



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



***Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με *in vitro* μεθόδους και
κυτταρομετρία ροής σε εκχυλίσματα φυτών των
οικογενειών *Passifloraceae*, *Cactaceae*, *Rosaceae****

ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
ABSTRACT	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ελεύθερες Ρίζες	8
Δραστικές μορφές οξυγόνου	8
Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	9
1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	10
1) Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	10
3) Μετατροπή της ζανθίνης σε ουρικό οξύ.....	12
4) Κυτόχρωμα P450	12
5) Αυτοοξείδωση μορίων	13
Εξωκυτταρικές πηγές	13
1.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.3.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	14
1.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	17
1.4. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	20
1.4.1 Θετικές επιδράσεις	21
1.4.2. Αρνητικές επιδράσεις	21
1.5. Οξειδωτικό στρες	23
1.6. Πολυφαινόλες	24
1.6.1. Πολυφαινόλες και ασθένειες	24
1.6.2. Χημική δομή και ταξινόμηση.....	25
1.6.3. Φλαβονοειδή	25
1.6.4. Φαινολικά Οξέα	26
1.7. Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση.....	27
1.8. Φρούτο του δράκου (Hylocereus undatus).....	29
1.9. Φρούτο του Πάθους (Passiflora edulis)	33
1.10. Πυράκανθος (Pyracantha Coccinea)	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1. . Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH [•]	39
2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{•+} 41	
2.3. Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.	42

Επαγόμενη από ρίζες $\text{ROO}\bullet$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	44
2.4. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926	49
2.5. Μέθοδος ΧΤΤ για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλισμάτων	49
2.6. Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS	51
3. Αποτελέσματα.....	56
3.1. Εξουδετέρωση της ρίζας DPPH [•]	56
3.2. Εξουδετέρωση της ρίζας ABTS ^{•+}	57
3.3. Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου ($\text{ROOH}\bullet$) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.....	59
3.4. Μελέτη της τοξικότητας του εκχυλίσματος <i>Pyracanta Coccinea</i> στην κυτταρική σειρά EA.hy926 με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	61
3.5. Αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής	63
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	64
5. Βιβλιογραφία	67

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Δημητρίου Στάγκου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τη συνεχή βοήθεια για την εκπόνηση της.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του.

Τέλος ευχαριστώ για τη βοήθεια και υποστήριξη όλη την εργαστηριακή ομάδα.

Περίληψη

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες έχουν συσχετισθεί με πολλές ασθένειες, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer καθώς και με τη γήρανση. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας πλέον έχει στραφεί στη χρήση πολλών φυτικών εκχυλισμάτων τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του σε μια ομάδα φυτοχημικών ουσιών τις πολυφαινόλες.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με *in vitro* μεθόδους και κυτταρομετρία ροής σε εκχυλίσματα από τα φυτά της οικογένειας Passifloraceae, Cactaceae, Rosaceae. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η πρώτη μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH[•] και η δεύτερη βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}. Η ρίζα DPPH[•] και ABTS^{•+} μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT). Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε τα αντιδραστήρια DPPH[•] και ABTS^{•+} ανάγονται με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. Ο προσδιορισμός της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με την αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική γεγονός μέσω της προστατευτικής δράσης απέναντι σε ROO⁻ που δείχνει κάποιον μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξιγόνου δράσης. Από τη συλλογή αποτελεσμάτων των παραπάνω μεθόδων φάνηκε ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση έχει το *Pyracantha coccinea* της οικογένειας Rosaceae και για το λόγο αυτό έγινε μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης του με τη μέθοδο XTT και στη συνέχεια προσδιορισμός της μεταβολής της γλουταθειόνης και των ROS με κυτταρομετρία ροής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα φυτικά εκχυλίσματα των οικογενειών Passifloraceae, Cactaceae, Rosaceae έχουν αντιοξειδωτική δράση

λόγω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών και της αύξησης αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η γλουταθειόνη.

ABSTRACT

Free radicals and oxidative stress have been associated with many diseases, such as diabetes, cancer, Alzheimer's disease and aging. The interest of the scientific community has now turned to the use of many plant extracts which having antioxidant activity due to high concentration of a group of phytochemicals substances polyphenols.

The objective of this study is to determine the antioxidant activity in vitro methods and flow cytometry in extracts from plants of the family Passifloraceae, Cactaceae, Rosaceae. For this purpose, two methods were used to determine the antioxidant capacity. The first method for estimating the antioxidant capacity, based on the ability to interact with the DPPH[•] radical and the second is based on the ability to interact with the radical ABTS^{•+}. The radical DPPH[•] and ABTS^{•+} can be inactivated or by adding an electron (SET) or a hydrogen atom (HAT). When in the ligand solution is added to a substance having antioxidant activity then the reagents DPPH[•] and ABTS^{•+} reduced so that the optical absorbance decreases. Determining the antimutagenic activity of the extracts was determined by the inhibition of the conversion of supercoiled plasmid to the configuration of open circular or linear event through the protective action against ROO[•] showing one antioxidant mechanism antimutagenic action. By collecting the results of these methods seemed higher antioxidant activity has *Pyracantha coccinea* the Rosaceae family, and therefore was a study of the cytotoxic action of the XTT method and then determining the change in GSH and ROS by flow cytometry.

The results of this study show that the herbal extracts of Passifloraceae family, Cactaceae, Rosaceae have antioxidant activity due to the capture of free radicals and increasing antioxidant molecules, such as glutathione.

1. Εισαγωγή

1.1. Ελεύθερες Ρίζες

Με τον όρο “ελεύθερες ρίζες” αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Cheeseman & Slater, 1993). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, 2001; Prior & Cao, 1999)

Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός (κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Cheeseman & Slater, 1993).

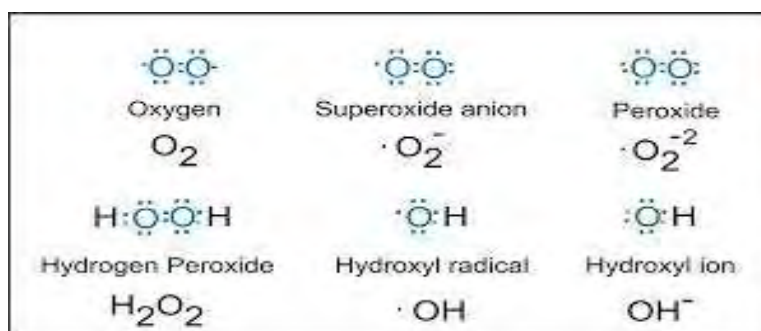
Δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι χημικά δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο και σε αυτές ανήκουν και ουσίες που αποτελούν ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: δραστικές μορφές οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο 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)

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας και μπορούν να διακριθούν τα μονήρη ηλεκτρόνια που διαθέτει το ανιόν σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου.



Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στιβάδας.

Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO^{\cdot} και το διοξειδίο του αζώτου NO_2^{\cdot} καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $ONOO^-$) (Fang, Yang, & Wu, 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}\cdot$)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$)	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO^-)

1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου (ενδοκυτταρικές πηγές). Επίσης παράγονται και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον (εξοκυτταρικές πηγές). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στη μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά.

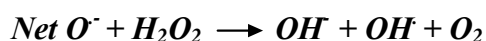
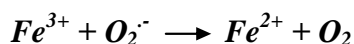
Ενδοκυτταρικές πηγές

1) Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $\text{O}_2\cdot^-$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH_2 στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $\text{O}_2\cdot^-$ (Chance et al., 1979). Το $\text{O}_2\cdot^-$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $\text{O}_2\cdot^-$ και στο H_2O_2 δημιουργείται $\text{OH}\cdot$.

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^{\cdot-}$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} . Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH^{\cdot}), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Boveris & Cadenas, 1997).

2) Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Polymorphonuclear neutrophil, PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani & Evans, 1979). Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες, ενώ το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petrone et al., 1992).

Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$:



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani & Evans, 1979; Meydani et al., 1992).

Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει HOCl.

3) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kupprasamy & Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή 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 $O_2^{\cdot-}$. 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 οξυγόνου είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

4) Κυτόχρωμα P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell & Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας $O_2^{\cdot-}$.

5) Αυτοοξειδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες,θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).

Εξωκυτταρικές πηγές

Η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες (Koren, 1995; Victoria, 1994). Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 2: εξωκυτταρικές πηγές ROS

1.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας για την αντιμετώπιση των επιβλαβών δράσεων των ελευθέρων ριζών. Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος. Το σύστημα της αντιοξειδωτικής

άμυνας απαρτίζεται από ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες είτε μειώνουν την παραγωγή τους (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell 2001).

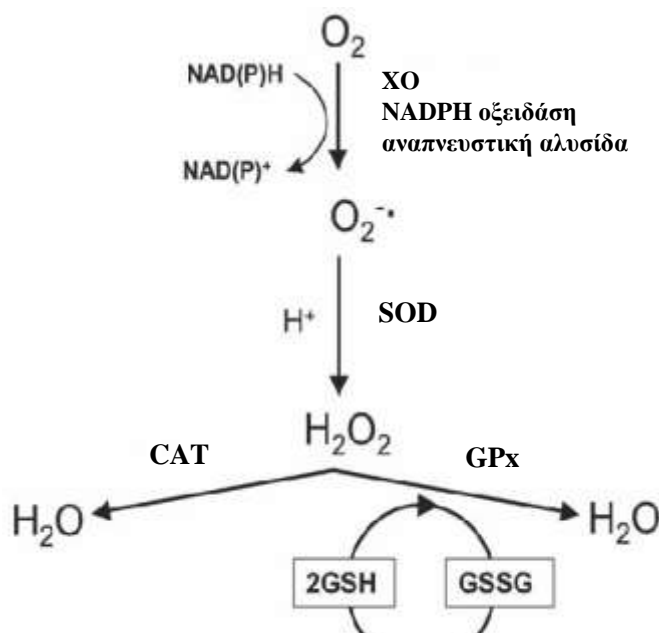
1.3.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ανήκουν διάφορα ένζυμα τα οποία είτε δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες είτε μειώνουν την παραγωγή τους. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR) (Halliwell & Gutteridge 1998).

Πίνακας 3: Αντιδράσεις που καταλύουν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα

Ένζυμα	Αντίδραση που καταλύουν
Υπεροξειδική δισμουτάση	$2 O_2^{\bullet -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Καταλάση	$2 H_2O_2 \Leftrightarrow O_2 + H_2O$
Περοξειδάση της γλουταθειόνης	$GSH + R^{\bullet} \rightarrow GSSG + R$
Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης	$NADPH + GSSG \Leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

GSH: γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης, R[•]: ελεύθερη ρίζα, NADPH: φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο.



Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η δράση της SOD ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τους McCord και Fridovich (McCord & Fridovichin, 1969). Η SOD καταλύει την αντίδραση αυτοοξειδωσης του $O_2^{\bullet -}$ σχηματίζοντας H_2O_2 και O_2 (Πίνακας 3). Υπάρχει σε τρεις μορφές με την ίδια καταλυτική δράση, την κυτταροπλασματική μορφή (Cu/ZnSOD) τη μιτοχονδριακή (MnSOD), και μία νέα μορφή (Cu/ZnSOD) που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και εντοπίζεται εξωκυτταρικά και διαφέρει από την κυτταροπλασματική (Halliwell & Gutteridge, 1998; Michiels et al., 1994).

Η SOD θεωρείται ότι είναι από τα ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiels et al., 1994). Κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet -}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon 2000).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Chance et al., 1986; Masters et al., 1986). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4

πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Περοξειδάση (GPx) και αναγωγή (GR) της γλουταθειόνης

Η περοξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια σεληνοπρωτεΐνη (Se-GPx). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες υπομονάδες 22 kD (Spallholz & Boylan, 1991). Κάθε μία περιέχει ένα άτομο σεληνίου, καθώς μια σεληνοκυστεΐνη είναι αυτή που εμπλέκεται στην καταλυτική δράση της GPx. Η GPx είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια και συμμετέχει στην αναγωγή λιπιδικών και μη υδροπεροξειδίων. Η κυριότερη αντίδρασή της αφορά τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O με ταυτόχρονη οξείδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH). Η δράση της GPx είναι εξειδικευμένη για τον δέκτη του υδρογόνου, την GSH, αλλά δεν είναι εξειδικευμένη για το υπόστρωμα, δίνοντας τη δυνατότητα να μπορεί να αλληλεπιδράσει με διαφορετικές ελεύθερες ρίζες (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge 1998). Από κινητικής πλευράς η GPx και η CAT συμμετέχουν και οι δύο στην απομάκρυνση του H_2O_2 . Ωστόσο η GPx έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το H_2O_2 από την CAT, κατά συνέπεια το H_2O_2 αποικοδομείται κυρίως από την GPx σε φυσιολογικές συνθήκες (Jones et al., 1981; Antunes et al., 2002).

