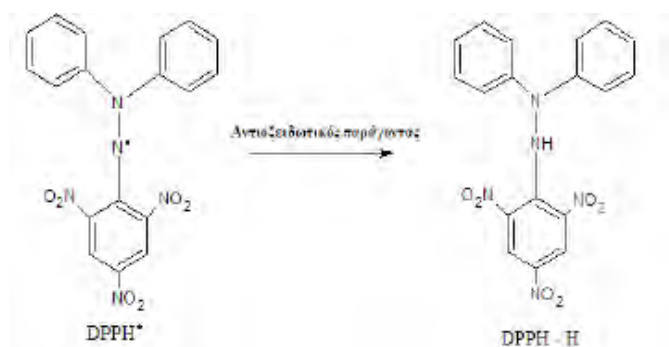
Πίνακας 4. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων (Folin-Ciocalteu)

	Τυφλό	Αρνητικό κοντρόλ	Δείγμα με εκχύλισμα
H ₂ O	1.020μl	1.100 μl	1.000 μl
F-C	100μl	-	100μl
εκχύλισμα	-	20μl	20μl
	Επάωση 3' στο σκοτάδι		
Na ₂ CO ₃	280 μl	280 μl	280 μl
H ₂ O	600 μl	600 μl	600 μl

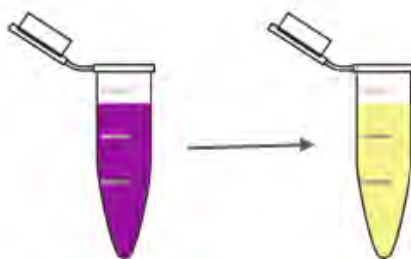
Αφού έχουν προστεθεί όλα τα διαλύματα, ακολουθεί μία ώρα επάωση στο σκοτάδι και ύστερα μέτρηση των απορροφήσεων στα 765 nm.

3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας αναγωγής της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2- πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου. Η DPPH• είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε ρίζα 1,1 διφαινυλ-2- πικρυλυδραζύλιο ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 .Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο(Εικόνα 14), μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm.



Εικόνα 13 .Χημική δομή ένωσης DPPH• και DPPH-H



Εικόνα 14. Μεταβολή χρώματος λόγω προσθήκης αντιοξειδωτικού.

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου προσθέτουμε σε tube 1,5ml με τη σειρά που λέει ο πίνακας τα παρακάτω :

Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων (DPPH)

	Τυφλό	Control	Δείγματα με εκχύλισμα
Εκχύλισμα	-	-	50 μl
Μεθανόλη	1.000 μl	950 μl	900 μl
DPPH•	-	50 μl	50 μl
Ντελ	1 ml	1 ml	1 ml

Τέλος, ετοιμάζουμε κάποιες ακόμα αντιδράσεις για να δούμε την απορρόφηση της ουσίας.

Πίνακας 6. Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (DPPH)

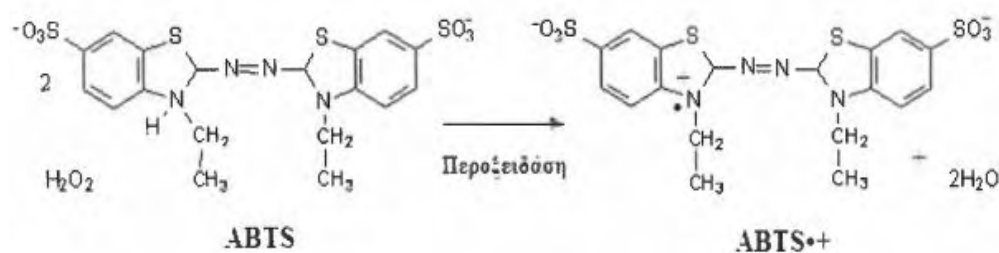
	Δείγματα με εκχύλισμα
Εκχύλισμα	50 μl
Μεθανόλη	950 μl
Ντελ	1 ml

Η %-αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• υπολογίζεται ως εξής:

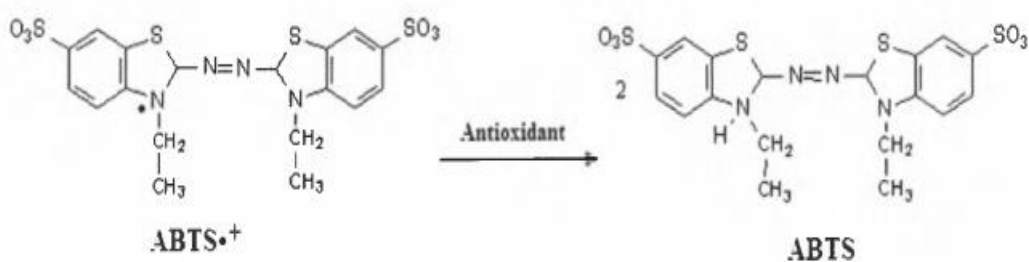
$\% \text{-αναστολή} = (\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση control} \times 100.$

3.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητα δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}

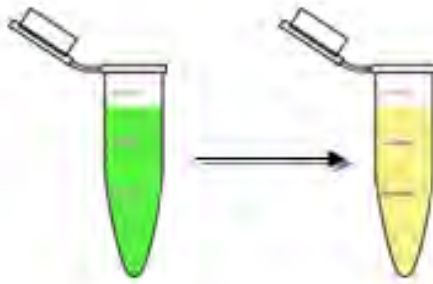
Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η δραστική ρίζα ABTS^{•+} παράγεται από το ABTS μέσω του ενζύμου περοξειδάση (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Εικόνα 15). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Προκειμένου να εκτιμήσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας πρέπει πρώτα να σχηματίσουμε την τεχνητή αυτή ρίζα. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm. (Εικόνα 17)



Εικόνα 15. Παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O



Εικόνα 16. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα ABTS^{•+}



Εικόνα 17. Μεταβολή χρώματος λόγω προσθήκης αντιοξειδωτικού.

Πίνακας 7. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων (Μέθοδος ABTS•+)

	Τυφλό	Control	Δείγματα με εκχύλισμα
H ₂ O	450 μl	400 μl	400μl
ABTS	500μl	500μl	500μl
H ₂ O ₂	50μl	50μl	50μl
HRP	-	50μl	50μl
Ντελ	1 ml	1 ml	1 ml
Εκχύλισμα	-	-	50μl

Τέλος, κάνουμε κάποιες ακόμα αντιδράσεις για να δούμε την απορρόφηση της ουσίας.

Πίνακας 8. Προσθήκη διαλυμάτων καμπύλης ουσίας (Μέθοδος ABTS•+)

	Δείγματα με εκχύλισμα
H ₂ O	450 μl
ABTS	500 μl
H ₂ O ₂	50 μl
Ντελ	1 ml
Εκχύλισμα	50 μl

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

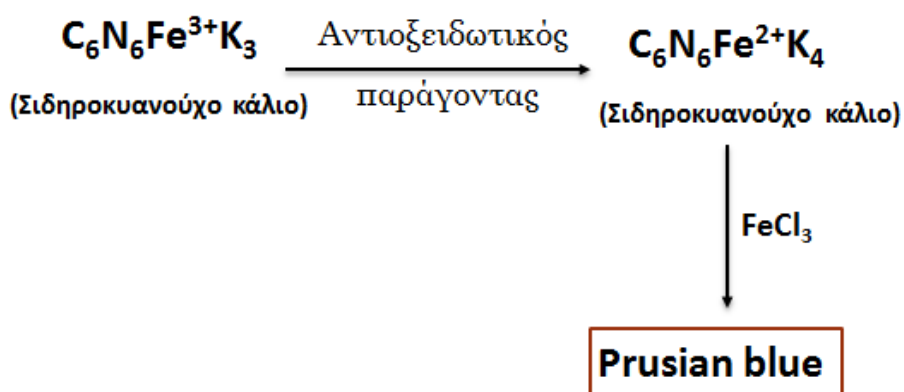
$\%RSC = [(\text{Απορρόφηση control} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση Control}] \times 100$

3.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων με την μέθοδο reducing power

Η αναγωγική δύναμη σχετίζεται με την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιας ουσίας και αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης. Όταν μία ένωση έχει ισχυρή αναγωγική δύναμη, υποδεικνύει ότι είναι δότης ηλεκτρονίων και μπορεί να ανάγει τα οξειδωμένα παράγωγα μόρια των διαδικασιών υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Το κίτρινο χρώμα του διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε ουσίας που μελετάται. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe^{3+} / σιδηροκυανιούχου, που χρησιμοποιείται στην ανηγμένη μορφή Fe^{2+} . Με την μέτρηση της έντασης του κυανού χρώματος στα 700 nm, προσδιορίζεται και η συγκέντρωση του ιόντος Fe^{3+} .

Αρχή της μεθόδου

Οι ουσίες οι οποίες εμφανίζουν αναγωγική δύναμη, αντιδρούν με σιδηροκυανούχο κάλιο (Fe^{3+}) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανούχο κάλιο (Fe^{2+}), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο και το μετατρέπει σε ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) που παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης 700nm.



Εικόνα 18. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικού (Reducing power)

Πίνακας 9. Σειρά και ποσότητα προσθήκης διαλυμάτων (Προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης)

	Τυφλό	Control	Δείγματα με εκχύλισμα
Εκχύλισμα*	-	-	250 μl
Phosphate buffer(0,2M, pH=6,6)	500 μl	250 μl	-
Potassium ferricyanide	-	250 μl	250 μl
<i>Επώαση στους 50°C για 20 λεπτά και μετά 2' κατάψυξη</i>			
TCA	250 μl	250 μl	250 μl
<i>Φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 10 λεπτά</i>			
dH ₂ O	250 μl	250 μl	250 μl
Ferric chloride	50 μl	50 μl	50 μl
Ντελ	1.050 μl	1.050 μl	1.050 μl

Τέλος, κάνουμε κάποιες ακόμα αντιδράσεις για να δούμε την απορρόφηση της ουσίας χωρίς την παρουσία του Potassium ferricyanide.

Πίνακας 10. Προσθήκη διαλυμάτων καμπύλης ουσίας(Προσδιορισμός αναγωγικής δύναμης)

	Δείγματα με εκχύλισμα
Εκχύλισμα *	250 μl
<i>Επώαση στους 50°C για 20 λεπτά και μετά 2' κατάψυξη</i>	
TCA	250 μl
<i>Φυγοκέντρηση στα 3.000 rpm για 10 λεπτά</i>	
dH ₂ O	250 μl
Ferric chloride	50 μl
Ντελ	1.050 μl

* Οι αραιώσεις του εκχυλίσματος έγιναν σε Phosphate buffer(0,2M, pH=6,6)

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που δίνει απορρόφηση ίση με 0,5 AU στα 700nm.

3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK⁺ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* , στα οποία υπήρχε μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK⁺).

Αρχικά, προσθέτουμε σε 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 μg/mL αμπικιλίνη) μια μικρή ποσότητα από τα βακτήρια .Αφού αναπτύχθηκε

αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια επωάζεται σε κλίβανο στους 37 °C με ανάδευση για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά στα 2057 g σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (εικόνα 16) και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυτοποίηση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 (εικόνα 16) και αναδεύονται αργά 4-5 φορές. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές προστίθενται 6 mL διαλύματος 3 (Εικόνα 19). Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 3214 g σε θερμοκρασία 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Διάλυμα 1	50 mM γλυκόζη 25 mM Tris-Cl, pH=8 10 mM EDTA, pH 8
Διάλυμα 2	0,2 N NaOH, 1% SDS
Διάλυμα 3	100 mL 5 M οξικό κάλιο C2H3O2K 11,5 mL οξικού οξέος

Εικόνα 19. Διαλύματα για την απομόνωση πλασμιδίου

Έπειτα, στο υπερκείμενο συλλέγεται και προστίθεται διάλυμα προπανόλης σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 λεπτά στα 3214 g σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφού στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, ένζυμο RNase 10 µg/mL).

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL ($1OD_{260} \rightarrow 50$

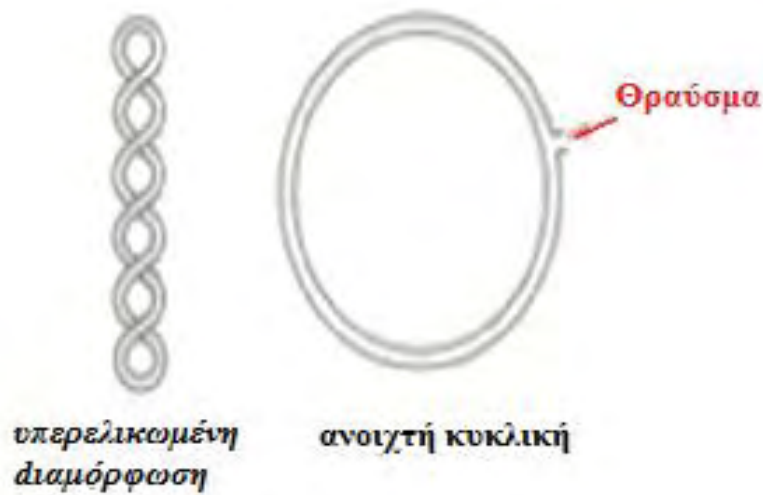
μg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή.

Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται με βρωμιούχο αιθιδίο και ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 . Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

3.7 Επαγόμενη από ρίζες Περοξύλιου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραύσματος σε πλασμιδιακό DNA

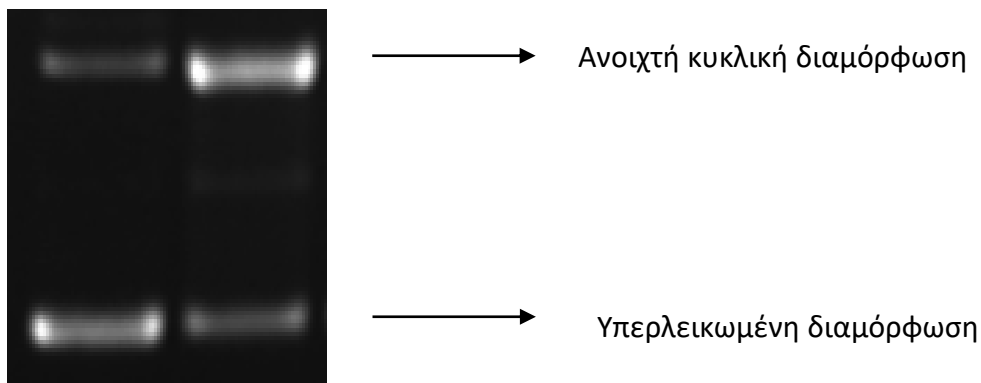
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για παρατήρηση της προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται στο ότι το πλασμιδιακό DNA έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του. Οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA είναι:

1. Η **υπερελικωμένη διαμόρφωση** (Supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
2. Η **ανοιχτή κυκλική** (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα θραύσματα από παράγοντες, όπως οι ελεύθερες ρίζες .
3. Η **γραμμική διαμόρφωση** (Linear conformation) η οποία δημιουργείται όταν φέρει δίκλινα θραύσματα.



