

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ - ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

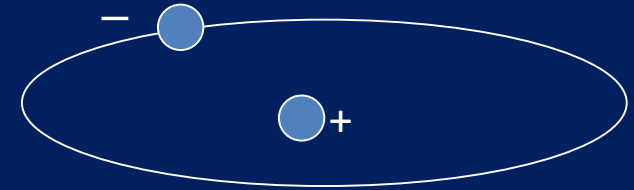
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Τι είναι ελεύθερες ρίζες;

- Ελεύθερη ρίζα είναι κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια



- Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου
- Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων είναι:
 $O_2\bullet-$, $OH\bullet$, $RO\bullet$, $ROO\bullet$, $NO\bullet$
- Υπάρχουν ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό τους
π.χ. H_2O_2 , $ONOO-$

Σχηματισμός ελευθέρων ριζών



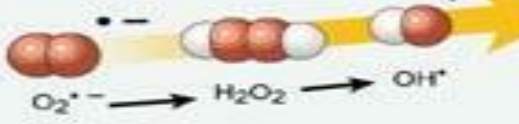
Ιονίζουσα ακτινοβολία

Κάπνισμα

Μεταβολισμός



Μιτοχόνδριο



Φλεγμονή



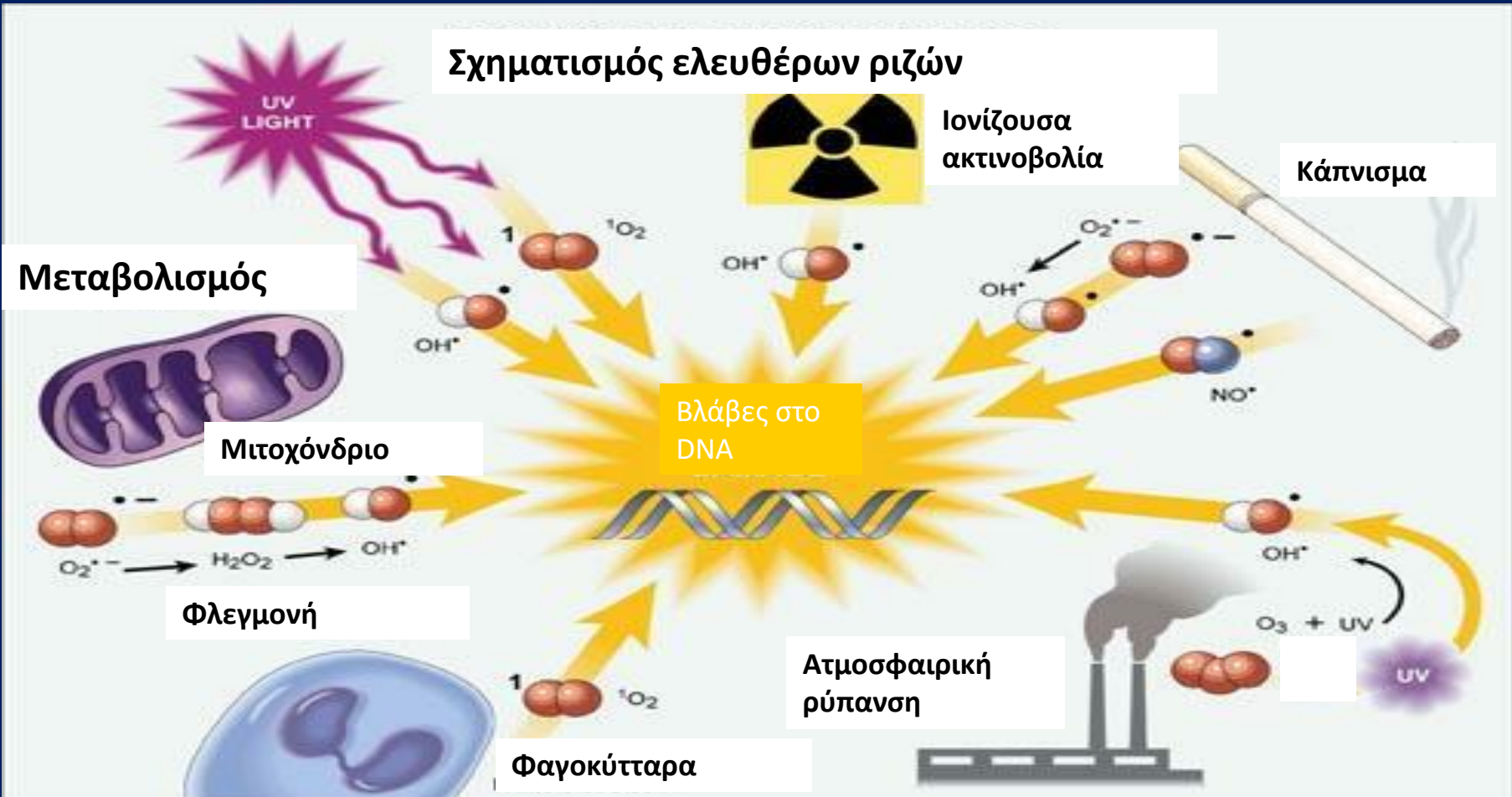
Φαγοκύτταρα

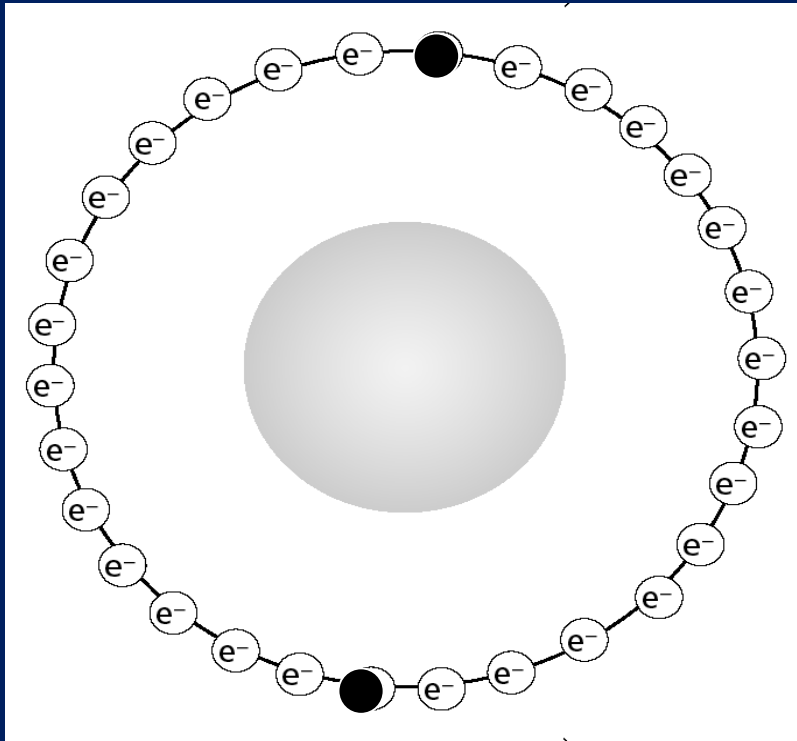
Ατμοσφαιρική ρύπανση



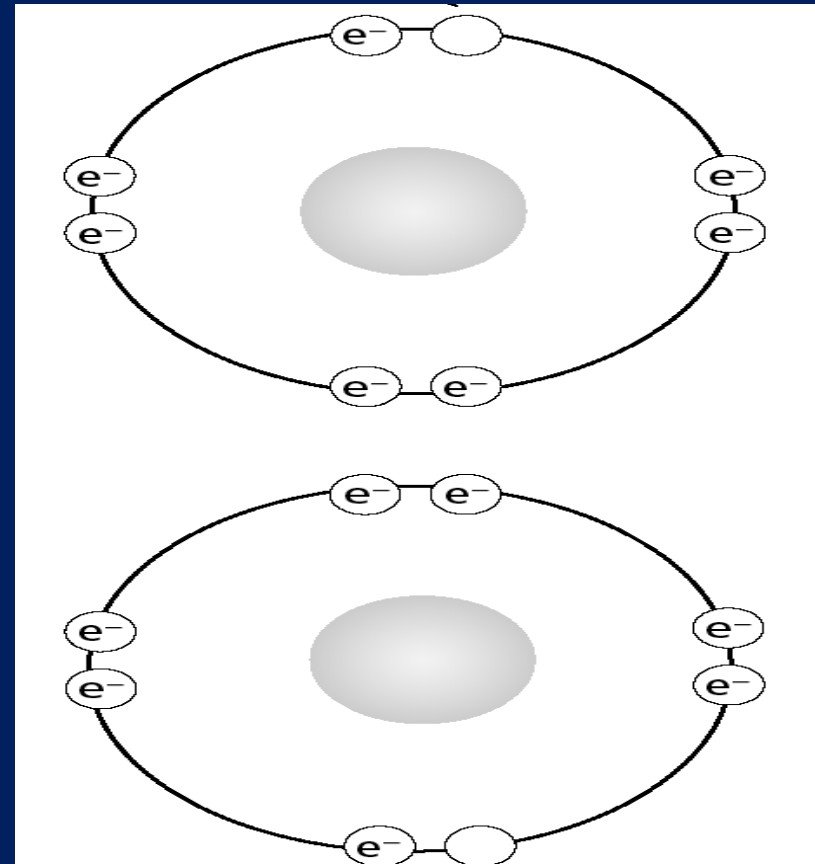
UV

Βλάβες στο DNA





Αντιοξειδωτικό



Ελεύθερες ρίζες

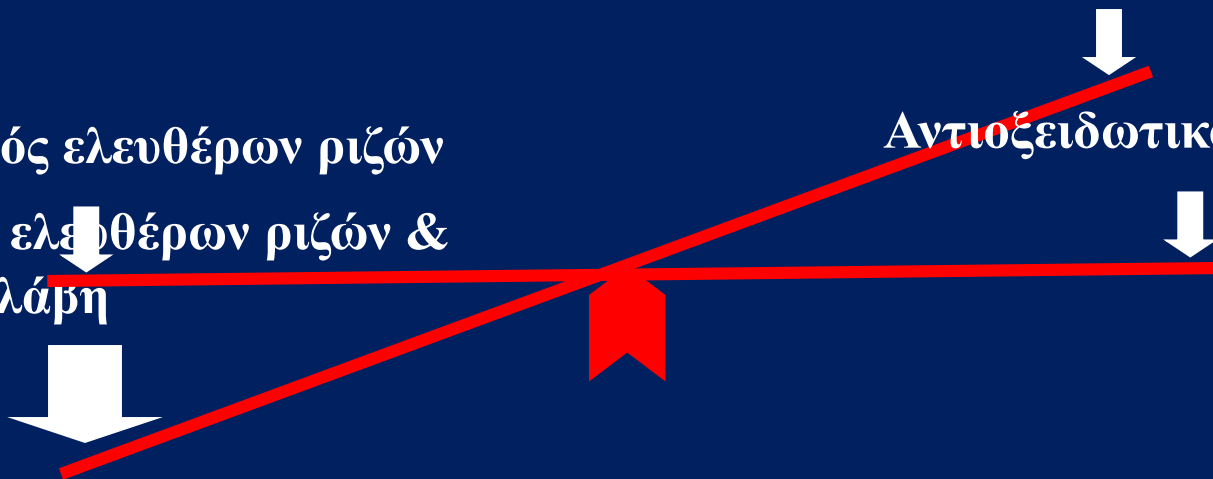
Οξειδωτικό στρες

Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Σχηματισμός ελευθέρων ριζών &
οξειδωτική βλάβη

Μείωση των
αντιοξειδωτικών μηχανισμών

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

- Μια σειρά από φασματοφωτομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας αντιοξειδωτικών ενώσεων να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες
- Μέθοδος του DPPH
- Μέθοδος του ABTS
- Εξουδετέρωση της $\text{OH}\cdot$
- Εξουδετέρωση της $\text{O}_2\cdot^-$

Η Μέθοδος DPPH

- Η σταθερή ρίζα **DPPH** αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται (ανάγεται)
 - είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET)
 - είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT)
- Με φασματοφωτομετρία (μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας DPPH μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο



1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη

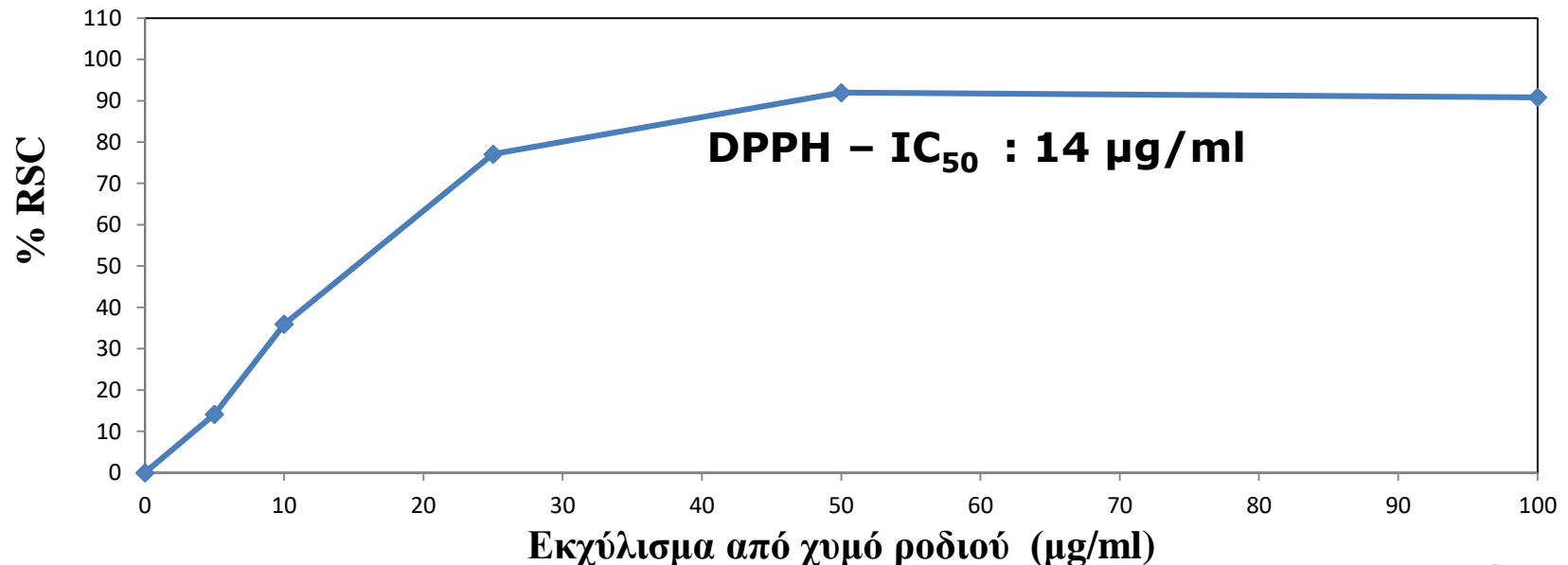
Η Μέθοδος DPPH

• Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{RSC}\% = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

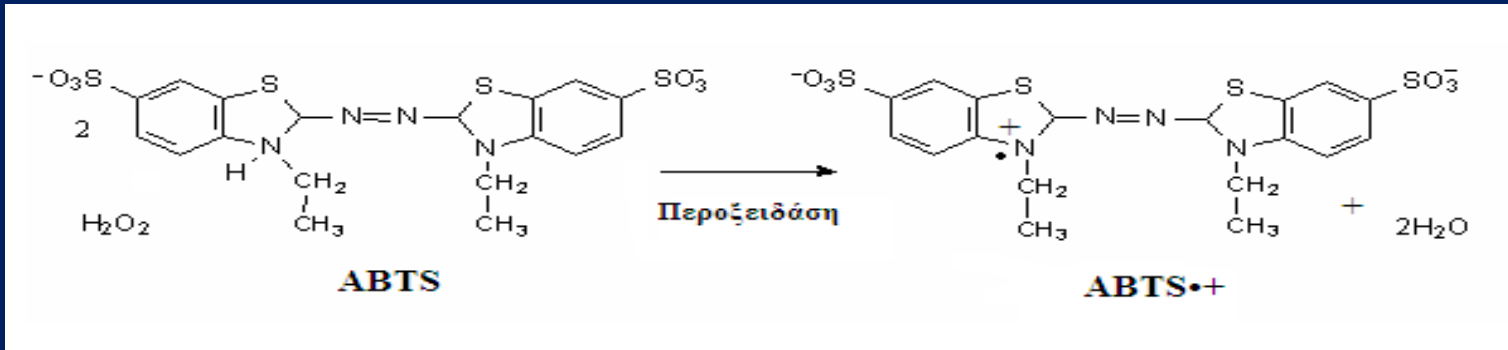
• Όπου Acontrol and Asample είναι οι τιμές της απορρόφησης για το μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα.

