بررسی خواص ضدسرطانی *Artima urmiana* بااستفاده از باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100

صدیقه مهرابیان*[۱] و معصومه عباسی[۲]

۱ - دانشکده علوم ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲ - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ملکان

چکیده

در طی متابولیسم اکسیداتیوی که در بدن صورت می گیرد ، رادیکال های آزاد می توانند به همـه ترکیبـات موجـود در سلول حمله نموده و موجبات تغییرات سلولی و پیری زودرس را فراهم نمایند . امروزه نقـش آنتـی اکسـیدان هـا بـرای برقراری تعادل در سلول ها بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است .

در تحقیق حاضر، آزمون تعیین قدرت جهش زائی بر اساس روش پیشنهادی پرفسور Ames و همکاران بـا اسـتفاده از سویه جهش یافته سالمونلاتیفی موریوم TA100 و سه مـاده سـرطان زای شـناخته شـده سـدیم آزیـد ، پرمنگنـات پتاسیم و کرزول انجام گرفته است . روش کار در این پژوهش بررسی دقیق اثر ضد جهش زائـی عصـاره هـای آرتمیـای خشک ، سیست و تخم دکپسوله می باشد ، در این بررسی شاهد مثبت ماده سرطان زائی و کشت شبانه سـالمونلاتیفی موریوم TA100 و شاهد منفی آب مقطر و کشت شبانه باکتری TA100 بود و نمونه ای مورد بررسی شـامل کشـت شبانه سالمونلاتیفی موریوم و ماده سرطان زا و ماده مورد آزمایش دارای خواص آنتی اکسیدان بـود و بـر اسـاس نتـایج بدست آمده از این آزمون تعداد کلنی های برگشتی در سویه سالمونلاتیفی موریوم TA100 و در صد ممانعت از مـواد جهش زا در مجاورت مواد ضد جهش وارد برنامه Spss گردید و با استفاده از آزمون هـای آمـاری لـون ، اتـوا ، ولـک و میزان هم واریانسی معنی دار معین شد و به این ترتیب در مواردی که ($p \leq ۰/۰۵$) بود فرضیه تحقیق مبنی بـر صـحت نتایج آزمون تعیین گشت علاوه بر این با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مقدار اسـتاگزانتین موجـود در آرتمیای خشک ، سیست و تخم دکپسوله ارزیابی شد . با استفاده از روش طیف سنجی IR وجود استاگزانتین نیـر در عصاره ها تأیید شد .

نتایج حاصل نشان داد آرتمیا ارومیانای موجود در دریاچه ارومیه و دیگر آب های شور اثر ضد جهشـی قـوی داشـتند و این اثر ضد جهش زائی و ضدسـرطانی ، ۸۵ درصـد در تخـم دکپسـوله شـده ، ۷۰درصـد در آرتمیـای کامـل خشـک و۱۰۰درصد در سیست مشاهده شد و مطابق فرمول Ong در صورتیکه اثر ضد جهش زائی بالای ۴۰درصد باشد مـاده مورد آزمایش قدرت ضد جهش زائی بالا دارد .

واژگان کلیدی: *Artima urmiana* ، ضدسرطان ، تست ایمز

*مسئول مکاتبه: masome_abasi@yahoo.com

مقدمه

شناسائی مواد یا عواملی که توانائی القا جهش را دارند ونیز عواملی که مـی تواننـد از ایـن جهـش هـا جلـوگیری کننـد فرآیندی است که نقش مهمی را در حفظ سلامتی ایفا می کند . در این میان بدیهی است که دسترسی به روشـی ارزان ، سریع و آسان جهت شناسائی مواد ضد جهش زا از اهمیت ویژه برخوردار است .