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη, ένα τριπεπτίδιο (γ -Glu-Cys-Gly), και υπάρχει στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) στα κύτταρα (Meister & Anderson, 1983). Η GSSG μετά το σχηματισμό της από την GPx ανάγεται σε GSH μέσω της δράσης του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Η GR είναι ένα διμερές ένζυμο το οποίο φέρει δύο μόρια FAD στα ενεργά του κέντρα, τα οποία χρησιμοποιούν το NADPH για την αναγωγή της GSSG. Το NADPH με τη σειρά του, ανανεώνεται από τη δράση του ενζύμου δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) (Michiels et al., 1994; Halliwell & Gutteridge 1998).

Στα κύτταρα η συγκέντρωση της GSH είναι 10 ή 100 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της GSSG. Αύξηση της ενδοκυτταρικής GSSG οφείλεται στην αποικοδόμηση του H_2O_2 από την GPx. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, ακόμη και

μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al., 1988).

1.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Βασικές προϋποθέσεις για τον χαρακτηρισμό ενός μορίου ως αντιοξειδωτικού είναι να καθυστερεί ή να εμποδίζει την οξείδωση ενός προς οξείδωση υποστρώματος και οι ρίζες που προκύπτουν μετά τη δράση του να είναι σταθερές. Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται διάφορα διατροφικά συστατικά όπως η βιταμίνη E, το β-καροτένιο, το ασκορβικό οξύ καθώς και η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q₁₀. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται και οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις (Halliwell & Gutteridge 1998).

1) Γλουταθειόνη

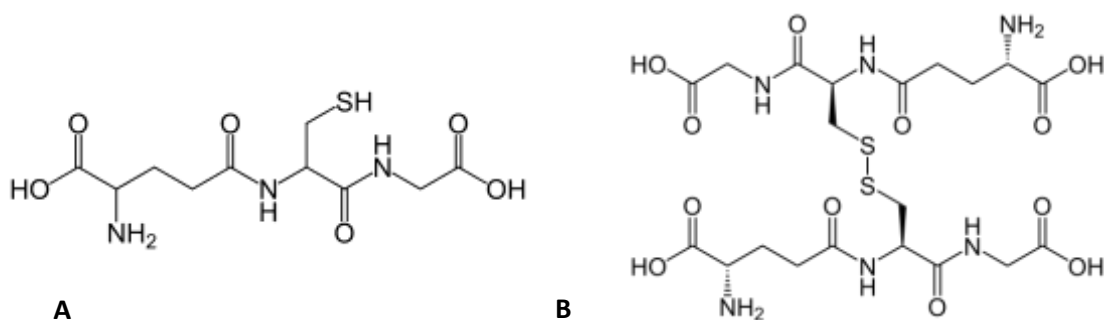
Η γλουταθειόνη είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος.

Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη (Scholz RW et al, 1989). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που τη συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση

με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.

Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου ($\text{ROOH}, \text{H}_2\text{O}_2$) και τις εξωγενείς ηλεκτρόνιοφιλες (πχ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου 2005). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ειδικότερα, αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της γλουταθειόνης, είναι ότι χρησιμοποιείται από πολλά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

Η κύρια αποστολή της είναι η διάσπαση και απομάκρυνση από το σώμα όλων των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισβάλλουν στο σώμα μας. Είναι ένα αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την οξείδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες στη γαστρεντερική οδό και προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που αυτές μπορεί να προκαλέσουν.



εικόνα 4: Α. ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης Β. οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης

2) Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία. Είναι μη θερμιδικές ουσίες, απαραίτητες για το μεταβολισμό και συνήθως λειτουργούν ως συνένζυμα σε ενζυμικές αντιδράσεις. Ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να τις παράγει για αυτό το λόγο και λαμβάνονται μέσω της διαίτας. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες κάθε βιταμίνης ποικίλουν όπως ποικίλει και η απαιτούμενη διαιτητική πρόσληψη για κάθε μία. (Καλογιάννης 2010)

2.1) Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξείδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

2.2) Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η αναγωγική μορφή της βιταμίνης C είναι ένα σακχαρικό οξύ και κατατάσσεται στους μονοσακχαρίτες. Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C.

Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμα όσο και σε οξειδωτικές ενώσεις με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Έτσι, μπορεί να

ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα.

3) Β-καροτίνη

Η β-καροτίνη είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Πιστεύεται ακόμα, ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωσή των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

4) Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από τις ROS.

5) Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

6) Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.4. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες ακολουθούν το φαινόμενο της όρμησης (hormesis), σύμφωνα με το οποίο χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο κύτταρο είναι απαραίτητες για ορισμένες θεμελιώδεις διεργασίες. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που μπορεί να αντιμετωπίσει ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός προκαλούν βλάβες στα βιομόρια.

1.4.1 Θετικές επιδράσεις

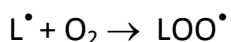
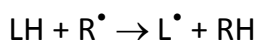
Μία ποσότητα ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως η μεταγωγή σήματος (Ji, 2007) και η έκφραση γονιδίων (Ji et al., 2006). Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν, επίσης, στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins, 1988). Αυτός ο ρόλος τους ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής μετά από έντονη άσκηση, που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (έκκεντρη άσκηση) (Malm, 2001). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), την αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al., 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτότητας των μυϊκών ινών ενώ αύξηση των επιπέδων τους επιτείνει την ένταση της συστολής των μυϊκών ινών (Reid, 2001).

1.4.2. Αρνητικές επιδράσεις

Οι πρωτεΐνες είναι στόχος της δράσης των ελευθέρων ριζών όταν αυτές έχουν υψηλή συγκέντρωση. Προκαλούν οξειδωσή τους με το σχηματισμό καρβονυλομάδων (αλδεϋδών και κετονών) σε ευπαθή προς οξειδωση αμινοξέα όπως η ιστιδίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η προλίνη, ενώ και οι θειολικές ομάδες (-SH) οξειδώνονται σχηματίζοντας θειολικές ρίζες (RS[•]). Οι καρβονυλικές ομάδες δεν αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσωμάτα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002). Η πρωτεϊνική οξειδωση έχει ως συνέπεια την αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και την τροποποίηση ή παύση της λειτουργικότητάς τους (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες σε όλα τα βιομόρια αλλά τα λιπίδια είναι τα πιο ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή (Halliwell & Chirico, 1993). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες οδηγώντας στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Alessio, 1993). Η οξειδωση των PUFA οδηγεί στην παραγωγή μιας λιπιδικής ρίζας, η οποία ενώνεται με το οξυγόνο και σχηματίζει μια ρίζα περοξυλίου (LOO[•]). Οι ρίζες αυτές οξειδώνουν κι άλλα PUFA και παράγονται λιπιδικά υδροϋπεροξειδία (LOOH), τα οποία διασπώνται σε συζυγή διένια και αλδεϋδες, όπως η 4-υδροξυνονενάλη και η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) (Young &

McEneny, 2001; Mylonas & Kouretas, 1999). Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνονται παρακάτω.



Η λιπιδική υπεροξειδωση αυξάνει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των μεμβρανών με αποτέλεσμα να οδηγεί συχνά σε κυτταρικό θάνατο.

Εκτός από τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν και το DNA προκαλώντας σπασίματα στις αλυσίδες του και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βάσεων (Jenkins, 1988). Από τις τροποποιήσεις αυτές παράγεται ένα καλά μελετημένο παραπροϊόν, η 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (OH8dG), η οποία προκύπτει από την οξείδωση της γουανίνης στη θέση C8 του πουρινικού δακτυλίου. Η ένωση αυτή οδηγεί στην πρόκληση μεταλλάξεων αντικατάστασης γουανίνης από θυμίνη. Τελικά, προκαλούνται μεταλλάξεις, που πιθανόν οδηγούν σε καρκινογένεση και γήρανση (Radak et al., 1999).

Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στο μυϊκό σύστημα έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση μυϊκού κάματος, που επηρεάζει την απόδοση κατά την άσκηση. Για τη φυσιολογική λειτουργία του μυός απαιτείται σχετικά μικρή ενδοκυτταρική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών (Reid, 2001). Όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις επιδρούν στο μιτοχονδριακό DNA των μυϊκών κυττάρων ενώ αναστέλλουν ως ένα βαθμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας (Reid et al., 1992). Οι συσταλτές πρωτεΐνες του μυός (ακτίνη και μυοσίνη) είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, η οποία μεταβάλλεται από την έντονη παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Τότε, προκαλείται ενδοκυτταρική αύξηση των ιόντων Ca^{2+} και απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα, γεγονότα που συμβάλλουν στην εμφάνιση του μυϊκού κάματος (Goldfarb, 1999).

1.5. Οξειδωτικό στρες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ή συνθήκες ηρεμίας οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής μπορεί να προέρθει από δύο βασικές αιτίες (Halliwell, 2001). Η πρώτη σχετίζεται με τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών. Μεταλλάξεις περιορίζουν τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επίσης, πολλά ξеноβιοτικά απομακρύνονται μέσω της δέσμευσής τους από την GSH. Αν αυτά, όμως, εισέρθουν στο κύτταρο σε μεγάλες συγκεντρώσεις, η GSH καταναλώνεται κι έτσι προκαλείται οξειδωτικό στρες ακόμα κι αν τα συγκεκριμένα ξеноβιοτικά δεν παράγουν ελεύθερες ρίζες. Η μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών με τη διατροφή είναι ακόμη μία αιτία εμφάνισης οξειδωτικού στρες.

Η δεύτερη αιτία έγκειται στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαιτίας της έκθεσης σε οξειδωτικούς παράγοντες. Επίσης, ο μεταβολισμός ορισμένων ξеноβιοτικών που δεν είναι ελεύθερες ρίζες είναι πιθανό να οδηγήσει στην παραγωγή μεταβολιτών, που είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά.

Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).



Εικόνα 5: σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

1.6. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μία πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006). Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών, είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασης των φυτών απέναντι στην υπερϊώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006). Ιδιαίτερα οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες καθώς αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές, φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων. Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών πολυφαινολών και τα πιθανά οφέλη τους στην υγεία. Επιδημιολογικές μελέτες και μετα-αναλύσεις υποδεικνύουν ότι η μακροχρόνια διατροφή πλούσια σε φυτικές πολυφαινόλες προσφέρει προστασία έναντι της ανάπτυξης καρκίνων, καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη, οστεοπόρωσης και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Pandey & Rizvi, 2009).

1.6.1. Πολυφαινόλες και ασθένειες

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει επανειλημμένα μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου χρόνιων ανθρώπινων νόσων και την κατανάλωση πολυφαινολών (Arts & Hollman, 2005). Οι φαινολικές ομάδες των πολυφαινολών μπορούν να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματίσουν σχετικά σταθερές φαινολικές ρίζες, διαταράσσοντας αντιδράσεις οξειδωσης σε κυτταρικά συστατικά (Clifford 2000) και είναι τεκμηριωμένο ότι τρόφιμα και ποτά πλούσια σε πολυφαινόλες μπορούν να αυξήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Αυτή η αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος μετά από την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες μπορεί να εξηγηθεί είτε από την μειωμένη παρουσία πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα, είτε από την αύξηση αντιοξειδωτικών ενζύμων ή με την απευθείας επίδρασή τους στην εξουδετέρωση οξειδωτικών συστατικών των τροφίμων. Μελέτες σε λεμφοκυτταρικό DNA έχουν δείξει ότι η κατανάλωση πολυφαινολών έχει συσχετισθεί με μειωμένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ως αντιοξειδωτικά οι

πολυφαινόλες μπορεί να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη και, ως εκ τούτου, να περιοριστεί ο κίνδυνος διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Vitrac 2005).

1.6.2. Χημική δομή και ταξινόμηση

Οι πολυφαινολικές ενώσεις ταξινομούνται με ποικίλους τρόπους, ως προς την προέλευση, τις ιδιότητες ή ως προς τη χημική τους δομή. Μια πολυφαινολική ένωση αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Vermeris & Nicholson, 2006).

Με βάση την χημική τους δομή, ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα μη φλαβονοειδή χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006).

1.6.3. Φλαβονοειδή

Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτύλιους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα

κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

1.6.4. Φαινολικά Οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur et al., 1997).