• Επίσης, για να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών εκχυλισμάτων, υπολογίζουμε το IC50, τη συγκέντρωση δηλαδή που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το %ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.



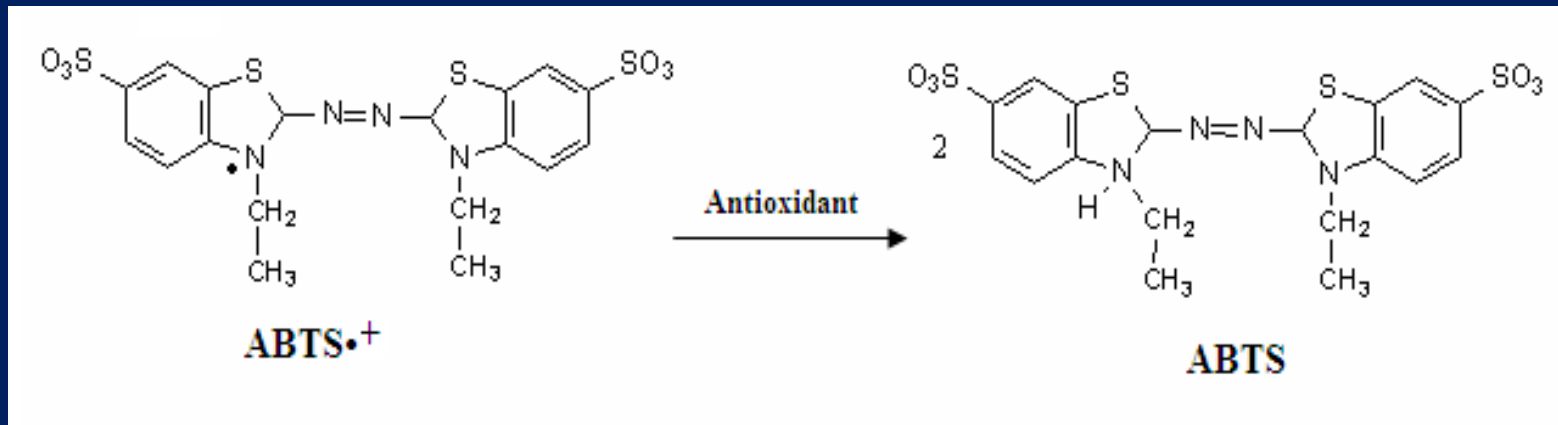
Η Μέθοδος ABTS

- Το **ABTS** παρουσία *υπεροξειδίου του υδρογόνου* (H_2O_2) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (**HRP**), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα **ABTS^{•+}**



[2,2' -Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]

- Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού η ρίζα **ABTS^{•+}** ανάγεται και αποχρωματίζεται. Με φασματοφωτομετρία (μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm) προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού.



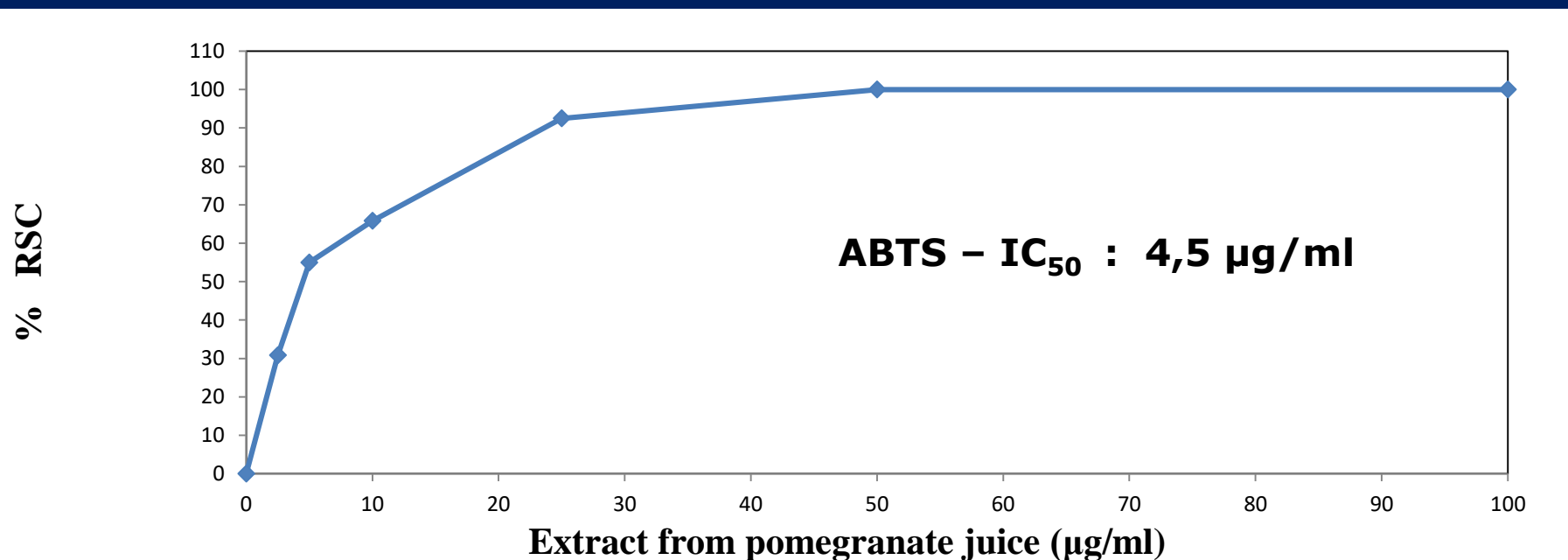
Η Μέθοδος ABTS

• Το επί τοις εκατό ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{RSC}\% = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

• Όπου Acontrol and Asample είναι οι τιμές της απορρόφησης για το μάρτυρα και το δείγμα αντίστοιχα.

• Επίσης, για να συγκρίνουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα διαφορετικών εκχυλισμάτων, υπολογίζουμε το IC50, τη συγκέντρωση δηλαδή που εξουδετερώνει τη ρίζα κατά 50%. Ο υπολογισμός γίνεται από το διάγραμμα που δείχνει το % ποσοστό εξουδετέρωσης της ρίζας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος.



• Οι μέθοδοι DPPH και ABTS είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων ουσιών.

• Έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλους μεθόδους όπως το ότι οι ρίζες που χρησιμοποιούνται είναι σταθερές, ενώ είναι και ευαίσθητες, γρήγορες, απλές μέθοδοι με χαμηλό κόστος.

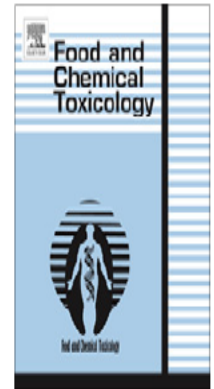
• Γενικά, χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης προϊόντων από φυτικά εκχυλίσματα.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts

Anna Apostolou^b, Dimitrios Stagos^{a,*}, Elissavet Galitsiou^a, Argiris Spyrou^a, Serko Haroutounian^b, Nikolaos Portesis^a, Ioanna Trizoglou^a, A. Wallace Hayes^{c,d}, Aristides M. Tsatsakis^e, Dimitrios Kouretas^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aiolou, 41221 Larissa, Greece

^b Agricultural University of Athens, Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece

^c Harvard School of Public Health, 677 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, USA

^d Spherix Consulting, Inc., 6430 Rockledge Drive #503, Bethesda, MD 20817, USA

^e Laboratory of Toxicology, School of Medicine, University of Crete, Voutes 71003, Heraklion, Greece

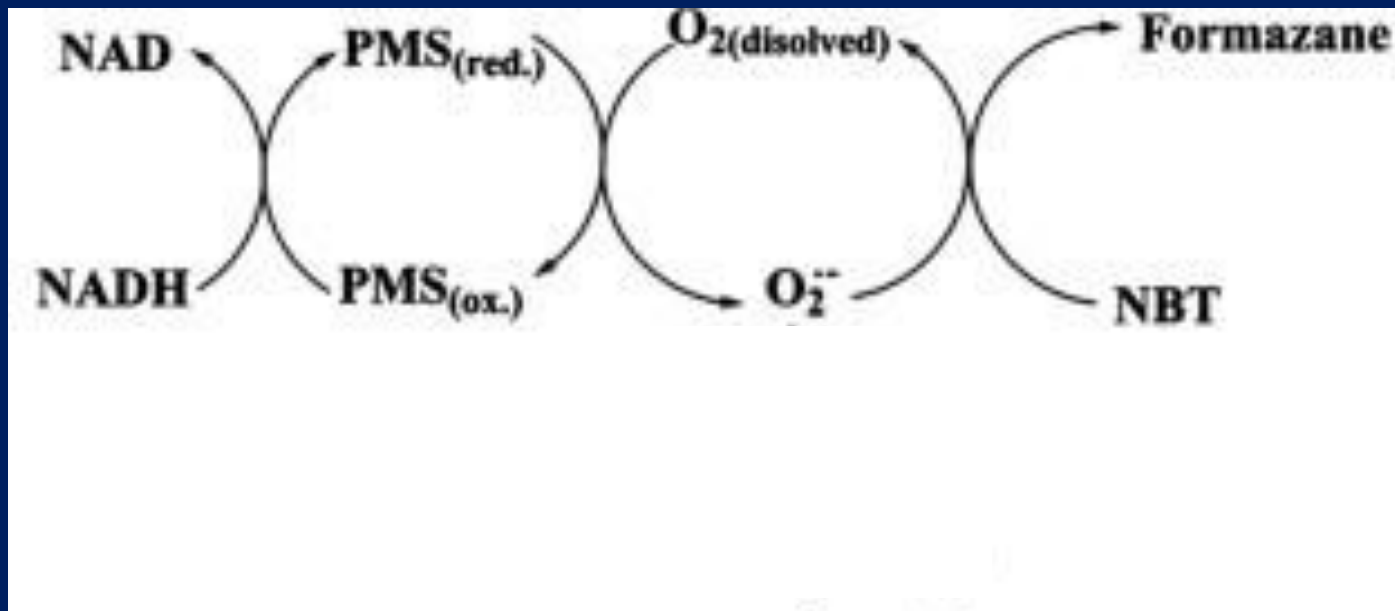
Table 3Antioxidant capacity, protective activity against hydroxyl (OH[•]) and peroxy (ROO[•]) radical-induced DNA damage.

Extract	Plant variety/harvest year	IC ₅₀ (μg/mL)	
		DPPH [•] ^a	ABTS ^{•+} ^a
Stems	Assyrtiko/2009	4.2 ± 0.5	5.5 ± 0.4
	Assyrtiko/2010	5.5 ± 0.7	3.5 ± 0.2
	Mavrotragano/2009	5.0 ± 0.4	3.5 ± 0.3
	Mandilaria/2009	6.0 ± 0.8	4.0 ± 0.6
	Mandilaria/2006	9.0 ± 1.0	9.0 ± 0.9
	Voidomato/2006	7.0 ± 0.9	3.5 ± 0.5
	Voidomato/2009	8.5 ± 1.0	6.8 ± 0.7
	Vilana/2009	7.0 ± 0.8	11.8 ± 1.3
	Moshato/2009	8.0 ± 0.7	3.5 ± 0.5
	Ksinomavro/2010	9.0 ± 1.1	5.0 ± 0.3
	Vinsanto/2010	10.0 ± 1.1	4.0 ± 0.2
Athiri/2010	15.0 ± 1.6	5.0 ± 0.4	
Seeds	Assyrtiko/2010	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.4
	Ksinomavro/2010	4.7 ± 0.6	3.5 ± 0.3
	Robola/2010	6.0 ± 0.7	2.8 ± 0.2
Pomace	Assyrtiko/2009	5.0 ± 0.5	6.0 ± 0.8

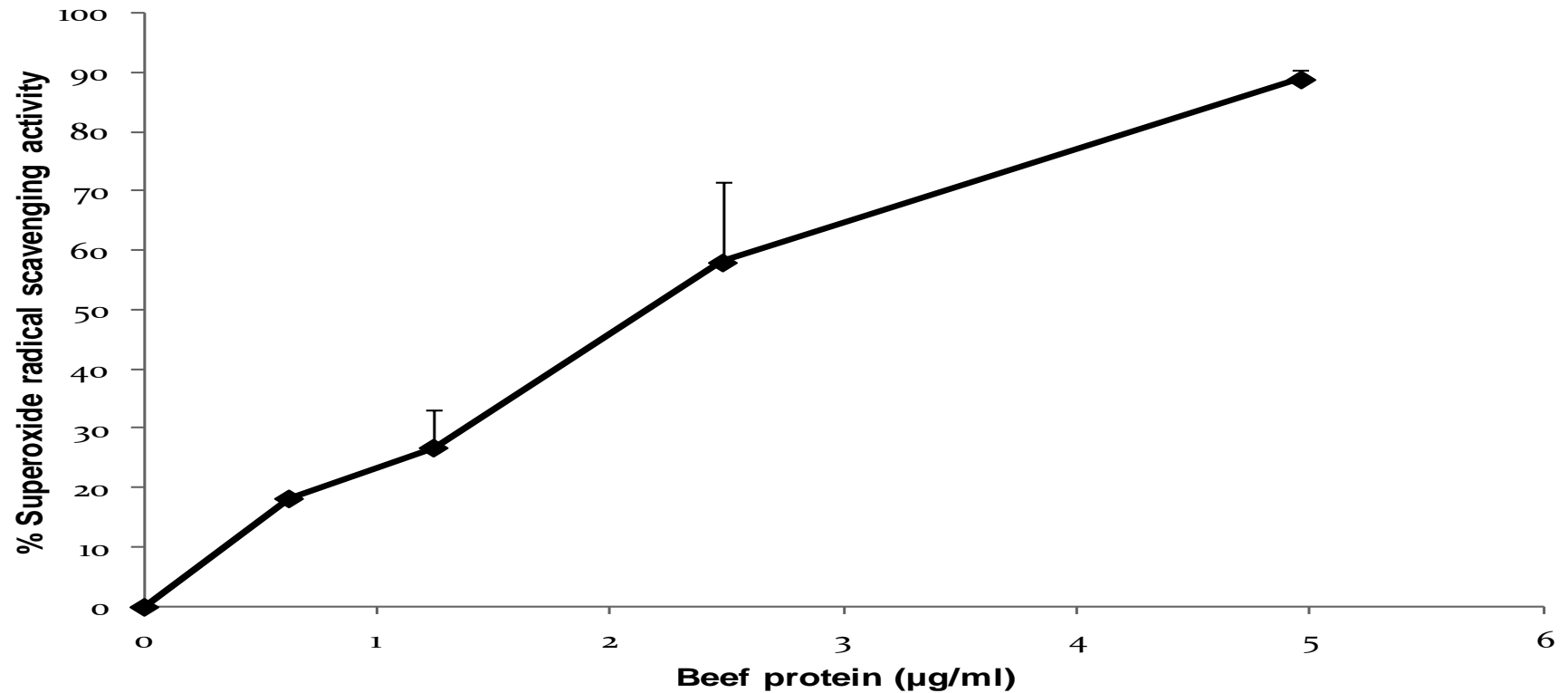
^a Values are the mean ± SD of at least two separate triplicate experiments.^b Values are the mean ± SD from three independent experiments.

Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

- Η ρίζα του $O_2^{\bullet-}$ είναι από τις πιο κοινές ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό.
- Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της εξουδετέρωσης της $O_2^{\bullet-}$ βασίζεται στον σχηματισμό της $O_2^{\bullet-}$ σε ένα σύστημα PMS-NADH με οξείδωση του NADH και αναγωγή του nitroblue tetrazolium (NBT).
- Η $O_2^{\bullet-}$ ανάγει το NBT σε formazane και έτσι μειώνει την απορρόφηση του NBT στα 560nm.



- Εξουδετέρωση της $O_2^{\bullet -}$ από πρωτεΐνη μοσχαρίσιου κρέατος.



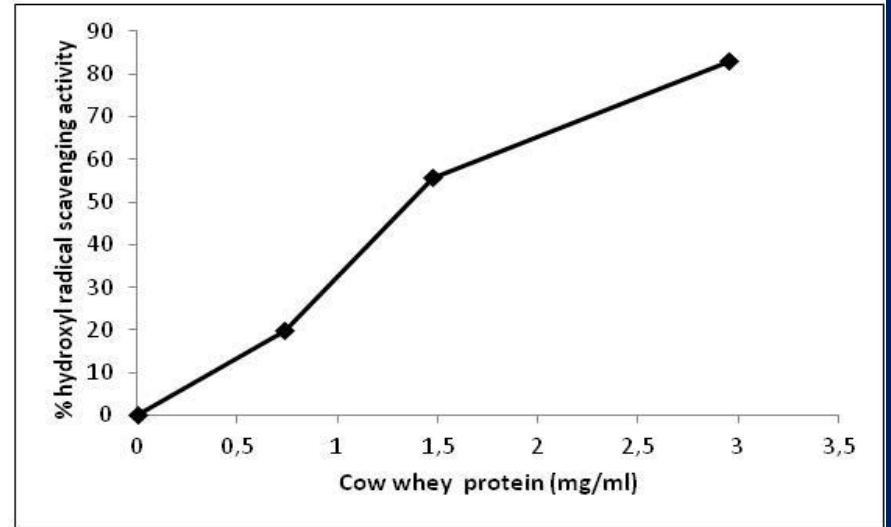
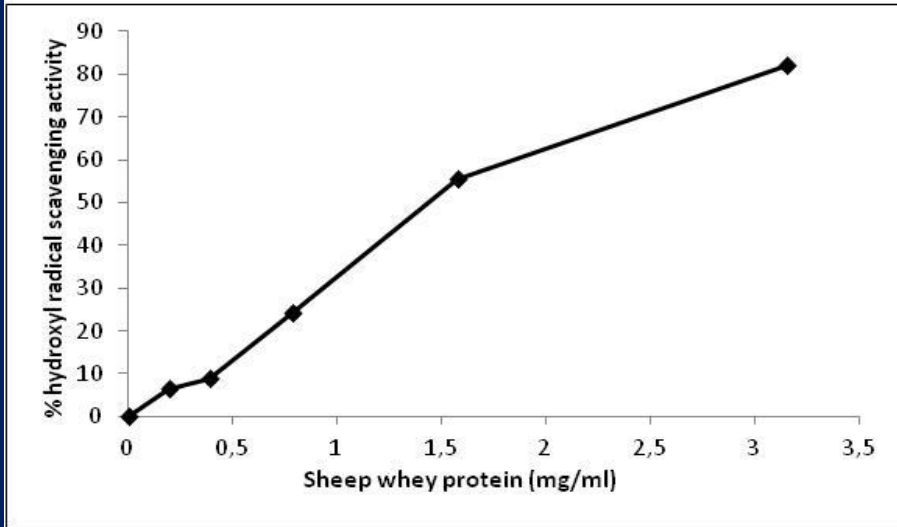
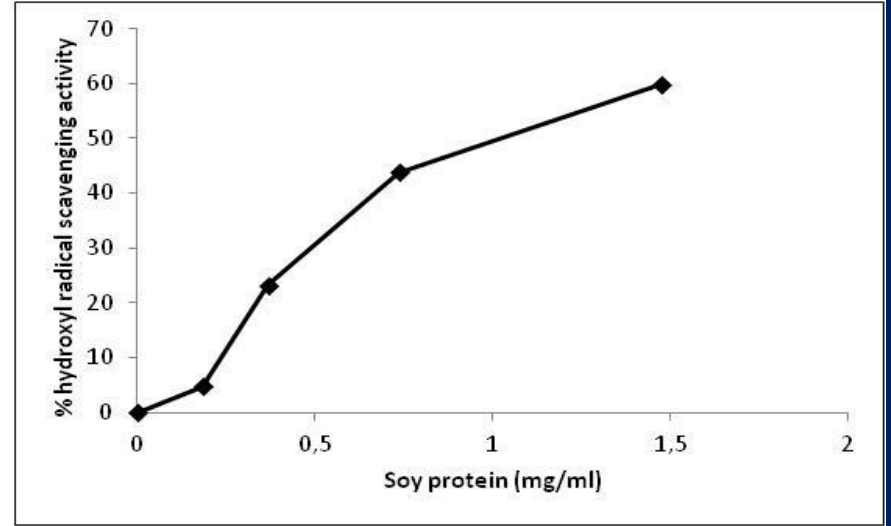
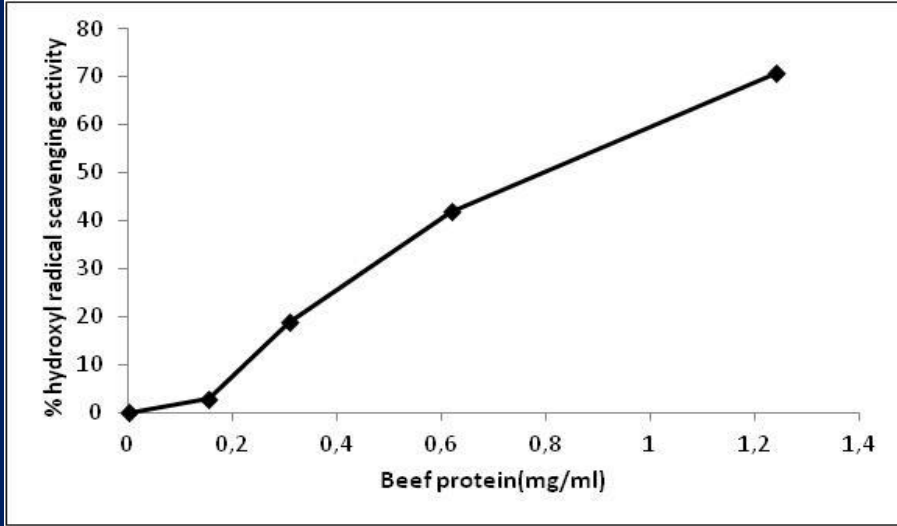
Προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου (OH•)

- Η ρίζα του OH• είναι από τις πιο κοινές και δραστικότερες ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό.
- Ο προσδιορισμός της εξουδετέρωσης της OH• από αντιοξειδωτικά βασίζεται στην οξείδωση της 2-δεοξυριβόζης.
- Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τη OH• που παράγεται κατά την αντίδραση Fenton.
- Η οξειδωμένη 2-δεοξυριβόζη απορροφάει στα 520nm.
- Η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τη OH• προσδιορίζεται ως το % ποσοστό μείωσης της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης.

Fenton reaction



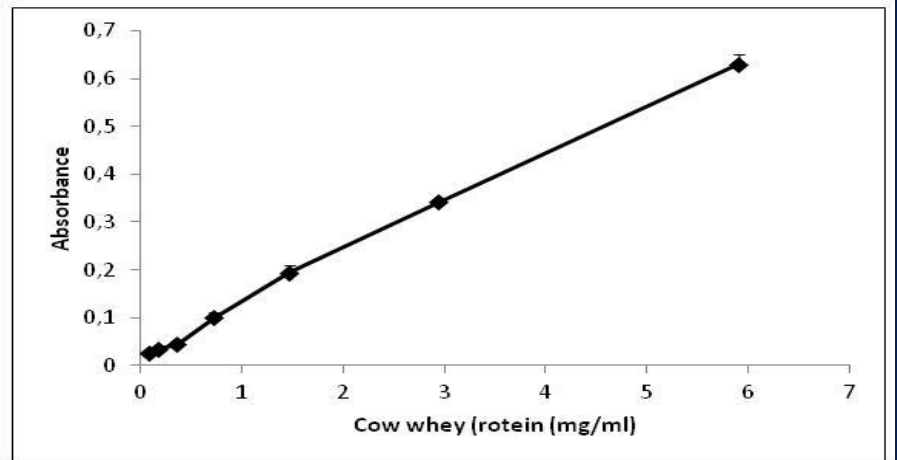
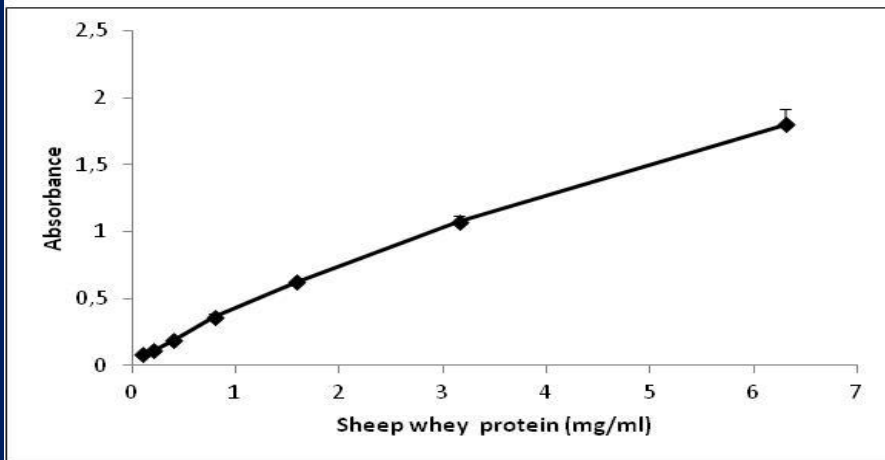
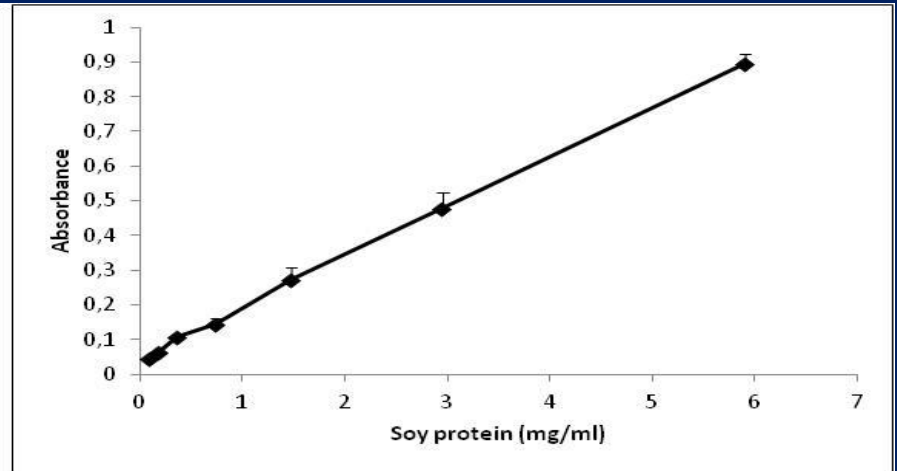
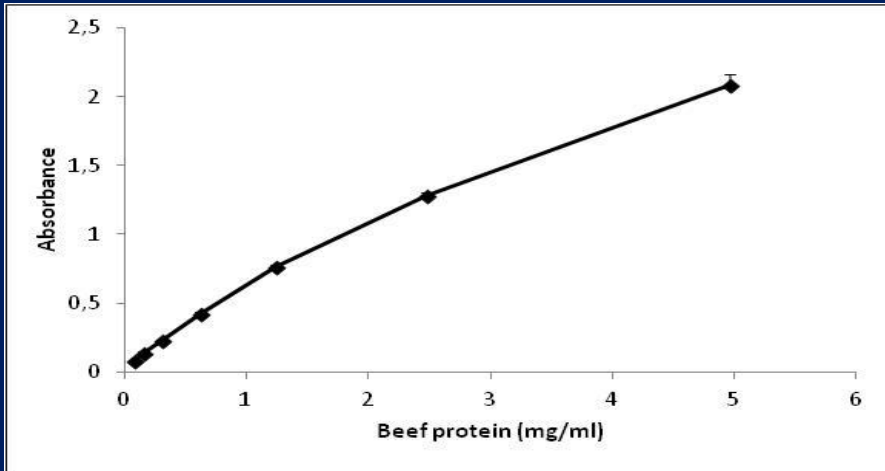
• Προσδιορισμός της ικανότητας πρωτεϊνών από πρόβειο τυρόγαλο, από αγελαδινό τυρόγαλο, από μοσχαρίσιο κρέας και από σόγια να εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου.



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

- Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας συνδέεται με αντιοξειδωτική δράση γιατί δείχνει ότι η ουσία δρα ως δότης ηλεκτρονίων, και άρα μπορεί να ανάγει οξειδωμένους ενδιάμεσους μεταβολίτες που σχηματίζονται από τη δράση των ελευθέρων ριζών (π.χ. κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση).
- Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} .
- Ο Fe^{2+} αντιδρά με τριχλωριούχο σίδηρο και παράγει ένα προϊόν που απορροφά στα 700nm.
- Για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας, υπολογίζεται το RPO.5AU , που είναι η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί απορρόφηση 0,5 στα 700 nm.

- Αναγωγική ικανότητα πρωτεϊνών από πρόβειο τυρόγαλο, από αγελαδινό τυρόγαλο, από μοσχαρίσιο κρέας και από σόγια.