فعالیت ضد جهش می تواند بعد از افزودن عامل اختصاصی ، از طریق دستکاری های محیطـی و یـا در سـطح ژنتیکـی ناشی از افزایش سیستم ترمیم باشد . این اثرات توسط الل های ضد تومـوری و ژن هـای دخیـل در تـرمیم و تکثیرنیـز حاصل می گردد (Chudiere , & Ferrari – Iliou, 2003)

از جمله ترکیبات ضد جهشی می توان به انواع آنتی اکسیدان ها ، ویتامین ها ، فلاونوئیـدها ، آنتوسـیانیدها و ... اشـاره کرد . آنتی اکسیدان ها سبب حذف مواد حد واسط تولیدی از رادیکال آزاد شده و از ادامه واکـنش هـای اکسیداسـیون صورت گرفته با آن ها ممانعت بعمل می آورد و در نتیجه آنتی اکسیدان ها اغلب مواد احیا کننده ای مانند تیول هـا یـا پلی فنل ها هستند

(vertuani *et al.*, 2004) شروع تشـکیل رادیکـال هـای آزاد مـی توانـد بـا اسـتفاده از بازدارنـده هـای اکسـیژن تکی(singlet) و پایدارکننده پراکسید نیز به تعویق افتد به این ترتیب پیشرفت زنجیره ی رادیکال آزاد یـا هیـدروژن دهی آنتی اکسیدان ها از جمله استاگزانتین به حداقل می رسد (Krieger-liszkay , 2005).

در بیماری های قلبی – عروقی ویتامین های آنتی اکسیدان می توانند مانع از اکسیداسیون کلسترول ، لیپـوپروتئین بـا چگالی پایین شده و در نتیجه به حفـظ عملکـرد آنـدوتلیال کمـک شـایانی نمایـد (Herrera & Barbas , 2001) میزان محافظت ایجاد شده به وسیله یک آنتی اکسیدان بستگی به غلظت و واکنش آن با انواع اکسـیژن فعـال دارد هـر نوع آنتی اکسیدان با روشی خاص مانع صدمه ی اکسیداتیو مـی شـود از جملـه آنتوسـیانین کـه در فعالیـت آن اثـرات سینرژی هم مشاهده می گردد . سینرژی به این معنا است که در مخلوط آنتی اکسیدان ها فعالیت به مراتـب بیشـتری نسبت به جمع فعالیت های هر یک از آنتی اکسیدان هـا بـه تنهـائی دارد (Evelson *et al.*,2001) از آنجـائی کـه انجام آزمایشات بر روی حیوانات حساس آزمایشگاهی هزینه بردار و وقت گیر و بسیار پر زحمت اسـت امـروزه بـیش از صد روش بررسی کوتاه مدت پایه گذاری شده است که پتانسیل جهش زائی و سرطان زائی مواد مختلف را ارزیـابی مـی کند. در آزمون ایمز موتاسیون برگشتی در سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار می گیرد که متداولترین روش تعیین پتانسیل جهش زائی و سرطان زائی مواد شیمیایی است

(Mortelmans.& Zeiger , 2000) د راین آزمون از سـویه هـای سـالمونلا وابسـته بـه اسـید آمینـه هیسـتیدین استفاده می شود که هر کدام دارای جهش های مختلفی در اوپرون هیستیدین (His) خود می باشند این جهـش هـا به عنوان Hot spot برای مواد جهش زا می باشند که با مکانیزم های مختلف در DNA ایجاد آسیب مـی کننـد . در این آزمون تعداد کلنی های برگشتی حاصله از جهش خود به خودی درهرپلیت ثابت است با افزودن عامل جهش زا بـه

هر پلیت تعداد کلنی های برگشتی به صورت دوز پاسخ افزایش می یابد. آزمون ایمز در تمام دنیـا بـرای غربـال سـازی اولیه و شناسائی پتانسیل جهش زائی مواد شیمیائی و داروئی معتبر می باشد(Maron & Ames , 1982).
هدف از این تحقیق شناسائی خاصیت آنتی اکسیدانی آرتمیا اورمیانای است ، با داشتن ماده کارتنوئیـد قرمـز و نـارنجی که همان استاگزانتین می باشد . تا بتوان از این سخت پوست در صـنایع غـذائی داروئـی بعنـوان مـاده آنتـی اکسـیدان استفاده نمود .

