



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ &
ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΟΝΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ROSA
SEMPERVIRENS , OPUNTIA – FICUS
INDICA & LYCIUM BARBARUM
ΜΕ IN VITRO ΜΟΡΙΑΚΕΣ
ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

**ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT & ANTI-
MUTAGENIC
ACTIVITY OF ROSA
SEMPERVIRENS , OPUNTIA – FICUS
INDICA & LYCIUM BARBARUM
PLANT EXTRACTS WITH
IN VITRO MOLECULAR
METHODS**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ-ΝΙΚΗ Κ. ΚΟΚΚΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων)**: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
2. **Δημήτριος Στάγκος**: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
3. **Σέρκος Χαρουτουγιάν**: Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού όπως είναι η αθηροσκλήρυνση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος και η διαδικασία της γήρανσης. Οι πολυφαινόλες των φυτών, ως ουσίες που δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά και να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξογόνο δράση τριών φυτικών εκχυλισμάτων, του *Rosa sempervirens*, του *Opuntia ficus-indica* και του *Lycium Barbarum*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 5 in vitro εργαστηριακές μέθοδοι, δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στην δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]), τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες του DPPH και ABTS, τη δυνατότητα των εκχυλισμάτων να αυξάνουν τα επίπεδα της GSH και να μειώνουν τα επίπεδα των ROS σε κυτταροκαλλιέργεια καθώς και την ανίχνευση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος που προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Τα εκχυλίσματα επέδειξαν αντιοξειδωτική και προστατευτική δράση απέναντι στη επαγόμενη από τις ρίζες βλάβη του DNA και στη δυνατότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH και ABTS. Οι τιμές των IC₅₀ για την εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH για το *Opuntia ficus-indica* ήταν για το διγλωμεθανολικό εκχύλισμα της φλούδας του 185 μg/ml, το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος 290 μg/ml και για τα κλαδιά του 700 μg/ml. Για το φρούτο του *Rosa sempervirens* το μεθανολικό εκχύλισμα του είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση καθώς η τιμή του IC₅₀ ήταν 130 μg/ml. Επίσης και το διγλωρομεθανολικό εκχύλισμα έδειξε αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC₅₀ 270 μg/ml. Το φρούτο του *Lycium Barbarum* δεν έδειξε σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά την δυνατότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS το διγλωμεθανολικό εκχύλισμα των κλαδιών του *Opuntia ficus-indica* έχει τιμή IC₅₀ 730 μg/ml ενώ το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος έχει τιμή IC₅₀ 210 μg/ml. Το μεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *Rosa sempervirens* είχε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς οι τιμές του IC₅₀ ήταν 85 και 130 μg/ml. Επίσης και τα διγλωρομεθανολικά εκχυλίσματα του ίδιου φρούτου έδειξαν αντιοξειδωτική δράση με τιμές IC₅₀ 330 και 270 μg/ml. Το εκχύλισμα του φρούτου του *Rosa sempervirens* έδειξε επίσης δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιογόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO[•] καθώς η IC₅₀ τιμή του ήταν 570 μg/ml. Το εκχύλισμα αυτό μελετήθηκε περισσότερο με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και του XTT και από τα αποτελέσματα που πήραμε φάνηκε πως το εκχύλισμα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της GSH που φτάνει και το 19.7% και αντίστοιχα μια πτώση των ROS της τάξης του 12.91%. Και οι δυο τιμές παρατηρήθηκαν στην μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, τα 125 μg/ml ενώ εν συνεχεία φαίνεται μια τάση να πέσει η γλουταθειόνη και να ανέβουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, γεγονός που συνάδει με το φαινόμενο προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών από μια τιμή συγκέντρωσης και πάνω.

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in many pathological conditions of the organism such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, cancer and the aging process. Plant polyphenols, as substances which bind the active oxygen species and oxidative free radicals can act as antioxidants and are used to combat oxidative stress. In the present study, we examined the antioxidant activity and the anti-mutagenic activity of three plant extracts of *Rosa sempervirens*, *Opuntia ficus-indica* and *Lycium Barbarum*. For this purpose, five in vitro methods were used in order to examine the ability of the extracts to protect DNA from free radical-induced monofunctional fragments, specifically from peroxy (ROO^\bullet) radicals, the ability to neutralize the radicals DPPH and ABTS and the ability of the extracts to increase levels of GSH and decrease ROS levels in cell culture. Furthermore, we detected the concentration of the extract which induced cytotoxicity. The extracts exhibited antioxidant and protective activity against induced DNA damage. Also, they exhibited the possibility of the extract to eliminate DPPH and ABTS free radicals. The values of IC_{50} for the neutralization of the radical DPPH of *Opuntia ficus-indica* was about $185 \mu\text{g} / \text{ml}$ for the peel, $290 \mu\text{g} / \text{ml}$ for the fruit and $700 \mu\text{g} / \text{ml}$ for the cladodes. This extract was dissolved in dichloromethane. Fruit of *Rosa sempervirens* methanolic extract had higher antioxidant activity as the value of IC_{50} was $130 \mu\text{g} / \text{ml}$. Dichloromethanolic extract of the same plant showed antioxidant activity with IC_{50} value $270 \mu\text{g} / \text{ml}$. Fruit of *Lycium Barbarum* showed no significant antioxidant activity. As far as it concerns the neutralization of the radical ABTS, dichloromethanolic extract of *Opuntia ficus-indica* cladodes, showed IC_{50} value at around $730 \mu\text{g} / \text{ml}$ and the fruit of the same extract showed IC_{50} value $210 \mu\text{g} / \text{ml}$. The methanolic extract of fruit of *Rosa sempervirens* exhibited antioxidant activity as the IC_{50} values were 85 and $130 \mu\text{g} / \text{ml}$. The dichloromethanolic extracts showed antioxidant activity with IC_{50} values 330 and $270 \mu\text{g} / \text{ml}$. The extract of fruit of *Rosa sempervirens* also showed dose-dependent protective - antimutagenic activity against the toxic activity of ROO^\bullet radicals as the IC_{50} value was $570 \mu\text{g} / \text{ml}$. This extract was further investigated by the flow cytometry method and XTT method and the results obtained showed that the extract had improved the redox state of the cells. There was an increase in GSH levels as high as 19.7% and a corresponding decrease in ROS levels in the order of 12.91%. Both rates were observed in the lowest concentration used, $125 \mu\text{g} / \text{ml}$, and then showed a tendency to decrease glutathione levels and increase levels of free radicals, which is consistent with the prooxidative effect of polyphenols.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT	3
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Οξειδωτικό στρες.....	9
1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός	9
1.1.2 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη O ₂	10
1.1.3 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	14
Ενδοκυτταρικές πηγές	15
1.Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	15
2.Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»	16
3.Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	16
4.Κυτόχρωμα P450.....	16
5.Αυτοοξειδωση μορίων	17
Εξωκυτταρικές πηγές	17
1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια	18
1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα	20
1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας	28
1.1.6.3Καρδιαγγειακό, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αγγειοπάθειες	30
1.1.6.4 Νευρωνική εκφύλιση	31
1.2 Πολυφαινόλες	31
1.2.1 Ετυμολογία.....	31
1.2.2 Ιστορικό	31
1.2.3 Ορισμός.....	32
1.2.4 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών.....	33
1.2.5 Φυσικές Ιδιότητες.....	37
1.2.6 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινολών.....	38
1.2.7 Επιδράσεις πολυφαινολών στην υγεία.....	38
1.2.8 Αναστολή ενζύμων	39
1.2.9 Δράση κατά καρδιοαγγειακών παθήσεων.....	39

1.2.10 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	40
1.2.11 Αγγειακές δράσεις των φλαβονοειδών.....	40
1.2.12 Κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των φλαβονοειδών.....	40
1.3 Rosa sempervirens.....	41
1.4 Opuntia Ficus-indica	47
Συστηματική ταξινόμηση	49
Χαρακτηριστικά.....	50
Χημική ανάλυση.....	51
Αναπαραγωγή του φραγκόσκυκου.....	52
Ιστορία.....	53
Οι καρποί.....	54
Οι βλαστοί.....	55
Φύλλα.....	55
Άνθη.....	55
Η επιβίωση.....	56
Οφέλη για την κτηνοτροφία.....	56
Πρόσθετες μελέτες για το φραγκόσκυκο.....	57
Φύλλα και άνθη.....	58
1.5 Lycium Barbarum ή Goji Berry	58
Καρπός.....	59
Σημαντικότητα του Goji Berry	59
Ευεργετικές Ιδιότητες.....	59
Πρόσθετες μελέτες για το Lycium Barbarum.....	60
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	62
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	62
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
2.2.1 1 ^η Μέθοδος: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.....	63
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	65
2.2.2 2 ^η Μέθοδος: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	68
2.2.3 3 ^η Μέθοδος: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας με τη μέθοδο DPPH [•]	71

2.2.4 4 ^η Μέθοδος: Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry)	72
2.2.5 5 ^η Μέθοδος: Μέθοδος του XTT	75
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
3.1 Αποτελέσματα της μεθόδου εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	77
3.2 Αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας με τη μέθοδο DPPH•	78
3.3 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων <i>Rosa sempervirens</i> , <i>Opuntia ficus-indica</i> και <i>Lycium Barbarum</i> στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.	80
3.4. Αποτελέσματα της μεθόδου του XTT.	82
3.5. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής.	82
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	87
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	
Πίνακας 1: Διατροφική αξία του φραγκόσυκου.	52
Πίνακας 2: Περιεκτικότητα του φραγκόσυκου σε βιταμίνες	52
Πίνακας 3: Περιεκτικότητα του φραγκόσυκου σε ανόργανα άλατα.	52
Πίνακας 8: Οι κωδικοί των υπο μέλετη φυτικών εκχυλισμάτων.	63
Πίνακας 4 : : Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.	67
Πίνακας 5: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.	70
Πίνακας 6: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.	70
Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.	72
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	
Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.	14
Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.	17
Εικόνα 3 : Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.	18
Εικόνα 4: Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών.	18
Εικόνα 5: Οξειδωτικό στρες.	20
Εικόνα 6: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων.	21

Εικόνα 7: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT.....	23
Εικόνα 8: Δομή γλουταθειόνης.....	24
Εικόνα 9: Γενική δομή φλαβονολών.	34
Εικόνα 10: Γενική δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων.	36
Εικόνα 11: Γενική δομή υδροξυκινναμωμικών οξέων.	36
Εικόνα 12 : Χημικές δομές διαφορετικών πολυφαινολικών τάξεων.	37
Εικόνα 13 : Κλαδόγραμμα του γένους Rosaceae σύμφωνα με την παραδοσιακή ταξινόμηση.	43
Εικόνα 14: Φυλλόγραμμα που παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτών της οικογένειας Rosaceae. Για την ταξινόμηση συνδυάστηκε η σύγκριση 125 χαρακτηριστικών (61 μη μοριακών και 64 μοριακών)(Dickinsonetal.2002). Τα χρώματα αναπαριστούν τις παραδοσιακές ταξινομημένες υποοικογένειες (κόκκινο=malloideae, μπλέ=spiraeoideae, πράσινο=amygdaloideae, ρόζ=rosoideae). Τα Ceanothus και Rhamnus αποτελούν την εξω-ομάδα.....	45
Εικόνα 15: Εικονογράφηση του Φραγκόσκου στο The Cactaceae.	48
Εικόνα 16: Περιοχές με ημι-άνυδρα κλίματα. ▮ BSh θερμό ημι-άνυδρο κλίμα. ▮ BSk ψυχρό ημι-άνυδρο κλίμα.	49
Εικόνα 17: Κλαδόγραμμα της οικογένειας Cactaceae.	50
Εικόνα 18: Το φραγκόσυκο.	51
Εικόνα 19 : Το φραγκόσυκο ως φυτοφράκτης.....	53
Εικόνα 20: Το φυτό της φραγκοσυκιάς 56	56
Εικόνα21: Ανοιχτή και υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA. Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).....	64
Εικόνα 22.....	69
Εικόνα 23: Παραγωγή της ρίζας του ABTS ^{•+} μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂	69
Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρομέτρου.	73
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	
Διάγραμμα 1 : IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Opuntia ficus-indica σε µg/ml.	77
Διάγραμμα 2 : IC₅₀ των εκχυλισμάτων του L.Barbarum σε µg/ml για δύο διαφορετικές επαναλήψεις της μεθόδου.....	78

Διάγραμμα 3: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Rosa sempervirens σε µg/ml για δύο διαφορετικές επαναλήψεις της μεθόδου.	78
Διάγραμμα 4: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Opuntia ficus-indica σε µg/ml.	79
Διάγραμμα 5: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του L.Barbarum σε µg/ml.	79
Διάγραμμα 6: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Rosa sempervirens σε µg/ml.	80
Διάγραμμα 7: :IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Opuntia ficus-indica σε µg/ml.	81
Διάγραμμα 8: IC₅₀ του εκχυλίσματος του L.Barbarum σε µg/ml.	81
Διάγραμμα 9: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του Rosa sempervirens σε µg/ml.	81
Διάγραμμα 11: Απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος.	83
Διάγραμμα 10: Απεικόνιση των συγκέντρωσεων του εκχυλίσματος και της βιωσιμότητας των κυττάρων.	82
Διάγραμμα 12: Απεικόνιση των επιπέδων των ROS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος.	83

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξειδωτικό στρες

1.1.1 Ιστορική αναδρομή & ορισμός

Το 1775 ο Priestley ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Η προφητική αυτή παρατήρηση από τον άνθρωπο που ανακάλυψε το οξυγόνο, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».

Το O_2 είναι πολύ σημαντικό στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, αλλά κάτω από κάποιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει **τοξικό**, καθώς η έκθεση του οργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξυγόνου προκαλεί ανεπιθύμητες αντιδράσεις για την υγεία.

Τα αίτια των δηλητηριωδών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershan et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Λίγο αργότερα, ο Denham Harman το 1956 διατύπωσε την υπόθεση ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (DMO – ROS) μπορεί να παίζουν ρόλο στην κυτταρική βλάβη, τη μεταλλαξιγένεση, τον καρκίνο και τις εκφυλιστικές διεργασίες της βιολογικής γήρανσης. Η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το 1969 σήμανε μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς. Μια τρίτη εποχή της έρευνας σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών ξεκίνησε όταν το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έκτοτε, είναι πλέον σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες. Είναι πλέον γνωστό, ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές (Valko, M., et al., 2007).

Ο όρος **οξειδωτικό στρες** ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως «η διαταραχή της ισορροπίας των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων» (Sies, H., et al., 1985).

Τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην παθογένεση πολλών ασθενειών κίνησε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα να πληθαίνουν οι έρευνες για την κατανόηση των επιβλαβών δράσεων τους, αλλά και την επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση.

1.1.2 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη O_2

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας *μικρότερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας *μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση*, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (*redox*), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1990). Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al., 2004; Pani and Galeotti, 2010; AICR, 2007), το θείο (Battin et al., 2009; Pani and Galeotti, 2010) ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με $3O_2$, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική. Όμως, είναι δυνατή η ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με $*O_2$. Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Halliwell 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge,

1995). Τα κυριότερα ΔΕΟ (Aqil et al., 2012; Vainio et al., 1999; Weisburger, 2001; AICR, 2007) είναι:

Η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Το σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e^- σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

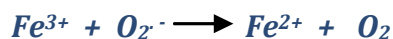


Το σουπεροξειδίο έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων». Ένζυμα που παράγουν σουπεροξειδίο είναι η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η NADPH – οξειδάση των φαγοκυττάρων που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής $O_2^{\cdot-}$. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές δραστικές μορφές οξυγόνου. Το $O_2^{\cdot-}$, όπως και όλες οι ρίζες, έχει τη φυσική τάση να ζευγαρώσει το ασύζευκτό του ηλεκτρόνιο. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες $O_2^{\cdot-}$ μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH, δύο ρίζες $O_2^{\cdot-}$ αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})

Η ρίζα υδροξυλίου OH^{\cdot} είναι πολύ δραστική, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski & Cabelli, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). Αυτή προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999). Η αντίδραση καταλύεται ως εξής:



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες,

λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι:

- ✚ Η απόσπαση υδρογόνου,
- ✚ Η προσθήκη ηλεκτρονίου και
- ✚ Η μεταφορά ηλεκτρονίου

(Halliwell & Gutteridge, 1999)

Υπεροξειδικές ρίζες (ROO[•])

Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO[•] σχηματίζονται από την προσθήκη μοριακού οξυγόνου (O₂) σε ελεύθερες οργανικές ρίζες. Είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (Παπαγεωργίου, 2005).

Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO₂[•])

Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου HO₂[•] προκύπτει από αναγωγή 1 e⁻ στο οξυγόνο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ παράγεται με αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια, σύμφωνα με την αντίδραση:

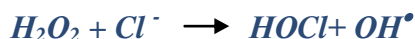


Στο μόριο του το H₂O₂ δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα (HO[•]), που είναι ιδιαίτερος δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του H₂O₂ στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το H₂O₂. Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια H₂O₂, μόλις αυτά παραχθούν (Παπαγεωργίου, 2005).

Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ HOCl είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H₂O₂ και το O₂^{•-} και σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο που βρίσκεται στο

κυτόπλασμα των φαγοκύτταρων), καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με το χλώριο (Cl^-), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, εν τούτοις πολύ δραστικό χημικά. Ενοχοποιείται ότι οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, προκαλείται «οίδημα» σ' αυτά, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C, οπότε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών (Whiteman Matthew, 2005).

Υποβρωμιώδες Οξύ (HOBr)

Το υποβρωμιώδες οξύ HOBr είναι ασθενές και ασταθές. Σε υδατικό διάλυμα, διίσταται εν μέρει στο ανιόν OBr^- και το κατιόν H^+ . Όταν καθαρό βρώμιο προστίθεται σε νερό, σχηματίζει υποβρωμιώδες οξύ και υδροβρωμικό οξύ (HBr):



Το HOBr χρησιμοποιείται ως λευκαντικό, οξειδωτικό, αποσμητικό και απολυμαντικό, εξαιτίας της ικανότητάς του να σκοτώνει τα κύτταρα πολλών παθογόνων. Η ένωση παράγεται ιδίως από ηωσινόφιλα, τα οποία το παράγουν από τη δράση της υπεροξειδάσης ηωσινόφιλων, ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί κατά προτίμηση βρωμίδιο. Το βρωμίδιο χρησιμοποιείται επίσης σε υδρομασάζ και ιαματικά λουτρά ως μικροβιοκτόνος παράγοντας, χρησιμοποιώντας τη δράση ενός οξειδωτικού παράγοντα για να παράγουν υποβρωμιώδες με παρόμοιο τρόπο με την υπεροξειδάση των ηωσινόφιλων.

Όζον (O_3)

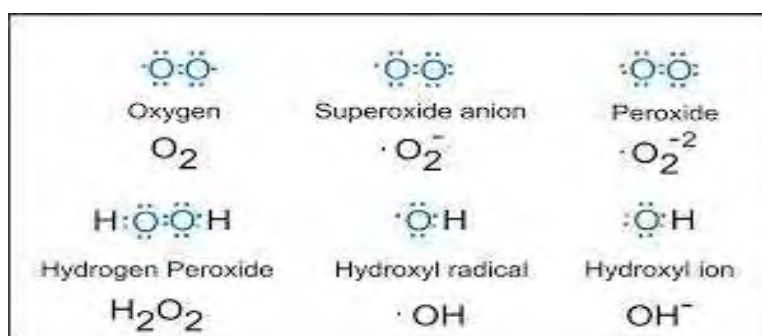
Το όζον O_3 βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και έχει μεγάλη βιολογική σημασία επειδή απορροφά τις βλαβερές για τους ζωντανούς οργανισμούς, υπεριώδεις ακτινοβολίες. Σχηματίζεται με φωτοδιάσπαση του O_2 από την υπεριώδη ακτινοβολία σε ατομικό οξυγόνο το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο. Το όζον δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Πρόκειται για οξειδωτικό αέριο στο μόριο του οποίου περιέχονται τρία άτομα οξυγόνου. Είναι διαμαγνητικό, έχει χαρακτηριστική οσμή και ιδιαίτερα περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό (Παπαγεωργίου, 2005).

Μονήρες οξυγόνο (1O_2)

Το μονήρες οξυγόνο 1O_2 (singlet oxygen) έχει όλα τα ηλεκτρόνια του συζευγμένα, πράγμα που σημαίνει ότι ουσιαστικά δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το 1O_2 σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη.

Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηρότητά του, περισσότερο από το μοριακό οξυγόνο, επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin και παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική ικανότητα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Έχει μικρή διάρκεια ημιζωής και δυνατότητα να διαπερνά τα κύτταρα (Halliwell, How to characterize an antioxidant: an update 1995). Αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το $^1\text{O}_2$ σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).



Εικόνα 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.

Οι ευεργετικές δράσεις των ΔΜΟ παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος.

Όπως συνάγεται από τις αντιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι πολύ δραστικές όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου, προσδίδει στις ΔΜΟ ιδιαίτερη δραστηρότητα, αφού μπορούν είτε να δώσουν είτε να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο σε/από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως αναγωγικά ή οξειδωτικά μέσα αντίστοιχα (Durackova, Z., et al., 2010).

1.1.3 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 (εξωκυτταρικές 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.

Σε γενικές γραμμές, δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά:

- ✚ τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας,
- ✚ τα προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- ✚ τη λιπιδική οξείδωση,
- ✚ την ακτινοβολία,
- ✚ τη φλεγμονή,
- ✚ το κάπνισμα

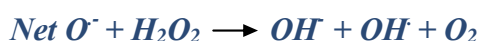
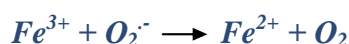
Ενδοκυτταρικές πηγές

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 $O_2^{\cdot-}$ 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 $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται 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), 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 (Petroni 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 υπεροξειδωση 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; Kurppasamy & 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 οξυγόνο 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 H_2O_2 (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την

κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell & Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $\text{O}_2^{\cdot-}$.

5. Αυτοοξειδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

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 ξеноβιοτικών 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).

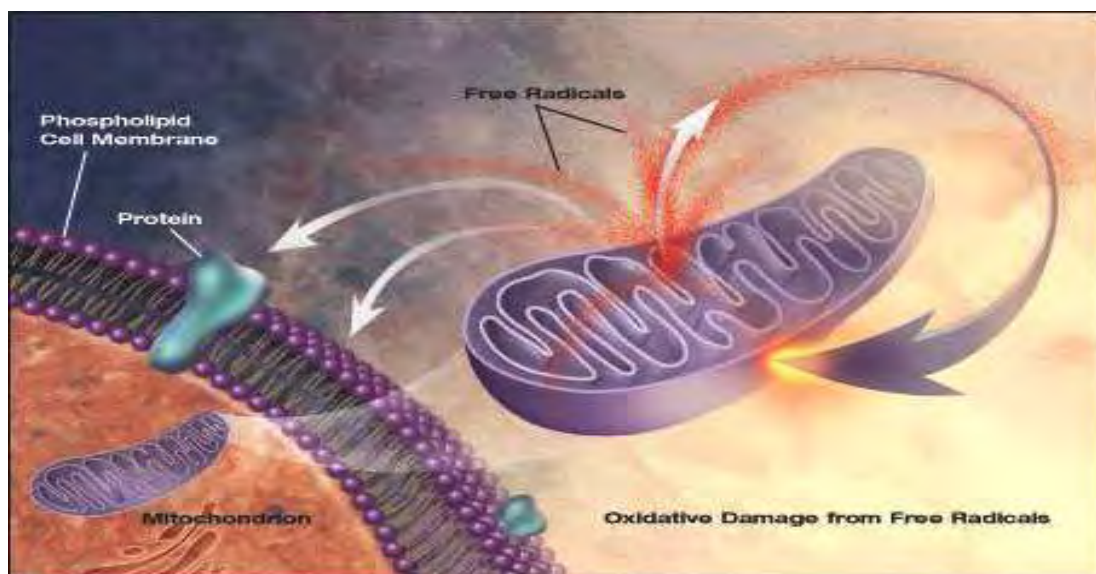


Εικόνα 2: Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών.

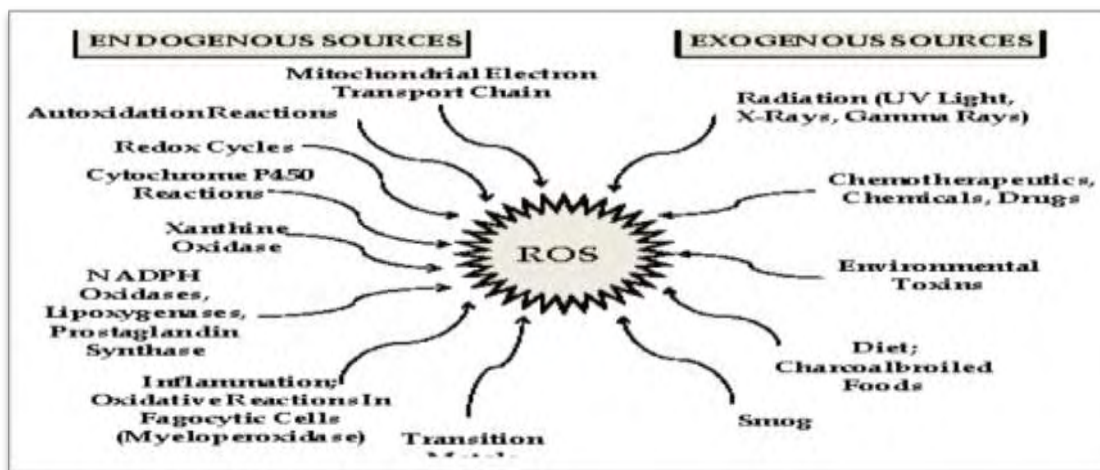
Όσο πιο σταθερή είναι μια ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι και ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ρίζες εξουδετερώνονται είτε αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, είτε με άλλες ρίζες, είτε με άλλα συστατικά του κυττάρου. Αν μια ρίζα αλληλεπιδράσει με μια μη ρίζα, τότε το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο θα μεταφερθεί στην δεύτερη, σχηματίζοντας μια νέα ρίζα. Αν όμως αλληλεπιδράσουν δυο ρίζες μεταξύ τους, τότε τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια θα δημιουργήσουν ένα ζεύγος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ένωσης που δε θα είναι ελεύθερη ρίζα. Υπάρχουν πολλοί τύποι ελεύθερων ριζών στο σώμα:

- ✚ Η ρίζα του υπεροξειδίου τείνει να προσλαμβάνει το απαραίτητο ηλεκτρόνιο από τα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Όταν τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται, το κύτταρο χάνει την ικανότητα να παράγει ενέργεια και πεθαίνει.