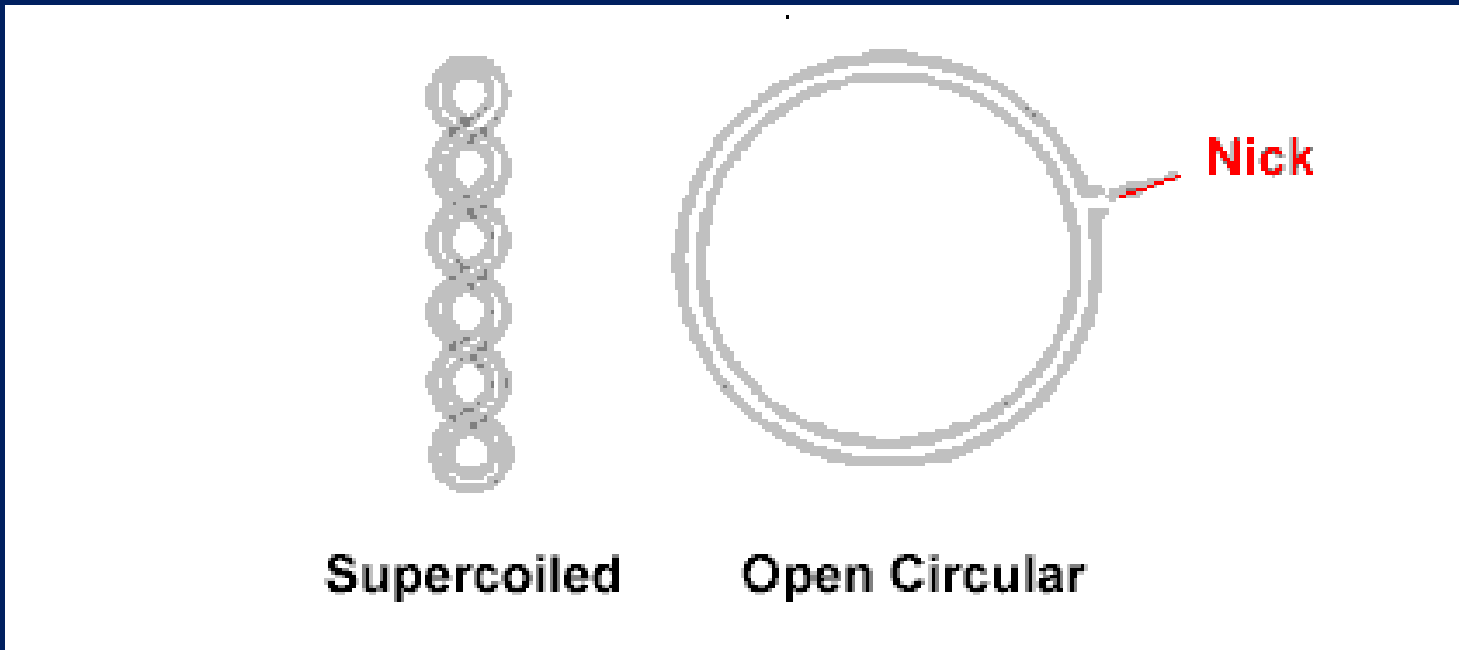


ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ DNA ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

- Μοριακές, βακτηριακές και κυτταρογενετικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών ουσιών έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.
- Οι μέθοδοι αυτές είναι:
- Το DNA breakage assay
- Το Ames test
- Οι ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchange assay, SCEs)

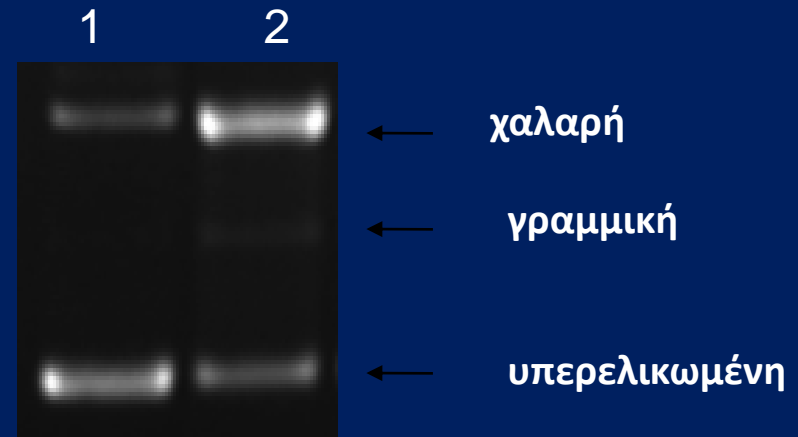
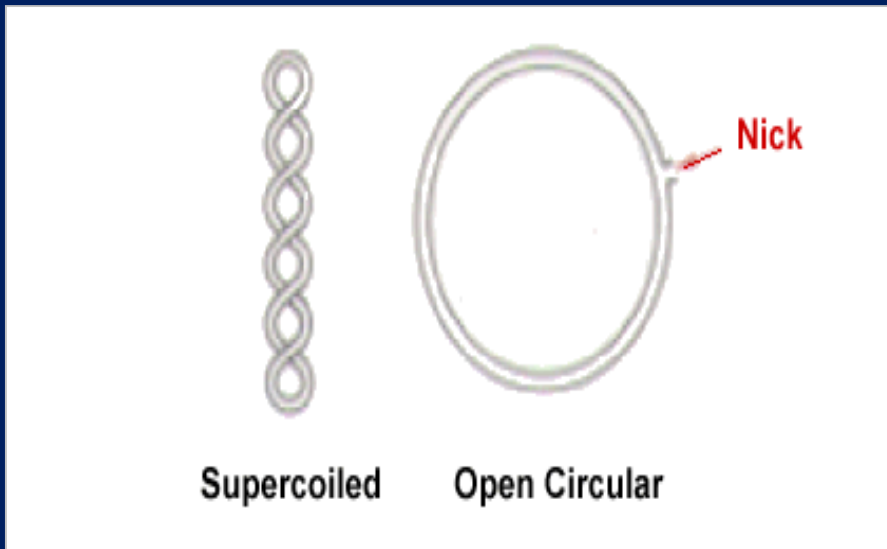
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Πρόκειται για μια μοριακή μέθοδο που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η ικανότητα αντιοξειδωτικών ουσιών να προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.
- Το πλασμιδιακό DNA υπάρχει σε 2 διαμορφώσεις, στην υπερελικωμένη και στη χαλαρή (ανοιχτή κυκλική).
- Όταν συμβαίνουν στο DNA μονόκλινα ή δίκλινα κοψίματα (nicks), τότε το υπερελικωμένο DNA μετατρέπεται σε χαλαρό.



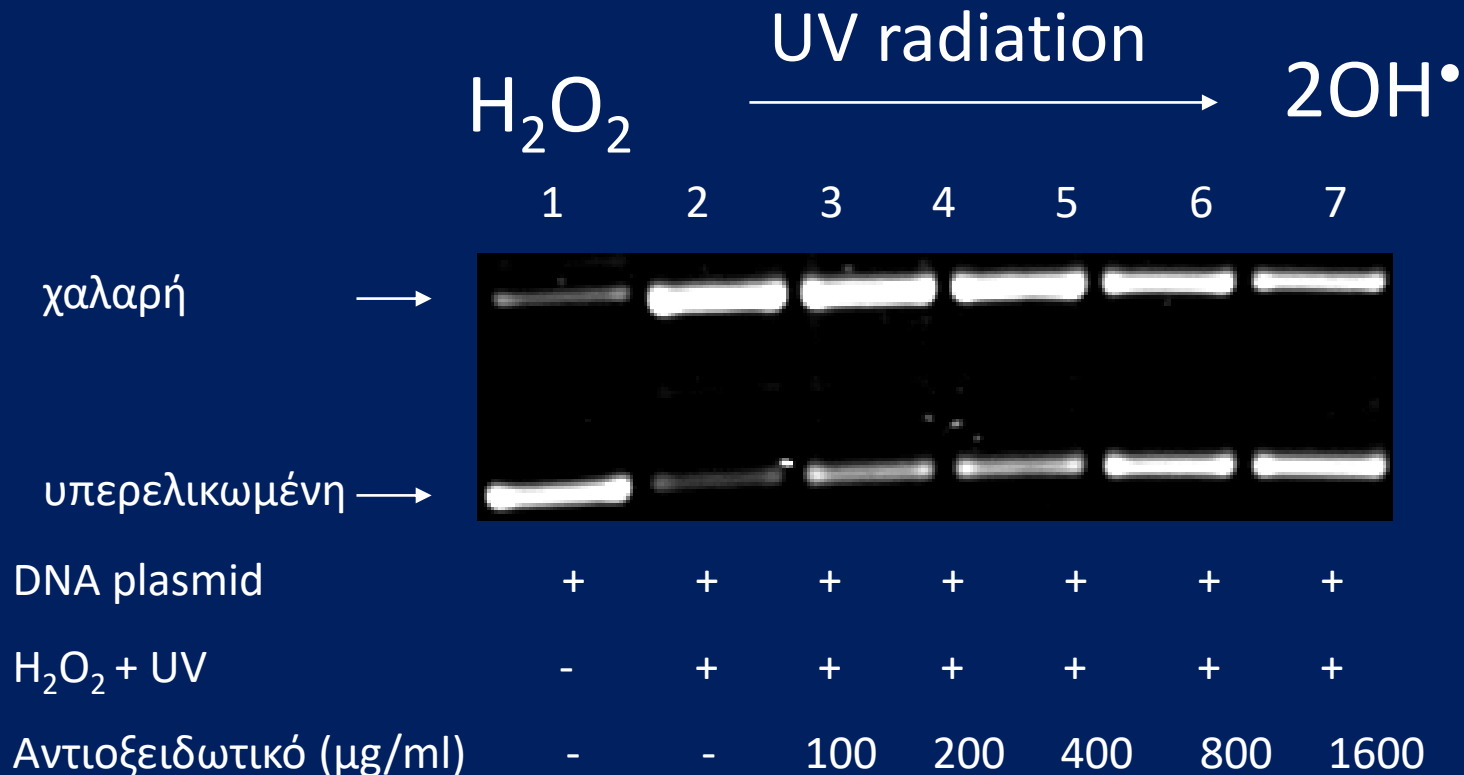
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Η υπερελικωμένη και η χαλαρή διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA έχουν διαφορετική κινητικότητα σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.
- Έτσι, όταν η υπερελικωμένη μορφή επωαστεί με ένα μεταλλαξιγόνο παράγοντα, όπως με μια ουσία που παράγει ελεύθερες ρίζες τότε προκαλούνται κοψίματα (nicks) στο DNA, και η υπερελικωμένη μορφή μετατρέπεται στη χαλαρή.



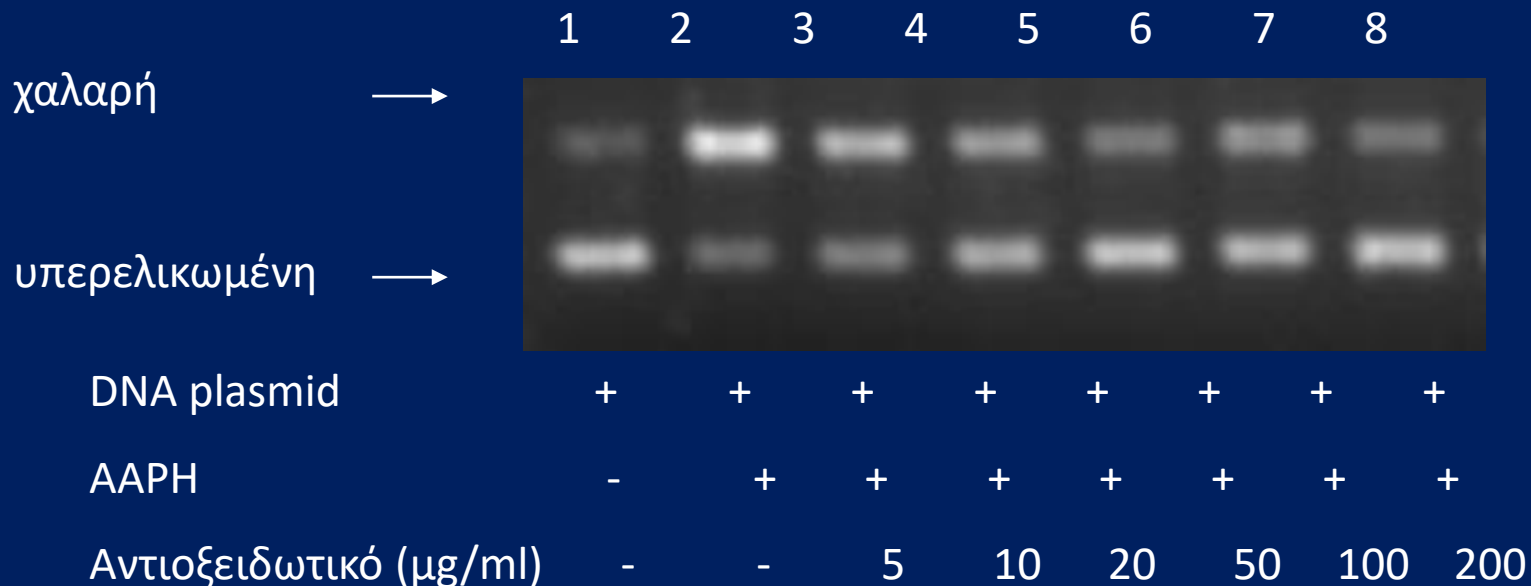
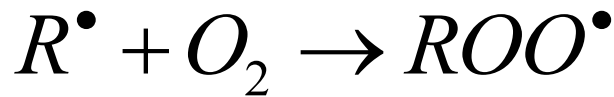
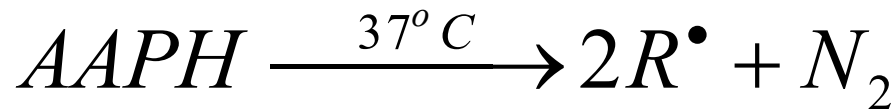
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Ρίζες υδροξυλίου παράγονται με επίδραση UV ακτινοβολίας σε H_2O_2 .



ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΘΡΑΥΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (DNA plasmid breakage assay)

- Ρίζες περοξυλίου ($ROO\cdot$) παράγονται από τη θερμική αποικοδόμηση του AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride)] .
- Ρίζες περοξυλίου ($ROO\cdot$) συνήθως σχηματίζονται στα κύτταρα ως προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών.



section for this paper

Experimental

Clinical

Epidemiological

Assessment of Antioxidant Activity of Extracts from Unique Greek Varieties of *Leguminosae* Plants Using *In Vitro* Assays

C. SPANOUI¹, D. STAGOS^{1*}, L. TOUSIAS¹, A. ANGELIS², N. ALIGIANNIS²,
A-L. SKALTSOUNIS² and D. KOURETAS^{1*}

¹*Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa;*

**Institut of Biomedical Research and Technology, Larissa;*

²*Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece*

Table II. Inhibition of hydroxyl radical-induced DNA strand scission by Leguminosae plant extracts.

