



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Προσδιορισμός αντι-μεταλλαξιγόνου δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, από φύλλα και καρπούς, *Castaneasativa* (Ευρωπαϊκή καστανιά) έναντι μεταλλαξιγένεσης επαγόμενης από οξειδωτικό στρες σε βακτήρια *Salmonella typhymurium* TA102»

«Determination of antimutagenic activity of phenolic extracts, from chesnut fruit and leaves (*Castaneasativa*), against oxidative stress induced mutagenesis in *Salmonella typhymurium* TA102»



ΜΑΡΝΑΣ ΠΕΡΙΚΛΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στάγκος Δημήτριος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών– Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κουρέτας Δημήτριος: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Πετρωτός Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μηχανικής Μεταποίησης Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων- Τμήμα Μηχανικής Βιο-συστημάτων –ΣΤΕΓ ΤΕΙ Λάρισας.

Ευχαριστίες

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπογύφιο διδάκτορα Λαδά Δημήτριο, για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια κατά την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, για το ευχάριστο κλίμα και την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε το είχα ανάγκη, καθώς και την οικογένεια μου που με στηρίζει σε κάθε μου απόφαση και προσπάθεια.

Περιεχόμενα

Contents

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες	9
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	10
1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	11
1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})	11
1.2.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)	12
1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	12
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	13
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	13
1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”	14
1.4.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	15
1.4.4 Κυτόχρωμα P ₄₅₀	15
1.4.5 Αυτοοξειδωση μορίων	15
1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS.....	15
1.6 Βιολογική δράση των ROS.....	16
1.6.1 Θετικές επιδράσεις.....	16
1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις	16
1.7 Οξειδωτικό στρες	18
1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	19
1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	20

1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά.....	21
1.9 Πολυφαινόλες	21
1.9.1 Φυσικές ιδιότητες	22
1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών.....	22
1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία	23
1.10 Ευρωπαϊκή Καστανιά (<i>CastaneaSativa</i>)	24
2. ΣΚΟΠΟΣ	26
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
3.1Τεστ του Ames.....	27
3.1.1 Μηχανισμός δράσης του t-BOOH.....	28
3.1.2 Δοκιμασία εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων καστανιάς	28
3.1.3 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας.....	29
3.1.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης	30
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

Περίληψη

Τα κάστανα αποτελούν μία από τις πιο διαδεδομένες τροφές που καταναλώνονται παγκοσμίως. Αποτελούν μια τροφή με μεγάλη θρεπτική αξία, καθώς είναι πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Επιπλέον αποτελούν μια πλούσια πηγή υδρόφιλων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως ελεύθερα σάκχαρα, οργανικά οξέα και πολυφαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μειώνουν τη δράση ελευθέρων ριζών και πολλές φορές να την εξαλείφουν, ενώ παρέχουν προστασία στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Επομένως το φυτό αποτελεί μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών, τα οποία συσχετίζονται με την πρόληψη ορισμένων ασθενειών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες, όπως φλεγμονώδεις νόσοι, ισχαιμικές ασθένειες, καρκίνος, εμφύσημα, γαστρικά έλκη, υπέρταση και νευρολογικές παθήσεις. Χαρακτηριστικό, τόσο των καρπών όσο και των φύλλων, αποτελεί η υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Για τον λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν έξι εκχυλίσματα, φύλλων και καρπών, καστανιάς για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιογόνου δράσης τους. Πραγματοποιήθηκαν πολλαπλά τεστ Ames με τη χρήση βακτηρίων *Salmonella typhimurium* TA102, παρουσία οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH και έπειτα παρατηρήθηκε η ανάπτυξη αποικιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα φύλλα και ο καρπός της καστανιάς φαίνεται να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιογόνο δράση, με τη δράση των φύλλων να είναι ισχυρότερη.

Abstract

Chestnuts are one of the most popular foods consumed worldwide. They are a food of great nutritional value as they are rich in complex carbohydrates, proteins and vitamins. In addition they are a rich source of hydrophilic antioxidants, such as free sugars, organic acids and polyphenolic compounds, thereby reducing their free radical activity and often eliminating it, while providing protection against lipid peroxidation. Therefore the plant is a rich source of antioxidants, which are associated with the prevention of certain diseases caused by oxidative stress, such as inflammatory diseases, ischemic diseases, cancer, emphysema, gastric ulcers, hypertension and neurological diseases. A characteristic of both fruits and leaves is the high content of polyphenols. This has resulted in an important study to identify and quantify their antioxidant activity. For this reason, the present study examined six extracts of chestnut leaf and fruit to determine their antimutagenic activity. Multiple Ames tests were performed using *Salmonella typhimurium* TA102 bacteria in the presence of oxidizing factor t-BOOH and then colonization was observed. According to the results, chestnut leaves and fruit appear to have an antimutagenic activity, with the effect of the leaves being stronger.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (Cheeseman & Slater, 1993). Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών οφείλεται στη διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, με αποτέλεσμα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο να μένει στο νέο μόριο ή άτομο που σχηματίζεται. Κύριο χαρακτηριστικό των ελευθέρων ριζών αποτελεί ο μικρός χρόνος ημιζωής καθώς και η απόσπαση ηλεκτρονίων άλλων μορίων, κάτι που οφείλεται στην υψηλή δραστηριότητα και αστάθειά τους (Keles, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 2001; Prior & Cao, 1999). Το άτομο του υδρογόνου αποτελεί την πιο απλή μορφή ελεύθερης ρίζας, ενώ η ρίζα $\text{OH}\cdot$ χαρακτηρίζεται ως το πιο ισχυρό οξειδωτικό.

Οι ελεύθερες ρίζες κατά κύριο λόγο αποτελούνται από άτομα O και λιγότερες φορές από N , S και C (Sengupta *et al.* 2004; Pani *et al.* 2010; AICR 2007; Battin & Brumaghim 2009; Pani *et al.* 2010). Η αντίδραση μίας ελεύθερης ρίζας με άλλα βιολογικά μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και υδατάνθρακες παράγει μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών με τον σχηματισμό νέων ριζών, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω με άλλα μακρομόρια.

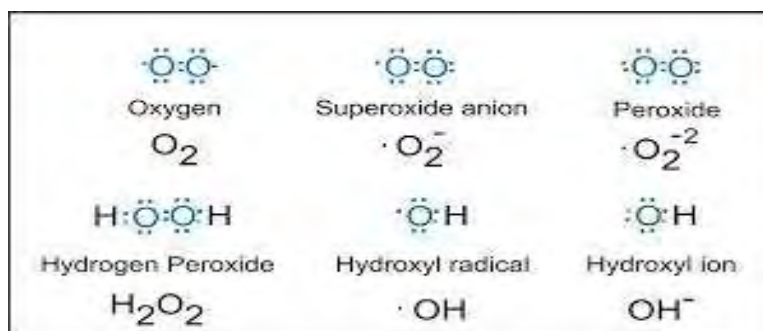
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό άτομο το Ο αποτελούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αλλά θα πρέπει να τονιστεί ότι μια δραστική μορφή οξυγόνου δεν είναι απαραίτητο να είναι και ελεύθερη ρίζα. Οι ROS δρύνε σε χαμηλές συγκεντρώσεις, κατά κύριο λόγο, και εμπλέκονται σε διεργασίες όπως το οξειδωτικό στρες, η πήξη του αίματος, η μεταγωγή σήματος, η φαγοκυττάρωση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μεταγραφή γονιδίων, ο κυτταρικό πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η φλεγμονή(Παπαγαλάνης, 2014).

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν οξείδωση των στόχων τους και χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), το υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2) οι ρίζεςτριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχεσρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδεςοξύ ($COCl$).

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)



Εικόνα 1: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

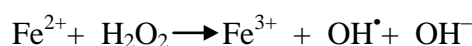
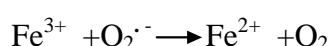
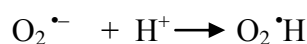
Αποτελεί ένα αρνητικά φορτισμένο ανιόν, μη διαπερατό στη μεμβράνη και σχηματίζεται σαν ένα ενδιάμεσο βιοχημικών αντιδράσεων. Η αντίδραση σχηματισμού του ανιόντος σουπεροξειδίου είναι $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$. Λόγω της τοξικής του δράσης χρησιμοποιείται στα φαγοκύτταρα, ενάντια σε παθογόνα, αφού παραχθεί από την οξείδωση του (Halliwell, 1995). Παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από τα συμπλέγματα I και II. Επίσης στην παραγωγή του συμμετέχει η οξειδάση της ξανθίνης, κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller, Lustgarten, Jang, Richardson, & Van Remmen, 2007). Οι οργανισμοί που διαθέτουν οξυγόνο, με διάφορες ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD,) μετατρέπουν το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο, αποφεύγοντας την τοξική του δράση.

1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})

Η ρίζα υδροξυλίου χαρακτηρίζεται για την υψηλή της δραστηριότητα και τον κρίσιμο ρόλο της στη χημεία των ριζών (Hayyan, Hashim, & AlNashef, 2016). Κατά κύριο λόγο παράγεται ως παραπροϊόν διεργασιών του ανοσοποιητικού συστήματος και δρα σε υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και αμινοξέα (Reiter et al., 1995). Η υψηλή της επικινδυνότητα για τον οργανισμό οφείλεται στον ιδιαίτερα μικρό χρόνο ημιζωής (Reiter, Carneiro, & Oh, 1997; Reiter et al., 1995).

Σχηματίζεται από την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία

ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος. Αλλά η αντίδραση καταλύεται και από άλλα μέταλλα, όπως ο χαλκός (Mylonas & Kouretas, 1999). Οι κύριες αντιδράσεις της ρίζας είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου, αντιδρώντας με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα).

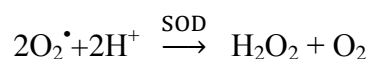


1.2.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί ένα δραστικό μόριο που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, δρα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, όπως η ρίζα υδροξυλίου. Σε αντίθεση με το ανιόν σουπεροξειδίου, έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής και καθίσταται διαπερατό στην μεμβράνη. Αποτελεί έναν ασθενή οξειδωτικό παράγοντα και εμφανίζει κυτταροτοξικότητα, καθώς μέσω της αντίδρασης Fenton παράγει ελεύθερες ρίζες.