- ✚ Η ρίζα του υδροξυλίου μπορεί να αντιδρά με ένζυμα, πρωτεΐνες και λίπη στις κυτταρικές μεμβράνες.
- ✚ Η ρίζα του περοξυλίου λιπιδίων προκαλεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να βλάψει την κυτταρική μεμβράνη, προκαλεί τη λύση του κυττάρου και την ελευθέρωση του περιεχομένου του.
- ✚ Το μονήρες οξυγόνο δεν είναι ουσιαστικά ελεύθερη ρίζα, αλλά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή άλλων ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 3 :Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ΔΜΟ.



Εικόνα 4: Τρόποι σχηματισμού ελευθέρων ριζών.

1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι

τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Λιπίδια

Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξειδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο.

Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει $ROO\cdot$ κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1999).

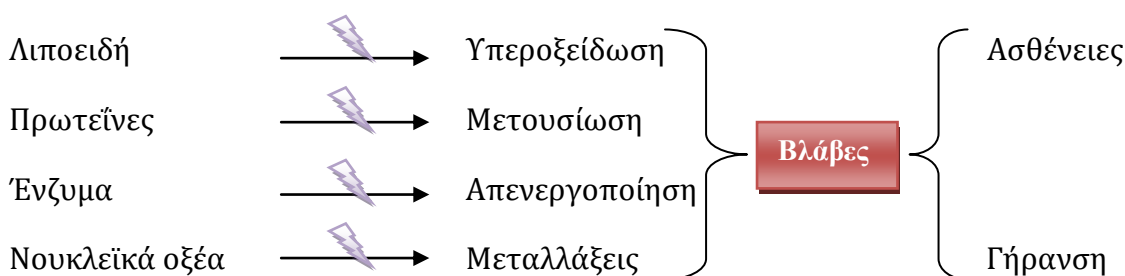
Πρωτεΐνες

Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $OH\cdot$, το $RO\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και η καταστροφή τους τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

DNA

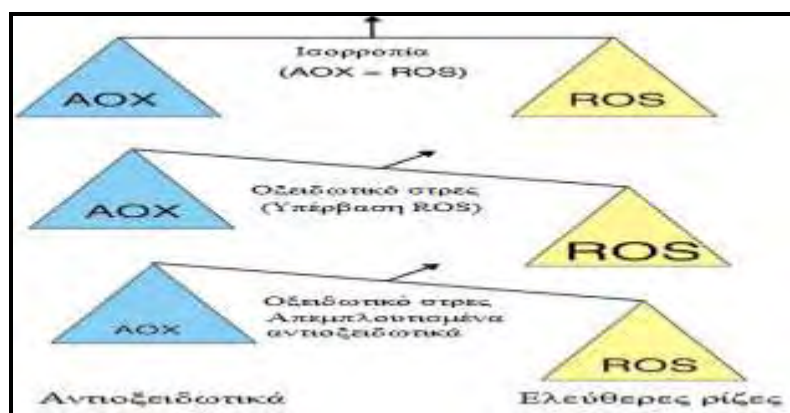
Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου($OH\cdot$) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου

οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).



1.1.5 Αντιοξειδωτική άμυνα

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται οξειδωτικό στρες, ο οποίος όρος περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, et.al., 2004). Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες.



Εικόνα 5: Οξειδωτικό στρες.

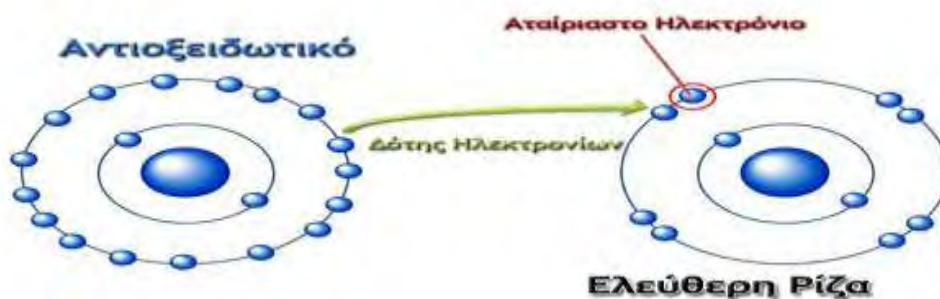
Γενικά χαρακτηρίζουμε ως αντιοξειδωτική ουσία κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία

καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. (Vaya J. and Aviram M., 2001).

1.1.5.1 Ο Ρόλος Των Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά παίρνουν μέρος σε μια σειρά από θετικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό, μερικές από τις οποίες αναφέρονται:

- ✚ Προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, και συνεπώς το κύτταρο, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.
- ✚ Δρουν καρδιοπροστατευτικά, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των αγγείων, περιορίζοντας τους φλεγμονώδεις παράγοντες, αποτρέποντας την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και συμβάλλοντας στον έλεγχο των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης και της ομοκυστεΐνης.
- ✚ Ασκούν αντικαρκινική δράση με το να μπλοκάρουν ή να εμποδίζουν την προσκόλληση επικίνδυνων ενζύμων στους ιστούς, αδρανοποιούν καρκινογόνες ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις σε υγιή κύτταρα κι επιβραδύνουν τους μηχανισμούς καρκινογένεσης.
- ✚ Βελτιώνουν τις πνευματικές ικανότητες και την ψυχική διάθεση, προστατεύοντας τους νευροδιαβιβαστές από την οξείδωση και βελτιώνοντας την εγκεφαλική μικροκυκλοφορία.
- ✚ Διατηρούν το δέρμα ελαστικό και το προφυλάσσουν από την πρόωρη γήρανση, περιορίζοντας τη διάσπαση του κολλαγόνου.
- ✚ Προστατεύουν οστά και αρθρώσεις, περιορίζοντας οιδήματα, φλεγμονές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις.
- ✚ Βελτιώνουν τη λειτουργική κατάσταση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των ματιών και ενισχύουν την όραση.
- ✚ Δρουν αντιαλλεργικά σε μεγάλο φάσμα αλλεργιών.
- ✚ Διαφυλάσσουν τα αποθέματα άλλων απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στον οργανισμό, αποτρέπουν την καταστροφή τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενισχύουν τη δράση τους.



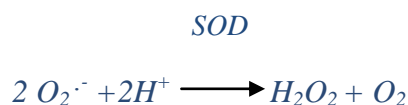
Εικόνα 6: Τρόπος δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων.

1.1.5.2 Πηγές Αντιοξειδωτικών

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά συστήματα (ενδογενή αντιοξειδωτικά) τα οποία μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη ενζυμικά ή τα λαμβάνει εξωγενώς (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι το κυτόχρωμα C, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης και η καταλάση.

1) Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu -SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

2) Καταλάση (CAT)

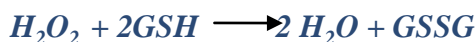
Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500 αμινοξέων, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Τα υπεροξειδιοσώματα παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .



3) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

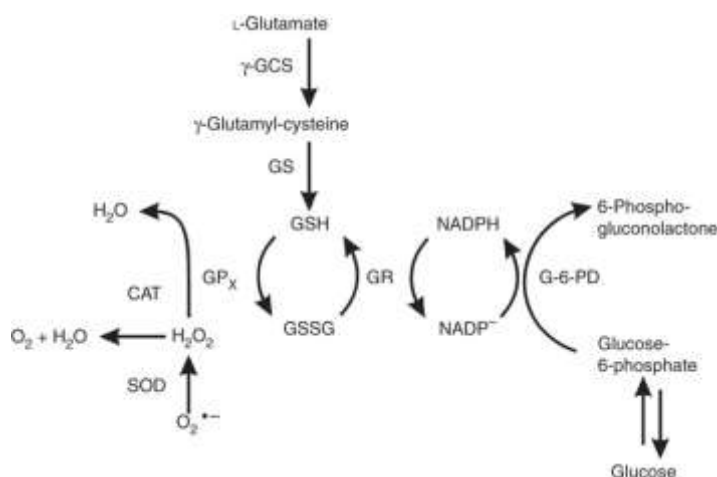
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται: (Antunes et al., 2002)

GPX



4) Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



Εικόνα 7: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT.

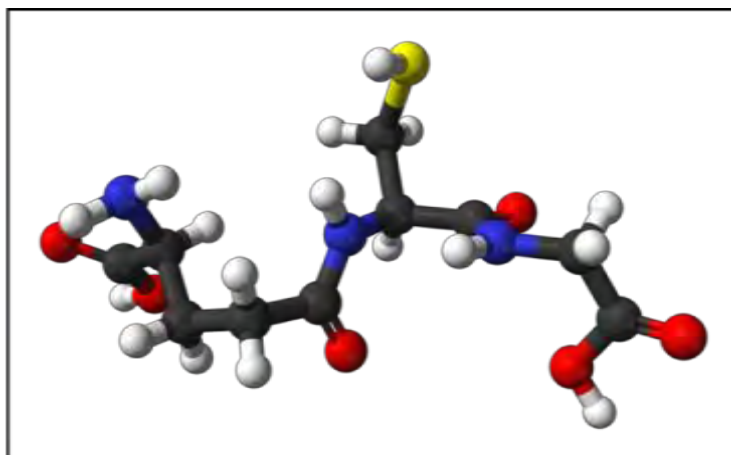
Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται η α-τοκοφερόλη, το β-καροτένιο και το συνένζυμο Q10 τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις μεμβράνες ενώ, υπάρχουν και το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, η τρανσφερίνη, η χολερυθρίνη, η γλουταθειόνη, η λακτοφερίνη κ.α. τα οποία βρίσκονται έξω από τις μεμβράνες.

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 την 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.



Εικόνα 8: Δομή γλουταθειόνης

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. Τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα ελαττώνονται κατά 17% από την ηλικία των σαράντα μέχρι την ηλικία των εξήντα. Σε χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης υπάρχει 33% μεγαλύτερος κίνδυνος για χρόνια νοσήματα. Στα χρόνια νοσήματα το 77% των ασθενών έχουν ανεπάρκεια γλουταθειόνης. Η κατανάλωση λίπους αυξάνει τις ανάγκες του οργανισμού για γλουταθειόνη. Η αύξηση της γλουταθειόνης με χορήγηση πρόδρομων ουσιών για τη βιοσύνθεση της ή η ενδοφλέβια χορήγηση γλουταθειόνης είναι στρατηγικές που αναπτύχθηκαν για την

αντιμετώπιση καταστάσεων όπως ανεπάρκεια του τριπεπτιδίου, υψηλό οξειδωτικό στρες και ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συμπληρωματικά, η γλουταθειόνη είναι δυνατόν να επιτελεί και τις παρακάτω λειτουργίες:

- ✚ Μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου που είναι κρίσιμος για τη ζωή.
- ✚ Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων. Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό, το γαστρεντερικό και οι πνεύμονες.
- ✚ Παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου.
- ✚ Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου.
- ✚ Βοηθά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών.
- ✚ Συμμετέχει στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό.
- ✚ Απομακρύνει υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες.
- ✚ Βοηθά στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

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 γι' αυτό το λόγο και λαμβάνονται μέσω της δίαιτας. Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες κάθε βιταμίνης ποικίλουν όπως ποικίλει και η απαιτούμενη διαιτητική πρόσληψη για κάθεμία. (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. Είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο, ο οποίος δε μπορεί να τη βιοσυνθέσει, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη απουσιάζει. Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα συμπαράγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αυτές αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτινίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι άκρως απαραίτητες στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα επινεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών (Suvana Kimnite Wattanapitayakul, 2001).

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.

Στο κυτόπλασμα το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη παρουσιάζουν συνεργό δράση για να προστατέψουν το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες. Εκτός του κυττάρου, το ασκορβικό οξύ πιθανώς να δρα σε σύζευξη με τη βιταμίνη E, η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να τις προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξειδωση, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη E προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξειδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (Παπαγεωργίου 2005).

Το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει τόσο το Fe^{3+} σε Fe^{2+} όσο και το Cu^{2+} . Έτσι, μίγμα σιδήρου ή χαλκού με ασκορβικό οξύ παράγει in vitro την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια. Η συγκεκριμένη προ-οξειδωτική δράση, που εμφανίζει το ασκορβικό οξύ in vitro έχει μεγάλη σημασία επειδή σχετίζεται με την περιεκτικότητα του ασκορβικού στα τρόφιμα. Σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις θα παρουσιάζει τοξική δράση. Η περίσσεια της βιταμίνης C αποβάλλεται μέσω των ούρων (Suvana Kimnite Wattanapitayakul, 2001).

3) Β-καροτίνη

Η β-καροτίνη είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ακόμα, ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση 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 συμπαραγόντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Υπάρχουν πολλά τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, τα κυριότερα εκ των οποίων παραθέτονται παρακάτω:

- ✚ Βιταμίνη Α: αυγό, βούτυρο, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ιχθυέλαια.
- ✚ Βιταμίνη C: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, νεράντζια), φραγκοστάφυλα, φράουλες, ακτινίδια, κεράσια, μούρα, πεπόνι, ντομάτα, λάχανο, πράσινη πιπεριά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, σπανάκι), σταυρανθή (μπρόκολο, κουνουπίδι, λαχανάκια Βρυξελλών) (Χασαπίδου 1996).
- ✚ Β-καροτένιο: φρούτα, κυρίως εσπεριδοειδή, λαχανικά πράσινου, κίτρινου και πορτοκαλί χρώματος, ντομάτες, και επίσης (σε μικρότερες ποσότητες) βερίκοκα, γλυκοπατάτες, καρπούζι, κολοκύθα.
- ✚ Βιταμίνη Ε: φυτικά έλαια (ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο) και κυρίως ελαιόλαδο, δημητριακά ανεπεξέργαστα, σόγια, αμύγδαλα, καρύδια, φουντούκια, λαχανικά σκούρα πράσινα, λαχανικά φυλλώδη, φύτρα σιταριού, αυγά.
- ✚ Σελήνιο: κρέας, συκώτι, θαλασσινά, αβοκάντο, ελιές, ξηροί καρποί, δημητριακά, σπόροι, φρούτα και λαχανικά που φυτρώνουν στο έδαφος.
- ✚ Φλαβονοειδή: αρακάς, βατόμουρα, εσπεριδοειδή, κόκκινο κρασί, κουμκουάτ, κρεμμύδια, μέλι, μήλα, μπρόκολο, πικρή σοκολάτα, σόγια, σταφύλια, τσάι πράσινο και μαύρο, φασολάκια πράσινα και επίσης στους ανθούς λαχανικών και λουλουδιών και στα φύκια.
- ✚ Ψευδάργυρος: δημητριακά, συκώτι, όσπρια, θαλασσινά, σπόροι σιταριού, μαγιά μπύρας, αυγά.

- ✚ Ανθοκυανίνες: γογγύλια, κάρδαμο, κεράσια, κουνουπίδι, κραμβολάχανο, λάχανο κατσαρό, μούρα, μπρόκολο, μύρτιλλα, σπαράγγια, σταφύλια, φράουλες.
- ✚ Ελλαγικό οξύ: βατόμουρα, κεράσια, σταφύλια, φράουλες.
- ✚ Λυκοπένιο: ντομάτες (φρέσκες, λιαστές και επεξεργασμένα προϊόντα ντομάτας) και σε μικρότερο βαθμό γκρέιπφρουτ, καρπούζι και πιπεριές.
- ✚ Φαινόλες: ελαιόλαδο, ελιές, εσπεριδοειδή, κακάο, κρασί, λιναρόσπορος, μπρόκολο, σκόρδο, σοκολάτα πικρή, τσάι πράσινο.
- ✚ Συνένζυμο Q10: σαρδέλα, σκουμπρί, σόγια.
- ✚ Πυκνογενόλη: φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί, κακάο, τσάι, και κρασί.

Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

- ✚ Είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ,
- ✚ είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

- ✚ Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
- ✚ Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

1.1.6 Οξειδωτικό στρες και διαταραχές της υγείας

Οι διαδικασίες ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό stress έχουν σαν αποτέλεσμα την κυτταρική εκφύλιση και εμπλέκονται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται, τουλάχιστον μερικώς, υπεύθυνες (Halliwell et al., 1992). Ακολουθώς, δίδονται μερικά παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων με την περιγραφή του ρόλου των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση και εκδήλωση της νόσου. Η γνώση σε μοριακό επίπεδο της βιοχημικής «απόκλισης» ή βλάβης σε νόσο μπορεί να βοηθήσει αποφασιστικά στο σχεδιασμό φαρμακομοριών για την θεραπευτική αντιμετώπιση της συγκεκριμένης παθολογικής κατάστασης.

1.1.6.1 Φλεγμονή

Η φλεγμονή συνδέεται με φαινόμενα ελευθέρων ριζών με περισσότερους του ενός τρόπου, μέσω i) της σύνθεσης μεσολαβητών φλεγμονής όπως των προσταγλαδινών, του θρομβοξανίου και των λευκοτριενίων. Στις βιοσυνθετικές αυτές διαδικασίες εμπλέκεται ο σχηματισμός υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών. Ταυτόχρονα, ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα στις διαδικασίες αυτές, η συνθετάση των προσταγλαδινών, όχι μόνο μπορεί να ενεργοποιήσει το οξυγόνο απευθείας, δίδοντας δραστικές μορφές αυτού, αλλά μπορεί να

συμμετέχει σε βιομετατροπές ξενοβιοτικών, παρέχοντας ενδιάμεσους δραστικούς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν το οξύγονο. ii) Κατά την κυτταρική φάση της φλεγμονής - φαγοκυττάρωση, κύτταρα όπως πολυμορφοπύρηνα και μακροφάγα ανάγουν οξύγονο σε ενεργές μορφές αυτού προκαλώντας τη λεγόμενη "αναπνευστική έκρηξη". Αυτές οι δραστικές μορφές οξύγονου καταστρέφουν το παθογόνο αίτιο (μικρόβιο και όχι μόνο) που φαγοκυττάρωνεται από τα συγκεκριμένα λευκοκύτταρα. Είναι όμως δυνατό να προξενηθεί και εξωκυτταρική βλάβη στους γύρω ιστούς. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συμβάλλει σε βλάβη ιστών και κακοήθεις ανωμαλίες, που ακολουθούν τις φλεγμονώδεις και άλλες αυτοάνοσες νόσους.

1.1.6.2 Επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη

Είναι γνωστό ότι άτομα που υποφέρουν για πολλά χρόνια από σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν συχνά, ορισμένες συγκεκριμένες επιπλοκές, όπως μικροαγγειοπάθεια, αθηρωμάτωση και καρδιαγγειακά προβλήματα, αμφιβληστροειδίτιδα (ρετινοπάθεια) καταρράκτη, νευροπάθειες και νεφρική βλάβη. Δηλαδή η βλάβη εμφανίζεται σε ιστούς στους οποίους δεν απαιτείται ινσουλίνη για τη μεταφορά της γλυκόζης.

Κατά τον σακχαρώδη διαβήτη, οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν κορεσμό στο ένζυμο εξοκινάση, το κυρίως υπεύθυνο ένζυμο για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Έτσι, η γλυκόζη εισρέει στο κύτταρο όπου αυξάνονται οι συγκεντρώσεις της με αποτέλεσμα: α) να «επιλαμβάνεται» του μεταβολισμού της γλυκόζης το ενζυμικό σύστημα των πολυολών, η αναγωγή της αλδόζης και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης. Το πρώτο ένζυμο ανάγει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη, το δεύτερο, πολύ βραδύτερα από το πρώτο, ενώ με αφυδρογόνωση οξειδώνεται η σορβιτόλη σε φρουκτόζη, β) το ενζυμικό αυτό σύστημα επάγεται, έτσι ο οργανισμός αρχίζει, μέσω της αυξημένης έκφρασης των αντίστοιχων mRNAs, να παράγει τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε ακόμη μεγαλύτερες ποσότητες. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι να συγκεντρώνονται ενδοκυτταρικά μεγάλα ποσά σορβιτόλης, τα οποία και λόγω της πολικότητάς τους δεν μπορούν να διαχυθούν έξω από το κύτταρο με συνέπεια την εισροή ύδατος (για λόγους οσμωτικούς) και σημαντική κυτταρική βλάβη. Για να έχει συνέχεια η (αναγωγική) δράση της αναγωγάσης της αλδόζης το ένζυμο είναι συζευγμένο με NADPH. Έτσι, καθώς η γλυκόζη ανάγεται από την αναγωγή της αλδόζης σε σορβιτόλη, καταναλίσκεται NADPH και σωρεύεται NADP⁺ ενδοκυτταρικά. Η μείωση του NADPH και η συσώρευση NADP⁺ οδηγούν σε οξειδωτικό stress. Το τελευταίο, έχει δειχθεί, (μετρήθηκαν αυξημένα ποσά λιπο-υπεροξειδίων, μηλονικής διαλδεύδης, περιορισμό της GSH, ελάττωση των συγκεντρώσεων Cu, Zn και Mn-SOD καθώς και βιταμίνης E), και σε διαβητικούς ασθενείς και σε πειραματόζωα που τους προκλήθηκε πειραματική υπεργλυκαιμία. Πολλοί ακόμη παράγοντες που έχουν σχέση με το οξειδωτικό stress παρεμβαίνουν άμεσα ή έμμεσα στην κυτταρική βλάβη που ακολουθεί: i) Προβλήματα στην ομοιόσταση του Ca⁺⁺ (από την απομάκρυνση της μυοϊνοσιτόλης λόγω της υπερώσμωσης). ii) Διαταραχή της φυσιολογικής σύνθεσης του NO που ρυθμίζει το μυϊκό τόνο των τοιχωμάτων των αγγείων. Για τη βιοσύνθεση του NO από αργινίνη απαιτείται απαραίτητα NADPH, το οποίο όμως λόγω του οξειδωτικού stress έχει εξαντληθεί. Λόγω του stress αυτού, το NO εύκολα οξειδώνεται από το O₂⁻, σε ONOO (υπεροξυνιτρίλιο) το οποίο επίσης είναι πάρα πολύ τοξικό. Σε όξινο περιβάλλον δίνει το ασταθές υπεροξυνιτρώδες οξύ που διασπάται σε NO₂ και HO[·]. iii) Σε διαβητικούς ασθενείς

και σε πειραματόζωα έχουν βρεθεί αυξημένα ποσά μεθυλογλυοξάλης και μηλονικής διαλδεΐδης. Οι καρβονυλικές αυτές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν με πλευρικές ή τελικές αμινο-ομάδες πεπτιδίων με ποικίλους τρόπους γεφυρώνοντας τις πεπτιδικές αλυσίδες ενδο- ή διαμοριακά.

Η παραγωγοποίηση αυτή των πεπτιδίων - πρωτεϊνών προκαλεί σοβαρές λειτουργικές βλάβες στα κύτταρα. iv) Σχηματισμός προϊόντων γλυκόζης και γλυκοξειδωσης. Τα κατά τον τρόπο αυτό σχηματισθέντα προϊόντα σύνδεσης γλυκόζης και πρωτεϊνών οδηγούν σε περαιτέρω κυτταρική βλάβη.

Στην προσπάθεια θεραπευτικής παρέμβασης θα ήταν, ως εκ τούτου, πολύ θετικό από φαρμακολογική άποψη για το μόριο ενός αναστολέα της αναγωγής της αλδόξης διατηρώντας τη φαρμακοφόρο δομή του να αποκτήσει με μοριακή τροποποίηση επιπλέον αντιοξειδωτικές ή σαρωτικές για τις ελεύθερες ρίζες ιδιότητες.

1.1.6.3 Καρδιαγγειακό, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αγγειοπάθειες

Από τους σημαντικότερους παράγοντες και παθογενετικά αίτια των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι οι οξειδωτικές με ελεύθερες ρίζες διαδικασίες και το οξειδωτικό stress. Μόρια της LDL (Low Density Lipoprotein: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) μέσω της μεμβράνης του εσωτερικού τοιχώματος των αγγείων διεισδύουν στη στοιβάδα του ενδοθηλίου, όπου οξειδώνονται από δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται από το ενδοθήλιο κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών. Οι οξειδωμένες oxLDL δεν αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς της φυσιολογικής LDL αλλά από άλλους υποδοχείς, τους λεγόμενους «σαμποτέρ» (Saboteur). Η αλληλεπίδραση της oxLDL με τους υποδοχείς αυτούς έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων και παραγόντων φλεγμονής, κυρίως κυτοκινών. Αυτό μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών οδηγεί σε αύξηση των λιπιδίων, εξωκυτταρικά αυξημένη συγκόλληση αιμοπεταλίων και άλλων ευμόρφων συστατικών του αίματος, σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου, ασβέστωση και σκλήρυνση της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον η οξειδωμένη LDL, μειώνει τα διαθέσιμα ποσά NO[•] (διατομική ρίζα, υπεύθυνη για την αγγειοδιαστολή) μετατρέποντας αυτό το μόριο στα πολύ τοξικά υπεροξυνιτρόδη (NO[•]+O₂^{•-} → ONOO). Τέλος, η oxLDL προκαλεί διέγερση παραγωγής ενδοθηλίνης-1 η οποία δρα αγγειοσυσταλτικά.

Το stress και η υπέρταση συνδέονται με αυξημένες συγκεντρώσεις κατεχολαμινών (κυρίως αδρεναλίνη) στο αίμα. Οξειδωση των κατεχολαμινών συνδέεται με παράγωγα δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτές, εκτός της λιπιδικής υπεροξειδωσης που προκαλούν, ελαττώνουν τα NO όπως προαναφέρθηκε και επάγουν την παραγωγή ενδοθηλίνης με αποτέλεσμα συστολή των αγγείων. Επιπλέον όμως, στην υπέρταση παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της προσταγλανδίνης H₂ (PGH₂) η οποία επίσης προκαλεί αγγειοσύσπαση και βοηθά στη συγκόλληση αιμοπεταλίων.

Τα τελευταία χρόνια, ο περιορισμός της αθηρωμάτωσης-αρτηριοσκλήρυνσης και της υπερχοληστερολαιμίας με την θεραπευτική εφαρμογή αντιοξειδωτικής προσέγγισης συνεχώς κατακτά έδαφος. Έτσι έχουν συντεθεί ενώσεις με αντιχοληστεριναϊκή και αντιοξειδωτική δράση [π.χ. η χρήση του φαρμάκου προβουκόλη (Probuco)]. Επίσης συνιστάται διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες (E, C, A). Τέτοια διατροφή φαίνεται ότι εμποδίζει ή τουλάχιστον σημαντικά επιβραδύνει την εμφάνιση στεφανιαίας

νόσου. Σημειώνεται τέλος η ευεργετική δράση της HDL (High Density Lipoprotein:υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη). Η λιποπρωτεΐνη αυτή έχει αντι-αθηρωματική ικανότητα επειδή μεταφέρει τη χοληστερόλη από τα αγγεία στο ήπαρ. Έχει βρεθεί επιπλέον ότι η HDL έχει και αντιοξειδωτική ικανότητα (Garner et al., 1998).