Στιλβένια (Stibenes)

Τα στιλβένια συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Παράγονται από φυτικούς οργανισμούς σε καταστάσεις κινδύνου. Όταν ένα φυτό αντιμετωπίζει έναν κίνδυνο αυτός κινεί μηχανισμούς σύνθεσης αυτών των ουσιών. Τα στιλβένια απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, καθώς ανιχνεύονται στα σταφύλια, τα φιστίκια, τα όσπρια, τον ευκάλυπτο, σε φυτά της οικογένειας Leguminosae και αλλού. Μέχρι το 1980 είχαν εξακριβωθεί περίπου 100 δομές στιλβενοειδών, ενώ σήμερα είναι γνωστές περί τις 300. Πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι είναι

αποδεδειγμένη η συνεργιστική δράση τους με άλλες ουσίες με σκοπό την προστασία του φυτού. Η ρεσβερατρόλη είναι η κύρια αντιπρόσωπος αυτής της ομάδας. Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει πλούσια φαρμακολογική δράση ώστε να θεωρείται σήμερα ένα δραστικό μέσο στην αντιμετώπιση δύσκολων παθολογικών καταστάσεων για τον άνθρωπο και να συμπεριλαμβάνεται στα πιο δραστικά μόρια φυτικής προέλευσης. Τα σταφύλια και το κρασί είναι η κύρια πηγή της.

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά. Οι φυτικές λιγνάνες είναι πολυφαινολικές ουσίες που προέρχονται από την φαινυλαλανίνη μέσω διμερισμού του κινναμωμικού οξέος. Οι λιγνάνες λειτουργούν ως αδύναμα οιστρογόνα συνεπώς μειώνουν τη δράση των κανονικών οιστρογόνων. Στον άνθρωπο μεταβολίζονται στο παχύ έντερο με τη βοήθεια ορισμένων βακτηρίων και μετατρέπονται σε εντερολιγνάνες. Ο μεταβολισμός αυτός εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων που κάθε άνθρωπος έχει στο παχύ έντερο. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνάνων (Adlercreutz and Mazur 1997).

1.7. Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

1. όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας,
2. η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή.

Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans et al., 1996). Οι πολυφαινόλες μπορούν να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες λόγω της διαθεσιμότητας των φαινολικών υδρογόνων τους. Δρουν κυρίως ως δότες υδρογόνων ή ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στη δημιουργία φαινολικών ριζών (Αντίδραση 1).



$\text{RO}\cdot$: ελεύθερη ρίζα

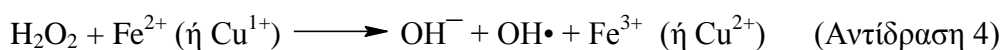
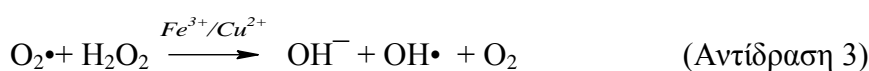
PPH : πολυφαινολική ένωση

$\text{PP}\cdot$: φαινολική ρίζα

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινολικές ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσauζάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (Αντίδραση 2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου.



Μια ακόμη ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν χηλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (Αντίδραση 3) και της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση 4) μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό, που καθιστά ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή, ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια είναι ότι εκτός της χηλικής δέσμευσης ενός δισθενούς κατιόντος, διατηρούν και την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Έτσι προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton .



Οι φυτικές πολυφαινόλες όμως εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ROS. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά, κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων, όπως του Fe και του Cu. Η παραγωγή ROS από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα. Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό OH^\bullet .

Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση και έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά.

1.8. Φρούτο του δράκου (*Hylocereus undatus*)

Φρούτο του δράκου είναι η ονομασία καρπών αρκετών κάκτων, κυρίως του γένους Υλοκέρεος (*Hylocereus*), υπάρχουν 16 είδη του γένους *Hylocereus* ανάμεσα τους το *Hylocereus undatus* (λευκό φρούτο του δράκου) το οποίο έχει λευκή σάρκα και ροζ επιδερμίδα. Είναι δημοφιλές στη Νοτιο-ανατολική Ασία. Λέγεται επίσης φρούτο δράκος (dragon fruit) ή Πιτάια (Pitaya), λόγω της εξωτερικής του επιφάνειας που θυμίζει τις φολίδες του δράκου. Εξωτερικά έχει ροζ χρώμα ενώ το εσωτερικό του είναι άσπρο με μαύρους κόκκους και θυμίζει ακτινίδιο.



Εικόνα 6: *Hylocereus undatus*

Οι κάκτοι του γένους Υλοκέρως κατάγονται από την Νότια και Κεντρική Αμερική και το Μεξικό. Οι κάκτοι καλλιεργούνται επίσης στην νοτιοανατολική Ασία. Επίσης, βρίσκονται στην ανατολική Μεσόγειο, κυρίως στο Ισραήλ και στην Παλαιστίνη, τη βόρεια Αυστραλία, τη Χαβάη και τη νότια Κίνα. Οι κάκτοι μεταφέρθηκαν μαζί με τους Ευρωπαίους. Οι κάκτοι αυτού του είδους ανοίγουν τα άνθη τους κατά τη διάρκεια της νύκτας (Jacobs 2001). Το φρούτο του δράκου ζυγίζει έως 1 kg και αποτελεί πλούσια πηγή θρεπτικών ουσιών και ανόργανων συστατικών, όπως η βιταμίνη B1, βιταμίνη B2, βιταμίνη B3 και βιταμίνη C, πρωτεΐνες, λίπος, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες αργού, φλαβονοειδή, θειαμίνη, νιασίνη, πυριδοξίνη, κοβαλαμίνες, γλυκόζη, φαινολικές, μπετακυανίνες, πολυφαινόλη, καροτίνη, φώσφορο, σίδηρο και φυτοαλβουμίνες (Jamilah B. et al, 2011). Οι φυτοαλβουμίνες είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Le Bellec et al, 2006). Οι πιο σημαντικές χρωστικές ουσίες φρούτων στα κόκκινα φρούτα δράκος είναι οι μπεταλαΐνες όπως οι μπετακυανίνες και μπεταξανθίνες (Tenore G.C. et al, 2012) Οι μπεταλαΐνες χρησιμοποιούνται ως φυσικές χρωστικές τροφίμων σε βιομηχανίες τροφίμων.

Ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία από Φρούτο του Δράκου

Οφέλη για την υγεία από το φρούτο του δράκου.

- Προάγει την επούλωση των πληγών
- Βελτιώνει την όρεξη.
- Βελτιώνει την όραση
- Μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του βάρους
- Βελτιώνει τη μνήμη.
- Ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Το φρούτο του δράκου είναι πλούσιο σε βιταμίνη C και οι φυτικές ίνες που διαθέτουν προάγουν την καλή υγεία.
- Το φρούτο του δράκου βοηθά στην πέψη. Λόγω ότι είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, βοηθήματα που περιέχουν φρούτο του δράκου βοηθούν στην πέψη των

τροφών. Μελέτες δείχνουν επίσης ότι το Φρούτο του δράκου επιδρά θετικά στην ανάπτυξη των προβιοτικών.

- Το φρούτο του δράκου βοηθά στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος στο διαβήτη τύπου 2. Επίσης μελέτες δείχνουν ότι τα σάκχαρα που βρέθηκαν στο φρούτο του δράκου παίζουν ρόλο στον έλεγχο του επιπέδου του σακχάρου στο αίμα σε ασθενείς με διαβήτη.
- Το φρούτο του δράκου μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Το φρούτο του δράκου είναι πλούσιο σε μέταλλα και φυτικές ίνες που βοηθά στην πέψη, καθαρίζει τοξικά συστατικά εμποδίζοντας έτσι την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου.
- Το φρούτο του δράκου ως αντιοξειδωτικό. Η παρουσία του υψηλού επιπέδου της βιταμίνης C, μετάλλων και φυτοαλβουμινών βοηθά στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Βοηθά στον έλεγχο του επιπέδου της χοληστερόλης. Είναι επίσης πλούσιο σε φλαβονοειδή, που είναι γνωστό ότι έχουν ευνοϊκές επιπτώσεις στην αποφυγή καρδιοπαθειών.



Εικόνα 7: οφέλη από την κατανάλωση φρούτου του δράκου

Πολυφαινολική σύσταση του φρούτου του δράκου

Το φρούτο του δράκου είναι πλούσιο σε μπεταλαΐνες, οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες που χωρίζονται στην ερυθρή-ιώδη μπετακυανίνη και κίτρινο-πορτοκαλί μπεταξανθίνη. Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι των δύο κατηγοριών μπεταλαΐνων είναι οι μπετανίνες και οι ιντικαξανθίνες αντίστοιχα (Strack et al., 2003). Λόγω της γλυκοζυλίωσης και της ακυλίωσης οι μπεταλαΐνες εμφανίζουν τεράστιες δομικές ποικιλομορφίες. Με τα μέχρι τώρα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί οι μπεταλαΐνες είναι ασφαλείς για κατανάλωση και αποτελούν μικροθρεπτικά στοιχεία. Επίσης έχουν αντιοξειδωτική δράση αφού έχουν μπορούν να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Η μέχρι τώρα χρήση τους περιορίζεται σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα λόγω της μειωμένης σταθερότητάς τους και της έλλειψης επιστημονικών ευρημάτων (Khan, 2015).

Ο αντιοξειδωτικός ρόλος των μπεταλαΐνων έγκειται στην ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να επάγουν την ενεργοποίηση διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι μπεταλαΐνες επάγουν τη σύνθεση της ενδογενούς γλουταθειόνης σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Tesoriere et al., 2003) και προστατεύουν τα ερυθροκύτταρα κατά την αιμόλυση (Tesoriere et al., 2005). Επιπλέον προστατεύουν τις LDL λιποπρωτεΐνες από την οξείδωση (Kanner et al., 2001; Tesoriere et al., 2004). Επιπλέον, σε μελέτη δείχθηκε ότι βιοδείκτες της οξείδωσης των λιπιδίων όπως F2-ισοπροστανή (στο πλάσμα) και μηλονική διαλδεΰδης (στο πλάσμα) μειώθηκαν με χορήγηση μπεταλαΐνων. Σε πειράματα με ποντίκια που τρέφονταν με εκχύλισμα κόκκινου τεύτλων που είναι πλούσια σε μπεταλαΐνες φάνηκε ότι εκτός από την επαγωγή των ενδογενών μηχανισμών αντιοξειδωτικής άμυνας (π.χ. γλουταθειόνη, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) παρατηρήθηκε αναστολή της βλάβης του DNA σε λεμφοκύτταρα, καθώς και σε ηπατοκύτταρα (Lee et al., 2009). Επίσης, οι μπεταλαΐνες μείωσαν τη βλάβη του DNA που προκαλείται από H_2O_2 σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Οι Krajka-Kuzniak et al. (Krajka-Kuzniak et al., 2013) έδειξαν ότι η μπεταλαΐνη σε ηπατοκύτταρα οδήγησε σε επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και αποτοξινωτικών ενζύμων (π.χ. S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, αναγωγή του NAD(P)H) που η έκφραση τους ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Οι μπεταλαΐνες έχουν αντιφλεγμονώδη δράση αφού αναστέλλουν τις COX-2 και COX-1, ένζυμα που καταλύουν τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος. Στο παρακάτω πίνακα φαίνονται οι δράσεις των μπεταλαΐνων.

Potential health benefit
Free radical scavenging of reactive oxygen species
Protection of LDL against oxidation
Prevention of DNA-damage
Induction of antioxidant (e.g. paraoxonase 1, glutathione peroxidase, heme oxygenase 1) and phase II detoxifying enzymes (e.g. glutathione S-transferase, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1)
Gene regulatory activity (e.g. Nrf2-dependent signal transduction pathway)
Anti-inflammatory activity (e.g. inhibition of cyclooxygenase-2)

Εικόνα 8: οφέλη στην αντιοξειδωτική ικανότητα ενός οργανισμού από κατανάλωση μπεταλαϊνών

1.9. Φρούτο του Πάθους (*Passiflora edulis*)

Το Παθανθές το εδώδιμον (*Passiflora edulis*) είναι ένα αναρριχητικό είδος της οικογένειας των παθανθών, εγγενές στη Βραζιλία, την Παραγουάη και τη Βόρεια Αργεντινή. Στην Ελλάδα είναι επίσης γνωστό ως Πασιφλόρα ή Πασιφλώρα.

Επίσης είναι ευρύτατα γνωστό με τις κοινές του ονομασίες όπως φρούτο του Πάθους. Το φρούτο του Πάθους έχει σχήμα στρογγυλό έως ωοειδές, χρώμα κίτρινο ή σκούρο μοβ με την



Εικόνα 9: *Passiflora edulis*

ωρίμανση, το εξωτερικό του είναι μαλακό προς σφιχτό, το εσωτερικό

του είναι ζουμερό γεμάτο με πολυάριθμα σπόρια (Morton, 1987). Ο καρπός είτε τρώγεται (με το κουταλάκι) είτε γίνεται χυμός και συχνά ο χυμός του προστίθεται σε άλλους χυμούς φρούτων για την ενίσχυση του αρώματος. Υπάρχουν αρκετές ξεχωριστές ποικιλίες των φρούτων του Πάθους με σαφώς διαφορετικές εξωτερικές εμφανίσεις. Η ξανθόκαρπη ποικιλία (flavicarpa), επίσης γνωστή ως το Golden Passion Fruit, μπορεί να φτάσει το μέγεθος ενός γκρέιπφρουτ, έχει ένα λείο, γυαλιστερό, φωτεινό και χαροπό φλοιό και έχει χρησιμοποιηθεί ως ρίζωμα για

το Purple Passion Fruit στην Αυστραλία. Η σκούρα μοβ ποικιλία *edulis* είναι μικρότερη από ένα λεμόνι, αν και είναι λιγότερο όξινη από ότι το κίτρινο φρούτο του Πάθους και έχει πλουσιότερο άρωμα και γεύση.