مواد و روش کار

روش آزمون تعیین قدرت ضد جهش زائی
آزمون ضدجهش زائی براساس آزمون سالمونلاتیفی موریوم جهش یافته توسـط Maron & Ames (1982) و نیـز آزمون اصلاح یافته توسط (Mortel mans & zeiger 2000) انجام گرفت . این آزمون با افـزودن ۰/۱ml مـاده مورد آزمایش شامل عصاره (آرتمیای خشک سیست و تخم دکپسوله) به ۰/۱mlکشت تازه شـبانه TA100 و ۰/۱ml از ماده جهش زا استفاده شده (آزیدسدیم ، پرمنگنات پتاسیم و کرزول) در لوله محتوی ۲ ml تاپ آگار صورت گرفت که به منظور انجام چند چرخه تقسیم سلولی و ایجاد یک زمینه رشد باکتریایی با چشـم قابـل رویـت و شـمارش مـی باشد
۰/۱ml از محلول ۰/۵m M هیستیدین – بیوتین نیز به هر لوله آزمایش اضافه شد . محتویات این لولـه هـا پـس از ۳ ثانیه تکان دهی یا شیکر در سطح محیط های گلوکز آگار حداقل که قبلا تهیه شده بودند گسترده شدند . پس از بسـته شدن آگار پلیت ها وارونه شده و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند . در این آزمـون شاهدهای مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شدند . کنترل منفی شامل ۰/۵ml آب مقطـر و ۰/۱ml کشـت تـازه شـبانه TA100 و محلول هیستیدین و بیوتین ۰/۵m M بود . شاهد مثبت شامل ۰/۱ml ماده جهـش زا و ۰/۱ml کشـت تازه شبانه TA100 و محلول هیستیدین و بیوتین ۰/۵m M که مطـابق روش ذکـر شـده مراحـل مختلـف در مـورد شاهد مثبت و منفی نیز انجام شد . در هر آزمون سه پلیت همزمان بکار گرفتـه شـد تـا نشـان دهنـده سـه بـار تکـرار همزمان بود . بعد از پایان دوره گرمخانه گذاری متوسط تعداد کلنی های برگشـتی در هـر پلیـت شـمارش و بـا شـاهد مثبت و منفی مقایسه شد .

کروماتوگرافی لایه نازک
حـدود ۱۰ میلـی گـرم از نمونـه مـورد آزمـایش درml ۲ سـیکلوهگزان حـل شـده و همـین روش بـرای مـاده استاندارد(British pharmacopoeia) نیز به کار گرفته شد .
فاز متحرک شامل اترسیکلوهگزان تهیه شد . سپس صفحات سیلیکاژل آماده از هر یک از مواد مـورد سـنجش و مقـدار ۱۰ میکرولیتر به وسیله پی پت پاستور در فاصله ۲ سانتی متری از لبه صفحه گذاشته شد . پس از خشک شدن لکه هـا صفحه سیلیکا درون تانک الکتروفورز حاوی فاز متحرک قرار داده شد . پس از آن که لکه ها حدود ۲/۳ از ارتفـاع پلیـت بالا آمدند . صفحه سیلیکا از تانک خارج و در هوای آزاد خشک گردید و RF حاصله در زیر نور ماوراء بـنفش بـا طـول موج ۲۵۴ نانومتر اندازه گیری و با نمونه استاندارد مقایسه شد . در کروماتوگرام به دسـت آمـده لکـه حاصـل از نمونـه مورد آزمایش و لکه استاندار دارای RF یکسانی بودند (۲۰۰۴) British pharmacopoeia .

نتایج

تایید ژنوتیپ سویه سالمونلاتیفی موریوم TA100

۱- جهش rFa – مشاهده هاله شفاف (به قطر حدود ۱۶ میلی متـر) در اطـراف دیسـک آغشـته بـه کریسـتال ویولـه نشانگر عدم رشد باکتری و وجود جهش rFa می باشد زیرا ایـن جهـش سـبب فقـدان نسـبی سـدلیپوپلی سـاکاریدی پوشش سطح باکتری می شود . و در نتیجه کریستال ویوله می تواند به داخل دیواره باکتری نفوذ کـرده و باعـث مـرگ آن ها شود .

۲- وجود پلاسمید R – Factor

عدم تشکیل هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک آنتی بیوتیک نشانگر مقاومت این سویه نسـبت بـه آمپـی سـیلین و وجود پلاسمید R – Factor در آن ها می باشد .