Εικόνα 20. Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA

Όταν η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA είναι μικρότερη διαπερνά πιο γρήγορα τους πόρους της αгарόζης. Επομένως, η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική όπως φαίνεται και στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21. Πήκτωμα αγαρόζης

Για την μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήσαμε gel αγαρόζης 0,8% . Επίσης, προηγουμένως έχουμε σταντάρει τη συγκέντρωση της ρίζας μας κόβει το πλασμιδιακό DNA.

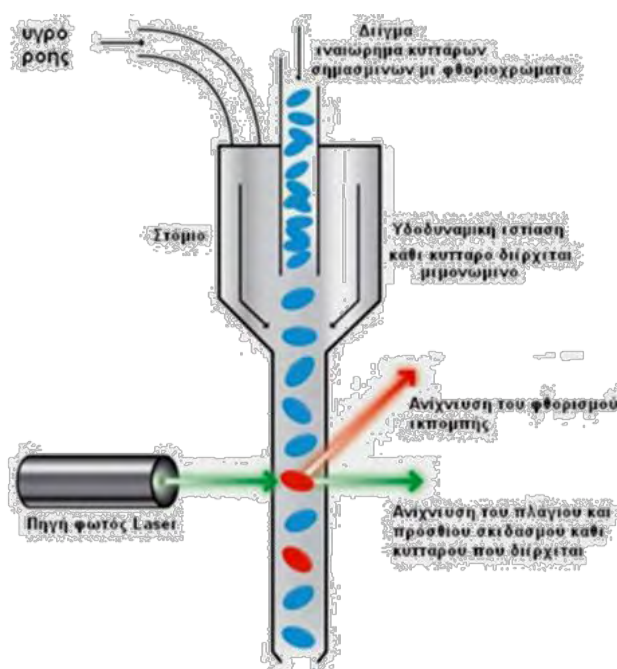
Για την διεξαγωγή του πειράματος ετοιμάζουμε τις παρακάτω αντιδράσεις:

Πίνακας 11. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων(μέθοδος χαλάρωσης πλαμιδιακού DNA)

	Control (-)	AAPH (+)	Δείγματα με το εκχύλισμα	Δείγμα max
PBS	8 μl	4 μl	1 μl	5 μl
Εκχύλισμα	-	-	3 μl	3 μl
DNA	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
AAPH	-	4 μl	4 μl	-
Υτελ	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

- ✓ Στη συνέχεια αναδεύουμε καλά (spin – vortex –spin) και τα βάζουμε για επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 45 λεπτά
- ✓ Προσθέτουμε 3 μl loading buffer και ξανακάνουμε ανάδευση (spin- vortex – spin)
- ✓ Φορτώνουμε τις αντιδράσεις στα πηγαδάκια του πηκτώματος και βάζουμε ηλεκτροφόρηση 100V για 1 h
- ✓ Ύστερα ακολουθεί η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο

3.8 Κυτταροκαλλιέργια – Κυτταρομετρία ροής



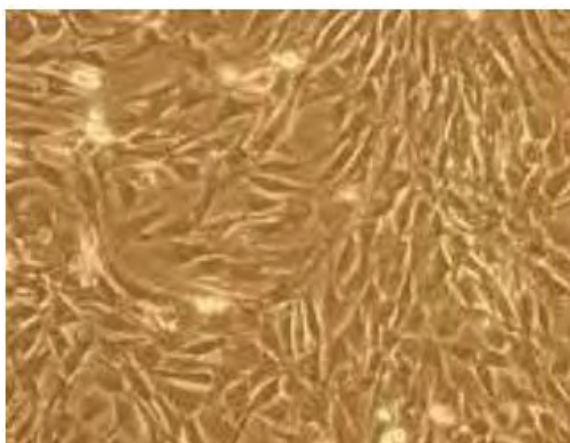
Η μέθοδος της κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη κυτταρική ανάλυση που δίνει την δυνατότητα μέτρησης μεμονωμένων σωματιδίων όπως διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Η εμπρόσθια σκέδαση (Forward Scattering) "FSC" σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση (Side Scattering) "SSC" εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα των

Εικόνα 22. Αναπαράσταση κυτταρομετρία ροής

σωματιδίων.

3.8.1 Κυτταρική σειρά C2C12

Η κυτταρική γραμμή C2C12 είναι μια αθάνατη γραμμή σκελετικών μυοβλαστών



ποντικού που προέκυψαν από αρχικά δορυφορικά κύτταρα από τον μυϊκό μηρό ενός θηλυκού δότη ποντικού C3H ηλικίας δύο μηνών 70 ώρες μετά από ένα τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται καλά σε μυοκύτταρα υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Ενώ, αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

Εικόνα 23. Κύτταρα C2C12 σε οπτικό μικροσκόπιο

3.8.2 Καλλιέργεια κυττάρων

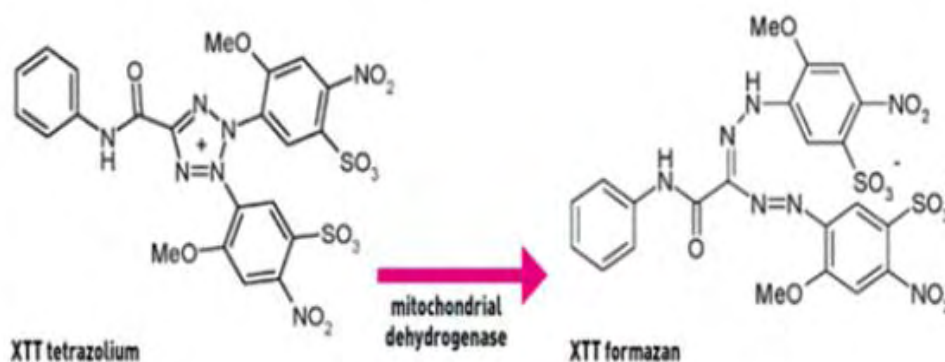
Τα κύτταρα αναπύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό 5 ml DMEM, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ ήταν 5%.

Όταν καλυφθεί το 70-80% της φλάσκας με κύτταρα τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια, με αφαίρεση θρεπτικού υλικού και ξέπλυμα με 1 ml PBS, αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μl τρυψίνης. Ακολουθεί επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης. Έπειτα προσθέτουμε 2 ml θρεπτικού ώστε να απενεργοποιήσουμε την θρυψίνη και στη συνέχεια προσθήκη 500μl των αποκολλημένων κυττάρων σε νέα φλάσκα 25cm² με 5ml θρεπτικό υλικό με 10% FBS.

Όλες οι δοκιμασίες με τα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής με φως και αέρα. Πριν τη διεξαγωγή του πειράματος, είναι απαραίτητη η χρήση UV για μισή ώρα για αποστείρωση. Ό,τι εισέρχεται στον θάλαμο πρέπει να είναι αποστειρωμένο και καθαρίζεται με αιθανόλη 70%v/v.

3.8.3 Δοκιμασία ΧΤΤ

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε προκειμένου να εντοπίσουμε τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί κυτταροτοξικότητα στην κυτταρική μας σειρά. Κυτταροτοξική ορίζουμε εκείνη τη συγκέντρωση στην οποία έχουμε πάνω από 20% θνησιμότητα των κυττάρων. Η μέθοδος ΧΤΤ αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμασία όπου ποσοτικοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων και βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος ΧΤΤ προς την αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες μόνο των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη απαντάτε με πορτοκαλί χρώμα και μέγιστο απορρόφησης της στα 450 nm. Η τοξική επίδραση κάποιου εκχυλίσματος φαίνεται με μείωση της παρατηρούμενης απορρόφησης.

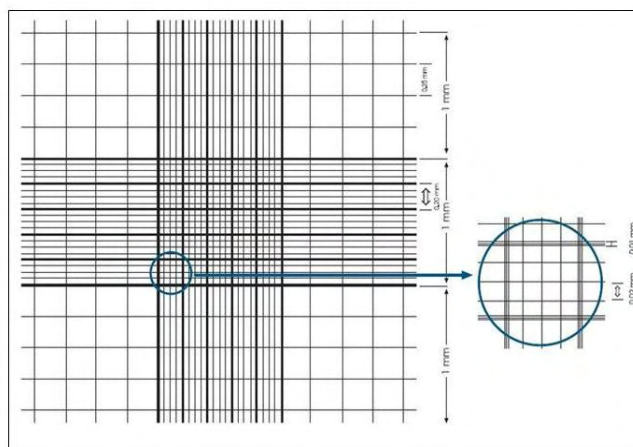


Εικόνα 24.Μετατροπή ΧΤΤ στην αντίστοιχη φορμαζάνη.

Πειραματικό μέρος

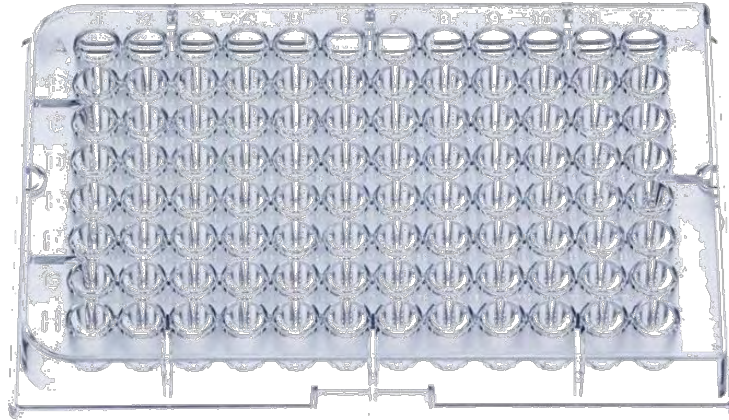
Στην πρώτη φάση τα κύτταρα απομακρύνονται από τη φλάσκα μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης. Ακολουθεί μέτρηση τους σε πλάκα Neubauer και υπολογίσαμε για να δούμε πόσα μl να βάλουμε σε κάθε πηγαδάκι στην πλάκα 96 θέσεων ώστε να έχουμε όπου 10.000 κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι. Βάζουμε 10 μl κυττάρων ύστερα από αραιώση με θρεπτικό στην πλάκα στο μικροσκόπιο. Πιο συγκεκριμένα, μετράμε τα κύτταρα στο κεντρικό τετράγωνο και στα τέσσερα γωνιακά (Εικόνα 25). Βγάζουμε τον μέσο όρο (M) και κάνουμε τους εξής υπολογισμούς: $M \times 25.000 = A$.

Και την ποσότητα που θέλω σε κάθε πηγαδάκι σε μl $= 10.000.000/A$



Εικόνα 25. Μέτρηση σε πλάκα Neubauer

Έπειτα προσθέτουμε τα κύτταρα στην πλάκα 96 θέσεων και συμπληρώνουμε με 150μl θρεπτικό με FBS και επωάζονται στον κλίβανο για 24 ώρες στους 37°C. Ύστερα , αντικαταστούμε το θρεπτικό υλικό με θρεπτικό υλικό που περιέχει αντί για FBS τις διάφορες συγκεντρώσεις του Sideritis sirylea και επωάζονται για άλλες 24ώρες στον κλίβανο στους 37°C. Το FBS δεν το χορηγούμε μαζί με το εκχύλισμα καθώς μπορεί να αλληλοεπιδράσουν και να χαθεί η δραστηκότητα τους. Στην τελευταία φάση προστίθεται το αντιδραστήριο ΧΤΤ, ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 37°C σε κλίβανο και φωτομέτρηση τόσο στα 450 όσο και στα 630 nm σε ELISA plate reader και με την βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας Gene5. Η μέτρηση που πραγματοποιείται στα 630 nm γίνεται με σκοπό την κανονικοποίηση των τιμών μεταξύ από τα πηγαδάκια της πλάκα. Να προσθέσουμε ότι η φορμαζάνη δεν απορροφά στα 630nm. Οι τιμές που εξήχθησαν στα 630 nm αφαιρέθηκαν από τις απορροφήσεις των τιμών στα 450 nm. Σε κάθε πλάκα 96-θέσεων υπήρχαν και μάρτυρες όπου δεν προστέθηκε εκχύλισμα στα κύτταρα, ενώ σε κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος περιλαμβανόταν και το αντίστοιχο τυφλό, το οποίο δεν περιείχε κύτταρα αλλά μόνο θρεπτικό προκειμένου να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που οφείλεται στο εκχύλισμα και το θρεπτικό.



Εικόνα 26. Πλάκα 96 θέσεων

Η %-βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = [(\text{Abs μάρτυρα} - \text{Abs Δείγματος}) / \text{Abs μάρτυρα}] \times 100\%$$

Abs μάρτυρα: Η οπτική απορρόφηση του μάρτυρα

Abs δείγματος: Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

3.8.4 Προσδιορισμός επιπέδων GSH με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα έπειτα από την χορήγηση των εκχυλισμάτων έγινε με την βοήθεια της χρωστικής mercury orange, η οποία συνδέεται κατευθείαν στην GSH. Τα κύτταρα απομακρύνονται από την φλάσκα και μετά από μία σειρά φυγοκεντρήσεων και πλύσεων επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και χορηγούνται 10μM mercuryorange ενώ ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 30 min. Στην συνέχεια ακολουθεί νέα πλύση, φυγοκέντρηση (300 g, 5 min, 4°C) και επαναδιάλυτοποίηση του ιζήματος με PBS. Τέλος, έγινε μέτρηση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScalibur .

Τα FSC, SSC προσδιορίστηκαν και καθόρισαν το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των κυττάρων αντίστοιχα. Συνολικά μετρήθηκαν 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα, ενώ η ένταση του φθορισμού της χρωστικής υπολογίστηκε σε λογαριθμική κλίμακα με τη χρήση του λογισμικού BD Cell Quest.