1.1.6.4 Νευρωνική εκφύλιση

Τα κύτταρα του εγκεφάλου, κυρίως οι νευρώνες που είναι τα πιο εξειδικευμένα κύτταρα του, είναι πολύ ευαίσθητα στην τοξικότητα του οξυγόνου και μπορεί, κάτω από ορισμένες συνθήκες, εύκολα να δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες σ' αυτά γιατί: i) Ο εγκέφαλος είναι πολύ πλούσιος σε φωσφολιπίδια και ειδικά με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ii) είναι έντονα οξυγονούμενο όργανο, και iii) χαρακτηρίζεται από σημαντική παρουσία $Fe^{++(+)}$, που γίνεται πολύ μεγαλύτερη σε περιπτώσεις τραυματισμών ή κακώσεων της κεφαλής και επακόλουθων αιμορραγιών. Και τα τρία παραπάνω χαρακτηριστικά συντελούν στη διαδικασία δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου, λιπιδικής υπεροξειδωσης και οξειδωτικού stress. Σήμερα είναι βέβαιο ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου Parkinson (Olanow et al., 1996) και Alzheimer (Butterfield, 1997).

Συμπέρασμα

Φαίνεται λοιπόν ότι ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό είναι βασικός υπεύθυνος, ή τουλάχιστον συμμετέχει, στην παθοφυσιολογία κάποιων σοβαρότατων ασθενειών, ενώ φαίνεται ότι είναι η κύρια αιτία γήρανσης των κυττάρων. Τα αντιοξειδωτικά είναι αυτά που μέσα στον οργανισμό ανταγωνίζονται τη δράση των ελευθέρων ριζών και στην ουσία προστατεύουν τα κύτταρα. Για κάποια συνθετικά αντιοξειδωτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα, κυρίως για την προστασία των τροφίμων από την υπεροξειδωση των λιπών (π.χ. BHA, BHT) σταδιακά περιορίζεται η χρήση τους σήμερα, γιατί για μερικά από αυτά, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι θα μπορούσαν να δράσουν και ως καρκινογόνα. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί στην αναζήτηση ασφαλών αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης.

1.2 Πολυφαινόλες

1.2.1 Ετυμολογία

Το όνομα τους προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «πολύς» και από τη λέξη φαινόλη η οποία αναφέρεται στη χημική δομή που σχηματίζεται με την προσάρτηση σε έναν αρωματικό βενζοειδή δακτύλιο μιας υδροξυλικής ομάδας (-OH) παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε στις αλκοόλες.

1.2.2 Ιστορικό

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για να ερευνησει κάποιος τις φυτικές πολυφαινόλες. Από τους βασικούς τύπους δομών τους μέχρι και τη συνεργασία τους για την περαιτέρω χημική τους μετατροπή και τη δημιουργία oligό-/πολυμερών συγκροτημάτων, οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα εντυπωσιακό ευρύ φάσμα βιο-/φυσικό-χημικών ιδιοτήτων που τις καθιστά μάλλον μοναδικό και ενδιαφέρον φυσικό προϊόν. Η πρώτη ερώτηση που έρχεται στο μυαλό είναι γιατί τα φυτά επιλέγουν να βασίζονται σε τόσο μεγάλο βαθμό στην παραγωγή μεταβολιτών με πολλαπλές

φαινολικές ομάδες. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης και πιθανότατα είναι διαφορετική ανάλογα με το είδος της πολυφαινόλης. Σε γενικές γραμμές, οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν εμπλακεί σε διάφορους λειτουργικούς ρόλους, συμπεριλαμβανομένης και της αντίστασης των φυτών έναντι παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων ζώων όπως είναι τα έντομα, την προστασία έναντι της ηλιακής ακτινοβολίας (έναντι της UV ακτινοβολίας που καταστρέφει το DNA), καθώς και την αναπαραγωγή, τη διατροφή και την ανάπτυξη, ιδίως μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους οργανισμούς πάνω και κάτω από το έδαφος (έντομα, μύκητες και συμβιωτικά βακτήρια) κατά τη διάρκεια της μακροπρόθεσμης εξέλιξης. Λόγω της υποχρεωτικής γρήγορης εποχικής προσαρμογής, τα φυτά έχουν μάθει να αντιμετωπίζουν τις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος και τις πιέσεις επικαλούμενα το μεγάλο χημικό τους «οπλοστάσιο» μέσω του εξαιρετικά δυναμικού δευτερογενή μεταβολισμού τους.

Φυσικά ανάμεσα στις κύριες ομάδες των δευτερογενών μεταβολιτών, άλλοι, όπως τα αλκαλοειδή και τα τερπενοειδή έχουν αποδείξει τη δυνατότητα τους στην προστασία των φυτών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους, συμβάλλοντας στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας μεταξύ των φυτών και άλλων ζωντανών οργανισμών, πολλοί εκ των οποίων τρέφονται από αυτούς, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Ωστόσο, οι φυτικές φαινόλες είναι ιδιαίτερα σημαντικές λόγω των λειτουργιών που προσφέρουν στα φυτά, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των εγγενών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Αναμφισβήτητο το πιο πολυσυζητημένο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών και γενικότερα των φαινολικών φυτών, είναι η αναγνωρισμένη ικανότητα τους να δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), όπως τις O_2^- , $HO\cdot$, $NO\cdot$, H_2O_2 , όπως επίσης και οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες RO και ROO. Οι φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικά με χηλίωση μεταλλικών ιόντων, όπως σιδήρου, χαλκού και σιδήρου και τα ιόντα που εμπλέκονται στην μετατροπή του O_2^- και H_2O_2 στο εξαιρετικά επιθετικό HO μέσω αντιδράσεων Haber-Weiss/Fenton. Μπορούν επίσης να εμποδίσουν τη δράση ορισμένων ενζύμων υπεύθυνων για την παραγωγή του O_2 όπως και την οξειδάση της ξανθίνης και της πρωτεϊνικής κινάσης (Prof. Stéphane Quideau et al., 2011).

1.2.3 Ορισμός

Οι πολυφαινόλες είναι χημικές ενώσεις που απαντώνται στην φύση και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα φρούτα, στα λαχανικά, στα δημητριακά και στα ποτά. Τα φρούτα όπως τα σταφύλια, τα μήλα, τα αχλάδια, τα κεράσια και τα μούρα περιέχουν μέχρι 200-300 mg πολυφαινολών ανά 100 γραμμάρια νεπού βάρους. Τα προϊόντα που κατασκευάζονται από αυτά τα φρούτα, περιέχουν επίσης πολυφαινόλες σε σημαντικές ποσότητες.

Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλλουν στην πικρή γεύση, στη στυφότητα, στο χρώμα, στη γεύση, στην οσμή και στην οξειδωτική σταθερότητα. Δεδομένου ότι οι φαινολικές ενώσεις στη διατροφή παρουσιάζουν ισχυρές ιδιότητες απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών ο κύριος ρόλος τους πιστεύεται ότι είναι η ικανότητα τους ως αντιοξειδωτικά που εμπλέκονται στην προστασία και την

υπεροξειδωση των λιπιδίων. Ωστόσο την τελευταία δεκαετία, ο τρόπος δράσης αυτών των ενώσεων έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο περίπλοκος από ότι αρχικά αναμενόταν. Στην πραγματικότητα οι πολυφαινόλες μπορούν να ασκούν και πολλές άλλες βιολογικές επιδράσεις. Μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου και την πρόσληψη της χοληστερόλης, ρυθμίζουν διαφορετικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της τελομεράσης, της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης, και να αλληλεπιδρούν με διάφορες οδούς της μεταγωγής σήματος. Επίσης οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν κασπασο-εξαρτώμενα μονοπάτια της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της ρύθμισης των αιμοπεταλίων και επίσης είναι σε θέση να αποτρέψουν ενδοθηλιακές δυσλειτουργίες (*Massimo D'Archivio et.al., 2010*).

1.2.4 Δομή και Τάξεις των Πολυφαινολών

Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Κυρίως απαντώνται σε συζευγμένες μορφές, με ένα ή περισσότερα υπολείμματα σακχάρων που συνδέονται με υδροξυλομάδες, αν και υπάρχουν επίσης άμεσες συζεύξεις του σακχάρου (πολυσακχαρίτη ή μονοσακχαρίτη) με έναν αρωματικό άνθρακα. Συσχέτιση με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και σύνδεση με άλλες φαινόλες είναι επίσης κοινή. Οι πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης που περιέχουν και βάσει των δομικών στοιχείων τα οποία συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι κύριες κατηγορίες πολυφαινολών περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνάνες.

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή:

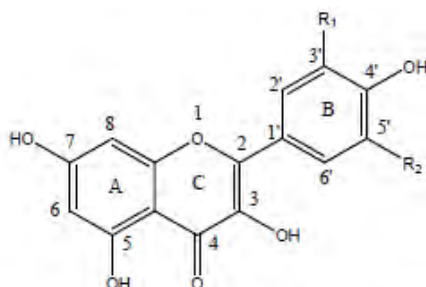
Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε σχεδόν όλα τα τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Ο ρόλος των ενώσεων αυτών, έχει χαρακτήρα προστατευτικό ενάντια των βλαβών που προκαλούνται στα κύτταρα από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να συμβάλλουν στη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, γεγονός που προέκυψε με αφορμή το γαλλικό παράδοξο (υψηλή

κατανάλωση κόκκινου κρασιού, κάπνισμα, μειωμένη φυσική δραστηριότητα, υψηλή κατανάλωση λιπαρών και παραδόξως ο πληθυσμός είχε μικρά ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακών).

Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cooke and Samman 1996).

Εν τούτοις, τα φλαβονοειδή δεν είναι αμιγώς αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με βάση την *in vivo* τοξικότητα ορισμένων φλαβονοειδών. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση, η δράση τους μπορεί να είναι ωφέλιμη, δεδομένου ότι μια ήπιου βαθμού αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (D. Procházková a 2011).



Γενική χημική δομή των φλαβονολών: Καμφερόλη, $R_1=H$, $R_2=H$; Κβεργκετίνη, $R_1=OH$, $R_2=H$; Μυρικετίνη, $R_1=OH$, $R_2=OH$

Εικόνα 9: Γενική δομή φλαβονολών.

✚ Φλαβανόλες

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερύκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη.

✚ Φλαβόνες

Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαιντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi and Naczki 1995).

✚ Φλαβονόλες

Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκετίνη, κατατάσσονται επίσης, η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊντζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) (Wendy L. Halli 2005).

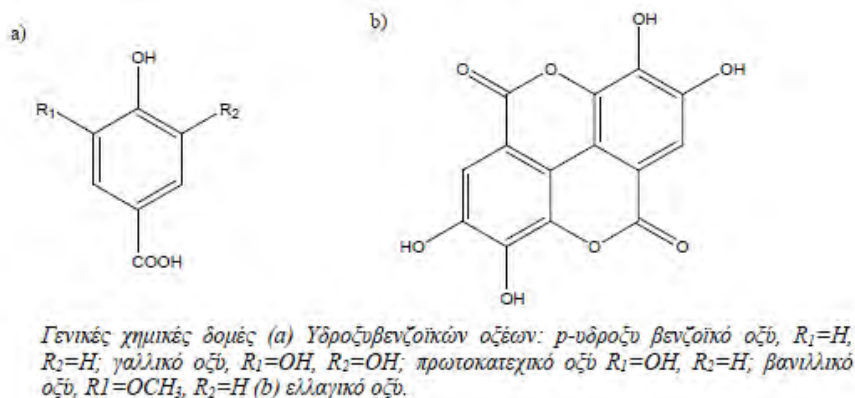
Ανθοκυανιδίνες

Στις ανθοκυανιδίνες οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα ολιγομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

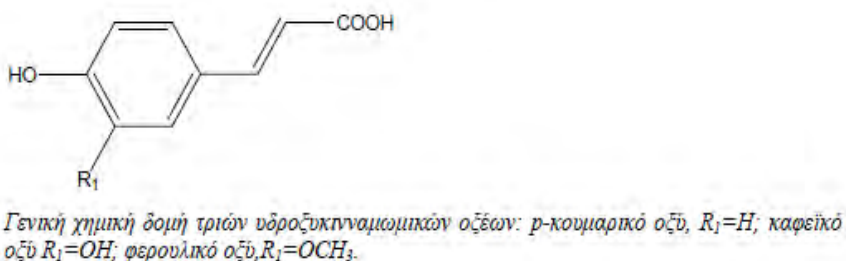
Φλαβονοειδή	Διατητικές Πηγές
Φλαβονόλες	Ρόδι, μήλα, βατόμουρα, ελιές, κρεμμύδια, πράσα, κρασί, τσάι.
Φλαβανόνες	Βερίκοκα, σταφύλια, κρασί, πράσινο τσάι, σοκολάτα.
Φλαβόνες	Ρόδι, σέλινο, μαϊντανός, δημητριακά, εσπεριδοειδή.
Ισοφλαβόνες	Ρόδι, όσπρια (σόγια).
Φλαβανόνες	Τομάτες, εσπεριδοειδή, αρωματικά φυτά (μέντα).
Ανθοκυανιδίνες	Ρόδι, κεράσια, φράουλες, σταφύλια, λαχανικά (λάχανο, μελιτζάνα).

Φαινολικά Οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού 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 υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερούλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκιναμικά 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 υδροξυκιναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερούλικό 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).



Εικόνα 10: Γενική δομή υδροξυβενζοϊκών οξέων.



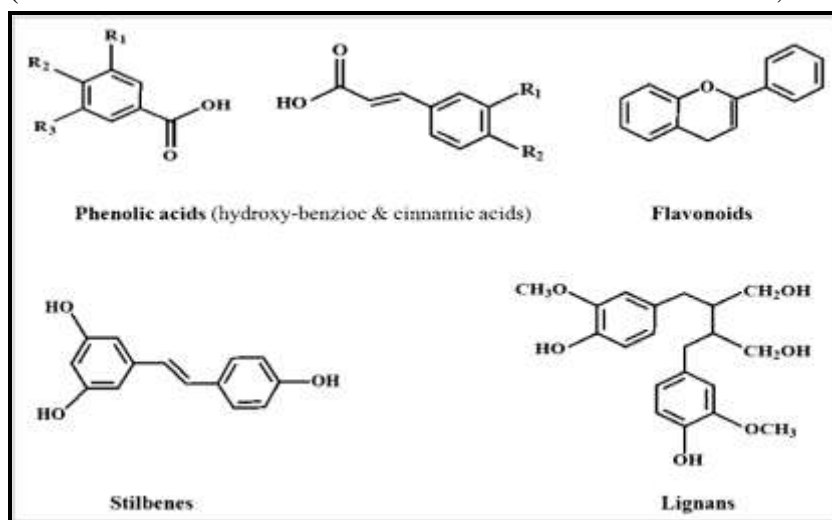
Εικόνα 11: Γενική δομή υδροξυκιναμικών οξέων.

Στιλβένια

Στην κατηγορία των στυλβενίων αντιπροσωπευτική χημική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη. Είναι λιγότερο διαδεδομένη στη διατροφή σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες. Βρίσκεται γενικά στο κρασί και ειδικά δε στο κόκκινο. Έρευνες έχουν δείξει την αντιοξειδωτική της δράση, κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Παπαγεωργίου 2005). Τα στυλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997).

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, το λινέλαιο και το λιναρόσπορο. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνάνων (Adlercreutz and Mazur 1997). Η διαφορετικότητα τους έγκειται στο υδροξυλικό τους πρότυπο και μπορεί να είναι γλυκοσυλιωμένες ή/και ακετυλιωμένες. Το μέγεθος τους ποικίλει από μικρά μόρια (όπως η φαινόλη), έως πολυμερή (όπως οι ταννίνες) μεγάλου μοριακού βάρους (Perez-Jimenez et al., 2010)



Εικόνα 12 : Χημικές δομές διαφορετικών πολυφαινολικών τάξεων.

1.2.5 Φυσικές Ιδιότητες.

Οι πολυφαινόλες είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους και βρίσκονται σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού από τις αλκοόλες ίδιου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

1.2.6 Χημειοπροστατευτική Δράση Πολυφαινόλων.

Από την αρχαιότητα ακόμη, σε πολιτισμούς όπως ο Ελληνικός, ο Αιγυπτιακός, ο Ρωμαϊκός, ο Κινέζικος και ο Ινδικός, ήταν γνωστές οι δράσεις κάποιων φυτών για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών (Klein et al., 2011; Chang et al.; 2012, Wells et al., 2008). Εκατοντάδες χρόνια μετά, πληθώρα ερευνών αποδεικνύει μέρα με τη μέρα πως βιοδραστικά συστατικά των τροφών μπορούν να επηρεάσουν όλες τις καρκινικές διαδικασίες σε όλα τα στάδια του καρκίνου (Kushi et al., 2011; Lee et al., 2005; Kloetzel et al. 2013; Bidinotto et al., 2012; Chang et al., 2012; Arcidiacono et al., 2012; Pauwels, 2010; La Vecchia, 2004; La Vecchia, 2009).

Η χημειοπροστασία ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Kushi et al., 2011; Kiani et al., 2005; Lee et al., 2005; Klein et al., 2011; Baliga et al., 2011; Brownell and Warner, 2009; Wang et al., 2012).

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά, τα οποία είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού, η γονιδιακή ρύθμιση, η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Karpi et al., 2012) και δρουν ως αντιοξειδωτικά, ενώ θεωρούνται φυτοιστρογόνα, γιατί έχουν παρόμοια δράση με τις ορμόνες. Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν πως μόνο ένα συστατικό της τροφής δε φτάνει για να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αλλά είναι ο συνδυασμός των συστατικών που βρίσκονται σε όλη την υγιεινή διατροφή που εμφανίζουν αυτή την ικανότητα (Banerjee et al., 2006, Baliga et al., 2011; Alexander and Cushing, 2009; Kumar et al., 2012; Cristensen et al., 2012; Kontou et al., 2012; Giacosa et al., 2012).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς όπως είναι η καταστολή αυξητικών ορμονών, η προστασία από την UV ακτινοβολία, η προσθήκη χρώματος, η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων και η συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber., B., et al., 2003), είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach et.al., 2004; Di Carlo et.al., 1999; Harborne 1986).. Επιπλέον, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (John Hart., H., et al., 1974).

1.2.7 Επιδράσεις πολυφαινόλων στην υγεία.

Στην περίπτωση των καρδιαγγειακών διαταραχών, το οξειδωτικό στρες και οι ΔΜΟ εμπλέκονται σε ενδοθηλιακές βλάβες, σε δημιουργία αρτηριοσκλήρυνσης και

σε παρατεταμένη ζημιά η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και σε ισχαιμική επανέγχυση.

Πολύαριθμες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των φυσικών διατροφικών πολυφαινολών στη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας και έχει τονιστεί ο σημαντικός ρόλος που παίζουν αυτές οι ουσίες στον περιορισμό των επιπτώσεων της κυτταρικής γήρανσης. Πολυφαινόλες όπως η ρεσβερατρόλη, επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) και η κουρκουμίνη έχουν αναγνωριστεί και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην καρδιαγγειακή υγεία, ενώ ορισμένες έχουν επίσης δειχθεί ότι είναι προστατευτικές ενάντια στη γήρανση (Sandhya, K., et al., 2013).

Η προστατευτική δράση των πολυφαινολών αποδίδεται στην αντιοξειδωτική τους δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αναστολείς των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές 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 προσαυξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).

1.2.8 Αναστολή ενζύμων

Τα φλαβονοειδή έχει δειχθεί πειραματικά, τουλάχιστον *in vitro*, ότι επηρεάζουν σημαντικά ενζυμικά συστήματα των ανώτερων οργανισμών και η δράση τους ποικίλει ανάλογα με τη δομή τους. Συγκεκριμένα, με μελέτες δομής-δράσης των φλαβονοειδών αποδείχθηκε ότι κάποια από αυτά έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν σημαντικά ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Βρέθηκε ότι ο διπλός C2,3- δεσμός, η C4-κετο-ομάδα και το 3',4',5'-τρι-ϋδροξυ σύστημα του Β-δακτυλίου είναι χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που έχουν ισχυρή ικανότητα αναστολής της οξειδάσης του NADPH. Επίσης, κάποια φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, το οποίο καταλύει την οξείδωση της ξανθίνης και υποξανθίνης σε ουρικό οξύ. Κατά την επανα-οξείδωση της οξειδάσης της ξανθίνης παράγονται υπεροξειδικές ρίζες και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έχει βρεθεί ότι η κερκετίνη και διάφορα άλλα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικοί αναστολείς του ενζύμου. Επίσης φαίνεται ότι φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση και άλλων ενζύμων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, όπως της υαλουρονιδάσης (Kurpusamy et al., 1990), της πρωτεϊνικής κινάσης C (Ferriola et al., 1989), της λιποξυγενάσης, της κυκλο-οξυγενάσης (Yamamoto et al., 1984), της αναγωγάσης της αλδόζης (Varma et al., 1977) κ.α

1.2.9 Δράση κατά καρδιαγγειακών παθήσεων

Τα αντιοξειδωτικά φλαβονοειδή που βρίσκονται σε καρπούς, λαχανικά, τσάι, κρασί κ.α., έχει βρεθεί από πολλές μελέτες ότι *in vitro* παρεμποδίζουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Οι Frankel και συν., 1993α έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί παρεμποδίζει την επαγόμενη από χαλκό οξείδωση της LDL σε ποσοστό ανάλογο με την καθαρή κερκετίνη, και σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από

την α-τοκοφερόλη. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι, τα μη αλκοολικά συστατικά του κρασιού είναι υπεύθυνα για τη δράση αυτή. Στις περισσότερες χώρες, η υψηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπών σχετίζεται με την υψηλή θνησιμότητα του πληθυσμού από καρδιαγγειακές παθήσεις. Όμως, στην περίπτωση χωρών με υψηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών και ταυτόχρονα κόκκινου κρασιού παρατηρείται χαμηλή θνησιμότητα από αυτά τα αίτια, αυτό που ονομάζεται «Γαλλικό παράδοξο». Η παρατήρηση αυτού του φαινομένου αποδίδεται στο υψηλό ποσοστό φαινόλων του κόκκινου κρασιού, το οποίο περιέχει κατεχίνες, γαλλικό οξύ, επικατεχίνη, ρουτίνη, κερκετίνη, μυρικετίνη, καφεϊκό οξύ, κυανιδίνη, ρεσβερατρόλη και άλλες φαινόλες σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Frankel et al., 1993β). Πολλές από αυτές, όπως η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και η επικατεχίνη, αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί αναστολείς της οξείδωσης της LDL, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το ρίσκο για καρδιαγγειακές νόσους (Frankel et al., 1993β).

1.2.10 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν επίσης αξιόλογες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας τις οδούς της κυκλο-οξυγενάσης και 5-λιποξυγενάσης του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Πολλά φλαβονοειδή, όπως η σαντίνη (3,6,4'-τρι-μεθυλο καμφερόλη), η 6-υδροξυ-, 3,6-διμεθυλο καμφερόλη, η υπολαετίνη (8-υδροξυ-λουτεολίνη), κ.α. ανέστειλαν σε μεγάλο βαθμό και τα δύο ένζυμα (Williams et al., 1995, 1999). Επίσης, ανθοκυανίνες ελέγχθηκαν σχετικά με την αντιφλεγμονώδη ικανότητά τους, αφού υπήρχαν αναφορές ότι, η κατανάλωση κερασιών μειώνει τους πόνους που προκαλούνται σε ασθενείς με αρθρίτιδα. Βρέθηκε ότι, οι ανθοκυανίνες δεν είχαν καμία δράση, όμως η μη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή τους, η κυανιδίνη, ανέστειλε αποτελεσματικά τα ένζυμα συνθετάση 1 και 2 των προσταγλανδινών (PGHS: prostaglandin endoperoxide hydrogen synthase) (Wang et al., 1999). Αντιφλεγμονώδη δράση σε διάφορα πειραματικά συστήματα εμφάνισαν επίσης συγκεκριμένοι γλυκοζίτες της κερκετίνης (Recio et al., 1995), το άγλυκο (Shoskes, 1998) και η απιγενίνη (Koganov et al., 1999).

1.2.11 Αγγειακές δράσεις των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν πλειοτροπικές δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, επηρεάζοντας τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, της LDL και των λείων μυϊκών ινών. Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν ενεργά, όπως είναι γνωστό, στην αθηρογένεση. Έτσι, τα φλαβονοειδή παρεμποδίζουν την συγκόλληση και συσώρευση των αιμοπεταλίων φαίνεται να έχουν αντιθηρωματική δράση (Beretz & Cazenave, 1998). Ταυτόχρονα, κάποια από αυτά βελτιώνουν τον τόνο των αιμοφόρων αγγείων και προκαλούν αγγειοδιαστολή (Sanchez de Rojas et al., 1996).