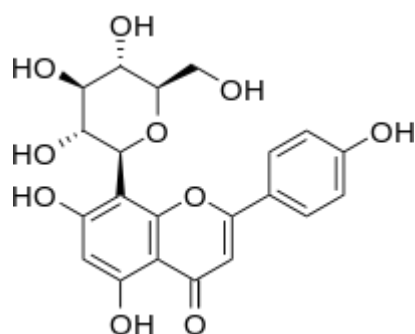
Αρκετές ποικιλίες φρούτων του Πάθους είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, (Talcott et al., 2003) και οι κίτρινες ποικιλίες του καρπού, βρέθηκαν να περιέχουν: καροτενοειδή βιτεξίνη, ισοβιτεξίνη και χρυσίνη, σκοπολετίνης, καροτενοειδή, θεοβρωμίνη. στη φλούδα και στο χυμό.

Οι παραδοσιακές ιατρικές χρήσεις της *Passiflora edulis* συνοψίζονται ως εξής (Amata et al., 2011):

- Υπέρταση: χυμός του φρούτου ή αφέψημα των φύλλων, από το στόμα.
- Αϋπνία, άγχος: αφέψημα από το φλοιό ή τα λουλούδια του φυτού με χυμό λεμονιού, για γαργάρα.
- Διουρητικό: αφέψημα από ξερές ρίζες, από το στόμα.
- Σκορβούτο: κατανάλωση του φρούτου (που είναι πλούσιο σε βιταμίνη C).
- Άσθμα: ξηρά φύλλα, για κάπνισμα (τσιγάρο ή πίπα).
- Συμπτώματα εμμηνόπαυσης: αφέψημα των φύλλων, για πόση, με προσθήκη μελιού για γλυκύτητα μεταξύ των γευμάτων.
- Εξάρτηση από αλκοόλ ή μορφίνη: αφέψημα αποξηραμένων φύλλων, από το στόμα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το *Passiflora edulis* είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες καροτενοειδή και διάφορες άλλες φυτοχημικές ουσίες που του προσδίδουν πλούσια αντιοξειδωτική δράση. Μία από τις πιο χαρακτηριστικές πολυφαινόλες του *Passiflora edulis* είναι η βιτεξίνη. Η βιτεξίνη είναι ένα φλαβονικό γλυκοσίδιο της απιγενίνης, και είναι μια χημική ένωση που βρίσκεται στο φρούτο του πάθους, στα φύλλα μπαμπού και στον κράταιγο. Η βιτεξίνη πρόσφατα έλαβε αυξημένη προσοχή λόγω του ευρέος φάσματος των φαρμακολογικών δράσεων της, συμπεριλαμβανομένων της αντικαρκινικής, αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιπερτασικής, αντισπασμωδικής και αντιστατικής δράσης της καθώς και της προστασίας έναντι νευρολογικών νόσων όπως Alzheimer και της κατάθλιψης. Οι επιδράσεις της συνδέονται με πολλαπλά συστήματα όπως το κεντρικό νευρικό

σύστημα, το καρδιακό, το αγγειακό και το ενδοκρινικό σύστημα (Miao et al., 2016). Η αντιοξειδωτική δράση της βιτεξίνης προσδιορίστηκε με διάφορες μεθόδους όπως η DPPH και ABTS οι οποίες δείχνουν ότι η βιτεξίνη έχει προστατευτική δράση έναντι των ριζών H_2O_2 εξουδετερώνοντας τις (Kim et al., 2005). Επιπλέον σε μελέτες που έγιναν σε σκουλήκια η βιτεξίνη επάγει την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και μειώνει τις ενδοκυτταρικές (ROS) με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής των σκουληκιών (Lee et al., 2015). Η δράση 60 $\mu\text{g/ml}$ βιτεξίνης είναι παρόμοια με τη δράση 30 mg/ml ασκορβικού οξέος (Cao et al., 2015). Μεταξύ των διαφόρων δράσεων της βιταξίνης η πιο σημαντική φαίνεται να έχει η αντιφλεγμονώδη δράση της και η οποία μπορεί να οφείλεται λόγω της ικανότητας της να αναστέλει στις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , κλπ και να ενεργοποιεί την αντι-φλεγμονώδη κυτοκίνη IL-10 (Kang et al., 2015; Flores et al., 2012). Αυτές οι δράσεις μπορεί να προσδίδουν δυνητικές θεραπείες για ασθένειες που οφείλονται σε φλεγμονή και όπως είναι γνωστό ο καρκίνος, διάφορες νευρολογικές και καρδιαγγειακές παθήσεις σχετίζονται με τη φλεγμονή (Meng et al., 2016).



Εικόνα 10: δομή βιτεξίνης

1.9. Πυράκανθος (*Pyracantha Coccinea*)

Ο **πυράκανθος** (επιστημονική ονομασία: *Pyracantha*) είναι γένος μεγάλων αγκαθωτών αειθαλών θάμνων, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Ροδοειδών. Είναι ενδημικά φυτά της Ασίας και της νοτιοανατολικής Ευρώπης. Φτάνει σε ύψος περίπου τα τέσσερα με έξι μέτρα. Έχει λευκά άνθη την άνοιξη και κίτρινους, πορτοκαλί ή κόκκινους καρπούς ανάλογα με το είδος, οι οποίοι παραμένουν πάνω στο φυτό καθ' όλη τη διάρκεια του χειμώνα. Οι καρποί είναι μη τοξικοί και μπορούν να γίνουν ζελέ. Τα φύλλα είναι μικρά ωοειδή και έχουν κοντούς μίσχους. Είναι κοινό διακοσμητικό φυτό και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ψηλών και αδιαπέραστων φρακτών. Είναι ανθεκτικό στο ψύχος, την ξηρασία και τα ασβεστώδη εδάφη. Η ιατρική χρήση του δεν είναι ευρέως γνωστή αλλά χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως διουρητικό, αναλγητικό και έχει αντισηπτική δράση. Επίσης χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του εμμηνορροϊκού κύκλου.



Εικόνα 11: *Pyracantha coccinea*

Διάφορα είδη του γένους *Pyracantha* είναι τα παρακάτω:

- *Pyracantha angustifolia*
- *Pyracantha atalantioides*
- *Pyracantha coccinea*
- *Pyracantha crenatoserrata*
- *Pyracantha crenulata*
- *Pyracantha koidzumii*
- *Pyracantha rogersiana*

Phenolic components	Concentration ($\mu\text{g/g}$ fresh fruit)	
	Ethanol	Water
(-)-Epicatechin	38.94 ± 1.77^a	1.79 ± 0.30^b
(+)-Catechin	nd	nd
Apigenin	nd	nd
Benzoic acid	nd	nd
Caffeic acid	3.54 ± 0.18^a	2.98 ± 0.06^a
Chlorogenic acid	7.97 ± 0.27^a	1.79 ± 0.12^b
Ferulic acid	nd	nd
Gallic acid	nd	0.60 ± 0.01^a
Hesperidin	nd	nd
Kaempferol	nd	nd
Naringenin	nd	nd
Naringin	nd	nd
p-Coumaric acid	nd	nd
p-Hydroxybenzoic acid	5.31 ± 0.03^a	1.49 ± 0.01^b
Protocatechuic acid	nd	1.79 ± 0.03^a
Rosmarinic acid	nd	nd
Rutin	87.62 ± 2.66^a	nd
Syringic acid	1.77 ± 0.09^a	0.60 ± 0.03^b
trans-Cinnamic acid	nd	0.60 ± 0.03^a
Vanillin	6.20 ± 0.27^a	1.79 ± 0.09^b

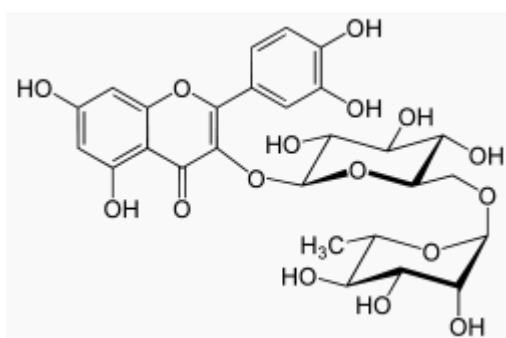
Εικόνα 12: πολυφαινολική σύσταση του *Pyracantha coccinea*

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι η πολυφαινολική σύσταση του *Pyracantha coccinea* είναι υψηλή και κυρίως σε φλαβονοειδή και κυρίως φλαβονόλες επικατεχίνες, ρουτίνη και υδροξυκινναμικά οξέα, καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ (Sarikurkcü & Tepe, 2015).

Το αιθανολικό εκχύλισμα παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση σε ρουτίνη. Η ρουτίνη είναι η γλυκοσιδωμένη μορφή της κερσετίνης και του δισακχαρίτη ρουτινόζη. Είναι ένα φλαβονοειδές που βρίσκεται σε μια ευρεία ποικιλία φρούτων και κυρίως σε εσπεριδοειδή. Λόγω της χημικής του συγγένειας με την κερσετίνη, η ρουτίνη χρησιμοποιείται για την προστασία των αιμοφόρων αγγείων και αποτελεί συστατικό βιταμινούχων σκευασμάτων.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες για τις επιπτώσεις της ρουτίνης σε ποντικούς, αρουραίους, χάμστερ και κουνέλια, καθώς και μελέτες *in vitro*. Επιπλέον υπάρχουν κλινικές μελέτες που καταδεικνύουν σημαντικές, θετικές επιδράσεις της ρουτίνης ως συμπλήρωμα διατροφής στον άνθρωπο (Enkhmaa *et al.*, 2005). Παρακάτω αναφέρονται οι θετικές επιδράσεις της ρουτίνης.

- Η ρουτίνη αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την αραίωση του αίματος και τη βελτίωση της κυκλοφορίας (Navarro-Núñez et al., 2008).
- Ρουτίνη καταδεικνύει αντι-φλεγμονώδη δράση σε ζώα και σε in vitro μελέτες (Guardia, 2001).
- Ρουτίνη αναστέλλει αναγωγή της αλδόξης. Η αναγωγή της αλδόξης είναι ένα ένζυμο φυσιολογικά παρόν στον οφθαλμό και στο σώμα που καταλύει την αντίδραση της γλυκόζης σε σορβιτόλη το πρώτο βήμα στο μονοπάτι της πολυόλης για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Επομένως η ιδιότητα αυτή παίζει ρόλο στην προστασία από σακχαρώδη διαβήτη (Reddy et al.).
- Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ρουτίνη θα μπορούσε να βοηθήσει στην αποφυγή σχηματισμού θρόμβων, έτσι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών που διατρέχουν κίνδυνο καρδιακών προσβολών και εγκεφαλικών επεισοδίων.
- Ορισμένα στοιχεία δείχνουν, επίσης, ρουτίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία αιμορροΐδων, κηλίδων και μικροαγγειοπαθειών. Η ρουτίνη είναι επίσης ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Σε σύγκριση με την κερσετίνη, τη μορίνη, την εσπεριδίνη και νερανζίνες, βρέθηκε να έχει ισχυρότερη δράση (Metodiewa et al., 1997).
- Συνθετικές ακετυλιωμένες ρουτίνες, χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της χρόνιας φλεβικής ανεπάρκειας



Εικόνα 13: δομή ρουτίνης

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

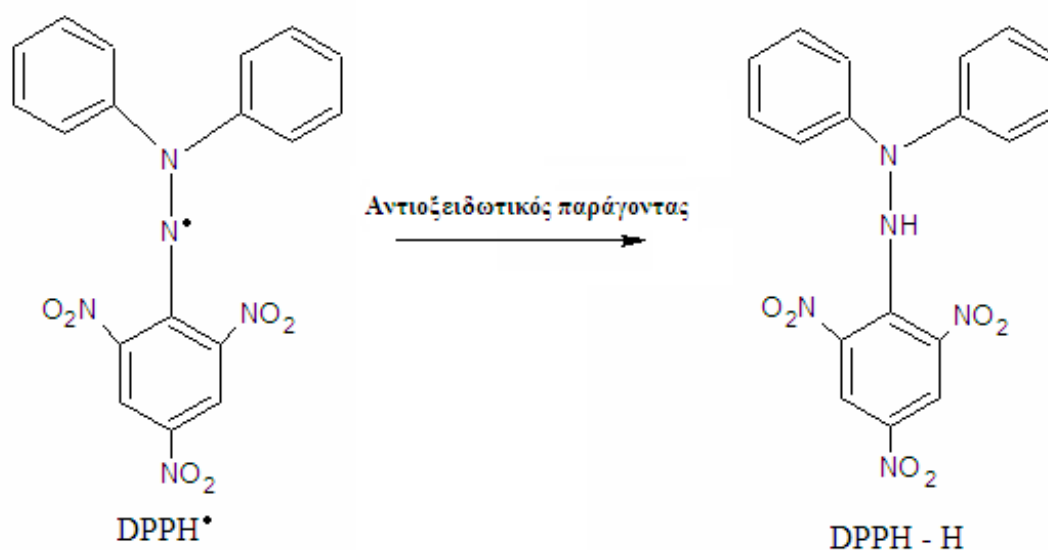
Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με ελεύθερες ρίζες

2.1. . Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•]

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH[•] πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brad-Williams et al. (Brad-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (Εικόνα 23).

Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, η αντίδραση με την ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH[•] και το φυτικό εκχύλισμα, το κλάσμα και η καθαρή πολυφαινολική ένωση (δείγμα) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα το

εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα, καθαρή πολυφαινολική ένωση μόνα τους σε μεθανόλη, αποτελούσε το τυφλό και η ρίζα DPPH[•] (100 μM) σε μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα, κλάσμα και καθαρή πολυφαινολική ένωση που εξετάστηκε.



Εικόνα 14: Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100 μM) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH[•] (5, 10, 20, 40, 80, 100 μM) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100 μM βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο. Ως δείκτης ισχυρής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαϊνή καθώς είναι γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τη ρίζα DPPH[•] (Visioli et al, 1998; Kruk et al., 2005).

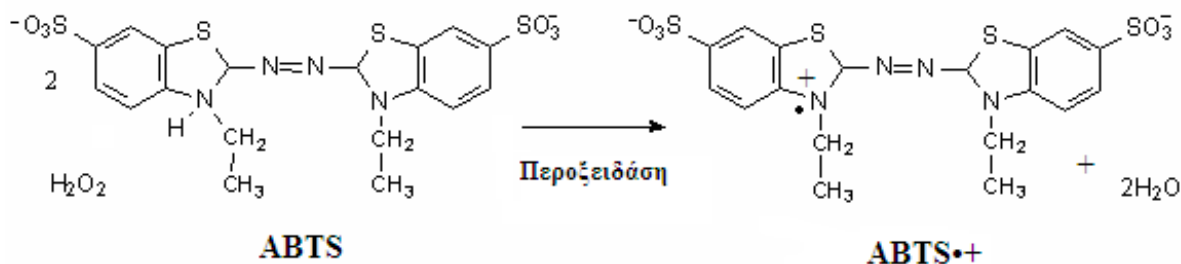
2.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα ABTS^{•+} είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας DPPH[•], η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα DPPH[•], η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα ABTS^{•+} πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS). Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας ABTS^{•+} και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Cano et al., 1998; Arnao et al., 2001). Η ρίζα ABTS^{•+} από την στιγμή που σχηματιστεί είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία H₂O₂ (Εικόνα 24). Η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ και 6 μM περοξειδάση. Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος).

Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστίθενται οι συγκεντρώσεις του εξεταζόμενου δείγματος. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε H₂O με 1 mM ABTS, 30 μM H₂O₂ αποτελούσε το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το καθένα. Οι διαλύτες



μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο (Kruk et al., 2005).

Εικόνα 15: Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας ABTS^{•+} μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

2.3. Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

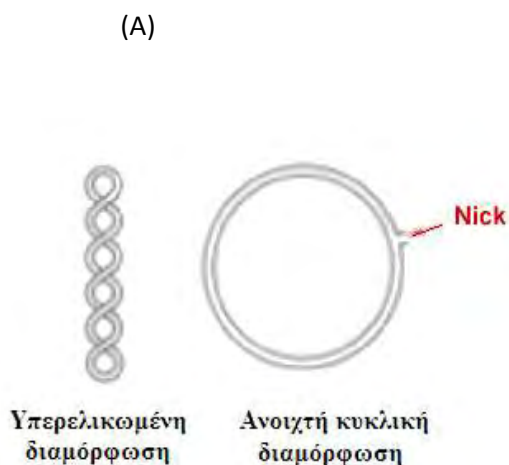
Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκε αυτή η *in vitro* μέθοδος, και η ρίζα περοξυλίου (ROO[•]).

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε

αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 16).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγώνυμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα

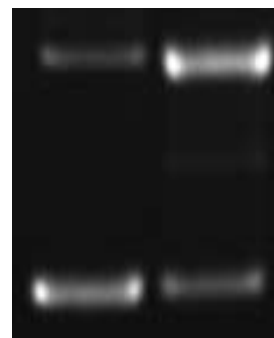
Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



(B)

1.

2.



Εικόνα 16: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (Α) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks). (Β) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.

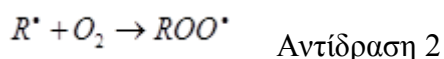
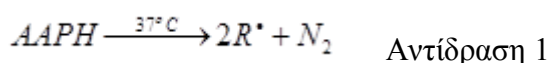
Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των ριζών OH^\bullet , ROO^\bullet να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Επαγόμενη από ρίζες ROO^\bullet πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO^\bullet βασίζεται στη μέθοδο των Changetal. (2001).

Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται. Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO• χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO• (Αντιδράσεις 1,2).



Οι ρίζες ROO• έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO•.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 g αγαρόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 3 mM**: Σε 100 μl PBS προστίθενται 3 mg AAPH. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA plasmid, AAPH και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης. Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων στα 45 min στους 37 °C. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 4. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex).

Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων

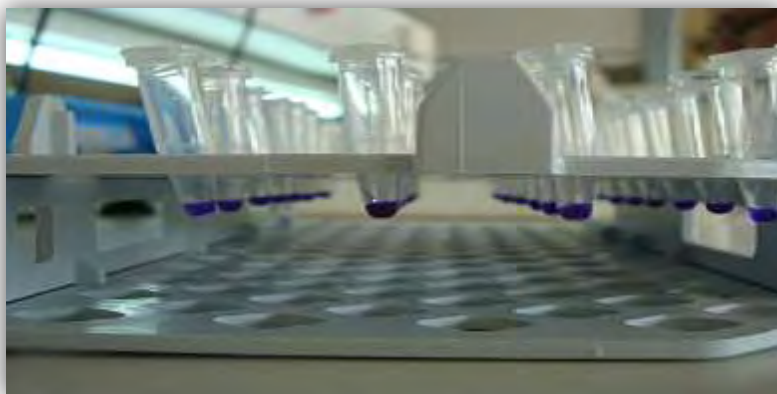
	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control(-)	9 μl	-	1μl	-
AAPH 3 mM(+)	5 μl	-	1μl	4μl
Εκχ. (63 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (125 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (250 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (500 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (1000 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (2000 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (2000 μg/ml)	6 μl	3μl	1μl	-



Εικόνα 17: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 µl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mMEDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5µg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.



Εικόνα 18 : Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης



Εικόνα 19 : Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.

2.4. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς EA.hy926

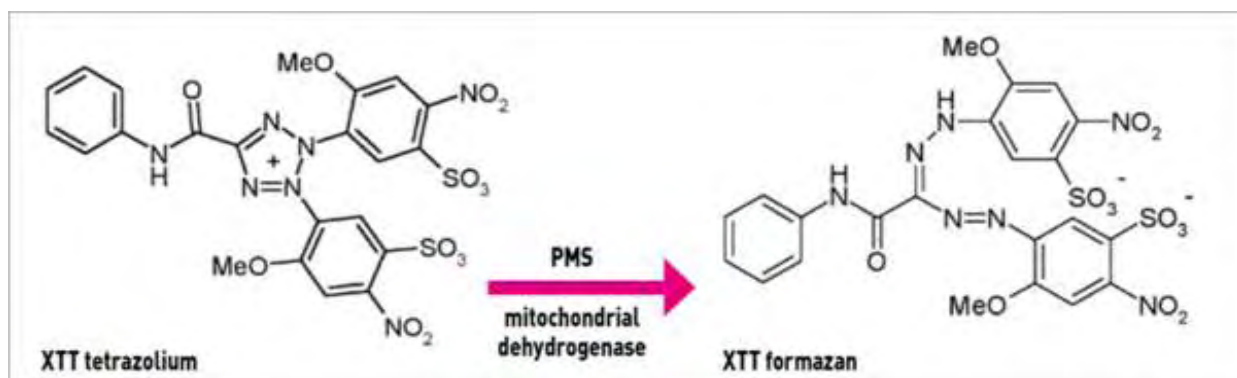
Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα EA.hy926 (ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου). Τα οποία αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι να καλύπτουν το 80% περίπου της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης (0.25%). Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.5. Μέθοδος XTT για προσδιορισμό κυτταροτοξικής δράσης εκχυλισμάτων

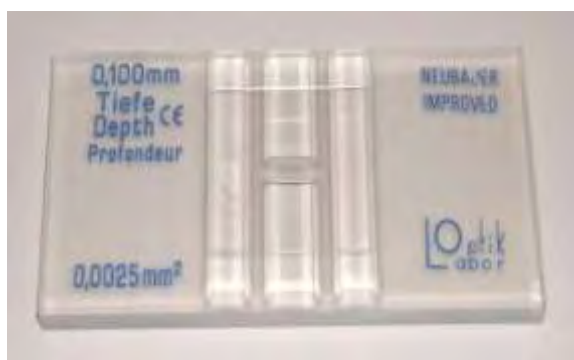
Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος *Pyracantha coccinea* χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά EA.hy926, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche.

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 20: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

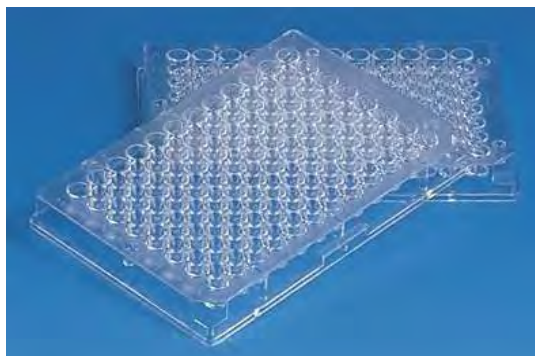
Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml.



Εικόνα 21: Πλάκα Neubauer

Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση 10^4 κυττάρων/θέση σε ένα 96-well plate. Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO_2 προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100 μl. Στα πηγαδάκια που αποτελούν τα control γίνεται προσθήκη μόνο θρεπτικού, χωρίς εκχύλισμα. Για κάθε συγκέντρωση του εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται τρία πηγαδάκια των οποίων τα κύτταρα σε καθένα από αυτά έχει προέλθει από διαφορετική φλάσκα. Επίσης, για κάθε συγκέντρωση αλλά και για το control χρησιμοποιείται τέταρτο πηγαδάκι που δε περιέχει κύτταρα για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του θρεπτικού και του

εκχυλίσματος. Το πείραμα πραγματοποιείται εις τριπλούν. Έπειτα, το plate επωάζεται για 24 h στους 37°C και σε 5% CO₂.



Εικόνα 22: 96-well plate

Μετά την επώαση προστίθενται 50 µl από το μίγμα XTT σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. Το μείγμα του XTT προκύπτει από την ανάμιξη XTT A και XTT B (PMS), πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται αμέσως πριν την χρησιμοποίησή του. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm καθώς και στα 630nm (για καλιμπράρισμα) με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή του εκχυλίσματος *Pyracantha coccinea* στην κυτταρική αύξηση της κυτταρικής σειράς EA.hy926 υπολογίζεται από τον τύπο:

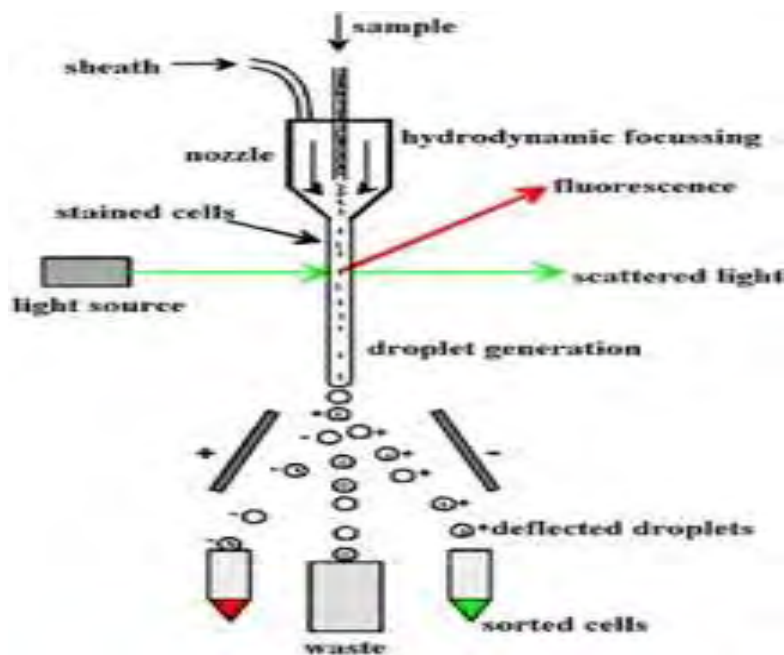
$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

Για να θεωρηθεί μία συγκέντρωση εκχυλίσματος κυτταροτοξική, η βιωσιμότητα των κυττάρων θα πρέπει να είναι κάτω από 80% και αυτές οι συγκεντρώσεις δε χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής.