۳- جهش uvrB

عدم رشد در ناحیه پرتو دیده نشان دهنده جهش uvrB می باشد هیچ رشدی نباید درپلیت های شاهد صورت گیـرد . عدم رشد در ناحیه پرتو دیده جهش uvrB را نشان می دهد .

جدول شماره ۱ – نتایج بررسی ژنوتیپ سالمونلاتیفی موریوم سویه TA100

مشخصه ژنوتیپی / باکتریانم باکتری	جهش Rfa	جهش uvrB	R – Factor
سالمونلاتیفی مویوم TA100	+	+	+

نتایج آزمون جهش زائی

اثر جهش زائی در حضور مواد جهش زای آزیدسدیم ، پرمنگنات پتاسیم و کرزول بـا اسـتفاده از سـالمونلاتیفی موریـوم TA100 در غیاب نمونه های مورد آزمایش به صورت ممانعت ۱۰۰درصد یا صفر درصد تعیین شد .

محاسبه در صد بازدارندگی مطابق فرمول زیر انجام گرفت :

$$\text{درصدبازدارندگی} = \left(\frac{A - B}{A}\right) \times ۱۰۰$$

این فرمول توسط Brockman و همکاران در سال ۱۹۸۰ ارائه گردیده است (Ong *et al.*, 1980) در این فرمـول B تعداد کلنی های برگشتی در هر پلیت در حضور ماده جهش زا و نمونه مورد آزمـایش مـی باشـد و A تعـداد کلنـی

های برگشتی در هر پلیت در حضور کنترل مثبت است. در این فرمول تعداد کلنی های برگشتی موجود درپلیـت هـای منفی (جهش های خودبخودی) از صورت و مخرج کسر باید کم شود . این فرمول به ایـن صـورت تفسـیر مـی شـود : زمانی که درصد بازدارندگی بین ۲۵ الی ۴۰ درصد باشد . اثر ضد جهش زائی نمونه آزمایشی متوسط فرض مـی شـود و هنگامی که درصد بازدارندگی بیش از ۴۰ درصد به دست آید اثر ضدجهش زائی نمونه آزمایشی قوی است و در صورتی که از ۲۵درصد کمتر نشان داده شود اثر ضد جهش زائی منفی تلقی می گردد . اثر ضدجهش زائی به صورت جداول(۲ ، ۳ و ۴) نشان داده شده است . نتایج این آزمون ها نشان داد که عصاره های مختلف آرتمیای خشک ، تخـم دکپسـوله شده و سیست دارای خاصیت ضدجهشی می باشند . در جداول(۲ ، ۳ و ۴) مشخص گردید که کلنی های برگشـتی در حضور ماده ضدجهش نسبت به نمونه شاهد مثبت کاهش یافته است . همچنین درصد بازدارندگی از جهـش بـالاتراز۴۰ درصد محاسبه شد و نشان دهنده اثر ضدجهش زائی قوی نمونه های مورد آزمایش در مقابل سه ماده پروموتاژن (آزیـد سدیم ، پرمنگنات پتاسیم وکرزول) می باشد .

تفسیر آماری – در این پژوهش ، اطلاعات مورد نیاز نظیر تعداد کلنی های برگشتی در سویه سـالمونلا TA100 بـا در نظر گرفتن شاهد مثبت و منفی در مورد کلیه مواد آزمایشـی وارد بانـک اطلاعـاتی نـرم افـزار آمـاری SPSS اسـتفاده گردید .