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Plant part	Methanolic extract					r	Aqueous extract					r
		100	200	400	800	1600		100	200	400	800	1600	
		% Inhibition						% Inhibition					
<i>Phaseolus vulgaris</i> ^a	aerial part	10 \pm 3	10 \pm 3	31 \pm 4*	37 \pm 4*	38 \pm 2*	0.881	NI	11 \pm 2	27 \pm 1*	29 \pm 3*	34 \pm 2*	0.934
	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	23 \pm 2*	19 \pm 1*	18 \pm 1*	0.681
<i>Vicia faba</i>	aerial part	NI	NI	27 \pm 2*	29 \pm 3*	32 \pm 3*	0.774	NI	NI	28 \pm 3*	31 \pm 2*	37 \pm 3*	0.960
<i>Vicia tenuifolia</i> subsp. <i>stenophylla</i>	fructus	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lens culinaris</i>	aerial part	NI	NI	19 \pm 2	19 \pm 1	23 \pm 1*	0.776	NI	NI	NI	NI	16 \pm 3	-
	seeds	NI	NI	31 \pm 3*	32 \pm 2*	33 \pm 3*	0.848	NI	NI	19 \pm 1*	18 \pm 1*	27 \pm 3*	0.758
<i>Lupinus albus</i>	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	11 \pm 3	13 \pm 2	16 \pm 3	0.734
	seeds	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
	aerial part	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	17 \pm 2*	16 \pm 1*	20 \pm 1*	0.859
<i>Lotus edulis</i>	seed coat	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
	aerial part	NI	8 \pm 2	28 \pm 2*	35 \pm 1*	42 \pm 2*	0.974	NI	NI	21 \pm 2*	22 \pm 2*	30 \pm 3*	0.931
<i>Lotus longisiliquosus</i>	fructus	NI	NI	32 \pm 1*	34 \pm 2*	37 \pm 3*	0.840	NI	NI	NI	NI	NI	-
	aerial part	NI	NI	30 \pm 2*	33 \pm 1*	33 \pm 1*	0.905	NI	NI	13 \pm 5	14 \pm 4	20 \pm 3	0.805
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	fructus	NI	NI	18 \pm 4	21 \pm 2*	23 \pm 3*	0.729	NI	12 \pm 3	15 \pm 2	21 \pm 5	26 \pm 3*	0.925
<i>Lathyrus sativus</i>	aerial part	NI	NI	26 \pm 2*	27 \pm 2*	32 \pm 2*	0.768	9 \pm 4	18 \pm 1*	29 \pm 2*	38 \pm 3*	47 \pm 3*	0.975
	aerial part	NI	NI	28 \pm 3	24 \pm 1*	31 \pm 2*	0.851	NI	NI	NI	NI	13 \pm 2	-
<i>Lathyrus clymenum</i>	aerial part	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	aerial part	14 \pm 3	21 \pm 4	52 \pm 5*	62 \pm 4*	69 \pm 3*	0.966	11 \pm 1	23 \pm 1*	36 \pm 3*	44 \pm 3*	55 \pm 2*	0.981
<i>Oleuropein</i> ^b	-	NI	11 \pm 2	23 \pm 2*	33 \pm 3*	42 \pm 3*	0.986						

Values are the means \pm SE of % inhibition from three independent experiments. ^a*Phaseolus vulgaris* was cultivated in Vrontou, Serres, Greece.

^bOleuropein: was used as positive control. r: represents the dose response correlation coefficient. NI: no significant inhibition (less than 8%). NT: not tested. * p <0.05 when compared with control (plasmid DNA plus H₂O₂+UV).

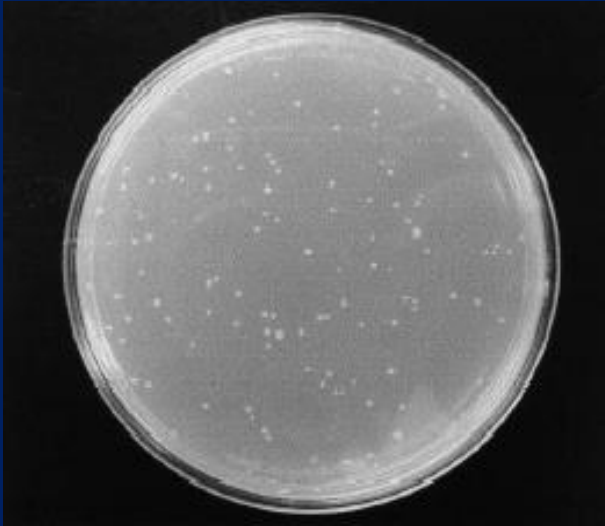
Table III. Inhibition of peroxyl radical-induced DNA strand scission by Leguminosae plant extracts.

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Plant part	Methanolic extract						r	Aqueous extract						r
		5	10	20	50	100	200		% Inhibition	5	10	20	50	100	
<i>Phaseolus vulgaris</i> ^a	aerial part	NI	14 \pm 4	24 \pm 1*	56 \pm 2*	81 \pm 6*	93 \pm 4*	0.968	16 \pm 5	26 \pm 4	57 \pm 4*	84 \pm 1*	87 \pm 1*	91 \pm 1*	0.987
	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	NI	10 \pm 2	18 \pm 4	0.904
<i>Vicia faba</i>	aerial part	NI	13 \pm 2	39 \pm 4*	69 \pm 3*	78 \pm 4*	84 \pm 5*	0.979	10 \pm 1*	26 \pm 1*	58 \pm 1*	87 \pm 1*	93 \pm 1*	96 \pm 1*	0.991
<i>Vicia tenuifolia</i> subsp. <i>stenophylla</i>	fructus	NI	NI	NI	19 \pm 1	37 \pm 4*	65 \pm 2*	0.985	NI	NI	14 \pm 3	38 \pm 3*	63 \pm 3*	80 \pm 3*	0.958
<i>Lens culinaris</i>	aerial part	NI	NI	NI	17 \pm 5	36 \pm 5	67 \pm 6*	0.972	NI	NI	15 \pm 4	43 \pm 3*	67 \pm 5*	84 \pm 6*	0.950
	seeds	NI	NI	20 \pm 2*	44 \pm 4*	61 \pm 3*	78 \pm 1*	0.971	NI	14 \pm 2*	32 \pm 2*	67 \pm 3*	73 \pm 1*	84 \pm 3*	0.984
<i>Lupinus albus</i>	seeds	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	31 \pm 4	49 \pm 2*	73 \pm 1*	0.897
	aerial part	NI	NI	NI	10 \pm 3	13 \pm 2*	16 \pm 1*	0.968	NI	NI	NI	NI	NI	9 \pm 3	-
<i>Lotus edulis</i>	seed coat	NI	NI	28 \pm 3*	49 \pm 4*	64 \pm 2*	67 \pm 3*	0.975	NI	NI	NI	14 \pm 4	17 \pm 2	20 \pm 3	0.732
	aerial part	NI	NI	24 \pm 3*	50 \pm 3*	79 \pm 1*	90 \pm 4*	0.983	NI	NI	15 \pm 5	41 \pm 3*	67 \pm 4*	76 \pm 3*	0.919
<i>Lotus longisiliquosus</i>	fructus	NI	NI	NI	21 \pm 2*	40 \pm 3*	74 \pm 4*	0.947	NI	NI	10 \pm 3	49 \pm 5*	71 \pm 2*	81 \pm 2*	0.977
	aerial part	NI	NI	12 \pm 2	34 \pm 1*	72 \pm 2*	92 \pm 2*	0.943	NI	12 \pm 1	33 \pm 2*	74 \pm 2*	84 \pm 3*	84 \pm 3*	0.976
<i>Tetragonolobus</i> <i>purpureus</i>	fructus	NI	NI	NI	8 \pm 2	24 \pm 1*	48 \pm 4*	0.841	NI	NI	NI	16 \pm 2	39 \pm 3*	67 \pm 3*	0.976
<i>Lathyrus sativus</i>	aerial part	NI	NI	9 \pm 1	30 \pm 2*	58 \pm 5*	88 \pm 2*	0.953	NI	11 \pm 4	34 \pm 2*	73 \pm 3*	94 \pm 3*	99 \pm 1*	0.976
	aerial part	NI	20 \pm 1*	38 \pm 3*	87 \pm 4*	96 \pm 2*	93 \pm 4*	0.985	NI	12 \pm 2	45 \pm 3*	73 \pm 4*	75 \pm 4*	78 \pm 3*	0.920
<i>Lathyrus clymenum</i>	aerial part	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-
<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i>	aerial part	40 \pm 2*	73 \pm 5*	89 \pm 6*	89 \pm 6*	93 \pm 7*	98 \pm 3*	0.851	51 \pm 6*	83 \pm 4*	84 \pm 2*	97 \pm 2*	99 \pm 1*	99 \pm 1*	0.852
<i>Oleuropein</i> ^b	-	36 \pm 3*	57 \pm 4*	75 \pm 1*	93 \pm 1*	95 \pm 1*	95 \pm 1*	0.947							

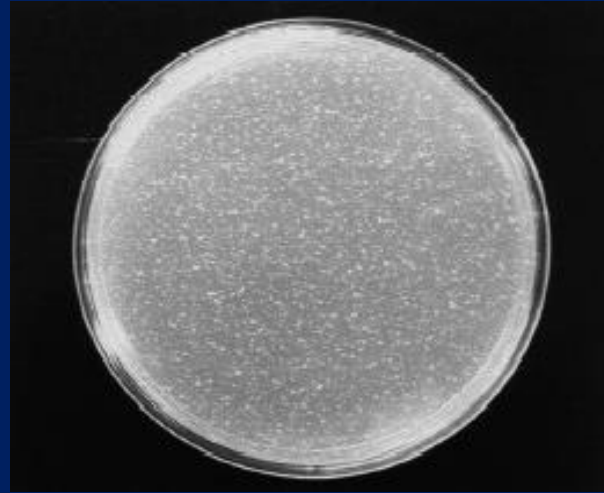
^a*Phaseolus vulgaris* was cultivated in Vrondou, Serres, Greece. ^bOleuropein: was used as positive control. Values are the means \pm SE of % inhibition from three independent experiments. r: represents the dose response correlation coefficient. NI: no significant inhibition (less than 8%). NT: not tested. * p <0.05 when compared with control (plasmid DNA plus AAPH).

Ames test

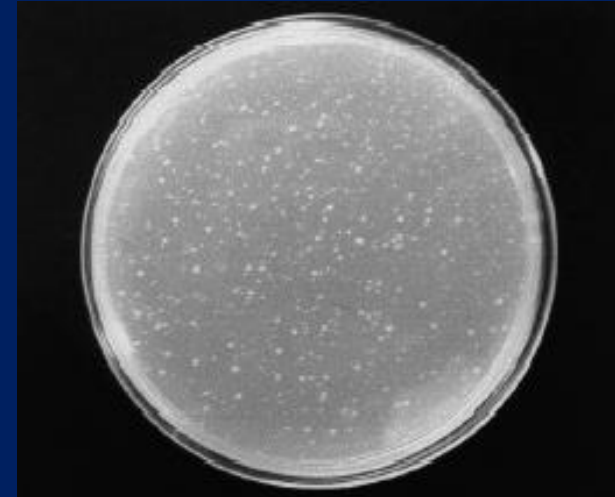
- Το Ames test είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη in vitro μέθοδος στην τοξικολογία για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων παραγόντων.
- Το Ames test όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση αντι-μεταλλαξιγόνων ουσιών.
- Για την ανίχνευση αντιοξειδωτικών που προστατεύουν από μεταλλάξεις που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιείται συνήθως το στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102.



Control



**mutagen inducing
mutations through ROS
production**



Mutagen + antioxidant

Ames test

- Η μπλεομυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση μεταλλάξεων μέσω ROS στα κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.



DNA mutations

Ames test

- Το H_2O_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση μεταλλάξεων μέσω ROS στα κύτταρα *Salmonella typhimurium* TA102.
- Το H_2O_2 παράγει ROS στα κύτταρα μέσω της αντίδρασης Fenton.

Αντίδραση Fenton



DNA mutations



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Mutation Research 609 (2006) 165–175



Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/gentox

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102

Demetrios Stagos^a, Georgios Kazantzoglou^b, Demetra Theofanidou^a,
Georgia Kakalopoulou^a, Prokopios Magiatis^b,
Sofia Mitaku^b, Demetrios Kouretas^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aiolou, GR-41221 Larissa, Greece

^b Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, GR-15771 Athens, Greece

Received 22 September 2005; received in revised form 14 February 2006; accepted 24 June 2006

Available online 28 August 2006

Ames test

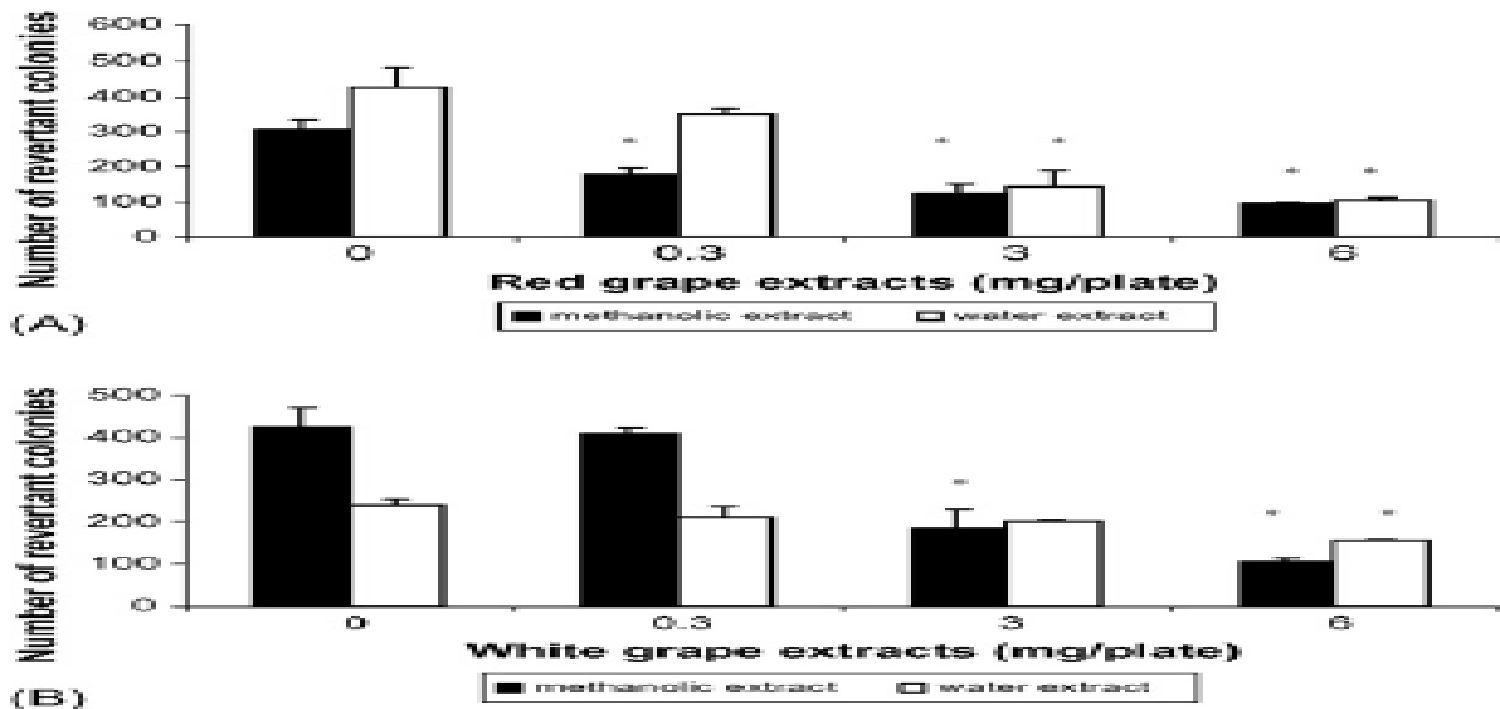
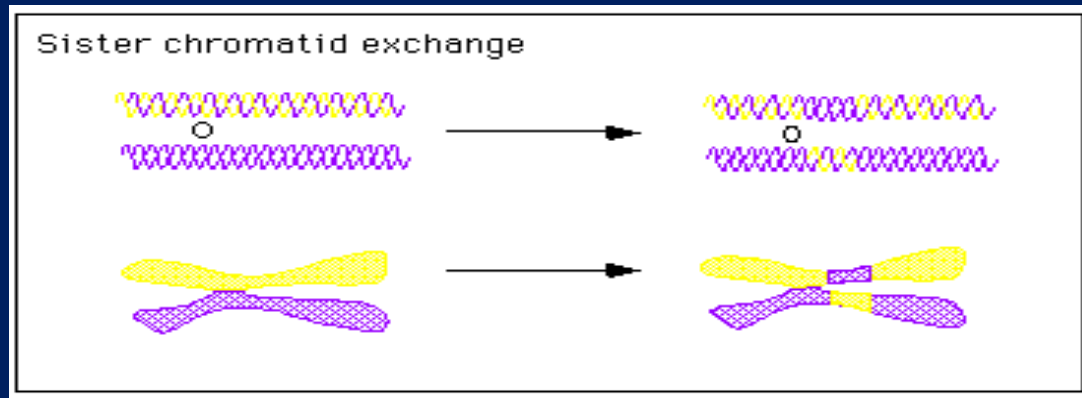