Μπορεί να πραγματοποιηθεί οξειδοαναγωγή της ίδιας της ρίζας υπεροξειδίου. Οξειδάσες, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στον μοριακό οξυγόνο.



1.3 Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως υπάρχουν ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο και αποτελούν τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Ωστόσο σε αυτές ανήκουν και μη ριζικά μόρια-ενώσεις (Fang, Yang, & Wu, 2002). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν

κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO[•] και το διοξείδιο του αζώτου NO₂[•] καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO₂ και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO⁻).

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO [•])	Νιτρώδες Οξύ (HNO ₂)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO ₂ [•])	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO ⁺)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO ⁻)

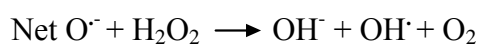
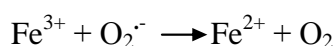
1.4 Ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Μια από τις σημαντικότερες διεργασίες παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Η παραγωγή O₂^{•-} και H₂O₂ οφείλεται στην αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3) (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Το H₂O₂ δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O₂^{•-} (Chance et al., 1979). Το O₂^{•-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). HOH[•] δημιουργείται μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss.

Αντίδραση Haber-Weiss:



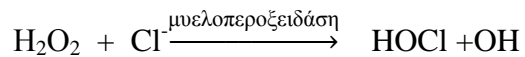
Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) καταλύει την παραγωγή του NO. Αυτό με τη σειρά του αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου, για την παραγωγή υπεροξυνιτρικού ανιόν (ONOO⁻), το οποίο μετατρέπεται σε υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH), από το οποίο θα προκύψουν εν τέλη οι ρίζες O₂^{•-} και NO₂[•].

Επιπρόσθετα μπορεί να παραχθεί ανιόν σουπεροξειδίου από την ημικινόνη(UQH), η οποία παράγεται μέσω της αντίδρασης του NO με την ουβικινόλη(UQH₂).

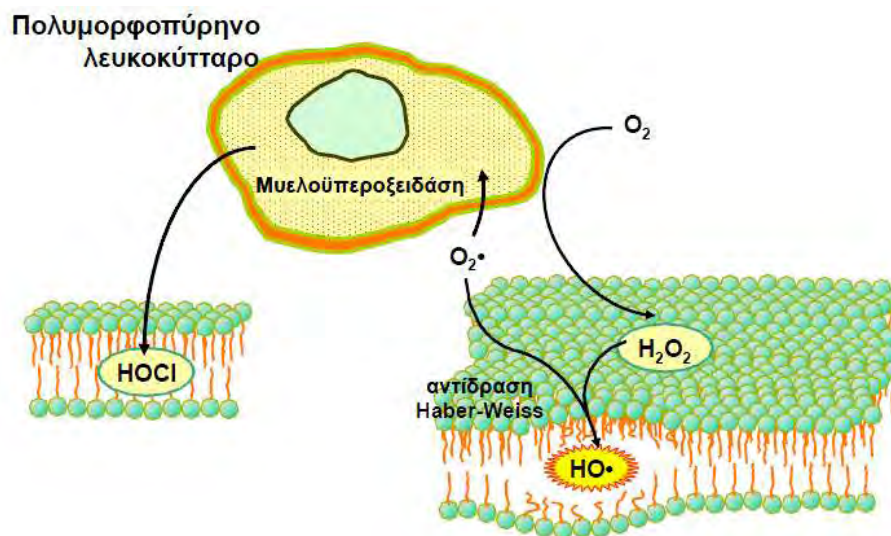
1.4.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”

Μία από τις σημαντικότερες άμυνες των ιστών, ενάντια σε ιούς και βακτήρια, αποτελούν τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) κύτταρα του ανοσοποιητικού. Καταστροφές των ιστών, που προκαλούνται για παράδειγμα από ROS, συντελούν στην ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων.

Σε έντονη καταστροφή του ιστού, χημειοτακτικοί παράγοντες κατεστραμμένων κυττάρων προσελκύουν τα PMN, τα οποία κατά τη φαγοκυττάρωση απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το O₂^{•-}. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το O₂^{•-} παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση. Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το O₂^{•-} σε H₂O₂, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH[•] από ιόντα μετάλλων ή σε HOCl.



Η διαδικασία αυτή αν και αποτελεί αμυντικό μηχανισμό ενάντια σε βακτήρια και ιούς, καθώς και οδηγεί στην απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες, δεν πρέπει να παραγνωρίζουμε ότι η απελευθέρωση ROS έχει ποικίλες επιπτώσεις, όπως η οξείδωση των λιπιδίων. Κατά την φαγοκυττάρωση παράγεται σουπεροξειδίο, και εν τέλη HOCl, και το φαινόμενο ονομάζεται αναπνευστική «έκρηξη».



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα

1.4.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Μία άλλη πηγή παραγωγής ROS αποτελεί η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Downey, 1990; Kurpusamy & Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας γίνεται σύσπαση του μυοκαρδίου. Η διαδικασία αυτή όμως απαιτεί ενέργεια η οποία προέρχεται από την αποφωσφορυλίωση του σε ADP και AMP. Στη συνέχεια το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $O_2^{\bullet-}$.

Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

1.4.4 Κυτόχρωμα P₄₅₀

Το κυτόχρωμα P₄₅₀ είναι ένα σύμπλοκο ενζύμων που συμμετέχει στον μεταβολισμό των φαρμάκων *in vivo* και παράγει ROS, μέσω των μικροσωμάτων των ηπατικών κυττάρων σε φυσιολογικές συνθήκες (Yu, 1994). Πιο συγκεκριμένα κατά την κατανάλωση οξυγόνου στα μικροσώματα η NADPH οξειδάση, παρουσία ADP και Fe^{3+} , καταλύει την δημιουργία $O_2^{\bullet-}$, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O_2 (Chance et al., 1979).

1.4.5 Αυτοοξειδωση μορίων

Υπάρχει ένας αριθμός μορίων (φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες) που διαθέτει την ιδιότητα της αυτοοξειδωσης. Αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία $O_2^{\bullet-}$.

1.5 Εξωκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS

Θα πρέπει να τονιστεί ότι μεγάλη ποσότητα ROS παράγεται και από εξωτερικές πηγές. Ένα μεγάλο ποσοστό προέρχεται από την διατροφή, κάτι που τονίζει την σημαντικότητά της (Ames, 1986; Kanner & Lapidot, 2001; Lijinsky, 1999). Επιπρόσθετα παράγοντες όπως η ηλιακή ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, το κάπνισμα, το όζον, καθώς και απόβλητα βιομηχανιών επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή ROS. Ωστόσο έχει αποδειχθεί πως η δράση ορισμένων φαρμάκων και ξενοβιοτικών ουσιών γενικότερα, σχετίζεται με την παραγωγή δραστικών μορφών

οξυγόνου (Naito, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998; Ray et al., 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή.

1.6 Βιολογική δράση των ROS

1.6.1 Θετικές επιδράσεις

Για πολλά χρόνια ο όρος ROS είχε αρνητική έννοια, σήμερα όμως είναι γνωστό ότι έχει και πολλές θετικές επιδράσεις για τον οργανισμό. Κύριος ρόλος των ROS αποτελεί η δράση τους ως σηματοδοτικά μόρια. Στην πορεία διαφόρων ενζυμικών ή μη αντιδράσεων, παράγονται ROS που οξειδώνουν σουλφυδρυλικές ομάδες (S-H) κυστεϊνών σε ομάδες σουλφενικού οξέος (S-OH) ή σε δισουλφιδικές ομάδες, ενδομοριακές (Cys-S-S-Cys) ή διαμοριακές διαμορφώνοντας μεταμεταφραστικά τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης παράγονται ROS και δρουν ενάντια σε αντιγόνα.

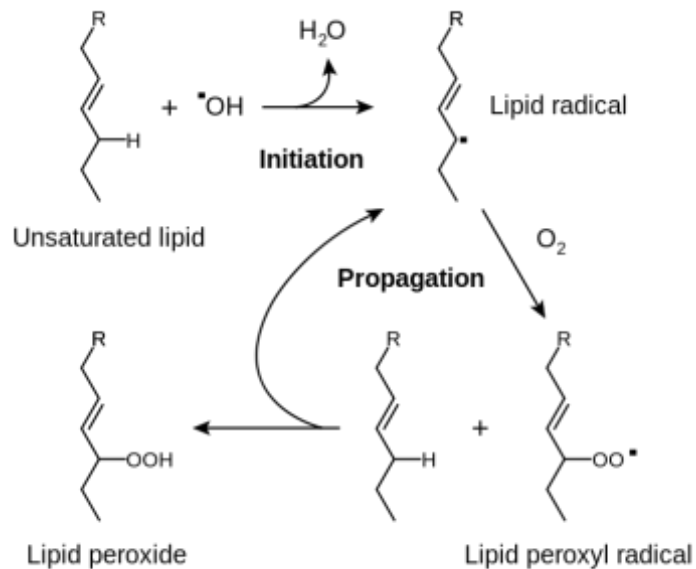
Επιπρόσθετα, οι ROS συμμετέχουν στην αγγειογένεση, την ανοσία, την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό και την μυϊκή συστολή. Τέλος συμμετέχουν στην στρατολόγηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων, καθώς τα αιμοπετάλια σε τραύματα απελευθερώνουν ROS, τα οποία δρουν ως σήμα.

1.6.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

Αν και αναφέρθηκαν αρκετές θετικές επιδράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι αρνητικές επιδράσεις που έχουν για τον οργανισμό είναι ποικίλες και ιδιαίτερα σοβαρές. Στοχεύοντας σε βιολογικά μακρομόρια οδηγούν στην βλάβη και ακόμα στην καταστροφή τους. Για τον λόγο αυτό έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση, νόσους νεφρών, ηπατικούς νόσους, φλεγμονές, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, γήρανση, λοιμώδεις και πνευμονικές νόσους.