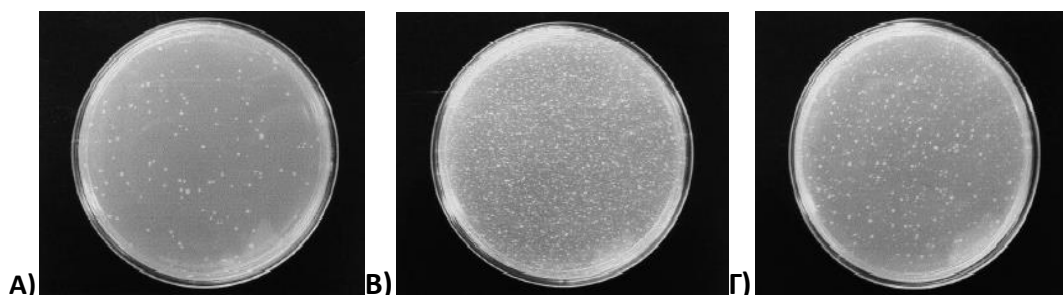
3.7.5 Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής

Ακολουθούνται τα ίδια βήματα μόνο που χρησιμοποιείται διαφορετική χρωστική. Η μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου έγινε με την βοήθεια της χρωστικής DCF-DA, η οποία αρχικά αποακετυλιώνεται μέσω ενδογενών εστερασών και μετέπειτα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF.

3.9 Τεστ του Ames

Το τεστ του Ames είναι μία ευαίσθητη και αξιόπιστη τεχνική που μπορεί να ανιχνεύσει χημικές ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση διαφόρων στελεχών *Salmonella typhimurium* τα οποία είναι αυξότροφα ιστιδίνης, δηλαδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη, γιατί καθένα από αυτά τα στελέχη φέρει μεταλλάξεις σε γονίδια του οπερονίου που κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση της ιστιδίνης. Εάν τα στελέχη αυτά καλλιεργηθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ίχνη ιστιδίνης, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις να συμβούν ανάστροφες ή οπισθόδρομες μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν ως συνέπεια τα γονίδια να ανακτήσουν την αρχική τους λειτουργία.

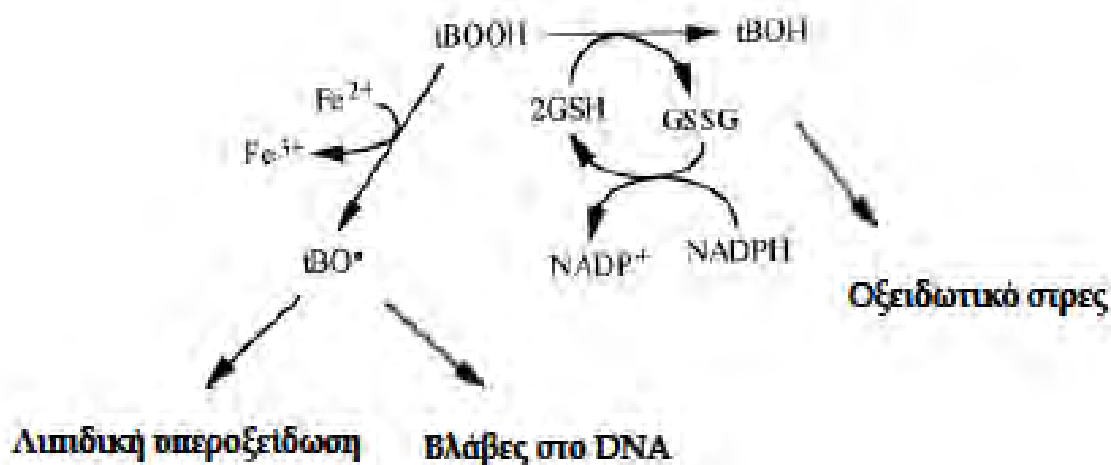
Μόνο τα βακτήρια στα οποία έχουν συμβεί μεταλλάξεις έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν αποικίες. Ο αριθμός των επαναμεταλλαγμένων αποικιών που σχηματίζονται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων είναι σταθερός για κάθε στέλεχος *S. typhimurium*. Εάν μία μεταλλαξιγόνο ουσία προστεθεί στο θρεπτικό υλικό, τότε θα προκληθεί αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με τα τριβλία στα οποία δεν έχει προστεθεί η μεταλλαξιγόνο ουσία.



Εικόνα 27. Τριβλία με αποικίες *Salmonella* στο τεστ του Ames A) Control B) Τριβλία με μεταλλαξιγόνο παράγοντα Γ) Τριβλία με μεταλλαξιγόνο παράγοντα και αντιοξειδωτικό

Στο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102 το οποίο είναι ευαίσθητο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η μετάλλαξη που υπάρχει στο στέλεχος αυτό είναι στο οπερόνιο της ιστιδίνης και συγκεκριμένα η hisG428, η οποία είναι μία μετάλλαξη τερματισμού (TAA). Η μετάλλαξη βρίσκεται σε πλασμίδιο (pAQ1) που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στα κύτταρα TA102 έτσι ώστε να αυξηθούν οι πιθανές θέσεις ανάστροφων μεταλλάξεων. Ακόμα το πλασμίδιο pAQ1 προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ανίχνευση του. Επιπλέον, το στέλεχος TA102 φέρει τη μετάλλαξη gfa που έχει ως συνέπεια το σχηματισμό ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα αυτό να είναι διαπερατό σε χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Τέλος, διαθέτει το πλασμίδιο pKM101 το οποίο έχει την ικανότητα να αυξάνει τις προκαλούμενες από χημικές ενώσεις και υπεριώδη ακτινοβολία μεταλλάξεις καθώς ενισχύει τον επιδιορθωτικό μηχανισμό βλαβών στο DNA που είναι επιρρεπής σε λάθη.

Το τεστ του Ames μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση αντιμεταλλαξιγόνων ουσιών, δηλαδή ουσιών που προστατεύουν το DNA από βλάβες. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του μεταλλαξιγόνου παράγοντα (t-BOOH). Το οργανικό υδροπεροξειδίο t-BOOH είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας. Ο παράγοντας αυτός εξαντλεί τα ενδογενή επίπεδα GSH μέσω του μηχανισμού της GPx ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} , δημιουργώντας ρίζες t-BO $^{\bullet}$. Οι δυο αυτοί μηχανισμοί συνδέονται με την οξείδωση κυτταρικών μακρομορίων.



Εικόνα 28. Μηχανισμός δράσης tBOOH

Η συγκέντρωση t-BOOH που επιλέχθηκε ήταν αυτή που διπλασιάζει τις αποικίες που παρατηρήσαμε. Παράλληλα, χορηγήθηκαν εκχυλίσματα του *Sideritis siphylea* σε

διάφορες συγκεντρώσεις για να δούμε αν και πόσο τα εκχυλίσματα αυτά εμφανίζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

3.8.1 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης του *Sideritis siplyea*

Το πρώτο βήμα είναι η μόλυνση του θρεπτικού υλικού (Nutrient Broth) με το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 . Στη συνέχεια επωάζεται στους 37°C για περίπου δυο μιση ώρες μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 540nm να φτάσει το 0.1-0.2 το οποίο αντιστοιχεί σε $1-2 \times 10^9$ αποικίες ανά mL, και επομένως γνωρίζουμε ότι η καλλιέργεια είναι στην εκθετική φάση αύξησης της.

Εφόσον έχουμε ετοιμάσει και αποστειρώσει το Top Agar (NaCl, Agar & ίχνη ιστιδίνης) αρχίζουμε το πείραμα μας σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 45°C ώστε να μην πήξει το άγαρ. Στον πίνακα παρατίθενται η σειρά και οι ποσότητες.

Πίνακας 12. Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων (Τεστ του Ames)

	Control	Control- tart	Δείγματα με το εκχύλισμα	Δείγμα με την μέγιστη C εκχυλίσματος
Top Agar	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
H ₂ O	100 μl	50 μl	-	50 μl
εκχύλισμα	-	-	50 μl	50 μl
tert	-	50 μl	50 μl	-
βακτήρια	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
Ντελ	2.200 μl	2.200 μl	2.200 μl	2.200 μl

Στη συνέχεια κάνουμε επίστρωση σε τριβλία που έχουν θρεπτικό υπόστρωμα Glucose Minimal άγαρ (περιέχει γλυκόζη, MgSO₄, κιτρικό οξύ, K₂HPO₄ και Na₂NH₂PO₄, Agar και dH₂O). Τα τριβλία επωάζονται για 48h στον κλίβανο στους 37°C. Τέλος, μετράμε τις αποικίες.

3.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε για κάθε εκχύλισμα *Sideritis siplyea* με βάση το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του *t*-BOOH από τα εκχυλίσματα υπολογίστηκε από τον αριθμό των αποικιών για κάθε τριβλίο σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή} = [(A_{\theta} - A_{\delta}) / (A_{\theta} - A_0)] \times 100\%$$

Όπου:

A θ : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τρυβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και t-BOOH).

A δ : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τρυβλίο παρουσία του εκχυλίσματος ανθέων ελιάς (TA102, εκχύλισμα ανθέων και t-BOOH).

A $_0$: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τρυβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

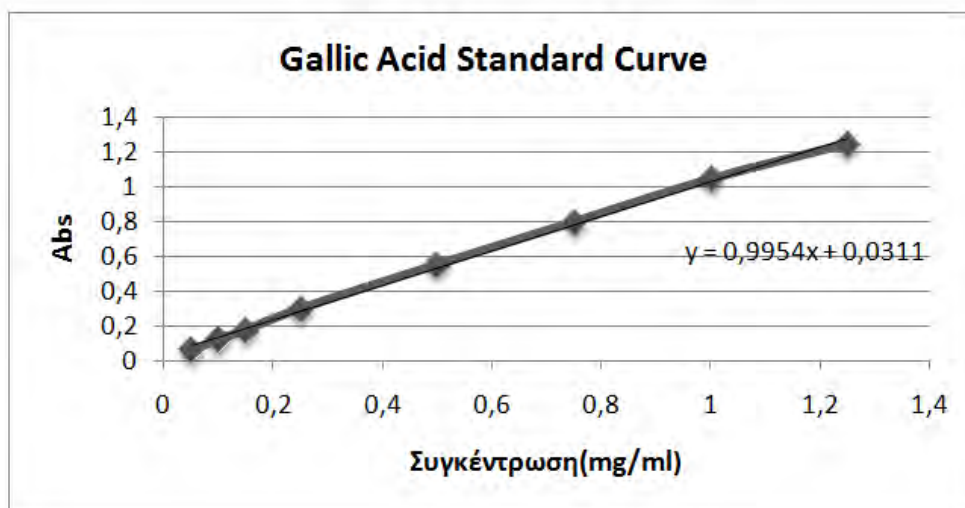
3.9 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) και μέσω μονόδρομης ανάλυσης (One-Way Anova) και το Dunnett test, έγιναν οι συγκρίσεις κατά ζεύγη. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως \pm standard error of the means (SEM).

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η εκτίμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται γραφικά η πρότυπη καμπύλη που ακολουθεί μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος.



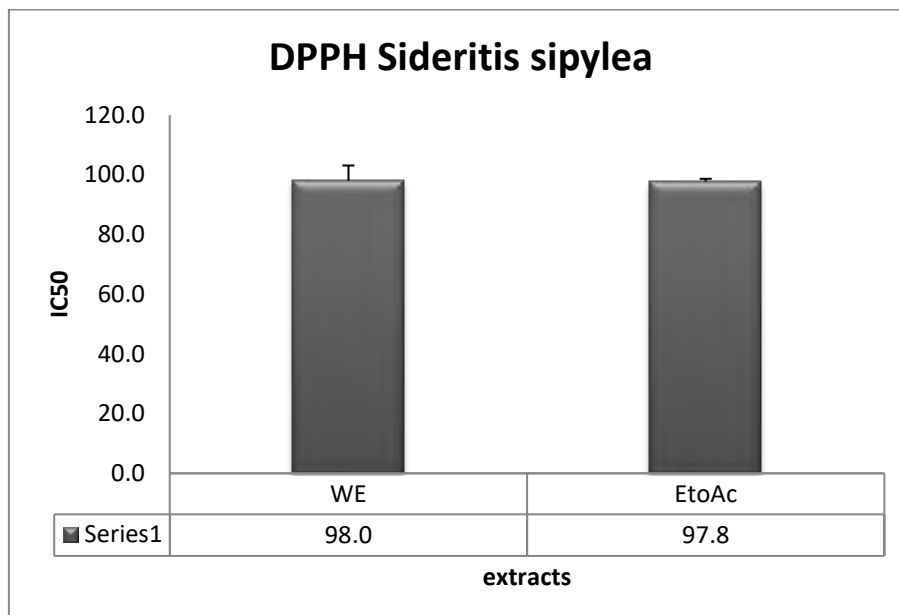
Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη Γαλλικού οξέος

WE: 0,54 mg/ml πολυφαινόλες

EtoAc: 0,41 mg/ml πολυφαινόλες

4.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμησης της ρίζας DPPH

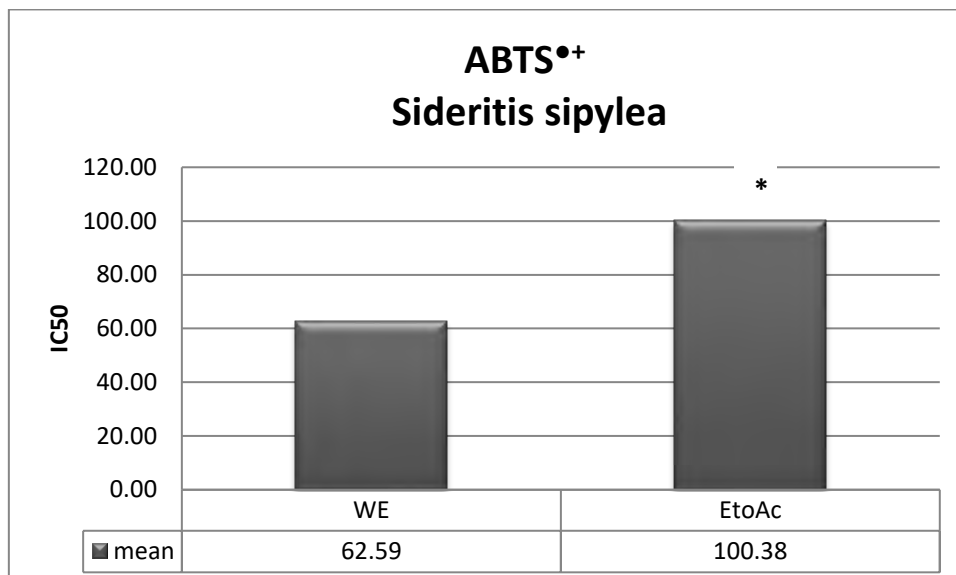
Με τη μέθοδο DPPH, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο εκχυλισμάτων *Sideritis siryalea*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα, έδειξαν πως τα δύο εκχυλίσματα εμφανίζουν το IC50 στις συγκεντρώσεις 98,0 και 97,8 μg , τιμές πολύ κοντά και χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Επομένως, από αυτήν την μέθοδο φαίνεται να έχουν την ίδια δραστηριότητα.