جدول شماره ۲ – نتایج بررسی اثر بازدارندگی و تعدیل جهش زائی آزیدسـدیم توسـط ارتمیاخشـک ، سیسـت ، تخـم دکپسوله شده با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم TA100

تعدادآزمایشات / تعدادکلنی برگشتی باکتری ودرصدآن	سالمونلاتیفی موریوم TA100					
	۱		۲		۳	
کنترل مثبت (سدیم آزید)	۱۶۰۰	–	۱۵۰۰	–	۱۴۴۰	–
کنترل منفی	۴۴۰	–	۵۱۲	–	۵۲۴	–
عصاره آرتمیا خشک	۶۰۰	٪۸۶	۷۲۰	٪۷۸	۸۰۰	٪۶۹
عصاره تخم دکپسوله شده	۵۰۰	٪۹۴	۷۲۴	٪۷۸	۶۳۲	۸۸٪
عصاره سیست	۴۸۰	٪۹۶	۳۶۰	٪۱۰۰	۴۰۰	٪۱۰۰

جدول شماره ۳ – نتایج بررسی اثر بازدارندگی و تعدیل جهش زائی پرمنگنات پتاسیم توسط آرتمیا خشک ، سیسـت و تخم دکپسوله شده با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم TA100

تعداد آزمایشات / تعدادکلنی برگشتی باکتری ودرصدآن	سالمونلاتیفی موریوم TA100					
	۱		۲		۳	
کنترل مثبت (پرمنگنات پتاسیم)	۱۶۸۰	–	۱۷۶۰	–	۲۰۰۰	–
کنترل منفی	۴۴۰	–	۵۱۲	–	۵۲۴	–
عصاره آرتمیا خشک	۷۲۴	٪۷۷	۸۸۴	٪۷۰	۱۰۱۶	٪۶۶
عصاره تخم دکپسوله شده	۶۰۰	٪۸۷	۷۲۴	٪۸۳	۸۰۰	٪۸۱
عصاره سیست	۵۰۰	٪۸۷	۴۸۰	۱۰۰٪	۳۶۰	٪۱۰۰

جدول شماره ۴ – نتایج بررسی اثر بازدارندگی و تعدیل جهش زائی کـرزول توسـط آرتمیـا خشـک ، سیسـت و تخـم دکپسوله شده با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم TA100

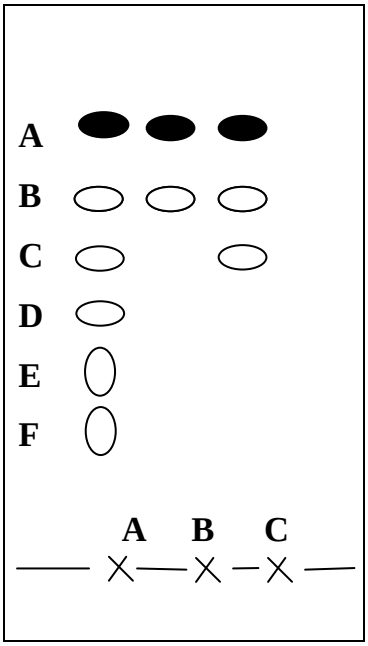
تعدادآزمایشات / تعدادکلنی برگشتی باکتری ودرصدآن	سالمونلاتیفی موریوم TA100					
	۱		۲		۳	
کنترل مثبت(کرزول)	۱۵۶۰	–	۲۴۰۰	–	۲۸۰۰	–
کنترل منفی	۶۶۴	–	۵۲۰	–	۴۸۰	–
عصاره آرتمیا خشک	۱۰۰۰	٪۶۲	۹۲۰	٪۷۸	۸۴۰	٪۸۴
عصاره تخم دکپسوله شده	۷۲۴	٪۹۳	۶۴۸	٪۹۲	۷۳۴	٪۸۹
عصاره سیست	۴۸۰	٪۱۰۰	۸۰۰	٪۸۵	۳۶۰	٪۱۰۰

وجود اختلاف معنی دار ($p \leq ۰,۰۵$) بین متوسط تعداد کلنی های برگشتی در هر پلیت در ارتبـاط بـا موتـاژن و نیـز عصاره های مختلف با استفاده از آزمونهای آماری (HSD) تفسیر شد . بررسی آزمون آماری صحت نتایج به دسـت آمده راتایید می کند .