1.2.12 Κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των φλαβονοειδών

Γενικά οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους πιστεύεται ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιογόνο δράση είναι οι ακόλουθοι:

- Επίδραση στη σύνθεση του DNA
- Επίδραση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA

- Επίδραση στη δέσμευση των μεταλλαξιγόνων στο DNA
- Αντιοξειδωτική-Χημειοπροστατευτική Δράση
- Παρεμπόδιση της νιτροσυλίωσης
- Αναστολή ή επαγωγή των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών

Υπάρχουν πολλές μελέτες που ασχολούνται με τις κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ιδιότητες συστατικών των φυτών, ιδιαίτερα των φυτών που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό στην παραδοσιακή ιατρική πρακτική. Αυτό οδήγησε στην απομόνωση συγκεκριμένων ουσιών που έχουν αξιολογηθεί δράση. Το γεγονός της ύπαρξης μεγάλης ετερογένειας στην παθοφυσιολογία και μοριακή βιολογία του καρκίνου οδήγησε στη χρησιμοποίηση διαφόρων κυτταρικών σειρών καρκινικών κυττάρων ως πρότυπων συστημάτων μελέτης αντικαρκινικής δράσης των ουσιών. Η ποικιλία που εμφανίζουν από άποψη ιστικής προέλευσης, επιτρέπει την καλύτερη αξιολόγηση σε πειραματικές μελέτες *in vitro*. Με αυτόν τον τρόπο δείχθηκε ότι κάποιες χαλκόνες έχουν μέτρια δράση κατά των P-388 λευχαιμικών κυττάρων (Wang et al., 1998). Επίσης, δώδεκα κυτταροτοξικά φλαβονοειδή: επτά φλαβάνες, τρεις φλαβόνες και δύο διφλαβάνες απομονώθηκαν από τις ρίζες του φυτού *Muntingia calabura* (Kaneda et al., 1991). Επιπρόσθετα, διάφορες φλαβόνες και φλαβονόλες βρέθηκε ότι διαθέτουν κυτταροτοξικές ιδιότητες αναστέλλοντας την κυτταρική ανάπτυξη αρκετών σειρών καρκινικών κυττάρων (Silva et al., 1995; Wall et al., 1994; Liu et al., 1990). Σ' αυτήν την κατεύθυνση αναφέρεται επίσης ότι η απιγενίνη εμποδίζει την αγγειογένεση στον ανθρώπινο καρκίνο των πνευμόνων, αφού βρέθηκε ότι αναστέλλει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (VEGF Vascular Endothelial Growth Factor) και του επαγόμενου από υποξία παράγοντα (HIF-1 Hypoxia- Inducible Factor) (Liu et al., 2005). Παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι πολυφαινόλες, και κυρίως η κερκετίνη, αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος μέσω επαγωγής της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Mouria et al., 2002). Τέλος, πολλές ουσίες φυσικής προέλευσης επάγουν την απόπτωση, ένα στοιχείο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού σήμερα η μελέτη των μηχανισμών απόπτωσης και συνακόλουθα της επαγωγής τους στα καρκινικά κύτταρα, αποτελεί έναν από τους πιο ελπιδοφόρους στόχους ανάπτυξης καινοτόμων και εξειδικευμένων φαρμάκων για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου (Gunji et al., 1991).

1.3 *Rosa sempervirens*



Το *Rosa sempervirens*, το αιθαλές τριαντάφυλλο, είναι ένα φυτό της οικογένειας Rosaceae. Είναι ένα ακανθώδες, αναρριχητικό φυτό το οποίο ζει πολλά χρόνια. Αναπτύσσεται κυρίως σε προστατευμένες κοιλάδες στη νότια Γαλλία, στην περιοχή όπου επικρατεί το κλίμα της Μεσογείου και χρησιμοποιήθηκε κατ'επανάληψη ως πατρική γενιά για τα υβρίδια που παρήχθησαν από τον Henri Antoine Jacques, του κηπουρού του βασιλιά Λουδοβίκου Φιλίππου Ι της Γαλλίας. Τα φύλλα του είναι γυαλιστερά ενώ ο καρπός του έχει χρώμα λαμπερό κόκκινο. Τα άνθη του είναι λευκά και εμφανίζονται την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι.

Η Rosales, η τάξη των δικοτυλίδων ανθοφόρων φυτών αποτελείται από 9 οικογένειες, 261 γένη και περισσότερα από 7.700 είδη. Η τάξη Rosales μοιάζει πολύ με μέλη άλλων τάξεων τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν αζωτοδέσμευση όπως για παράδειγμα τα όσπρια της τάξης Fabales. Η Rosales είναι μία ποικιλόμορφη τάξη που περιλαμβάνει οικογένειες οι οποίες προηγουμένως άνηκαν στις τάξεις των Urticales και Rhamnales. Οι οικογένειες στην τάξη αυτή ποικίλλουν όσον αφορά το μέγεθός τους με το 93% των ειδών να περιλαμβάνεται στις 4 μεγαλύτερες οικογένειες: Rosaceae, Urticaceae, Moraceae και Rhamnaceae. Η τάξη αυτή περιλαμβάνει κάποια από τα πιο διάσημα διακοσμητικά φυτά και βρώσιμα φρούτα όπως είναι τα μήλα, τα ροδάκινα, τα βατόμουρα, τα σύκα και τα τριαντάφυλλα.

Η οικογένεια Rosaceae είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια ανθοφόρων φυτών που περιλαμβάνει περίπου 2.950 γνωστά είδη σε 91 γένη. Το όνομα της προέρχεται από το γένος *Rosa* και περιλαμβάνει βότανα, θάμνους και δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, αλλά μερικά είναι και αιθαλή. Μεγαλώνουν κυρίως στο Βόρειο Ημισφαίριο σε περιοχές που υπάρχουν βροχές και έρημοι. Αρκετοί καρποί προέρχονται από την οικογένεια Rosaceae, συμπεριλαμβανομένων πολλών βρώσιμων φρούτων όπως είναι τα μήλα, τα αχλάδια, τα δαμάσκηνα, τα βερίκοκα, τα ροδάκινα, τα βατόμουρα, τα μούσμουλα, οι φράουλες και τα αμύγδαλα, καθώς και καλλωπιστικά δέντρα και θάμνοι. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν τόσο φύλλα όσο και μικρές φυλλοειδείς δομές που ονομάζονται παραφύλλα και είναι συνήθως παρόντες στη βάση των μίσχων των φύλλων. Τα ερμαφρόδιτα άνθη ποικίλλουν όσον αφορά το μέγεθός τους ενώ μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικά χρώματα, όπως είναι το κίτρινο, το ροζ, το πορτοκαλί, το μωβ και το κόκκινο. Τα λουλούδια μπορεί να έχουν σχήμα κούπας ωστόσο αυτό που τα χαρακτηρίζει ιδιαίτερα είναι η ακτινική τους συμμετρία καθώς και το γεγονός ότι βρίσκονται σε πολλαπλάσια του πέντε ή του τέσσερα. Τα πέταλα και τα σέπαλα είναι συνήθως μη συνδεδεμένα μεταξύ τους και πολλά είδη φέρουν το χαρακτηριστικό hypanthium, από

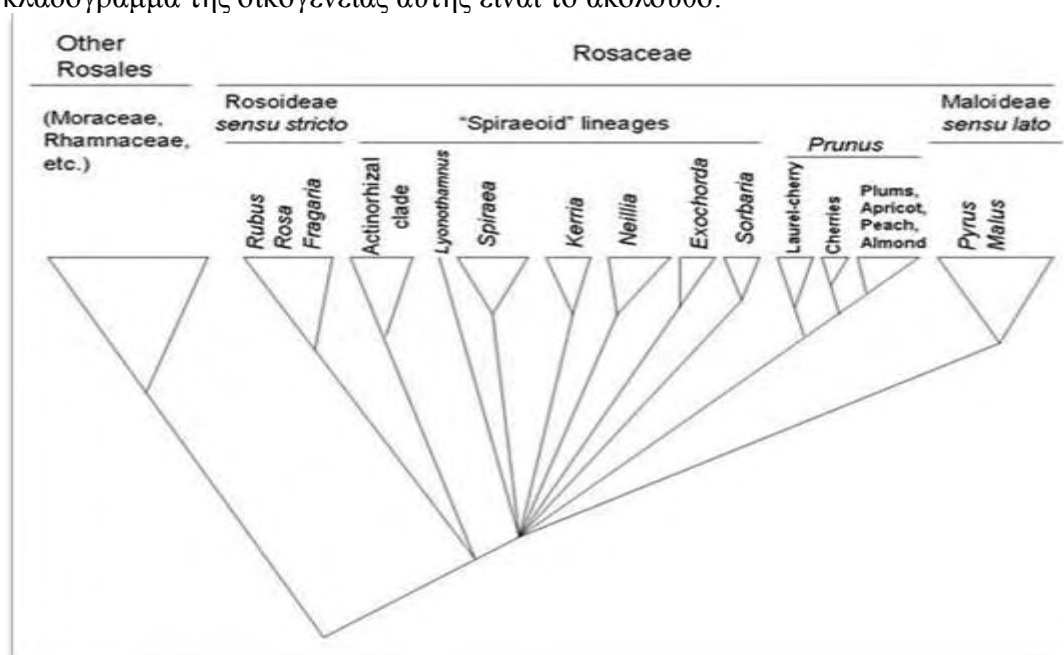
το χείλος του οποίου προκύπτουν τα σέπαλα, τα πέταλα και οι στήμονες. Το *hypanthium* είναι συνήθως συνδεδεμένο με τον ιστό που παράγει το νέκταρ των λουλουδιών. Αρκετά είδη γονιμοποιούνται μέσω των εντόμων και παράγουν ποικιλία φρούτων.

Η οικογένεια των *Rosaceae* ανήκει στην κλάση *Equisetopsida*, στην υποκλάση *Magnoliidae*, στην υπερτάξη *Rosanae* (δικότυλα, αγγειόσπερμα) και στην τάξη *Rosales*. Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από το γένος *Rosa*. Μεταξύ των πιο πλούσιων σε είδη γένων των *Rosaceae* είναι το *Alchemilla* (270 είδη), το *Sorbus* (260 είδη), το *Crataegus* (260 είδη), το *Cotoneaster* (260 είδη), και το *Rubus* (250 είδη), αλλά το μεγαλύτερο γένος από όλα είναι το *Prunus* (περιλαμβάνει τις δαμασκηνιές, κερασιές, ροδακινιές, βερικοκιές και αμυγδαλιές) με περίπου 430 είδη .

Στο γένος *Prunus* εντάσσονται 80 είδη του Β. ημισφαιρίου, 10 της Ευρώπης και 5 είδη υπάρχουν στη χώρα μας: *S. aucuparia*, *S. domestica*, *S. torminalis*, *S. graeca*, & *S. Umbellata*.

Ωστόσο, οι αριθμοί αυτοί είναι υποκειμενικοί και η ταξινόμηση της συγκεκριμένης οικογένειας χρειάζεται ακόμα πολλή δουλειά (Potter, D et al. 2007).

Η οικογένεια *Rosaceae* διαιρείται σε 6 υποοικογένειες, τις *Rosoideae*, *Spiraeoideae*, *Maloideae* (*Pomoideae*), *Amygdaloideae* (*Prunoideae*), *Neuradoideae*, και *Chrysobalanoideae*. Από το 1971 η υποοικογένεια *Chrysobalanoideae* θεωρείται σαν οικογένεια. Ο Schulze-Menz το 1964 αναγνώρισε τις οικογένειες *Rosoideae*, *Dryadoideae*, *Lyonothamnoideae*, *Spireoideae*, *Amygdaloideae* και *Maloideae*, οι οποίες χωρίστηκαν έτσι με βάση την δομή των καρπών. Πιο πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι όλες αυτές οι οικογένειες είναι μονοφυλετικές. Ο Hutchinson (1964) και ο Kalkmann (2004) μίλησαν μόνο για φυλές και όχι για οικογένειες. Ο Takhtajan (1997) οριοθέτησε 10 υποοικογένειες, τις *Filipenduloideae*, *Rosoideae*, *Ruboideae*, *Potentilloideae*, *Coleogynoideae*, *Kerroideae*, *Amygdaloideae* (*Prunoideae*), *Spireoideae*, *Maloideae* (*Pyroideae*), *Dichotomanthoideae* και 21 φυλές. Ένα κλαδόγραμμα της οικογένειας αυτής είναι το ακόλουθο:



Εικόνα 13 : Κλαδόγραμμα του γένους *Rosaceae* σύμφωνα με την παραδοσιακή ταξινόμηση.

Ωστόσο, καθώς τα όρια της οικογένειας Rosaceae δεν είναι ακριβώς καθορισμένα, δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα πόσα γένη περιλαμβάνει. Το πρόβλημα της μίξης είναι κοινό σε πολλά γένη και οδηγεί σε έναν αβέβαιο αριθμό ειδών που περιλαμβάνονται σε κάθε γένος.

Χαρακτηριστικά

Τα μέλη αυτής της οικογένειας μπορεί να είναι, όπως προαναφέρθηκε, δέντρα, θάμνοι ή ποώδη φυτά. Είναι κυρίως αιωνόβια αλλά υπάρχουν και κάποια που ζουν μόνο για ένα χρόνο.

Τα φύλλα

Τα φύλλα είναι συνήθως τοποθετημένα σπειροειδώς αλλά υπάρχει μια ανάποδη διάταξη σε μερικά είδη. Μπορεί να είναι απλής μορφής ή και σύνθετης μορφής, η οποία υπάρχει σε περίπου 30 γένη. Στο περιθώριο τους, τα φύλλα έχουν πριονωτή μορφή. Σε ορισμένα γένη υπάρχουν και αγκάθια, είτε στα φύλλα είτε στη ράχη.

Τα λουλούδια

Τα λουλούδια στην οικογένεια των τριαντάφυλλων γενικά περιγράφονται ως «φανταχτερά». Είναι ακτινομορφικά, δηλαδή, έχουν ακτινωτή συμμετρία και σχεδόν πάντα ερμαφρόδιτα. Τα μέλη της οικογένειας Rosaceae έχουν γενικά πέντε σέπαλα, πέντε πέταλα, και πολλούς σπειροειδώς τοποθετημένους στήμονες. Οι βάσεις των σεπάλων, πετάλων και στήμονων συντήκονται μαζί για να σχηματίσουν μια χαρακτηριστική κυπελλοειδή δομή που ονομάζεται hypanthium. Μπορούν επίσης να οργανωθούν σε τσαμπιά, ενώ σπάνια συναντάμε μοναχικά λουλούδια.

Οι καρποί και οι σπόροι

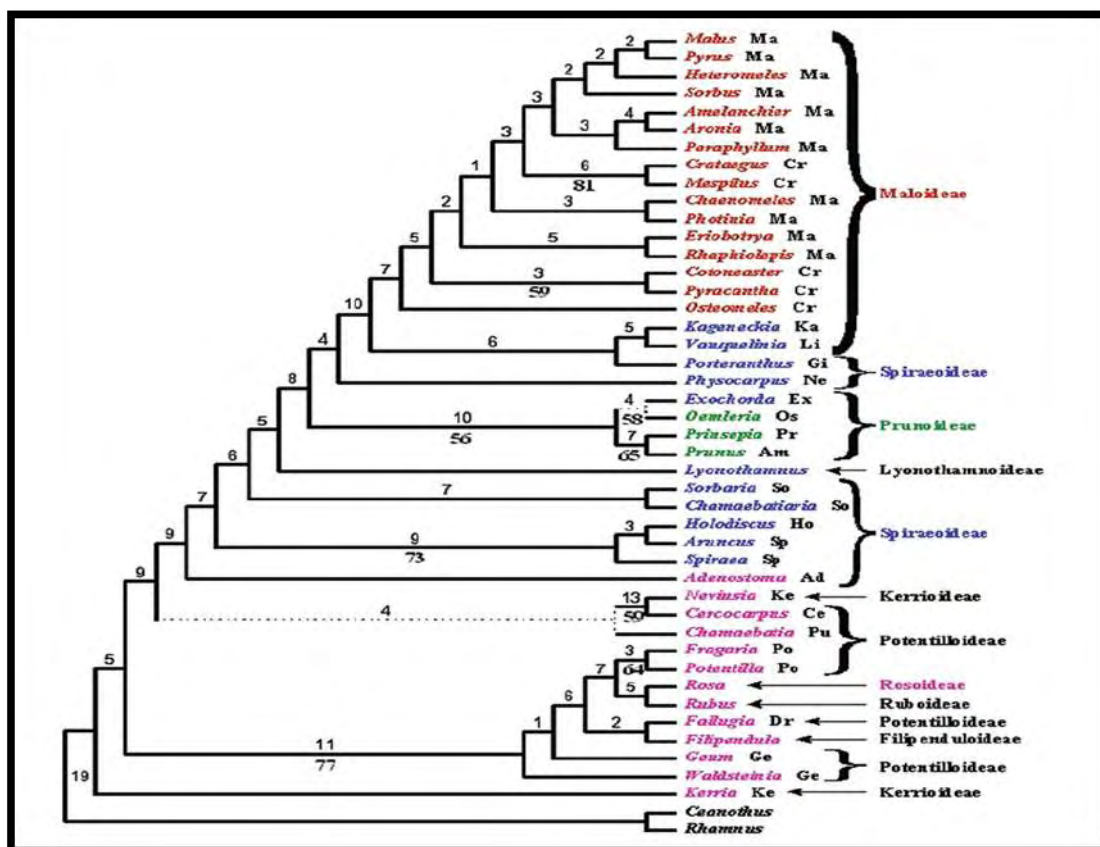
Οι καρποί απαντώνται σε πολλές ποικιλίες και κάποτε θεωρούνταν τα κύρια χαρακτηριστικά για την διαφοροποίηση των υποοικογενειών μεταξύ της οικογένειας Rosaceae, αποτελώντας αιτία για μια τεχνητή υποδιαίρεση. Μπορεί να είναι ξηρούς καρπούς, καρποί (Prunus), και φρούτα, όπως το μηλοειδές του μήλου, ή ο μίσχος ενός τριαντάφυλλου. Πολλά φρούτα της οικογένειας είναι βρώσιμα, αλλά οι σπόροι τους συχνά περιέχουν αμυγδαλίνη, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε κυανιούχο κατά την πέψη.

Τα γένη

1^η υποοικογένεια: Rosoideae. Συνήθως αποτελείται από γένη που έχουν φρούτα και συχνά το σαρκώδες μέρος του καρπού είναι εκείνο που φέρει τα καρπόφυλλα, όπως συμβαίνει στη φράουλα. Είναι μια ομάδα που περιέχει πέντε ή έξι φυλές και 20 ή περισσότερα γένη, συμπεριλαμβανομένων των τριαντάφυλλων, του Rubus (βατόμουρο), Fragaria (φράουλα), Potentilla και Geum.

2^η υποοικογένεια: Amygdaloideae. Αυτή η υποοικογένεια περιλαμβάνει τον κλάδο των μηλοειδών ο οποίος είναι γνωστός και ως Maloideae ή Pygoideae.

3^η υποοικογένεια: Dryadoideae: Σε αυτήν την οικογένεια τα φρούτα είναι τριχωτά και περιλαμβάνει 5 γένη. Αυτά είναι τα Dryas, Cercocarpus, Chamaebatia, Cowania και Purshia, τα περισσότερα από τα οποία σχηματίζουν ριζικά οξείδια τα οποία φιλοξενούν τα βακτήρια Frankia spp.



Εικόνα 14: Φυλλόγραμμα που παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτών της οικογένειας Rosaceae. Για την ταξινόμηση συνδύαστηκε η σύγκριση 125 χαρακτηριστικών (61 μη μοριακών και 64 μοριακών) (Dickinson et al. 2002). Τα χρώματα αναπαριστούν τις παραδοσιακές ταξινομημένες υποοικογένειες (κόκκινο=maloideae, μπλε=spiraeoideae, πράσινο=amygdaloideae, ρόζ=rosoideae). Τα Ceanothus και Rhamnus αποτελούν την εξω-ομάδα.

Αν και η μοριακή ανάλυση συμφωνεί με παραδοσιακή ταξινόμηση στο γεγονός ότι η οικογένεια Rosaceae είναι σθεναρά μονοφυλετική, υπήρξε διαμάχη σχετικά με τις υποοικογένειες και τα είδη που περιλαμβάνουν. Έγινε γενετική ανάλυση για να εξεταστούν φυλλογενετικά τόσο η οικογένεια όσο και κάθε υποοικογένεια ξεχωριστά και τα μεγαλύτερα γένη. Ο Dickinson et al. (2002) δημιούργησε ένα φυλλόγραμμα διαφορετικό από τα ήδη υπάρχοντα. Για το σχηματισμό του, χρησιμοποίησε κλαδική ανάλυση από 125 χαρακτηριστικά που σχετίζονται τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά για τα μέλη της Rosaceae και πρόσθεσε αρκετά γένη στις Maloideae. Το γένος Spiraeoideae το χώρισε με τα Amygdaloideae (Prunoideae) και τα Rosoideae τα υποδιαίρεσε σε επιμέρους φύλα. (Εικόνα 14). Αν και η ταξινόμηση που έγινε από τον Dickinson et al. για τα φυτά Rosaceae μπορεί να μην ισχύει από ταξινομική άποψη, αυτή η ομαδοποίηση εξακολουθεί να έχει μεγάλη χρησιμότητα από οικονομικής και γεωπονικής σκοπιάς. Η περαιτέρω μοριακή ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με μεθόδους της βιοπληροφορικής, μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τελική σωστή ταξινόμηση της οικογένειας Rosaceae (Kim E. Hummer and Jules Janick, 2009).

Ιστορική Αναδρομή

Μία ζεστή καλοκαιρινή ημέρα, στις 16 Ιουνίου του 1830, η αίθουσα του Διοικητικού Συμβουλίου της Κηπουρικής Κοινωνίας του Παρισιού γέμισε με τριαντάφυλλα και αιωνόβια φυτά. Ο Antoine Jacque, ο διακεκριμένος επικεφαλής κηπουρός του Δούκα της Ορλεάνης (που επρόκειτο να γίνει βασιλιάς της Γαλλίας εντός λίγων εβδομάδων), έδειχνε στους συναδέλφους του τους πρόσφατους θησαυρούς του, οι οποίοι αναπτύχθηκαν στο Chateau του Neuilly, στις όχθες του Σηκουάνα, κοντά στο Παρίσι. Ανάμεσα σε αυτούς τους θησαυρούς υπήρχαν αρκετά υβρίδια του *Rosa sempervirens*, τα οποία σύντομα θα αποτελούσαν τους πιο όμορφους και ελκυστικούς κήπους τριαντάφυλλων σε όλον τον κόσμο παρόλο που ανθοφορούσαν μία φορά στις 5 εβδομάδες και παρόλο που είχαν μόνο μεσαίου μεγέθους λουλούδια (όπως αυτά περιγράφονται από τον Jacques - πράγμα που σημαίνει αρκετά μικρό μέγεθος σήμερα). Η ελκυστικότητα τους οφείλονταν στη δυνατότητα τους να αναρριχθούν πάνω σε τοίχους, καμάρες και σε πέργκολες με τις συστάδες των λουλουδιών τους να κρέμονται προς τα κάτω. Το συνολικό αποτέλεσμα ήταν εκπληκτικό, και δύο τριαντάφυλλα του Jacques έλαβαν το βραβείο της Royal Horticultural Society του Garden Merit. Τα *Rosa sempervirens* υβρίδια πήραν τα ονόματά τους κυρίως από τη γαλλική βασιλική οικογένεια. Ένα ονομάστηκε 'Αδελαΐδα της Ορλεάνης, από το όνομα της πολυαγαπημένης, ευφυούς και μορφωμένης αδελφής του βασιλιά, ένα άλλο πριγκίπισσα Louise το οποίο πήρε το όνομα του από την μεγαλύτερη κόρη του, η οποία αργότερα θα γίνει βασίλισσα του Βελγίου και ένα άλλο υβρίδιο ονομάστηκε πριγκίπισσα Marie, παίρνοντας το όνομα του από τη δεύτερη κόρη του, η οποία ήταν μία ταλαντούχος γλύπτρια. Ο Jacques έδωσε σε ένα τριαντάφυλλο όνομα από την δική του οικογένεια αλλά παραμένει άγνωστο από ποιο ακριβώς μέλος της. Ο Antoine Jacques γεννήθηκε το 1782 στο Chelles, περίπου 55 μίλια (90 χιλιόμετρα) από το Παρίσι και ήταν ο γιος ενός κηπουρού. Οι γιοί σε εκείνες τις εποχές, συνήθιζαν να ακολουθούν τα επαγγέλματα των πατεράδων τους. Στην ηλικία των 22 ετών, μετά την έξοδό του από το στρατό, υπηρέτησε ως μαθητευόμενος κηπουρός στο Τριανόν στις Βερσαλλίες, όπου η ευφυΐα του και η σκληρή δουλειά του τον έφερε στην αυλή του Ναπολέοντα, ο οποίος τον ρώτησε ποια ήταν η φιλοδοξία του στη ζωή. Ο Jacques απάντησε «Να γίνω επικεφαλής κηπουρός σε μια από τις επικράτειες σας, Μεγαλειότητα." Λίγα χρόνια αργότερα ήταν επικεφαλής κηπουρός στο Le Raincy, κοντά στο Chelles. Το 1818 ο Louis Philippe, ο τότε Δούκας της Ορλεάνης, του ζήτησε να αναλάβει την ευθύνη της αποκατάστασης των πάρκων και των κήπων του Neuilly, καθώς επίσης και του Monceau (στα προάστια του Παρισιού), καθώς και τη διατήρηση του Le Raincy. Ο Jacques, μαζί με δύο άλλους κηπουρούς που βρίσκονταν κάτω από τις διαταγές του στο Monceau και Le Raincy, ανέλαβε την ευθύνη για αυτά τα τρία μεγάλα κτήματα τα οποία ανέρχονταν σε αρκετές χιλιάδες στρέμματα.

Ο Jacque ήταν ένας ταλαντούχος, ακούραστος κηπουρός που έδειξε μεγάλο ενδιαφέρον για πολλά είδη φυτών, τόσο του θερμοκηπίου όσο και της υπαίθρου. Τα γραπτά του ήταν ευρέως διαδεδομένα και είχαν μελετηθεί από διάσημους βοτανολόγους. Δημοσίευσε αρκετούς καταλόγους φυτών που βρίσκονταν μέσα στο Βασίλειο και σε ηλικία 65 ετών, δημοσίευσε έναν μεγάλο κατάλογο των φυτών της Ευρώπης, σε συνεργασία με το γνωστό βοτανολόγο Héring. Μια δεύτερη έκδοση ακολούθησε σύντομα.

Όπως μπορεί να φανταστεί κανείς, εκείνες τις εποχές, όταν ήταν ιππύλατα τα πάντα, απαιτούνταν μεγάλος αριθμός ανδρών, αλόγων, μουλαριών και γαϊδουριών. Ο Jacques διατήρησε πάρα πολύ λεπτομερή απογραφή των εργαλείων του. Είχε 20

χειράμαξες με ρόδες, 67 βαριά φτυάρια, 38 σκάλες, 113 τσουγκράνες των διαφόρων ειδών και ούτω καθεξής.

Ο πρώτος κατάλογος του Jacques, που δημοσιεύθηκε το 1825, παραθέτει εκατοντάδες διαφορετικά δέντρα για τα οποία ήταν υπεύθυνος στα τρία μεγάλα κτήματα του βασιλιά συν 304 διαφορετικά τριαντάφυλλα, από τα οποία 23 ήταν είδη τριανταφύλλων, συμπεριλαμβανομένου φυσικά και *R. sempervirens* και το *R. Argvensis* με το οποίο έχει στενή σχέση. Ο κατάλογος αυτός περιλαμβάνει επίσης και το *Bourbon rose* το οποίο ονομάζει *Rosa canina burboniana*. Ο Jacques ήταν το πρώτο πρόσωπο στην Ευρώπη που έλαβε σπόρους από αυτό το τριαντάφυλλο το 1819 από τον Δρ Breon, ο οποίος ήταν ο Βοτανικός Διευθυντής του νησιού της Bourbon, μιας γαλλικής αποικίας στον Ινδικό Ωκεανό που σήμερα ονομάζεται La Réunion.