Διάγραμμα 2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμησης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM (n=2).

4.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμησης της ρίζας ABTS^{•+}

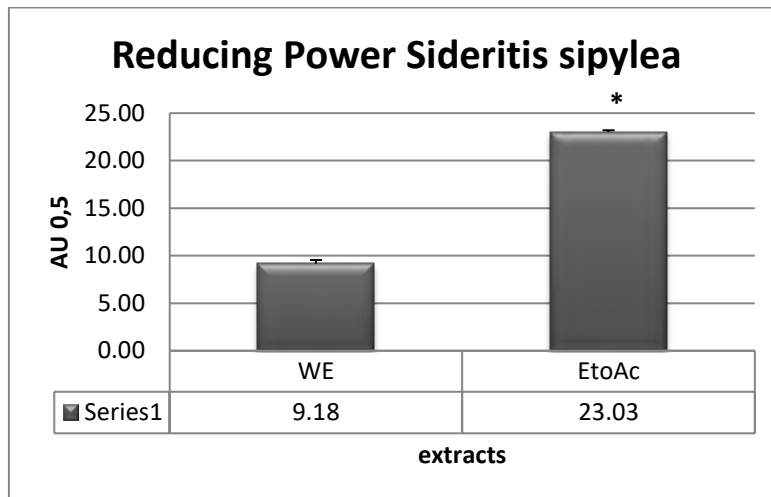
Με τη μέθοδο ABTS^{•+}, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δύο πολυφαινολικών εκχυλισμάτων *Sideritis sipylea*. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Σύμφωνα με το διάγραμμα, το WE φαίνεται να είναι πιο δραστήσιος καθώς εμφανίζει IC50 στα 62,59 μ g ενώ το EtoAc στα 100,38 μ g. Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμησης της ρίζας ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM(n=2) * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων (p<0,05)

4.4 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων με την μέθοδο reducing power

Με την μέθοδο reducing power, προσδιορίζεται η αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων του Sideriti Sipylea. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως Reducing power 0,5 AU, δηλαδή στη συγκέντρωση στην οποία θα έχει απορρόφηση 0,5 AU. Όσο μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη έχει ένα εκχύλισμα τόσο πιο δραστικό θεωρείται. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το WE έχει στατικώς σημαντική μεγαλύτερη αναγωγική δύναμη αφού είχε απορρόφηση 0,5 AU στα 9,18 μ g εκχυλίσματος ενώ το EtoAC στα 23,03 μ g εκχυλίσματος.

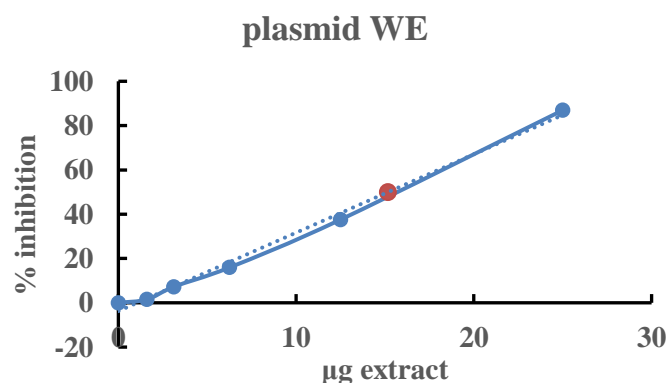


Διάγραμμα 4. Μέτρηση αναγωγικής δύναμης μέσω της μεθόδου Reducing power. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM(n=2). * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών IC50 των δύο εκχυλισμάτων ($p < 0,05$)

4.5 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO^{\bullet}) πρόκληση μονόκλωνων θραύσματος σε πλασμιδιακό DNA - μέθοδος χαλάρωσης πλαμιδιακού DNA

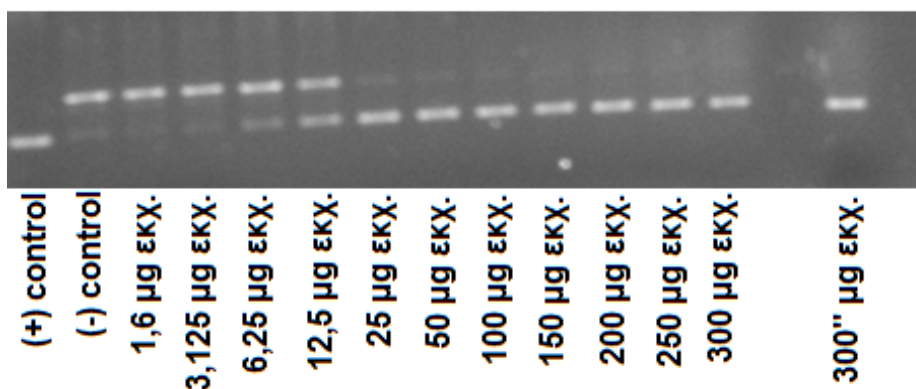
Με την μέθοδο αυτή, προσδιορίσαμε την ικανότητα των δύο εκχυλισμάτων Sideriti, να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO^{\bullet} . Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$), μεγαλύτερη ικανότητα του WE να προστατεύει το DNA από θραύσεις καθώς εμφάνισε IC50 στα 15μg εκχυλίσματος, σε σύγκριση με το EtoAc, το οποίο εμφάνισε IC50 στα 29 μg εκχυλίσματος.

Εκχύλισμα WE



Εικόνα 29. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. WE, IC50:15 μg εκχυλίσματος Τα αποτελέσματα

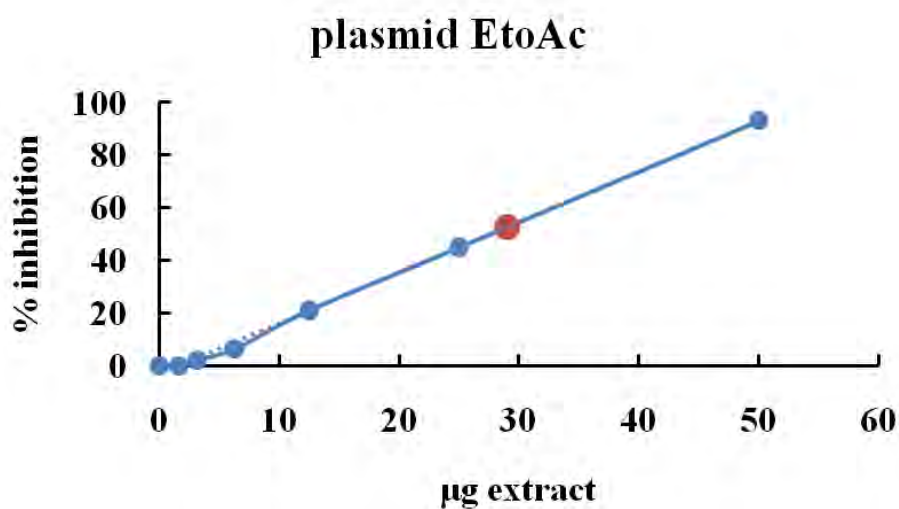
εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).



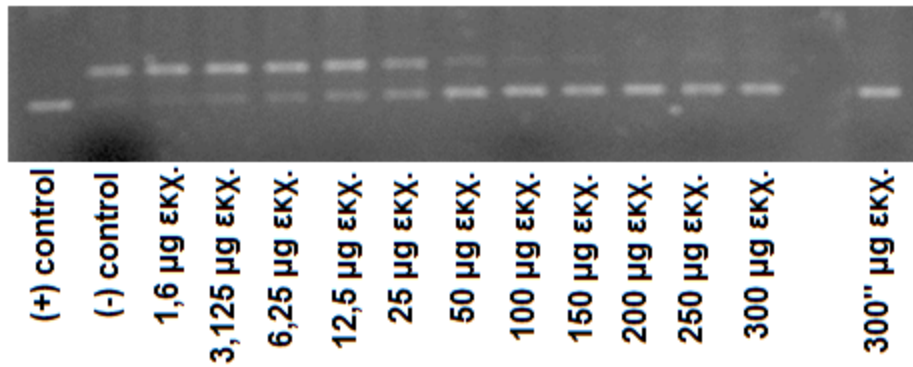
Εικόνα 30. Πηκτή ηλεκτροφόρησης WE

[

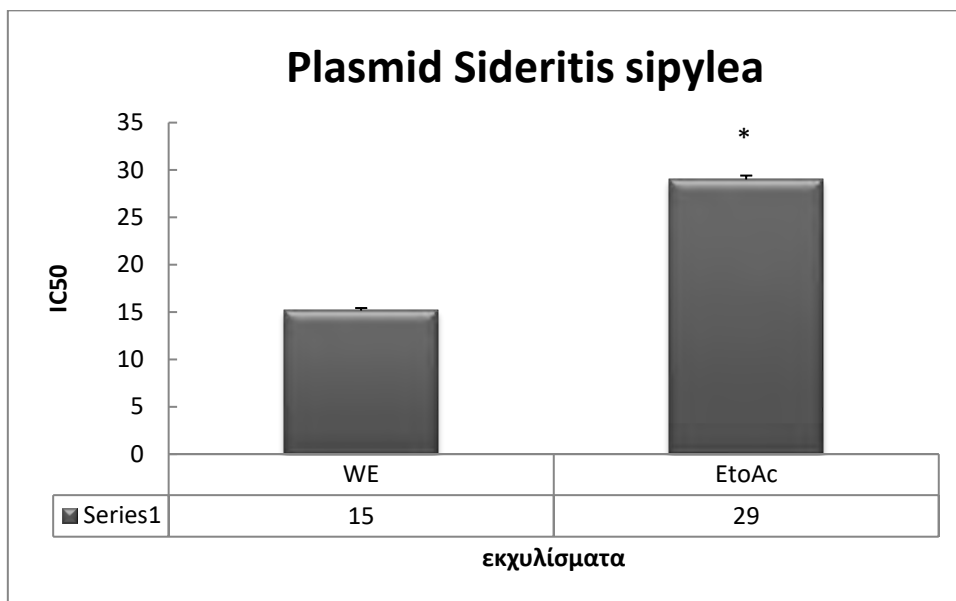
Εκχύλισμα EtoAc



Εικόνα 31. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. EtoAc, IC₅₀:29 μg εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3).



Εικόνα 32. Πηκτή ηλεκτροφόρησης EtoAc



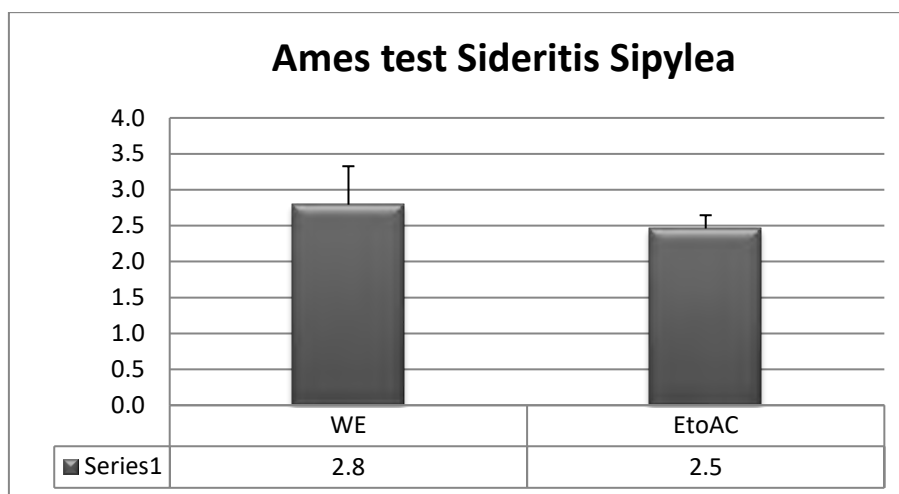
Διάγραμμα 5. Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50 και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων.

4.6 Τεστ του Ames

Με το τεστ του Ames, έγινε η μέτρηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων Sideritis, έναντι του μεταλλαξιγόνου παράγοντα tert-BOOH σε στελέχη Salmonella Typhimurium TA102.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε µg/plate, που απαιτείται για την εξουδετέρωση της μεταλλαξιγένεσης στο 50%.

Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δύο εκχυλίσματα Sideritis είχαν ισότιμη αντιμεταλλαξιγόνο δράση μεταξύ τους, χωρίς κάποια σημαντική στατική διαφορά. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε το IC50 του WE και EtoAc να είναι στα 2,5 και 2,8 μg εκχυλίσματος αντίστοιχα.