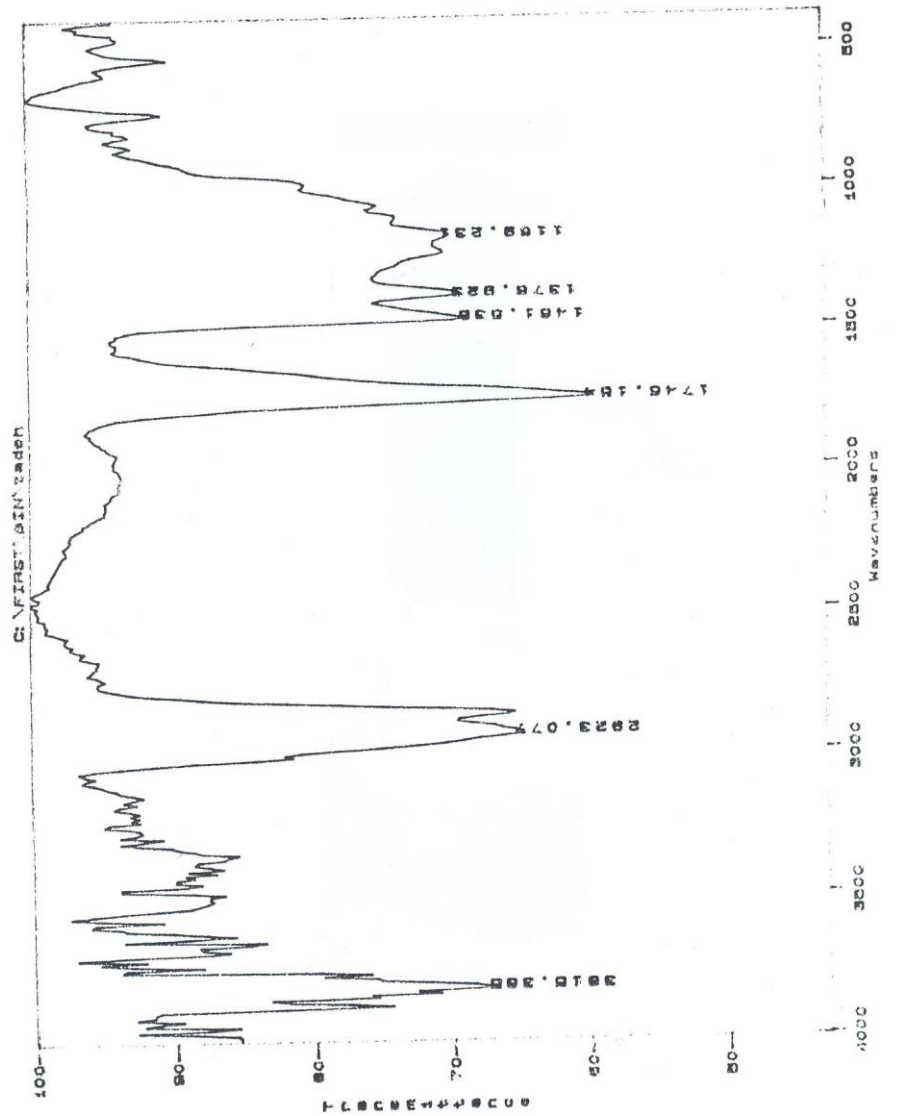
نتایج حاصل از کروماتوگرافی TLC (لایه نازک) نشان داد که پیشرفت نمونه های حاصـل از عصـاره آرتمیـای خشـک شده ، سیست و تخم دکپسوله شده بر روی سیلیکاژل منجر به ایجاد یک نوار نارنجی پررنگ با $RF = \%$ ۴۰ گردید .

این نوار از نظر رنگ و میزان RF مشابه استاگزانتین رفرانس بوده و اصـلی تـرین لکـه جـدا سـازی نمونـه هـای اولیـه محسوب می شود . ۵ لکه کم رنگ از عصاره آرتمیای خشک و یـک لکـه نـارنجی کـم رنـگ از تخـم دکپسـوله شـده و سیست بوجود آمد (شکل شماره ۱) در اینجا به نظر می رسید نوارهای کم رنگ ایجاد شده شکل استاگزانتین اسـتری شده و یا کارتنوئیدهای دیگر در ساختمان آرتمیا باشد . اما بعد از جداسازی اجزای موجـود در عصـاره هـای حاصـل بـا ستون کروماتوگرافی بر طیف سنجی با اسپکتروفتومتر (FT = IR) و مقایسه آنها مشاهده شد که طیف هـای ایجـا د شده طیف حاصل از نوار اصلی بودند (شماره ۲).