Κάποια από τα είδη που ανέφερε ο Jacques στον κατάλόγο του έχουν χαθεί. Δεν έχει βρεθεί κανένα ίχνος από 40 *sempervirens* υβρίδια του Jacques, όπως αναφέρεται σε ορισμένα βιβλία. Ίσως το γεγονός ότι ο ίδιος παραθέτει τα *sempervirens* τριαντάφυλλα του με ένα κεφάλαιο S, και λίγο πιο κάτω, τα *semperviflorens* τριαντάφυλλα του (τόρα ονομάζεται *chinensis*), επίσης με ένα κεφαλαίο S έχει οδηγήσει σε σύγχυση.

Πρόσθετες μελέτες για το *Rosa Sempervirens*

Σε μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στη Σερβία το 2015 από τους Jelena D.Nadpal et al. και τους (Roman, Stanila, & Stanila, 2013) βρέθηκε ότι το *Rosa Sempervirens* είχε υψηλή περιεκτικότητα σε κερκετίνη, γαλλικό οξύ και σε πρωτοκατεχίνη. Επίσης, το μεθανολικό εκχύλισμα έδειξε μερική αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αναστολής της δράσης της COX-1 και της LOX -12 (Tesoriere, Attanzio, Allegra, Gentile, & Livrea, 2014). Σε μία ακόμη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από τους Johansson et al., το 1997, βρέθηκε ότι στα σπέρματα όλων των γενών της οικογένειας *Rosaceae* είναι η πλήρης απουσία γ-λινολενικού οξέος. Αντίθετα η σύσταση του ελαίου χαρακτηρίζεται από τα μεγάλα ποσοστά ολεϊκού οξέος. Βασικό συστατικό του ελαίου είναι επίσης το λινολεϊκό οξύ. Βρέθηκαν επίσης σε μικρότερα ποσοστά παλμιτικό και στεαρικό οξύ. Μία ακόμη μελέτη που έγινε στην Πορτογαλία έδειξε ότι τα περισσότερα μέλη της οικογένειας *Rosaceae* είχαν υψηλά ποσά κατεχίνης, 3-O-καφεοιλκινικού οξέος, κερκετίνης-3-O-ρουτινοσίδης και ανθοκυανιδών (Guimaraes et al., 2014). Σε μία άλλη μελέτη από τους Tumbas et al. το 2012, έδειξε πως η συνεργειακή δράση των πολυφαινολών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα του τριαντάφυλλου είναι εκείνη που αυξάνει την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ROS (Tumbas et al., 2012).

Λόγω της πρόσφατης έναρξης της μελέτης του *Rosa Sempervirens* περισσότερες έρευνες θα διεξαχθούν στο μέλλον.

1.4 *Opuntia Ficus-indica*

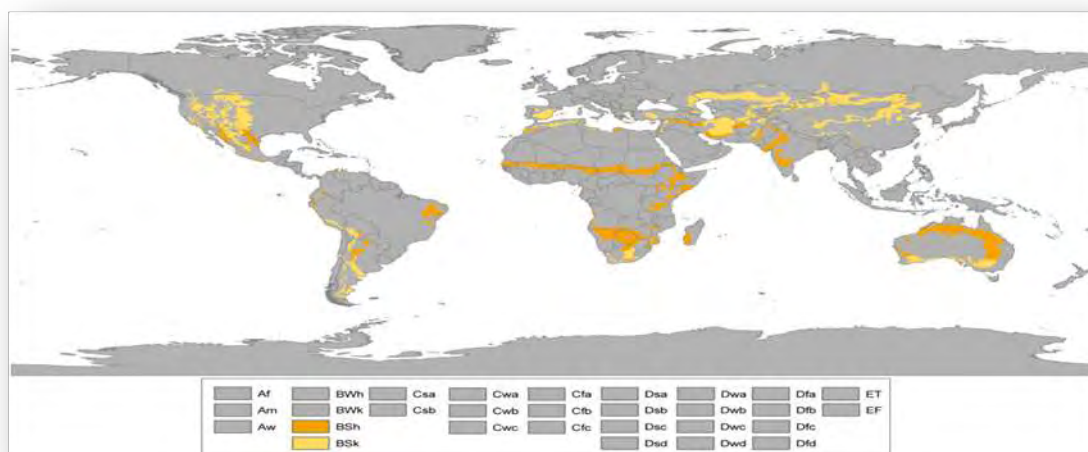


Η **οπουντία ή ινδική συκή** (*Opuntia ficus-indica*) ή κοινώς η **φραγκοσυκιά** είναι ένα είδος κάκτου που έχει εδώ καιρό γίνει ένα εξημερωμένο είδος, σημαντικό στον τομέα των γεωργικών οικονομιών των καλλιεργειών σε όλες τις άνυδρες και ημι-άνυδρες περιοχές του κόσμου. Θεωρείται ότι ενδεχομένως προέρχεται από το



Μεξικό

Εικόνα 15: Εικονογράφηση του Φραγκόσκου στο *The Cactaceae*.



Εικόνα 16: Περιοχές με ημι-άνυδρο κλίματα. **BSh** θερμό ημι-άνυδρο κλίμα. **BSk** ψυχρό ημι-άνυδρο κλίμα.

Μερικές από τις κοινές Αγγλικές ονομασίες για το φυτό και τον καρπό του είναι το «Ινδικό σύκο οπουντία», το «σύκο βαρβαρίας», ο «κάκτος αγλάδι», ο «ασπόνδυλος κάκτος» και το «αγκαθωτό αγλάδι», αν και αυτή η τελευταία ονομασία, επίσης εφαρμόζεται και σε άλλα λιγότερο κοινά είδη Οπουντίας (*Opuntia*). Στο Ισπανόφωνο Μεξικό το φυτό ονομάζεται *nopal* ενώ ο καρπός του ονομάζεται *tuna*, ονομασίες που χρησιμοποιούνται επίσης και στα Αμερικανικά Αγγλικά, ιδίως στους όρους της μαγειρικής. Ο καρπός του ονομάζεται στην Ελλάδα φραγκόσυκο, στην Κύπρο παπουτσόσυκο, στην Αιθιοπία *beles*, στην Αλβανία *fik deti* (που σημαίνει σύκο της θάλασσας), στο Ισραήλ *sabra*, στη Μάλτα *bajtra* και στην Τυνησία *El Hindi*. Στη Σικελία, ο καρπός της φραγκοσυκιάς «αγκαθωτό αγλάδι», είναι γνωστός ως *ficudinnia* (η Ιταλική του ονομασία είναι *fico d'India*, που σημαίνει «Ινδικό σύκο»)(El-Mostafa et al., 2014).

Συστηματική ταξινόμηση

Η οπουντία ή αλλιώς το φραγκόσυκο, ανήκει στο βασίλειο των φυτών (*Plantae*), στη συνομοταξία Αγγειόσπερμα (*Magnoliophyta*), στην ομοταξία δικοτυλήδονα (*Magnoliopsida*), στην υφομοταξία Καρυοφυλλίδες (*Caryophyllidae*), στην τάξη Καρυοφυλλώδη (*Caryophyllales*), στην οικογένεια Κακτίδες (*Cactaceae*) και στο γένος Οπουντία (*Opuntia*). Ένα κλαδόγραμμα της οικογένειας *Cactaceae* είναι το ακόλουθο:

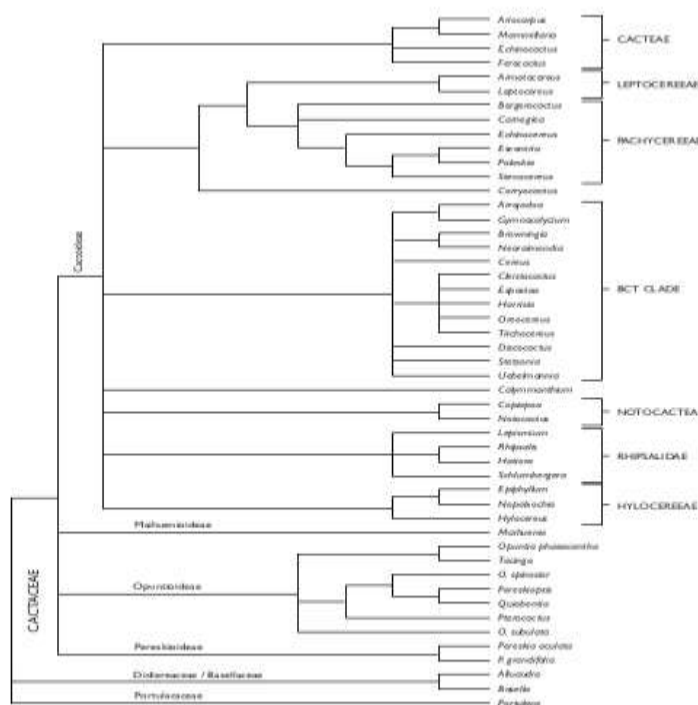


Figure 13. Strict consensus tree of 41,468 equally parsimonious trees from analysis of the *rbcL* gene for the family Cactaceae. A total of 1,434 bp of sequence data used for comparison. Some important nodes in this tree are still unresolved.

Εικόνα 17: Κλαδόγραμμα της οικογένειας Cactaceae.

Χαρακτηριστικά

Η φραγκοσυκιά είναι ένα κακτοειδές φυτό, με πολλά κλαδιά, το οποίο μπορεί να φτάσει σε ύψος μέχρι τα 3-5 μέτρα. Δεν έχει κορμό και αποτελείται από σαρκώδη επίπεδα τμήματα («φύλλα») με μορφή ελλειπτικού δίσκου, ενωμένα μεταξύ τους. Ο καρπός της φραγκοσυκιάς είναι το φραγκόσυκο, ο οποίος είναι ένα από κίτρινο (πριν ωριμάσει πλήρως) προς ροδοκόκκινο (όταν ωριμάσει) φρούτο με μικρά αγκαθάκια, σαν χνουδι, στην επιφάνειά του. Τα φραγκόσυκα αναπτύσσονται περιμετρικά στην άκρη των επίπεδων τμημάτων της φραγκοσυκιάς και έχουν βάρος 150-400 γραμμάρια. Τα άνθη της είναι κίτρινα, χωρίς μίσχο. Γενικά είναι ένας πολυετής, δενδρόμορφος, πυκνόμορφος, αειθαλής θάμνος, με βλαστό όρθιο. Στην Ελλάδα απαντάται ημιαυτοφυής και πολλές φορές αυτοφυής. Ευδοκίμει σε θερμούς και ηλιόλουστους τόπους, χωρίς ιδιαίτερη προτίμηση στο έδαφος, αρκεί αυτό να μην είναι υγρό ή να στραγγίζεται καλώς, ήτοι σε βραχώδης, πετρώδεις, αμμώδεις ή ξηρές τοποθεσίες, σε αβαθή εδάφη ή μετρίου βάθους, φτωχά σε οργανική ύλη, οξέα ή ελαφρώς αλκαλικά ή σε βουνοπλαγιές. Στα αργιλώδη και ασβετώδη εδάφη ευδοκίμει λιγότερο απ’ όσο στα μεσαία συστάσεως. Η ανάπτυξη της σε βραχώδη εδάφη επιτυγχάνεται χάριν του ισχυρού συστήματος ριζών το οποίο διαθέτει και σιγά – σιγά προκαλεί διάσπαση και αποσάθρωση αυτών. Το δυνατό ριζικό «οπλικό» σύστημα ίσως είναι μία από τις αιτίες ένεκεν των οποίων η φραγκοσυκιά δείχνει προτίμηση και σε, πρόποδες λοφίσκων, πετρώδεις εκτάσεις, ή επικλινή εδάφη παρά στους κάμπους. Ένας άλλος λόγος που συνηγορεί σ’ αυτήν την ιδιόρρυθμη

προτίμηση, είναι το γεγονός ότι φοβάται την ασφυξία των ριζών η οποία προέρχεται από άφθονα ή στάσιμα νερά. Είναι φυτό ανθεκτικό στην ξηρασία και προσπαθεί να αποθηκεύει νερό στους ιστούς του όταν το βρίσκει, για τις δύσκολες ημέρες που συχνά έρχονται. Είναι αξιοσημείωτο πως και την υγρασία αξιοποιεί αφού την απορροφά και την μετατρέπει σε νερό στους ιστούς του. Η προσφορά της φραγκοσυκιάς είναι τεράστια τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα τα οποία την επιδιώκουν μετά μανίας τόσο τους καλοκαιρινούς όσο και τους χειμερινούς μήνες. Στις ερήμους ιδίως όπου ευδοκιμεί αποτελεσματικώς, δέχεται εφορμήσεις διψασμένων και πεινασμένων ζώων.



Εικόνα 18: Το φραγκόσυκο.

Η επιφάνεια του καρπού, δηλαδή του φραγκόσυκου, καλύπτεται αφενός από σκούρα κομπάκια και αφετέρου από πολύ μικρά αγκαθάκια, τα οποία μοιάζουν με χνούδι και δε γίνονται άμεσα αντιληπτά. Είναι πιθανό να πιάνει κανείς τα φραγκόσυκα για κάποιο χρόνο (λεπτά) πριν αρχίσει να νιώθει την ενόχληση από τα αγκαθία. Για τη συλλογή του και το καθάρισμά του πριν την κατανάλωση, πρέπει να το πιάνει κανείς με κάποιο μέσο (π.χ. χαρτί, γάντι) ή εργαλείο (πιρούνι) ώστε να μην έρχεται σε επαφή με το δέρμα. Ο καρπός της οπουντίας της ινδικής συκής, εάν καταναλωθεί με τους σπόρους μπορεί να προκαλέσει δυσκοιλιότητα, ενώ, γίνεται καθαρτικό εάν καταναλωθεί χωρίς τους σπόρους. Τα φυτά ανθίζει σε τρία ευδιάκριτα χρώματα: λευκό, κίτρινο και κόκκινο. Τα άνθη εμφανίζονται για πρώτη φορά στις αρχές Μαΐου, από τις αρχές του καλοκαιριού στο βόρειο ημισφαίριο και οι καρποί ωριμάζουν από τον Αύγουστο μέχρι τον Οκτώβριο.

Χημική ανάλυση

Η χημική ανάλυση του εδώδιμου μέρους του φραγκόσυκου δημοσιεύτηκε σε έκδοση του Γενικού Χημείου του Κράτους της Κύπρου. Η χημική ανάλυση βρίσκεται στη σελίδα 81 του βιβλίου ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, που εκδόθηκε το 1999 με αριθμό ISBN 9963-38-212-6. Αυτό που βρέθηκε ήταν ότι τα 82 γραμμάρια από τα 100 ήταν νερό. Η ίδια ποσότητα δείγματος περιείχε σε χλιοστογραμμάρια: 119 κάλιο, 24 φωσφόρο, 13 μαγνήσιο και 80 βιταμίνη C. Η περιεκτικότητα του σε θρεπτικά συστατικά είναι η ακόλουθη:

Φραγκόσυκο, ωμό (Διατροφική αξία/100 γραμμάρια ή 35 oz)	
Ενέργεια	172 Kj
Θερμίδες	41 Kcal
Υδατάνθρακες	9,6 gr
Φυτικές ίνες	3,6 gr
Λιπαρά	0,5 gr
Πρωτεΐνες	2,5 gr

Πίνακας 1: Διατροφική αξία του φραγκόσυκου.

Βιταμίνες	Διατροφική αξία/100 γραμμάρια ή 35 oz
Βιταμίνη Α	25μg (3%)
Ριβοφλαβίνη (B2)	0,1 mg (8%)
Νιασίνη (B3)	0,5 mg (3%)
Βιταμίνη (B6)	0,1 mg (8%)
Φυλλικό οξύ (B9)	6 μg (2%)
Βιταμίνη C	14,0 mg (17%)
Βιταμίνη E	0 %

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα του φραγκόσυκου σε βιταμίνες.

Ανόργανα άλατα	Διατροφική αξία/100 γραμμάρια ή 35 oz
Ασβέστιο	56 mg (6%)
Σίδηρος	0,3 mg (2%)
Μαγνήσιο	85 mg (24%)
Φώσφορος	24 mg (3%)
Κάλιο	220 mg (5%)
Ψευδάργυρος	0,1 mg (1%)

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα του φραγκόσυκου σε ανόργανα άλατα.

Αναπαραγωγή του φραγκόσυκου

Οποιοδήποτε μέρος του φυτού ριζοβολά, κάνοντας πολύ εύκολη την αναπαραγωγή του. Στην Αυστραλία δημιουργήθηκαν προβλήματα από τη ραγδαία εξάπλωση του φυτού και για την αντιμετώπισή του εισάχθηκε έντομο από την κεντρική Αμερική που περιόρισε σημαντικά την έκτασή του. Το φυτό χρησιμοποιείται συχνά ως φυτοφράκτης. Φράκτες από φραγκοσυκιές μπορούν να λειτουργήσουν αποτρεπτικά στην εξάπλωση δασικών πυρκαγιών διότι ο σαρκώδης κορμός περιέχει νερό και καίγεται δύσκολα. Ο καρπός του, το φραγκόσυκο καταναλώνεται ως φρούτο αλλά πριν το φάει κανείς θα πρέπει να το καθαρίσει προσεκτικά γιατί είναι γεμάτο μικροσκοπικά αγκάθια. Το φραγκόσυκο πολλαπλασιάζεται δύσκολα με σπέρματα,

ευκολότερα όμως με μοσχεύματα, (αγενής γένεση ή αγενής πολλαπλασιασμός), δηλαδή κομμάτια των φυλλοκλαδίων, που αφήνονται μερικές ημέρες στην ύπαιθρο και κατόπιν φυτεύονται.



Εικόνα 19 : Το φραγκόσυκο ως φυτοφράκτης.

Ιστορία

Η πατρίδα της φραγκοσυκιάς είναι η Κεντρική Αμερική - Μεξικό. Εισήχθη στην Ευρώπη και στη συνέχεια σε όλο τον κόσμο από τους θαλασσοπόρους οι οποίοι επέστρεψαν από την ανακάλυψη της Αμερικής κατά τον 15ο-16ο αιώνα. Η πρώτη περιγραφή του έγινε το 1535 από τον Ισπανό Gonçalo Hernández de Oviedo y Valdés στην «Ιστορία των Ανατολικών Ινδιών». Η φραγκοσυκιά δεν είναι φυτό του παλαιού κόσμου· γεννήθηκε στο Μεξικό, και είναι το εθνικό φυτό του Μεξικού, τόσο που απεικονίζεται στη σημαία τους. Σύμφωνα με τον μύθο, οι θεοί είπαν στους Αζτέκους να χτίσουν την πρωτεύουσά τους εκεί που θα δουν έναν αετό να σκοτώνει ένα φίδι, καθισμένος πάνω σε μια φραγκοσυκιά (νοπάλ) και έτυχε να είναι πάνω σ' ένα βράχο σ' ένα νησί μέσα σε λίμνη κι εκεί χτίσαν το Τενοχτιτλάν, που σημαίνει «φραγκόσυκο πάνω στο βράχο» (στη γλώσσα Ναχουάτλ, το φραγκόσυκο λέγεται νόχτλι), που σήμερα είναι η πόλη του Μεξικού. Στις αρχές της δεκαετίας του 1900, στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο καρπός «αγκαθωτό αγλάδι» της φραγκοσυκιάς, εισάγονταν από το Μεξικό και τις χώρες της Μεσογείου, για να ικανοποιήσει τον αυξανόμενο πληθυσμό των μεταναστών που έφταναν από την Ιταλία και την Ελλάδα. Ο καρπός έχασε τη δημοτικότητά του κατά τα μέσα της δεκαετίας του 1950, αλλά έχει αυξήσει τη δημοτικότητά του από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, λόγω της εισροής των μεταναστών από το Μεξικό. Πρόσφατα, οι βιομηχανίες βοοειδών στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν αρχίσει να καλλιεργούν την οπουντία την ινδική συκή (*Opuntia ficus-indica*), ως μια νέα πηγή τροφής των βοοειδών των. Ο κάκτος καλλιεργείται τόσο ως πηγή τροφοδοσίας όσο και ως περίφραξη. Τα βοοειδή αποφεύγουν τα αιχμηρά αγκάθια του κάκτου περίφραξης και δεν περιπλανώνται εκτός των ορίων που περικλείονται από αυτήν. Το ιθαγενές «αγκαθωτό αγλάδι» φραγκόσυκο, χρησιμοποιείται πάνω από έναν αιώνα, για να τα θρέψει και τα αγκάθια του μπορούν να καούν ώστε να μειωθούν οι στοματικοί τραυματισμοί. Τα επιθέματα κάκτου, στα οποία τρέφονται τα βοοειδή, είναι χαμηλά σε ξηρή ύλη και ακατέργαστη πρωτεΐνη, αλλά είναι χρήσιμα ως συμπλήρωμα σε συνθήκες ξηρασίας. Πέρα από την διατροφική αξία, η περιεκτικότητα σε υγρασία, ουσιαστικά εξαλείφει το πότισμα των βοοειδών και την ανθρώπινη προσπάθεια για την επίτευξη αυτής της αγγαρείας. Η εκδοχή 1975–1988 του Οικοσήμευ της Μάλτας, επίσης παρουσιάζει μια

φραγκοσυκιά, μαζί με μια παραδοσιακή *dgħajsa*, ένα φτυάρι και μια πιρούνα, με τον ανατέλλοντα ήλιο στον ορίζοντα. Στη Μάλτα, το λικέρ που ονομάζεται *bajtra* (η ονομασία του φραγκόσυκου στη Μάλτα), είναι παρασκευασμένο από αυτόν τον καρπό, ο οποίος μπορεί να βρεθεί να φύεται αγρίως, στα περισσότερα χωράφια. Στο νησί της Αγίας Ελένης, το φραγκόσυκο δίνει το όνομά του στο τοπικά αποσταγμένο λικέρ, *Tungi Spirit*. Η Οπουντία η ινδική συκή (*Opuntia ficus-indica* καλλιεργείται σε *nopals* για να χρησιμεύσει ως ένα φυτό ξενιστής για τα έντομα κοχενίλης, τα οποία παράγουν τις επιθυμητές κόκκινες και μωβ βαφές, πρακτική που χρονολογείται από την προ-Κολομβιανή εποχή. Το φυτό θεωρείται επιβλαβές είδος, σε ορισμένα μέρη της Δεκάνης της Μεσογείου, λόγω της ικανότητάς του να εξαπλώνονται ταχέως πέρα από τις ζώνες όπου αρχικά καλλιεργείτο.

Οι καρποί

Ο καρπός της φραγκοσυκιάς έχει σχήμα ωοειδές, ή υποσφαιρικό πεπλατυσμένο στην κορυφή και σχηματίζει το βοθρίο. Είναι γεμάτος γλωχίνες (αγκάθια) στο περίβλημα, (επικάρπιο), φυόμενα καθ' ομάδας σε μικρές αποστάσεις επί της επιφανείας του, καθώς και στην στεφάνη (κορυφή) του καρπού. Πρόκειται για ένα μέσο αυτοπροστασίας από τους εχθρούς. Είναι σαρκώδης, κίτρινος ή κοκκινωπός, εδώδιμος. Έχει σάρκα γλυκιά, χρώματος πορτοκαλί έως υποκίτρινο στην αρχή της ωριμάνσεως και κοκκινωπό προς κοκκινόμαυρο κατά την υπερωρίμανση. Καταναλώνεται νωπός, αφού αποφλοιωθεί. Έχει γεύση ευχάριστη, γλυκιά, δροσιστική, εξαιρετικώς εύγευστη και εύχυμη. Επίσης ο καρπός είναι ράγα. Ο καρπός περιέχει βιταμίνη C και ήταν μία από τις πρώτες θεραπείες για το σκορβούτο. Το κόκκινο χρώμα του χυμού οφείλεται στις μπεταλαΐνες (Albano et al., 2015). Το φυτό περιέχει επίσης φλαβονοειδή, όπως κερκετίνη, ισοραμνετίνη και καμπφερόλη. Άλλα συστατικά του πολτού του καρπού, είναι οι υδατάνθρακες (γλυκόζη, φρουκτόζη και άμυλο), πρωτεΐνες και ίνες πλούσιες σε πηκτίνη (Sumaya-Martinez et al., 2011). Οι καρποί συνήθως τρώγονται, αφού προηγουμένως αφαιρεθεί ο παχύς εξωτερικός τους φλοιός και μετά από την ψύξη τους για μερικές ώρες, σε ένα ψυγείο. Έχουν παρόμοια γεύση με ένα ζουμερό, γλυκό καρπούζι. Η έντονη κόκκινη / μωβ ή λευκό / κίτρινη σάρκα, περιέχει πολλούς μικρούς σκληρούς σπόρους που συνήθως καταπίνονται (Esatbeyoglu, Wagner, Schini-Kerth, & Rimbach, 2015). Οι καρποί χρησιμεύουν ως:

- ✚ Τονωτικά στην καρδιά λόγω της ουσίας κακτίνη που περιέχουν.
- ✚ Αντίδοτο κατά της μέθης. Απομακρύνουν πονοκεφάλους, ναυτία ξηροστομία και άλλα. Η χρήση γίνεται από τους μεθυσμένους, αφού φυσικά θα τους τους προσφέρει κάποιος ως φάρμακο και τα έχει επεξεργασθεί δεόντως (Alimi et al., 2010).
- ✚ Στην μαγειρική παράγουν δεκάδες φαγητά με κρέας και λαχανικά για τον άνθρωπο. Επίσης γίνονται σαλάτες, επιδόρπια, μεζέδες ακόμη και ψωμί. Δεν έχουν καμία απολύτως τοξικότητα κι έτσι πρέπει να τα συνηθίσουμε ως γεύμα.

Οι ασθένειες οι οποίες προλαμβάνονται από τη χρήση του φραγκόσυκου είναι τα φλεγμονώδη αποστήματα, η διόγκωση του σπλήνα, η ελονοσία, η υπερλιπιδαιμία και η παχυσαρκία, η υπερτροφία του προστάτη, η φλεβίτιδα, οι πνευμονικές παθήσεις. Επίσης χρησιμοποιείται για τους μώλωπες και την περιποίηση των τραυμάτων (Ammar et al., 2015). Αποτελεί επίσης πιθανό παράγοντα για την

καταπολέμηση ορισμένων μορφών καρκίνου (στήθους, προστάτου, στομάχου, πνευμόνων, παγκρέατος) λόγω των φλαβονοειδών συστατικών που περιέχει. Είναι ένα δυναμωτικό για το ανοσοποιητικό σύστημα ενώ τα άνθη και τα κλαδώδια («φύλλα») χρησιμοποιούνται ως διουρητικά, αντισπασμωδικά, αντιδιαρροϊκά, αιμολυτικά, καθώς για καταπολέμηση της νεφρίτιδας (Kim et al., 2015).