Fig. 2. Antimutagenic effects of grape extracts on BLM-induced mutagenicity in *S. typhimurium* TA102 cells. (A) Mandilaria variety (red grapes) and (B) Assyrtiko variety (white grapes). Values are the mean \pm S.D. number of histidine revertants minus the number of spontaneous revertants (356 ± 29) of three independent experiments carried out in triplicate. The concentration of BLM was $0.5 \mu\text{g}/\text{plate}$. * $p < 0.05$ when compared with positive control.

Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Οι SCEs είναι η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ ομόλογων περιοχών των δύο αδελφών χρωματίδων.
- Οι SCEs είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που συμβαίνει κατά το διπλασιασμό του DNA στη S φάση του κυτταρικού κύκλου πριν οι δύο χρωματίδες χωριστούν σε δύο διαφορετικά χρωμοσώματα.
- Αν και οι SCEs δεν αποτελούν μεταλλάξεις, ωστόσο είναι από τους πιο κοινούς κυτταρογενετικούς βιοδείκτες στην τοξικολογία για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων ουσιών.
- Οι SCEs συνήθως προσδιορίζονται σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων αλλά μπορούν να προσδιοριστούν και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

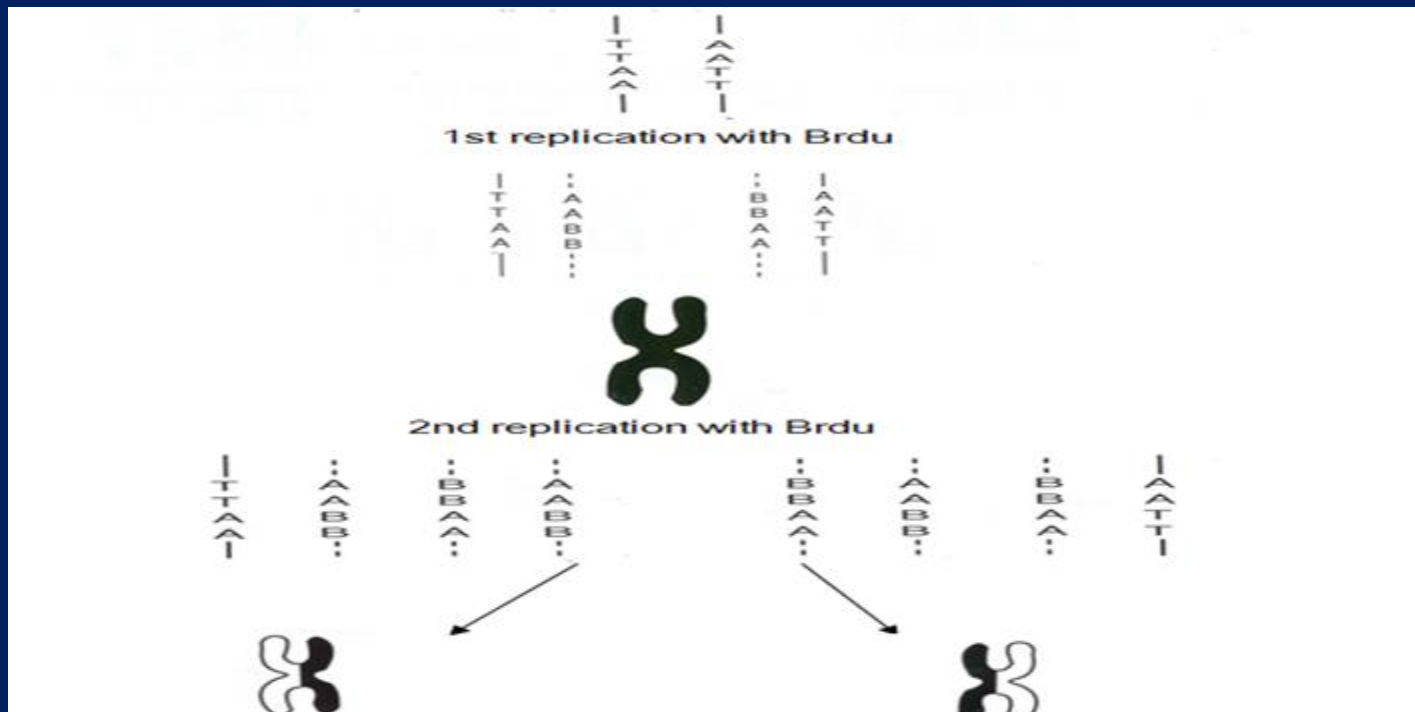


Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Για τον προσδιορισμό των SCEs, είναι απαραίτητη η διαφορετική χρώση των 2 χρωματίδων.
- Αυτό επιτυγχάνεται με χρώση φθορισμού σε συνδυασμό με χρώση Giemsa (μέθοδος FPG) , η οποία βασίζεται στην προσθήκη βρωμοδεοξυουριδίνης (BrdU), ένα χημικό ανάλογο της θυμίνης στην κυτταροκαλλιέργεια από την οποία απομονώνονται τα χρωμοσώματα.
- Λόγω του ημισυντηρητικού διπλασιασμού του DNA, μετά τη 2^η μίτωση οι δύο αδερφές χρωματίδες χρωματίζονται διαφορετικά.

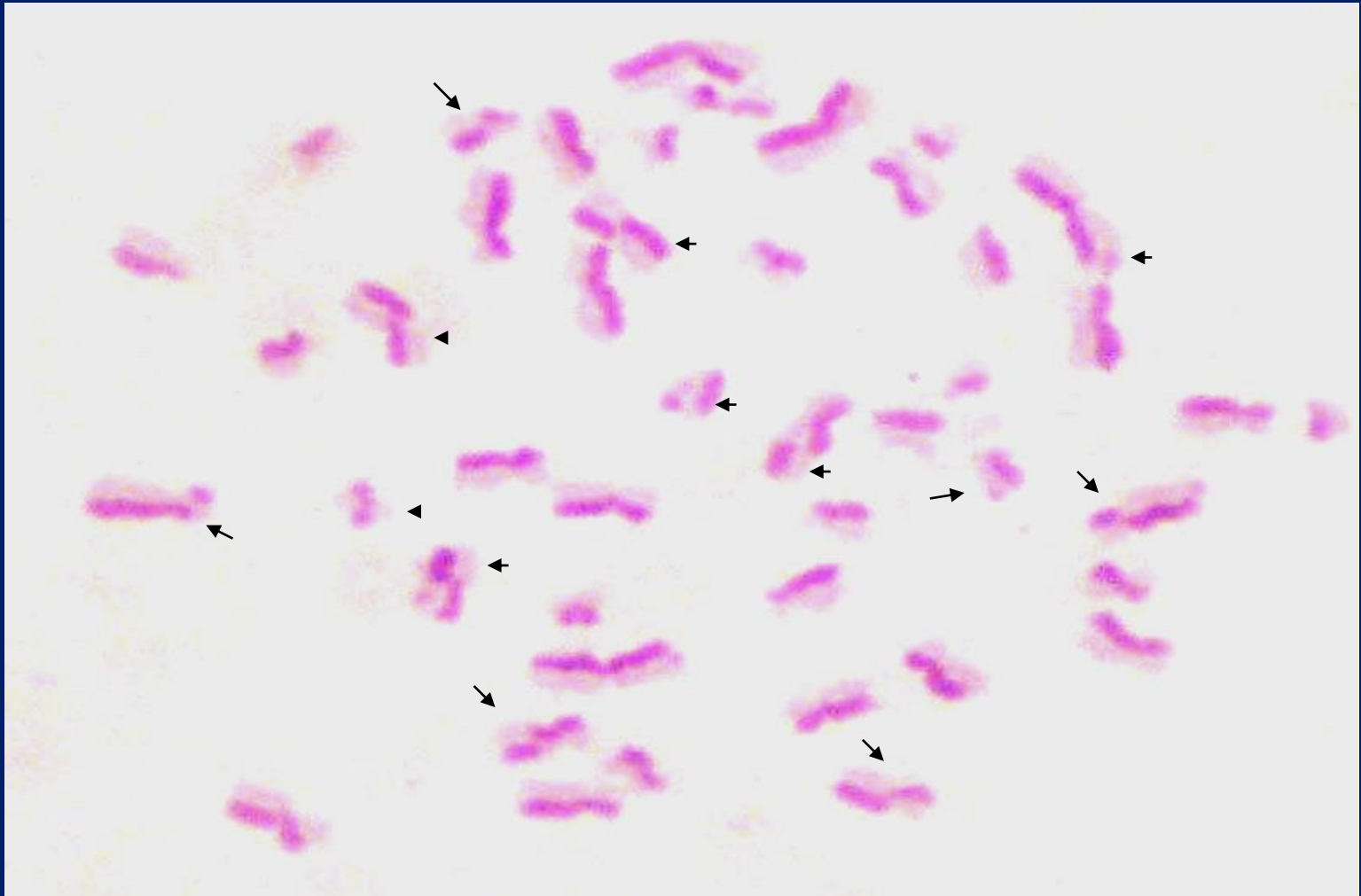
1^η μίτωση

2^η μίτωση



Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

- Πυρήνας από ανθρώπινα λεμφοκύτταρα με χρωμοσώματα χρωματισμένα με τη μέθοδο FPG για τον προσδιορισμό των SCEs.



Ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων Sister Chromatid Exchanges (SCEs)

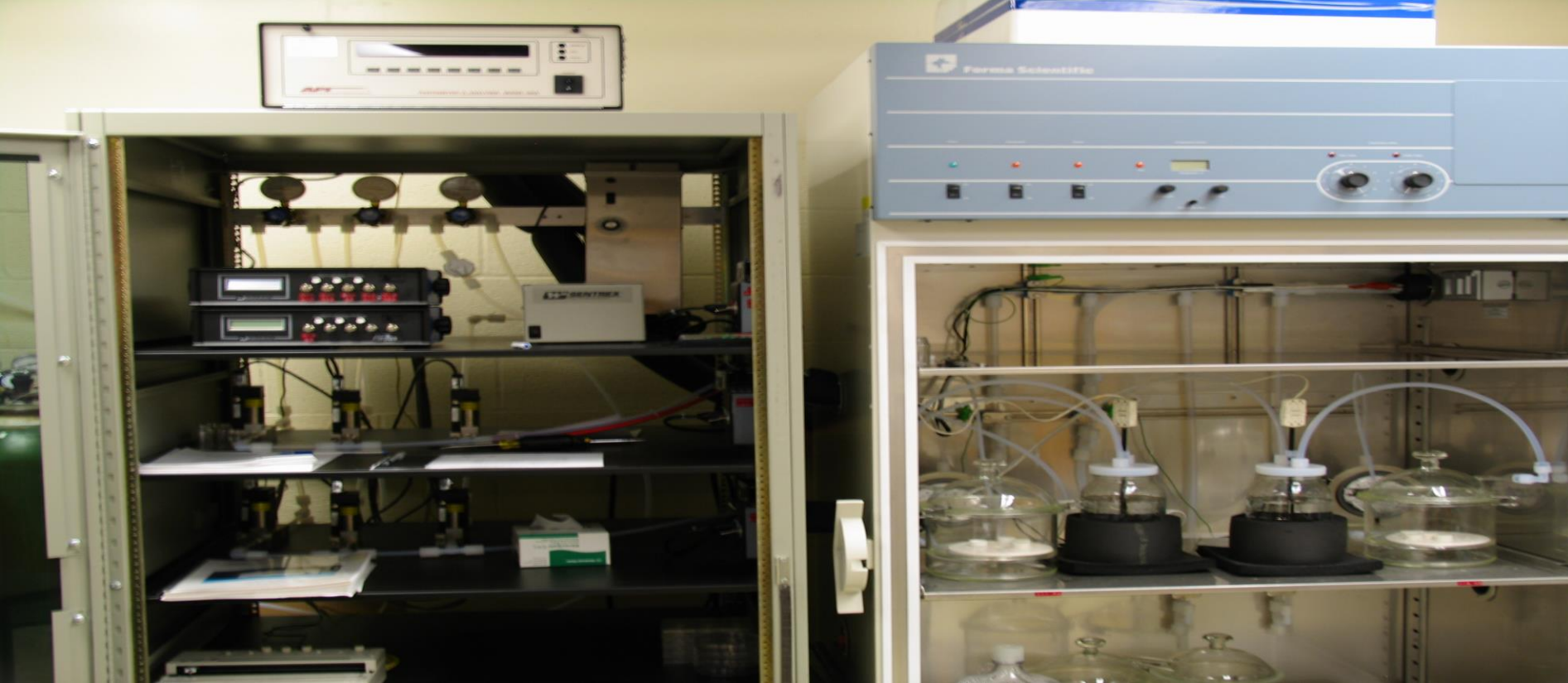
- Η αυξημένη παραγωγή ROS στα κύτταρα, αυξάνει τον αριθμό των SCEs.
- Έτσι, οι SCEs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντιοξειδωτικών ουσιών.
- Καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων επωάζονται με παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες (π.χ. μιτομυκίνη), έτσι αυξάνονται οι SCEs.
- Σε διαφορετικές καλλιέργειες, γίνεται επώαση των κυττάρων με τον προ-οξειδωτικό παράγοντα αλλά και με το αντιοξειδωτικό.
- Εάν ο αριθμός των SCEs στις κυτταροκαλλιέργειες που προστέθηκε το αντιοξειδωτικό είναι μικρότερος από αυτόν όπου προστέθηκε μόνο το προ-οξειδωτικό, τότε αυτό είναι ένδειξη αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΒΛΑΒΩΝ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

- Η μέθοδος OxyBlot Protein Oxidation Detection χρησιμοποιείται για γρήγορο και ευαίσθητο προσδιορισμό των βλαβών που προκαλούνται σε πρωτεΐνες από ελεύθερες ρίζες.
- Μία από τις τροποποιήσεις που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τις ROS είναι ο σχηματισμός καρβονυλίων.
- Αυτές οι καρβονυλικές ομάδες μπορούν να προσδιοριστούν αντιδρώντας με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) και παράγοντας δινιτροφαινυλδραζόνη (DNP-hydrazone).
- Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αντισώματα ειδικά για την ομάδα DNP-hydrazone.