شکل شماره ۱ – کروماتوگرافی لایه نازک عصاره آرتمیای خشک (A) تخم دکپسوله شده B و سیست C بر روی کاغذ کروماتو گرافی سیلیکاژل .



شکل ۲- طیف IR از لکه های عصاره آرتمیای خشک، سیست وتخم دکپسوله شده



بحث و نتیجه گیری

امروزه دانشمندان بر این عقیده هستند که آسیب ها و تغییرات ژنتیکی ایجـاد شـده در تـوالی و انسـجام DNA بـروز جهش و موتاسیون در ژن ها و دیگر تغییرات در ساختارکروموزومی در سرطان زائی نقش بسزائی دارند (Nakabeppu *et al.*,2006).

در پژوهش حاضر آرتمیا ارومیانای موجود در دریاچه ارومیه اثر ضدجهشی قوی برعلیه سه ماده جهش زای سدیم آزید ، پرمنگنات پتاسیم و کرزول نشان داد . درصد بازدارندگی در مقابل مواد پروموتاژن ۸۵درصد در تخم دکپسـوله شـده و ۷۰ درصد در آرتمیای خشک و ۱۰۰ درصد در سیست مشاهده شد .

آرتمیا دارای منبع غنی ازترکیبات غذائی مفید و ضروری با خواص آنتـی اکسـیدانی مـی باشـد . همچنـین پیگمانهـای کاروتنوئیدی نظیربتاکاروتن ، کانتاگزانتین آستاگزانتین در ساختار آرتمیا گزارش شده است کـه بسـیاری از آنهـا دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشد (Duarte &Lunec , 2005).

نتایج حاصل از کروماتوگرافی و طیف سنجی با اسپکتروفتومتر وجود ماده استاگزانتین را در آرتمیا اورمیانا تایید نمود .

در تحقیقات انجام شده مجموعه ای از انواع مختلف آنتی اکسیدان ها در سیستم دفاعی داخلی بدن شامل ویتامین ها ، مواد معدنی ، آنتی اکسیدان و ترکیباتی مثل گلوتایتون وجود دارد . علاوه بر گلوتایتون ترکیبات دیگری از جملـه مـواد موجود در مواد غذائی دریائی در حذف و محدود سازی رادیکال های آزاد نقش دارند (Trusheva , 2006).

منابع

Chudiere, J. & Ferrari – Iliou, R. 2003. Interacellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology, 37: 949 – 962.

Duarte, T. & Lunec, J. 2005. When is antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and of vitamin C & Free radicals. Free Radic.Res.39 (7), 671-686. reactions

Evelson, P., Travacio, M. & Repetto, M .2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. Arch. Biochem . Biophys., 388(2):,261-26 .

Herrera, E. & Barbas , C. 2001. Vitamin E: action and metabolism.perspectives , J. physiol.Biochem.,57(2),43-56 .

Krieger – Liszkay , A.2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. J.Exp.Bot., 56:337-346.

Mortelmans , K. & Zeiger . E. 2000. The Ames salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 60:429- 455.

Maron , D.M. & Ames , B.N. 1982. Revised method for the salmonella mutgenicity test. Mutation Research, 113: 173-215.

BP. 2004. Monographs: medicinal and pharmaceutical substances. British pharmacopoeia, I & II. UK.

Nakabeppu , Y. , Sokumi , k. & sakamoto , k. 2006. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. Biol. Chem., 4 : 373 -379 .

Ong , T.M. ,wolf , C.R. & zeiger , E. 1980. Differential effects of cytochrome p450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S9 from rat liver. J. Environ . pathol.Toxicol.,4: 55- 65.

Trusheva , B.(2006) Bioactive constituents of Brazilian red proplis .
Evidence-based compleentary and Alternative Medicine. eCAM .oxford University press 3(2), 249-254 .

Vertuani , S. , Angusti , A. & Manferedini , S. 2004. The antioxidants and pro – antioxidants network: an overview Curr. pharm . 10, 1677 – 1694.