2.6. Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό επιπέδων GSH και ROS

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που

δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 23 : Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με μία ή περισσότερες ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση

κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο).

Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μια ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάζεται ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400 μM) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύεται στους 4°C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100 μM) διαλυμένης σε μεθανόλη παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργούνται σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37°C σε 5% CO₂. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει το εκχύλισμα *Pyracantha coccinea* σε τέσσερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις οι οποίες έχουν προκύψει από τη μέθοδο XTT ότι δεν είναι κυτταροτοξικές. Χρησιμοποιούνται και δύο φλάσκες control οι οποίες περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Έπειτα ακολουθεί επώαση για 24 h στους 37°C και σε 5% CO₂.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (333 μl 0,25% για τις 25cm² φλάσκες), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, μεταφορά κάθε φλάσκας σε falcon και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με

2ml PBS (0,01 M με pH 7,4), έπειτα φυγοκέντρωση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά, αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση σε 300μl PBS (0,01 M με pH 7,4).

Στη συνέχεια κάθε δείγμα 300μl χωρίζεται σε δύο σωληνάκια κυτταρομέτρου από 150μl στο καθένα και στη συνέχεια προστίθενται 15μl χρωστικής ουσίας σε κάθε σωληνάκι. Προστίθεται mercury orange στα σωληνάκια που θα μετρηθεί η GSH και DCF-DA σε αυτά που θα μετρηθούν τα ROS. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C στο σκοτάδι και μετά το πέρας 30 λεπτών προστίθεται σε αυτά 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g, στους 5°C για 5 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα που έχουν καθιζάνει επαναδιαλυτοποιούνται σε 250μl PBS (0,01 M με pH 7,4) και ακολουθεί η μέτρησή τους με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρούνται η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύονται με έναν ρυθμό 1000 γεγονότων/sec. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετράται σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύονται χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

3. Αποτελέσματα

Αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων

Αρχικά σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων φρούτο του δράκου (*Hylocereus undatus*), φρούτο του πάθους (*Passiflora edulis*) και πυράκανθος (*Pyracantha coccinea*). Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με διαφορετικές ρίζες. Όλα τα μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH[•], ABTS^{•+}

3.1. Εξουδετέρωση της ρίζας DPPH[•]

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα είχαν μέτρια ικανότητα ως δεσμευτές, αδρανοποιητές της ρίζας DPPH[•]. Οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 125 ως >1000 mg/mL. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων διέφερε ανάμεσα στα εκχυλίσματα των διαφορετικών φυτών και ανάμεσα στα διαφορετικά τμήματα του ίδιου φυτού. Διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα παρατηρήθηκαν και ανάμεσα στα μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα.

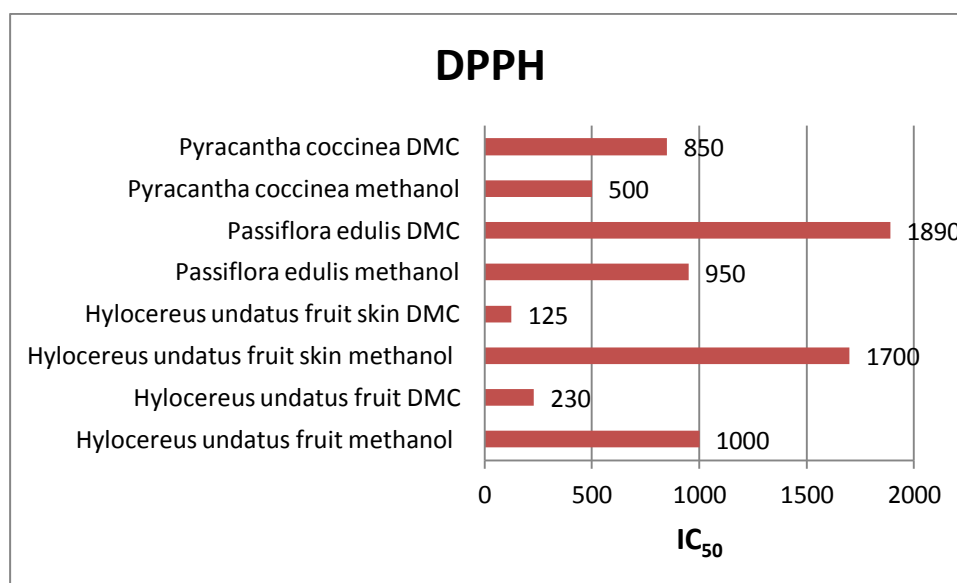
Τα εκχυλίσματα του φυτού παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH[•] ήταν αυτά του *Hylocereus undatus* που προέρχονταν τόσο από την επιδερμίδα όσο από τη σάρκα. Οι τιμές IC₅₀ για το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα ήταν 125 μg/mL και 230 μg/mL αντίστοιχα. Τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ως προς τη ρίζα DPPH[•] είχαν σχεδόν όλα τα μεθανολικά εκχυλίσματα εκτός του *Pyracantha coccinea* με τιμή IC₅₀ 500 μg/mL. Στο παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές των IC₅₀ των μεθανολικών και διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων.

Πίνακας 5: εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Τμήμα φυτού	IC ₅₀ µg/ml
Hylocereus undatus	Fruit skin	1000
Hylocereus undatus	fruit	1700
Passiflora edulis	fruit	950
Pyracantha coccinea	seed	500

Πίνακας 6: εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH των διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Τμήμα φυτού	IC ₅₀ µg/ml
Hylocereus undatus	Fruit skin	230
Hylocereus undatus	fruit	125
Passiflora edulis	fruit	950
Pyracantha coccinea	seed	850



Διάγραμμα 1: συνολική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH

3.2. Εξουδετέρωση της ρίζας ABTS^{•+}

Όλα τα μεθανολικά και διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα ήταν και αποτελεσματικοί δεσμευτές, αδρανοποιητές της ρίζας ABTS^{•+}. Οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 140 ως >1000 mg/ml. Εντούτοις υπήρχαν κάποιες διαφορές που

παρατηρήθηκαν ανάμεσα στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων απέναντι στη ρίζα ABTS^{•+} με αυτές που παρατηρήθηκαν απέναντι στη ρίζα DPPH[•].

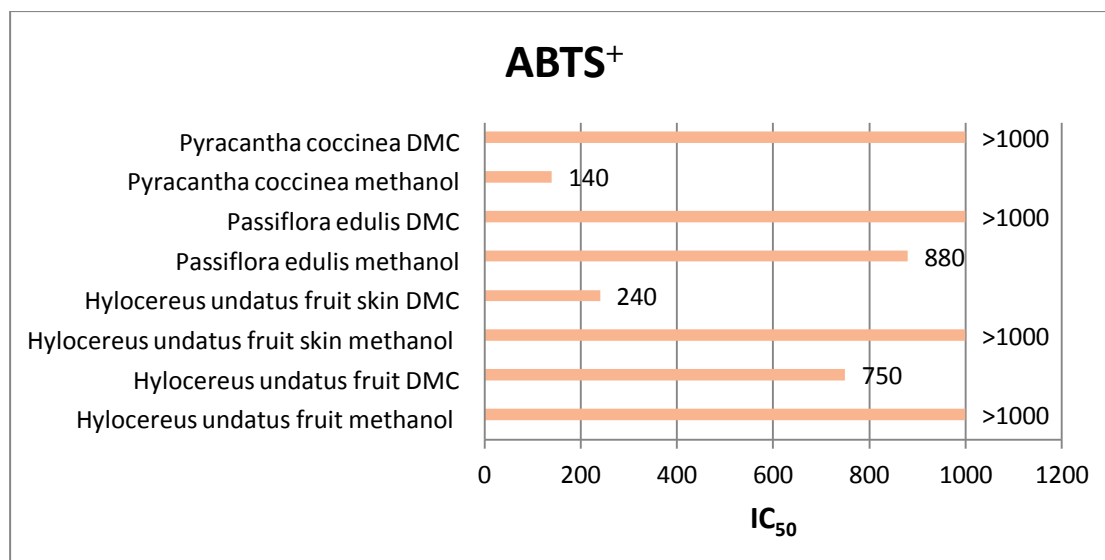
Τα εκχυλίσματα του φυτού *Hylocereus undatus* και συγκεκριμένα του τμήματος επιδερμίδας καθώς και του *Pyracantha coccinea* ήταν τα πιο δραστικά έχοντας τιμές IC₅₀ 240 μg/mL και 140 μg/mL για το διχλωρομεθανικό και το μεθανολικό εκχύλισμα αντίστοιχα. Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων πιθανόν οφείλονται στη διαφορετική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις αλλά και στην ποιοτική σύσταση των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 7: εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS^{•+} των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Τμήμα φυτού	IC ₅₀ μg/ml
Hylocereus undatus	Fruit skin	>1000
Hylocereus undatus	fruit	>1000
Passiflora edulis	fruit	880
Pyracantha coccinea	seed	140

Πίνακας 8: εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS^{•+} των διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Τμήμα φυτού	IC ₅₀ μg/ml
Hylocereus undatus	Fruit skin	240
Hylocereus undatus	fruit	750
Passiflora edulis	fruit	>1000
Pyracantha coccinea	seed	>1000



Διάγραμμα 2: συνολική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ABTS⁺

3.3. Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.

Καθώς τα φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, στη συνέχεια εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επιβλαβή δράση ελεύθερων ριζών στο DNA. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες OH• και ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (Bluescript-SK+). Οι ρίζες OH• και ROO• προκαλούν μονόκλιωνα σπασίματα στο DNA αλλάζοντας την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτή κυκλική. Η προστατευτική δράση βασίστηκε στην παρεμπόδιση αυτής της αλλαγής διαμόρφωσης.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα διάφορα φυτικά εκχυλίσματα προφανώς οφείλονται στη διαφορετική πολυφαινολική τους σύσταση. Περαιτέρω ανάλυση της πολυφαινολικής σύστασης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών σε κάθε εκχύλισμα, καθώς και να δώσει

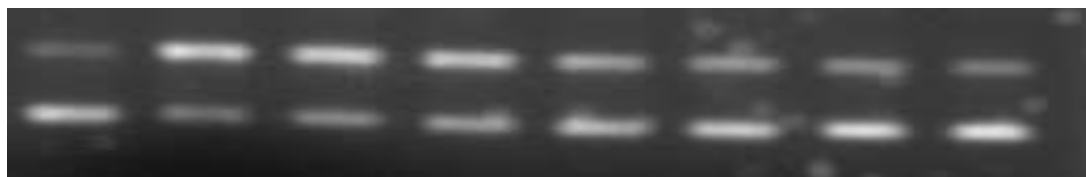
πληροφορίες για το πώς αλληλεπιδρούν τα διαφορετικά φλαβονοειδή τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα υπόλοιπα φυτοχημικά συστατικά των εκχυλίσμάτων για να δώσουν την τελική αντιμεταλλαξογόνο και αντιοξειδωτική δράση του κάθε εκχυλίσματος.

Στη μέθοδο αυτή εξετάστηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Hylocereus undatus*, *Pasiflora edulis* και *Pyracantha coccinea*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ισχυρότερη δράση έδειξε το εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea* με IC_{50} 950 $\mu\text{g/ml}$. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα είχαν $IC_{50} > 2000 \mu\text{g/ml}$.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα δεν είχαν καμία επίδραση στο πλασμιδιακό DNA όταν εξετάστηκαν μόνα τους.