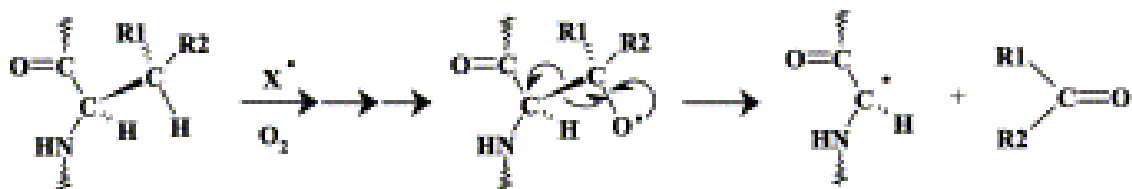
Η υψηλή συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων καθιστά την κυτταρική μεμβράνη εύκολο στόχο οξείδωσης. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο

και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO[•] κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Η ROO[•] στη συνέχεια δρα σε γειτονικά λιπαρά οξέα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.



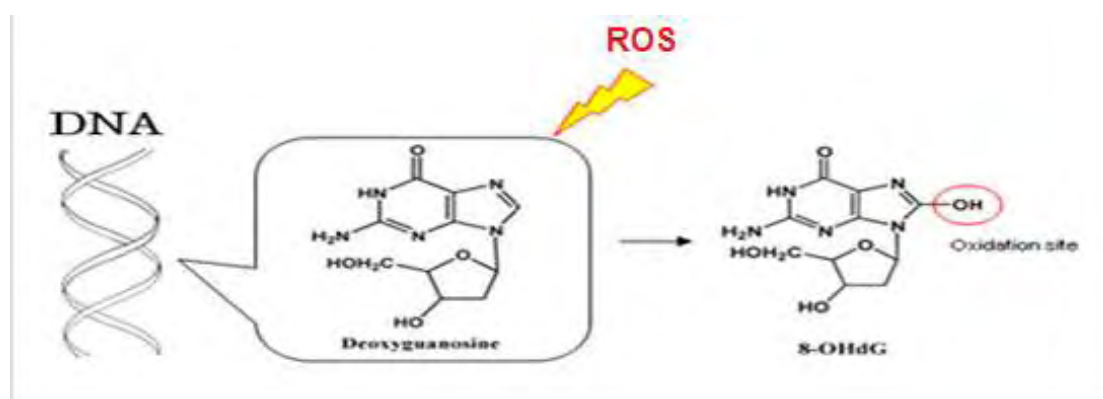
Εικόνα 3: Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Μερικές ROS, όπως οι ενεργές ρίζες αζώτου, το RO[•] και το HO[•] οδηγούν σε σοβαρές βλάβες των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα συμβαίνουν αλλαγές στην τριτοταγή δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους (Davies, 1987; Grune, Reinheckel, & Davies, 1997; Levine & Stadtman, 2001). Τα παραπάνω οδηγούν σε αλλοίωση κυτταρικών λειτουργιών, απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας και διαφορετικά επίπεδα έκφρασης.



Εικόνα 4: Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης

Μία από τις σοβαρότερες επιπτώσεις των ROS είναι η αλληλεπίδραση τους με το DNA. Αυτό βέβαια έχει ως αντίκτυπο τη δημιουργία θραυσμάτων, την απώλεια δράσης του επιδιορθωτικού συστήματος, τις αλλαγές βάσεων, την απώλεια πουρινών και καταστροφή της δεοξυριβόζης. Η ρίζα υδροξυλίου (HO^\bullet) προσβάλλει τη γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Helbock, Beckman, & Ames, 1999).



Εικόνα 5: Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

1.7 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μια διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS, RNS και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε τραυματισμό των ιστών και βλάβες του DNA. (Pisoschi & Pop, 2015). Πιο συγκεκριμένα δημιουργείται διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και οξειδωτικών, με ελαττωμένη δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών ή αύξηση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Η απόπτωση και η νέκρωση κυττάρων είναι μία άμεση επίπτωση του οξειδωτικού στρες



Εικόνα 6: Οξειδωτικό στρες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες του DNA, όπως η δημιουργία θραυσμάτων, την απώλεια δράσης του επιδιορθωτικού συστήματος, τις αλλαγές βάσεων, την απώλεια πουρινών και καταστροφή της δεοξυριβόζης. Επίσης επηρεάζει και άλλα βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, οδηγώντας σε αλλοίωση κυτταρικών λειτουργιών, απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας και διαφορετικά επίπεδα έκφρασης.

Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενο του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενο των κυττάρων περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, όπως CAT ή GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται σε θάνατο από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο “μηχανισμός αυτοκτονίας” του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες.

1.8 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Υπάρχουν ορισμένες ουσίες, οι οποίες αντισταθμίζουν τις επιπτώσεις που προκαλεί το οξειδωτικό στρες και ονομάζονται αντιοξειδωτικά (Dekkers, van Doornen, & Kemper, 1996). Αυτό επιτυγχάνεται εμποδίζοντας ή καθυστερώντας την οξείδωση υποστρώματος, ενώ μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή λιγότερο

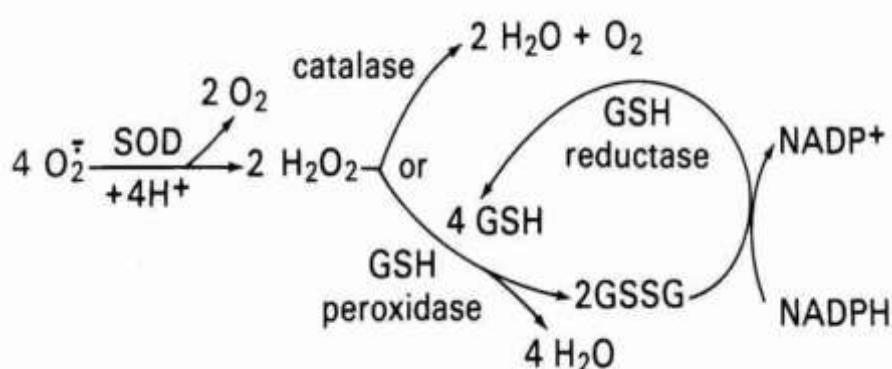
δραστικών ριζών (Krinsky, 2002). Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά, εξωγενή ή ενδογενή, υδρόφιλα ή υδρόφοβα.

1.8.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Ο οργανισμός διαθέτει ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια, επιδιορθώνουν τις βλάβες που δημιουργήθηκαν, καθώς εμποδίζουν το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να είναι ενζυμικοί και μη.

1.8.1.α Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Κύριο μηχανισμό ενάντια στο οξειδωτικό στρες αποτελούν τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό. Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξеноβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα 7: Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

1.8.1.β Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Εκτός από τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν και μηενζυμικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Αυτές περιλαμβάνουν τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη

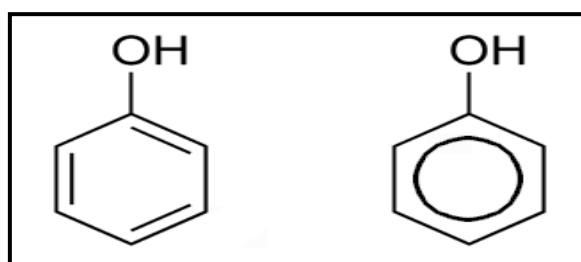
C (ασκορβικόξύ), τη βιταμίνη E (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες (γλουταθειόνη, ουρικόξύ, συνένζυμο Q10, φερριτίνη, χολερυθρίνη) και ιχνοστοιχεία (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπράγοντες. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι οι βιταμίνες C και E, οι οποίες έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki *et al.* 2003). Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστο αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες. Η βιταμίνη C με τη σειρά της, είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL).

1.8.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Ο κύριος τρόπος πρόσληψης των εξωγενών αντιοξειδωτικών από τον οργανισμό είναι μέσω της διατροφής. Κάποια εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι τα φλαβονοειδή, οι βιταμίνες C, E και A, η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων, το συνένζυμο Q10, ολιγοστοιχεία και φυτοχημικά.

1.9 Πολυφαινόλες

Τα φυτοχημικά αποτελούν την πιο συνηθισμένη πηγή αντιοξειδωτικών καθώς προσλαμβάνονται μέσω της τροφής (Tsao, 2010). Η πιο μεγάλη ομάδα είναι οι πολυφαινόλες, χημικές ουσίες που περιέχουν μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες. (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011).



Εικόνα 8: Δομή φαινολών

Πηγές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι το ελαιόλαδο, τα φρούτα, ο καφές, το τσάι, τα λαχανικά, το κόκκινο κρασί, οι ελιές, η σοκολάτα, βότανα, ξηροί καρποί και σόγια (D'Archivio, Filesi, Vari, Scazzocchio, & Masella, 2010). Τα παραπάνω αποτελούν τροφές που καταναλώνονται σε καθημερινή βάση, καθιστώντας τις πολυφαινόλες αντιοξειδωτικά με μεγάλη αξία.