Inhibition of ozone-induced SP-A oxidation by plant polyphenols

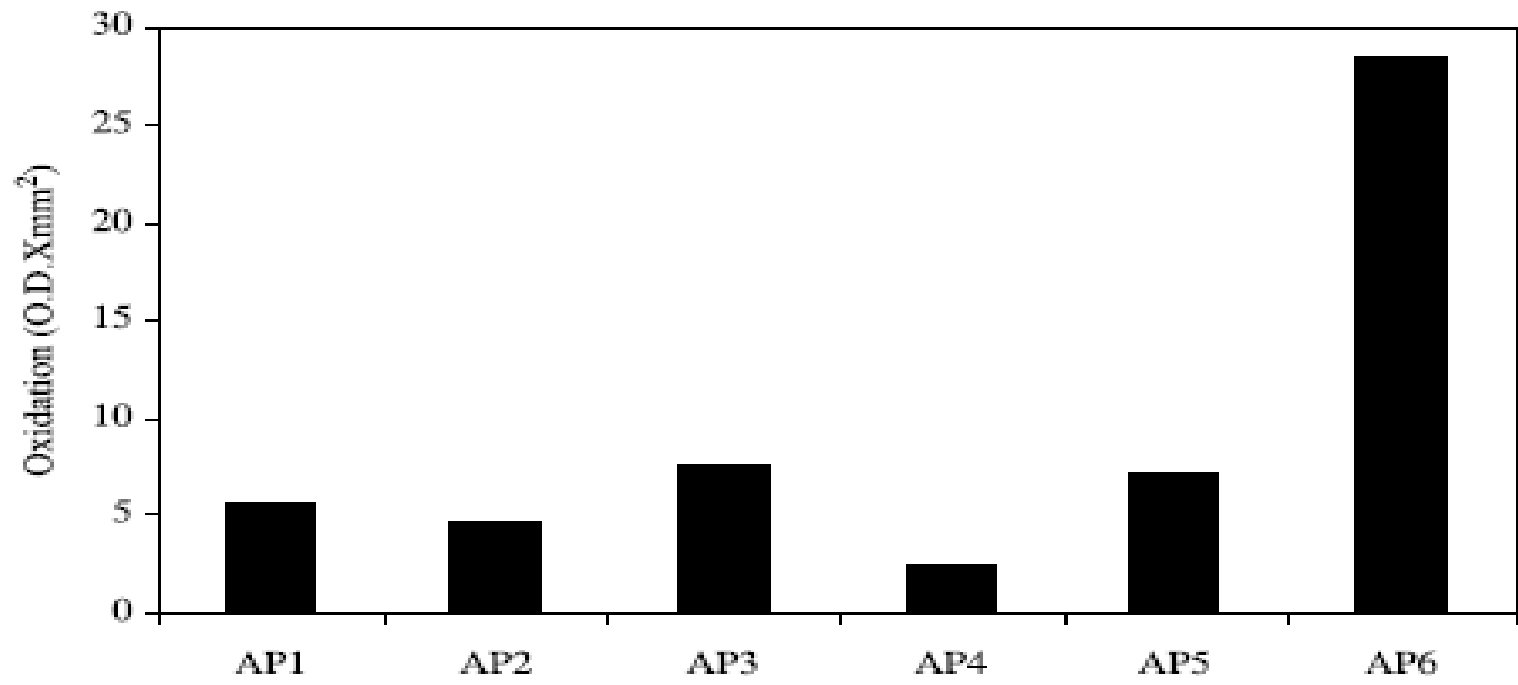
DIMITRIOS STAGOS^{1,2}, TODD M. UMSTEAD³, DAVID S. PHELPS³,
LEANDROS SKALTSOUNIS⁴, SERKO HAROUTOUNIAN⁵, JOANNA FLOROS^{2,3,6,†}, &
DEMETRIOS KOURETAS¹



- Σύστημα για την *in vitro* έκθεση πρωτεϊνών σε όζον.
- Αυτό το σύστημα παράγει ακριβώς καθορισμένες ποσότητες αερίων (φιλτραρισμένος αέρας με 5% διοξείδιο του άνθρακα και υδρατμούς σε θερμοκρασία 37°C) στα δοχεία έκθεσης μαζί με συγκεκριμένες ποσότητες όζοντος.
- Δείγματα της SP-A πρωτεΐνης εκτέθηκαν σε όζον (1 ppm) για 4 h.

- Προσδιορισμός καρβονυλικών ομάδων σε δείγματα της SP-A πρωτεΐνης με τη μέθοδο Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit.

A



- Φυτικές πολυφαινόλες προστατεύουν την SP-A πρωτεΐνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και την άμυνα των πνευμόνων από οξείδωση από το όζον.

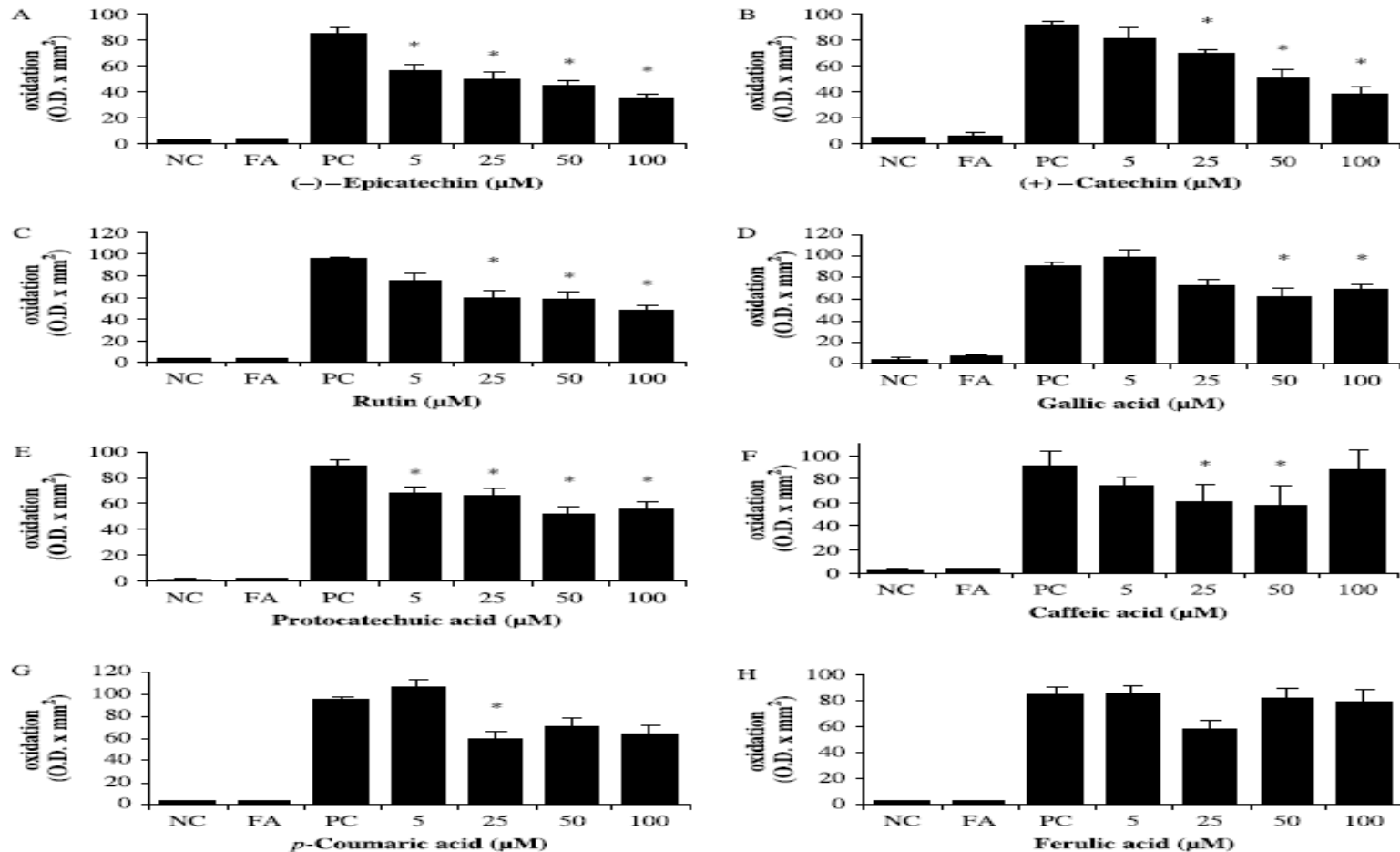


Figure 5. Effects of tested polyphenols on ozone-induced SP-A oxidation. SP-A was exposed to ozone (1ppm) for 4h. Oxidation was expressed as the product of optical density (OD) by the area (mm²) of dots. Values are the mean \pm SE from three independent experiments carried out in triplicate. NC: Negative control (SP-A alone exposed to filtered air); PC: Positive control (SP-A alone exposed to ozone); FA: SP-A plus polyphenol at a concentration of 100 μ M exposed to filtered air. ANOVA was used for the statistical analysis. * $p < 0.05$ when compared with positive control.

ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΣ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ:

Nrf2/ARE: ΕΝΑ ΜΟΡΙΟ ΚΛΕΙΔΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

- Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor 2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στο DNA στο στοιχείο απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (antioxidant response element, ARE) και έτσι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα.
- Αυτός ο μηχανισμός είναι μεγάλης σημασίας για την κυτταρική προστασία από το οξειδωτικό στρες και την επιβίωση των κυττάρων.