Οι βλαστοί

Οι βλαστοί της φραγκοσυκιάς είναι φυλλοειδώς πεπλατυσμένοι, ενώ στους κάκτους παρατηρούνται διαφοροποιήσεις σε σφαιρικούς ή κυλινδρικούς ή αρθρωτούς, με πολλά φυλλοκλάδια. Έχουν σχήμα ελλειψοειδές, τριγωνικό ή άλλα παρόμοια και χρησιμεύουν ως αποθηκευτικοί χώροι. Περιέχουν μεγάλες ποσότητες νερού για να αντέχουν στις ξηρασίες. Μοιάζουν δηλαδή με σαρκώδη φύλλα, εξ ου και ο όρος βλαστοπαχύφυτα, αλλά είναι βλαστοί με λειτουργικές ιδιότητες φύλλων, μήκους 20 - 50 εκατοστών, πλάτους 10 - 20 εκατοστών και καλύπτονται από κηρώδες στρώμα. Αρχικώς είναι άκρως ευαίσθητοι, προοδευτικώς όμως αυξάνουν και τελικώς αποκτούν ινώδη (ξυλώδη) υπόσταση, για να καταλήξουν στον σχηματισμό του κορμού ο οποίος είναι το κεντρικό μέρος του φυτού απ' το οποίο γίνονται οι διακλαδώσεις, αλλά και το γηραιότερο. Επίσης έχουν στην επιφάνειά τους πολλές και σκληρές ίνες, τα αγκάθια, κέντρα, ακίδες ή γλωχίνες. Ασκούν δε και την φωτοσυνθετική λειτουργία του φυτού.

Φύλλα

Η φραγκοσυκιά δεν έχει φύλλα. Τα φύλλα της έχουν υποστεί «ισχυράν πήρωσιν» και έχουν μετατραπεί σε ακάνθας, ή φυλλακάνθας, όπως ευρίσκομε τον όρον στο «Περί φυτών ιστορία» έργο του αρχαίου Έλληνα βοτανολόγου Θεοφράστου. Είναι μικρά, βελονοειδή, εύπτωτα, σκληρά, μυτερά όργανα και επιτυγχάνουν δύο στόχους. Πρώτον, μειώνουν την διαπνοή ώστε να μη χάνεται το αποταμιευμένο νερό, και δεύτερον προστατεύουν από την επιδρομή των φυτοφάγων ζώων.

Άνθη

Τα άνθη είναι μεγάλα και φύονται κατά κανόνα στην κορυφή των φυλλοκλαδίων, συνήθως των ανωτέρων ή εξωτερικών και πολύ σπανία στα πλευρικά μέρη. Έχουν χρώμα ζωηρό κιτρινωπό, πορτοκαλί ή χρυσίζον. Είναι ένας θαυμάσιος συνδυασμός που δίνει ιδιαίτερο χρώμα κατά την περίοδο της ανθοφορίας στους χώρους όπου υπάρχουν συστοιχίες από φραγκοσυκιές. Τα άνθη είναι μονήρη, δηλαδή βρίσκονται μεμονωμένα στον βλαστό, αλλά πολλές φορές είναι και ερμαφρόδιτα, κανονικά, ακτινόμορφα ή ζυγόμορφα ή έχουν αμφίπλευρη συμμετρία. Η ωθήκη είναι υποφυής ή βρίσκεται κάτω από το πεπλατυσμένο τμήμα της βάσεως και δέχεται πολλές σπερματικές βλάστες (ωάρια). Το περιάνθιο είναι διπλό και τα μέλη του βρίσκονται σε σπειροειδή διάταξη με μεταβατικές μορφές από σέπαλα σε πέταλα. Τα σέπαλα και τα πέταλα δεν έχουν πλήρη διαφοροποίηση. Και τα δύο είναι πολυάριθμα, όρθια ή αποκλίνοντα. Οι στήμονες είναι σπειροειδώς τοποθετημένοι ή ενίοτε κατά ομάδες. Ο ύπερος είναι ένας και απαρτίζεται από τρία ή και περισσότερα καρπόφυλλα. Τα πέταλα και τα σέπαλα με τα έντονα χρώματά τους και την γύρη προσελκύουν τα έντομα κι έτσι επιτυγχάνεται η επικονίαση στο φυτικό βασίλειο. Μένουν ανοικτά 36-48 ώρες για τον σκοπό αυτό (Ammar et al., 2015).



Εικόνα 20: Το φυτό της φραγκοσυκιάς.

Η επιβίωση

Η φραγκοσυκιά ζει, όπως προαναφέρθηκε σε αμμώδη, πετρώδη ξηρά ή άνυδρα εδάφη. Αποτελεί με λίγα λόγια ένα ξηρόφυτο. Για τον σκοπό αυτό έχει δημιουργήσει ένα δικό της αμυντικό σύστημα, ώστε να δύναται να επιβιώνει και σε περιόδους παρατεταμένης ανομβρίας. Η προσαρμογή της στηρίζεται στα πιο κάτω χαρακτηριστικά:

- ✚ Αποταμίευση νερού. Μαζί με τις θρεπτικές ουσίες η φραγκοσυκιά αποθηκεύει μεγάλες ποσότητες νερού μέσα στους ιστούς της, οι οποίοι συνήθως βρίσκονται στον κορμό. Γι' αυτό η κατηγορία λέγεται παχύφυτα ή σαρκόφυτα. Αποτέλεσμα της μεγάλης αποθήκευσης νερού στους ιστούς είναι η αρκετή εξόγκωση. Όταν τους κόψουμε σε κάποιο σημείο ρέει νερό. Τα φυλλοκλάδια είναι οι δεξαμενές νερού της φραγκοσυκιάς (El-Mostafa et al., 2014).
- ✚ Μείωση διαπνοής. Ο δεύτερος λόγος με τον οποίον εξασφαλίζει η φραγκοσυκιά την διαφύλαξη νερού είναι η μείωση της διαπνοής και αυτό επιτυγχάνεται με την «εξαφάνιση» των φύλλων. Από πλευράς μακροβιότητας, ζει άνω από 200έτη.

Οφέλη για την κτηνοτροφία

Στον τομέα των ζωοτροφών η φραγκοσυκιά είναι από τα πλέον προτιμώμενα φυτά λόγω του νερού που περιέχει αλλά και λόγω των πολλών θρεπτικών συστατικών. Αρκεί να σημειωθεί ότι στην Αμερική είναι η βασική τροφή των γαλακτοφόρων αγελάδων, αφού τα συστατικά των φύλλων είναι εξαιρετικά πλούσια σε βιταμίνες, νερό, υδατάνθρακες, και σε μεταλλικά στοιχεία όπως σίδηρο, κάλιο, μαγνήσιο και ασβέστιο. Επίσης σε ανάμειξη με βαμβακόπιτα παράγεται μια σπουδαία τροφή. Επομένως στον τομέα της κτηνοτροφίας, η συμβολή της είναι σημαντική, ωστόσο άγνωστη στην Ελλάδα.

Πρόσθετες μελέτες για το φραγκόσυκο.

Σε μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στη Μεσσήνα της Ιταλίας, το 2003, από τους Galati et al. αναλύθηκε το περιεχόμενο του χυμού του *Opuntia ficus-indica* και συγκεκριμένα το περιεχόμενο σε ασκορβικό οξύ, σε συνολικές πολυφαινόλες και σε φλαβονοειδή. Αυτό που βρέθηκε ήταν υψηλή συγκέντρωση σε φερουλικά οξέα, ρουτίνη και ισοχαρμετίνη και κατά συνέπεια μεγάλη αντιοξειδωτική δράση του χυμού. Επίσης, ο χυμός αυτός ανέστειλε την ελκογόνο δράση της αιθανόλης στο στόμαχο κουνελιών (Galati et al., 2003). Μία παρόμοια μελέτη η οποία διενεργήθηκε στο Μαρόκο και στη Λιλ της Γαλλίας το 2014 από τους Karym El-Mostafa et al., έδειξε ότι οι βιοενεργές ενώσεις του *Opuntia ficus-indica* σε συνδυασμό με την υψηλή περιεκτικότητά του σε μπεταλαίνες, αποτελούν μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για τον διαβήτη τύπου 2, την παχυσαρκία, τους ρευματισμούς, την ισχαιμία, τους καρκίνους και τις ικές και βακτηριακές μολύνσεις, τα καψίματα, τις πληγές, τα οιδήματα, την υπερλιπιδαιμία και την γαστρίτιδα (El-Mostafa et al., 2014). Μία τρίτη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ, το 2003, από τους Joseph O.Kuti et al., έδειξε ότι ο κάκτος αυτός ήταν πλούσιος σε κερκετίνη, καμπεφερόλη, ισοχαρμετίνη και ασκορβικό οξύ, με την κερκετίνη να αποτελεί την πολυφαινόλη που βρισκόταν σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες. Οι ερευνητές El-Sayed S.Abdel-Hameed et al. στην Αίγυπτο, τόνισαν πως το πολυφαινολικό περιεχόμενο του κάκτου είναι διαφορετικό σε καλλιέργεια διαφορετικού χρώματος. Ωστόσο όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτου χρώματος, είχαν την ίδια ποσότητα σε σίδηρο, χαλκό και ποτάσσιο (Abdel-Hameed, Nagaty, Salman, & Bazaid, 2014). Το ίδιο υποστήριξαν και οι ερευνητές Clara Albano et al. στην Ιταλία το 2015, λέγοντας πως η μωβ ποικιλία του κάκτου φάνηκε να έχει υψηλότερη συγκέντρωση μετανίνης, βιταμίνης C και συνεπώς αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με την πορτοκαλί ποικιλία θεωρώντας τις χρωστικές μπεταλαίνες μια ενδιαφέρουσα πηγή βιοενεργών ενώσεων (Albano et al., 2015). Βέβαια, οι M.R.Castellar et al. στην Ισπανία, το 2012, ανέφεραν πως το φαινολικό περιεχόμενο στον κάκτο *Opuntia ficus-indica*, αρχίζει να σχηματίζεται στους 4 μήνες μετά την άνθηση και ολοκληρώνεται στους 9 μήνες. Το ίδιο συμβαίνει και με τη σύνθεση των μπεταλαίνων. Το ασκορβικό οξύ αρχίζει να παράγεται στους 4 μήνες στα ανώριμα φρούτα. Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός πως στους 7 μήνες μετά την άνθηση βρέθηκε υψηλότερη περιεκτικότητα σε μπετακυανίνες σε σχέση με τους 8 μήνες γεγονός που υποδεικνύει πως οι ενζυματικές δράσεις τείνουν να μειώνονται όσο προχωράει το τελικό στάδιο ωρίμανσης (M. R. Castellar, Solano, & Obon, 2012) (R. Castellar, Obon, Alacid, & Fernandez-Lopez, 2003). Ακόμη, σε μία μελέτη που διενεργήθηκε στη Ρώμη το 2007, βρέθηκε ότι οι πολυφαινόλες του κάκτου αναστέλλουν το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος και κατά συνέπεια, την COX-2, την λιποξυγενάση LOX και τη συνθάση του NO (iNOS). Συγκεκριμένα, η κερκετίνη και η καμπεφερόλη ανέστειλαν τις COX και LOX σε ποντίκια, σε λαγούς και σε γουρούνια και εμπόδισαν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-Kb. Η COX-2, η λιποξυγενάση LOX και η συνθάση του NO εκφράζονται στη διαδικασία της φλεγμονής. Κατά συνέπεια η μείωση της δράσης τους από τις πολυφαινόλες οδηγεί σε αντιφλεγμονώδη δράση. Ο παράγοντας NF-Kb, σε μη φλεγμονώδεις καταστάσεις βρίσκεται απομονωμένος στο κυτταρόπλασμα σε μία ανενεργή μορφή συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη IκB. Στην φλεγμονή, οι πρωτεΐνες αυτές φωσφορυλιώνονται από την κινάση IKK σε δυο περιοχές σερίνης και η ίδια

κινάση τις οδηγεί σε αποδόμηση. Συνεπώς, οι πολυφαινόλες αναστέλλουν την αποδόμηση του NF-Kb και την φλεγμονώδη διαδικασία (Tesoriere et al., 2014).

1.5 *Lycium Barbarum* ή Goji Berry



Το γκότζι μπέρι ή μούρο γκότζι ή λυκόμουρο (*Goji*, *goji berry* ή *wolfberry*) είναι ο καρπός από το Λύκιον το βάρβαρον ή Λύκιον το κοινό (*Lycium barbarum*). Ανήκει στην οικογένεια των Στρυχνίδων ή Σολανίδων (*Solanaceae*). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει επίσης την πατάτα, την ντομάτα, την μελιτζάνα, την πιπεριά τσίλι και τον καπνό. Τα είδη γκότζι μπέρι, είναι φυλλοβόλα ξυλώδη πολυετή φυτά, που αναπτύσσονται σε ύψος 1–3 μ. Το *L. barbarum* καλλιεργείται στον βορρά της Κίνας, πρωτίστως στην Αυτόνομη Περιοχή *Ningxia Hui* και τείνει να είναι κάπως υψηλότερο από τα υπόλοιπα είδη του γένους αυτού. Φτάνει σε ύψος από 2,5 έως 4 μέτρα, και ανθίζει κατά τους μήνες Ιούνιο έως Αύγουστο. Μπορεί να αναπτυχθεί σε αμμώδη και αργιλώδη εδάφη που είναι θρεπτικά φτωχά, και σε ηλιόλουστους ή ημισκιερούς τόπους. Το γκότζι μπέρι έχει καταγωγή από την Ασία. Ανακαλύφθηκε στις κορυφές των Ιμαλαΐων και του Θιβέτ από τους Κινέζους και αναφέρεται στις λαϊκές παραδόσεις από το 2.800 π.Χ. Στην κινεζική ιατρική χρησιμοποιείται για την τόνωση της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών. Πλέον είναι γνωστό σε όλον τον κόσμο, ενώ έχει αρχίσει να καλλιεργείται και στην Ελλάδα από επαγγελματίες αγρότες (Lam et al., 2016).

Φύλλα και άνθη

Τα φύλλα του γκότζι μπέρι, σχηματίζονται στο βλαστό είτε σε εναλλασσόμενη διάταξη, είτε σε δεσμίδες έως και τρεις, έκαστο, έχοντας είτε ένα λογχοειδές (σε σχήμα σαν την αιχμή του δόρατος μακρύτερο από ότι το πλάτος του) ή ωοειδούς σχήματος (σαν του αυγού). Οι διαστάσεις των φύλλων έχουν 7,0 εκ. μήκος επί 3,5 εκ. πλάτος, με αμβλείες ή στρογγυλεμένες άκρες. Τα άνθη αναπτύσσονται σε ομάδες από μια έως τρεις, στις μασχάλες των φύλλων. Ο κάλυκας που τελικά διαρρηγνύεται από το αυξανόμενο μούρο, αποτελείται από κωδωνοειδούς σχήματος ή σωληνοειδή σέπαλα, τα οποία σχηματίζουν κοντούς, τριγωνικούς λοβούς. Οι στεφάνες των ανθέων, έχουν το χρώμα της λεβάντας ή του μωβ, πλάτους 9–14 χιλ. με πέντε ή έξη λοβούς κοντύτερους του σωλήνα. Οι στήμονες είναι διαρθρωμένοι με μακρύτερα νημάτια απ' ότι οι ανθήρες. Οι ανθήρες διανοίγουν σε διαμήκη κατεύθυνση. Στο Βόρειο Ημισφαίριο, η ανθοφορία

εμφανίζεται από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο και η ωρίμανση των μούρων, από τον Αύγουστο έως τον Οκτώβριο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος, το υψόμετρο και το κλίμα.

Καρπός

Αυτά τα είδη παράγουν ένα φωτεινό πορτοκαλί-κόκκινο, ελλειψοειδές μούρο με διάμετρο 1–2 εκ.. Ο αριθμός των μούρων ποικίλει ευρέως, βασιζόμενος στην ποικιλία και το μέγεθος του καρπού, που περιέχει 10-60 μικροσκοπικούς κίτρινους σπόρους, οι οποίοι έχουν συμπιεστεί με ένα καμπύλο έμβρυο. Τα μούρα ωριμάζουν από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο στο Βόρειο Ημισφαίριο. Οι πορτοκαλοκόκκινοι καρποί του έχουν γλυκιά, ελαφρώς όξινη γεύση, σαν να πρόκειται για συνδυασμό κερασιών και φραμπουάζ. Επειδή οι καρποί του είναι μαλακοί και οξειδώνονται εύκολα, δεν αγγίζονται με τα χέρια, αλλά συλλέγονται με ειδικό είδος υφάσματος μέσα σε ψάθες και μετά αποξηραίνονται. Οι καρποί διατηρούνται με την αποξήρανσή τους σε πλήρη ήλιο, πάνω σε ανοικτούς δίσκους ή με την μηχανική αφυδάτωση, χρησιμοποιώντας μια προοδευτικά αυξανόμενη σειρά με την έκθεσή τους στη θερμότητα, για πάνω από 48 ώρες.

Σημαντικότητα του Goji Berry

Είναι το πρώτο σε περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών άγριο φρούτο. Αποτελεί μία από τις πλουσιότερες πηγές βιταμινών και θρεπτικών ουσιών, γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως «υπερτροφή». Περιέχει υψηλά ποσοστά βιταμινών του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β6), όμως το πιο εντυπωσιακό είναι ότι περιέχει περισσότερο β-καροτένιο από τα καρότα, περισσότερη βιταμίνη C από τα πορτοκάλια, περισσότερο σίδηρο από το σπανάκι, καθώς και βιταμίνη Ε, που σπάνια υπάρχει σε φρούτα. Συγκριτικά το πορτοκάλι περιέχει 750 μονάδες αντιοξειδωτικών, το σπανάκι 1.260 μονάδες, το βατόμουρο 2.400 ενώ το Γκότζι Μπέρι 25.100 μονάδες αντιοξειδωτικών. Επίσης, έχει πάνω από 18 διαφορετικά είδη αμινοξέων, πολλούς υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά, διατροφικές ίνες, ενώ εκτός από σίδηρο περιέχει μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος, το ασβέστιο και ο φώσφορος. Τα σημαντικότερα βιοενεργά του μόρια είναι οι πολυσακχαρίτες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα καροτενοειδή τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική του δράση. Πρόσφατα, ένα διμερές Ν-φερυλολ-τυραμίνης φάνηκε να αποτελεί την πιο άφθονη πολυφαινόλη στα εμπορικά διαθέσιμα φρούτα γκότζι μπέρι (Forino et al.2016). Τα 100 γραμμάρια μεταποιημένου καρπού αποδίδουν περίπου 370 θερμίδες.

Ευεργετικές Ιδιότητες

- ✚ Θεωρείται ότι βελτιώνει την κυκλοφορία του αίματος και προστατεύει από καρδιακές παθήσεις, λόγω των υποχοληστερολαιμικών του ιδιοτήτων. Μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να βοηθήσει και στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως η αθηροσκλήρωση και ο διαβήτης (Mocan, Vlase, Vodnar, et al., 2015).
- ✚ Πιστεύεται ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και αποτοξινώνει τον οργανισμό, καθώς και ότι έχει τονωτική και προστατευτική δράση για το συκώτι και τους νεφρούς.
- ✚ Συμβάλλει στη διατήρηση της καλής όρασης και στη βελτίωσή της. Τα θρεπτικά συστατικά λουτεΐνη και ζεαξανθίνη που περιέχει δρουν προστατευτικά έναντι της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας και του καταρράκτη (Mocan, Vlase, Raita, et al., 2015).

- ✚ Του αποδίδονται αντικαρκινικές ιδιότητες χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυσακχαρίτες και αντιοξειδωτικές ουσίες. Οι πολυσακχαρίτες φαίνεται πως παρεμποδίζουν τις γονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, ενώ ο συνδυασμός τους με τις αντιοξειδωτικές ουσίες πιστεύεται ότι αποτρέπει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών (Zhang, Yu, Cai, & Ke, 2016).
- ✚ Οι φυτικές ίνες του θεωρείται ότι βελτιώνουν τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος και μπορούν να θεραπεύσουν γαστρεντερικές παθήσεις (π.χ. έλκος του στομάχου, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, δυσκοιλιότητα) (Alimi et al., 2010).
- ✚ Φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ευεργετικό για τους ηλικιωμένους. Στη διάρκεια σχετικής έρευνας, παρατηρήθηκε βελτίωση της ψυχικής υγείας και των νοητικών λειτουργιών των συμμετεχόντων, καθώς και της ποιότητας του ύπνου τους. Γενικότερα, πιστεύεται πως ενισχύει τη λίμπιτο, βελτιώνει τη διάθεση, καταπολεμά την αϋπνία και προσφέρει ενέργεια, ενώ θεωρείται ισχυρό αντιγηραντικό και ελιξήριο μακροζωίας.
- ✚ Περιέχει διάφορες φυτοστερόλες, όπως την αντιφλεγμονώδη Β-σιτοστερόλη, η οποία περιορίζει την απορρόφηση της χοληστερόλης και συμβάλλει στη σεξουαλική ευρωστία.
- ✚ Περιέχει «ωφέλιμα» λίπη, όπως ω-6 και λινολεϊκό οξύ, που είναι ρυθμιστές της ορμονικής λειτουργίας.
- ✚ Ανακουφίζει τις εγκύους από την πρωινή ναυτία, ενισχύει το μεταβολισμό και το ανοσοποιητικό σύστημα.
- ✚ Χρησιμοποιείται με επιτυχία για την απώλεια βάρους, καθαρίζει το αίμα και βοηθά στην αποτοξίνωση του σώματος.
- ✚ Επιπλέον, μπορούν να βοηθήσουν τον οργανισμό με τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας ή θεραπείας με ακτινοβολία για τον καρκίνο.
- ✚ Περιέχουν και γερμάνιο, ένα ορυκτό που θεωρείται ότι έχει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες.
- ✚ Τα ασιατικά αυτά φρούτα έχουν την ικανότητα να καταπολεμήσουν τους δύο βασικούς παράγοντες που προάγουν τις καρδιακές παθήσεις, την οξειδωμένη χοληστερόλη και την αυξημένη αρτηριακή πίεση.
- ✚ Το φυτό *Lycium barbarum* μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως φράχτης και να σταθεροποιήσει αμμώδη εδάφη, γιατί σχηματίζει γερές ρίζες και αναπτύσσεται πολύ καλά σε αμμώδη εδάφη.

Πρόσθετες μελέτες για το *Lycium Barbarum*

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τους Shing-Chung Lam et al. βρέθηκε ότι εκχυλίσματα διαλυμένα σε μεθανόλη, από 50 διαφορετικές καλλιέργειες του *Lycium Barbarum* σε διαφορετικές περιοχές της Κίνας είχαν παρόμοια συστατικά υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών. Τα εκχυλίσματα αυτά μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τη μέθοδο του 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλιδραζύλιο (DPPH) και της φασματομετρίας ESIQ-TOF-MS / MS. Ωστόσο, ο μέσος όρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μεθανόλης του *L. barbarum* που συλλέχθηκαν στην περιοχή Ningxia ήταν σημαντικά υψηλότερος από αυτούς των περιοχών Qinghai, Xinjiang, και Gansu. Επιπλέον, η χημική δομή της ένωσης με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα αναγνωρίστηκε το 2-O-β-D-γλυκοκυρανοζυλο-I-ασκορβικό οξύ (Lam et al., 2016). Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ρουμανία από τους Andrei Mocan et al. βρέθηκε ότι τα λουλούδια του *L. barbarum*

αποτελούν πηγή διοςγενίνης, β-σιτοστερόλης και λανοστερόλης. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανάλυση των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών δραστηριοτήτων των λουλουδιών του *L.barbarum* ως μία εναλλακτική πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν κυρίως η ρουτίνη, η κερκετίνη, η ισοκερκετίνη, το χλωρογενικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ και τα φερούλικά οξέα (Mocan, Vlase, Vodnar, et al., 2015). Σε μία τρίτη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τους Xian-Jun Zhang et al. το 2016, βρέθηκε ότι οι πολυσακχαρίτες του *L.barbarum* αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων της σειράς BIU87 μέσω του καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3/AKT (Zhang et al., 2016). Σε μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Θεσσαλονίκη και στην Κρήτη, από τους Γρηγοράκης et al. αναλύθηκε το φαινολικό προφίλ φυτών *L.barbarum* που καλλιεργείται στην Κρήτη. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν υψηλή περιεκτικότητα σε 17 φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένου και του υδροξυκιναμικού οξέος, του cinnamoylquinic οξέος και για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν ο κουμαρικός εστέρας της 3-O-εξόζης της κερκετίνης και η κερκετίνη 3-O-hexose-O-hexose-O-rhamnose (Benchennouf, Grigorakis, Loupassaki, & Kokkalou, 2017). Μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τους Liu Y et al. το 2015, έδειξε ότι οι πολυσακχαρίτες του *L.barbarum* μπορούν να μειώσουν την ηπατοτοξικότητα στα ψάρια μέσω της μείωσης των επιπέδων των ενζύμων GOT, GPT, LDH, αύξησης των αντιοξειδωτικών ενώσεων στα ψάρια και μείωσης των επιπέδων MDA στο ήπαρ.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις ακόλουθες μεθόδους ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boricacid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστικήμπλετηςβρωμοφαινόλης (Bromophenolblue) (ResearchOrganics- Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EthithiumBromide) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) (Merck-Γερμανία)
- H₂O₂ (ΥπεροξειδίουΥδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

Στις παρακάτω μεθόδους εξετάστηκαν 5 εκχυλίσματα των φυτών *Rosa sempervirens*, *Opuntia ficus-indica* και *Lycium Barbarum* με τα 3 από τα οποία να αποτελούν εκχυλίσματα από τον καρπό, την φλούδα και το λουλούδι του *Opuntia ficus-indica*. Το κάθε ένα εκχύλισμα εξετάστηκε διαλυμένο σε μεθανόλη και σε διχλωρομεθάνιο. Με M παρουσιάζονται τα μεθανολικά εκχυλίσματα και με D τα διχλωρομεθανολικά. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι κωδικοί του εκχυλίσματος του *Opuntia ficus-indica* και το τμήμα του φυτού από το οποίο αυτό προέρχεται καθώς και οι κωδικοί για τα εκχυλίσματα του *Rosa sempervirens* και του *Lycium Barbarum*. Για τα εκχυλίσματα του *Rosa sempervirens* και *Lycium Barbarum* με M παρουσιάζεται το μεθανολικό εκχύλισμα και με με D το διχλωρομεθανολικό, ενώ ο αριθμός μπροστά αποτελεί τον κωδικό του εκχυλίσματος.