Relaxed DNA

supercoiled DNA



Αντιπροσωπευτική εικόνα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 125 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 250 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος

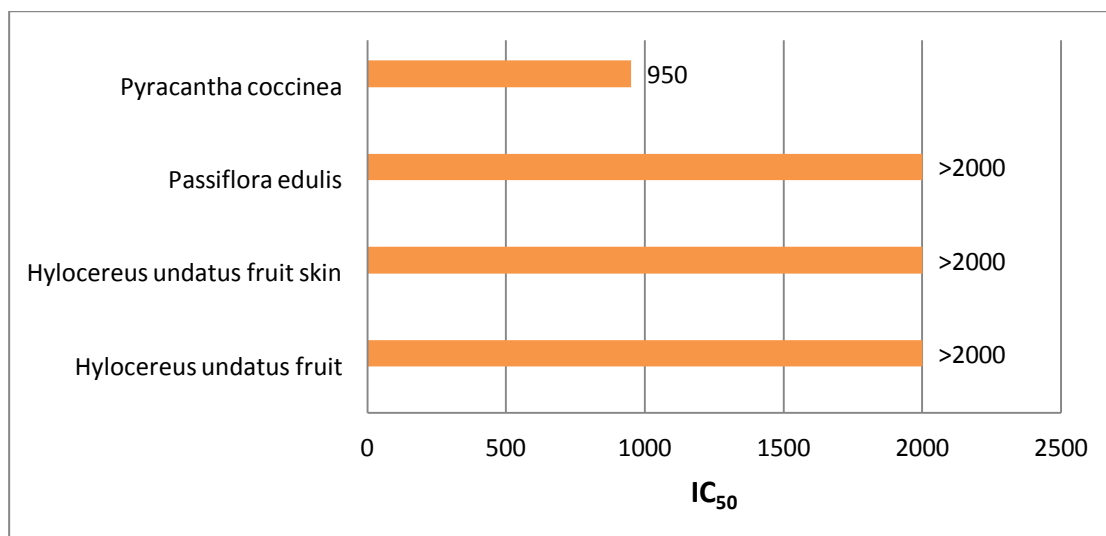
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 500 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 1000 $\mu\text{g/ml}$

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 2000 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + 2000 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος

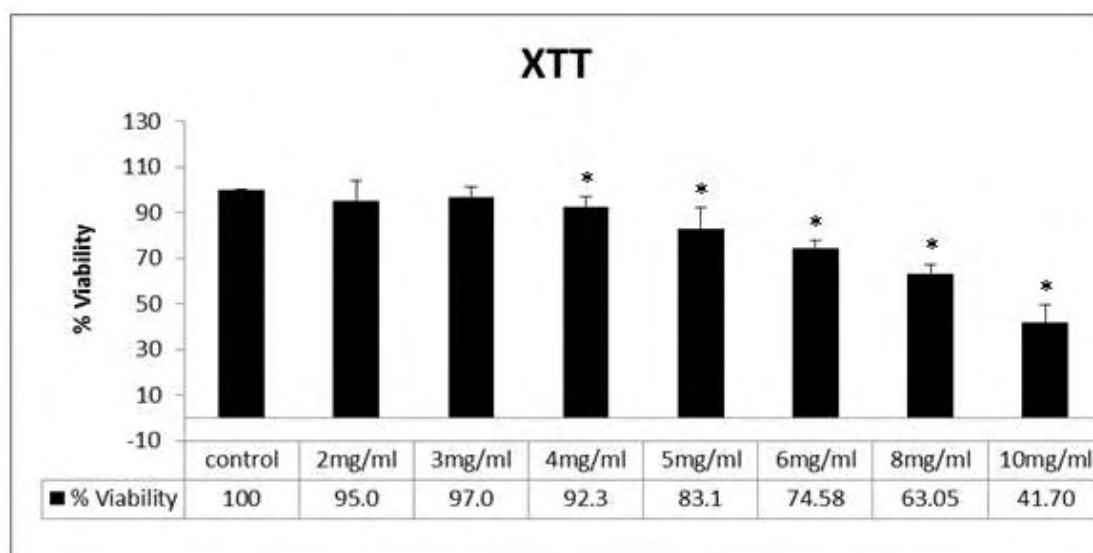
Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η συνολική επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



Διάγραμμα 3: αποτελέσματα IC₅₀ της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των μεθανολικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο αναστολής της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•)

3.4. Μελέτη της τοξικότητας του εκχυλίσματος *Pyracantha Coccinea* στην κυτταρική σειρά EA.hy926 με τη μέθοδο XTT.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέξαμε από τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH και ABTS καθώς και από το πλασμίδιο, επιλέχθηκε το πιο ισχυρό εκχύλισμα το οποίο ήταν το *Pyracantha coccinea* για να εξεταστεί η αντιοξειδωτική του ικανότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Αρχικά εξετάστηκε η τοξικότητα του εκχυλίσματος στην ενδοθηλιακή σειρά EA.hy926 με τη μέθοδο XTT για να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της τοξικότητας του *Pyracantha coccinea* στα EA.hy926.



Διάγραμμα 4: αποτελέσματα XTT της κυτταρικής βιωσιμότητας των EA.hy926 ύστερα από έκθεση 24h σε *Pyracantha coccinea*

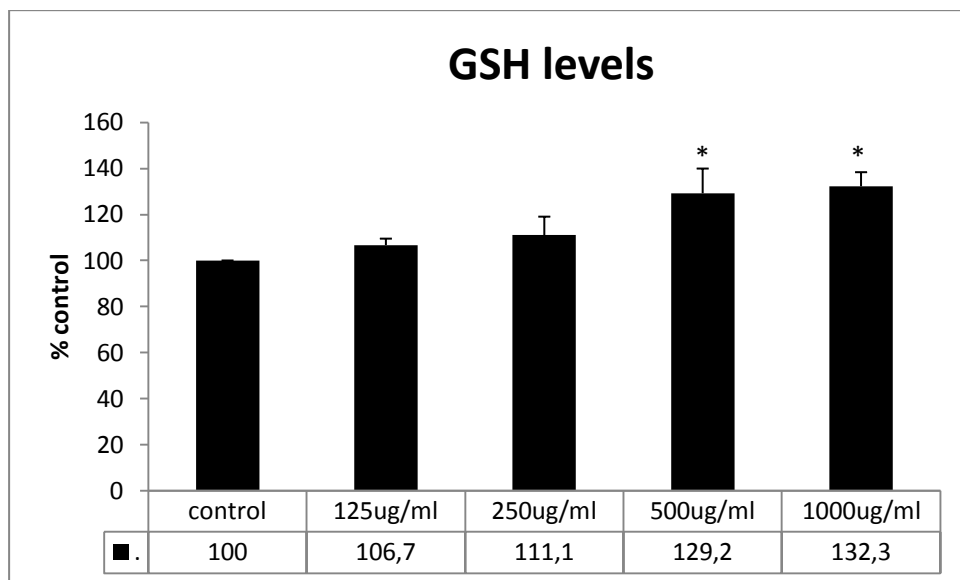
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea* μειώνει την ζωτικότητα των κυττάρων EA.hy926 στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το control.

Πίνακας 9: κυτταροτοξικότητα του *Pyracantha coccinea* στην κυτταρική σειρά EA.hy926

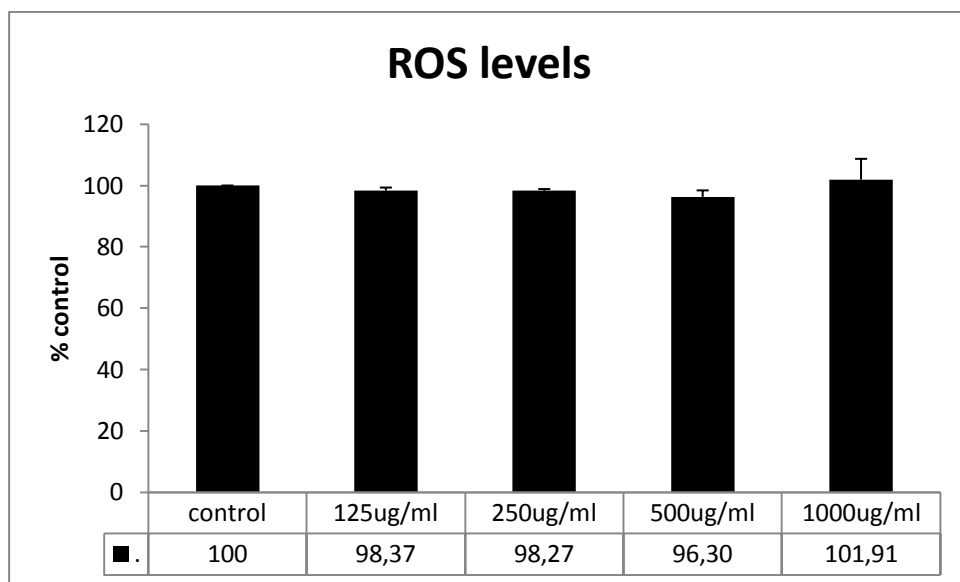
Pyracantha Coccinea (mg/ml)	Κυτταροτοξικότητα (mg/ml)
control	100
2	95
3	97
4	92,3
5	83,1
6	74,58
8	63,05
10	41,7

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι η συγκέντρωση που είναι κυτταροτοξική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 είναι >5 mg/ml.

3.5. Αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής



Διάγραμμα 5: προσδιορισμός της GSH στα EA.hy926 ύστερα από έκθεση 24h σε *Pyracantha coccinea*



Διάγραμμα 6: προσδιορισμός ROS στα EA.hy926 ύστερα από έκθεση 24h σε *Pyracantha coccinea*

Το εκχύλισμα προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης έως και 32.3% ενώ αντίθετα στα ROS δεν είχε κάποια επίδραση.

4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια συζητείται έντονα ο ρόλος των πολυφαινόλων στη διατροφή και πως αυτές μπορούν να λειτουργήσουν προστατευτικά ενάντια σε ένα πλήθος ασθενειών που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η γήρανση και άλλες εκφυλιστικές νόσοι. Τα φυτά της οικογένειας Passifloraceae, Cactoeae και Rosaceae είναι γνωστά για την δράση τους ενάντια σε πολλές ασθένειες λόγω της σύστασης τους σε αντιοξειδωτικά μόρια και κυρίως σε πολυφαινόλες.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των φυτών *Hylocereus undatus*, *Passiflora edulis* και *Pyracantha coccinea* με διάφορες *in vitro* μεθόδους και κυτταρομετρία ροής.

Από τους σημαντικότερους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και η παρεμπόδιση των επιβλαβών τους επιδράσεων. Έτσι, αρχικά εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν διαφορετικές ελεύθερες ρίζες. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διάφορων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων. Από τις πιο χαρακτηριστικές μεθόδους είναι εκείνες που εκτιμούν την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της αλληλεπίδρασής με τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+} οι οποίες εφαρμόστηκαν και στην παρούσα μελέτη. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε καθαρό απομονωμένο πλασμιδιακό DNA. Η συνδυαστική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων συνέβαλε στην πιο άρτια εκτίμηση των ιδιοτήτων τους καθώς και της αντιοξειδωτικής τους ισχύος για την περαιτέρω μελέτη των πιο δραστικών.

Από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν σε αυτά ενώσεις, οι οποίες έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η δράση τους ήταν κάπως πιο αποτελεσματική απέναντι στις ρίζες DPPH[•]. Οι διαφορές στη δραστηριότητα απέναντι στις ρίζες αποδίδεται στη διαφορετική φύση των ριζών. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα με την υψηλότερη αναγωγική ικανότητα απέναντι στις ρίζες

DPPH[•] και ABTS^{•+} ήταν και στις δύο μεθόδους το *Pyracantha coccinea* με IC₅₀ 500 μg/ml και 140 μg/ml αντίστοιχα, ενώ από τα διχλωρομεθανικά εκχυλίσματα πιο δραστικά στις ήταν για τη μέθοδο DPPH[•] το *Hylocereus udatus* (fruit) και για τη μέθοδο ABTS^{•+} το *Hylocereus udatus* (fruit skin) με IC₅₀ 125μg/ml και 240 μg/ml αντίστοιχα.

Εκτός από την ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντικές αντιοξειδωτικές/προστατευτικές ιδιότητες απέναντι στην επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από τις ρίζες ROO[•]. Η δράση τους αυτή θεωρείται και αντιμεταλλαξογόνος καθώς τα μονόκλωνα θραύσματα στο DNA αποτελούν έναν μηχανισμό μεταλλαξιγόνου δράσης των ελευθέρων ριζών. Το πιο δραστικό εκχύλισμα ήταν αυτό του *Pyracantha coccinea* με IC₅₀ 950 mg. Η προστατευτική δράση απέναντι στις ρίζες ROO[•] παίζει σπουδαίο ρόλο στην αναστολή της λιπιδικής περοξειδωσης η οποία έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ακεραιότητα της μεμβράνης και κατ' επέκταση στην κυτταρική επιβίωση.

Από τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής και της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας επιλέχθηκε το *Pyracantha coccinea* να εξεταστεί για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926 και για τον προσδιορισμό της μεταβολής της γλουταθειόνης και των ROS στην ίδια κυτταρική σειρά με κυτταρομετρία ροής. Από τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο XTT φαίνεται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5 mg/ml. Έτσι, επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος μικρότερες από 5 mg/ml για να εξεταστεί η αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα EA.hy926.