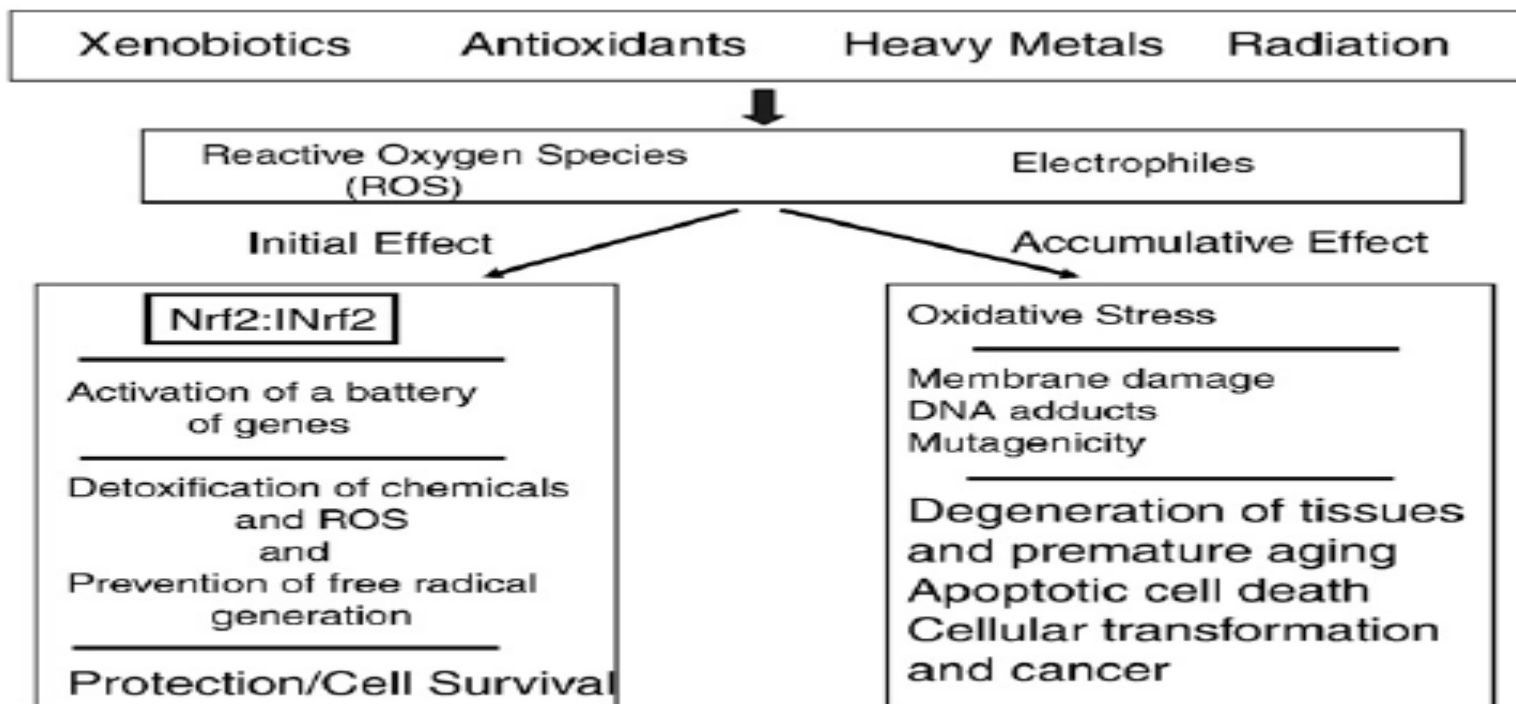
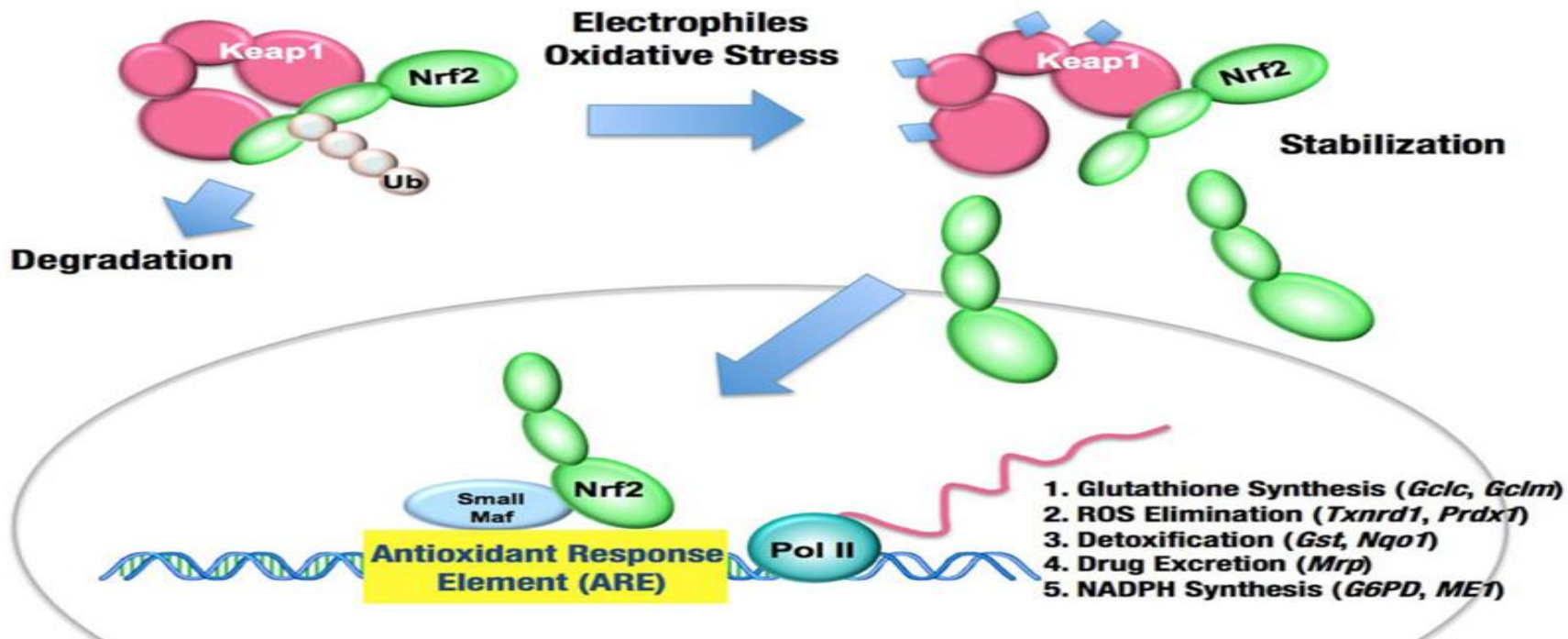
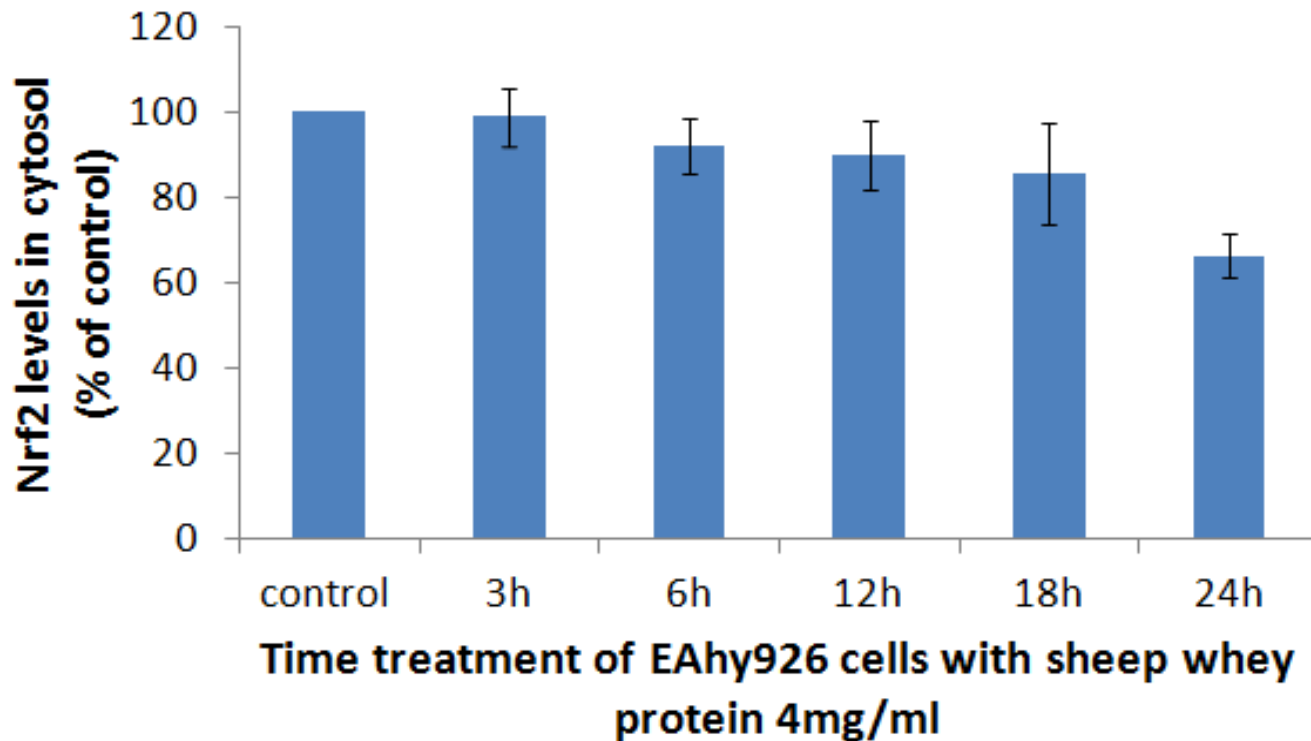
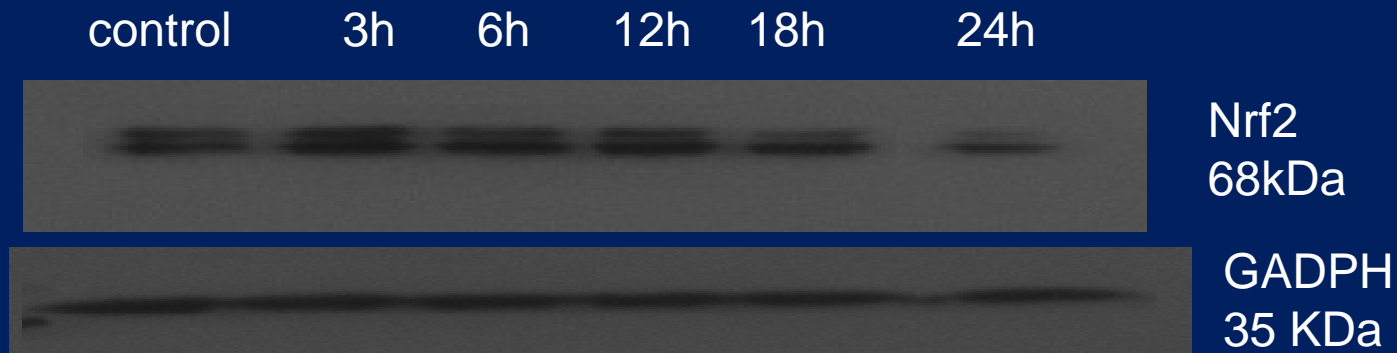


Fig. 1. Chemical and radiation exposure and coordinated induction of defensive genes.

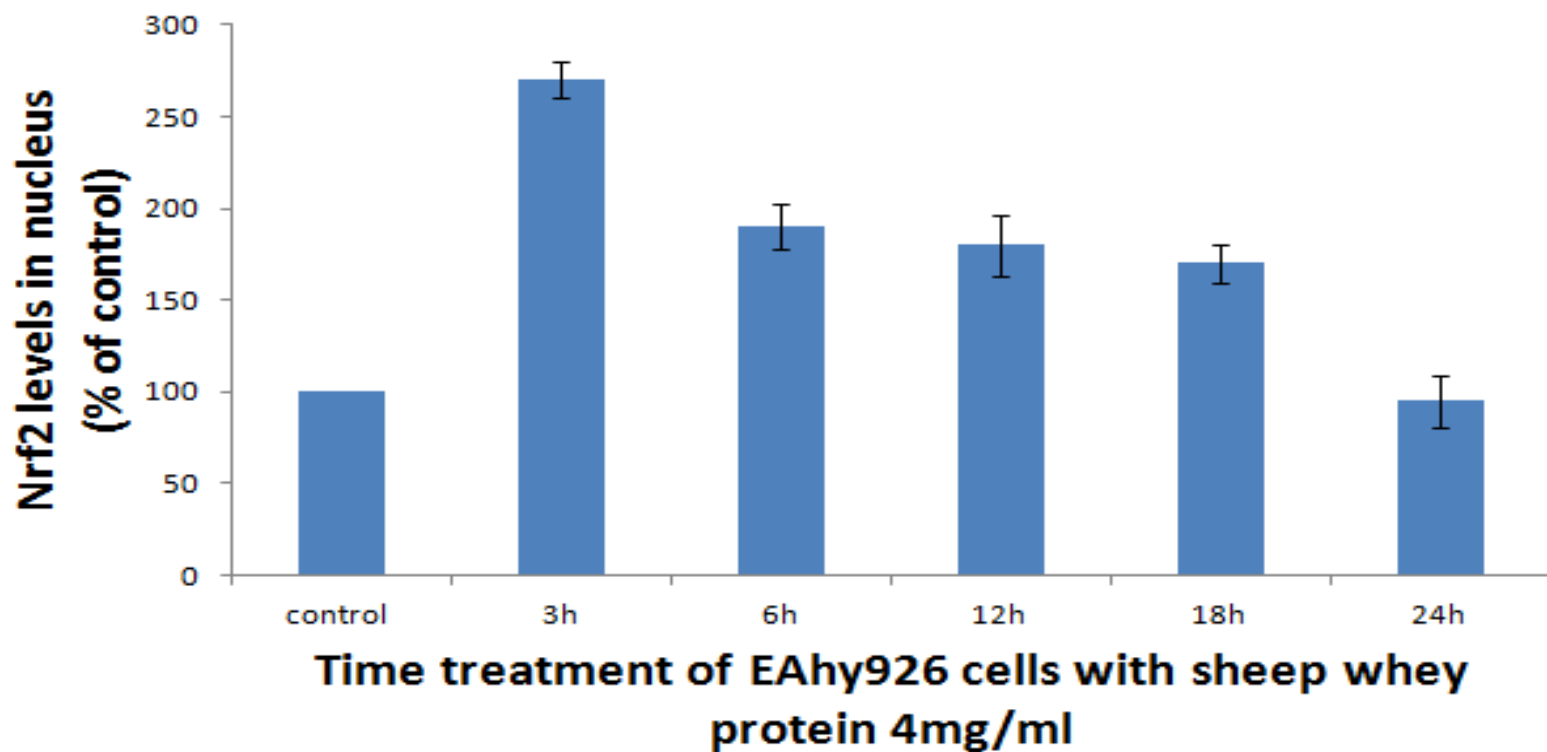
- Ο Nrf2 συνδέεται στο κυτταρόπλασμα με έναν αναστολέα του, το Keap1.
- Μετά από πρόκληση οξειδωτικού στρες ο Nrf2 φωσφορυλιώνεται ή/και αλλάζει η δομή του Keap1, και τα δύο μόρια αποσυνδέονται.
- Τότε ο Nrf2 μετακινείται στον πυρήνα, σχηματίζει ετεροδιμερή και συνδέεται στο ARE, και ενεργοποιεί την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων.
- Χρειάζονται 15 λεπτά για να γίνει η παραπάνω διαδικασία.
- Έτσι, με την ενεργοποίηση του Nrf2 προστατεύεται το κύτταρο από βλάβες που προκαλούνται από τις ROS, δεν προκαλείται απόπτωση και εξασφαλίζεται η επιβίωση του κυττάρου.



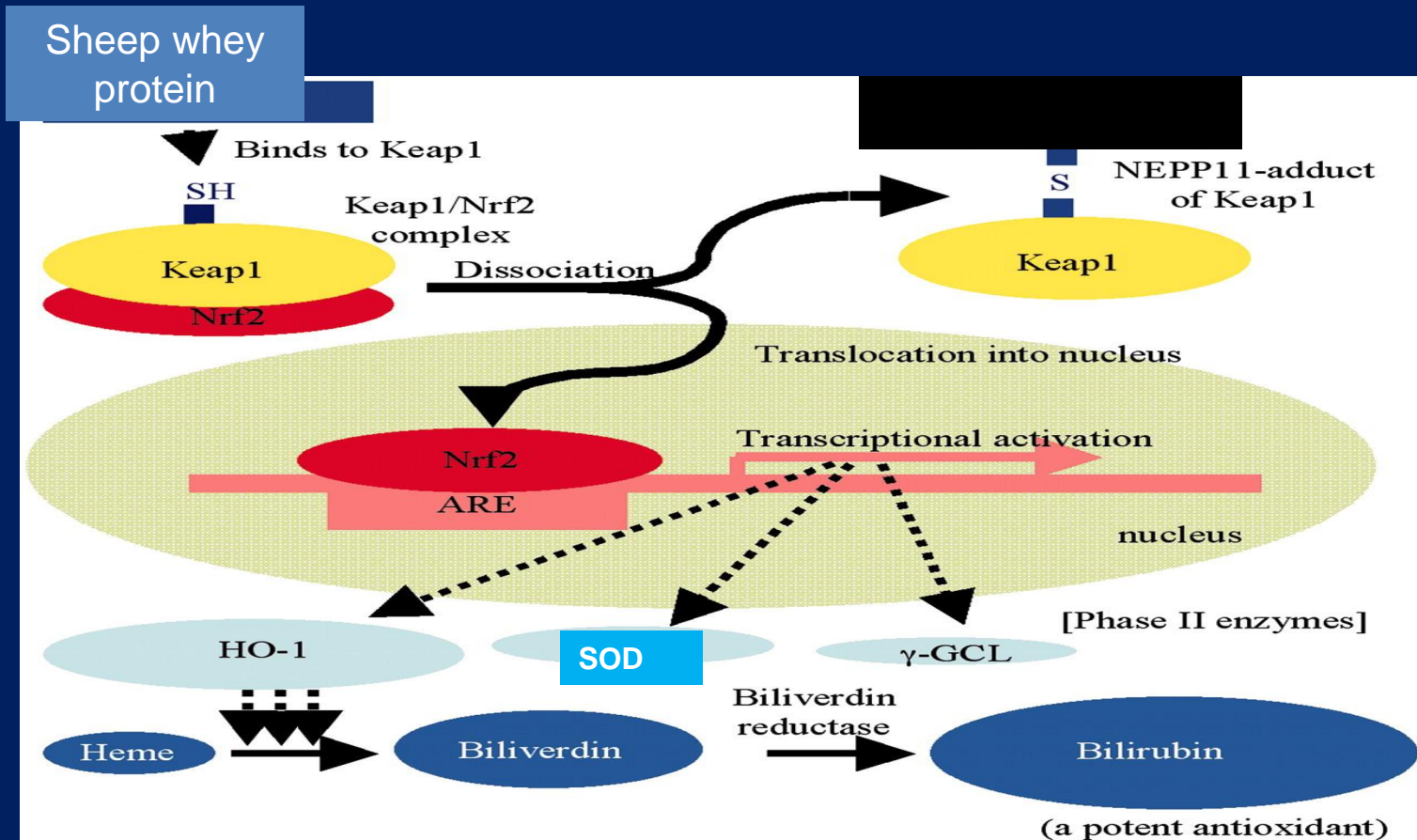
Επίπεδα του Nrf2 στο κυτταρόπλασμα μετά από επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με πρωτεΐνη τυρογάλακτος.



Επίπεδα του Nrf2 στον πυρήνα μετά από επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με πρωτεΐνη τυρογάλακτος.



Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος ασκεί την αντιοξειδωτική της δράση μέσω του Nrf2 μεταγραφικού παράγοντα στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