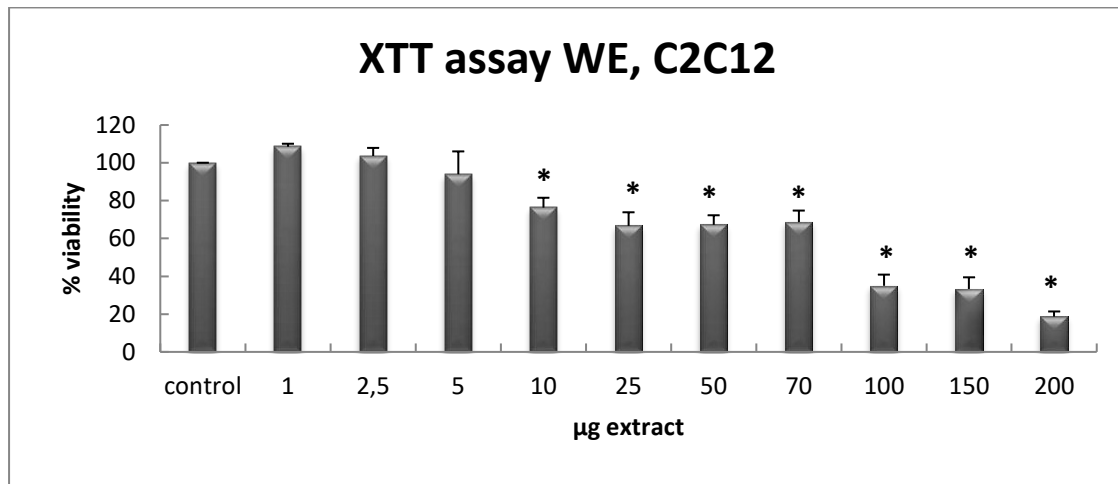
Διάγραμμα 6. Προσδιορισμός αντιγενοτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων Sideriti με το τεστ του Ames. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Η διαφορά δεν είναι στατικά σημαντική

4.7 Κυτταροκαλλιέργειες

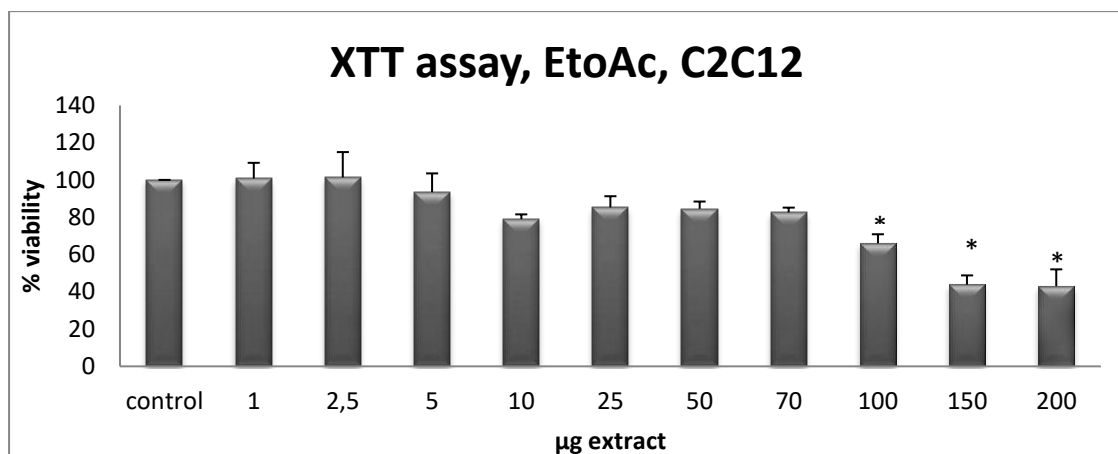
4.7.1 ΧΤΤ

Προσδιορίσαμε τις κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις μέσω της μεθόδου ΧΤΤ προκειμένου να μην χρησιμοποιήσουμε τοξικές συγκεντρώσεις για τα κύτταρα μας στα μετέπειτα πειράματα. Οι συγκεντρώσεις τις οποίες χρησιμοποιήσαμε ήταν στο εύρος 1-200 μg εκχυλίσματος και πιο αναλυτικά φαίνονται στα Διαγράμματα 7 και 8.

Όπως φαίνεται και από τα Διαγράμματα, η κυτταροτοξική συγκέντρωση για το WE είναι στα 10 μg εκχυλίσματος (Διάγραμμα 7). Ενώ στο το EtoAC τα κύτταρα φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη ανοχή και παρατηρείται 20% θνησιμότητα σε 100 μg εκχυλίσματος (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος WE στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=6$). * $p<0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.

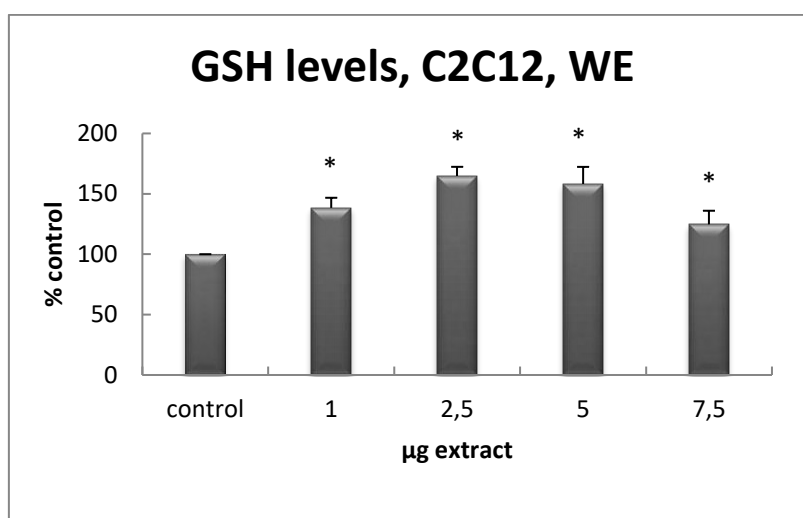


Διάγραμμα 8. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος EtoAc στην κυτταρική σειρά C2C12, έπειτα από 24 ώρες χορήγησης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$, ($n=6$). * $p<0,05$ στατιστική σημαντικότητα σε συγκριτικά με το control.

4.7.2 Αποτίμηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων Sideriti στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό των κυττάρων μέσω κυτταρομετρία ροής

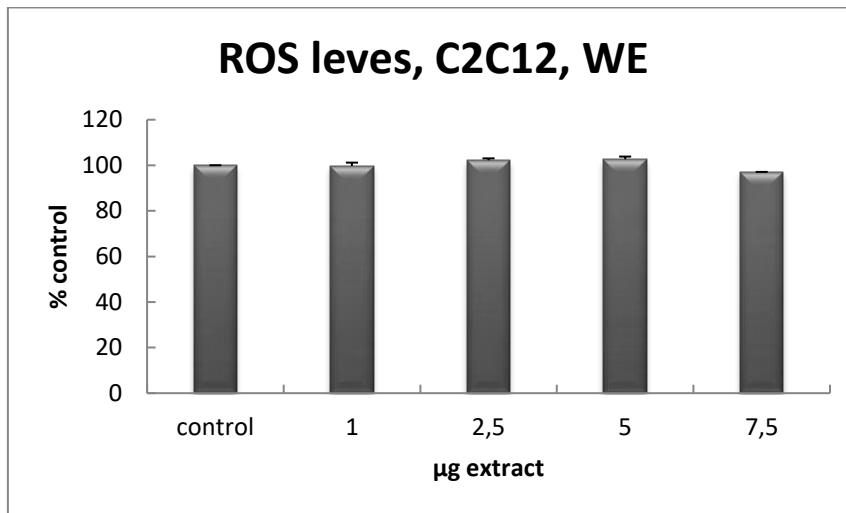
Κυτταρομετρία ροής για το εκχύλισμα WE

Το εκχύλισμα WE εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 10 μg εκχυλίσματος. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 1, 2.5, 5 και 7,5 μg εκχυλίσματος WE. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι το WE αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 38%, 65%, 58% και 25% στα 1, 2.5, 5 και 7,5 μg WE αντίστοιχα, συγκριτικά με το control.

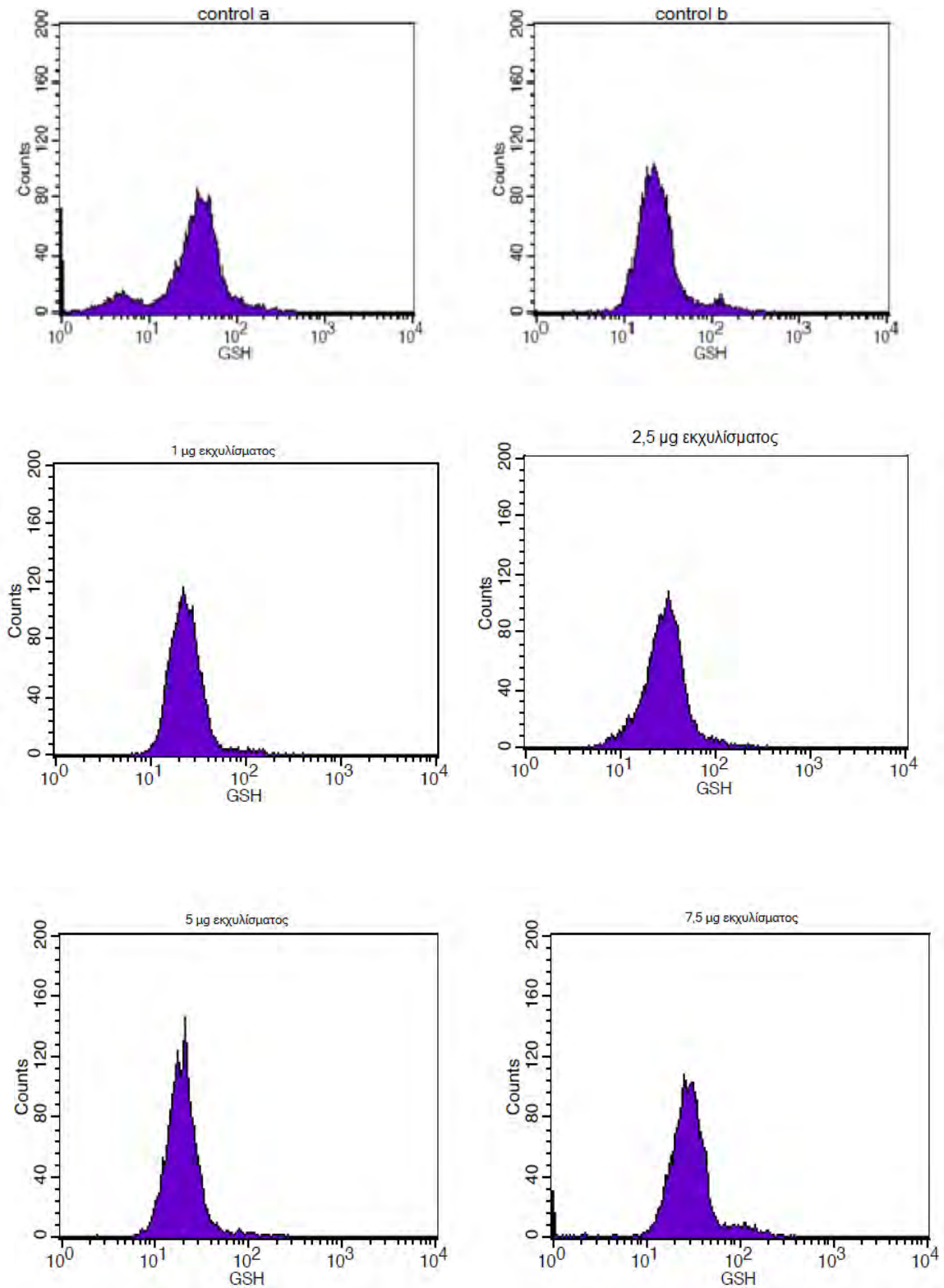


Διάγραμμα 9. Επίδραση εκχυλίσματος WE, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με τοcontrol.

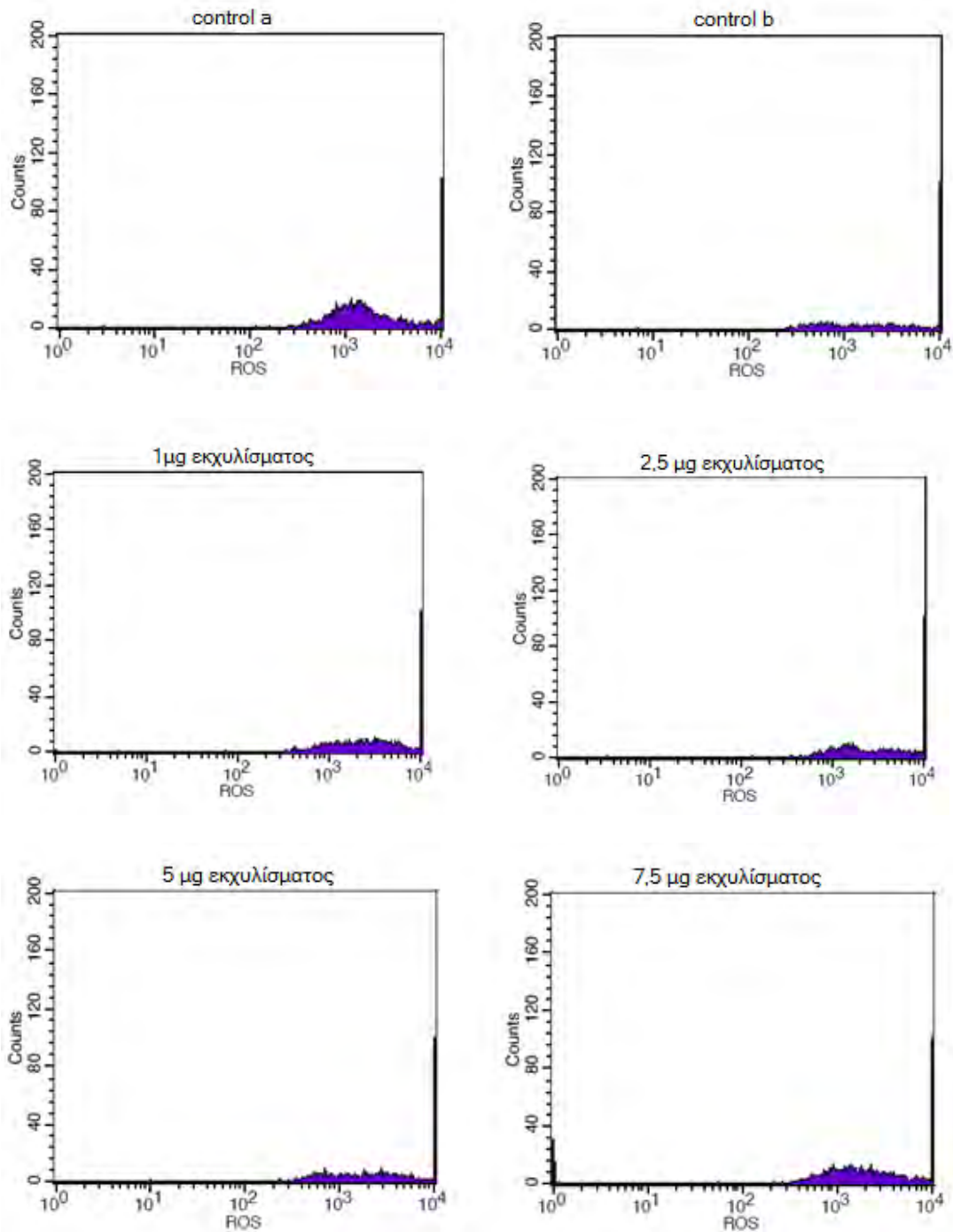
Όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS στα κύτταρα C2C12, δεν υπήρξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.