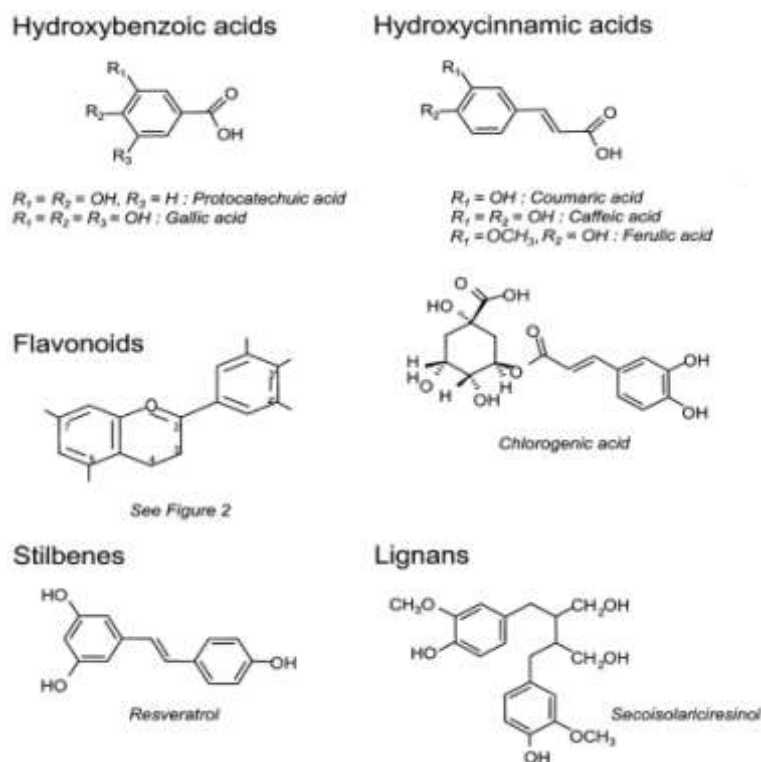
1.9.1 Φυσικές ιδιότητες

Οι πολυφαινόλες μπορεί να έχουν και μεγάλο και μικρό μοριακό βάρος, έχουν χαμηλό σημείο τήξεως, ενώ μπορούν να βρίσκονται σε υγρή ή στερεή μορφή. Οι πολυφαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους είναι λιποδιαλυτές, ενώ οι χαμηλού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτές,

1.9.2 Χημική δομή και τάξεις πολυφαινολών

Στα φυτικά ήδη έχουν προσδιοριστεί πάνω από 8000 πολυφαινόλες. Οι πρόδρομες ενώσεις των πολυφαινολών είναι η φαινυλαλανίνη και το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες (Papadopoulou & Frazier, 2004). Συνήθως βρίσκονται συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Κύριο δομικό χαρακτηριστικό αποτελεί η υψηλή συγγένεια δέσμευσης με πρωτεΐνες, ενώ μπορούν να βρίσκονται ενωμένες με λιπίδια, αμίνες, οργανικά και καρβοξυλικά οξέα. Μπορεί να γίνει διάκριση τους σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (Manach *et al.* 2005).

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες και αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάται στη διατροφή (Manach *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Αποτελούνται από δύο δακτυλίους ενωμένους με τρία άτομα άνθρακα. Τα μη φλαβονοειδή διακρίνονται σε φαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνες (Manach *et al.* 2004). Πρόδρομα μόρια των φαινολικών οξέων αποτελούν το βενζοϊκό οξύ και το κιναιμικό οξύ, ενώ παρατηρούνται συνήθως σε τρόφιμα όπως τα μήλα, το τσάι, ο καφές και το κόκκινο κρασί. Χαρακτηρίζονται για τις αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.



Εικόνα 9: Είδη πολυφαινολών

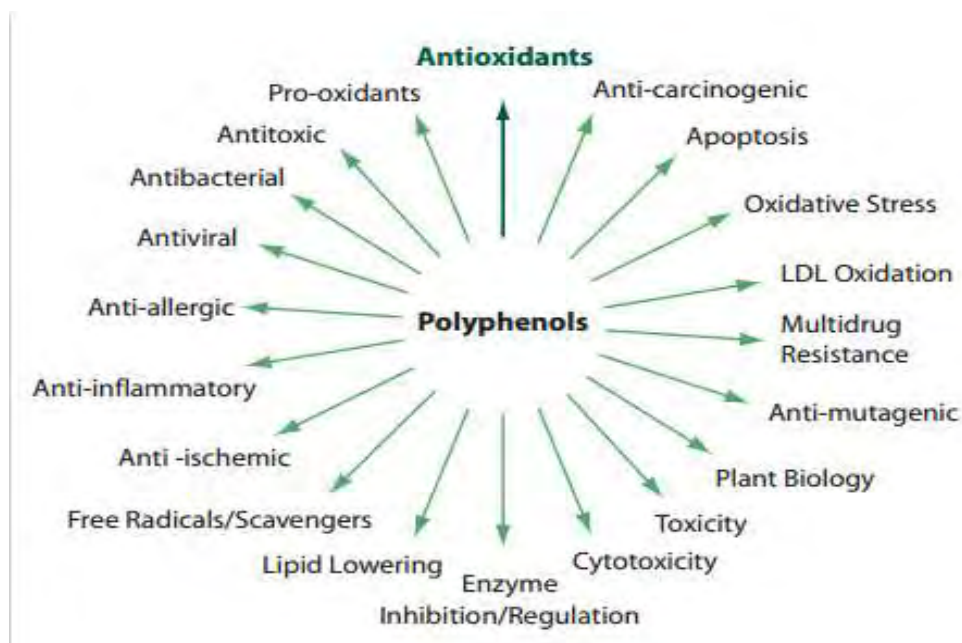
1.9.3 Ευεργετικές επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία

Κύριος ρόλος των πολυφαινολών είναι η δέσμευση με πρωτεΐνες, με πεπτικά ένζυμα και η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (Mennen et al. 2005). Μπορούν είτε να δίνουν σε ελεύθερες ρίζες ένα ηλεκτρόνιο, ώστε να γίνονται σταθερές και σταματά η διάδοσή τους, είτε να μετατρέπονται οι ίδιες σε ρίζες λιγότερο δραστικές. Επιπλέον δρουν ως συν-αντιοξειδωτικά αυξάνοντας τα επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών, ενώ αναστέλλουν την οξειδάση της ζανθίνης και συμμετέχουν στην αναγέννηση βιταμινών.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι η δέσμευση μετάλλων μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{+2} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξείδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές $OH\cdot$. Ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες παρουσιάζοντας προ-οξειδωτική ικανότητα, οπότε απαιτούνται μελέτες για την εντοπισμό της κατάλληλης δόσης για τον οργανισμό, ώστε να έχουν αντιοξειδωτική δράση (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert et al. 2005).

Οι πολυφαινόλες έχει δειχθεί ότι έχουν προστατευτικές ιδιότητες σε πολλές ασθένειες, όπως καρκίνος, διαβήτης, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οστεοπόρωση και

καρδιαγγειακές νόσους. Επίσης παρουσιάζουν θετική επίδραση σε καρδιοπάθειες, διάφορες αλλεργίες και στην παχυσαρκία(Rodrigoetal. 2014; Bouayed et al. 2011).



Εικόνα 10: Παράγοντες στους οποίους οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετική δράση

1.10 Ευρωπαϊκή Καστανιά (*Castanea Sativa*)

Η ευρωπαϊκή καστανιά (*Castanea Sativa*) αποτελεί πολύτιμο αντικείμενο εκμετάλλευσης για τον άνθρωπο, τόσο για τον πλούσιο, θρεπτικό καρπό της, όσο και για την ανθεκτική ξυλεία της (Conedera, Krebs, Tinner, Pradella, & Torriani, 2004). Ο βιολογικός κύκλος της καστανιάς διαρκεί 6-7 μήνες, με αυξημένες τις ανάγκες της κατά τους θερινούς μήνες, με την ωρίμανση των καρπών της να ολοκληρώνεται κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Το δέντρο της καστανιάς μπορεί να φτάσει έως τα 25-30 μέτρα ύψος ενώ ο κορμός του αυξάνει έως 2 μέτρα πλάτος.



Εικόνα 12: *Castaneasativa* και ο καρπός της.

Οι ποικιλίες καστανιάς διακρίνονται στις τύπου *Castanea mollissima*, *Castanea sativa* και στα Ευρω-Ιαπωνικά υβρίδια. Η *Castanea sativa* φύεται και καλλιεργείται σε όλες τις χώρες της Ευρώπης και ονομάζεται ιταλική, ισπανική και γλυκιά καστανιά. Στην Ελλάδα συναντάται σε πολλές περιοχές της Βόρειας, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, ακόμη και στην Κρήτη (Γκουνταράς, 2012). Αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης επιστημονικών ερευνών, τόσο για τα θρεπτικά συστατικά που διαθέτει το ίδιο το κάστανο ως τροφή, όσο και για τις χρήσιμες ουσίες που περιέχουν τα φύλλα, τα άνθη και οι ιστοί της *Castanea sativa* γενικότερα (de Vasconcelos et al., 2010; Jukić et al., 2014; Neri, Dimitri, & Sacchetti, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, ο καρπός των καστανών αποτελείται από σύνθετους υδατάνθρακες (κυρίως άμυλο), πρωτεΐνες, βιταμίνες και ανόργανα άλατα, καθώς και αντιοξειδωτικά, ενώ διαθέτει χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα (Donno, Beccaro, Mellano, Bonvegna, & Bounous, 2014). Επίσης έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λυσίνη, θρεονίνη και γ-αμινοβουτυρικού οξέος, κάτι που τα καθιστά μια πολύ καλή προβιοτική πηγή. Ωστόσο μερικά από τα πιο σημαντικά τους θρεπτικά συστατικά δεν βρίσκονται μόνο στον καρπό της καστανιάς, αλλά και στα φύλλα και άλλους ιστούς. Οι ιστοί της *Castaneasativa* περιέχουν δευτερεύοντες μεταβολίτες όπως φλαβονοειδή και ταννίνες, ενώ ο σημαντικότερος μεταβολίτης φαίνεται πως είναι το βανιλλικό οξύ.

Επιπρόσθετα τα κάστανια διακρίνονται για το υψηλό αντιοξειδωτικό και φαινολικό τους δυναμικό. Αποτελούν μια πλούσια πηγή υδρόφιλων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως ελεύθερα σάκχαρα, οργανικά οξέα και πολυφαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μειώνουν τη δράση ελευθέρων ριζών και πολλές φορές να την εξαλείφουν, ενώ παρέχουν προστασία στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Σε μια έρευνα μελετήθηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο σε καστανιές από 16 περιοχές της Τουρκίας (Otlas & Selek, 2012). Με βάση τα αποτελέσματα, το πολυφαινολικό περιεχόμενο κυμαινόταν από 5 mgGAE/g ξηρής μάζας έως και 32.82 mgGAE/g ξηρής μάζας.