ΦAD	Fruit Skin of Opuntia Ficus-Indica.
ΦAM	Fruit Skin of Opuntia Ficus-Indica.

<i>ΦΥΔ</i>	Stems of Opuntia Ficus-Indica.
<i>ΦΥΜ</i>	Stems of Opuntia Ficus-Indica.
<i>ΙΒΔ</i>	Fruit of Opuntia Ficus-Indica.
<i>ΙΒΜ</i>	Fruit of Opuntia Ficus-Indica.
<i>4Μ</i>	Fruit of Lycium Barbarum.
<i>4Δ</i>	Fruit of Lycium Barbarum.
<i>5Μ</i>	Fruit of Rosa Sempervirens.
<i>5Δ</i>	Fruit of Rosa Sempervirens.

Πίνακας 4: Οι κωδικοί των υπο μέλετη φυτικών εκχυλισμάτων.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

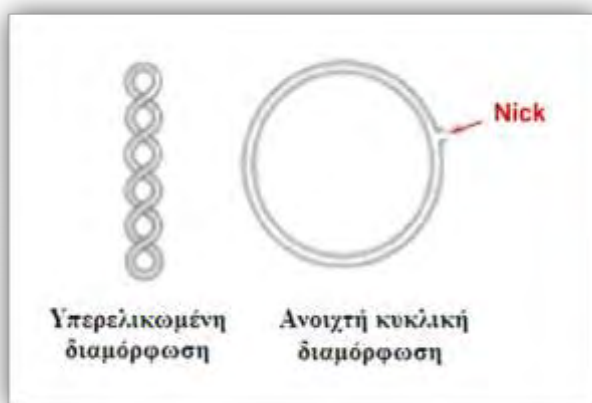
2.2.1 1^η Μέθοδος: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

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. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων των φυτών *L.Barbarum*, *Opuntia ficus-indica* και *Rosa sempervirens* με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων εξετάστηκε έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Οι ρίζες περοξυλίου παρήχθησαν από την θερμική διάσπαση του 2,2 -azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) παρουσία UV ακτινοβολίας. Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια

είναι μικρά κυκλικά δίκλωνα 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).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη 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 αγαρόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα21: Ανοιχτή και υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA. Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks).



← Ανοιχτή κυκλική

← Γραμμική

← Υπερελικωμένη

Φωτογραφία ηηκτώματος αηαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμυδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμυδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Στήλη 2: πλασμυδιακό 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 πλασμυδίου 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 ROO[•] να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμυδιακού DNA.

Απομόνωση πλασμυδιακού DNA

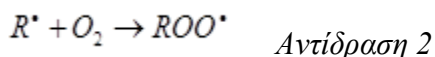
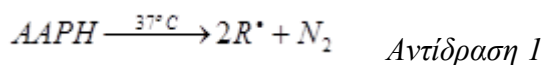
Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την ScharlauChemie (Barcelona, Spain). Το πλασμυδιακό DNABluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli*DH5A. Το πλασμυδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμύδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 μg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμύδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμυδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS] και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμυδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμυδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμυδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, για αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο

με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA. Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1 OD 260→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της AlphaInnotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO[•] 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 μονόκλινα 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

Για όλα τα εκχυλίσματα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια. 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 3 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-20mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 3mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 80% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση. 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).

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Extract- polyphenol	DNA plasmid	H ₂ O ₂
Control	2μl	6μl	-	2μl	-
H ₂ O ₂ + UV	2μl	4μl	-	2μl	2μl

Πίνακας 5 : : Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.

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 ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 55 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. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S) / (S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

Όπου:

S_{control} : το ποσοστό υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

S_0 : το ποσοστό της υπερελικομένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 3 mM AAPH)

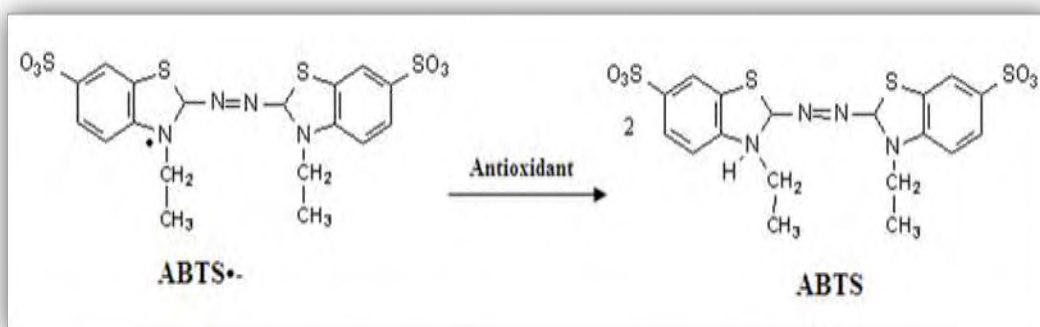
S : το ποσοστό της υπερελικομένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

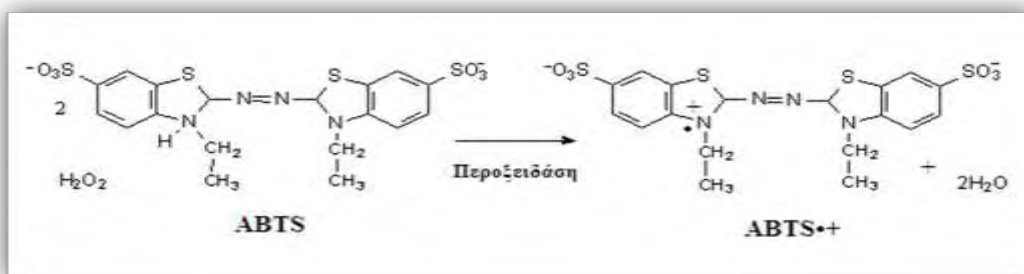
2.2.2^η Μέθοδος: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Η ρίζα του ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα του ABTS^{•+} είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του ABTS^{•+}

ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα του $ABTS^{\bullet+}$.




Εικόνα 23: Παραγωγή της ρίζας του $ABTS^{\bullet+}$ μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H_2O_2 .

Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- ✚ **ABTS (MW: 548.68) (1 mM τελική συγκέντρωση).** Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μ L) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε στο H_2O . Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο (20ml H_2O + 21.94mg ABTS).
- ✚ **H_2O_2 (30 μ M τελική συγκέντρωση).** Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μ M σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μ L) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μ M. Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8.8 M αραιώνουμε με H_2O ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μ M. Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο. Να γίνεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί (να μην μένει πολύ ώρα στον πάγο). Οι αραιώσεις φαίνονται παρακάτω.
- ✚ 1^η αραιώση 1/100 10ul stock 30% + 990ul H
- ✚ 2^η αραιώση 1/146 68ul (1) + 9860ul H_2O

-  **HRP** Ένζυμο (Sigma cat. no. 125K7415). Διαλύουμε 1mg σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Μπορεί να διατηρηθεί στους +4 μέχρι 2 μήνες. Μπορούμε να το διατηρήσουμε στους -80. Κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση (π.χ. 100ul stock + 1900ul H₂O). -Το διάλυμα προετοιμάζεται την ημέρα του πειράματος είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στον πάγο. Κάνουμε μια καμπύλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (π.χ. 25ul, 50ul, 100ul, 200ul). Αντί για καμπύλη μπορούμε να μετρήσουμε κατευθείαν και να κάνουμε αναγωγή στην απορρόφηση 1,201. Π.χ. αν η απορρόφηση είναι 1,546. $1,546/1,201=1,28$. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζουμε όλες τις αναστολές με 1,28.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά erpendorf 1.5 ml, σε όγκο 1 ml στο οποίο εμπεριέχονται ABTS 1 mM, H₂O₂ 30 μM και HRP 6 μM. Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις (π.χ. 0.5, 1, 5 mg/ml) όπως φαίνεται στον πίνακα. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Πίνακας σειράς προσθήκης διαλυμάτων:

3x	Blank	Control	1(C ₁)	2(C ₂)	3(C ₃)	4(C ₄)	5(C ₅)
H ₂ O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Υτελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Πίνακας 6: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. Πίνακας προσθήκης διαλυμάτων καμπύλη ουσίας:

3x	Blank	1(C ₁)	2(C ₂)	3(C ₃)	4(C ₄)	5(C ₅)
H ₂ O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H ₂ O ₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Υτελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Πίνακας 7: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.

Υπολογισμοί

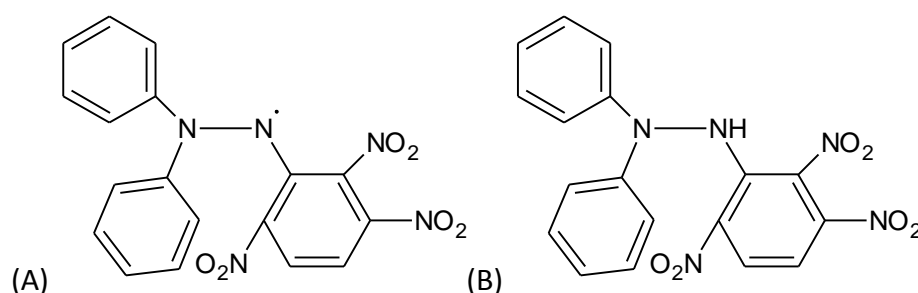
Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\% RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100,$$

όπου RSC (radical scavenging capacity), και απορρόφηση control είναι η απορρόφηση της ρίζας μόνη της.

2.2.3 3^η Μέθοδος: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας με τη μέθοδο DPPH•.

Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Σχήμα 1). Το διάλυμα αυτής της ρίζας, το οποίο έχει μπλε χρώμα, μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e⁻) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Σχήμα 1), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση.



(A) Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλ (DPPH•). (B) Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης.

Πειραματική Μέθοδος

Σε σωλήνες erpendorf του 1ml προσθέτουμε την ουσία, τα μεθανόλη και τελευταίο το DPPH (τελική συγκέντρωση 100μM). Αναδεύουμε καλά με vortex. Επωάζουμε για 20' σε θερμοκρασία δωματίου. Μηδενίζουμε με blank που περιέχει μόνο μεθανόλη. Αρχίζουμε να μετράμε στα 517nm (με το χρονόμετρο να προσέχουμε ώστε ο χρόνος προσθήκης του DPPH να είναι ίδιος με το χρόνο μέτρησης των δειγμάτων). Θα πρέπει να κάνουμε αναγωγή σε μια απορρόφηση για να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα. Π.χ. αν η απορρόφηση είναι 1,546 και θέλουμε να κάνουμε αναγωγή στο 1,201. $1,546/1,201=1,28$. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζουμε όλες τις αναστολές με 1,28. Για να βρούμε το IC50: κανουμε την καμπύλη % αναστολή/συγκέντρωση στο excel και υπολογίζουμε την εξίσωση της καμπύλης από το excel. Ο υπολογισμός της εξίσωσης πρέπει να γίνει από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης (οι τιμές που είναι στο μη γραμμικό τμήμα πρέπει να αφαιρεθούν).

	Blank	Control	Συγκέντρωση1	Συγκέντρωση2	Συγκέντρωση3
Ουσία	-	-	25ul	50ul	100ul
Μεθανόλη	1000ul	950ul	925ul	900ul	850ul
DPPH	-	50ul	50ul	50ul	50ul

Πίνακας 8: Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.

Μπορούμε να βάζουμε την ίδια ποσότητα ουσίας σε όλες τις συγκεντρώσεις κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις.

Διαλύματα

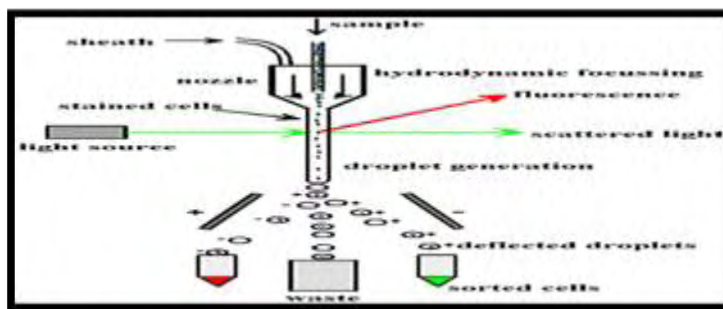
- ✚ Διάλυμα DPPH (stock 2mM). Σε 25.4ml μεθανόλης προσθέτουμε 20mg DPPH (σε ποτηράκι ζέσεως). Αφού διαλυθεί το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Διατήρηση στους +4 έως και 3 ημέρες.

2.2.4 4^η Μέθοδος: Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry) .

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να περιλαμβάνεται και η ταξινόμηση των συστατικών βάσει φυσικών παραμέτρων.

Αρχές της κυτταρομετρίας ροής

Μία δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. 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 το μέγεθος 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 24: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρομέτρου.

Συσκευές κυτταρομετρίας ροής

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων το δευτερόλεπτο, σε "πραγματικό χρόνο", και ορισμένες έχουν επιπλέον τη δυνατότητα ενεργού διαχωρισμού και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί να παράγει την εικόνα ενός κυττάρου, η κυτταρομετρία ροής παρέχει δεδομένα για τα χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων σε λίγο χρόνο. Για την ανάλυση στερεών ιστών θα πρέπει πρώτα να παρασκευαστεί εναιώρημα απομονωμένων (όχι συσσωματικών) κυττάρων.

Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από 5 κύρια συστατικά μέρη:

- μία ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid) η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- ένα οπτικό σύστημα - συνήθως χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου)- υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό λέιζερ)- αερόψυκτα λέιζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488nm), ερυθρού-HeNe (633nm), πράσινο-HeNe, HeCd (υπεριώδες))- λέιζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες)- που παράγει φωτεινά σήματα
- έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion - ADC) - το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον Η/Υ
- ένα σύστημα ενίσχυσης - δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
- έναν Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων.

Τα σύγχρονα όργανα κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά λέιζερ και ανιχνευτές φθορισμού (το τρέχον ρεκόρ για όργανο που κυκλοφορεί στην αγορά είναι 4 λέιζερ και 18 ανιχνευτές φθορισμού). Η αύξηση του αριθμού των λέιζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων και συνεπώς δίνει τη δυνατότητα για πιο ακριβή ταυτοποίηση των πληθυσμών που αποτελούν το στόχο βάσει του φαινοτύπου των τελευταίων. Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφίσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων.

Πειραματική Διαδικασία

Καλλιέργεια κυττάρων

Ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς EA.hy926 θα καλλιεργηθούν και θα πολλαπλασιαστούν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C) και συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα (5%) σε ειδικό επωαστήριο χωρισμένα σε φλάσκες επιφάνειας 25cm². Η καλλιέργεια θα πραγματοποιηθεί για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιέχει DMEM (4 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml) / στρεπτομυκίνης (100 µg/ml) HEPES. Στη συνέχεια θα απομακρυνθεί το θρεπτικό που περιέχει FBS και θα αντικατασταθεί με θρεπτικό υλικό που περιέχει το εκχύλισμα συγκεντρώσεων 2,5 και 10 µg/ml. Στα κύτταρα ελέγχου θα αντικατασταθεί το θρεπτικό υλικό με απλό θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει FBS. Αφού τα κύτταρα επωαστούν και πολλαπλασιαστούν για 24 ώρες με το εκχύλισμα θα ακολουθήσει η διαδικασία συλλογής και προετοιμασίας των κυττάρων για των προσδιορισμό των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Προετοιμασία κυττάρων

Μετά το πέρας 24 ωρών καλλιέργειας των κυττάρων που χορηγήθηκε εκχύλισμα, control και κυττάρων που χορηγήθηκε tert-butyl τα κύτταρα συλλέγονται με τη χρήση θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που διασπά τις πρωτεΐνες με τις οποίες τα κύτταρα συνδέονται στον πάτο της φλάσκας. Συγκεκριμένα αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα προστίθεται 1 ml PBS (ρυθμιστικό διάλυμα) με σκοπό την πλύση των κυττάρων και την απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια απομακρύνεται το PBS και προστίθεται 0,5 ml θρυψίνης 0,25%. Τα κύτταρα επώάζονται στον κλίβανο για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθενται στην φλάσκα 3 ml θρεπτικού υλικού που περιέχει FBS. Πραγματοποιούνται ήπιες αναδεύσεις και τα κύτταρα συλλέγονται σε falcon των 15ml. Ακολουθούν μια σειρά φυγοκεντρήσεων:

- A) Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 300g στους 5°C για 10 λεπτά.
- B) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 3ml PBS, ακολουθεί ήπια ανάδευση των κυττάρων και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g στους 5°C για 10 λεπτά.
- Γ) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 2ml PBS, ακολουθεί ήπια ανάδευση των κυττάρων.
- Δ) Τα κύτταρα από κάθε falcon χωρίζονται ισόποσα σε 2 σωληνάκια και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g στους 5°C για 10 λεπτά. Το ένα σωληνάκι προορίζεται για την μελέτη της γλουταθειόνης και το άλλο για την μελέτη των ελευθέρων ριζών.
- Ε) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 150 µl PBS και 15 µl χρωστικής. Για τον προσδιορισμό της GSH χρησιμοποιείται η χρωστική Mercury Orange και για τον προσδιορισμό των ROS χρησιμοποιείται η χρωστική DCF. Τα κύτταρα αναδεύονται ήπια και επώάζονται στον κλίβανο για 30 λεπτά.
- ΣΤ) Τα κύτταρα ξεπλένονται με 250µl PBS και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g στους 5°C για 10 λεπτά.

Z) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 150 µl PBS. Τα κύτταρα είναι έτοιμα για ανάλυση.

Χρωστικές

A) DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) 400 mM. Η χρωστική DCF χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό προσδιορισμό των ROS. Για την παρασκευή 10 ml της χρωστικής 1,9 mg ζυγίζονται και διαλύονται σε 10ml μεθανόλης.

B) Mercury Orange. Η χρωστική Mercury Orange χρησιμοποιείται για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της GSH. Για την παρασκευή 10 ml της χρωστικής 8 mg ζυγίζονται και διαλύονται σε 10 ml ακετόνης.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Cell Quest Pro.

2.2.5 5^η Μέθοδος: Μέθοδος του XTT

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος 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. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 0,25% και την επαναίωσή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά ml. 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% CO_2 .

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 XTTA και XTTB (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 των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικής σειράς EA.hy 926 υπολογίζεται από τον τύπο:

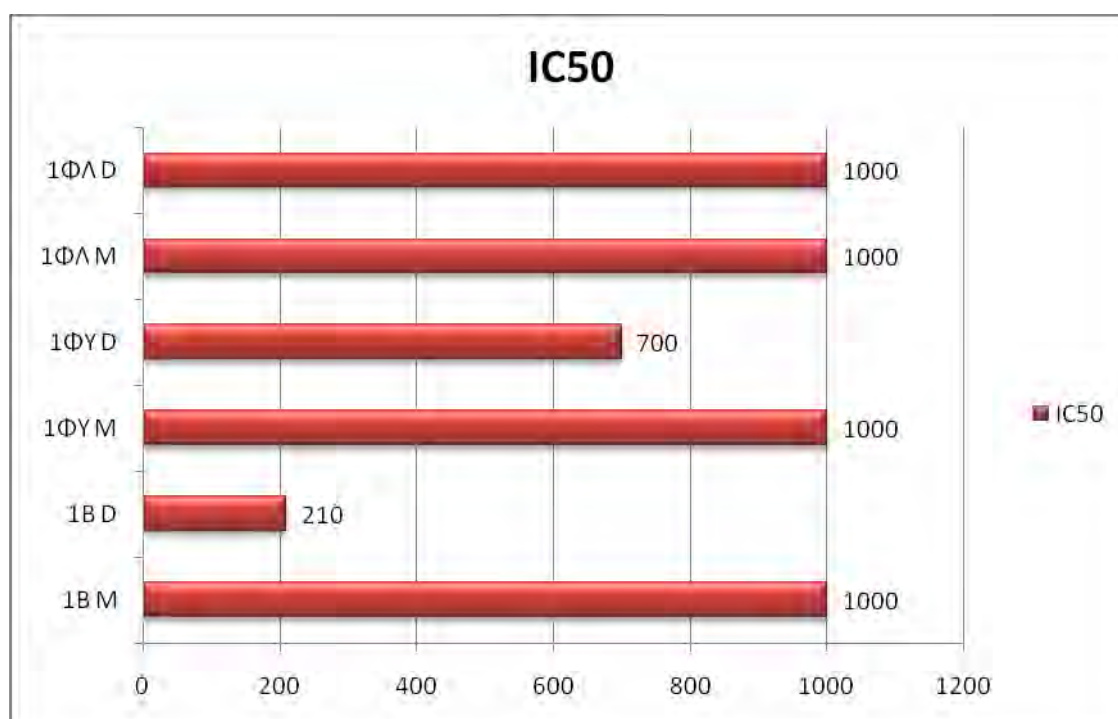
% αναστολή = $[(\text{O.D. αρνητικού μάρτυρα} - \text{O.D. δείγματος}) / \text{O.D. αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$

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.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

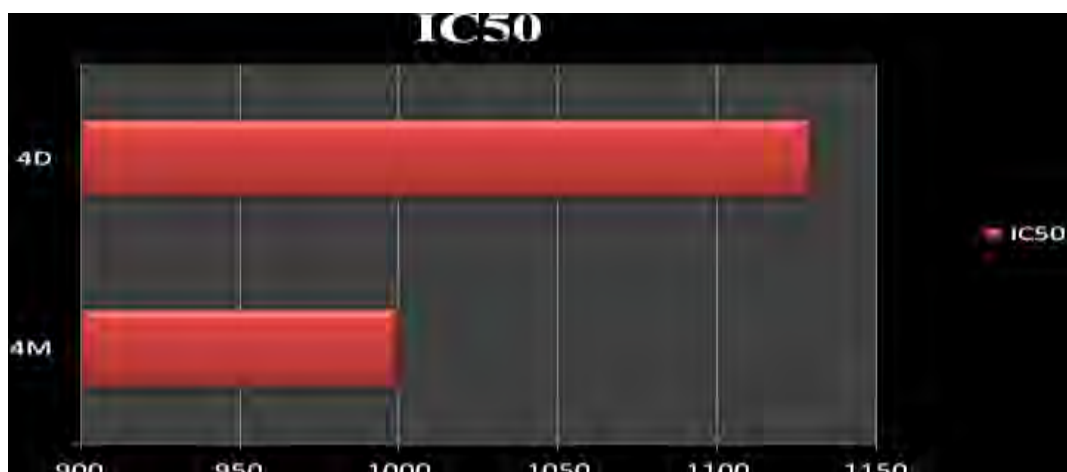
3.1 Αποτελέσματα της μεθόδου εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}.

Στη μέθοδο αυτή εξετάστηκαν και τα 5 φυτικά εκχυλίσματα, τόσο εκείνα που ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη όσο και εκείνα που ήταν διαλυμένα σε διγλωρομεθάνιο. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων, που είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 1 : IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Opuntia ficus-indica* σε µg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό, φαίνεται πως το διγλωρομεθανολικό εκχύλισμα των μίσχων του *Opuntia ficus-indica* έχει τιμή IC₅₀ 730 µg/ml ενώ το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος έχει τιμή IC₅₀ 210 µg/ml. Αυτό σημαίνει πως το φρούτο που έχει διαλυθεί σε διγλωρομεθάνιο έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ήταν μικρότερη όπως προκύπτει από τις τιμές IC₅₀ οι οποίες είναι μεγαλύτερες από 1000 µg/ml.



Διάγραμμα 2 : IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *L.Barbarum* σε μg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται πως τόσο το μεθανολικό όσο και το διγλωρομεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *L.Barbarum* δεν παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση διότι οι τιμές IC₅₀ είναι μεγαλύτερες από 1000 μg/ml.

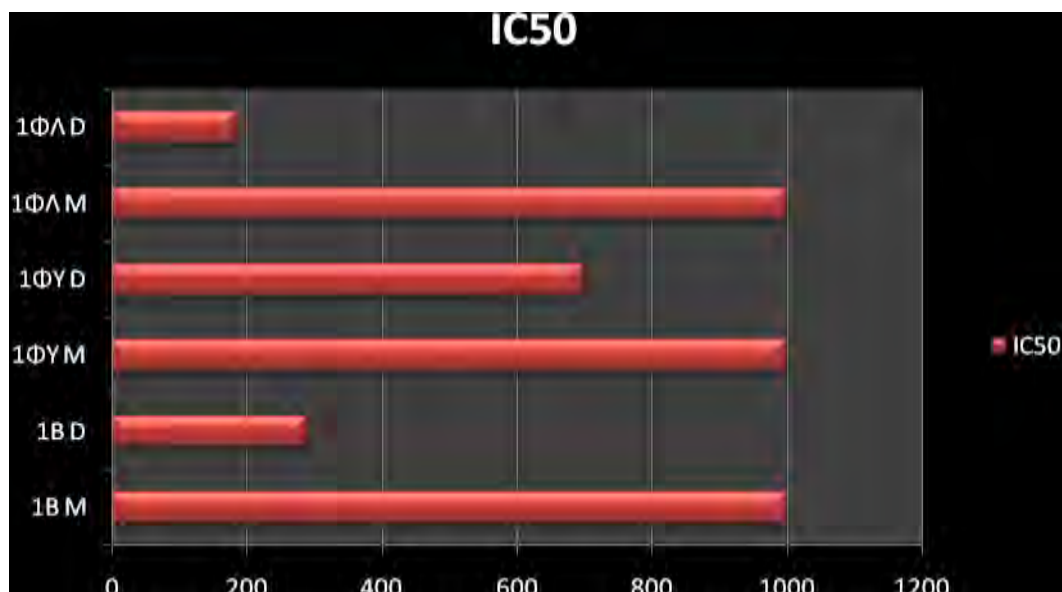


Διάγραμμα 3: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Rosa sempervirens* σε μg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται πως το μεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *Rosa sempervirens* είχε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς η τιμή του IC₅₀ ήταν 130 μg/ml. Επίσης και τα διγλωρομεθανολικά εκχυλίσματα του ίδιου φρούτου έδειξαν αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC₅₀ 270 μg/ml.