Διάγραμμα 10. Επίδραση εκχυλίσματος WE στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



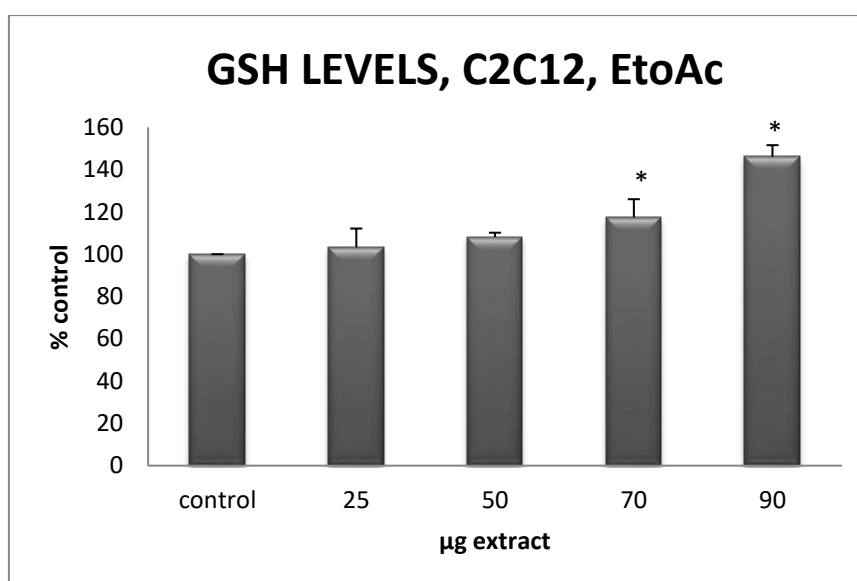
Εικόνα 33. Επίδραση WE στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.



Εικόνα 34. Επίδραση WE στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

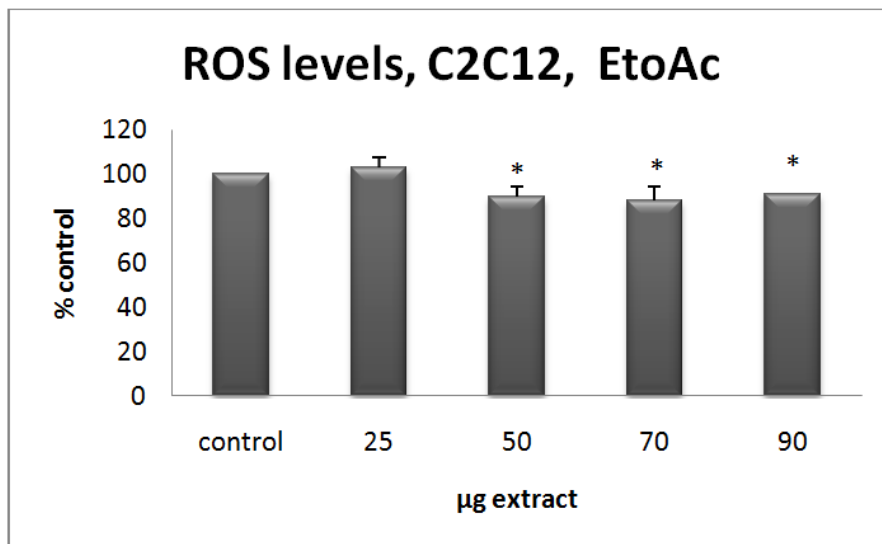
Κυτταρομετρία ροής για το εκχύλισμα EtoAc

Το εκχύλισμα EtoAc εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα 100 μg εκχυλίσματος. Συνεπώς οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν ήταν 25, 50, 70 και 90 μg εκχυλίσματος Sideritis 1. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι το EtoAc αύξησε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά 17% και 46% στα 70 και 90 μg EtoAc αντίστοιχα, συγκριτικά με το control. Ενώ στα 25 και 50 μg εκχυλίσματος παρατηρήσαμε μία μικρή αύξηση των επιπέδων και συγκεκριμένα 3% και 8% αντίστοιχα, οι οποίες δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές.

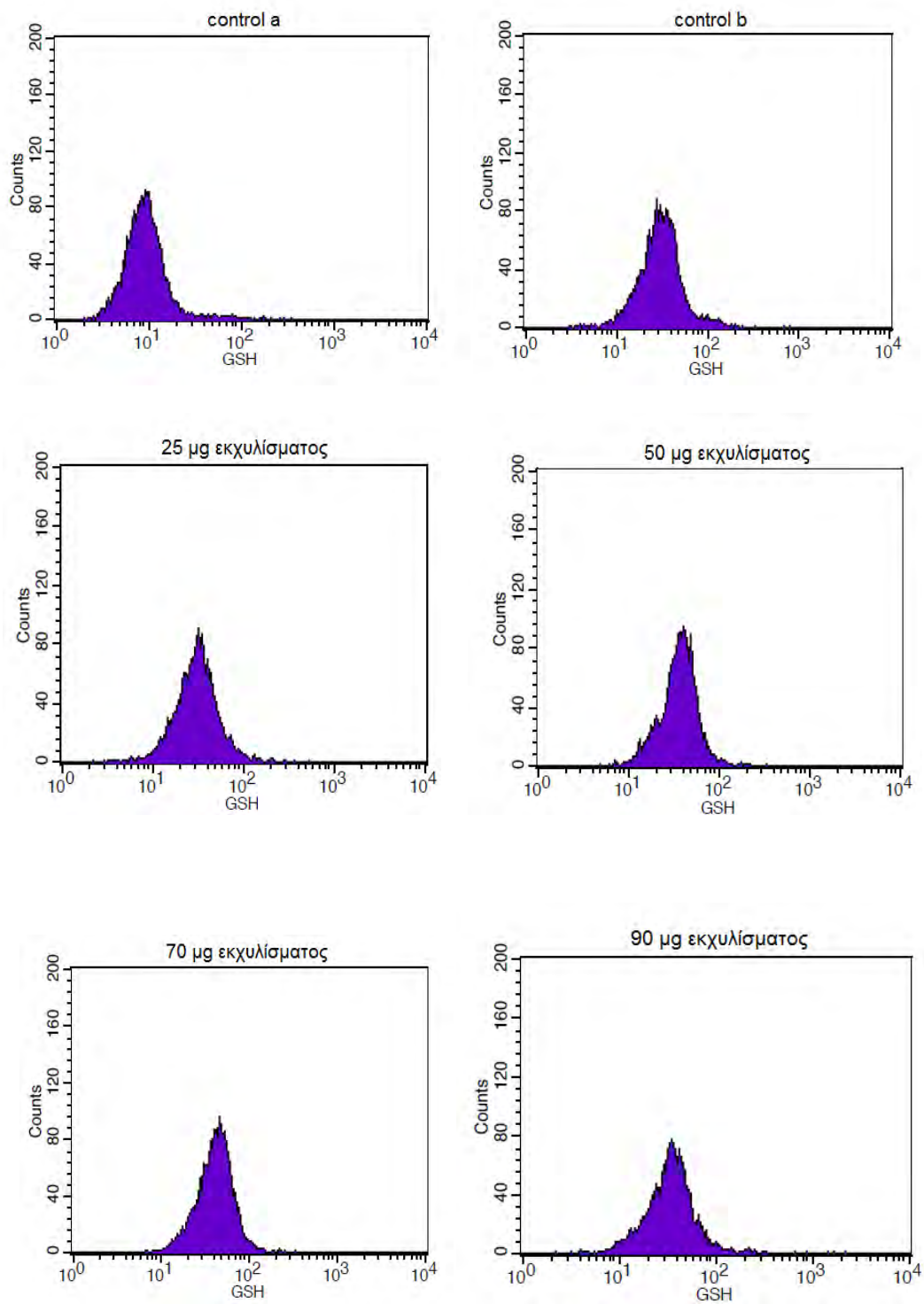


Διάγραμμα 11. Επίδραση εκχυλίσματος EtoAc, στα επίπεδα GSH, στην κυτταρική σειρά C2C12, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.

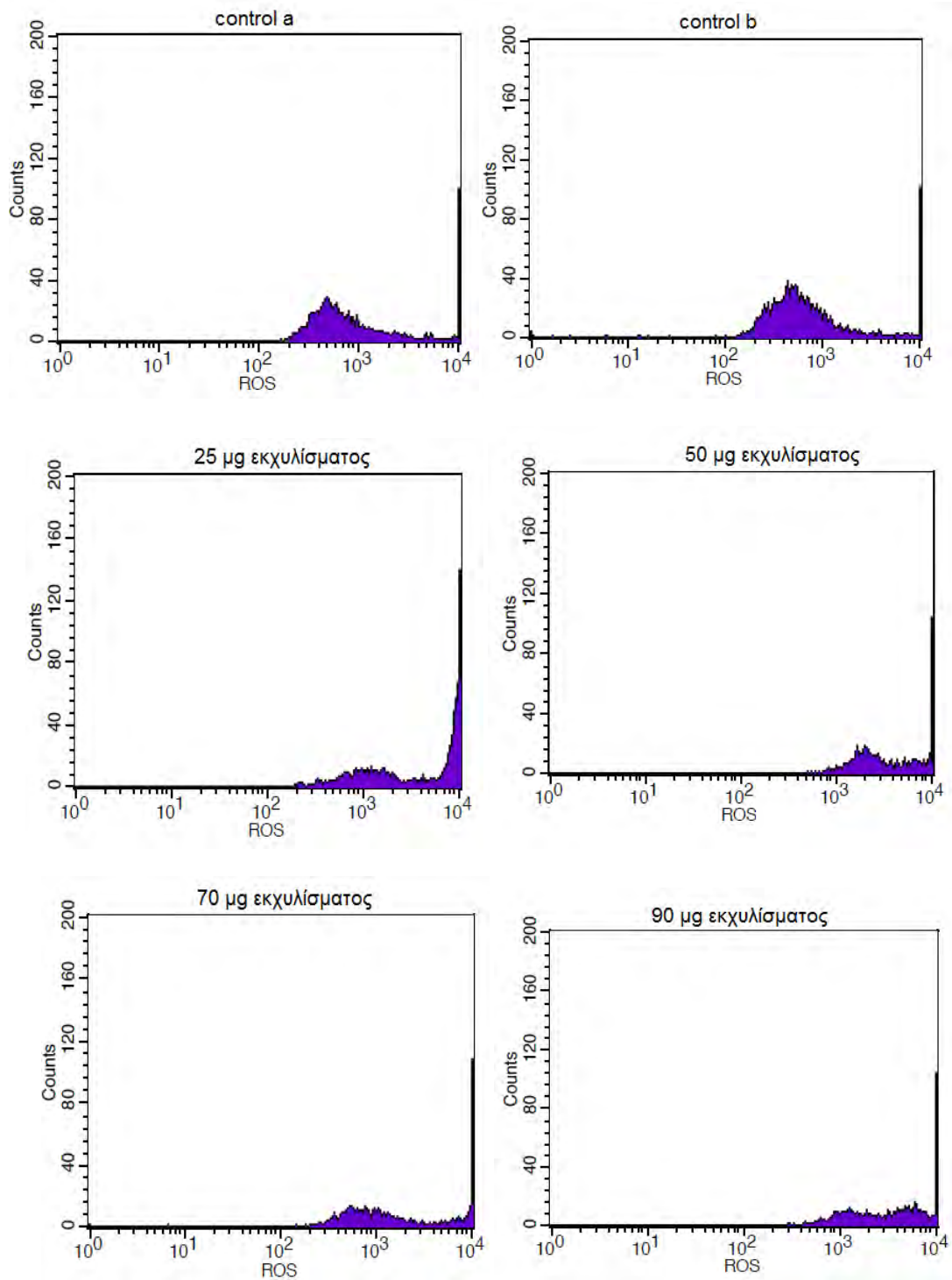
Όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS στα κύτταρα C2C12, παρατηρούμε μία μείωση 10%, 12% και 9% στις συγκεντρώσεις 50, 70 και 90 μg εκχυλίσματος αντίστοιχα που θεωρούνται στατικώς σημαντικές.



Διάγραμμα 12. Επίδραση εκχυλίσματος EtoAc στα επίπεδα ROS, στην κυτταρική σειρά C2C12, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε εκατοστιαίο επίπεδο ως προς το control και παρουσιάζονται ως mean \pm SEM, (n=3). *p<0,05 στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με το control.



Εικόνα 35. Επίδραση EtoAc στα επίπεδα GSH στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση GSH, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.



Εικόνα 36. Επίδραση ΕτοAc στα επίπεδα ROS στην κυτταρική σειρά C2C12. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από 10,000 κύτταρα κατά την μέτρηση ROS, μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο FL2 αντιπροσωπεύει τον φθορισμό που ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και ως μήκος κύματος εκπομπής.

5.Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή έγινε σύγκριση της αντιοξειδωτικής, αντιγενετοξικής καθώς και της αντιμεταλλαξογόνου δράσης του *Sideritis siphylea*, από τη Λέσβο, μετά από δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης. Συγκεκριμένα, στο πρώτο εκχύλισμα (WE) ο διαλύτης είναι νερό/αιθανόλη (50:50) και στο δεύτερο (EtoAc) οξικός αιθυλεστέρας.