Επομένως το φυτό αποτελεί μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών, τα οποία συσχετίζονται με την πρόληψη ορισμένων ασθενειών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες, όπως φλεγμονώδεις νόσοι, ισχαιμικές ασθένειες, καρκίνος, εμφύσημα, γαστρικά έλκηπέρταση και νευρολογικές παθήσεις (Barreira, Ferreira, Oliveira, & Pereira, 2010; Braga, Rodrigues, Beatriz, & Oliveira, 2015). Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα φύλλα της καστανιάς παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική

ικανότητα από ότι ο καρπός (Vella, Laratta, La Cara, & Morana, 2018). Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών μορίων που περιέχουν καθίσταται θεμελιώδους σημασίας, για την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού και τη χρήση τους σε τροφές, κάτι που θα έχει ωφέλιμες επιδράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων καρπών και φύλλων καστανιάς, καθώς και ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων σε μαλτοδεξτρίνη και οροπρωτεΐνη. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε το τεστ του Ames. Πιο συγκεκριμένα έγινε δοκιμή των εκχυλισμάτων σε καλλιέργειες βακτηρίων *S. Typhimurium TA102*, παρουσία του μεταλλαξιγόνου παράγοντα t-BOOH.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1Τεστ του Ames

Το Τεστ του Ames αποτελεί μία σχετικά γρήγορη και αξιόπιστη δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνου και αντι-μεταλλαξιγόνου δράσης ουσιών (Mortelmans & Zeiger, 2000). Είναι in vitro δοκιμασία, όπου χρησιμοποιείται το βακτήριο *Salmonellatyphimurium*, που έχει απενεργοποιημένο, λόγω μεταλλάξεων, το οπερόνιο της ιστιδίνης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μειωμένη ανάπτυξη παρουσία ιστιδίνης. Για την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος TA102, το οποίο χαρακτηρίζεται για την υψηλή ευαισθησία του σε οξειδωτικές βλάβες. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του στελέχους είναι:

- Υψηλή διαπερατότητα σε χημικές ενώσεις, λόγω μετάλλαξης του γονιδίου *rfa*.
- Αυξημένη μεταλλαξιγένεση, λόγω του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, ο οποίος ενεργοποιείται από το πλασμίδιο *pKM101*.
- Αυξημένη δημιουργία επαναμεταλλάξεων, λόγω παρουσίας πλασμιδίων *pAQ1*, τα οποία φέρουν μετάλλαξη στο οπερόνιο της ιστιδίνης.

Επομένως κατά την δοκιμασία Ames η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους σε θρεπτικό υλικό παρουσία ιστιδίνης θα έχει ως αποτέλεσμα ένας μικρό κύκλο διαιρέσεων, καθώς υπάρχει αυξημένη πιθανότητα επαναμετάλλαξης του οπερονίου της ιστιδίνης, δίνοντας έναν αριθμό αποικιών περίπου 200-250 ανά τριβλίο. Με τη χορήγηση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα ο αριθμός των επαναμεταλλάξεων αυξάνεται, επομένως και ο αριθμός των αποικιών. Αντίθετα με την ταυτόχρονη χορήγηση αντιμεταλλαξιγόνου παράγοντα, μειώνεται ο αριθμός των επαναμεταλλάξεων, με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο αριθμός των αποικιών.

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας t-BOOH, σε συγκέντρωση τέτοια ώστε περίπου να διπλασιάζεται ο αριθμός των αποικιών με τη δράση του. Για τον έλεγχο αντι-μεταλλαξιγόνου δράσης χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικά εκχυλίσματα της *Castanea*

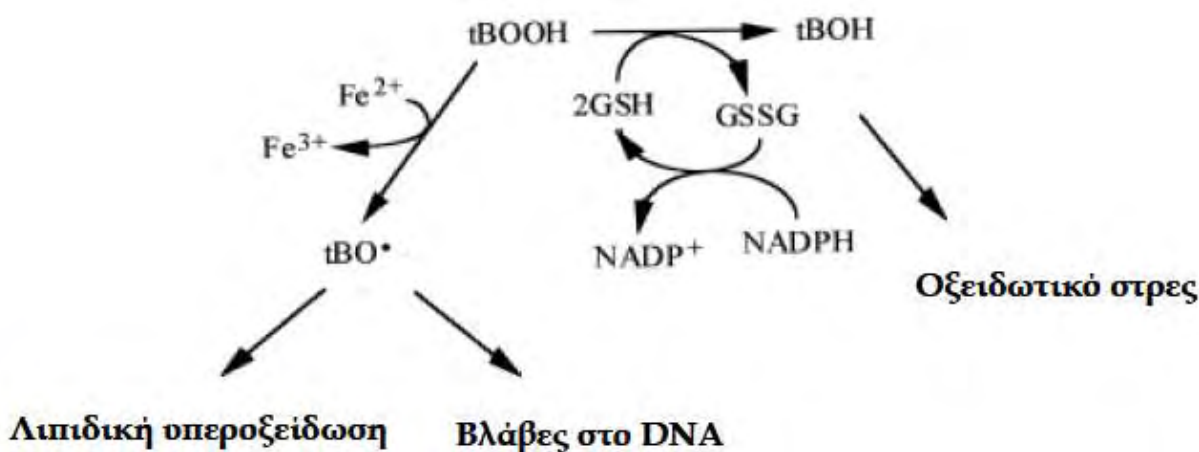
sativa, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, τα οποία αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες καθαρή μαλτοδεξτρίνη και οροπρωτεΐνη). Με βάση προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου το πολυφαινολικό περιεχόμενο των φύλλων είναι 158 mgGAE/g ξηρού βάρους ενώ αυτό των καρπών 42,7 mgGAE/g ξηρού βάρους (αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Πίνακας 3: Εκχυλίσματα φύλλων και καρπών καστανιάς

1. Σκέτα κάστανα	2. Σκέτα φύλλα
3. Μαλτοδεξτρίνη φύλλα	4. Μαλτοδεξτρίνη κάστανα
5. Οροπρωτεΐνη φύλλα	6. Οροπρωτεΐνη κάστανα

3.1.1 Μηχανισμός δράσης του *t*-BOOH

Όπως προαναφέρθηκε, ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας αυτής της μελέτης ήταν το οργανικό υδροϋπεροξειδίο *t*-BOOH (Hix, Kadiiska, Mason, & Augusto, 2000). Το *t*-BOOH εξαντλεί τα ενδογενή επίπεδα GSH μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί σε οξειδωτικό στρες. Επιπρόσθετα αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} , σχηματίζοντας τη ρίζα *t*-BO \cdot και επάγεται η λιπιδική υπεροξείδωση.



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης του *t*-BOOH

3.1.2 Δοκιμασία εκτίμησης της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων καστανιάς

Το πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η κατασκευή του διαλύματος glucose minimal agar, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε τριβλία. Το θρεπτικό μέσο αποτελούνταν από 15 gr agar, 20 ml διαλύματος VB salts και 60 ml

διαλύματος γλυκόζης, σε 1000 ml διαλύματος. Για την δημιουργία του διαλύματος VB salts χρησιμοποιήθηκαν 13 ml H₂O, 0,2 gr NaSO₄, 2 gr κιτρικού οξέως, 10 gr K₂HPO₄ και 3.5 gr Sodium ammonium phosphate σε 20 ml διαλύματος. Για τη δημιουργία του διαλύματος γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν 6 gr γλυκόζης σε 60 ml διαλύματος.

Αρχικά, στο θρεπτικό υλικό (NutrientBroth) προστέθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Salmonellatyphimurium* TA102 και επώαστηκε στους 37°C έως ότου η οπτική απορρόφηση στα 540 nm φτάσει το 0,1-0,2 (αντιστοιχεί σε 1-2x10⁹ αποικίες ανά ml), που υποδηλώνει ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση αύξησης. Το Nutrient Broth περιείχε 0,24 gr Merck Broth σε 30 mlH₂O.

Στη συνέχεια από την καλλιέργεια του στελέχους, 100 μl της καλλιέργειας προστέθηκαν σε 2 ml διαλύματος Top Agar μαζί με 50 μl t-BOOH και 50 μl εκχυλίσματος καστανιάς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 6 διαδοχικών αραιώσεων. Το Top Agar περιείχε 0,48 gr agar, 0,48 gr NaCl και 8 ml διαλύματος His/Biotin σε 80 ml διαλύματος. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 45°C αφενός για να μην πήξει το άγαρ και αφετέρου για να μην υποστούν ανεπανόρθωτη βλάβη τα βακτήρια από τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, το διάλυμα επιστρώθηκε στο τριβλίο με GM άγαρ. Στη συνέχεια, αφού το άγαρ στερεοποιήθηκε τα τριβλία τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 37°C για 48 ώρες και έπειτα έγινε καταμέτρηση των αποικιών.

Κάθε συγκέντρωση εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία πειράματα. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιείχε οξειδωτικό παράγοντα ούτε εκχύλισμα καστανιάς, ενώ ο θετικός μάρτυρας δεν περιείχε εκχύλισμα καστανιάς. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε και η επίδραση των εκχυλισμάτων καστανιάς στα βακτήρια απουσία του οξειδωτικού παράγοντα στις 2 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κάθε εκχυλίσματος. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες.

3.1.3 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας

Τέλος εξετάστηκε σε οπτικό μικροσκόπιο (40x μεγέθυνση) εάν το t-BOOH και τα εκχυλίσματα καστανιάς παρουσίαζαν τοξική δράση. Για να μελετηθεί αυτό παρατηρήθηκαν μικρές αποικίες (δεν φαίνονται με γυμνό οφθαλμό), οι οποίες οφείλονται σε ίχνη ιστιδίνης που οδηγεί σε διαιρέσεις και στα μη επαναμεταλλαγμένα βακτήρια. Επομένως σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα παρατηρήθηκαν τα τριβλία με τα εκχυλίσματα καστανιάς, και αν ο αριθμός των αποικιών ήτανε

παρόμοιος δεν υπήρχε τοξικότητα, ενώ αν ήταν μειωμένος το εκχύλισμα είχε τοξική δράση.