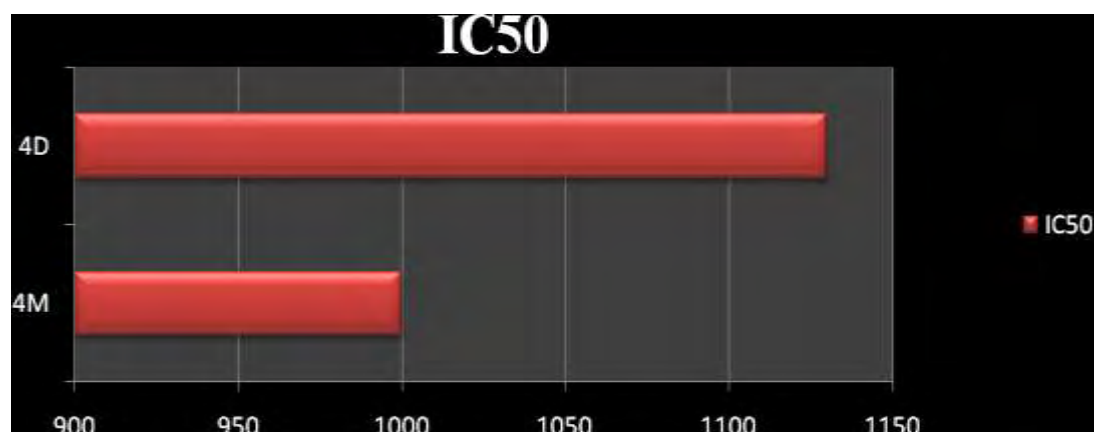
3.2 Αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας με τη μέθοδο DPPH•.

Στη μέθοδο αυτή όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, εξετάστηκαν και τα 5 φυτικά εκχυλίσματα, τόσο εκείνα που ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη όσο και εκείνα που ήταν διαλυμένα σε διγλωρομεθάνιο. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων, που είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 4: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Opuntia ficus-indica* σε µg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό, φαίνεται πως το διγλωμεθανολικό εκχύλισμα της φλούδας του *Opuntia ficus-indica* έχει τιμή IC₅₀ 185 µg/ml, το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος έχει τιμή IC₅₀ 290 µg/ml και τα εκχυλίσματα από το μίσχο έχουν τιμή IC₅₀ 700 µg/ml. Αυτό σημαίνει πως τα εκχυλίσματα που έχουν διαλυθεί σε διγλωρομεθάνιο έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Η αντιοξειδωτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων ήταν μικρότερη όπως προκύπτει από τις τιμές IC₅₀ οι οποίες είναι μεγαλύτερες από 1000 µg/ml.



Διάγραμμα 5: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *L.Barbarum* σε µg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται πως τόσο το μεθανολικό όσο και το διγλωρομεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *L.Barbarum* δεν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση διότι οι τιμές IC₅₀ είναι μεγαλύτερες από 1000 µg/ml.



Διάγραμμα 6: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Rosa sempervirens* σε µg/ml.

Στο διάγραμμα αυτό παρατηρούμε πως το εκχύλισμα του *Rosa Sempervirens* συνολικά έδειξε μεγάλη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα άλλα δύο μελετηθέντα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα, το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *Rosa Sempervirens* παρουσίασε τιμή IC₅₀ 330 µg/ml ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα του ίδιου φρούτου παρουσίασε ακόμη ισχυρότερη τιμή IC₅₀ περίπου στα 85 µg/ml.

3.3 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων *Rosa sempervirens*, *Opuntia ficus-indica* και *Lycium Barbarum* στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.

Τα εκχυλίσματα των *Opuntia ficus-indica* και *Lycium Barbarum* δεν έδειξαν δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO• καθώς οι IC₅₀ τιμές τους ήταν μεγαλύτερες από 1000 µg/ml όπως φαίνεται στα ακόλουθα διαγράμματα. Στη μέθοδο αυτή εξετάστηκαν μόνο τα μεθανολικά εκχυλίσματα λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων των διχλωρομεθανολικών.

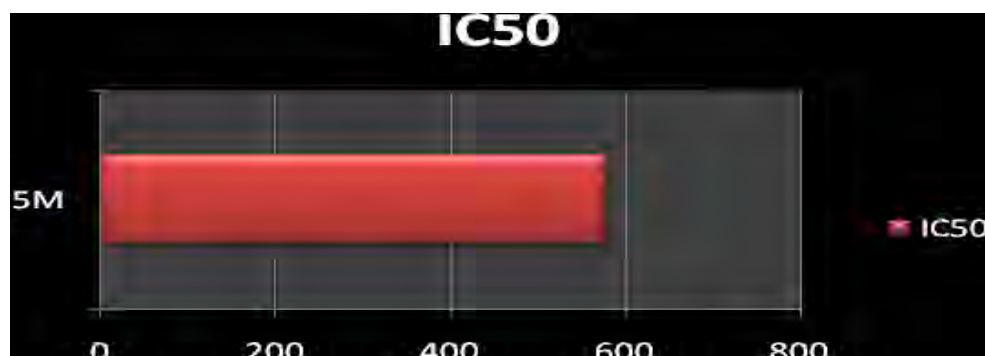


Διάγραμμα 7: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Opuntia ficus-indica* σε μg/ml.



Διάγραμμα 8: IC₅₀ του εκχυλίσματος του *L.Barbarum* σε μg/ml.

Το εκχύλισμα του *Rosa sempervirens* έδειξε δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO^o καθώς η IC₅₀ τιμή του ήταν 570 μg/ml όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα. Στη μέθοδο αυτή εξετάστηκε επίσης μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων του διχλωμεθανολικού.

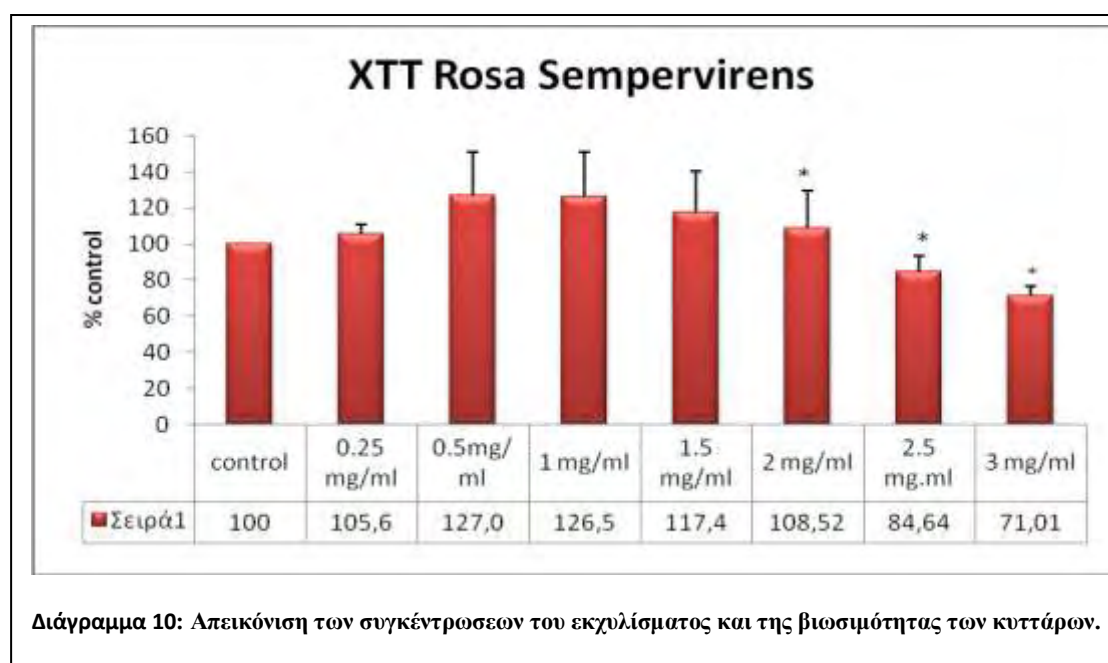


Διάγραμμα 9: IC₅₀ των εκχυλισμάτων του *Rosa sempervirens* σε μg/ml.

Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της δράσης αναστολής

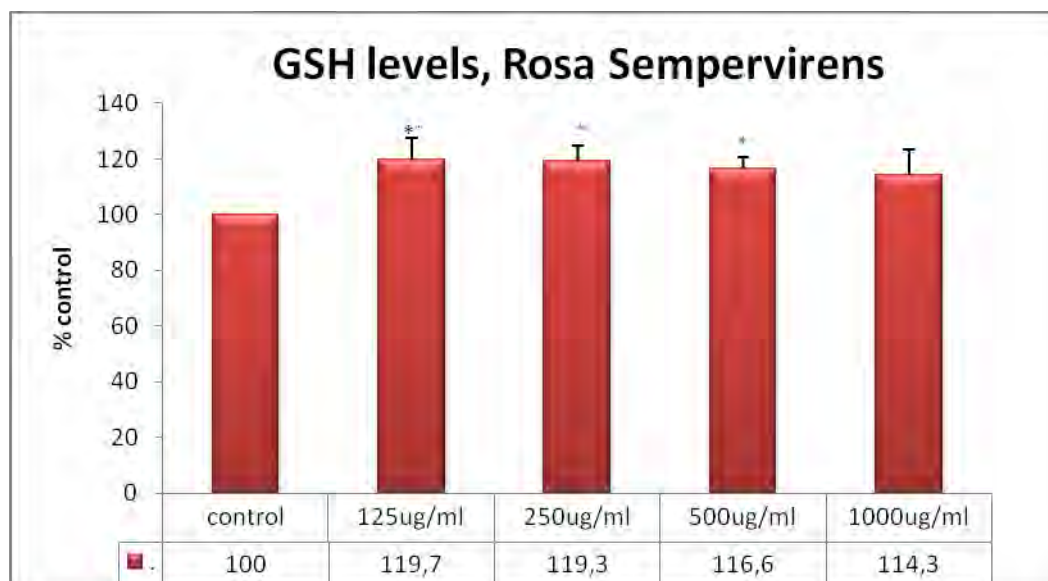
των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επίδρασης του AAPH διαφέρει από εκχύλισμα σε εκχύλισμα με το εκχύλισμα από *Rosa sempervirens* (Διάγραμμα 9) να υπερισχύει. Τα εκχύλισματα από τα *Opuntia ficus-indica* και *Lycium Barbarum* (Διαγράμματα 7 και 8) παρουσίασαν την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχύλισματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

3.4. Αποτελέσματα της μεθόδου του XTT.

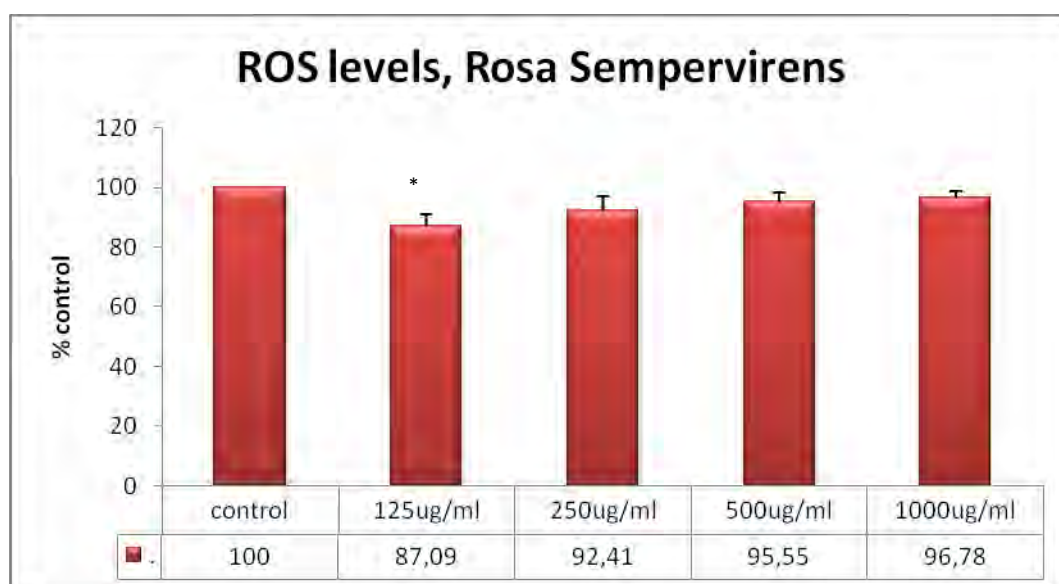


Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως σε συγκέντρωση >2mg/ml του εκχυλίσματος υπάρχει μία τάση για στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

3.5. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής.



Διάγραμμα 11: Απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 12: Απεικόνιση των επιπέδων των ROS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος.

Συνολικά το εκχύλισμα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων της GSH που φτάνει και το 19.7% και αντίστοιχα μια πτώση των ROS της τάξης του 12.91%. Και οι δυο τιμές παρατηρήθηκαν στην μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, τα 125 μg/ml ενώ εν συνεχεία φαίνεται μια τάση να μειωθεί η γλουταθειόνη και να αυξηθούν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες λόγω των σημαντικών αντιοξειδωτικών και αντιμεταλλαξογόνων ιδιοτήτων τους και τους πιθανούς ρόλους τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι μικροβιακές και βακτηριακές λοιμώξεις, οι ιώσεις, ο διαβήτης και η ρευματοειδής αρθρίτιδα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξογόνου δράσης τριών φυτικών εκχυλισμάτων των φυτών *Opuntia Ficus-indica*, *Rosa Sempervirens* και *Lycium Barbarum* μέσω των μεθόδων εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS, DPPH, της αναστολής της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO•) και του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ενδοθηλιακά κύτταρα με προσδιορισμό της GSH και των ROS με κυτταρομετρίας ροής.

Το πρώτο φυτό το οποίο μελετήθηκε ήταν το *Opuntia Ficus-indica*, ένα φυτό της οικογένειας Cactaceae το οποίο έχει, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και σε μεταλαΐνες (Albano et al., 2015)(Esatbeyoglu et al., 2015)(Butera et al., 2002)(Sumaya-Martinez et al., 2011)(Cejudo-Bastante, Chaalal, Louaileche, Parrado, & Heredia, 2014)(R. Castellar et al., 2003)(Yeddes, Cherif, Guyot, Sotin, & Ayadi, 2013). Τα αποτελέσματα της μεθόδου του DPPH, έδειξαν πως το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα της φλούδας του *Opuntia ficus-indica* έχει τιμή IC₅₀ 185 µg/ml, το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος έχει τιμή IC₅₀ 290 µg/ml και οι μίσχοι έχουν τιμή IC₅₀ 700 µg/ml. Δηλαδή το *Opuntia ficus-indica* είχε ισχυρή δυνατότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH. Ωστόσο, τα εκχυλίσματα που έχουν διαλυθεί σε διχλωρομεθάνιο έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι η εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο έχει ως αποτέλεσμα βιοδραστικών ουσιών με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την πλειοψηφία των μελετών στις οποίες φαίνεται πως η εκχύλιση με μεθανόλη είναι καλύτερης απόδοσης σε πολυφαινόλες, ενώ με το διχλωρομεθάνιο απομονώνονται κυρίως τερπένια. Όσον αφορά την ικανότητα του *Opuntia ficus-indica* να εξουδετερώνει τη ρίζα του ABTS, το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα των μίσχων έχει τιμή IC₅₀ 730 µg/ml ενώ το φρούτο του ίδιου εκχυλίσματος έχει τιμή IC₅₀ 210 µg/ml. Αυτό σημαίνει πως το φρούτο που έχει διαλυθεί σε διχλωρομεθάνιο έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Όσον αφορά την επίδραση του *Opuntia ficus-indica* στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO•) φάνηκε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα του *Opuntia ficus-indica* δεν είχε δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξογόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO• καθώς η IC₅₀ τιμή του ήταν μεγαλύτερη από 1000 µg/ml (στη μέθοδο αυτή εξετάστηκαν μόνο τα μεθανολικά εκχυλίσματα λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων των διχλωρομεθανολικών).

Το δεύτερο φυτό το οποίο μελετήθηκε ήταν το *Lycium Barbarum* το οποίο ανήκει στην οικογένεια Solonaceae και στο γένος *Lyceum*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εκχυλίσματα από αυτό το φυτό προκαλούν αύξηση της SOD, αύξηση της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GSHPx) και μείωση της MDA (Alimi et al., 2010). Τα κύρια βιοενεργά συστατικά του *L. barbarum* είναι οι πολυσακχαρίτες (LBP 5-8% του αποξηραμένου φρούτου), τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή και κυρίως η ζεαξανθίνη (0.03-0.5% του αποξηραμένου φρούτου), η μπετανίνη και τα φαινολικά οξέα τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση (Zhang et al., 2016) (Benchenouf et al., 2017) (Mocan, Vlase, Raita, et al., 2015). Η ικανότητα του *L. barbarum* να εξουδετερώνει τη ρίζα DPPH ήταν πολύ μικρή καθώς τόσο το μεθανολικό όσο και το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα δεν παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση διότι οι τιμές IC_{50} είναι μεγαλύτερες από 1000 $\mu\text{g/ml}$. Το ίδιο συνέβη και στην εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS. Επίσης, το εκχύλισμα δεν έδειξε δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO[•] καθώς η IC_{50} τιμή ήταν μεγαλύτερη από 1000 $\mu\text{g/ml}$. Γενικά, στην παρούσα εργασία το εκχύλισμα του *L. barbarum* δεν είχε την επιθυμητή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξογόνο δράση. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη μέθοδο της εκχύλισης, η οποία ίσως να μην είχε ως αποτέλεσμα υψηλή απόδοση σε απομόνωση των πολυφαινολών. Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως το εκχύλισμα αυτό είναι πλούσιο σε ρουτίνη, κερκετίνη, ισοκερκετίνη, γλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και φερουλικά οξέα (Zhang et al., 2016).

Το τρίτο εκχύλισμα το οποίο μελετήθηκε ήταν το *Rosa sempervirens*. Το εκχύλισμα αυτό είναι πλούσιο σε βιταμίνη C, σε γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, κερκετίνη, καμπεφερόλη, τοκοφερόλη, οργανικά οξέα και αμινοξέα (Nadpal et al., 2016) (Roman et al., 2013) (Tumbas et al., 2012). Το υψηλό φαινολικό του φορτίο συνηγορεί με την ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH και ABTS. Συγκεκριμένα, το μεθανολικό εκχύλισμα του *Rosa sempervirens* είχε ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 130 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης και το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα έδειξε αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC_{50} 270 $\mu\text{g/ml}$. Όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS, το μεθανολικό εκχύλισμα του φρούτου του *Rosa sempervirens* είχε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς η τιμή του IC_{50} ήταν 107,5 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης και τα διχλωρομεθανολικά εκχυλίσματα του φρούτου αυτού έδειξαν αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC_{50} 300 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης, το εκχύλισμα του *Rosa sempervirens* έδειξε δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO[•] καθώς η IC_{50} τιμή ήταν 570 $\mu\text{g/ml}$. Λόγω της ισχυρής δράσης του το εκχύλισμα του *Rosa sempervirens* μελετήθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η μέθοδος του XTT έδειξε πως η κυτταροτοξικότητα επέρχεται σε συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος >2,5 $\mu\text{g/ml}$. Η κυτταρομετρία ροής έδειξε πως συνολικά το εκχύλισμα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της GSH που φτάνει και το 19.7% και αντίστοιχα μια πτώση των ROS της τάξης του 12.91%. Και οι δυο τιμές παρατηρήθηκαν στην μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, τα 125 $\mu\text{g/ml}$ ενώ εν συνεχεία φαίνεται μια τάση να μειωθεί η γλουταθειόνη και να αυξηθούν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, γεγονός ίσως οφείλεται στο ότι αρκετές φορές πολυφαινολικά εκχυλίσματα σε μεγαλύτερες ιδιαίτερα συγκεντρώσεις παρουσιάζουν προοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του *Rosa sempervirens* επιβεβαιώνονται και από μία παρόμοια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Jelena D. Nadpal et al (2015). Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε

ότι το *Rosa sempervirens* είχε υψηλή περιεκτικότητα σε κερκετίνη, γαλλικό οξύ και σε πρωτοκατεχοϊκό οξύ. Μία ακόμη μελέτη έδειξε ότι γενικά τα περισσότερα μέλη της οικογένειας *Rosaceae* είχαν υψηλά ποσά κατεχίνης, 3-O-καφεοϊλκινικού οξέος, κερκετίνης-3-O-ρουτινοσίδης και ανθοκυανιδών (Guimaraes et al., 2014). Σε μία άλλη μελέτη από τους Tumbas et al. (2012), φάνηκε πως η συνεργιστική δράση των πολυφαινολών που υπάρχουν σε εκχυλίσματα από *Rosaceae* αυξάνει την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ROS (Tumbas et al., 2012). Βέβαια, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος από το *Rosa sempervirens* ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική και η αντιμεταλλαξογόνος δράση. Οι εφαρμογές της έρευνας όσον αφορά την αντιμεταλλαξογόνο και αντιοξειδωτική δράση αυτού του φυτού θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων, όπως βιοδραστικών τροφίμων και ποτών, είτε άλλου τύπου προϊόντων, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρωμάτων διατροφής.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Hameed, E.-S. S., Nagaty, M. A., Salman, M. S., & Bazaid, S. A. (2014). Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chemistry*, *160*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.060>
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., ... Blando, F. (2015). Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *4*(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Hfaiedh, M., Sakly, M., Zourgui, L., & Rhouma, K. Ben. (2010). Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *17*(14), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.001>
- Ammar, I., Bardaa, S., Mzid, M., Sahnoun, Z., Rebaii, T., Attia, H., & Ennouri, M. (2015). Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.039>
- Benchenouf, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Kokkalou, E. (2017). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 596–602. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265987>
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., ... Livrea, M. A. (2002). Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(23), 6895–6901.
- Castellar, M. R., Solano, F., & Obon, J. M. (2012). Betacyanin and other antioxidants production during growth of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *67*(4), 337–343. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0316-y>
- Castellar, R., Obon, J. M., Alacid, M., & Fernandez-Lopez, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2772–2776. <https://doi.org/10.1021/jf021045h>
- Cejudo-Bastante, M. J., Chaalal, M., Louaileche, H., Parrado, J., & Heredia, F. J. (2014). Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(33), 8491–8499. <https://doi.org/10.1021/jf502465g>
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El

- Kebbaj, M. S., ... Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(9), 14879–14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2015). Betanin—a food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(1), 36–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., & Taviano, M. F. (2003). Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(17), 4903–4908. <https://doi.org/10.1021/jf030123d>
- Guimaraes, R., Barros, L., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *69*(1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0394-5>
- Kim, J., Soh, S. Y., Shin, J., Cho, C.-W., Choi, Y. H., & Nam, S.-Y. (2015). Bioactives in cactus (*Opuntia ficus-indica*) stems possess potent antioxidant and pro-apoptotic activities through COX-2 involvement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(13), 2601–2606. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6968>
- Lam, S.-C., Luo, Z., Wu, D.-T., Cheong, K.-L., Hu, D.-J., Xia, Z.-M., ... Li, S.-P. (2016). Comparison and Characterization of Compounds with Antioxidant Activity in *Lycium barbarum* Using High-Performance Thin Layer Chromatography Coupled with DPPH Bioautography and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*, *81*(6), C1378-84. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13327>
- Mocan, A., Vlase, L., Raita, O., Hanganu, D., Paltinean, R., Dezsi, S., ... Crisan, G. (2015). Comparative studies on antioxidant activity and polyphenolic content of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *28*(4 Suppl), 1511–1515.
- Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D. C., Gheldiu, A.-M., Oprean, R., & Crisan, G. (2015). Antioxidant, Antimicrobial Effects and Phenolic Profile of *Lycium barbarum* L. Flowers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(8), 15060–15071. <https://doi.org/10.3390/molecules200815060>
- Nadpal, J. D., Lesjak, M. M., Sibul, F. S., Anackov, G. T., Cetojevic-Simin, D. D., Mimica-Dukic, N. M., & Beara, I. N. (2016). Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food Chemistry*, *192*, 907–914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.089>
- Roman, I., Stanila, A., & Stanila, S. (2013). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal*, *7*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-73>

- Sumaya-Martinez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillan, E., Garcia-Paredes, J. D., Carino-Cortes, R., Cruz-Cansino, N., ... Alanis-Garcia, E. (2011). Betalain, Acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(10), 6452–6468. <https://doi.org/10.3390/ijms12106452>
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF-kappaB-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1beta-exposed Caco-2 cells. *The British Journal of Nutrition*, *111*(3), 415–423. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002663>
- Tumbas, V. T., Canadanovic-Brunet, J. M., Cetojevic-Simin, D. D., Cetkovic, G. S., Ethilas, S. M., & Gille, L. (2012). Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(6), 1273–1281. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4695>
- Yeddes, N., Cherif, J. K., Guyot, S., Sotin, H., & Ayadi, M. T. (2013). Comparative Study of Antioxidant Power, Polyphenols, Flavonoids and Betacyanins of the Peel and Pulp of Three Tunisian *Opuntia* Forms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *2*(2), 37–51. <https://doi.org/10.3390/antiox2020037>
- Zhang, X.-J., Yu, H.-Y., Cai, Y.-J., & Ke, M. (2016). Lycium barbarum polysaccharides inhibit proliferation and migration of bladder cancer cell lines BIU87 by suppressing Pi3K/AKT pathway. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13963>
- Acuna, U.M.; Atha, D.E.; Ma, J.; Nee, M.N. & Kennelly, E.J. Antioxidant capacities of ten edible north american plants. *Phytother. Res.* **2002**, *16*: 63-65.
- Arts, I.D.J.; Harnack, L.; Gross, M.; Folsom, A. Dietary catechins in relation to coronary heart disease among postmenopausal women. *Epidemiol* **2001**, *12*: 668.
- Baret, A. et al., Pharmacokinetic and anti-inflammatory properties in the rat of superoxide dismutases (CuSODs and MnSOD) from various species. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*: 2755.
- Bennet, R.C. & Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley review no.72. *New Phytol.* **1994**, *127*: 617-633.
- Cao, G.; Sofic, E. & Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*: 749.
- Choi, E.J. ; Chee, K. & Lee, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*: 281.
- Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L. & Kinsella, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **1993b**, *342*: 1103.
- Fang, Y.Z.; Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, *18*: 872.

Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J.X. & O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicol.* **2002**, *177*: 91.

Halliwel, B. Dietary polyphenols: good, bad or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*: 341.

Halliwel, B. et al., Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*: 598.

Herrmann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* **1976**, *11*: 433.

Kessler, M.; Ubeaud, G & Jung, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*: 131.

Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H. & Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*: 571.

Schlesier, K.; Harwat, M.; Bohm, V. & Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad. Res.* **2002**, *36*: 177.

Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aligiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D. J "Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts." *Agric Food Chem.* 2008 Aug 27;56(16):6967-76. Epub 2008 Jul 16.

Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D "Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation." *In Vivo.* 2011 Jul-Aug;25(4):657-62.

Spanou CI, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Aligiannis N, Angelis A, Skaltsounis AL, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Kouretas D. J "Effects of Greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities." *Physiol Biochem.* 2012 Mar;68(1):37-45.

Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM, Kouretas D "Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols" *Food Chem Toxicol.* 2012 Jun;50(6):2155-70.

Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assessment of antioxidant/anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods, *In Vivo*: 741-747