Η αφορμή για την μελέτη είναι η ανάγκη εύρεσης πιο οικονομικών αλλά και λιγότερων τοξικών φαρμάκων για τον άνθρωπο. Έτσι, έχουμε στραφεί στην έρευνα σε φαρμακευτικά φυτά, όπως και ο Σιδερίτης. Μέσω της μελέτης αυτής θα δούμε ποιο από τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα προκειμένου να γίνεται η χρήση κατάλληλου διαλύτη στην εκχύλιση που θα αποφέρει το βέλτιστο πολυφαινολικό περιεχόμενο στα εκχυλίσματα, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία βιολειτουργικών ροφημάτων, τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Πιο συγκεκριμένα, μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu προσδιορίσαμε το σύνολο των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα δύο εκχυλίσματα του *Sideritis*. Στη συνέχεια, προσδιορίσαμε την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της ικανότητας να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH και ABTS^{•+} καθώς και να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο (reducing power). Έπειτα, τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την αντιγενετοξική ικανότητά τους, μέσω της ικανότητάς τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ρίζες ROO[•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα πειράματα συνεχίστηκαν με το τεστ του Ames προκειμένου να ελέγξουμε την αντιμεταλλαξογόνο δράση τους. Τέλος, η αντιοξειδωτική δράση των υπό εξέταση δειγμάτων αξιολογήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο, με την χρήση της κυτταρικής σειράς C2C12 (σκελετικοί μυοβλάστες ποντικών). Στους μυοβλάστες κατά την άσκηση παρατηρείται σημαντική παραγωγή ελευθέρων ριζών (Davies, Quintanilha, Brooks, & Packer, 1982) και ως αποτέλεσμα προκαλεί βλάβη κυττάρων και απόπτωση, (Kouka et al., 2018), γι αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μελετηθεί αυτή η κυτταρική σειρά. Τα μυϊκά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς για την αντιμετώπιση του ROS. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενζυματικά και μη ενζυματικά. Οι μη ενζυματικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά μόρια όπως γλουταθειόνη που μελετήσαμε. (Wu, Fang, Yang, Lupton, & Turner, 2004) Προκειμένου να μην χρησιμοποιηθούν κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων στα πειράματα, ελέγξαμε την κυτταροτοξικότητά των δύο εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου ΧΤΤ και ύστερα έγινε προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) και τα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

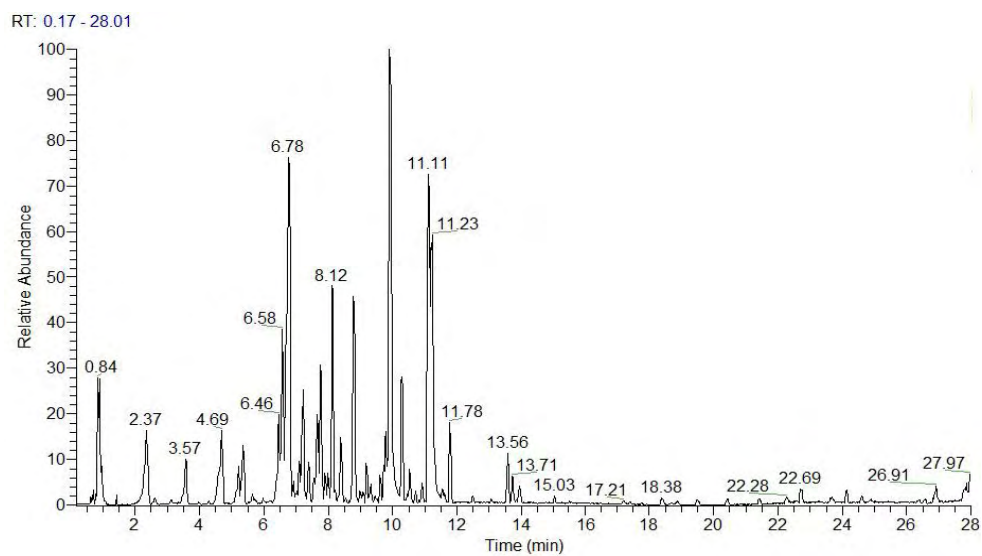
Σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu το εκχύλισμα WE φάνηκε να έχει μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με το EtoAc . Ωστόσο, η μέθοδος DPPH έδειξε ότι τα δύο εκχυλίσματα έχουν ουσιαστικά την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς το IC50 του WE και EtoAc είναι 98 και 97,2 μg ,αντίστοιχα, τιμές που δεν έχουν στατικώς σημαντική διαφορά. Όμως, η μέθοδος ABTS*+ ,η οποία θεωρείται και πιο αξιόπιστη διότι ανιχνεύει τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια, έδειξε ότι το WE έχει στατικώς σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς εμφανίζει IC50 στα 62,59 μg εκχυλίσματος σε σύγκριση με το EtoAc που το IC50 του είναι 100,38 μg, αποτελέσματα που συνάδουν με το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο που πήραμε από την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τις προηγούμενες τεχνικές , μέσω τη μεθόδου reducing power το εκχύλισμα WE φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ επομένως να είναι πιο ισχυρό. Συγκεκριμένα, το WE εμφανίζει reducing power 0,5 AU στα 9,18 μg ενώ το EtoAc στα 23,03 μg , απόκλιση που φάνηκε να είναι στατικώς σημαντική. Και τα δύο εκχυλίσματα Sideritis λοιπόν, εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Παρόμοιες μελέτες σε άλλα είδη Sideritis έχουν δείξει ανάλογα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα σε μελέτη για δυο είδη Sideritis, *Sideritis raeseri* ssp. *raeseri* and *S. raeseri* ssp. *Attica*, εξετάστηκε η ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH και ABTS*+, με το IC50 τους στη δοκιμασία DPPH να κυμαίνεται στα 241 ± 147 μg εκχυλίσματος. (Stagos et al., 2012)

Είναι φανερό ότι με διαλύτη την αιθανόλη διατηρείται το βέλτιστο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Η αιθανόλη είναι πιο πολική σε σύγκριση με τον οξικό αιθυλεστέρα και μετακινεί ταχύτερα τα μόρια του φυτού προς αυτόν. Τέλος, οξικός αιθυλεστέρας οδηγεί σε απώλεια γλυκοσιδίων.

Πιο αναλυτικά, φαίνεται στις παρακάτω εικόνες αναγράφεται το προφίλ του ολικού φαινολικού περιεχομένου των δύο εκχυλισμάτων ύστερα από αρνητικό ιοντισμό σε υγρή χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας (LC-MS) (Εικόνες 38 και 40) . Τα αποτελέσματα αυτά δόθηκαν από τον κύριο Ευάγγελο Αξιώτη από το Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Εκχύλισμα WE
5-caffeoylquinic acid
p-coumaric acid derivative
Echinacoside
Lavandulfolioside
Verbascoside
Forsythoside
Hypolaetin 7-O-allosyl(1→2)glucoside
Isoscutellarein 7-O-allosyl(1→2)glucoside
3'-O-methylhypolaetin 7-O-allosyl(1→2)glucoside
4'-O-methylisoscuteallarein 7-O-allosyl(1→2)glucoside

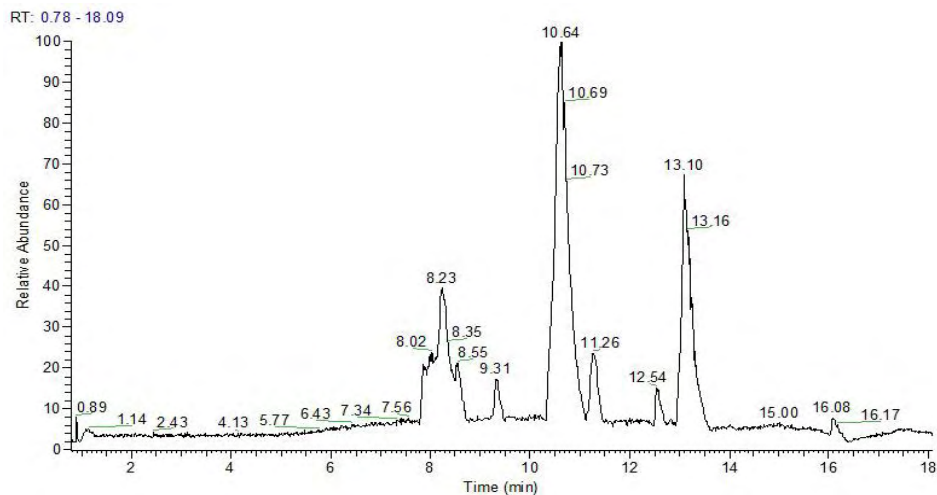
Εικόνα 37. Φαινολικό περιεχόμενο εκχυλίσματος WE



Εικόνα 38. Υγρή χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας(LC-MS) για το εκχύλισμα WE

Εκχύλισμα EtoAc
Verbascoside
Martynoside
4'-O-Methylisoscuteellarein 7-O-allosyl-(1→2) [6''-O-acetyl] -glucoside
Apigenin 7-(4''-E-p-coumaryl)glucoside)
Luteolin
Xanthomicrol

Εικόνα 39. Φαινολικό περιεχόμενο εκχυλίσματος EtoAc



Εικόνα 40.Υγρή χρωματογραφία- φασματογραφία μάζας(LC-MS) για το εκχύλισμα EtoAc

Εφόσον είχαμε τελειώσει με τις φωτομετρικές μεθόδους που μας έδωσαν μία εικόνα για την αντιοξειδωτική δράση των δύο εκχυλισμάτων, με το WE να φαίνεται να είναι πιο δραστικό, προχωρήσαμε σε επόμενη μέθοδο για να δούμε την προστασία του πλασμιδιακού DNA από τα εκχυλίσματα μας. Με την μέθοδο πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων από ρίζες περοξυλίου, φάνηκε ότι το WE προστατεύει σε μεγαλύτερο βαθμό το DNA, καθώς έχει IC50 ίσο με 15 μg εκχυλίσματος ενώ το EtoAc έχει IC50 29 μg εκχυλίσματος. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. ($p < 0,05$) Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν και με άλλες μελέτες που έχουν γίνει για την προστασία του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ρίζες περοξυλίου από άλλα είδη *Sideritis* από την Ελλάδα, *Sideritis raeseri ssp. raeseri* and *S. raeseri ssp. Attica*, τα οποία βρέθηκαν να προστατεύουν το DNA από βλαβες. (Stagos et al., 2012) Ακόμη, μελέτες με την ίδια δοκιμασία με *goji berry* που είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες βρέθηκε να προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το DNA. (Skenderidis et al., 2018)

Όσον αφορά τα αποτελέσματα από το τεστ του Ames, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα έχουν παρόμοια αντιμεταλλαξογόνο ικανότητα ώστε να προστατεύουν το γενετικό υλικό από μεταλλάξεις με IC50 2,5 μg/plate και 2,8 μg/plate, για το WE και EtoAc αντίστοιχα, διαφορά πολύ μικρή που δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίστοιχες έρευνες, στη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν δείξει την ισχυρή αντιμεταλλαξογόνο δράση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, όπως αυτών που προέρχονται από το δέντρο *Byrsonima*, με το test του Ames. (Espanha et al., 2014)

Το επόμενο βήμα ήταν να περάσουμε σε επίπεδο κυττάρων. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς είναι μία γέφυρα μεταξύ in vitro και in vivo

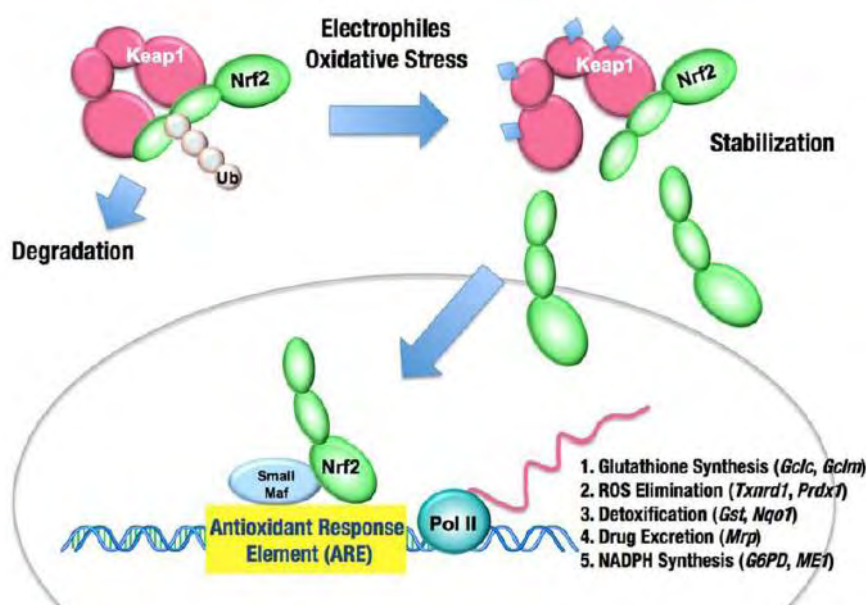
διαδικασιών και μπορούν να προσομοιάσουν τις αποκρίσεις ενός ιστού. (Veskoukis et al., 2019) Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ελέγξουμε τόσο την τοξικότητα που μπορεί να προκληθεί από μια ουσία στα κύτταρα όσο και να διαπιστώσουμε μέσω της κυτταρομετρίας ροής τα επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη (GSH), ενώ συγχρόνως, μπορούν να προσδιοριστούν και τα επίπεδα δυνητικά επικίνδυνων μορίων, όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS).

Αρχικά, για να περάσουμε στον έλεγχο της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων μας στην κυτταρική σειρά έπρεπε να προσδιοριστούμε τις τοξικές για τα κύτταρα C2C12 συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων Sideritis, δηλαδή οι συγκεντρώσεις οι οποίες προκαλούν από μόνες τους βλάβες στα κύτταρα, ώστε να αποκλειστούν και να συνεχίσουμε τα πειράματα με συγκεντρώσεις που δεν είναι επιβλαβείς για τα κύτταρα. Κυτταροτοξική ορίζουμε εκείνη τη συγκέντρωση στην οποία έχουμε πάνω από 20% θνησιμότητα των κυττάρων. Ο προσδιορισμός των τοξικών και μη συγκεντρώσεων έγινε με την βοήθεια της μεθόδου ΧΤΤ. Στα κύτταρα χορηγήθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 1-7,5 μg εκχυλίσματος για το WE και 25-90 μg εκχυλίσματος για το EtoAc, αφού παρουσίασαν σε διαφορετικό σημείο τοξικότητα. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα WE εμφάνισε τοξικότητα στα 10μg εκχυλίσματος, ενώ το EtoAc στα 100 μg.