3.1.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Εφόσον πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των αποικιών υπολογίστηκε η τιμή IC50 για κάθε εκχύλισμα με βάση το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του *t*-BOOH υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left(\frac{A_{\theta} - A_{\delta}}{A_{\theta} - A_0} \right) \times 100\%$$

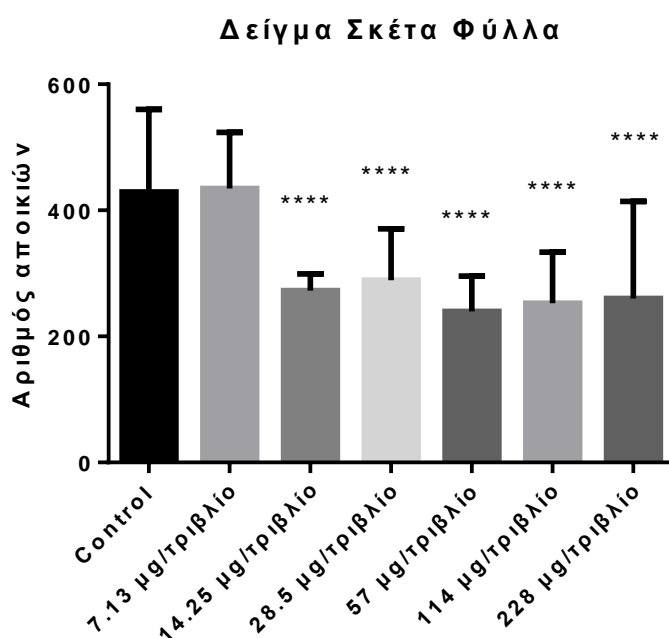
A_{θ} : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τριβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και *t*-BOOH).

A_{δ} : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τριβλίο παρουσία του εκχυλίσματος καστανιάς (TA102, εκχύλισμα και *t*-BOOH).

A_0 : Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His+/τριβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

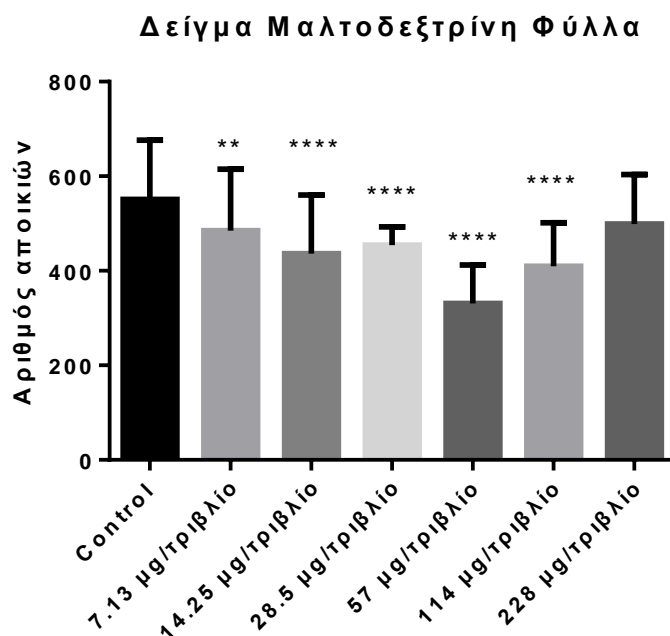
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την πραγματοποίηση του Ames test στα εξεταζόμενα δείγματα. Το πρώτο δείγμα αφορούσε σκέτα φύλλα καστανιάς (Διάγραμμα 1). Σε όλες τις συγκεντρώσεις άνω των 7,13 $\mu\text{g}/\text{τριβλίο}$ παρατηρήθηκε ικανότητα αναστολής της μεταλλαξιγένεσης έως και 49,5% στη συγκέντρωση των 57 $\mu\text{g}/\text{τριβλίο}$.



Διάγραμμα 1: Τεστ του Ames για σκέτα φύλλα. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH). Με (*) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου (control). Αναλόγως της στάθμης σημαντικότητας χρησιμοποιούνται διαφορετικοί αστερίσκοι ($p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***; $p \leq 0,0001$: ****).

Στο διάγραμμα 2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς ενθυλακωμένων με μαλτοδεξτρίνη. Όλες οι συγκεντρώσεις

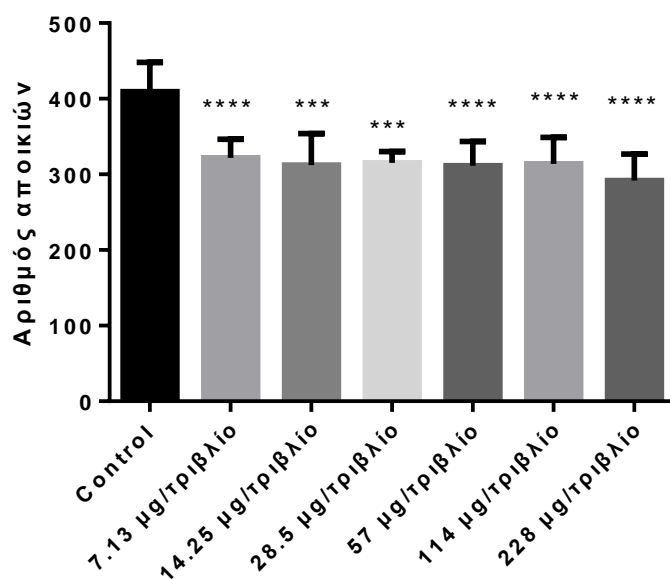
προκάλεσαν μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών, με την ισχυρότερη επίδραση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 57 μg/τριβλίο με μείωση κατά 34,1% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control). Στη συγκέντρωση 228 μg/τριβλίο δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αναστολή μεταλλαξιογόνου δράσης.



Διάγραμμα 2: Τεστ του Ames για φύλλα ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH). Με (*) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου (control). Αναλόγως της στάθμης σημαντικότητας χρησιμοποιούνται διαφορετικοί αστερίσκοι ($p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***; $p \leq 0,0001$: ****).

Στο διάγραμμα 3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης εκχυλίσματος φύλλων καστανιάς ενθυλακωμένων με οροπρωτεΐνη. Όλες οι συγκεντρώσεις προκάλεσαν παρεμφερή μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών, με την ισχυρότερη επίδραση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 228 μg/τριβλίο με μείωση κατά 27,8 % σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).

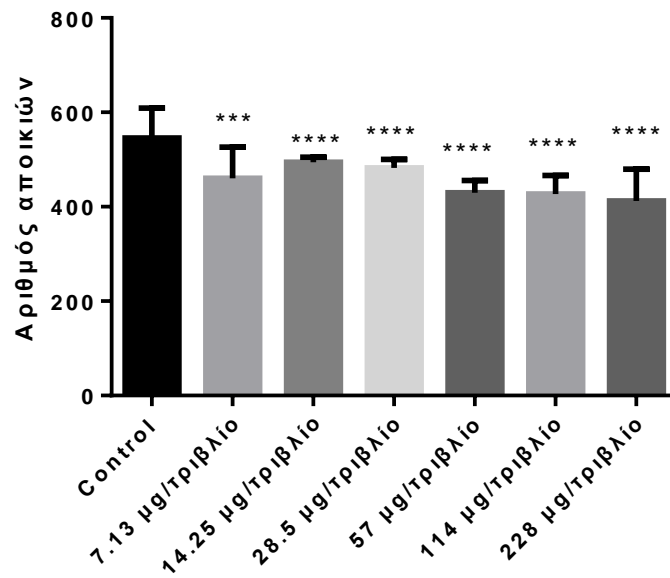
Δείγμα Οροπρωτεΐνη Φύλλα



Διάγραμμα 3: Τεστ του Ames για φύλλα ενθυλακωμένα σε οροπρωτεΐνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH). Με (*) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου (control). Αναλόγως της στάθμης σημαντικότητας χρησιμοποιούνται διαφορετικοί αστερίσκοι ($p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***; $p \leq 0,0001$: ****).

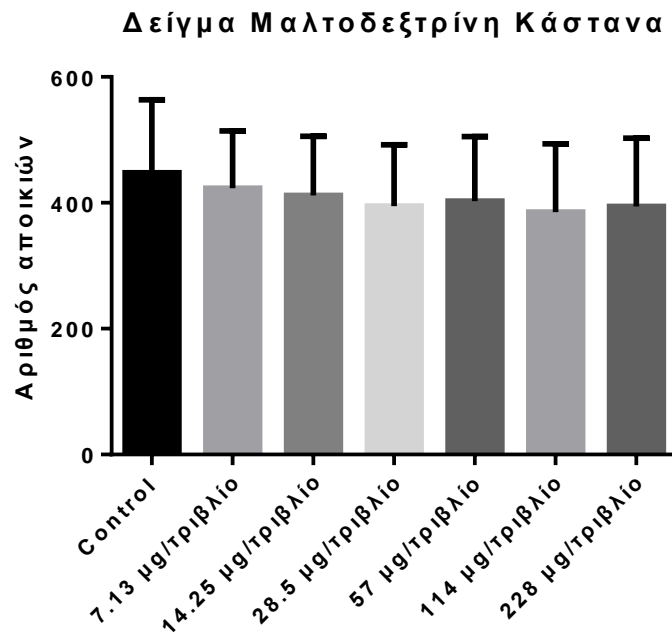
Στο διάγραμμα 4 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης εκχυλίσματος κασάνων. Όλες οι συγκεντρώσεις προκάλεσαν μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών, με την ισχυρότερη επίδραση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 228 µg/τριβλίο με μείωση κατά 26,6 % σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).