Από τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, φάνηκε πως το εκχύλισμα *Pyracantha coccinea* προκάλεσε δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης έως και 32,3% ενώ αντίθετα στα ROS δεν είχε κάποια επίδραση. Δηλαδή, φαίνεται το εκχύλισμα να έχει την ικανότητα να βελτιώνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση της υπό μελέτης κυτταρικής σειράς EA.hy926, καθώς αύξησε τα επίπεδα GSH. Η γλουταθειόνη είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια συμμετέχοντας στην άμυνα του κυττάρου έναντι των βλαβερών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Έτσι, η αύξησή της που παρατηρήθηκε (σε ποσοστό έως 32,3%) υποδηλώνει τη βελτίωση της κυτταρικής άμυνας. Αυτή η

αύξηση της γλουταθειόνης μπορεί να οφείλετε στη επαγωγική δράση του εκχυλίσματος σε αντιοξειδωτικά μόρια. Το κυριότερο βιοδραστικό μόριο του *Pyracantha coccinea* είναι η ρουτίνη και από μελέτες που έχουν γίνει, έδειξε ότι έχει την ικανότητα να επάγει το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 που είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή πολλών αντιοξειδωτικών μορίων συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειόνης (Domitrović et al., 2012).

Όσον αφορά τα ROS, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή παρ' όλα αυτά όμως θα μπορούσε να εξεταστεί αν υπήρξε μείωση των βλαβών στα κυτταρικά βιομόρια από ROS (π.χ. λιπιδική υπεροξειδωση, οξειδωση πρωτεϊνών, βλάβες στο DNA). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα βιομόρια και το εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea* θα μπορούσε να μειώσει τις βλάβες αυτές ίσως όχι με απευθείας περισυλλογή των ελεύθερων ριζών αλλά με επαγωγή των αντιοξειδωτικών μορίων.

Συμπερασματικά με την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι εκχυλίσματα από τα τρία φυτά των οικογενειών Passifloraceae, Cactoeae και Rosaceae έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά των εκχυλισμάτων, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διερευνηθούν και οι μοριακοί μηχανισμοί ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής δράσης στα κύτταρα EA.hy926. Αποδεικνύοντας την ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση των φυτικών εκχυλισμάτων αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για όφελος της ανθρώπινης υγείας φτιάχνοντας συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά και φάρμακα.

5. Βιβλιογραφία

1. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin Miao He a,1 , Jia-Wei Min a,1 , Wei-Lin Kong a , Xiao-Hua He a , Jun-Xu Li b , Bi-Wen Peng a, *Fitoterapia* 115 (2016) 74–85
2. Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483–525.
<http://doi.org/10.1080/10408360701612942>
3. Alessio HM (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25(2), 218-24.
4. Amata RL et al. (June 2011). «Manual for identification of passion fruit diseases and their management»
5. Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32
6. Antunes F., Derick H., Cadenas E. 2002 Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in *in vivo* conditions. *Free Rad Biol Med* 33: 1260-7
7. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:317–325
8. Boveris A, Cadenas E, Stoppani AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1976;156:435–444
9. Brand- Williams, W.; Cuvelier, M.E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss und-Technology*, 1995, 28: 25
10. Cao F. An, X., H. Qu, S. Wang, Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin, *Die Pharmazie* 70 (11) (2015) 724–732.
11. Cengiz Sarikurkcü , Bektas Tepe Biological activity and phytochemistry of firethorn (*Pyracantha coccinea* M.J. Roemer). *Journal of Functional Foods* 19 (2015) 669–675
12. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605
13. Chance B., Sies H., Boveris A. 1979 Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
14. Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
15. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1033–1043.

16. Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033–1043.
17. Cotgreave I.A., Moldeus P., Orrenius S. 1988 Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 189-212
18. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing 2006.
19. Domitrović Robert , Hrvoje Jakovac, Vanja Vasiljev Marchesi, Sanda Vladimir-Knežević, Olga Cvijanović, Žarko Tadić, Željko Romić and Dario Rahelić. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33: 1260–1270
20. Downey JM (1990). Free radicals and their involvement during longterm myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52: 487-504.
21. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr (1992). Free radicalmediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2- chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* 72:153-165
22. Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, Kitajima K, Anuurad E, Yamasaki M, Yamane Y (Apr 2005). "Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice". *The Journal of Nutrition*. 135 (4): 729–34.
23. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review.
24. Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), 872–879.
25. Flores G., K. Dastmalchi, A.J. Dabo, K. Whalen, P. Pedraza-Penalosa, R.F. Foronjy, J.M. D'Armiento, E.J. Kennelly, Antioxidants of therapeutic relevance in COPD from the neotropical blueberry *Anthopterus wardii*, *Food Chem.* 131 (1) (2012) 119–125
26. Goldfarb AH (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 24(3), 249-66.
27. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1988;20(1):55–59. PubMed.
28. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (Sep 2001). "Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat". *Farmaco*. 56 (9): 683–7
29. Halliwell B (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? Flow far have we come? *Am J Clin Nutr* 72:1082-1087.
27. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon,

- England. 28. Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine (2nd ed.) Oxford: Clarendon Press, pp 136-158.
30. Halliwell B (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
31. Halliwell B, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (suppl 1), 715S-725S.
32. Halliwell B. 2001 Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
33. Halliwell B. 2007 Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiov Res* 73: 341-347.
34. Halliwell B., Gutteridge M.C. 1998 Free radicals in biology and medicine. *Oxford Science Publications* Third Edition.
35. Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, 2, 950–988.
36. Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <http://doi.org/10.1021/jf061478a>
37. Jacobs, Dimitri (1999): Pitaya (*Hylocereus undatus*), a Potential New Crop for Australia. *Australian New Crops Newsletter* 11: 16.3
38. Jamilah B. et al. Physico-chemical characteristics of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *International Food Research Journal*. 2011, 18: 279-286.
39. Jenkins RR, Goldfarb A (1993). Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 25(2), 210-2.
40. Ji L.L., 1999 Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exper Biol Med* 222: 283-292.
41. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 425-435.
42. Jones D.P., Eklow L. Thor H., Orremus S. 1981 Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes. Relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 210: 505-516.
43. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625- 635.
44. Kang I., S. Choi, T.J. Ha, M. Choi, H.R. Wi, B.W. Lee, M. Lee, Effects of mung bean (*Vigna radiata* L.) ethanol extracts decrease proinflammatory cytokine-induced lipogenesis in the KK-Ay diabese mouse model, *J. Med. Food* 18 (8) (2015) 841–849.

45. Kanner J and Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31:1388-1395.
46. Kanner, J., Harel, S., Granit, R., Betalains—a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5178–5185
47. [Kanti Bhooshan Pandey](#) and [Syed Ibrahim Rizvi](#) *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Nov-Dec;2(5):270-8. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease
48. 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.
49. Khan MI, Giridhar P. 2015. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* 117:267–95
50. Kim J.H. , B.C. Lee, J.H. Kim, G.S. Sim, D.H. Lee, K.E. Lee, Y.P. Yun, H.B. Pyo, The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*, *Arch. Pharm. Res.* 28 (2) (2005) 195–202.
51. Koren HS (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect* 103: 235-242.
52. Krajka-Ku'zniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., BaerDubowska, W., Betanin, a beetroot component, induces nuclearfactorerythroid-2-relatedfactor2-mediatedexpressionofdetoxifying/antioxidantenzymesinhumanlivercell lines. *Br. J. Nutr.* 2013, 110, 2138–2149.
53. Kuppasamy P and Zweier JL (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. / *Biol Chem* 264: 9880-9884
54. Le Bellec et al. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits.* 2006, 61(4):237-250.
55. Lee E.B., J.H. Kim, Y.S. Cha, M. Kim, S.B. Song, D.S. Cha, H. Jeon, J.S. Eun, S. Han, D.K. Kim, Lifespan extending and stress resistant properties of vitexin from *Vigna angularis* in *Caenorhabditis elegans*, *Biomol. Ther. (Seoul)* 23 (6) (2015) 582–589.
56. Lee, J. H., Son, C. W., Kim, M. Y., Kim, M. H. et al., Red beet (*Beta vulgaris* L.) leaf supplementation improves antioxidant status in C57BL/6J mice fed high fat high cholesterol diet. *Nutr. Res. Pract.* 2009, 3, 114–121.
57. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 15036–15040.
58. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 959, 396-411

59. Malm C, Svensson M, Ekblom B, Sjodin B (1997). Effects of ubiquinone-10 supplementation and high intensity training on physical performance in humans. *Acta Physiol Scand* 161, 379-384.
60. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727- 47.
61. Masters C., Pegg M., Cranc D. 1986 On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70: 113-120.
62. Masters C., Pegg M., Cranc D. 1986 On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70: 113-120.
63. McCord J.M., Fridovich I. 1969 Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2-14: 6049-6055.
64. McCord JM and Fridovich I (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243:5753-5760.
65. Meister A., Anderson M.E. 1983 Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-60.
66. Meng X., J. Yang, M. Dong, K. Zhang, E. Tu, Q. Gao, W. Chen, C. Zhang, Y. Zhang, Regulatory T cells in cardiovascular diseases, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (3) (2016) 167–179.
67. Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S (1997). "Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-Diethylaminoethyl ethers of flavaone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action". *IUBMB Life*. 41 (5): 1067–1075.
68. Meydani M and Evans WJ (1993). Free radicals, exercise and aging. In: Yu BP, Ed *Free Radicals in Aging* Boca raton, FL: CRC Press, pp 183-204
69. Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364.
70. Michiels C., Raes V., Toussaint O., Remacle J. 1994 Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 17: 235-248.
71. Miller, N.; Diplock., A.T. & Rice-Evans, C. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice in storage. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43: 1794.
72. Morton JF (1987). «Passionfruit, p. 320–328; In: *Fruits of warm climates*». NewCrop, Center for New Crops & Plant Products, Department of Horticulture and Landscape Architecture at Purdue University, W. Lafayette, IN, USA.
73. Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295-309.

74. Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
75. Navarro-Núñez L, Lozano ML, Palomo M, Martínez C, Vicente V, Castillo J, Benavente-García O, Diaz-Ricart M, Escolar G, Rivera J (May 2008). "Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (9): 2970–6.
76. Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L (2001). Release of dopamine by perfusion with l-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906:170-175.
77. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM (1980). Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1159-1163
78. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.
79. Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005 Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302
80. [Pyne DB¹](#).
81. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.
82. Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24:191-200.
83. Reddy GB, Muthenna P, Akileshwari C, Saraswat M, Petrash JM. "Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by dietary rutin". *Current Science*. 101 (9): 1191–1197
84. Reid MB (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724-31.
85. Reid MB (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724-31.
86. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS (1992). Reactive oxygen in muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 73(5), 1797-804.

87. Reporter, Daily Mail (9 May 2012). "Chemical found in apples, onions and green tea can help beat blood clots". London: Mail Online. Retrieved 11 May 2012.
88. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Bolwell G.P. & Bramley, P.M. The related antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res.* 1995, 22: 375.
89. Scholz, R.W. Graham K.S. Gumprich E. Reddy C.C. (1989). «Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation». *Ann NY Acad Sci* 570: 514–7.
90. Spallholz J.E., Boylan L.M. 1991 Glutathione peroxidase. The two selenium enzymes. In Everse J., Everse K.E., Grisham M.B. eds. Peroxidases in chemistry and biology. Vol I. Boca Raton F.L CRC Press 259-291
91. Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of molecural methods, *In Vivo*: 741-747
92. Strack D, Vogt T, Schliemann W (February 2003). "Recent advances in betalain research". *Phytochemistry*. 62 (3): 247–69.
93. Talcott ST, Percival SS, Pittet-Moore J, Celoria C (2003). «Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*)». *J Agric Food Chem* 51 (4): 935–41
94. Tenore G.C. et al. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of Functional Foods*. 2012, 4(1):129-136
95. Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Livrea, M. A., Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalaine in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 941– 945.
96. Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M., Livrea, M. A., Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1266–1270.
97. Tesoriere, L., Butera, D., Pintauro, A.M., Allegra, M., Livrea, M. A., Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficusindica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 391–395.
98. Vermeris W., Nicholson R. Phenolic compound biochemistry. Springer 2006
99. Visioli F., Bellomo G., Galli C. 1998 Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Com* 247:60–4.
100. Vitrac X, Moni JP, Vercauteren J, Deffieux G, Mérillon JM. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta*. 2002;458:103–110.
101. Wormser U, Sintov A, Brodsky B, Nyska A (2000). Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol* 169: 33-39

102. Young IS, McEneny J (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29(2), 358-62.
103. Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162
104. Aust J Sci Med Sport 1994 Sep-Dec;26(3-4):49-58.

Ηλεκτρονικές πηγές

icalhealthguide.com/articles/dragonfruit-healthbenefits.htm

<https://el.wikipedia.org/wiki/Πυράκανθος>

<http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Pyracantha+coccinea>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Vitexin>