Έπειτα, εφόσον πλέον γνωρίζουμε τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων τις οποίες θα χρησιμοποιήσουμε και δεν είναι τοξικές για την κυτταρική μας σειρά πρέπει να διαπιστώσουμε την επίδραση τους στα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) καθώς και των επιπέδων δραστικής μορφών οξυγόνου (ROS) με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Μετά την ανάλυση, των αποτελεσμάτων της φάνηκε πως και τα 2 εκχυλίσματα Sideritis αυξάνουν σε κάποιες συγκεντρώσεις στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά C2C12 ενώ μόνο το EtoAc φάνηκε να μειώνει στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου(ROS) .

Αξιοσημείωτο είναι ότι στα αποτελέσματα του εκχυλίσματος WE για την GSH εμφανίζεται το προοξειδωτικό φαινόμενο, με συνέπεια την μείωση των ενδογενών επιπέδων της GSH μετά από μία συγκέντρωση εκχυλίσματος. (Priftis et al., 2015)(Procházková, Βουξονά, & Wilhelmová, 2011) Η εμφάνιση προοξειδωτικής ικανότητας στις πολυφαινόλες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως από τη χημική τους φύση, τη συγκέντρωσή τους όπως και από τις μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες, για παράδειγμα ο κυτταρικός τύπος, η οξειδοαναγωγική κατάσταση και το pH των κυττάρων. (León-González, Auger, & Schini-Kerth, 2015)(Kouka et al., 2017)

Η αύξηση των επιπέδων της GSH μπορούν να εξηγηθούν με πολλούς πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς, όπως η αύξηση των ενζυμικών συστημάτων που είναι αρμόδια για τη σύνθεση της. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η μεγιστοποίηση της δραστηριότητας της ρεδουκτάσης της GSH (GR). Η GR έχει την ικανότητα να μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης G-S-S-G σε ανηγμένη μορφή GSH που είναι και η ενεργή μορφή.(Papadopoulou et al., 2017) Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί το ARE όταν εντοπιστεί οξειδωτικό περιβάλλον. Αυτός ο μηχανισμός- μονοπάτι φαίνεται σχηματικά και στην εικόνα. Τέλος, η ύπαρξη περίσσειας GSH έπειτα από αντίδραση με ελεύθερες ρίζες η οποία και προκαλεί άμεσα την εξουδετέρωση των ριζών.(Visioli, Wolfram, Richard, Abdullah, & Crea, 2009) Αυτός ο μηχανισμός- μονοπάτι φαίνεται σχηματικά και στην εικόνα.



Εικόνα 41. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Keap1-Nrf2

Όσον αφορά το δεύτερο μέρος της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS δεν βλέπουμε τόσο μεγάλες μεταβολές. Πιο συγκεκριμένα, για το εκχύλισμα WE δεν υπάρχει κάποια στατική σημαντική αλλαγή. Ωστόσο, μετά από χορήγηση EtoAc εκχυλίσματος στην κυτταρική σειρά, παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων ROS. Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι επίπεδα των ROS είναι ενδογενή επίπεδα και δεν έχουμε κάποιο εξωτερικό οξειδωτικό παράγοντα να τα επηρεάζει.

Δεν υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία πληροφορίες σχετικά με την χορήγηση κάποιου είδους Sideritis στην κυτταρική σειρά C2C12. Ωστόσο άλλα πολυφαινολικά

εκχυλίσματα όπως εκχυλίσματα από σταφύλι έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα. (N. Goutzourelas et al., 2014) Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα με εκχυλίσματα 3 διαφορετικές ποικιλίες από σταφύλια, δύο από αυτά, mandilaria και manrotrapano, φάνηκε να μειώνουν στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα ROS. Η άμεση δραστηριότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών των δύο εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα ROS στα μυϊκά κύτταρα. (Nikolaos Goutzourelas et al., 2015) Ωστόσο, η χορήγηση άλλων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων όπως από ελαιόλαδο δεν φάνηκε να παρουσιάζει διακύμανση στα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου. (Kouka et al., 2017) Προφανώς, η άμεση εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οφείλεται στις διαφορετικές πολυφαινόλες του κάθε εκχυλίσματος.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε, εφόσον έχουμε την εικόνα των εκχυλισμάτων τόσο *in vitro* όσο σε επίπεδο κυττάρων, ότι πολλές φορές μπορεί να έχουμε κάποια αλλαγή της βιοδραστικής του ικανότητας λόγω του μεταβολισμού των κυττάρων. Ισχυρές πολυφαινόλες μπορεί να μετατραπούν σε λιγότερο δραστικές ή και το αντίθετο. Επίσης, μπορεί κάποιοι μεταβολίτες που θα παραχθούν να εμφανίσουν κυτταροτοξικότητα. Έτσι, αν και οι κυτταροκαλλιέργειες θεωρούνται ένα *in vitro* σύστημα, λόγω του ότι είναι μεταβολικά δραστικές μπορούν να προσομοιάσουν ένα *in vivo* περιβάλλον. (Kouka et al., 2019) Επομένως, είναι φυσιολογικό που αν και το εκχύλισμα WE στα *in vitro* πειράματα είναι εμφανώς πιο δραστικό, καθώς έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και αναγωγική δύναμη, στην κυτταρική σειρά μυοβλαστών παρατηρούμε το εκχύλισμα EtoAc να έχει τη δυνατότητα να εξουδετερώνει και να οδηγεί στην μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτό είναι αποτέλεσμα κάποιων από τις πολυφαινόλες και των μεταβολιτών τους που οδηγούν στην άμεση εξουδετέρωση. (Alon, Tsakonvka, & Rajeva, 2014) Τέλος, όσον αφορά το προοξειδωτικό φαινόμενο που προκλήθηκε με τη χορήγηση του εκχυλίσματος WE, είναι πολύ πιθανόν τα φλαβονοειδή μόρια που προέκυψαν από τον μεταβολισμό των κυττάρων να είναι πλούσια σε υδροξυλομάδες, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι το προοξειδωτικό φαινόμενο είναι άμεσα συνδεδεμένα με τον πλήθος των υδροξυλίων στα φλανοειδή. (Cao, Sofic, & Prior, 1997)

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως το εκχύλισμα WE παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε *in vitro* επίπεδο. Παράλληλα, σε επίπεδο κυττάρων επίσης φαίνεται να προστατεύει περισσότερο τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα συνάδουν με το φαινολικό τους περιεχόμενο, καθώς η αιθανόλη βοηθά σε μεγαλύτερο βαθμό την μεταφορά πολυφαινολών στο εκχύλισμα. Αυτή η παρατήρηση είναι ιδιαίτερως σημαντική, καθώς για την παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, τροφίμων κλπ με βάση το Sideritis θα χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως διαλύτης στις εκχυλίσεις και όχι οξικός αιθυλεστέρας ώστε να παίρνουμε προϊόντα με μεγαλύτερη δράση. Ωστόσο, πρέπει

να υπάρξει προσοχή το ποσοστό της αιθανόλης γιατί μεγάλες αναλογίες μπορεί να οδηγήσουν σε εξάτμιση πολυφαινολών κατά την εκχύλιση. Επίσης θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερο ενδιαφέρον και να πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα έτσι ώστε να γίνει πλήρης αποτίμηση της ικανότητας των δύο διαλυτών.

Σε επόμενη φάση θα ήταν σκόπιμο πέρα από την επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη για κάθε εκχύλισμα, να λαμβάνεται υπόψη ότι κάποιες πολυφαινόλες παραμένουν στο εκχύλισμα. Αυτές οι πολυφαινόλες είναι γνωστές ως μη-εκχυλίσιμες πολυφαινόλες(NEPs) και περιλαμβάνουν μόρια όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες , συμπυκνωμένες ταννίνες και προανθοκυανιδίνες. Είναι ανάγκη να γίνεται η κατάλληλη προεπεξεργασία του εκχυλίσματος και μετά να να προχωράμε στις συμβατικές μεθόδους εκχυλίσεις ή πιο εξειδικευμένες. Κάποιες φορές ωστόσο λόγω των ιδιαίτερα ισχυρών δεσμών απαιτείται επεξεργασία του υπολείμματος για απελευθέρωση των NEPs με όξινη, αλκαλική ή ενζυματική υδρόλυση. (Domínguez-Rodríguez, Marina, & Plaza, 2017) Καταυτόν τον τρόπο λοιπόν, θα επιτυγχάνεται η ανάκτηση του μέγιστου πολυφαινολικού φορτίου και θα είναι δυνατή η παραγωγή πιο δραστικών και με μεγαλύτερη απόδοση προϊόντων που η δράση τους οφείλεται στις πολυφαινόλες φυτικών εκχυλισμάτων.

Η Ελλάδα είναι μία χώρα της οποίας η οικονομία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη γεωργία. Το τσάι είναι ένα φυτό το οποίο ευδοκιμεί μόνο σε ανατολικές χώρες. Έτσι, θα μπορούσαμε να εκμεταλλευτούμε αυτό το προνόμιο έτσι ώστε να κάνουμε εξαγωγές για τσάι του βουνού ή άλλων προϊόντων που βασίζονται σε αυτό σε άλλες χώρες του εξωτερικού. Μέσω από μελέτες σαν αυτές πρώτα από όλα θα γίνει πιο αναγνωρίσιμο για τις ευεγερτικές του ιδιότητες και εφόσον θα παράγονται πιο βιοδραστικά προϊόντα και με υψηλή προστιθέμενη αξία θα ανέβει και η τιμή τους. Είναι λοιπόν μεγάλη ανάγκη η εκμετάλλευση των ήδη υπάρχοντων φυσικών πόρων με ταυτόχρονη όμως χρήση των γνώσεων που διαθέτουμε μέσω της έρευνας για την βέλτιστη παραγωγή φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών με βάση τα φυτικά προϊόντα.

6. Βιβλιογραφία

- Alov, P., Tsakovska, I., & Pajeva, I. (2014). Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1568026615666141209143702>
- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- Axiotis, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, L. A. (2018). An ethnobotanical study of medicinal plants in the Greek islands of North Aegean Region. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00409>
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285. <https://doi.org/10.1042/>
- Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(82\)80124-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(82)80124-1)
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L. Y., & Zhang, Z. (2013). Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients*, 5(6), 2173–2191. <https://doi.org/10.3390/nu5062173>
- Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M. L., & Plaza, M. (2017). Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., & Kyle, J. A. M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599–603. <https://doi.org/10.1079/PNS2003275>
- Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J., & Korte, D. W. J. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2), 153–165.
- Espanha, L. G., Resende, F. A., de Sousa Lima Neto, J., Boldrin, P. K., Nogueira, C. H., de Camargo, M. S., ... Varanda, E. A. (2014). Mutagenicity and antimutagenicity

- of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-182>
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *36*(4), 327–358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B. L., Khan, S. I., Kobaisy, M., Skaltsounis, A. L., & Duke, S. O. (2007). Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. *Journal of Natural Medicines*. <https://doi.org/10.1007/s11418-006-0013-y>
- González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2011). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities - A review. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.014>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., ... Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*. <https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
- Goutzourelas, Nikolaos, Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., ... Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4216>
- Guo, J.-J., Hsieh, H.-Y., & Hu, C.-H. (2009). Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: a theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry. B*, *113*(47), 15699–15708. <https://doi.org/10.1021/jp907822h>
- H., S. (n.d.). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, *18*(9), 685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>
- Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(9–10), 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>
- Kalivas, A., Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Chatzopoulou, P., Tsaftaris, A., & Madesis, P. (2014). DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3381-5>
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *30*(2), 145–158.
- Koren, H. S. (1995). Associations between criteria air pollutants and asthma.

Environmental Health Perspectives, 103 Suppl, 235–242.
<https://doi.org/10.1289/ehp.95103s6235>

- Kouka, P., Chatzieffraimidi, G. A., Raftis, G., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., ... Kouretas, D. (2018). Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek *Olea europaea* variety in different cell cultures. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.054>
- Kouka, P., Priftis, A., Stagos, D., Angelis, A., Stathopoulos, P., Xinou, N., ... Kouretas, D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3078>
- Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., Dimopoulou, S., Sarikaki, G., Stathopoulos, P., ... Kouretas, D. (2019). The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin olive oils is correlated with their antioxidant potency. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>
- Land, E. T. (1990). Free radicals in biology and medicine. *International Journal of Radiation Biology*. <https://doi.org/10.1080/09553009014552071>
- Leaf, D. A., Kleinman, M. T., Hamilton, M., & Barstow, T. J. (1997). The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. <https://doi.org/10.1097/00005768-199708000-00008>
- León-González, A. J., Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2015). Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>
- Levine, R. L., Moskowitz, J., & Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: Roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1080/15216540051081056>
- Levine, Rodney L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(9 Suppl), 30S-34S.

- Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H., & Orelund, L. (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Research*, 906(1–2), 170–175.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Papadopoulou, A., Petrotos, K., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Maimaris, A., Makris, H., ... Kouretas, D. (2017). Enhancement of Antioxidant Mechanisms and Reduction of Oxidative Stress in Chickens after the Administration of Drinking Water Enriched with Polyphenolic Powder from Olive Mill Waste Waters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2017/8273160>
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4377>
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., & Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv Fur Tierernahrung*, 52(3), 203–222.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C. M. T., Nissen, P., & Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb822>
- Skenderidis, P., Kerasioti, E., Karkanta, E., Stagos, D., Kouretas, D., Petrotos, K., ... Tsakalof, A. (2018). Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. *Toxicology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.001>
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., ...

- Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>
- Szweda, P. A., Friguier, B., & Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(1), 29–36.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
- Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M. I. C. B., & Crea, R. (2009). Olive Phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf8034429>
- Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., De Andrade, M., & Li, D. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- A., Γ. (n.d.). Το Τσάι του βουνού, από αυτοφυές τώρα στην καλλιέργεια. *Υπουργείο Γεωργίας “Τα Αγροτικά,” Τεύχος 16*, 29–31.
- Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., Λάζαρη, Δ., και Κρίγκας, Ν. (2013). Καλλιέργεια, μεταποίηση και διασφάλιση ποιότητας των ελληνικών αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών. *Καβάλα: Γ. Λουπέλης*.
- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I. *Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου 26*, 151–194.
- Σαμαρά, Γ. Χ. (n.d.). *Βελτιστοποίηση της καλλιέργειας “τσάι του βουνού” (Sideritis raeseri) στο χωριό Βρύναινα του νομού Μαγνησίας*.