Δείγμα Σκέτα Κάστανα



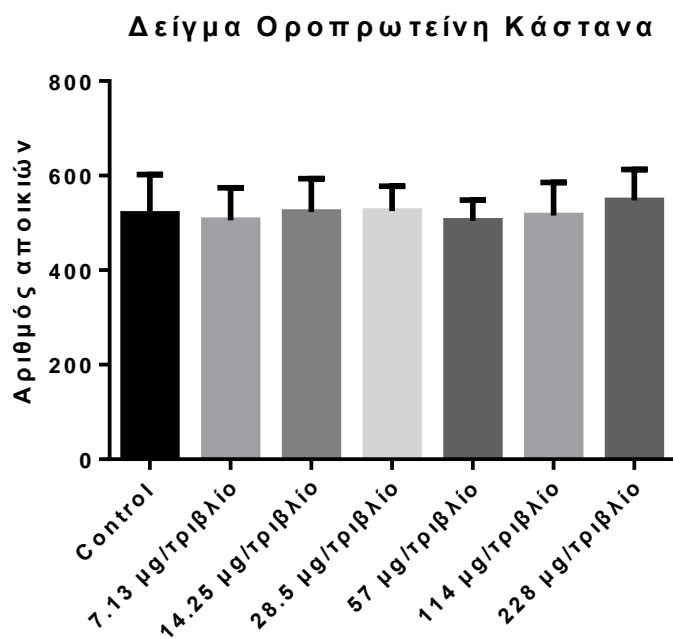
Διάγραμμα 4: Τεστ του Ames για σκέτα κάστανα. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH). Με (*) υποδηλώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) με τα τριβλία ελέγχου (control). Αναλόγως της στάθμης σημαντικότητας χρησιμοποιούνται διαφορετικοί αστερίσκοι ($p \leq 0,05$: *; $p \leq 0,01$: **; $p \leq 0,001$: ***; $p \leq 0,0001$: ****).

Στο διάγραμμα 5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης εκχυλίσματος καστανών ενθυλακωμένων με μαλτοδεξτρίνη. Σε καμία συγκέντρωση δεν προκλήθηκε μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).



Διάγραμμα 5: Τεστ του Ames για κάστανα ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH).

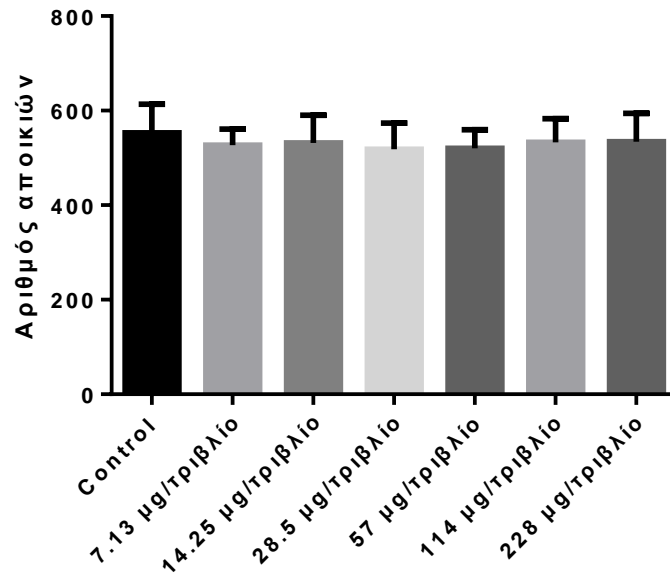
Στο διάγραμμα 6 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης εκχυλίσματος καστώνων ενθυλακωμένων με οροπρωτεΐνη. Σε καμία συγκέντρωση δεν προκλήθηκε μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).



Διάγραμμα 6: Τεστ του Ames για κάστανα ενθυλακωμένα σε οροπρωτεΐνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH).

Στο διάγραμμα 7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης σκέτης μαλτοδεξτρίνης. Σε καμία συγκέντρωση δεν προκλήθηκε μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).

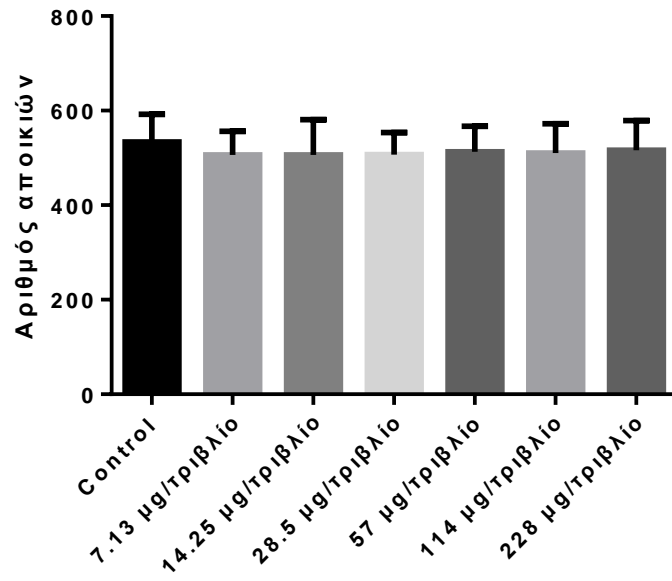
Δείγμα Μαλτοδεξτρίνη Σκέτη



Διάγραμμα 7: Τεστ του Ames για σκέτη μαλτοδεξτρίνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH).

Στο διάγραμμα 8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της χορήγησης σκέτης οροπρωτεΐνης. Σε καμία συγκέντρωση δεν προκλήθηκε μείωση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).

Δείγμα Οροπρωτεΐνη Σκέτη



Διάγραμμα 8: Τεστ του Ames για σκέτη οροπρωτεΐνη. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μετά την αφαίρεση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών των τριβλίων ελέγχου (που δεν χορηγήθηκε ούτε δείγμα, ούτε t-BOOH).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων φύλλων και καρπών καστανιάς.

Τα κάστανα αποτελούν μία από τις πιο διαδεδομένες τροφές που καταναλώνονται παγκοσμίως. Αν και πιο διαδεδομένη πηγή τροφής αποτελεί ο καρπός της καστανιάς, μεγάλη αξία έχουν και τα φύλλα της. Ο καρπός της καστανιάς αποτελεί μια πολύ θρεπτική τροφή καθώς έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σύνθετους υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, βιταμίνες και άλλα βιομόρια, ενώ αποτελεί μια πλούσια πηγή πολυφαινολικών ενώσεων. Αντίστοιχα τα φύλλα διαθέτουν ένα πολύ υψηλότερο ποσοστό πολυφαινολών, κάτι που καθιστά τόσο τον καρπό όσο και τα φύλλα υψηλού ερευνητικού ενδιαφέροντος για αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνους δράσεις.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν εκχυλίσματα φύλλων και καρπών καστανιάς, τόσο σκέτα όσο και ενθυλακωμένα ως προς την επίδραση στην μεταλλαξιγόνο δράση του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH. Αρχικά, παρήχθησαν τα υδατικά εκχυλίσματα. Συνολικά εξετάστηκε ένα δείγμα φύλλων σε τρεις μορφές (σκέτο, ενθυλακωμένο είτε με μαλτοδεξτρίνη είτε με οροπρωτεΐνη) και ένα δείγμα καρπών επίσης σε τρεις μορφές (σκέτο, ενθυλακωμένο είτε με μαλτοδεξτρίνη είτε με οροπρωτεΐνη) που προέρχονται από το είδος *Castanea sativa*.

Λόγω λοιπόν τη υψηλής περιεκτικότητας των φύλλων και των καρπών καστανιάς σε πολυφαινόλες πραγματοποιήθηκε το τεστ του Ames με σκοπό την εξέταση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των αντίστοιχων εκχυλισμάτων. Το εκχύλισμα των σκέτων φύλλων παρουσίασε αυξανόμενη αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης που προκάλεσε το *t*-BOOH στα βακτήρια σε έξι διαδοχικές αραιώσεις. Σε συγκεντρώσεις 7,13, 14,25, 28,5, 57, 114 και 228 $\mu\text{g}/\text{τριβλίο}$ παρατηρήθηκε αναστολή 10,9, 26,4, 28,8, 30,3, 38,7 και 49,5 % αντίστοιχα. Αν ληφθεί υπόψη η υψηλή περιεκτικότητα

των φύλλων καστανιάς σε πολυφαινόλες τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα και τονίζουν την μεγάλη αξία τους ως φυτό με πλούσια αντιοξειδωτική δράση.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε η ίδια δοκιμασία για εκχύλισμα καστανίου. Παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις 7,13, 14,25, 28,5, 57, 114 και 228 μg/τριβλίο μια διαδοχική αύξηση αναστολής της μεταλλαξιγόνου δράσης κατά 10,7, 15,3, 15,6, 25,1, 26,6 και 20,2 % αντίστοιχα. Σαφώς και τα επίπεδα αναστολής μπορούν να χαρακτηριστούν ικανοποιητικά, όμως είναι πολύ μικρότερα από αυτή που έδειξε το εκχύλισμα των φύλλων καθώς η περιεκτικότητα των καρπών σε πολυφαινόλες είναι αρκετά μικρότερη. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι σε συγκέντρωση 228 μg/τριβλίο παρατηρήθηκε μείωση της αναστολής σε σχέση με τις προηγούμενες δύο συγκεντρώσεις. Ένα χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση. Αυτό αποτελεί ένα κομβικό σημείο καθώς χρήζει διερεύνησης η ποσότητα της εκάστοτε πολυφαινόλης, στην οποία εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση, για αποφευχθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες για τον οργανισμό.

Η ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων αποτελεί μια πολύ σημαντική διεργασία και χρησιμοποιείται ευρέως για ουσίες που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, ζωοτροφές και καλλυντικά. Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται οι ουσίες από οξείδωση, ενώ ως διεργασία προσδίδει ασφάλεια, εύκολη διαχείριση και λιγότερο κόστος και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση σε μαλτοδεξτρίνη και οροπρωτεΐνη, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων και ζωοτροφών.

Τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα φύλλων σε μαλτοδεξτρίνη στις συγκεντρώσεις 7,13, 14,25, 28,5, 57, 114 και 228 μg/τριβλίο παρουσίασαν αναστολή 12,2, 21,8, 28,3, 34,1, 23,1 και 9 % αντίστοιχα. Παρατηρείται μια ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνος δράση μέχρι τη συγκέντρωση των 57 μg/τριβλίο, ενώ στη συνέχεια μειώνεται κάτι που δείχνει πιθανή ύπαρξη προ-οξειδωτικής δράσης. Στο εκχύλισμα καστανίων σε μαλτοδεξτρίνη δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αναστολή.

Για το εκχύλισμα οροπρωτεΐνης-φύλλων παρατηρήθηκε επίσης αντιμεταλλαξιγόνος δράση, και παρουσίαζε αναστολή 21,4, 22,8, 22,1, 22,7, 22,1 και 27,8 % στις συγκεντρώσεις 7,13, 14,25, 28,5, 57, 114 και 228 μg/τριβλίο αντίστοιχα. Πάλι παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις 28,5, 57 και 114 μg/τριβλίο μειωμένη

αναστολή. Τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα καστανών-οροπρωτεΐνης έδειξαν ότι δεν σημείωσε κάποια αναστολή.

Επομένως αν συγκριθούν όλα τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων βγαίνει το συμπέρασμα ότι τη μεγαλύτερη αντιμεταλλαξιγόνο δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα σκέτων φύλλων και μάλιστα με μεγάλη διαφορά από το δεύτερο.

Σε μια παλιότερη μελέτη είχε βρεθεί πως τα υδατικά εκχυλίσματα φύλλων καστανιάς περιέχουν έως και 224 mg/g εκχυλίσματος πολυφαινόλες, αριθμός που είναι ακόμα μεγαλύτερος με τη χρήση διαφορετικού διαλύτη (Calliste, Trouillas, Allais, & Duroux, 2005). Σε μια άλλη οι συνολικές πολυφαινόλες των φύλλων έφταναν τα 103 mgGAE/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος ενώ αυτές των καρπών από 7,66 – 42,82 mgGAE/g ξηρού βάρους (“Bioactive Compounds of Chestnuts as Health Promoters,” 2016). Αντίστοιχες ποσότητες παρατηρήθηκαν και στα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, με τις πολυφαινόλες των φύλλων να είναι 158 mgGAE/g ξηρού βάρους ενώ αυτές των καρπών 42,7 mgGAE/g ξηρού βάρους όπως έχει υπολογιστεί σε άλλη εργασία. Τα αποτελέσματα άλλης εργασίας του εργαστηρίου (αδημοσίευτα αποτελέσματα) έδειξαν ότι η ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση των φύλλων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εξετάστηκε στις μεθόδους DPPH, ABTS, ρίζας σουπεροξειδίου και ρίζας υδροξυλίου καθώς και της αναγωγικής ισχύος (Reducing power). Το ισχυρότερο δείγμα σε όλες αυτές τις δοκιμασίες ήταν αυτό των σκέτων φύλλων, το οποίο είχε μακράν του δεύτερου την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Αυτό παρατηρήθηκε και στο τεστ του Ames, καθώς το ισχυρότερο εκχύλισμα όλων ήταν αυτό με τα σκέτα φύλλα. Επιπλέον, και στην περίπτωση ενθυλάκωσης είτε με μαλτοδεξτρίνη είτε με οροπρωτεΐνη, το εκχύλισμα φύλλων ήταν πιο ισχυρό από το αντίστοιχο εκχύλισμα των καρπών. Κατά αυτό τον τρόπο, παρατηρείται μια σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πολυφαινόλες και της δραστηριότητάς τους, είτε αντιοξειδωτικής, είτε αντιμεταλλαξιγόνου. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε προγενέστερες έρευνες του εργαστηρίου με διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα όπως για παράδειγμα ο καφές, τα στέμφυλα, το τσάι και το ελαιόλαδο (Kouka et al., 2019; Priftis, Mitsiou, et al., 2018; Priftis, Panagiotou, et al., 2018; Stagos et al., 2018). Η αντιοξειδωτική δράση των καρπών και ιδιαίτερα των φύλλων καστανιάς οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδή και τανίνες. Πιο συγκεκριμένα σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται

να έχουν τα φαινορικά οξέα, το γαλλικό οξύ και το ελλαγικό οξύ, τα οποία περιέχονται σε φύλλα και καρπούς καστανιάς (Cristina Galinanes, M. Sonia Freire, Julia Gonzalez-Alvarez. 2015) .

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, εκχυλίσματα φύλλων, καστάνων και ενθυλακωμένα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από μονόκλωνα σπασίματα προκαλούμενα από τ ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και περοξυλίου(αδημοσίευτα αποτελέσματα). Για την ρίζα OH^{\bullet} τα φύλλα παρουσίαζαν την καλύτερη ανασταλτική ικανότητα σε σχέση με τα κάστανα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη ρίζα ROO^{\bullet} . Επομένως παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα φύλλων παρουσίαζε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση , ενώ το εκχύλισμα καστάνων πιο ήπια. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και με το τεστ του Ames που φάνηκε η ισχυρή αντιμεταλλαξιογόνος δράση του εκχυλίσματος φύλλων και η πιο ήπια του εκχυλίσματος καστάνων.

Εν κατακλείδι, τα εκχυλίσματα φύλλων και καρπών καστανιάς που εξετάστηκαν παρουσίασαν αντιμεταλλαξιογόνο δράση. Ο προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιογόνου δράσης εκχυλισμάτων καστανιάς με τη δοκιμασία Ames test είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται. Τα αποτελέσματα αυτά προσδίδουν νέες, ενδιαφέρουσες και ευεργετικές για τον οργανισμό ιδιότητες σε αυτό το δημοφιλές φυτό. Βέβαια, είναι απαραίτητο να λάβουν χώρα περαιτέρω μελέτες για να διερευνηθεί και ο μοριακός μηχανισμός της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ames, B. N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 206, 3–32.
- Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/1082013209353983>
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>
- Bioactive Compounds of Chestnuts as Health Promoters. (2016). In *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part II*. <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010009>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Braga, N., Rodrigues, F., Beatriz, M., & Oliveira, P. P. (2015). *Castanea sativa* by-products: A review on added value and sustainable application. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.955488>
- Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., & Duroux, J. L. (2005). *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: An electronic spin resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf049341c>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian

organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605.

Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.

Cristina Galinanes, M. Sonia Freire, Julia Gonzalez-Alvarez (2015). Antioxidant activity of phenolic extracts from chestnut fruit and forest industries residues. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Conedera, M., Krebs, P., Tinner, W., Pradella, M., & Torriani, D. (2004). The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany*.
<https://doi.org/10.1007/s00334-004-0038-7>

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342.
<https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895–9901.

de Vasconcelos, M. do C. B. M., Bennett, R. N., Quideau, S., Jacquet, R., Rosa, E. A. S., & Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.008>

Dekkers, J. C., van Doornen, L. J., & Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 21(3), 213–238.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115.

Donno, D., Beccaro, G. L., Mellano, M. G., Bonvegna, L., & Bounous, G. (2014). *Castanea* spp. buds as a phytochemical source for herbal preparations: Botanical

- fingerprint for nutraceutical identification and functional food standardisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6627>
- Downey, J. M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annual Review of Physiology*, *52*, 487–504. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.002415>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *18*(10), 872–879.
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *11*(7), 526–534.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*, *61*, 73–101.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, *116*(5), 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymology*, *300*, 156–166.
- Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., & Augusto, O. (2000). In vivo metabolism of tert-Butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/tx0001301>
- Jukić, H., Mujić, I., Vladimir-Knežević, S., Rudić, D., Jug, T., Živković, J., & Nikolić, G. (2014). The role and significance of castanea sativa Mill. Leaf polyphenols on sensory and organoleptic properties of food. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1043.23>
- Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(11), 1388–1395.

- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., ... Owen, R. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European journal of cancer prevention : The official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), 67–75. <https://doi.org/10.1097/01.cej.0000051106.40692.d3>
- 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*, 2019, 1870965. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S-542S.
- Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9880–9884.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502.
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research*, 443(1–2), 129–138.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004b). Polyphenols: food sources and bioavailability.

The American journal of clinical nutrition, 79(5), 727–747.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 230S-242S.
- Mennen, L., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 326S-329S.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(4), 477–503. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034>
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295–309.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(9 Suppl), 30S-34S.
- Neri, L., Dimitri, G., & Sacchetti, G. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of cured chestnuts from three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.03.002>
- Otles, S., & Selek, I. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activities of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruits. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2012.00180.x>
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>

- Papadopoulou, A., & Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(3–4), 186–190. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.017>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Priftis, A., Mitsiou, D., Halabalaki, M., Ntasi, G., Stagos, D., Skaltsounis, L. A., & Kouretas, D. (2018). Roasting has a distinct effect on the antimutagenic activity of coffee varieties. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *829–830*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.03.003>
- Priftis, A., Panagiotou, E.-M., Lakis, K., Plika, C., Halabalaki, M., Ntasi, G., ... Kouretas, D. (2018). Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *114*, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.029>
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, *27*(11–12), 1173–1181.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *50*(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Ray, R. S., Mehrotra, S., Shankar, U., Babu, G. S., Joshi, P. C., & Hans, R. K. (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug and Chemical Toxicology*, *24*(2), 191–200. <https://doi.org/10.1081/DCT-100102610>
- Reiter, R. J., Carneiro, R. C., & Oh, C. S. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, *29*(8), 363–

372. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979057>

- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., ... Acuna-Castroviejo, D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1–11.
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenolsindisease: fromdiettosupplements. *Currentpharmaceuticalbiotechnology*, 15(4), 304–317.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 5(3), 237–245.
- Stagos, D., Balabanos, D., Savva, S., Skaperda, Z., Priftis, A., Kerasioti, E., ... Kouretas, D. (2018). Extracts from the Mediterranean Food Plants *Carthamus lanatus*, *Cichorium intybus*, and *Cichorium spinosum* Enhanced GSH Levels and Increased Nrf2 Expression in Human Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6594101. <https://doi.org/10.1155/2018/6594101>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vella, F. M., Laratta, B., La Cara, F., & Morana, A. (2018). Recovery of bioactive molecules from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by-products through extraction by different solvents. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1378199>
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.

Physiological Reviews, 74(1), 139–162.

Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I .
Δραστικές ρίζες οξυγόνου. 26(3), 151–194.

Γκουνταράς Ι., (2012). Στοιχεία φυσιολογίας φύλλου και καρπού καστανιάς.
Πτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών,
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος