



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**Εργαστήριο ΒιοΑνόργανης Χημείας**

***Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης***

***Μελέτη τοξικολογικών και βιοδραστικών  
ιδιοτήτων υδατικών εκχυλισμάτων του  
φυτού *Opuntia ficus-indica* (φραγκόσυκο) σε  
*in vitro* συνθήκες***



***ΡΑΠΤΑΚΗ ΗΛΙΑΝΑ***

***Επιβλέπων Καθηγητής : Κουτσολέλος Αθανάσιος***

***ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015***

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMME**

**LABORATORY OF BIOINORGANIC CHEMISTRY**



**Master Thesis**

***In vitro toxicological assessment of extracts  
derived by cactus *Opuntia ficus-indica****

**Raptaki Iliana**

**Master Thesis Supervisor: Athanassios G.Coutsolelos**

**HERAKLION 2015**

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο  
Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων  
του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου



Με την συνεργασία του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και  
Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του  
Παν. Αθηνών



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Αθανάσιος Κουτσολέλος:** (επιβλέπων καθηγήτης)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κατερίνα Κυριακοπούλου:**

Ερευνήτρια, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

**Αριστείδης Τσατσάκης:**

Καθηγητής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης



*Αφιερωμένο στους γλυκούς γονείς μου...*

## *Ευχαριστίες*

Με την ολοκλήρωση και τη συγγραφή της Μεταπτυχιακής μου μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν και στάθηκαν δίπλα μου, προκειμένου να πραγματοποιήσω την προσπάθεια μου στον ερευνητικό τομέα.

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου το χρονικό διάστημα 2014-2015. Προς την Διοικητική Επιτροπή του Ινστιτούτου, την Δρ Κυριακή Μαχαίρα και την Διεύθυνση του Εργαστηρίου που μου πρόσφερε τα μέσα για την εκπόνηση της εργασίας μου, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Πριν από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αθανάσιο Κουτσολέλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με δέχτηκε στο εργαστήριο του στην αρχή ως προπτυχιακή φοιτήτρια και μετά ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια δίνοντας μου την δυνατότητα να διευρύνω τις γνώσεις μου πάνω σε αυτό που ήθελα να ακολουθήσω, την Τοξικολογία. Με το επιστημονικό του κύρος και τη διδακτική του ικανότητα συνετέλεσε τα μέγιστα ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία και ήταν πάντα διαθέσιμος να ασχοληθεί με κάθε απορία μου σχετική με ακαδημαϊκά ζητήματα, εντός και εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας και με κάθε δισταγμό μου, όσο ασήμαντος και να ήταν, για τα επόμενα βήματα των σπουδών μου. Μακάρι όλοι οι φοιτητές να γνωρίζουνε τέτοιους καθηγητές που θα τους συμπεριφέρονται με τόση αγάπη και τόση βοήθεια πραγματικά σαν να ήταν οι ίδιοι οι γονείς τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ Κυριακοπούλου Αικατερίνη, Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Επιβλέπουσα του πειραματικού μέρους της Μελέτης μου, για την ανάθεση του θέματος καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξε στις ικανότητές μου. Η συμβολή της ήταν πραγματικά πολύτιμη, καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού έργου, όπως και στη συγγραφή του. Παρά τις πολλές υποχρεώσεις της ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει και να δώσει λύσεις στις δυσκολίες και τα προβλήματα που αντιμετώπιζα, ενθαρρύνοντάς με πάντα με αισιοδοξία για το καλύτερο αποτέλεσμα. Οι επικοινωνιακές συζητήσεις και οι συμβουλές της κατά το σχεδιασμό και την οργάνωση της πειραματικής διαδικασίας, σε συνδυασμό με την κατανόηση και την οικεία προσέγγισή της, συνέβαλαν καθοριστικά στην πολλή καλή συνεργασία μας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Τσατσάκη Αριστείδη, ο οποίος δέχτηκε να διαβάσει και να κρίνει την παρούσα Μεταπτυχιακή μελέτη και να συμμετέχει στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων Δρ Κατσάνου Ευφροσύνη για την

προσωπική της ανάλωση και την αμείωτη συμπαράσταση καθώς και την άψογη συνεργασία κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Χωρίς την υπερπολύτιμη βοήθεια και τις υποδείξεις της δεν θα ήταν εφικτή η διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης, καθώς με μύησε στα "μυστικά και τη μαγεία" της επιστημονικής έρευνας.

Ευχαριστώ τον Ερευνητή Γιώργο Χαραλαμπίδη για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη σε κάθε δυσκολία και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε. Δεν είναι μόνο ένας άψογος επιστήμονας και συνεργάτης για μένα αλλά ένας πραγματικός φίλος.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου εκείνη την εποχή που συνέβαλαν τα μέγιστα στην ομαλή διεξαγωγή της εργασίας μου, παρέχοντας τις πολύτιμες συμβουλές τους, τόσο στο πειραματικό αλλά και στο θεωρητικό μέρος της εργασίας. Με τον τρόπο τους έκαναν το εργαστήριο ένα πολύ φιλικό περιβάλλον για να δουλεύει κανείς. Ένα ευχαριστώ λοιπόν στην Αγαθή Χαριστού, Σπυροπούλου Αναστασία και Λάσκαρη Βασιλεία αλλά φυσικά και στους Τσακίρακη Άγγελο, Ζούπα Μαρία, Αραπάκη Νίκη, Γιατρόπουλο Αθανάσιο, Κολιόπουλο Γιώργο και Παχίτη Ειρήνη.

Ακολουθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Παν. Αθηνών και ιδιαίτερα τον κ Σκαλτσούνη και τον κ. Ν.Φωκιαλάκη για τη συνεργασία και την ευγενική προσφορά των φυτικών εκχυλισμάτων φραγκόσυκου, απαραίτητο υλικό για την εκπόνηση της εργασίας.

Σε αυτό το σημείο θέλω να αναφέρω ανθρώπους, εκτός του στενού ακαδημαϊκού περιβάλλοντος, που υπήρξαν σημαντικοί πόλοι στη ζωή μου, προσδίδοντας την απαιτούμενη ισορροπία. Θέλω αρχικά να ευχαριστήσω τη σχολική μου παρέα, την παιδική μου παρέα στο χωριό αλλά και τους συμφοιτητές μου στην Σχολή και ελπίζω να είναι δίπλα μου και στο μέλλον, παρά τη μεγάλη απόσταση που θα μας χωρίζει.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ και βαθιά ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου η οποία βρίσκεται πάντα δίπλα μου, μου δίνει ολόψυχα την αγάπη της και με πίστη στις δυνατότητες μου αποτέλεσε αρωγό σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου στηρίζοντας με κάθε δυνατό τρόπο με σκοπό να πετύχω ότι καλύτερο στην ακαδημαϊκή και επαγγελματική μου καριέρα.

# Περιεχόμενα

<b>Κεφάλαιο 1:Περίληψη.....σελ 10</b>
<b>Κεφάλαιο 2:Σκοπός εργασίας.....σελ 13</b>
<b>Κεφάλαιο 3:Εισαγωγή.....σελ 15</b>
<b>3.1 Φυσικά προϊόντα και βιοδραστικότητα φυσικών μορίων.....σελ 15</b>
<b>3.1.1 Βιολογική Δράση αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών.....σελ 15</b>
<b>3.1.1.1 Αντιοξειδωτική δράση φυτών (ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες)....σελ 17</b>
<b>3.1.1.2 Αντιμικροβιακή δράση φυτών.....σελ 17</b>
<b>3.1.2 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις.....σελ 17</b>
<b>3.1.2.1 Πολυφαινόλες.....σελ 20</b>
<b>3.1.2.2 Χημική δομή-κατηγορίες πολυφαινολών .....σελ 20</b>
<b>3.2.1.2 Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών.....σελ 22</b>
<b>3.1.3 Χημειοπροστασία.....σελ 23</b>
<b>3.1.3.1 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.....σελ 24</b>
<b>3.1.3.2 Φυσικοί και διατροφικοί παράγοντες.....σελ 24</b>
<b>3.1.3.3 Πρόγραμμα ανάπτυξης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων.....σελ 24</b>
<b>3.1.4 Φυτό φραγκόσυκο.....σελ 25</b>
<b>3.1.4.1 Περιεκτικότητα ενώσεων του φραγκόσυκου.....σελ 27</b>
<b>3.1.4.2 Το όφελος του φραγκόσυκου στην υγεία.....σελ 29</b>
<b>3.2 Γενικές αρχές τοξικολογίας και τοξικότητα φυσικών μορίων.....σελ 35</b>
<b>3.2.1 Εισαγωγή στην τοξικολογία.....σελ 35</b>
<b>3.2.1.2 Ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη της τοξικολογίας.....σελ 35</b>
<b>3.2.1.3 Αξιολόγηση Τοξικολογικού Κινδύνου.....σελ 36</b>
<b>3.2.1.4 Γενετική Τοξικολογία -Ο ρόλος της γονοτοξικότητας στην καρκινογένεση.....σελ 37</b>
<b>3.2.1.5 In vitro τοξικότητα .....σελ 38</b>
<b>3.2.1.6 Τοξικότητα φυσικών μορίων.....σελ 39</b>
<b>Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι.....σελ 42</b>
<b>4.1 Υλικά.....σελ 42</b>
<b>4.1.1 Φυτικό Υλικό.....σελ 42</b>

<b>4.1.2 Πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές</b> .....	<b>σελ 43</b>
<b>4.1.2.1 Λεμφοκύτταρα</b> .....	<b>σελ 43</b>
<b>4.1.2.2 Κυτταρική σειρά HepG2</b> .....	<b>σελ 44</b>
<b>4.1.2.3 Κυτταρική σειρά HeLa</b> .....	<b>σελ 46</b>
<b>4.1.3 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών</b> .....	<b>σελ 47</b>
<b>4.1.3.1 Υλικά για κυτταρική σειρά HepG2</b> .....	<b>σελ 47</b>
<b>4.1.3.2 Υλικά για κυτταρική σειρά HeLa</b> .....	<b>σελ 47</b>
<b>4.1.3.3 Υλικά για τα Λεμφοκύτταρα</b> .....	<b>σελ 48</b>
<b>4.1.3.4 Λοιπά αντιδραστήρια και υλικά</b> .....	<b>σελ 48</b>
<b>4.1.4 Υλικά Μεθόδων</b> .....	<b>σελ 48</b>
<b>4.1.4.1 Υλικά Μεθόδου Ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay)</b> .....	<b>σελ 48</b>
<b>4.1.4.2 Υλικά MTT Assay</b> .....	<b>σελ 49</b>
<b>4.1.4.3 Υλικά MTS Assay</b> .....	<b>σελ 49</b>
<b>4.1.4.4 Υλικά Μεθόδου γH2AX In Cell Western( ICW)</b> .....	<b>σελ 49</b>
<b>4.2 Μέθοδοι</b> .....	<b>σελ 50</b>
<b>4.2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών</b> .....	<b>σελ 50</b>
<b>4.2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας κυτταρικών σειρών</b> .....	<b>σελ 50</b>
<b>4.2.1.2 Διαδικασίες Κυτταροκαλλιιεργειών</b> .....	<b>σελ 50</b>
<b>4.2.1.2.1 Καλλιέργεια ευκαρυωτικών καρκινικών κυττάρων</b> .....	<b>σελ 50</b>
<b>4.2.1.2.2 Απόψυξη κυττάρων</b> .....	<b>σελ 52</b>
<b>4.2.1.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων ( split)</b> .....	<b>σελ 53</b>
<b>4.2.1.2.4 Κρυοσυντήρηση κυττάρων</b> .....	<b>σελ 54</b>
<b>4.2.1.2.5 Απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων πρωτογενών κυττάρων (MNC) (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα)</b> .....	<b>σελ 55</b>
<b>4.2.1.2.6 Συλλογή και Επίστρωση κυττάρων</b> .....	<b>σελ 56</b>
<b>4.2.1.2.7 Μέτρηση Κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο</b> .....	<b>σελ 57</b>
<b>4.2.1.2.8 Έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue dye exclusion</b> .....	<b>σελ 58</b>
<b>4.2.2 Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης απομονωμένων κυττάρων σε πήκτωμα αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay)</b> .....	<b>σελ 59</b>
<b>4.2.2.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου( Έλεγχος Γονοτοξικότητας)</b> .....	<b>σελ 64</b>
<b>4.2.3 Μέθοδος μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT</b> .....	<b>σελ 66</b>



4.2.3.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου ( Έλεγχος Κυτταροτοξικότητας)	σελ 68
4.2.4 Μέθοδος μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTS	σελ 69
4.2.4.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου ( Μετρηση κυτταροτοξικότητας λεμφοκυττάρων)	σελ 71
4.2.5 Μέθοδος $\gamma$ H2AX In Cell Western (ICW)	σελ 71
4.2.5.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου ICW (έλεγχος κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας)	σελ 72
4.2.6 Στατιστική Ανάλυση	σελ 72
<b>Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα Πειραμάτων</b>	σελ 73
5.1 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT σε <i>in vitro</i> σύστημα	σελ 73
5.1.1 Κύτταρα HepG2	σελ 73
5.1.2 Χρήση κυττάρων HeLa	σελ 77
5.2 Μελέτη εκτίμησης γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet Assay	σελ 80
5.3 Μελέτη της τυχόν προστατευτικής δράσης έναντι του οξειδωτικού stress ή/και της γονοτοξικότητας με τη μέθοδο COMET assay	σελ 81
5.4 Μελέτη κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με την μέθοδο ICW	σελ 82
5.5 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTS σε <i>in vitro</i> σύστημα	σελ 86
5.5.1 Λεμφοκύτταρα	σελ 86
<b>Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα-Συζήτηση</b>	σελ 87
6.1 Προτάσεις για Μελλοντικές Έρευνες	σελ 90
<b>Κεφάλαιο 7: Παραρτήματα</b>	σελ 91
7.1 Παράρτημα Εικόνων	σελ 93
7.2 Παράρτημα Πινάκων	σελ 93
7.4 Παράρτημα Στατιστικής Ανάλυσης	σελ 98
<b>Κεφάλαιο 8: Βιβλιογραφία</b>	σελ 102

## Κεφάλαιο 1: Περίληψη

Η μελέτη των φυτών έχει αυξηθεί θεαματικά τα τελευταία χρόνια λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που εμφανίζουν εκτός από την παραδοσιακή χρήση τους και στην θεραπεία και πρόληψη ασθενειών. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν. Εκτός όμως από τις ευεργετικές τους επιδράσεις καλό είναι να διερευνούνται μελέτες προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές τοξικές τους επιδράσεις στους οργανισμούς.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το φυτό φραγκόσυκο αφού έχει δειχθεί από διεθνείς μελέτες ότι εμφανίζει ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορα συστήματα. Περιέχει αρκετές ουσίες, οι οποίες έχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία όπως υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση, και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αφθονία των βιταμινών και ανόργανων συστατικών σε κάκτους και το φραγκόσυκο δεν αποτελεί εξαίρεση, αφού είναι μια πολύτιμη πηγή θρεπτικών συστατικών και θεωρείται αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό, νευροπροστατευτικό, ηπατοπροστατευτικό κ.α.

Το εκχύλισμα του φραγκόσυκου από λουλούδια (flowers) περιέχει διάφορα φλαβονοειδή, ενώ η φλούδα του φραγκόσυκου (peel), η οποία είναι πλούσια σε βασικά λιπαρά οξέα και λιποδιαλύτες αντιοξειδωτικών, αλλά και οι σπόροι (seeds) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ελαίου. Το εκχύλισμα από το σκληρό μέρος του φυτού (cladodes) περιέχει βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και διάφορα φλαβονοειδή, που είναι αποτελεσματικά μέσα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και μπορεί να μειώσει το επίπεδο της χοληστερόλης, να δράσει κατά του έλκους και να βοηθήσει τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε φλεγμονές καθώς το υδατικό του εκχύλισμα βελτιώνει αξιοσημείωτα την επούλωση του τραύματος. Συνολικά, τα εκχυλίσματα από όλα τα μέρη του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες όπως διάφορα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του φυτού φραγκόσυκου [λουλούδια (flower), σκληρό μέρος του φυτού (cladode), η φλούδα (peel), οι σπόροι (seed) και το σάρκωμα (flesh)] ως προς την τοξική αλλά και προστατευτική τους δράση.

Για τον τοξικολογικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* συστήματα με χρήση ανθρώπινων κυττάρων (κυτταρικές σειρές και πρωτογενείς καλλιέργειες). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 και τα κύτταρα της μήτρας HeLa καθώς και ως πρωτογενή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα λεμφοκύτταρα.

Αρχικά μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στα ηπατικά κύτταρα σε 11 συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν από 5 έως 0.005 mg/L ενώ στα κύτταρα της μήτρας σε 10 συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 2.5

έως 0.005 mg/L με την μεθοδο MTT .Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι κανένα από τα εκχυλίσματα δεν είχε κυτταροτοξική δράση σε κάποια από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στις συγκεκριμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Στην συνέχεια προσδιορίστηκε η γονοτοξική δράση των εξεταζόμενων υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού φραγκόσυκου σε συγκέντρωση 2.5 mg/ml σε πειραματικό μοντέλο των HepG2 κυττάρων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Comet assay). Στα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό, επομένως οι εξεταζόμενες ουσίες δεν εμφανίζουν γονοτοξικότητα.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη με την μέθοδο Comet διερευνήθηκε και η ικανότητα του φυτού φραγκόσυκου να εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό που προκαλούνται από μικρές δόσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου σε *in vitro* συνθήκες σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος ανθρώπου HepG2. Παρατηρήθηκε ότι η επώαση των κυττάρων HepG2 στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ανέστρεψε πλήρως τις αλλοιώσεις που προκλήθηκαν στο DNA ύστερα από την σύντομη επώαση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, υποδεικνύοντας ότι τα εκχυλίσματα του φραγκόσυκου προστατεύουν τα εν λόγω ηπατικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρές.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων με τη χρήση κυττάρων από καρκινικές κυτταρικές σειρές, έγιναν ορισμένα πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση ορισμένων από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1-OF3) και σε πρωτογενή κύτταρα ανθρώπου (λεμφοκύτταρα) με την μέθοδο MTS. Στα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1, OF2 και OF3) σε δύο συγκεντρώσεις 0.625 mg/ml και 1,25 mg/ml παρατηρήθηκε πολύ μικρή θνησιμότητα των κυττάρων στην μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Τέλος εφαρμόστηκε η νέα μέθοδος In Cell Western ( ICW) με την οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας και της γονοτοξικότητας που προκαλεί η μελετούμενη κάθε φορά ουσία. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, ήρθαν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των κλασικών μεθόδων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας που εφαρμόστηκαν, επαληθεύοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα μας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσιάστηκαν στο διεθνές συνέδριο 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research που έγινε στη Βουδαπέστη (Ουγγαρία), 23- 27/8/2015.

## ***Abstract***

*Opuntia ficus Indica* is an important food source with a global distribution and a high nutritional and commercial value. Besides being consumed as food, most portions of the cactus plant have been used in folk medicine, e.g as emollient, moisturizing, cicatrizing, hypocholesterolemic and hypoglycemic agents. In modern times, many studies confirmed the biological efficiency of the plant against several diseases as well. In view of the interest paid overtime on *O.ficus indicia*, we performed a comparative study on the chemical content and the biological activity and toxicity of the different parts of this cactus species ( Cladode, fruit Flesh, fruit peel, flower and seed).

Plant Material was received from local producers of the southern Peloponnese ( Greece). Extraction were carried out in H<sub>2</sub>O using a Branson Ultrasonic bath.

The MTT ( 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to determine viability/cytotoxicity of HepG2 and Hela cells and the Comet assay to determine DNA damage and to investigate potential protective effects of the extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – induced DNA damage.

*Opuntia ficus Indicia* ( OF) extracts were neither cytotoxic to HepG2 and Hela cells nor genotoxic to HepG2 cells at all concentration tested. Moreover, a 24h incubation with OF extracts significantly reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –induced DNA damage in HepG2 cells. As conclusion, the absence of any cytotoxic effect of the extracts in combination to the protective, antioxidant and effect many of them, emphasize the potential role of this plant in the overall well being.

## Κεφάλαιο 2 : Σκοπός Εργασίας

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ο προσανατολισμός του γενικού πληθυσμού προς τα προληπτικά μέτρα για την υγεία. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση και η μελέτη των φυτών και των φυσικών προϊόντων έχει αυξηθεί θεαματικά τα τελευταία 5-10 χρόνια λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που παρατηρούνται από την παραδοσιακή χρήση τους στην θεραπεία και πρόληψη ασθενειών. Όπως ένα νόμισμα έχει δύο πλευρές, έτσι και στη περίπτωση των φυσικών προϊόντων έντονη έρευνα σε αυτόν τον τομέα έδειξε ότι η χρήση φυσικών προϊόντων ενδέχεται να έχει και αρνητικές πτυχές όπως οι τοξικές επιδράσεις που ενδεχομένως προκαλούν σε διάφορους οργανισμούς και στον άνθρωπο. Επομένως ακόμα και για τα φυσικά προϊόντα είναι απαραίτητο να διενεργούνται μελέτες προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές τοξικές τους επιδράσεις.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας που διεξήχθη στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, ήταν ο τοξικολογικός έλεγχος υδατικών εκχυλισμάτων από διάφορα μέρη του φυτού *Opuntia ficus* ευρέως γνωστό ως φραγκόσυκο. Το εν λόγω φυτό έχει δειχθεί από διεθνείς μελέτες ότι εμφανίζει ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορα συστήματα (αντιοξειδωτική δράση, ευεργετική δράση σε έλκος, προστατευτική δράση ενάντια σε ηπατοξικές ουσίες, προστατευτική δράση έναντι γαστρικών αλλοιώσεων). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα του ανωτέρω φυτού που παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Παν. Αθηνών και είναι τα εξής:

- 1) *Opuntia ficus* indicia flower (OF1)
- 2) *Opuntia ficus* indicia cladode (OF2)
- 3) *Opuntia ficus* indicia fruit peel (OF3)
- 4) *Opuntia ficus* indicia seed (OF4)
- 5) *Opuntia ficus* indicia fruit flesh (OF5)



Εικόνα 1: Μέρη του κακτοειδούς φυτού φραγκόσυκου ( *Opuntia Ficus Indica*)

Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν είναι οι εξής:

- ✚ μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT assay,
- ✚ μελέτη επαγωγής οξειδωτικού stress και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο COMET assay,
- ✚ μελέτη της κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με την μέθοδο In Cell Western ICW και μελέτη πιθανής προστατευτικής δράσης έναντι του οξειδωτικού stress ή/και της γονοτοξικότητας με τη μέθοδο COMET assay

## ***Κεφάλαιο 3:Εισαγωγή***

### ***3.1 Φυσικά προϊόντα και βιοδραστικότητα φυσικών μορίων***

#### ***3.1.1 Βιολογική Δράση αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών***

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά αποτελούν μια αξιόπιστη πηγή για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων ( Horeau and Da Silve,1999). Έχουν χρησιμοποιηθεί



στην παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων ή συμπτωμάτων όπως εξάντληση, αδυναμία, κατάθλιψη, μόλυνση, φλεγμονή (Vieria, 2010), δυσπεψία και γαστρίτιδα ( Hajjimehdripor et al, 2010) ή για την ενίσχυση της μνήμης, βελτίωση της κυκλοφορίας, ενίσχυση των αιμοφόρων αγγείων ( Wang et al, 2004).Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα φυτά αποτελούν πηγή χρήσιμων συστατικών με αντιοξειδωτικές ( Zheng and Wang, 2001),

**Εικόνα 2: Τα φυτά στην διάθεση της ιατρικής** αντιμικροβιακές ( Monero et al, 2006 ), αντιφλεγμονώδεις ( Al-Sereiti et al, 1999), αντι-αλλεργικές ( Ito et al, 1998) και αντικαταθλιπτικές ( Takeda et al, 2002) ιδιότητες (Shekarchi et al.,2012). Τα συστατικά και οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν συσχετιστεί με τις παραπάνω ιδιότητες των φυτών είναι κυρίως τα φαινολικά συστατικά και οι τερπενοειδείς ενώσεις (Kiabankt, 2009).

#### ***3.1.1.1 Αντιοξειδωτική δράση φυτών και παραγώγων αυτών (ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες)***

Στις μέρες μας η έρευνα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως των φαινολικών συστατικών, έχει επικεντρωθεί στην μελέτη της βιολογικής τους δράσης, λόγω της χρήσης τους στον τομέα της υγείας όσο και στον τομέα των τροφίμων.

Σε βιολογικό επίπεδο, το οξυγόνο συμμετέχει στον μεταβολισμό των λιπών, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Παρόλα αυτά το οξυγόνο είναι έντονα αντιδρών άτομο και είναι πιθανό να δημιουργήσει μόρια που ονομάζονται «ελεύθερες ρίζες». Μία ελεύθερη ρίζα είναι οποιαδήποτε ένωση υπάρχει ανεξάρτητα και η οποία περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell et al, 1994). Οι ρίζες αυτές έχουν την ικανότητα να επιδρούν αρνητικά στα υγιή

κύτταρα του σώματος, ενώ μπορούν να αντιδράσουν με κυτταρικά λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, οδηγώντας σε τοπική βλάβη και ενδεχόμενη δυσλειτουργία οργάνων και πολύτιμων μορίων όπως το DNA (Aruoma, 1998).

Οι ελεύθερες ρίζες εκτός από τις επιβλαβείς επιδράσεις τους συμμετέχουν και σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Σε χαμηλές έως και μέτριες συγκεντρώσεις παίζουν ένα φυσιολογικό ρόλο στην απόπτωση, αγγειακό τόνο, ρύθμιση ορμονών, ανοσολογική και προσαρμοστική ανταπόκριση στα ένζυμα. (Kelly 1997). Έτσι στον οργανισμό οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και η παραγωγή των ελεύθερων ριζών βρίσκονται σε ισορροπία. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, κατά την οποία υπερισχύει η πρώτη, ορίζεται ως αντιοξειδωτικό στρες (Halliwell & Gutteridge 1998; Sies 1985). Το αντιοξειδωτικό στρες προκαλείται από :

- ✚ Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (εξαιτίας μεταλλάξεων ή επιδράσεων από τοξικούς παράγοντες)
- ✚ Αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών (εξαιτίας έκθεσης των κυττάρων σε διάφορους παράγοντες)

Κατά το οξειδωτικό στρες, η υπεροχή των οξειδωτικών παραγόντων συνήθως οδηγεί σε πρόκληση βλαβών στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επίσης μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων και από το ενδοκυτταρικό φορτίο των ελεύθερων ριζών. Έρευνες έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998)

Ευτυχώς ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να περιοριστεί με φυσικό τρόπο από ποικιλία ευεργετικών συστατικών που είναι γνωστά ως αντιοξειδωτικά και μπορούν να προλαμβάνουν τις αλλοιώσεις που προκύπτουν από την οξείδωση (Stanner et al, 2004). Αυτό εξηγεί τον μεγάλο όγκο των ερευνών γύρω από φυσικά προϊόντα, αφού είναι πλούσια σε φυσικά αντιοξειδωτικά αλλά και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα πιθανά οφέλη της υγείας από φαρμακευτικά φυτά που έχουν την ικανότητα δέσμευσης ενεργών μορφών οξυγόνου. Τα τελευταία χρόνια η χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών έχει αυξηθεί λόγω της ανησυχίας που προκύπτει για την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών καθώς φαίνεται να είναι λιγότερο ισχυρά και περισσότερο τοξικά (Iragashi et al ,1993, Kozłowska et al, 1990). Τα αντιοξειδωτικά αυτά δρουν μαζί με εναλλακτικά φυσικά συστατικά, όπως είναι οι φαινόλες των φυτών παρουσιάζοντας υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτή των συνθετικών (Beutner et al, 2001, Williams et al, 1999) (Antolovich et al, 2001).



### **3.1.1.2 Αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση φυτών**

Η αύξηση της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά και το αναπτυσσόμενο ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα έχουν κατατάξει τα φαρμακευτικά φυτά στην πρώτη γραμμή ως αξιόπιστη πηγή για την ανακάλυψη δραστικών αντιμικροβιακών παραγόντων και πιθανώς ακόμη και νέων κατηγοριών αντιβιοτικών (Saleem et al, 2010). Έχει διαπιστωθεί ότι οι φυσικές ουσίες που απαντούν στα φυτά, έχουν ορισμένες φορές αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές δράσεις. Η παρουσία ενός ευρέως φάσματος φυτοχημικών παραγόντων όπως τα φαινολικά συστατικά έχει προταθεί ότι εμφανίζουν αντιβακτηριακές, αντι-ικές και αντισηπτικές επιδράσεις (Romani et al.,2006) αλλά και προστατεύουν το ανθρώπινο σώμα ενάντια σε οξειδωτικές βλάβες ( Ksouri et al., 2008)

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και τα φυτικά εκχυλίσματα (Tere et al., 2004) μελετώνται για τις αντιμικροβιακές δραστηριότητες ενώ είναι γνωστό ότι πολλά από αυτά διαθέτουν εντομοκτόνες, αντιμυκητιακές, ακαρεοκτόνες, αντιβακτηριακές και κυτταροτοξικές δράσεις (Faleiro et al.,1999). Επομένως οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται στους τομείς της φαρμακολογίας, φαρμακευτικής βοτανολογίας, ιατρικής και κλινικής μικροβιολογίας, φυτοπαθολογίας και βιομηχανίας τροφίμων (Daferera et al,2000) (Celictas et al,2000).

Τέλος η ποικιλόμορφη θεραπευτική δυνατότητα των φυτικών εκχυλισμάτων έχει τραβήξει την προσοχή των ερευνητών για να μελετήσουν την πιθανή αντικαρκινική τους δράση, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι ο μηχανισμός δράσης τους είναι ανόμοιος από το μηχανισμό των κλασσικών κυτταροτοξικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Rajeshet al.,2003) και ως εκ τούτου μπορεί να μην έχουν τις αρνητικές δράσεις των κλασσικών χημικών μορίων.

### **3.1.2 Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις**

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με διάφορα βιολογικά συστήματα δρώντας προστατευτικά σε αυτά. ( Bidlacketal, 2000;Meskinetal, 2000). Για παράδειγμα, επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Ethertonetal.2002; Valkoetall 2007).

Την ίδια στιγμή που από στα εργαστήρια ανακαλύπτονται συνεχώς νέα μόρια που εξοπλίζουν τη φαρέτρα της Ιατρικής, πολλές από τις φυτοχημικές ενώσεις χρησιμοποιούνται από την κοσμητολογία. Τα φαρμακευτικά καλλυντικά (Cosmeceuticals) είναι πλέον γεγονός και η φαρμακευτική κοσμητολογία συναγωνίζεται την κλινική φαρμακολογία για να προσδώσει επιστημονικό υπόβαθρο

ως προς την δράση των καλλυντικών (evidence based pharmaceutical cosmetology).  
([http://www.iama.gr/ethno/files/naturale\\_material\\_medicines.pdf](http://www.iama.gr/ethno/files/naturale_material_medicines.pdf))

Επιπλέον πολλές βιοδραστικές ουσίες (αντιοξειδωτικές ουσίες, προβιοτικά, φυτικές ίνες, λιπαρά οξέα, φυτοστερόλες, πεπτίδια κ.ά.) έχουν σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων , όπου χρησιμοποιούνται στον έλεγχο του βάρους, στον αθλητισμό και γενικότερα στη βιομηχανία τροφίμων της σύγχρονης εποχής. (Κουτελιδάκης, 2015)

Στον Πίνακα 1 παρακάτω, συνοψίζονται ορισμένες βιοδραστικές φυτικές ουσίες και τα οφέλη τους στην υγεία, όπως έχουν αποδειχθεί από την έως τώρα έρευνα.

<b>Βιοενεργά συστατικά</b>	<b>Φυσικές πηγές</b>	<b>Πλεονεκτήματα υγείας</b>
<b>Καροτενοειδή</b>		
<i>α-καροτένιο</i>	καρότα	Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και προστασία κυττάρων από οξειδώσεις
<i>β-καροτένιο</i>	Φρούτα, λαχανικά	Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών
<i>Λουτεΐνη</i>	Πράσινα λαχανικά	Συμβολή στην διατήρηση υγιούς οράσεως
<i>Λυκοπένιο</i>	Τομάτες, σάλτσες	Μείωση του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη
<i>Ζεαξανθίνη</i>	Αυγά, καλαμπόκι, εσπεριδοειδή	Συμβολή στην διατήρηση υγιούς οράσεως
<b>Διαιτητικές ίνες</b>		
<i>Αδιάλυτες φυτικές ίνες</i>	Πίτουρο σίτου	Μείωση κινδύνου καρκίνων του μαστού και του παχέος εντέρου
<i>β-γλυκάνη</i>	βρώμη	Μείωση κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων
<i>Διαλυτές φυτικές ίνες</i>	Φυτό psyllium	Μείωση κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων
<b>Λιπαρά οξέα</b>		
<i>ω-3 λιπαρά οξέα (DHA/EPA)</i>	Τόνος, λιπαρά ψάρια, ιχθυέλαια	Μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών και βελτίωση των διανοητικών και των οπτικών λειτουργιών
<i>Λινελαϊκό οξύ</i>	Ελαιόλαδο, τυριά	Μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων, μέσω βελτίωσης της σύστασης των λιποπρωτεϊνών
<b>Φλαβονοειδή</b>		
<i>Ανθοκυανιδίνες</i>	Φρούτα, λαχανικά	Αντιοξειδωτική δράση (εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, μείωση κινδύνου εμφάνισης εκφυλιστικών ασθενειών)
<i>Κατεχίνες</i>	Τσάι, φρούτα, σοκολάτα	Αντιοξειδωτική δράση
<i>Φλαβονόνες</i>	Φρούτα, λαχανικά	Αντιοξειδωτική δράση
<i>Φλαβόνες</i>	Φρούτα, λαχανικά	Αντιοξειδωτική δράση
<b>Φαινολικά οξέα</b>		
<i>Καφεϊκό οξύ</i>	Φρούτα, λαχανικά	Αντιοξειδωτική δράση
<i>Φερουλικό οξύ</i>	Φρούτα, λαχανικά	Αντιοξειδωτική δράση
<b>Φυτοστερόλες-στανόλες</b>		
<i>Σιτοστερόλη-στανόλη, σιγμαστερόλη, καμπεστερόλη</i>	Σόγια, σιτάρι, καλαμπόκι	Μείωση της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, μέσω της μείωσης των επιπέδων της LDL χοληστερόλης στο αίμα
<b>Πρεβιοτικά-Προβιοτικά</b>		
<i>Φρουτοολιγοσακχαρίτες</i>	κρεμμύδια	Βελτίωση της γαστρεντερικής λειτουργίας
<i>Γαλακτοβάκκλιοι</i>	Γαλακτοκομικά, γιαούρτι	Βελτίωση της γαστρεντερικής λειτουργίας
<b>Φυτοιστρογόνα</b>		
<i>Ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη, ντανζεΐνη)</i>	Καρποί σόγιας και τροφές με βάση τη σόγια	Μείωση των μετα - εμμηνόπαυσιακών συμπτωμάτων, αντιοξειδωτική δράση
<i>Λιγνίνες</i>	Λινάρι, σίκαλη, λαχανικά	Προστασία από τα καρδιαγγειακά, μέσω μείωσης LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων
<b>Ταννίνες</b>		
<i>Προανθοκυανιδίνες</i>	Μούρα, κακάο, σοκολάτα	Βελτίωση λειτουργίας του ουροποιητικού, μείωση κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων
<b>Σουλφίδια</b>		
<i>Αλλυλικά, μεθυλικά, τρισουλφίδια</i>	Σταυρανθή λαχανικά (κουνουπίδι, μπρόκολο)	Μείωση της LDL χοληστερόλης, βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος
<b>Άλλα</b>		
<i>Πρωτεΐνη σόγιας</i>	Καρποί σόγιας, τροφές σόγιας	Βελτιώνουν τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης
<b>Σαπωνίνες</b>	Καρποί σόγιας, τροφές σόγιας	Περιέχουν αντικαρκινικά ένζυμα, μειώνουν την χοληστερόλη

**Πίνακας 1:** Βιοδραστικές φυτικές ουσίες και τα οφέλη τους στην υγεία

### **3.1.2.1 Πολυφαινόλες**

Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlacketal, 2000; Meskinetal, 2000; Σπανού Χ, 2010). Είναι μια πολύπλοκη ομάδα ενώσεων που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα της καθημερινής διατροφής, ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harborne, 1993, Bravo, 1998) .Αποτελώντας τα κυριότερα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου, καθώς είναι πλούσιες στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν (Kris Etherton PM et al, 2002). Γενικά στις πολυφαινόλες οφείλεται το χρώμα και γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων (στυφάδα, τραχύτητα) και το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών, καθώς σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al, 2004, Vermeris & Nicholson, 2006, Crozier et al, 2006). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες σε τρόφιμα και ποικίλα φυτικά παράγωγα εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al, 2005; Manachetal, 2004; Crozieretal, 2006).

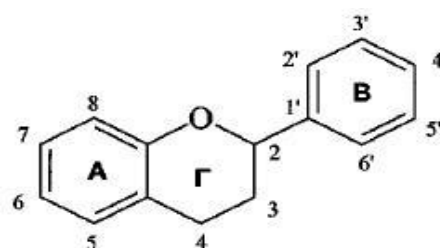
### **3.1.2.2 Χημική δομή-κατηγορίες πολυφαινολών**

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να ορίζεται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Πρόκειται, είτε για απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005). Στη φύση ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλωμένες, είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα τους μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων τους, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη,

ξυλόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι επίσης ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Όσον αφορά τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, αφού άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Διακρίνονται τουλάχιστον σε 10 κατηγορίες (Harborne, 1989) ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους, δηλαδή ανάλογα του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους.

Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή, και τα μη-φλαβονοειδή:

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα, αφού περιλαμβάνουν πάνω από 4000 αναγνωρισμένα στελέχη (Cheynier, 2005). Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθών. Έχουν κοινή δομή, η οποία χαρακτηρίζεται από 2 βενζολικούς (αρωματικούς) δακτυλίους (A και B) που



Εικόνα 3: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου, τριών ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (Γ). Παρουσιάζουν δηλαδή τη δομή (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών λοιπόν περιέχει 15 άτομα άνθρακα. Έχουν σχετικά μικρά μοριακά βάρη και είναι γενικά ευδιάλυτα, ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (αριθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης, κλπ). Οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίστανται στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3-υδροξύ ή 2-οξο ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτυλίους A και B (Vinson, 1998). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανιδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach C. et al, 2004).

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα διακρίνουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες:

**Φαινολικά οξέα:** μπορούμε να τα διακρίνουμε στα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκιναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξάιρεση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών, όπως οι υδρολυόμενες τανίνες (Clifford MN, Scalbert A., 2000). Χαρακτηριστικότερα βενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερούλικό οξύ. Είναι γνωστή η δράση του καφεϊκού οξέος, τόσο στην απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, όσο και στη δραστηριότητα της κασπάσης 3 από πολλές μελέτες. (Lee HJ et al., 2005). (Καραγκίνη Δέσποινα Αικατερίνη, 2013 )

### **3.2.1.2 Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινόλων**

Σε επίπεδο φυτικού οργανισμού, οι πολυφαινόλες θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Ακόμη, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων (Manach C. et al, 2004, Di Carlo G. et al., 1999, Harborne J.B., 1986).

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες και για τον ανθρώπινο οργανισμό (Dew et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν συλλέξει ικανοποιητικό όγκο δεδομένων και έχουν καταλήξει, ότι οι πολυφαινόλες πράγματι διαθέτουν τα εχέγγυα ως παρεμποδιστές ασθενειών. Για το λόγο αυτό υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν, μεταξύ άλλων, την ευεργετική δράση των πολυφαινόλων στις φλεγμονές, στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στην καρκινογένεση, στην οστεοπόρωση και πιθανότατα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και στο διαβήτη (Hertog et al, 1995, Tapiero et al, 2002, Scalbert et al, 2004, Han et al, 2007).

Ως αντιοξειδωτικά οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al, 2005). Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων έγγειται στο γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως “ δεσμευτές” ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η αντιοξειδωτική δράση τους εκδηλώνεται με προστασία της LDL από την οξείδωση, αλλά και με δράση έναντι οξειδωτικών παραγόντων του επιθηλιακού ιστού, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και έτσι, να μειώνεται ο κίνδυνος καρδιοπαθειών



(Halliweel, 1999, Χίου, 2006). Τα φαινολικά συστατικά διαθέτουν ιδανικές χημικές δομές για να “δεσμεύουν” τις ελεύθερες ρίζες και έχει αποδειχτεί *in vitro* ότι είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τις βιταμίνες E και C (Rice-Evans et al, 1997).

Τέλος, τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά των φυσικών φυτικών τροφίμων, κυρίως φρούτων και λαχανικών, έχουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι της καρκινογένεσης, προστατεύοντας το DNA από τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν την καρκινογένεση “μπλοκάροντας” συγκεκριμένες καρκινογενετικές οδούς και επηρεάζοντας τα μοριακά γεγονότα των σταδίων έναρξης, προώθησης και εξέλιξης (Halliwell,1999, Utqiaga & Leighton, 2000, Stocket et al, 2004). Κατά τη Bravo (1998), πολλά είδη των πολυφαινολών (φαινολικά οξέα, υδρολυμένες ταννίνες, φλαβονοειδή) έχουν αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, παρεμβαίνοντας σε πολλά από τα μονοπάτια που οδηγούν στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων και αδρανοποιώντας τους καρκινογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση την έκφρασης της μετάλλαξης γονιδίων και τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων και ενζυματικών συστημάτων.

Έτσι, κάποιιοι από τους μηχανισμούς δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων, σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης, την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, αλλά και την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης. (Καραγκίνη Δέσποινα Αικατερίνη,2013 )

### **3.1.3 Χημειοπροστασία**

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, κάπνισμα, διατροφή, εργασιακό περιβάλλον) (Baer-Dubowskaetal, 2006; DeFlora & Ferguson, 2005) . Με βάση τις επιδημιολογικές μελέτες ο Sporn για πρώτη φορά έθεσε τον όρο χημειοπροστασία του καρκίνου (Sporn 1976). Χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων (Sporn 1976; Hong&Sporn 1997; Kelloffetal.,2004). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που τη διέπουν έδειξαν ότι υπάρχουν στάδια τα οποία μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η

χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ καλή προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shulkaetal, 2004; Surch,2003)

### **3.1.3.1 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Η πρώτη ταξινόμηση έγινε από τον Wattenberg το 1985, με βάση τα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμασιών σε πειραματόζωα (Wattenberg,1985). Έκτοτε ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει εμπλουτίσει την αρχική ταξινόμηση τους ( Kelloff et al, 2004; 2000; Shulka et al, 2004; De Flora et al 2001). Όπως προαναφέρθηκε, η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου βασίζεται στην πρόωμη προστασία, πριν την εμφάνιση του (De Flora &Ferguson, 2005; Smith et al, 2005) και στην μετέπειτα προστασία μετά τη διάγνωση, με σκοπό την αναστροφή και την παρεμπόδιση της περαιτέρω ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η βιοδιαθεσιμότητα τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κ.λ.π. ( De Flora & Ferguson, 2005; Kelloff et al,2005). Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, στους αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου, στους παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου και στους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Stoner et al, 1997; De Flora and Ferguson, 2005)

### **3.1.3.2 Φυσικοί και διατροφικοί παράγοντες**

Η χρησιμοποίηση των φυσικών και διατροφικών προϊόντων ως η κυριότερη πηγή φαρμακευτικών στοιχείων είναι καθιερωμένη. Ωστόσο, η φυσική παρουσία των βιοδραστικών ενώσεων ως συστατικών της διατροφής είναι το κύριο χαρακτηριστικό που καθιστά τις διατροφικές φυτοχημικές ενώσεις πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου, βασίζεται κυρίως στα φυτικά και διατροφικά βιοδραστικά στοιχεία. Πολλά τρόφιμα έχουν μελετηθεί για τις προστατευτικές τους ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες χημειοπροστασίας, απέναντι σε διάφορες μορφές καρκίνου (Kelloff et al,2000; Shukla et al,2004; Surch,2003). Επίσης, ένας μεγάλος αριθμός διατροφικών βιοδραστικών φυτοχημικών ενώσεων έχει μελετηθεί για τις χημειοπροστατευτικές του ιδιότητες (Kelloff et al,2000;Wattenberg, 1992). Ωστόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι διατροφικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες προσλαμβάνονται ως μείγματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι διαφορετικοί παράγοντες που υπάρχουν στα τρόφιμα να αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα και το εύρος των δράσεων των επιμέρους συστατικών. Αυτό καθιστά απαραίτητη την



κατανόηση των επιμέρους ιδιοτήτων των διατροφικών βιοδραστικών στοιχείων, ώστε να είναι πιο εύκολη η κατανόηση των ιδιοτήτων τους ως στοιχεία των τροφίμων.

### 3.1.3.3 Πρόγραμμα ανάπτυξης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Μετά την οριοθέτηση της χημειοπροστασίας και των χημειοπροστατευτικών παραγόντων ως σημαντική προσέγγιση απέναντι στην αντιμετώπιση του καρκίνου (Sporn 1976; Wattenberg,1985), ένας μεγάλος αριθμός μελετών εξετάζει μέχρι και σήμερα την αναζήτηση νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων καθώς και τους μηχανισμούς με τους οποίους δρουν. Με βάση τις μελέτες, το Διεθνές Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) καθιέρωσε ένα πρόγραμμα ανάπτυξης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Το πρόγραμμα αυτό είχε σκοπό να συντονίσει τη μηχανιστική έρευνα με *in vitro* & *in vivo* δοκιμές σε πειραματόζωα των νέων παραγόντων καθώς και τις περαιτέρω κλινικές και τοξικολογικές μελέτες (Crowell,2005; Kelloffert al,2004)

Το 1995 δημιουργήθηκε ένα σχέδιο καθοδήγησης για την ανάπτυξη νέων παραγόντων ή υποψήφιων φαρμάκων (Kelloffert al,1995). Με βάση το σχέδιο, αρχικά γίνεται ο χαρακτηρισμός της δραστηριότητας των υποψήφιων παραγόντων χρησιμοποιώντας *in vitro* μεθόδους (Kelloffert al,1995). Ουσίες φυτικής προέλευσης θα μπορούσαν να αποτελούν νέους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες.

### 3.1.4 Φυτό φραγκόσυκο

Η προέλευση του φραγκόσυκου είναι από το Μεξικό. Η επιστημονική του ονομασία είναι "*Opuntia Ficus Indica*" και ήρθε στην Μεσόγειο από Ισπανούς θαλασσοπόρους το 1500 μ.Χ. Ο Θεόφραστος στην ιστορία των φυτών κάνει λόγο για ένα δέντρο παραπλήσιο με την "Ινδική Συκή" που βγάζει ρίζες από τα φύλλα του και βρίσκεται κοντά στην Οπούντια (Όπους=Πόλη των Σύκων). Είναι ένα φυτό με πολλούς χυμούς και ανήκει στην οικογένεια Cactaceae. Το φραγκόσυκο έφτασε στην



Εικόνα 4: Κακτοειδές φυτό φραγκόσυκο (*Opuntia ficus indica*)

Ευρώπη το 1493, ενώ η πρώτη λεπτομερής περιγραφή έγινε το 1535 από τον Ισπανό Conzalo Fernandez de Oviedo Valdes. ( Eun-Hee Park et al, 1998)

Η φραγκοσυκιά είναι φυτό χυμώδες, δέντρο που φτάνει τα 3 - 5 μέτρα ύψος. Αποτελείται από cladodes πεπλατυσμένα με σχήμα οβάλ, μήκος 30-40 εκατοστά πλάτος 15-25 cm και πάχος 1.5-3.0 cm. Το ριζικό

σύστημα είναι ρηχό και δεν υπερβαίνει τα 30 cm σε βάθος , ενώ φτάνει σε αρκετό μήκος. Ο καρπός είναι σαρκώδης με πολλούς σπόρους του οποίου το βάρος μπορεί να κυμαίνεται από 150-400 γραμ. Το χρώμα είναι διαφορετικό ανάλογα την ποικιλία. Χαρακτηρίζεται από την αξιοσημείωτη προσαρμογή του σε άνυδρα και ημι-άνυδρα κλίματα, σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη. Το οπωροφόρο αυτό φυτό έχει χρησιμοποιηθεί για αιώνες από φυλές του Μεξικού για θεραπεία πολλών ασθενειών. Στην άγρια φύση ευδοκimei σε πολλές περιοχές, ενώ σήμερα καλλιεργείται σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες για εμπορικούς σκοπούς. <http://www.fragosika.gr/>

Κατά την τελευταία δεκαετία, οι ευεργετικές ιδιότητες αυτού του κάκτου έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης από πολλούς επιστήμονες και έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον αρκετών ιδιωτικών εταιρειών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πλούσια σύνθεσή του σε πολυφαινόλες, βιταμίνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και αμινοξέα έχει επισημανθεί με τη χρήση αρκετών εκχυλιστικών μεθόδων. Τα εκχυλίσματα του εμφανίζουν βιολογική δραστηριότητα συμπεριλαμβανομένης της αντιφλεγμονώδους, αντιοξειδωτικής, υπογλυκαιμικής, αντιμικροβιακής και νευροπροστατευτικής δράσης. Λόγω των πολλών θετικών βιολογικών επιδράσεων του , υπάρχει ένα αναμενόμενο όφελος για την υγεία και τις θεραπείες ασθενειών (Margina, Tsatsakis et al, 2015).

Το φραγκόσυκο χρησιμοποιείται στον τομέα της υγείας, σε συμπληρώματα διατροφής και ως συστατικό καλλυντικών με τις μορφές του τσαγιού, μαρμελάδας, χυμού και λαδιού. Επίσης, χρησιμοποιείται ως ένα φυτικό φάρμακο για ποικίλα προβλήματα υγείας σε διαφορετικές χώρες (Kianbakt,2009). Το σκληρό μέρος του φυτού (cactus cladodes), το φρούτο( fruit) αλλά και τα άνθη του (flowers) περιέχουν αντιοξειδωτικά, πολυσακχαρίτες και φυτικές ίνες. Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες έδειξαν ότι τα φυσικά μόρια του κάκτου έχουν υψηλό δυναμικό ενδιαφέρον για την ανθρώπινη υγεία και την ιατρική. Κατά κανόνα, για να κατασκευαστεί ένα φυτικό φάρμακο πλούσιο σε βιοδραστικές ενώσεις πραγματοποιείται εκχύλιση των διαπερατών στερεών υλικών του φυτού. Το φραγκόσυκο είναι γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Naija Hfaiedh et al ,2008). Επιπλέον τα αλκαλοειδή και διάφορα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από τον κάκτο, μαζί με πολυσακχαρίτες που συναντάμε στα εκχυλίσματα και τα μερικώς αποξηραμένα μέρη του φυτού (cladodes) είναι υπεύθυνα για τις αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στο φυτό (Karym El-Mostafa, Youssef El Kharrassi et al, 2014).

### 3.1.4.1 Περιεκτικότητα ενώσεων του φραγκόσκου

Το φραγκόσκου περιέχει σημαντικές ποσότητες ουσιών, όπως ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E, καροτενοειδή, αμινο- οξέα και αντιοξειδωτικές ενώσεις (φαινόλες, φλαβονοειδή), οι οποίες έχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία όπως υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση, και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Flores et al,2014). Αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αφθονία των βιταμινών και ανόργανων συστατικών σε κάκτους και το φραγκόσκου δεν αποτελεί εξαίρεση αφού είναι μια πολύτιμη πηγή θρεπτικών συστατικών, καθώς θεωρείται αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό, νευροπροστατευτικό, ηπατοπροστατευτικό κ.α. Το εκχύλισμα του φραγκόσκου από λουλούδια (flowers) περιέχει διάφορα φλαβονοειδή, ενώ η φλούδα του φραγκόσκου (peel), η οποία είναι πλούσια σε βασικά λιπαρά οξέα και λιποδιαλύτες αντιοξειδωτικών, αλλά και οι σπόροι (seeds) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ελαίου. Το εκχύλισμα από το σκληρό μέρος του φυτού (cladodes) περιέχει βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και διάφορα φλαβονοειδή, που είναι αποτελεσματικά μέσα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και μπορεί να μειώσει το επίπεδο της χοληστερόλης, να δράσει κατά του έλκους και να βοηθήσει τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε φλεγμονές καθώς το υδατικό του εκχύλισμα βελτιώνει αξιοσημείωτα την επούλωση τραυμάτων . Συνολικά, τα εκχυλίσματα από όλα τα μέρη του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες όπως διάφορα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Περισσότερα στοιχεία για το περιεχόμενο των διαφόρων τμημάτων του φυτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 2(Karym El-Mostafa, Youssef El Kharrassi et al, 2014)

<u>Plant tissue</u>	<u>Main Component Identified</u>	<u>Content in mg/100 g</u>
<b><u>Flower</u></b>	Gallic acid	1630–4900
	Quercetin 3- <i>O</i> -Rutinoside	709
	4 Kaempferol 3- <i>O</i> -Rutinoside	400
	5 Quercetin 3- <i>O</i> -Glucoside	447
	6 Isorhamnetin 3- <i>O</i> -Robinobioside	4269
	7 Isorhamnetin 3- <i>O</i> -Galactoside	979
	8 Isorhamnetin 3- <i>O</i> -Glucoside	724
	9 Kaempferol 3- <i>O</i> -Arabinoside	324
	Total phenolic acid	218.8
<b><u>Pulp</u></b>	Isorhamnetin	4.94
	Kaempferol	0.78

	Luteolin	0.84
	Quercetin	9
	isorhamnetin glycosides	50.6
	Kaempferol	2.7
<b><u>Seed</u></b>	Total phenolic acid	48–89
	Feruloyl-sucrose isomer 1	7.36–17.62
	Feruloyl-sucrose isomer 2	2.9–17.1
	Sinapoyl-diglucoside	12.6–23.4
	Total Flavonoids	1.5–2.6
	Total Tannins	4.1–6.6
<b><u>Skin fruits</u></b>	Total phenolic acid	45,700
	Total Flavonoid	6.95
	Kaempferol	0.22
	Quercetin	4.32
	Isorhamnetin	2.41–91
<b><u>Cladode</u></b>	Gallic acid	0.64–2.37
	Coumaric	14.08–16.18
	3,4-dihydroxybenzoic	0.06–5.02
	4-hydroxybenzoic	0.5–4.72
	Ferulic acid	0.56–34.77
	Salicylic acid	0.58–3.54
	Isoquercetin	2.29–39.67
	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	4.59–32.21
	Nicotiflorin	2.89–146.5

Rutin	2.36–26.17
Narcissin	14.69–137.1

**Πίνακας 2: Κατανομή και περιεχόμενο φαινολών και φλαβονοειδών στα διάφορα μέρη του φυτού *Opuntia ficus Indica***

Οι ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών που περιέχονται στο φραγκόσυκο συνδέονται με την αντιοξειδωτική ιδιότητα αλλά και την ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών (Hichem et al, 2010). Για παράδειγμα, το γαλλικό οξύ, που βρέθηκε σε υψηλή περιεκτικότητα στο εκχύλισμα από λουλούδια (flowers), έχει υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα αφού εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και μειώνει σημαντικά τη βλάβη που μπορεί να προκληθεί στο DNA από αυτές. Το γαλλικό οξύ προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα λευχαιμίας, καρκίνου των πνευμόνων και του προστάτη (Lazhar et al, 2008). Το εκχύλισμα του cladode είναι πλούσιο σε μια ουσία που ονομάζεται nicotiflorin και έχει αντιφλεγμονώδη και νευροπροστατευτική δράση, ενώ δρα προστατευτικά έναντι των οξειδωτικού στρες. Το εκχύλισμα από την φλούδα του φυτού (peel) περιέχει μεγάλες ποσότητες της ουσίας isorhamnetin, η οποία ασκεί αντικαρκινική δράση με την αναστολή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF). Επιπλέον αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα από φραγκόσυκο ειδικά από τα φρούτα (fruits), τον πολτό (pulp) και τους σπόρους (seeds) είναι πλούσια σε λινολεϊκό (Ωμέγα 3), ελαϊκό οξύ και παλμιτικό οξύ. Το λινολεϊκό οξύ έχει υποχοληστερολαιμική δράση και ανασταλτικές ιδιότητες κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου σε μεταστατικά κύτταρα, (Galati et al, 2005) ενώ το Ωμέγα-3 λινολεϊκό οξύ είναι γνωστό για τις ευεργετικές του δράσεις σε καρδιαγγειακές ασθένειες, φλεγμονώδεις καταστάσεις, αυτοάνοσες διαταραχές και στον διαβήτη.

### **3.1.4.2 Ευεργετικές δράσεις του φραγκόσυκου στην υγεία**

Το φραγκόσυκο χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό μέσο για να θεραπεύσει επιφανειακά τραύματα (καψίματα, γρατζουνιές) και εφαρμόζεται τοπικά (Deters et al, 2012). Η σύγχρονη επιστήμη έχει ανακαλύψει ότι το φραγκόσυκο έχει πολλά οφέλη για την υγεία. Μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να προστατέψει το ανοσοποιητικό σύστημα και την πρόληψη οξειδωτικού στρες δρώντας ως ένας συλλέκτης ελεύθερων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση προστατεύει τα όργανα και τα κύτταρα. Επιπλέον το φραγκόσυκο μπορεί να μειώσει την χαμηλής πυκνότητας λιπο-πρωτεΐνη LDL σε χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης πράγμα που βοηθάει να μειωθεί η αρτηριακή πίεση.

Τα εκχυλίσματα αλλά και οι μεμονωμένες ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το φραγκόσυκο έχουν χρησιμοποιηθεί ως παραδοσιακό φυτικό φάρμακο. Οι

έως τώρα επιστημονικές εργασίες που έχουν γίνει με πολυάριθμα πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι το φραγκόσυκο εμπλέκεται στη θεραπεία και πρόληψη διαφορετικών ασθενειών. Το θεραπευτικό δυναμικό του έχει προταθεί για ασθένειες όπως το μεταβολικό σύνδρομο (συμπεριλαμβανομένων σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκία ), τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD), ρευματισμούς, εγκεφαλική ισχαιμία, καρκίνος, και ιολογικές και βακτηριακές λοιμώξεις. Είναι πραγματικά ενδιαφέρον, ότι τα παρασκευάσματα από το συγκεκριμένο φυτό μπορούν να εμφανίζουν προληπτική και θεραπευτική δράση ενάντια στον αλκοολισμό και τον εθισμό στο αλκοόλ. Η έρευνα έχει δείξει ότι μπορεί να βοηθήσει στην μείωση των επιπτώσεων της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, αν χρησιμοποιηθεί πριν την κατανάλωση (Karym El-Mostafa, Youssef El Kharrassi et al, 2014).

Στην παραδοσιακή ιατρική, το φραγκόσυκο έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία εγκαυμάτων, τραυμάτων, οιδήματος, υπερλιπιδαιμίας, παχυσαρκίας ενώ τα αλκοολούχα εκχυλίσματα ενδείκνυνται για αντι-φλεγμονώδη, υπογλυκαιμικούς, και αντι-ικούς σκοπούς. Το φραγκόσυκο έχει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις καθώς καταπραΰνει τον ερεθισμό από τσιμπήματα εντόμων. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το φραγκόσυκο είναι χρήσιμο για τη θεραπεία της αρθρίτιδας και της φλεγμονής των οφθαλμών στους μύες και τις αρθρώσεις. Οι αθλητές παίρνοντας φραγκόσυκο έχουν μειώσει μετά την άσκηση τον πόνο των μυών. Το φραγκόσυκο ως φάρμακο κατά του διαβήτη έχει παρατηρηθεί σε κλινικές μελέτες ότι βοηθάει στην σταθεροποίηση των επιπέδων του σακχάρου. Τέλος είναι πιθανός παράγοντας για την καταπολέμηση ορισμένων μορφών καρκίνου (στήθους, προστάτη, στομάχου, πνευμόνων, παγκρέατος) λόγω των φλαβονοειδών συστατικών που περιέχουν.

Συμπερασματικά, οι ευεργετικές δράσεις του φραγκόσυκου συνοψίζονται ως εξής:

- ✚ Κατά του σακχαρώδους διαβήτη
- ✚ Κατά της υπερτροφίας του προστάτη
- ✚ Κατά της υπερχοληστερολαιμίας
- ✚ Κατά της φλεβίτιδας
- ✚ Κατά ορισμένων πνευμονικών παθήσεων
- ✚ Πιθανός παράγοντας για την καταπολέμηση ορισμένων μορφών καρκίνου (στήθους, προστάτη, στομάχου, πνευμόνων, παγκρέατος)
- ✚ Δυναμωτικό στο ανοσοποιητικό σύστημα
- ✚ Ως διουρητικό, αντισπασμωδικό, αντιδιαρροϊκό, αιμολυτικό, καθώς και για την καταπολέμηση της νεφρίτιδας (flower, cladode)
- ✚ Ως κατάπλασμα για την θεραπεία φλεγμονωδών αποστημάτων, την διόγκωση του σπληνός, την ελονοσία, τους μώλωπες και την περιποίηση των τραυμάτων
- ✚ Για την θεραπεία της υπερλιπιδαιμίας και της παχυσαρκίας

(<http://www.astrospalio.gr/uploads/fragosika.pdf>)

Πειράματα σε πειραματόζωα και σε κυτταρικές σειρές (*in vivo* και *in vitro* μελέτες) έχουν δείξει τις θεραπευτικές δυνατότητες των εκχυλισμάτων του φυτού, έχοντας ενισχύσει το ενδιαφέρον της φαρμακολογικής βιομηχανίας για την εξερεύνηση του φραγκόσυκου ως εργαλείο στον εντοπισμό νέων φυσικών βιοδραστικών ουσιών. Οι ευεργετικές δράσεις του φραγκόσυκου συνοψίζονται στον πίνακα 3 παρακάτω: (Karym El-Mostafa, Youssef El Kharrassi et al, 2014).

<u>Biological Activity</u>	<u>Source of Cactus</u>	<u>In Vivo and in Vitro Models</u>	<u>References</u>
<b><u>Hypolipidemic and Hypocholesterolemic</u></b>	Cladodes powder	Rats	(Galati E.M et al 2003)
	Cladodes (Glycoproteine)	Mice	(Oh P-S et al 2006)
	Seeds powder and seeds oil	Rats	(Ennouri et al 2005)
<b><u>Anti-diabetic</u></b>	Capsule: cladode and fruit skin extract	Human	(Deldicque L et al 2013)
	Cactus powder in capsule	Human (Man and women)	(Godard MP et al 2010)
	Aqueous extract of the cladode and fruit and mixture	Rats	(Butterweck V et al, 2011)
	Cladode and fruit skin extract	Man	(Van Proeyen K et

	capsule		al, 2012)
<b><u>Hypoglycemic</u></b>	Polysaccharide extract from the cladode	Rats	(Allarcon-Aguilar et al, 2003)
	Extract powder racket after drying	Rats	(Nunez-Lopez M.A et al, 2013)
<b><u>Anti-Inflammatory</u></b>	Indicaxanthin, from fruit	Human intestinal epithelial cell line (Caco-2 cells) stimulated by cytokine IL-1b	(Tesoriere L et al, 2014)
	Lyophilized extracts of cladodes	Human chondrocyte cultures stimulated with IL-1 $\beta$	(Panico A.M et al 2007)
	Indicaxanthin from Cactus Pear Fruit	Rat Pleurisy obtained by injection of 0.2 ml of $\lambda$ -carrageenin into the pleural cavity	(Allegra M et al 2014)
	Methanol extract of cactus stems (active substance: $\beta$ -sitosterol)	Mice (male)	(Park E.H et al 2001)



	Methanolic extracts of prickly pear fruits (Betalain Indicaxanthin)	In vitro study of the interaction between purified Betalains and HOCL and human myeloperoxidase	(Allegra M et al, 2005)
<b><u>Anti-Inflammatory and Antioxidant</u></b>	Butanol and methanol fruit extract	In vivo studies in gerbils and In vitro studies in cultured mouse cortical cells	(Kim J-H et al 2006)
	Betalain a pigment purified from fresh pulp of cactus pear	Endothelial cells human umbilical vein (HUVEC)	(Gentile C et al, 2004)
	Betanin prickly pear fruit Extracts	Chemical and biological (human RBC, LDL) systems	(Butera et al, 2002)
<b><u>Antioxidant</u></b>	Ethanol extract of the stem	Chemical and biological systems (mouse splenocytes)	(Lee, J-C et al 2002)
	Flavonoid fraction of juice of whole fruits	Rats	(Galati E.M et al, 2005)
	Glycoprotein (90 kDa) isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten	Mice induced by Triton WR-1339	(Oh P-S et al 2006)
		Healthy humans (10 women and 8 men)	( Tesoriere L et al,

<b><u>Antimicrobial</u></b>	Cactus pear fruit	supplemented with cactus pear or Vit C	2004)
	Quercetine ether 3-O-méthyl isolated from <i>Opuntia ficus-indica</i> var. <i>saboten</i>	Primary cultured rat cortical cells	(Dok-Go et al, 2003)
	Methanol extract of cladode	Bacteria: <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i>	(Castillo S.L et al, 2011)
	Methanolic, ethanolic, and aqueous extracts of cladode	Bacteria: <i>Vibrio cholerae</i>	(Sanchez E et al,2010)
	Hexane extracts from flowers	Bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	(Ennouri M et al, 2014)
	Aqueous and alcoholic extracts of cladode	Bacteria: <i>Proteus mirabilis</i>	(Yasmeen R et al, 2012)

**Πίνακας 3: Σημαντικές βιοδραστικές επιδράσεις του φραγκόσυκου σε διάφορα πειραματικά μοντέλα**

Σύμφωνα με τα παραπάνω οι ευεργετικές δράσεις του φυτού φραγκόσυκου είναι πολλές αλλά όπως όλα τα φυσικά προϊόντα εκτός από το να προστατεύουν μπορούν να είναι επικίνδυνα για τα υγιή κύτταρα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Επομένως άσχετα με τα οφέλη των φυσικών προϊόντων πρέπει να εξεταστεί η τοξικότητα τους σε *in vitro* ή/και *in vivo* συστήματα.

## 3.2 Γενικές αρχές τοξικολογίας και τοξικότητα φυσικών μορρίων

### 3.2.1 Εισαγωγή στην τοξικολογία

Η Τοξικολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται γενικά με τα δηλητήρια και τις τοξικές ουσίες και ειδικότερα με:

- ✚ τη μελέτη της φύσης και των ιδιοτήτων τους
- ✚ την επίδρασή τους στα διάφορα βιολογικά συστήματα
- ✚ το μηχανισμό μέσω του οποίου εκδηλώνουν την τοξική τους δράση
- ✚ τη θεραπευτική αντιμετώπιση των δηλητηριάσεων
- ✚ τις μεθόδους ανίχνευσής τους στα βιολογικά υλικά και σε διάφορα άλλα πειστήρια



**Εικόνα 5: Ο Ελβετός «πατέρας» της τοξικολογίας Θεόφραστος Παράκελσος, είχε διατυπώσει την περίφημη φράση "η δόση κάνει το δηλητήριο"**

Δηλητήριο ή τοξική ουσία είναι κάθε ουσία που μπορεί να προκαλέσει βλάβη της υγείας ή και θάνατο όταν με τον οποιονδήποτε τρόπο εισέλθει σε ζώντα οργανισμό.

#### 3.2.1.2 Ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη της τοξικολογίας

Από τα προϊστορικά χρόνια, ο πρωτόγονος άνθρωπος ήταν ενήμερος για τα φυσικά δηλητήρια και τα χρησιμοποιούσε για κατασκευή όπλων (επάλειψη των βελών των τόξων με δηλητήρια). Στην Αρχαία Αίγυπτο βρέθηκε ο Πάπυρος του Ebers (1500 π.Χ) με συνταγές δηλητηρίων, ενώ στην Αρχαία Ελλάδα ο Σωκράτης (470 - 399 π.Χ) δηλητηριάζεται με κώνειο. Στα Αρχαία κείμενα του Ομήρου αναφέρεται ότι ο Οδυσσέας προμηθεύεται από την Εφύρα δηλητήριο για τα βέλη του και ο Ερμής σώζει τον Οδυσσέα από τα φίλτρα της Κίρκης με ειδικό αντίδοτο. Ο Μιθριδάτης (123 - 63 π.Χ) πειραματιζόταν με εγκληματίες για ανακάλυψη αντιδότην και ο εθισμός που παρατηρήθηκε μετά από συνεχή λήψη δόσεων δηλητηρίων ονομάστηκε Μιθριδατισμός.

Στα Ρωμαϊκά και μεσαιωνικά χρόνια αναφορές υπάρχουν για χρήση δηλητηρίων για εγκληματικές ενέργειες κατά πολιτικών αντιπάλων, αδύνατη διάγνωση των δηλητηριάσεων (μόνο νεκροψία), το φάνειο ύδωρ, τα δηλητήρια των Βοργιών, το αρσενικό και οι ενώσεις του καθώς και για μείγματα φυτικών δηλητηρίων.

Ο Διοσκουρίδης το 50 π.Χ σύμφωνα με την μελέτη του «Materia Medica» ταξινομεί τα δηλητήρια ανάλογα με την προέλευση τους σε ζωικά, φυτικά, μεταλλικά

και περιγράφει την θεραπεία της δηλητηρίασης. Ο Μαϊμονίδης (1135 – 1204 μ.Χ) μελετά τα δηλητήρια και τα αντίδοτά τους. Ο Παράκελσος(1493- 1541 μ.Χ) αναφέρεται στη σημασία της δόσης στη διάκριση μεταξύ θεραπευτικού και τοξικού αποτελέσματος. Τέλος ο Ισπανός Orfila σύμφωνα με την μελέτη του «TraitedeToxicologie» ( 1815 μ.Χ) κατατάσσει τα δηλητήρια σε 6 κατηγορίες και προτείνει τρόπους ανίχνευσης των τοξικών ουσιών συμβάλλοντας στη Δικαστική Τοξικολογία.

Ορισμένοι από τους κλάδους της σύγχρονης τοξικολογίας είναι οι εξής:

- ✚ Δικαστική Τοξικολογία
- ✚ Κλινική Τοξικολογία
- ✚ Αναλυτική Τοξικολογία
- ✚ Περιβαλλοντική Τοξικολογία - Οικοτοξικολογία
- ✚ Βιομηχανική και Επαγγελματική Τοξικολογία
- ✚ Γενετική Τοξικολογία
- ✚ Ρυθμιστική (regulatory) Τοξικολογία

### **3.2.1.3 Αξιολόγηση Τοξικολογικού Κινδύνου**

Η διαδικασία της *τοξικολογικής εκτίμησης κινδύνου* είναι η μεθοδολογία εκείνη με την οποία οι χημικές ουσίες, αξιολογούνται ως προς τις πιθανές επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου (Frazier, J.M et al 1990) .Αποτελείται από πολλά και σαφώς καθορισμένα στάδια που περιλαμβάνουν: τον προσδιορισμό των βλαπτικών ιδιοτήτων μιας ουσίας, την εκτίμηση της έκθεσης σε αυτήν αλλά και τον χαρακτηρισμό του κινδύνου μετά την έκθεση (Blaauboer, B.J et al 2001; Blaauboer, B.J Altern Lab Anim 2002; Blaauboer, B.J,2002). Μέχρι σήμερα η βασική μεθοδολογία, για την εκτίμηση των κινδύνων από υφιστάμενες και νέες χημικές ουσίες και την τοξικολογική αξιολόγηση, βασίζεται σε πειράματα στα ζώα. Η χρήση των ζώων ήδη εδώ και αρκετά χρόνια αλλά και σήμερα υφίσταται κριτική, τόσο για ηθικούς, όσο και για επιστημονικούς λόγους.

Τα σημαντικότερα επιμέρους στοιχεία της διαδικασίας αξιολόγησης του κινδύνου για την χρήση μιας χημικής ουσίας είναι:

- ✚ Ο προσδιορισμός των βλαπτικών ιδιοτήτων της εκάστοτε ουσίας κατά τον οποίο γίνεται ο προσδιορισμός της εγγενούς ικανότητας μιας χημικής ουσίας να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις, και η ποσοτική περιγραφή της φύσης αυτών των επιπτώσεων. Η διαδικασία ταυτοποίησης της επικινδυνότητας περιλαμβάνει δοκιμές τοξικότητας και αυστηρή συγκέντρωση των διαθέσιμων αποτελεσμάτων τόσο επιδημιολογικών και τοξικολογικών, όσο και μελετών δομής και δραστηριότητας.

- ✚ η εκτίμηση της δόσο-απόκρισης ή σε γενικές γραμμές ο χαρακτηρισμός του κινδύνου όπου είναι η ημιποσοτική αξιολόγηση της φύσης των δυσμενών επιπτώσεων μετά από έκθεση σε μία χημική ουσία, και όπου είναι δυνατόν να γίνει η εκτίμηση της δόσο-απόκρισης
- ✚ η εκτίμηση της έκθεσης όπου είναι η ημιποσοτική αξιολόγηση της πιθανότητας έκθεσης του ανθρώπου, ή άλλου οργανισμού, ή συστήματος ή υποπληθυσμού σε μια χημική ουσία (Frazier, J.M., 1990) και
- ✚ ο χαρακτηρισμός του κινδύνου όπου είναι η ημι-ποσοτική εκτίμηση των πιθανοτήτων για την εμφάνιση δυσμενών επιπτώσεων αλλά και την σοβαρότητα και την διάρκεια τους σε ένα δεδομένο πληθυσμό, υπό προκαθορισμένες συνθήκες έκθεσης.

#### **3.2.1.4 Γενετική Τοξικολογία – Ο ρόλος της γονοτοξικότητας στην καρκινογένεση**

Η γενετική τοξικολογία είναι ο κλάδος της τοξικολογίας που ασχολείται με τους γονοτοξικούς παράγοντες και τις επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και ειδικότερα με την έρευνα των μηχανισμών μεταλλαξιγένεσης, την ανάπτυξη και εφαρμογή δοκιμασιών για την ταυτοποίηση και ανάλυση γονοτοξικών παραγόντων, τη μελέτη των νοσημάτων που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις και τον προσδιορισμό του κινδύνου από την έκθεση σε αυτούς (Klaassen, C.D,1996). Ένα μεγάλο μέρος των νοσημάτων που αφορούν τον άνθρωπο συσχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με τη γενετική τοξικολογία (Hayes,AW, ,1994). Οι μεταλλάξεις στα γαμετικά κύτταρα είναι υπεύθυνες για την πρόκληση κληρονομικών γενετικών νοσημάτων, ενώ οι μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα μπορεί να προκαλέσουν πληθώρα νόσων με σημαντικότερο αντιπρόσωπο τον καρκίνο.

Η σημαντικότητα των μελετών γονοτοξικότητας απορρέει κυρίως από τη συσχέτιση της γονοτοξικότητας με την καρκινογόνο δράση των ουσιών και την αδυναμία καθορισμού ασφαλούς ορίου έκθεσης. Η συσχέτιση μεταξύ γονοτοξικότητας και καρκινογένεσης είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια παρόλο που οι γονοτοξικές ουσίες δεν είναι κατά ανάγκη καρκινογόνες, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των καρκινογόνων ουσιών είναι γονοτοξικές (Grunau,C et al 2001; Miller, J.A 1977; Baxevanis, A. 2001; Seo, K,Y, Jelinski, S.A and Loechler 2000).

Οι καρκινογόνες ουσίες διακρίνονται στις γονοτοξικές και μη γονοτοξικές. Σε αντίθεση με τις μη γονοτοξικές, οι γονοτοξικές ουσίες προκαλούν βλάβη στο DNA. Η πλειοψηφία των γονοτοξικών ουσιών είναι και καρκινογόνες καθώς μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις στα ογκογονίδια και στα γονίδια καταστολής όγκων διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία μεταξύ διπλασιασμού και απόπτωσης των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι μελέτες γονοτοξικότητας θεωρούνται ως «βραχυχρόνιες» δοκιμασίες για την καρκινογένεση (Anderson D, 1990).

Σύμφωνα με τις αρχές της γενετικής τοξικολογίας αλλά και τις εισηγήσεις διαφόρων οργανισμών η πλήρης διερεύνηση της πιθανής γονοτοξικής δράσης μιας ουσίας απαιτεί τη μελέτη πολλών διαφορετικών παραμέτρων και περιλαμβάνει ένα σύνολο διαφορετικών *in vitro* και *in vivo* δοκιμασιών.

Για την μελέτη της γονοτοξικότητας υπάρχει μια σειρά δοκιμασιών, *in vitro* και *in vivo*. Οι *in vitro* δοκιμασίες είναι απλούστερες, ταχύτερες, χρησιμοποιούν απλά βιολογικά συστήματα όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και κυτταροκαλλιέργειες και οι πληροφορίες που προκύπτουν από τις δοκιμασίες αυτές αποτελούν το πρώτο επίπεδο στη διερεύνηση της τοξικότητας μιας ουσίας. Οι *in vivo* μελέτες πραγματοποιούνται σε πειραματόζωα και η τελική απόκριση είναι αποτέλεσμα της συνολικής φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής συμπεριφοράς μέσα σε έναν ανώτερο οργανισμό. Τέλος, σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση επιδράσεων στον άνθρωπο αποτελούν οι επιδημιολογικές μελέτες.

### 3.2.1.5 *In vitro* τοξικότητα

Η ανάπτυξη και επέκταση μη-γονοτοξικών, *in vitro*, μελετών τοξικότητας ξεκίνησε από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Σε γενικές γραμμές, η *in vitro* τοξικότητα είναι η χρήση δοκιμασιών που δεν χρησιμοποιούν σπονδυλωτά πειραματόζωα, ως πειραματικά μοντέλα. Η *in vitro* μελέτη της τοξικότητας αποτελεί την μελέτη των τοξικών επιδράσεων, όπως παρατηρούνται σε ένα σύστημα που βρίσκεται έξω από το σώμα ενός ολόκληρου οργανισμού. Οι δοκιμασίες αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν οποιονδήποτε από τους κατώτερους οργανισμούς (έλμυνθες και βακτήρια) έως καλλιεργημένα κύτταρα και υπολογιστικά μοντέλα. Ο όρος *in vitro* αναφέρεται κυρίως στο χειρισμό των κυττάρων και των ιστών έξω από το σώμα και κάτω από συνθήκες που να υποστηρίζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη σταθερότητα τους (Castell, J.V., et al 1997). Η *in vitro* κυτταρο-τοξικολογία ή κυτταροτοξικότητα αναφέρεται στη χρήση τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας στις έρευνες τοξικολογίας. Τα μοντέλα κυττάρων μπορεί να είναι είτε καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων ή αθανатоποιημένων και μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών ή βλαστικών κυττάρων. Είναι απαραίτητο να υπάρχουν βασικές γνώσεις για την τοξικολογία των χημικών ουσιών που μελετούνται όπως η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση τους.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των *in vitro* μελετών είναι:

- ✚ Η δυνατότητα χρήσης κυττάρων και ιστών του ανθρώπου, αποφεύγοντας έτσι τις διαφορές ανάμεσα στα είδη.
- ✚ Η μεγαλύτερη απλότητα σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα γεγονός που καθιστά ευκολότερη την λήψη αποτελεσμάτων.

- ✚ Η μεγαλύτερη ευκολία στην εφαρμογή σύγχρονων, βιοχημικών, κυτταρικών και μοριακών τεχνικών σε μηχανιστικές μελέτες.
- ✚ Η δυνατότητα μελέτης των συστατικών των πιθανών οργάνων-στόχων αλλά στοχευόμενων συστημάτων είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό.
- ✚ Η δυνατότητα εκπόνησης μελετών για μείγματα χημικών ουσιών.

Οι εφαρμογές των *in vitro* μεθόδων τοξικολογίας αντιμετωπίζουν και ορισμένες δυσκολίες-μειονεκτήματα όπως:

- ✚ η κυτταρική καλλιέργεια είναι ένα απλοποιημένο σύστημα και δεν μπορεί να αντικατοπτρίσει την πολυπλοκότητα της λειτουργίας ενός ολόκληρου οργανισμού.
- ✚ τα *in vitro* συστήματα δεν διαθέτουν κρίσιμες λειτουργίες του οργανισμού (π.χ. ορμόνες, ανοσοποιητικό σύστημα, νευρικό σύστημα) με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναπαράγουν τη βιοδυναμική ολόκληρου του ανθρώπου.
- ✚ δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς και στην προβολή των αποτελεσμάτων σε πιθανές επιδράσεις στον άνθρωπο η οποία απαιτεί γνώση της φαρμακοκινητικής της εκάστοτε χημικής ένωσης.
- ✚ οι περισσότερες *in vitro* δοκιμασίες, μέχρι σήμερα, περιορίζονται σε δοκιμές οξείας τοξικότητας και όχι στα βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της τοξικότητας με επαναλαμβανόμενες δόσεις.
- ✚ πολλά τεχνικά προβλήματα όπως το είδος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες, τη διαλυτότητα των χημικών ουσιών που μελετούνται καθώς και την περίοδο έκθεσης, που μπορεί να μην είναι πάντα επαρκής (Ανδρέας Κρητικός, 2014).

### 3.2.1.6 Τοξικότητα φυσικών μορίων

Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω η έρευνα των τελευταίων χρόνων γύρω από τα φυσικά προϊόντα έδειξε ότι ορισμένα από αυτά είναι συνδεδεμένα και με ορισμένες ανεπιθύμητες τοξικές επιδράσεις. Ορισμένες τέτοιες περιπτώσεις ανεπιθύμητων τοξικών επιδράσεων φυσικών μορίων ή ασθενειών που προκαλούνται από αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

Ορισμένα φρούτα, εκτός από την μεταβολή της απορρόφησης φαρμάκων από το σώμα που μπορούν να επιφέρουν, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων, έχοντας έτσι σημαντικό αντίκτυπο στα φαρμακοκινητικά δεδομένα και την τοξικότητα των φαρμάκων αυτών. Επιπλέον τα φυσικά προϊόντα πιθανώς να οδηγήσουν σε αλλαγές στην βιοδιαθεσιμότητα αλλά και στη κατανομή διαφόρων φαρμάκων.



Ορισμένα φυτά, για να προστατευτούν από παθογόνους οργανισμούς και παράσιτα, παράγουν φυσικές τοξικές ουσίες που έχουν δράση ανάλογη των συνθετικών εντομοκτόνων. Σημειώνεται ότι ένας στόχος των γενετικά τροποποιημένων φυτών-τροφίμων, είναι η εισαγωγή γονιδίων που θα έχουν ως αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση ενώσεων που προσδίδουν στο φυτό αντοχή στους μικροοργανισμούς.

Τα φυτά που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος ως τρόφιμα περιέχουν πάρα πολλές χημικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων και τοξικές (Margina 2015). Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιμικροβιακές ενώσεις ή εντομοκτόνα μικρού μοριακού βάρους που παράγονται και συσσωρεύονται ταχύτατα στα φυτά στις περιοχές εκείνες που έχουν μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παραγωγή των τοξινών αυτών αποτελεί τον κυριότερο αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Χημικά ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Η βιοσύνθεση φυτοαλεξινών από διάφορα φυτά τρόφιμα, όπως φασόλια, αρακάς, σόγια, διεγείρεται από διάφορους εξωγενείς παράγοντες. Οι φυτοαλεξίνες και τα άλλα φυσικά εντομοκτόνα που παράγονται από τα φυτά αποτελούν το συντριπτικά μεγαλύτερο μέρος όλων των τοξινών που καταναλώνει ο άνθρωπος. Η ανάπτυξη φυτών ανθεκτικών σε ασθένειες ενδέχεται να οδηγήσει στην παραγωγή από τα φυτά ανεπιθύμητων ή και επικίνδυνων ενώσεων. Στις φυτοαλεξίνες ανήκουν τα ισοφλαβονοειδή που κάποιες από τις ενώσεις τους έχουν δηλητηριώδη επίδραση στον άνθρωπο, κάποια είναι τοξικά με ψυχοτρόπο δράση, προκαλούν ισχυρές ημικρανίες ενώ άλλα έχουν αιμολυτική δράση.

Διάφορα προϊόντα μεταβολισμού των φυτών, όπως οι φλαβόνες και ισοφλαβόνες, τα παράγωγα ισοκουμαρίνης και τα λιγνάνια έχουν οιστρογόνο δράση. Κάποιοι γλυκοζίτες που υπάρχουν στους πυρήνες φρούτων με υδρόλυση μπορούν να αποδώσουν υδροκυάνιο στον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλες ουσίες είναι αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων, και μειώνουν τη βιολογική αξία των τροφίμων. Οι λεκτίνες που υπάρχουν στα λαχανικά είναι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να συνδέονται στους υδατάνθρακες των γλυκοπρωτεϊνών ορισμένων κυττάρων των θηλαστικών. Από διατροφική άποψη σχετικό πρόβλημα για τον άνθρωπο παρουσιάζει η κατανάλωση υψηλών επιπέδων λεκτινών. Αυτές αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 100°C για 10 min ενώ σε χαμηλότερη θερμοκρασία (70-80°C) δεν αδρανοποιούνται με αποτέλεσμα να προκαλούνται εντερικές διαταραχές.

Ενώσεις που υπάρχουν στο λάχανο και στο κουνουπίδι μπορούν να προκαλέσουν βρογχοκήλη ανάλογη με αυτή που προκαλείται από την έλλειψη ιωδίου. Οι ενώσεις αυτές είναι θειογλυκοζίτες, υδρολύονται σε ισοθειοκυανικά παράγωγα και αναστέλλουν τη βιοσύνθεση της θυροξίνης.

Ο λαθ(ο)υρισμός είναι ασθένεια γνωστή από τον αρχαίο κόσμο και οφείλεται στη βρώση των σπερμάτων πολλών ειδών του φυτού λαθούρι (μπιζέλι). Συστατικό του φυτού είναι η νευροτοξίνη οξαλλο-διαμινο-προπιονικό οξύ και όταν η δίαιτα για



μια περίοδο μερικών μηνών αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από μπιζέλια, ενδέχεται να προκληθεί μυϊκή αδυναμία και ξαφνική παράλυση των κάτω άκρων.

Η ευρωτίαση είναι γνωστή ασθένεια που οφείλεται σε κατανάλωση τροφίμων που έχουν μολυνθεί από τοξίνες μικροοργανισμών. Προκαλείται από τα αλκαλοειδή που παράγονται από μύκητα που αναπτύσσεται στη σίκαλη και σε άλλα σιτηρά. Ο μύκητας σχηματίζει δομές, που είναι σκληρές μάζες κυττάρων που μπορεί να συλλεγούν μαζί με τα σιτηρά. Τα σκληρώτια περιέχουν τοξικά αλκαλοειδή, όπως η εργοταμίνη. Η ασθένεια έχει διάφορες επιπτώσεις όπως διανοητική σύγχυση, και μπορεί να είναι θανατηφόρα.

Επίσης, τα φαινορικά αντιοξειδωτικά δεν είναι τελείως αβλαβή. Για το λόγο αυτό η χρήση τους έχει απαγορευτεί στις παιδικές τροφές, και συνιστάται να αποφεύγεται η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τα πρόσθετα αυτά από πολύ μικρά παιδιά.

Οι τοξικολογικές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα με πειραματόζωα παρέχουν σαφείς ενδείξεις ότι τα BHT, BHA και οι εστέρες του γαλλικού οξέος μπορεί να έχουν διάφορες αρνητικές επιπτώσεις σε υψηλά επίπεδα δόσης συμπεριλαμβανομένης της προοξειδωτικής δραστηριότητας, η οποία σχετίζεται με τη μεταλλαξιγένεση και τη μιτοχονδριακή τοξικότητα. Ωστόσο δεν είναι πλήρως κατανοητό πότε τα φλαβονοειδή δρουν ως αντι ή προ- οξειδωτικοί παράγοντες σε *in vivo* συστήματα. Επίσης, ανησυχητική είναι η πιθανή συνεργιστική δράση τους. Η σχετική νομοθεσία για τη χρήση των αντιοξειδωτικών είναι διαφορετική σε κάθε χώρα ( Denisa Margina,2015).

Τέλος, στα φυσικά προϊόντα συγκαταλέγονται και τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα που εμφανίζουν και αυτά τοξική δράση και είναι γνωστά με την γενική ονομασία «βιοτοξίνες θαλάσσιας προέλευσης» (Marine Biotoxins). Πολύ συχνά η επίδρασή τους φθάνει στους ανώτερους οργανισμούς ακόμη και στον ίδιο τον άνθρωπο προκαλώντας χαρακτηριστικές και πολλές φορές επικίνδυνες ακόμα και θανατηφόρες δηλητηριάσεις.

Επομένως από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα φυσικά προϊόντα δεν είναι πάντα «αθώα» και μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η διεξοδική μελέτη των τοξικών ιδιοτήτων ακόμα και των φυσικών εκχυλισμάτων και μορίων πριν την οποιαδήποτε χρήση ως πρόσθετα διατροφής, καλλυντικά, συστατικά φαρμάκων κ.λ.π.

## **Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι**

### **4.1 Υλικά**

#### **4.1.1 Φυτικό Υλικό**

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω σημεία του φυτού *Opuntia ficus*:

- ✚ *Opuntia ficus indica* flower (OF1)
- ✚ *Opuntia ficus indica* cladode (OF2)
- ✚ *Opuntia ficus indica* fruit peel (OF3)
- ✚ *Opuntia ficus indica* seed (OF4)
- ✚ *Opuntia ficus indica* fruit flesh (OF5)

#### **Πειραματική πορεία προετοιμασίας εκχυλισμάτων**

Πέντε διαφορετικά τμήματα από το φυτό *Opuntia ficus indica* (air dried fruit Peel, Seeds, Flowers, fresh Flesh-Pulp and partly dried Cladodes) υποβλήθηκαν σε εκχύλιση διάρκειας 45 λεπτών με υπερήχους. Αρχικά, τα μέρη του φυτού *Opuntia ficus indica* που αποξηραίνονται στον αέρα (Peel, Seeds and Flowers) τεμαχίζονται, ενώ τα μερικώς αποξηραμένα μέρη του φυτού (cladodes) ομογενοποιούνται. Στη συνέχεια, 1 gr από τα μέρη του φυτού που αποξηραίνονται στον αέρα (OF1,OF3,OF4) και 5 gr από το OF5 και το μερικώς αποξηραμένο μέρος του φυτού OF2 αναμιγνύεται με 50 ml αποσταγμένου νερού και 50 ml αιθανόλης (EtOH) προκειμένου να αποκτηθούν δύο διαφορετικά εκχυλίσματα του φυτού (υδατικά και αιθανολικά). Μετά το τέλος των εκχυλίσεων με τη βοήθεια υπερήχων, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 rpm για 15 λεπτά και πραγματοποιήθηκε διήθηση μέσω χωνιού Buchner χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί. Τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα στη συνέχεια αποθηκεύονται σε καταψύκτη στους - 20 °C μέχρι τις περαιτέρω αναλύσεις τους.

Η ανωτέρω διαδικασία έγινε από επιστήμονες του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Παν. Αθηνών

Στα πειράματα που έγιναν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα υδατικά εκχυλίσματα. Ωστόσο όπως ελέγχθηκε από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Παν. Αθηνών τόσο τα αιθανολικά όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού είχαν παρόμοια χημική σύσταση.

### 4.1.2 Πρωτογενή κύτταρα και κυτταρικές σειρές

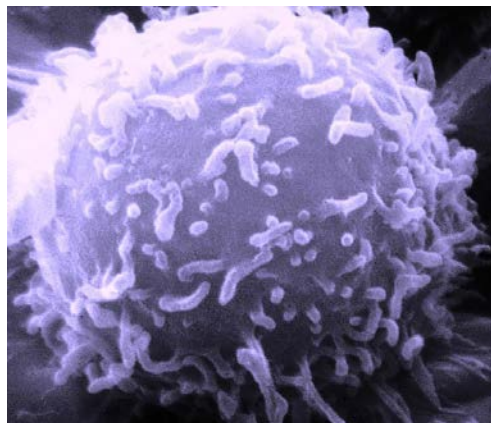
Οι κυτταρικές καλλιέργειες αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της κυτταρικής και της μοριακής βιολογίας αφού παρέχουν ένα άριστο σύστημα για την μελέτη της φυσιολογίας και της βιοχημείας των κυττάρων, του μηχανισμού δράσης των φαρμακευτικών ενώσεων και τοξικών ουσιών, της μεταλλαξιγένεσης και της καρκινογένεσης.

Ο όρος κυτταρική καλλιέργεια αναφέρεται στην απομόνωση κυττάρων από ένα φυτό ή ένα ζωικό οργανισμό και στην μετέπειτα ανάπτυξή τους σε ένα επιθυμητό τεχνητό περιβάλλον. Υπάρχουν δύο είδη κυτταρικών καλλιεργειών. Οι πρωτογενείς όπου τα κύτταρα απομονώνονται απευθείας από έναν ιστό ή ένα οργανισμό (είτε μηχανικά είτε με την βοήθεια ενζύμων) και διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησης τους για έναν σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς και οι καλλιέργειες κυτταρικών σειρών που προέρχονται από έμβρυα, όγκους ή μετασχηματισμένα κύτταρα και έχουν πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ( Sultan and Haagsman,2001)

Τα πρωτογενή κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας εργασίας ήταν τα λεμφοκύτταρα και οι κυτταρικές σειρές ήταν η κυτταρική σειρά HepG2 και η κυτταρική σειρά HeLa.

#### 4.1.2.1 Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι μια μεγάλη κατηγορία κυττάρων του αίματος και αποτελούν μια ομάδα σφαιρικών κυττάρων με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Στους ενήλικες και στα παιδιά αποτελούν το δεύτερο σε αριθμό τύπο λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και ο αριθμός τους αυξάνεται σε ιογενείς λοιμώξεις. Τα λεμφοκύτταρα ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά αντιγόνα επιφανείας τους (δείκτες), τα οποία εντοπίζονται με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικών μεθόδων. Τα



**Εικόνα 6: Εικόνα λεμφοκυττάρου απο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**

λεμφοκύτταρα έχουν ποικίλους λειτουργικούς ρόλους, όλοι από τους οποίους σχετίζονται με τους ανοσολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια σε

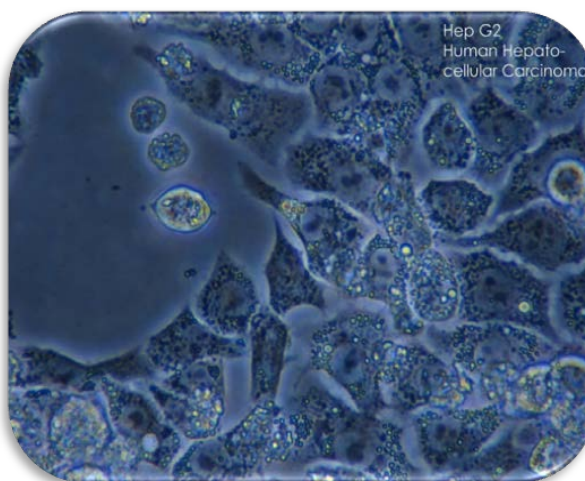
μικροοργανισμούς, ξένα μακρομόρια και καρκινικά κύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα με διάμετρο 6-8μm είναι γνωστά ως μικρά λεμφοκύτταρα. Στο περιφερικό αίμα υπάρχει επίσης ένας μικρός αριθμός από μεσαίου μεγέθους λεμφοκύτταρα και μεγάλα λεμφοκύτταρα με διάμετρο έως και 18μ m .

Τα μεγάλα λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 3% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και αντιπροσωπεύουν κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνα και είναι καθ' οδόν προς τους διάφορους ιστούς. Τα μικρά λεμφοκύτταρα που επικρατούν στο περιφερικό αίμα, έχουν σφαιρικό πυρήνα και συμπυκνωμένη χρωματίνη, κάτι που αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό κυττάρων με μικρή βιοσυνθετική δραστηριότητα, σε αυτά παρατηρείται μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος, που εμφανίζεται σαν ένας λεπτός δακτύλιος γύρω από τον πυρήνα και είναι ελαφρά βασεόφιλο λόγω της ύπαρξης ενός σχετικά μεγάλου αριθμού ελεύθερων ριβοσωμάτων.

Σε φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης, το κυτταρόπλασμα των μικρών λεμφοκυττάρων περιέχει έναν μικρό αριθμό αζουρόφιλων κοκκίων, μια στοιχειώδη συσκευή Golgi, λίγα μιτοχόνδρια, ελάχιστη ποσότητα ενδοπλασματικού δικτύου και μερικές φορές μικρά αθροίσματα γλυκογόνου. Ο ρόλος του μεγέθους των λεμφοκυττάρων ως προς τη λειτουργία τους δεν είναι ξεκάθαρος και η παραδοσιακή αυτή ταξινόμηση των λεμφοκυττάρων σε σχέση με το μέγεθός τους δεν χρησιμοποιείται πλέον. Η πρόοδος που έχει επιτελεστεί ως προς τη κατανόηση των ανοσολογικών λειτουργιών των λεμφοκυττάρων συνετέλεσε στην διάκριση δύο κύριων κατηγοριών, των Β και Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία επιτελούν διαφορετικές, αλλά συσχετιζόμενες λειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα.

#### 4.1.2.2 *Κυτταρική σειρά HepG2*

Τα HepG2 είναι προσκολλητικά κύτταρα, με μορφή που προσομοιάζει σε επιθηλιακά κύτταρα. Αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες και σχηματίζουν μικρά συσσωματώματα. Η κυτταρική σειρά HepG2 είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά, που προέρχεται από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού αγοριού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη,



**Εικόνα 7: Ανθρώπινα ηπατοκύτταρα της κυτταρικής σειράς HepG2**

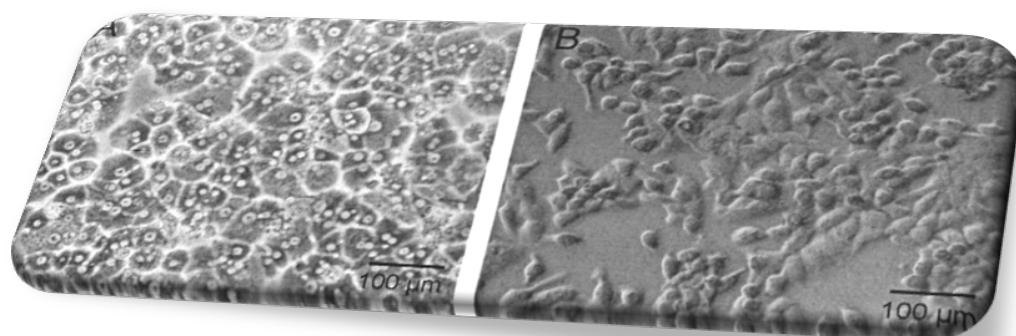
τρανσφερίνη, ινωδογόνο,  $\alpha$ -2-μακροσφαιρίνη, πλασμινογόνο.

Τα HepG2 αποκρίνονται σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (HGH).

Λόγω του υψηλού βαθμού μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης *in vitro*, τα κύτταρα HepG2 είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και της δυναμικής των καναλιών του χοληδόχου πόρου και των μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα *in vitro*.

Αυτό μπορεί να είναι σημαντικό για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών του ήπατος που προκαλούνται από μία εσφαλμένη υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών επιφανείας κυττάρου, π.χ. ανωμαλίες στη λειτουργία των ηπατικών καναλιών- μεταφορέων, όπως στη νόσο Dubin-Johnson, (PFIC), και οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τα κύτταρα HepG2 και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται επίσης ως ένα σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη του μεταβολισμού του ήπατος, την τοξικότητα ξενοβιοτικών παραγόντων, την ανίχνευση κυτταροπροστατευτικών και αντι-γονοτοξικών παραγόντων, την κατανόηση της ηπατοκαρκινογένεσης και για μελέτες στοχοθέτησης φαρμάκων. Τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται επίσης σε δοκιμές με βιο-τεχνητές συσκευές ήπατος.

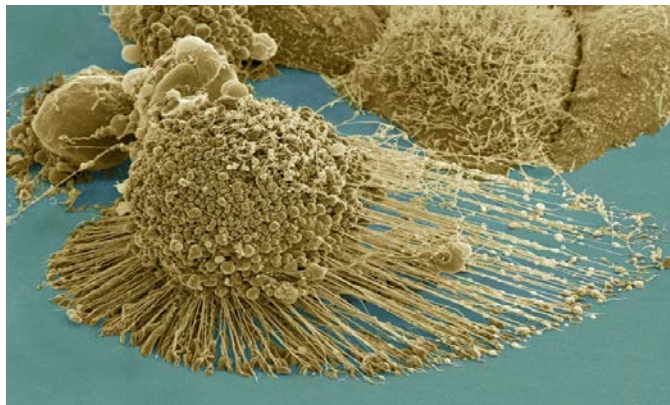
(Καραγκίνη Δέσποινα Αικατερίνη,2013 )



**Εικόνα 8: Μορφολογική σύγκριση ηπατοκυττάρων (A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 (B). Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα εμφανίζουν το τυπικό κυβικό σχήμα, και τα HepG2 κύτταρα δείχνουν μορφολογία παρόμοια με επιθηλιακά κύτταρα**

### 4.1.2.3 Κυτταρική σειρά HeLa

Τα κύτταρα HeLa είναι μία αθάνατη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως στην επιστημονική έρευνα. Είναι η παλαιότερη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη κυτταρική σειρά και προέρχεται από καρκινικά



κύτταρα του τραχήλου της μήτρας που ελήφθησαν στις 8 Φεβρουαρίου 1951 από την Henrietta Lacks, μια ασθενή η οποία τελικά πέθανε από καρκίνο στις 4 Οκτωβρίου, 1951.

Εικόνα 9:Εικόνα ενός αποπτωτικού HeLa κυττάρου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα κύτταρα από τον όγκο της Henrietta είχαν ληφθεί (χωρίς τη γνώση ή τη συγκατάθεσή της) από τον ερευνητή George Gey που ανακάλυψε ότι αυτά τα κύτταρα έκαναν κάτι που δεν είχαν ξαναδεί ποτέ: «Μπορούσαν να διατηρηθούν στη ζωή και να αναπτυχθούν». Πριν από αυτό, τα κύτταρα που καλλιεργούνται από άλλα κύτταρα μπορούσαν να επιβιώσουν μόνο για λίγες ημέρες και οι επιστήμονες ξόδευαν περισσότερο χρόνο προσπαθώντας να κρατήσουν τα κύτταρα ζωντανά παρά στην πραγματική έρευνα στα κύτταρα. Ο George Gey παρατήρησε ότι μερικά κύτταρα του συγκεκριμένου δείγματος όγκου συμπεριφέρονταν διαφορετικά από τους άλλους και έτσι ήταν σε θέση να απομονώσει ένα συγκεκριμένο κύτταρο, να το πολλαπλασιάσει, και να αρχίσει μια κυτταρική σειρά. Ο Gey ονόμασε το δείγμα HeLa, από τα αρχικά γράμματα του ονόματος της Henrietta Lacks. Καθώς τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε ένα εργαστήριο ήταν "αθάνατα" (δηλαδή δεν πέθαιναν μετά από μερικές κυτταρικές διαιρέσεις), μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή πολλών πειραμάτων. Αυτό ήταν ένα τεράστιο όφελος για την ιατρική και βιολογική έρευνα.

Τα κύτταρα διαδόθηκαν από τον George Gey λίγο πριν η Lacks πεθάνει από καρκίνο το 1951. Αυτή ήταν η πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που αποδείχθηκε επιτυχής *in vitro*, θέτοντας ένα επιστημονικό επίτευγμα με σημαντικό μελλοντικό όφελος για την ιατρική έρευνα. Ο Gey δώρισε ελεύθερα τα κύτταρα αυτά, μαζί με εργαλεία και διαδικασίες που ανέπτυξε στο εργαστήριο του, σε οποιονδήποτε επιστήμονα ζητώντας να χρησιμοποιηθούν μόνο για λογαριασμό της επιστήμης.



Αρχικά, η κυτταρική γραμμή ειπώθηκε να ονομαστεί "Helen Lane" or "Helen Larson" προκειμένου να διατηρηθεί η ανωνυμία της Lacks. Παρά αυτή την προσπάθεια, το πραγματικό της όνομα χρησιμοποιήθηκε από τον τύπο λίγα χρόνια από το θάνατό της. Αυτά τα κύτταρα επεξεργάστηκαν ως καρκινικά κύτταρα, όπως αυτά που ελήφθησαν από την βιοψία της βλάβης του τράχηλου, στο πλαίσιο της διάγνωσης του καρκίνου της Lacks.

Το 1954 ο Jonas Salk αναπτύσσει ένα εμβόλιο για την πολιομυελίτιδα, χρησιμοποιώντας αυτά τα κύτταρα και, με σκοπό να δοκιμαστεί το εμβόλιο, τα κύτταρα γρήγορα τίθενται σε μαζική παραγωγή στο πρώτο εργοστάσιο παραγωγής κυττάρων. Το 1955 τα κύτταρα HeLa είναι τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα που κλωνοποιούνται με επιτυχία. Η ζήτηση για τα κύτταρα HeLa γρήγορα μεγάλωσε. Από τη στιγμή που είχαν τεθεί σε μαζική παραγωγή, τα κύτταρα Henrietta έχουν χρησιμοποιηθεί από τους επιστήμονες σε όλο τον κόσμο στην έρευνα για τον καρκίνο, το AIDS, τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας και των τοξικών ουσιών, την γονιδιακή χαρτογράφηση, στη μελέτη καλλυντικών και σε αμέτρητες άλλες επιστημονικές μελέτες. Οι επιστήμονες έχουν καλλιεργήσει περίπου 20 τόνους των συγκεκριμένων κυττάρων και σήμερα υπάρχουν σχεδόν 11.000 διπλώματα ευρεσιτεχνίας (πατέντες) που περιλαμβάνουν αυτά τα κύτταρα.

### **4.1.3 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών**

#### **4.1.3.1 Υλικά για κυτταρική σειρά HepG2**

- ✚ Πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα κύτταρα Minimum Essential Medium Eagle (Sigma – Aldrich)Ορός νεογέννητου βοός (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ 100 U/ml Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ Θρυψίνη/EDTA (0.05 % 0.02 % σε PBS χωρίς Ca) (Gibco, ThermoFisher Scientific)

#### **4.1.3.2 Υλικά για κυτταρική σειρά HeLa**

- ✚ Πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα κύτταρα DMEM (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ Ορός νεογέννητου βοός(fetal bovine serum, FBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ 100 U/ml Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ Θρυψίνη/EDTA(0.05 %-0.02 % σε PBS χωρίς Ca) (Gibco, ThermoFisher Scientific)

#### **4.1.3.3. Υλικά για τα Λεμφοκυττάρια**

- ✚ Πλήρες υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης για τα κύτταρα RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ Ορός νεογέννητου βοός (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ 100 U/ml Πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ PHA (Phytohemagglutinin) (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- ✚ Lymphoprep (Stemcell Technologies)

#### **4.1.3.4 Λοιπά αντιδραστήρια και υλικά**

- ✚ DMSO (dimethylsulfoxide)
- ✚ PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ✚ Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials), Greiner, 122263
- ✚ Δοχείο ψύξης κυττάρων με υγρό άζωτο
- ✚ Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειών 25 cm<sup>2</sup> filter, Greiner, 690175
- ✚ Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειών 75 cm<sup>2</sup> filter, Greiner, 690175
- ✚ Ειδικά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας
- ✚ 15 ml falcon, Greiner, 188271
- ✚ 50 ml falcon, Greiner, 188271

#### **4.1.4 Υλικά Μεθόδων**

##### **4.1.4.1 Υλικά Μεθόδου Ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αгарόζης (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay)**

- ✚ PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ✚ Αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως
- ✚ Lysis Buffer ( Περιέχει: 2.5M NaCl, 100mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 10mM Tris (hydroxymethyl)aminomethane)
- ✚ Neutralizing buffer (Περιέχει : 0.5M Tris (hydroxymethyl)aminomethane )
- ✚ Alkali Buffer (Περιέχει: 300Mm NaOH, 200 Mm EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid))



- ✚ Αιθανόλη (EtOH)
- ✚ Χρωστική propidium iodide
- ✚ Χρωστική SYBR Gold

#### **4.1.4.2 Υλικά MTT Assay**

- ✚ PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ✚ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich)
- ✚ Ισοπροπανόλη

#### **4.1.4.3 Υλικά MTS Assay**

- ✚ PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ✚ CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent
- ✚ Ισοπροπανόλη

#### **4.1.4.4 Υλικά Μεθόδου γH2AX In Cell Western( ICW)**

- ✚ PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ✚ PST(Περιέχει: 1x PBS, FBS (Fetal bovine serum), 10 % Triton X-100)
- ✚ Διάλυμα μονιμοποίησης: Παραφορμαλδεϋδη 4% σε PBS
- ✚ Διάλυμα Neutralization (Περιέχει: stock solution ( 1M) NH<sup>4</sup>Cl και PBS)
- ✚ Διάλυμα Permeabilization (Περιέχει: PBS, 10% Triton X-100, PBS)
- ✚ Διάλυμα Saturation: (Περιέχει: Διάλυμα PhosStop (phosphatase inhibitor), Διάλυμα RNase ( PBS, 10 Mm HEPES, 1M NaCl), MAXBlock Blocking Medium)
- ✚ Primary antibody (anti-H2AX Rabbit) (Cell Signaling)
- ✚ Secondary antibody ( anti- Rabbit 800 )
- ✚ Reddot (Biotium)

## 4.2 Μέθοδοι

### 4.2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

#### 4.2.1.1 Συνθήκες καλλιέργειας κυτταρικών σειρών

##### Πλήρες Θρεπτικό μέσο

Όλα τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια κυτταρικών σειρών περιέχουν τα εξής τέσσερα βασικά συστατικά: ανόργανα άλατα, γλυκόζη, αμινοξέα και βιταμίνες. Τα ανόργανα άλατα εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες, οι κυριότερες των οποίων είναι η διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας των κυττάρων και η ρύθμιση του μεμβρανικού δυναμικού. Οι υδατάνθρακες, κυρίως με την μορφή σακχάρων, αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα σάκχαρα είναι η γλυκόζη και η γαλακτόζη αν και ορισμένα μέσα περιέχουν μαλτόζη ή φρουκτόζη. Τα αμινοξέα (essential amino acid) πρέπει να προστεθούν στο μέσο καλλιέργειας αφού τα κύτταρα δεν μπορούν να τα συνθέσουν μόνα τους. Παρόλο που τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέσουν τα μη ουσιώδη αμινοξέα (no essential amino acid), η παρουσία αυτών στο θρεπτικό μέσο διεγείρει την ανάπτυξη και παρατείνει την επιβίωση τους. Τέλος, αρκετές βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για ορισμένες κυτταρικές σειρές η βιταμίνη B12 είναι απαραίτητη. Επίσης υπάρχουν μέσα με υψηλή περιεκτικότητα στις βιταμίνες A και E. Μεταξύ των πιο κοινά χρησιμοποιούμενων περιλαμβάνονται η ριβοβλαβίνη, η βιοτίνη και η θιαμίνη ([www.hpacultures.org.uk](http://www.hpacultures.org.uk)).

Η περιεκτικότητα ενός θρεπτικού μέσου σε κάθε ένα από αυτά τα συστατικά μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε κυτταρικής σειράς. Από τα πιο σημαντικά συμπληρώματα του θρεπτικού μέσου είναι ο ορός, ένα σύνθετο μίγμα βιολογικού υλικού που ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ορός είναι ο ορός εμβρύου βοός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων και μεγάλη περιεκτικότητα σε αυξητικούς παράγοντες. Επίσης η αλβουμίνη αποτελεί κύριο συστατικό αυτού. Χρησιμοποιείται σε αναλογία 2-20% ([www.hpacultures.org.uk](http://www.hpacultures.org.uk)).

Τέλος, για την αποφυγή των μολύνσεων των καλλιεργειών χρησιμοποιούνται αντιμυκητιασικά/αντιβακτηριακά αντιβιοτικά, όπως η αμφοτερσίνη, gentamicin και πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη αντίστοιχα. Ωστόσο, η συνεχής χρήση αντιβιοτικών μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο φαινότυπο και το γενότυπο των κυττάρων (Masters and Stacey, 2007).

## **pH**

Η ρύθμιση του pH αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών αναπτύσσονται σε pH 7.2-7.4. Για το λόγο αυτό τα περισσότερα θρεπτικά περιέχουν τη χρωστική ερυθρό της φαινόλης ως δείκτη pH, οπότε η τιμή του υποδηλώνεται συνεχώς από το χρώμα του θρεπτικού μέσου. Σε pH 6.5 έχει κίτρινο χρώμα, σε pH 7.0 πορτοκαλί, σε pH 7.4 κόκκινο, σε pH 7.6 ροζ και σε pH 7.8 μωβ. Συνήθως, το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας πρέπει να ανανεώνεται όταν έχει κίτρινο χρώμα (όξινο pH) ή μωβ (αλκαλικό pH). Η ύπαρξη συγκεκριμένης συγκέντρωσης διττανθρακικού νατρίου στο θρεπτικό μέσο επιτρέπει τη διατήρηση του pH στο 7.2-7.4 σε περιβάλλον σταθερής παροχής 5% CO<sub>2</sub> (Masters and Stacey, 2007).

## **Θερμοκρασία**

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των κυττάρων εξαρτάται από τη θερμοκρασία σώματος του ξενιστή από τον οποίο προέρχεται. Οι κυτταρικές σειρές που προέρχονται από θηλαστικά αναπτύσσονται άριστα στους 36 °C με 37 °C. Οι απότομες αλλαγές θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσουν θερμικό σοκ στα κύτταρα με αποτέλεσμα αλλαγές στην μεταγραφή και κατά συνέπεια στο προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών των κυττάρων (Masters and Stacey, 2007).

## **Άσηπτο περιβάλλον**

Για την άριστη ανάπτυξη των κυττάρων είναι απαραίτητες οι συνθήκες ασηψίας. Για το λόγο αυτό όλα τα στάδια κυτταρικής καλλιέργειας πραγματοποιούνται σε εστία παροχής συνεχούς ροής αποστειρωμένου αέρα (Laminar Flow Cabinet, MDH). Τα συστατικά του πλήρους θρεπτικού μέσου παραλαμβάνονται αποστειρωμένα. Το ίδιο ισχύει και για τα δοχεία καλλιέργειας, τους σωλήνες φυγοκέντρου και τις πιπέτες. Επιπλέον πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί όσον αφορά στους χειρισμούς μας προκειμένου να αποφύγουμε πιθανή μόλυνση των κυττάρων.



**Εικόνα 10:** Πραγματοποίηση πειραμάτων σε συνθήκες ασηψίας

#### **4.2.1.2 Διαδικασίες Κυτταροκαλλιιεργειών**

##### **4.2.1.2.1 Καλλιέργεια ευκαρυωτικών καρκινικών κυττάρων**

Καρκινικά κύτταρα HeLa και HepG2 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο (DMEM, 10% (v/v) FBS και 1% (v/v) αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε ειδικό κλίβανο επώασης στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>.

##### **4.2.1.2.2 Απόψυξη κυττάρων**

Οι κυτταρικές σειρές HepG2 και HeLa διατηρούνται σε υγρό άζωτο. Όταν πρόκειται να πραγματοποιηθεί η έναρξη της καλλιιεργειας τα κύτταρα αποψύχονται. Κατά τη διαδικασία αυτή, κύτταρα τα οποία έχουν παραμείνει παγωμένα ακόμα και για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι δυνατόν να επανακαλλιιεργηθούν. Η διαδικασία γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες και όσο το δυνατόν ταχύτερα, προκειμένου να μειωθεί χρονικά η έκθεση των κυττάρων στο DMSO, το οποίο εμπεριέχεται στο υλικό στο οποίο έχουν ψυχθεί τα κύτταρα και το οποίο δρα τοξικά.

##### **Πειραματική διαδικασία απόψυξης κυττάρων**

- ✚ Το κρυοφιαλίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται ταχύτατα από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37<sup>0</sup> C για περίπου 5 λεπτά

- ✚ Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων (2 ml) σε σωλήνα φυγόκεντρου που περιέχει 10 ml θρεπτικού υλικού με ορό. Το στάδιο αυτό αποσκοπεί στην αραίωση του DMSO στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα και το οποίο σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για αυτά.
- ✚ Φυγοκέντρωση στα 1000 rpm για 5 λεπτά
- ✚ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου.
- ✚ Προσθήκη διαλύματος σε ειδικά δοχεία καλλιέργειας, στα οποία αναγράφεται η κυτταρική σειρά και η ημερομηνία απόψυξης
- ✚ Μικροσκοπική παρατήρηση
- ✚ Τοποθέτηση των δοχείων καλλιέργειας σε επωαστικό θάλαμο (Water Jacketed Incubator 3250 Forma Scientific) σταθερής θερμοκρασίας 37<sup>0</sup> C και παροχής CO<sub>2</sub> 5 %
- ✚ Παρατηρούμε καθημερινά τις καλλιέργειες προκειμένου να βεβαιωθούμε για τη σωστή ανάπτυξη των κυττάρων

#### ***4.2.1.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)***

Η συνεχή ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του μέσου, τη συσσώρευση προϊόντων μεταβολισμού που μπορεί να γίνουν τοξικά καθώς και νεκρών και αποπτικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, όταν οι καλλιέργειες φτάσουν σε πυκνότητα 70-80 % πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια προκειμένου την ανανέωση των θρεπτικών συστατικών και την απομάκρυνση των τοξικών απόβλητων. Επομένως η ανακαλλιέργεια πρέπει να γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς έτσι, ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων για πειράματα, αλλά και η ομαλή τους ανάπτυξη. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμά είναι δυνατή με μηχανικό τρόπο ή με τη χρήση ενζύμων. Κατά την τελευταία περίπτωση συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, λοιπόν, αποσκοπεί στη διατήρηση του απαραίτητου προς μελέτη βιολογικού υλικού.

#### ***Πειραματική διαδικασία ανακαλλιέργειας κυττάρων***

- ✚ Παρατήρηση του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας στο μικροσκόπιο. Η εικόνα των κυττάρων είναι ενδεικτική της κατάστασης στην οποία βρίσκονται. Κύτταρα που είναι προσκολλημένα στο τρυβλίο θεωρούνται υγιή και ζωντανά, ενώ αυτά που επιπλέουν είναι πιθανότητα νεκρά. Η

ανακαλλιέργεια γίνεται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου στο οποίο καλλιεργούνται.

- ✚ Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και δύο φορές πλύσεις με PBS (6-7 ml)
- ✚ Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης 1x και επώαση στους 37°C. Η θρυψίνη 1x παρασκευάζεται από θρυψίνη 10x (Gibco, Cat. No. 15400) με αραιώση σε 1x PBS. Τα κύτταρα δεν θα πρέπει να μείνουν για πολύ ώρα στο διάλυμα θρυψίνης.
- ✚ Επαναδιάλυση των κυττάρων με την θρυψίνη σε 5 ml πλήρες θρεπτικού μέσου προκειμένου να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης και ανάδευση προκειμένου να ξεχωρίσουν τα κύτταρα μεταξύ τους, αφού η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει την τάση να δημιουργεί συσσωματώματα.
- ✚ Σε ένα καινούργιο δοχείο καλλιέργειας που υπάρχουν ήδη 10-11 ml πλήρες θρεπτικού μέσου προστίθεται το κυτταρικό εναιώρημα από την προηγούμενη φλάσκα ανάλογα με την αραιώση που θα πραγματοποιηθεί.
- ✚ Μικροσκοπική παρατήρηση.
- ✚ Τοποθέτηση των δοχείων καλλιέργειας σε επωαστικό θάλαμο.

#### **4.2.1.2.4 Κρυοσυντήρηση κυττάρων**

Η κρυοσυντήρηση των κυττάρων και η αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο έχει ως στόχο τη δημιουργία αποθεμάτων και τη διατήρησή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν από την ψύξη τους και για το λόγο αυτό-κατά γενικό κανόνα- η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Επιπλέον, η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται βαθμιαία μέχρι η θερμοκρασία τους να φτάσει ένα κρίσιμο σημείο προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό τους και να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού. Επίσης, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων, καταψύχονται σε υγρό καλλιέργειας που περιέχει διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO).

#### **Πειραματική διαδικασία κρυοσυντήρησης κυττάρων**

- ✚ Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου
- ✚ Γίνεται φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- ✚ Απορρίπτεται το υπερκείμενο
- ✚ Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 3,6 ml (ανάλογα με την ποσότητα κρυοφιαλιδίων που χρειαζόμαστε) θρεπτικού μέσου και πραγματοποιείται καλή ανάδευση
- ✚ Μεταφορά του εναιωρήματος σε ειδικό κρυοφιαλίδιο, στο οποίο αναγράφεται η ημερομηνία κατάψυξης και η κυτταρική σειρά

- ✚ Προσθήκη 5 % του κρυοπροστατευτικού αλλά τοξικού παράγοντα DMSO (Sigma, D2650) προκειμένου να αποφευχθεί η θραύση των κυττάρων λόγω δημιουργίας κρυστάλλων στο εσωτερικό τους
- ✚ Η προσθήκη γίνεται σιγά-σιγά, ώστε να μη δημιουργηθούν τοπικά υψηλές συγκεντρώσεις DMSO οι οποίες είναι τοξικές για τα κύτταρα
- ✚ Κλείσιμο του κρυοφιαλιδίου και μεταφορά στους - 80<sup>0</sup> C για 24 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί η σταδιακή ψύξη των κυττάρων που συμβάλλει στην μεγαλύτερη βιωσιμότητά τους
- ✚ Μεταφορά του κρυοφιαλιδίου σε υγρό άζωτο

Η βασική αρχή για επιτυχή κατάψυξη των κυττάρων είναι το σταδιακό πάγωμα. Αντίθετα, η επαναφορά των κυττάρων βασίζεται στο γρήγορο ξεπάγωμα. Είναι πολύ σημαντικό 2 βδομάδες μετά την κατάψυξη να ξεπαγώσουμε ένα κρυοφιαλίδιο προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η διαδικασία του παγώματος έχει πραγματοποιηθεί σωστά.

#### **4.2.1.2.5 Απομόνωση και καλλιέργεια ανθρώπινων πρωτογενών κυττάρων (MNC) (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα)**

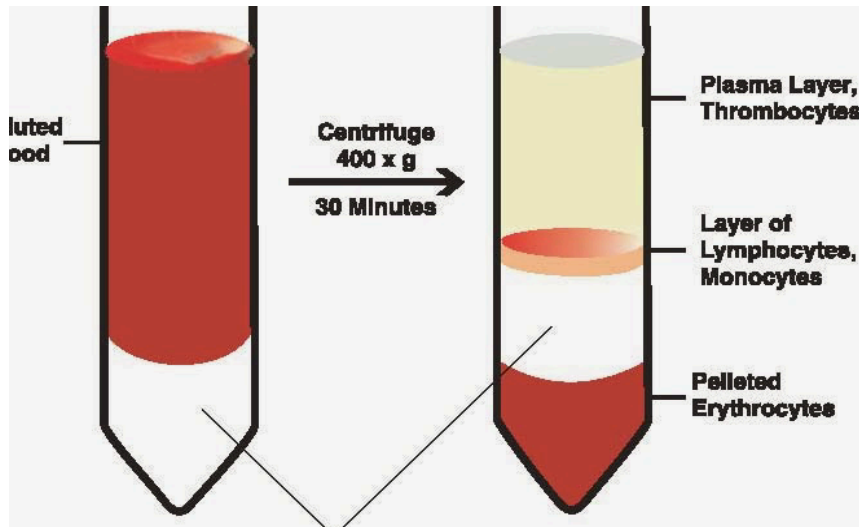
- ✚ Συλλογή αίματος από έναν υγιή δότη σε σωληνάρια ηπαρίνης και διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου (30 λεπτά) Ανάδευση του πηκτικού διαλύματος Lymphoprep καλά πριν από τη χρήση, αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές.
- ✚ Προσθήκη Lymphoprep σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα

BLOOD	PBS + 2% FBS	LYMPHOPREP™	TUBE SIZE
(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
1	1	1.5	5
2	2	3	14
2	2	3	14
4	4	4	14
5	5	10	50
10	10	15	50
15	15	15	50

**Πίνακας 4: Αναλογίες υλικών για την απομόνωση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων από περιφερειακό αίμα.**



- ✚ Αραίωση αίματος με μία ίση ποσότητα διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) εμπλουτισμένου με ορό εμβρύου μόσχου (PBS + 2% FB )
- ✚ Προσθήκη του αίματος πάνω από το Lymphoprep , με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ανάμιξη του αίματος με Lymphoprep.
- ✚ Φυγοκέντριση στα 1000 rpm για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✚ Αφαίρεση ανώτερου στρώματος πλάσματος χωρίς να διαταραχθεί το πλάσμα



Εικόνα 11: Διαχωρισμός στρωμάτων αίματος μετά απο την φυγοκέντριση

- ✚ Αφαίρεση του στρώματος MNC και έκπλυση με θρεπτικό μέσο.
- ✚ Μεταφορά των κυττάρων με τη βοήθεια πιπέτας σε μια φιάλη καλλιέργειας που περιέχει το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυττάρων RPMI 1640 και 10% FBS, 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και 1% PHA.
- ✚ Μεταφορά στον κλίβανο επώασης για 24h.

#### 4.2.1.2.6 Συλλογή και Επίστρωση κυττάρων

Η επίστρωση των κυττάρων σε μικροπλάκες 96 θέσεων καθώς και σε μικροπλάκες 12 θέσεων πραγματοποιείται για να μας βοηθήσει στις μεθόδους μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρήση του χρωμογόνου MTT και Comet assay αντίστοιχα.

#### Πειραματική διαδικασία συλλογής και επίστρωσης κυττάρων

- ✚ Το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται από το δοχείο καλλιέργειας



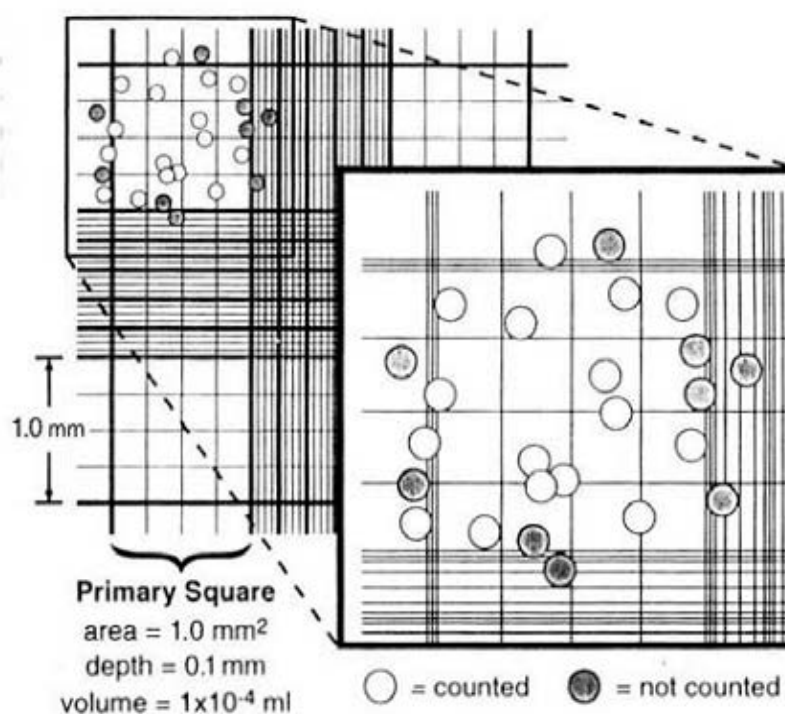
- ✚ Πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων στο δοχείο καλλιέργειας δύο φορές με διάλυμα PBS (6-7 ml)
- ✚ Το διάλυμα PBS απομακρύνεται από το δοχείο προσεκτικά από την άκρη της φλάσκας, ώστε να μην καταστραφούν τα κύτταρα μας
- ✚ Τοποθέτηση 1 ml θρυψίνης με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από το δοχείο καλλιέργειας και το δοχείο μεταφέρεται σε επωαστικό θάλαμο για 5 περίπου λεπτά
- ✚ Επαναδιάλυση των κυττάρων με την θρυψίνη σε 5 ml πλήρες θρεπτικού μέσου και ανάδευση με σκοπό να ξεχωρίσουν μεταξύ τους τα κύτταρα, αφού η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει την τάση να δημιουργεί συσσωματώματα
- ✚ Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου και μία μικρή ποσότητα του μεταφέρεται σε erpendorf
- ✚ Σε erpendorf τοποθετούνται 12 μl κυττάρων και 12 μl της χρωστικής trypan blue (επαναλαμβάνεται δύο φορές)
- ✚ 12 μl από το συγκεκριμένο εναιώρημα μεταφέρονται σε αιμοκυτταρόμετρο και καταμετράται ο αριθμός των κυττάρων

Ανάλογα με την μέθοδο που θέλουμε να πραγματοποιήσουμε την συγκεκριμένη στιγμή τοποθετούμε 50.000 ή 32.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι της μικροπλάκας 96 θέσεων (για τη μέθοδο MTT) και 280.000 ή 140.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι της μικροπλάκας 12 θέσεων (για τη μέθοδο Comet assay).

#### ***4.2.1.2.7 Μέτρηση Κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο***

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη

επιφάνεια. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/ml) είναι: Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα  $\times 10^4$



Εικόνα 12: Πλακίδιο

Neubauer. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι  $0.1 \text{mm}^3$  ή  $1 \times 10^{-4}$  ml

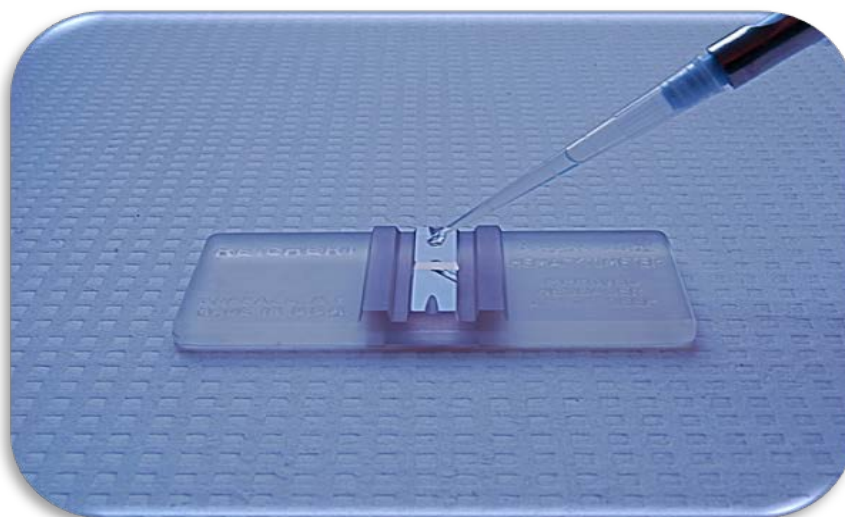
#### 4.2.1.2.8 Έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο *trypan blue dye exclusion*

Πρόκειται για μια απλή και γρήγορη μέθοδο διάκρισης των ζωντανών κυττάρων από τα νεκρά. Η διάκριση αυτή βασίζεται στην ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα η χρωστική *trypan blue* δεν μπορεί να διαπεράσει την άθικτη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, αλλά διαπερνά τη διαρρηγμένη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων και των κυττάρων που βρίσκονται σε προχωρημένη απόπτωση. Επειδή τα ζωντανά κύτταρα εμποδίζουν την είσοδο της χρωστικής, η μέθοδος ονομάζεται *dye exclusion method* (Strober, 1997).

### ***Πειραματική διαδικασία ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων***

- ✚ Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου και μία μικρή ποσότητα του μεταφέρεται σε erpendorf
- ✚ Σε erpendorf τοποθετούνται 12 μl κυττάρων και 12 μl της χρωστικής trypan blue (επαναλαμβάνεται δύο φορές)
- ✚ Επώαση για λίγα δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί στον χρόνο επώασης γιατί είναι πιθανόν να παρατηρήσουμε αύξηση στον αριθμό των νεκρών κυττάρων λόγω της τοξικότητας του trypan blue
- ✚ Τοποθέτηση 12 μl κυττάρων και χρωστικής σε αιμοκυτταρόμετρο
- ✚ Μικροσκοπική παρατήρηση και μέτρηση του αριθμού των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων

Κύτταρα τα οποία έχουν αποκτήσει μπλε χρώμα καταμετρώνται ως νεκρά, ενώ κύτταρα τα οποία είναι διάφανα αφού έχουν υποστεί χρώση καταμετρούνται ως ζωντανά.



**Εικόνα 13: Τοποθέτηση κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο**

#### ***4.2.2 Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης απομονωμένων κυττάρων σε πήκτωμα αγαρόζης (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay)***

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης απομονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της γονοτοξικότητας μεγάλου αριθμού χημικών και φαρμακευτικών ουσιών καθότι πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και κυρίως

ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση της θραύσης του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων.

Το 1976 ο Cook και οι συνεργάτες του προκειμένου να διερευνήσουν τη δομή του πυρήνα πρότειναν τη λύση των κυττάρων με ανιονικά απορρυπαντικά και υψηλής μοριακότητας NaCl. Ως αποτέλεσμα οι μεμβράνες, το κυτταρόπλασμα και το πυρηνόπλασμα διασπώνται, τα νουκλεοσώματα αποδιοργανώνονται και σχεδόν όλες οι ιστόνες διαλυτοποιούνται. Αυτό που απομένει είναι μια πυρηνική μήτρα ή αλλιώς ένας πυρηνικός σκελετός που αποτελείται από RNA και πρωτεΐνες μαζί με DNA, η οποία ονομάζεται νουκλεοειδές. Η παραπάνω ερευνητική ομάδα πρότεινε ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο το DNA κατά διαστήματα προσδένεται στον πυρήνα του νουκλεοειδούς με συνέπεια να εμφανίζεται ως σύνολο από υπερελικωμένες θηλιές, και όχι ως γραμμικό μόριο. Όταν η υπερελίκωση απομακρύνεται, οι θηλιές εκτείνονται γύρω από τον πυρήνα του νουκλεοειδούς σχηματίζοντας μια «στεφάνη» (halo) (Shaposhnikov et al, 2008; Piperakis, 2009)

Η πρώτη προσπάθεια άμεσης ποσοτικοποίησης των ρηγμάτων του DNA έγινε το 1978 από τους Rydberg και Johanson, οι οποίοι ανέμιζαν κύτταρα με αгарόζη πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Ακολούθως πραγματοποίησαν λύση κυττάρων σε μετρείως αλκαλικές συνθήκες.

Το 1984 οι Ostling και Johanson βασιζόμενοι στις προαναφερθείσες προσεγγίσεις εφάρμοσαν μια μικροηλεκτροφορτική τεχνική για την ανίχνευση βλαβών στο DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Σε αυτή την τεχνική η λύση και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ουδέτερες συνθήκες ενώ για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική πορτοκαλί της ακριδίνης. Οι εικόνες που προέκυψαν έμοιαζαν με κομήτες που φέρουν μια διακριτή κεφαλή, η οποία αποτελείται από άθικτο DNA και μια ουρά που αποτελείται από κομμάτια DNA. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε comet assay. Ωστόσο μόνο δίκλωνες θραύσεις του DNA μπορούσαν να αναλυθούν (Liao et al, 2009)

Τα επόμενα χρόνια η μέθοδος comet assay τροποποιήθηκε από δύο ερευνητικές ομάδες, τον Singh και τους συνεργάτες του, το 1988 και τον Olive και τους συνεργάτες του, το 1990.

Η πρώτη ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε την ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικές συνθήκες (pH > 13) επιτρέποντας στις υπερέλικες του DNA να χαλαρώσουν και να ξεδιπλωθούν. Αυτό καθιστά δυνατή την ανίχνευση μονόκλωνων θραυσμάτων καθώς και θέσεων ασταθών σε αλκαλικές συνθήκες (alkali labile sites) κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Η δεύτερη ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε την ηλεκτροφόρηση σε λιγότερο αλκαλικές συνθήκες ( $\text{pH} > 12,3$ ) για τον εντοπισμό των μονόκλωνων θραυσμάτων (Tice et al, 2000; Liao et al, 2009)

### **Βασικές αρχές της μεθόδου**

Στο νουκλεοειδές το DNA διατηρεί την αρνητική υπερελίκωσή του λόγω της προηγούμενης οργάνωσης του σε νουκλεοσώματα. Η παρουσία θραυσμάτων οδηγεί σε χαλάρωση της υπερελίκωσης, και οι θηλιές αντί να εκτείνονται μεταξύ των ορίων του νουκλεοειδούς, εκτείνονται έξω από αυτό σχηματίζοντας μια στεφάνη. Λόγω του αρνητικού φορτίου του DNA, κατά την ηλεκτροφόρηση οι χαλαρές αυτές θηλιές μετακινούνται προς την άνοδο, σχηματίζοντας την ουρά του κομήτη ενώ το άθικτο DNA παραμένει περιελιγμένο στο νουκλεοειδές σχηματίζοντας την κεφαλή του κομήτη (McKelvey-Martin et al, 1993; Wong et al, 2005). Το σχήμα και το μέγεθος του κομήτη και η κατανομή του DNA μέσα σε αυτόν σχετίζεται με την έκταση της βλάβης/ αλλοίωσης του DNA (Kumaravel et al, 2009)

Η έκταση της μετακίνησης του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται άμεσα από την βλάβη αυτού στα κύτταρα. Τα θράσματα του DNA μετά από επίδραση με αλκαλικό διάλυμα είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με την παρουσία ενζύμων (π.χ ενδοκλεάσες) αυξάνουν τη μετακίνηση του DNA, ενώ χιαστί δεσμοί μεταξύ DNA- DNA και DNA- πρωτεϊνών επιβραδύνουν τη μετακίνηση αυτού (Kumaravel et al, 2009)

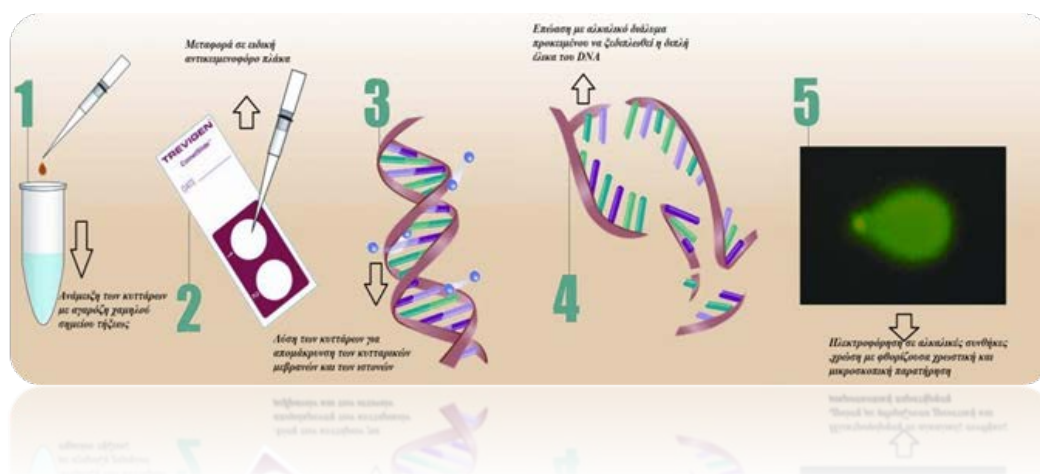
Η βλάβη του γενετικού υλικού εκτιμάται είτε μέσω οπτικής είτε μέσω αυτοματοποιημένης ανάλυσης των εικόνων με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα (Wong et al, 2005; McKelvey Martin et al, 1993)



**Εικόνα 14: Μικροσκόπιο φθορισμού για οπτική παρατήρηση της βλάβης του γενετικού υλικού**

Διαφορετικές εκδοχές της μεθόδου χρησιμοποιούνται προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη και διαφορετικά επίπεδα βλάβης του DNA. Εν συντομία τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι τα εξής: Εναιώρημα κυττάρων αναμιγνύεται με αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως και απλώνεται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά την λύση των κυττάρων με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων και απορρυπαντικών ακολουθεί επώαση σε αλκαλικό διάλυμα προκειμένου να ξεδιπλωθεί η διπλή έλικα. Όταν η τεχνική εφαρμόζεται σε αλκαλικές συνθήκες, απομονωμένοι πυρήνες που ενσωματώνονται σε πήκτωμα αгарόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα λύνονται, ακολουθεί χαλάρωση και αποδιάταξη του DNA, ηλεκτροφόρηση του σε αλκαλικό pH και τέλος η αδρανοποίηση και η χρώση του. Το κερματισμένο DNA εμφανίζει αυξημένη μετακίνηση κατά την ηλεκτροφόρηση λαμβάνοντας το σχήμα “κομήτη”. Η έκταση της βλάβης του DNA εκτιμάται μετρώντας τη μετατόπιση του ανάμεσα στον

πυρήνα του κυττάρου ή “κεφαλή του κομήτη” και την προκύπτουσα “ουρά” λόγω κερματισμού του πυρηνικού DNA . Η ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερες συνθήκες μετά από επώαση με αλκαλικό διάλυμα καθιστά δυνατή την ανίχνευση μονόκλωνων θραυσμάτων, την πλειοψηφία των απουρινικών και απυριμιδικών θέσεων καθώς και συμπλόκων τα οποία είναι ασταθή σε αλκαλικές συνθήκες ([www.amsbio.com](http://www.amsbio.com))



**Εικόνα 15 1:** Ανάμειξη των κυττάρων με αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως, 2: Μεταφορά σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα, 3: Λύση των κυττάρων για απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών και ιστονών, 4: Επώαση με αλκαλικό διάλυμα προκειμένου να ξεδιπλωθεί η διπλή έλικα του DNA, 5: Ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό διάλυμα, χρώση με φθορίζουσα χρωστική και μικροσκοπική παρατήρηση

Επιπλέον, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εκδοχή της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελεί η ενζυμική πέψη με ειδικά ένζυμα (Fpg, Endo III, hooG1) που αναγνωρίζουν οξειδωμένες πουρίνες και πυριμιδίνες μετά την λύση των κυττάρων (Tchou et al,1994; Blasiak et al ,2004).

Μερικές από τις εφαρμογές της μεθόδου ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης είναι οι εξής:

### **✚ Μελέτες που αφορούν τον άνθρωπο**

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης είναι ιδανική για τέτοιου είδους μελέτες, καθώς δεν απαιτείται σήμανση με ραδιενεργά ισότοπα ή άλλες επιβλαβείς ενώσεις. Χρησιμοποιείται στην παρακολούθηση της έκθεσης σε γονιδοτοξικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες που συνδέεται με πολλές ασθένειες στον άνθρωπο και στην εκτίμηση της συμμετοχής του καπνίσματος στην πρόκληση βλαβών του DNA. Επιπρόσθετα, με τη συγκεκριμένη τεχνική μπορούν να εκτιμηθούν τα επίπεδα βλαβών του DNA που σχετίζονται με την διατροφή, ή την επαγγελματική έκθεση σε τοξικούς παράγοντες (π.χ. ψεκαστές που εκτίθενται σε φυτοφάρμακα) (Kasiotis K.M., Kyriakoroulou K,2011). Τέλος, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των επιπέδων

ενδογενούς βλάβης του DNA σε φυσιολογικά κύτταρα μεμονωμένων κυττάρων (Collins,2004; Piperakis,2009).

### **Οικολογικές μελέτες**

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορους οργανισμούς (μύδια, σκώλικες, μικρά τρωκτικά) και να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης προσδιορισμού της περιβαλλοντικής ρύπανσης με ουσίες που προκαλούν γονοτοξικότητα (Collins,2004; Piperakis,2009).

### **Γονιδιοτοξικοί έλεγχοι**

Η μέθοδος comet assay χρησιμοποιείται ευρέως για τον έλεγχο της τοξικότητας νέων χημικών ενώσεων και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Collins,2004; Piperakis,2009)

### **Εκτίμηση της επιδιόρθωσης του DNA**

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της ικανότητας επιδιόρθωσης σε κυτταρικό επίπεδο. Ένας τρόπος είναι η πρόκληση βλάβης στα κύτταρα και η παρακολούθηση της ταχύτητας με την οποία επιδιορθώνονται οι βλάβες. Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων επιδιορθώνουν τις θραύσεις στο DNA πάρα πολύ γρήγορα. Αντίθετα, η επιδιόρθωση οξειδωμένων πουρινών/πυριμιδινών με εκτομή βάσεων απαιτεί περισσότερο χρόνο. Εναλλακτικά, η ικανότητα επιδιόρθωσης ενός κυτταρικού εκχυλίσματος μπορεί να εκτιμηθεί *in vitro* όπου ο πυρήνας καθίσταται προσβάσιμος σε πρωτεΐνες, αναστολείς, δεοξυριβονουκλετίδια κ.α. Επιπλέον, πληροφορίες σχετικά με την επιδιόρθωση του DNA μπορούν να προκύψουν από την εφαρμογή της μεθόδου σε ελλιπείς κυτταρικές σειρές όσον αφορά τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης (McKelvey-Martin et al,1993; Collins,2004; Piperakis,2009)

### **Πλεονεκτήματα μεθόδου**

Η μέθοδος comet assay είναι μια σχετικά γρήγορη, απλή, μη επεμβατική και με χαμηλό κόστος τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση αλλοιώσεων του DNA σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται επίσης ο μικρός αριθμός κυττάρων που απαιτείται, η υψηλή ευαισθησία (50-15000 θραύσεις/κύτταρο) και η ευρεία εφαρμογή της σε μια ποικιλία ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρούμενων ή μη. Αξίζει να αναφέρουμε ότι ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν προκύψει και από την εφαρμογή της σε προκαρυωτικά κύτταρα (Dhawan A et al,2009).

(<http://www.nanoimpactnet.eu/uploads/Protocols/Genotoxicity/Comet%20Assay.pdf>)



Τέλος, ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου comet assay είναι η ευελιξία της. Η επώαση με διαλύματα διαφορετικού pH προκειμένου να ξεδιπλωθεί η διπλή έλικα, οι διαφορετικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης όπως και η χρήση ειδικών ενζύμων μπορούν να αξιοποιηθούν για τον προσδιορισμό διαφορετικών τύπων και επιπέδων βλάβης του DNA (Rojas et al,1999; Tice et al,2000; Wong et al,2005; Liao et al,2009; Piperakis,2009).

### ***Μειονεκτήματα μεθόδου***

Με την μέθοδο comet assay δεν μπορούμε να διακρίνουμε το είδος της βλάβης του DNA (μονόκλωνες θραύσεις, δίκλωνες θραύσεις, alkali-labile θέσεις, χιαστί δεσμοί) ( Muller, 2007). Επίσης, δεν επιτρέπεται τη διάκριση των αποπτωτικών από τα νεκρά κύτταρα (Liao et al,2009).

Επιπρόσθετα, δεν επιτρέπει τη μέτρηση του μεγέθους των θραυσμάτων του DNA αφού διαχωρίζονται κατά το σύντομο χρονικό διάστημα της ηλεκτροφόρησης (Olive and Bamath, 2006)

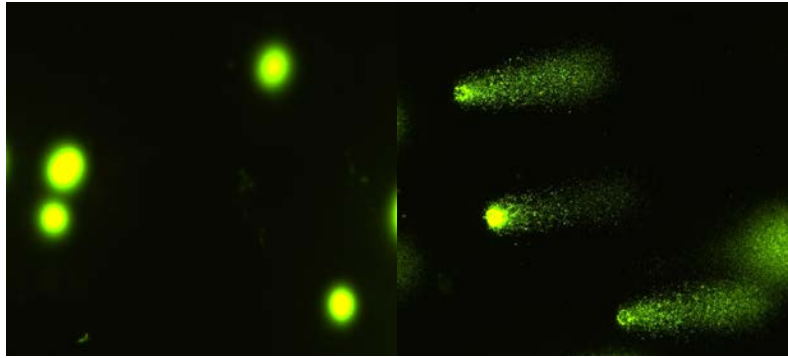
### ***4.2. 2.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου***

#### ***(έλεγχος γονοτοξικότητας)***

- ✚ Συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων διατηρούνται σε δοχεία καλλιέργειας τα οποία έχουν μεταφερθεί σε επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας και παροχής CO<sub>2</sub>
- ✚ Όταν οι καλλιέργειες έχουν πυκνότητα 60-70% πραγματοποιείται συλλογή και επιστροφή κυτταρικής σειράς σε μικροπλάκες 12 θέσεων (280.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι)
- ✚ Προσθήκη 900 μl υλικού καλλιέργειας χωρίς ορό και 100 μl ουσίας (OF1,OF2,OF3,OF4,OF5) στην συγκέντρωση 2.5 mg/ml
- ✚ Μεταφορά σε επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37<sup>0</sup> C και παροχής CO<sub>2</sub> 5 % για 20-24 ώρες
- ✚ Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS (1 ml/πηγαδάκι)
- ✚ Προσθήκη 100 μl θρυψίνης για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37<sup>0</sup> C και παροχής CO<sub>2</sub> 5 % για 5 λεπτά
- ✚ Προσθήκη 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και γρήγορη μεταφορά σε παγωμένα erpendorf τοποθετημένα σε πάγο
- ✚ Μισή ώρα πριν την έναρξη του πειράματος έχει δημιουργηθεί διάλυμα αγαρόζης σε ένα ποτήρι ζέσεως (1% σε PBS) πάνω σε καυτή θερμαντική πλάκα και στη συνέχεια μεταφορά σε υδατόλουτρο 37<sup>0</sup> C όπου παραμένει για



- τουλάχιστον 20 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αποφευχθεί το θερμικό σοκ των κυττάρων
- ✚ 75 μl διαλύματος κυττάρων αναμιγνύονται με 75 μl αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως
  - ✚ Σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρονται 75 μl αυτού του διαλύματος δεξιά και τα υπόλοιπα 75 μl αριστερά και τοποθετούνται καλυπτίδρες.
  - ✚ Τοποθέτηση slides σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup> C για 12-30 λεπτά
  - ✚ Αφαίρεση καλυπτίδρας και τοποθέτηση slides σε Lysis Buffer για 1 ώρα
  - ✚ Έκπλυση με κρύο PBS για 15 λεπτά
  - ✚ Οι αντικειμενοφόροι μεταφέρονται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτονται με αλκαλικό διάλυμα pH>13 για 30 λεπτά στους 4<sup>0</sup> C
  - ✚ Ηλεκτροφόρηση για 30 λεπτά σε συνθήκες 380 mA και 22 V στους 4<sup>0</sup> C
  - ✚ Έκπλυση με Neutralizing buffer για 30 λεπτά
  - ✚ Έκπλυση διάρκειας 20 λεπτών με καθαρή παγωμένη αιθανόλη
  - ✚ Πλήρης στέγνωση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες περίπου
  - ✚ Ενυδάτωση αντικειμενοφόρων πλακών για 10 λεπτά με dH<sub>2</sub>O
  - ✚ Χρώση πλακών με χρωστική propidium iodide (1/400) ή με χρωστική SYBR Gold
  - ✚ Σκοτάδι 10 λεπτών για την πρώτη χρωστική και 45 λεπτών για την δεύτερη
  - ✚ Έκπλυση δύο φορές για 10 λεπτά η κάθε μία με dH<sub>2</sub>O προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της φθορίζουσας χρωστικής
  - ✚ Μικροσκοπική παρατήρηση
  - ✚ Λήψη εικόνων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM 2500) με φακό 20X
  - ✚ Ανάλυση των εικόνων με το λογισμικό TriTek CometScore TM Freeware 1.5. Το συγκεκριμένο λογισμικό υπολογίζει διάφορες παραμέτρους, αλλά η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη εργασία είναι το % ποσοστό DNA στην ουρά του κομήτη (% DNA in tail), η οποία θεωρείται η πιο αξιόπιστη παράμετρος για την αξιολόγηση και την ποσοτικοποίηση των αλλοιώσεων του DNA που παρατηρούνται με τη μέθοδο comet.
  - ✚ data analysis με το πρόγραμμα SPSS :Anova



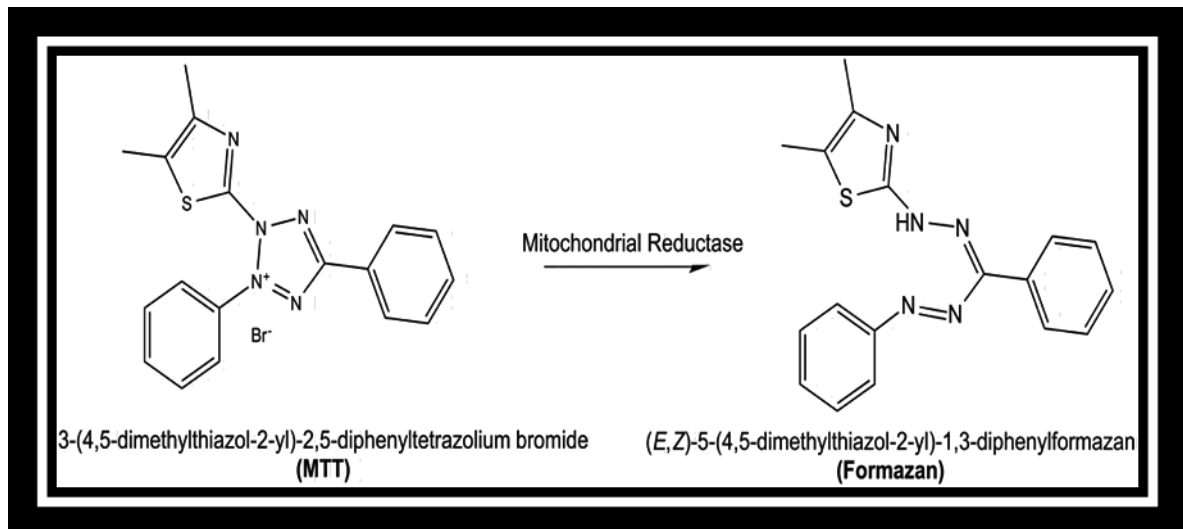
**Εικόνα 16:** Καρκινικά κύτταρα HepG2 σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση με SYBR Gold. Αριστερά, κύτταρα χωρίς αλλοιώσεις του DNA και δεξιά κύτταρα που έχουν υποστεί αλλοιώσεις του DNA.

### **4.2.3 Μέθοδος μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT**

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από επώασή τους με τα εκχυλίσματα του φραγκόσυκου σε 11 συγκεντρώσεις από κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα, (OF1,OF2,OF3,OF4,OF5 οι οποίες κυμαίνονταν από 0.005 έως και 5 mg/L χρησιμοποιώντας την βιοχημική μέθοδο MTT.

#### **Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή αρχικά περιγράφηκε από τον Mosmann (1983) και βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου αφυδρογονάση να ανάγει το διαλυτό υποκίτρινο χρώματος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε μπλε-μωβ φορμαζάνη που συσσωρεύεται στα υγιή κύτταρα σε βαθμό ευθέως ανάλογο του αριθμού τους (Mosmann, Tim, 1983). Συγκεκριμένα ο δακτύλιος του τετραζολίου μεταβολίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια από τη δραστηριότητα διαφόρων αφυδρογονασών και το απαλό κίτρινο χρώμα του υποστρώματος μετατρέπεται σε πορφυρούς κρυστάλλους, οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους με ισοπροπανόλη δίνουν ένα σκούρο μπλε/μωβ χρώμα. Τα άλατα τετραζολίου δέχονται ηλεκτρόνια από τα οξειδωμένα υποστρώματα ή από κατάλληλα ένζυμα όπως NADH και NADPH.



**Εικόνα 17:** Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου( MTT) σε μπλέ/μώβ φορμαζάνη από το ένζυμο μιτοχονδριακή ρεδοουκτάση

Η συγκέντρωση των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια των κυττάρων είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Επομένως η δοκιμασία MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη βιωσιμότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού. Η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη με την βιωσιμότητα των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού (Fabre et.al., 2001). Τα υδατοδιαλυτά άλατα του τετραζολίου αναπτύχθηκαν με την εισαγωγή θετικών ή αρνητικών φορτίων και υδροξυ ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο του άλατος τετραζολίου, ή καλύτερα με σουλφονικές ομάδες που προστίθενται απευθείας στον φαινολικό δακτύλιο.

Συγκεκριμένα στην μέθοδο MTT, κύτταρα επιστρώνονται σε πλάκα μικροκαλλιέργειας και καλλιεργούνται με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Μετά από 24 ώρες γίνεται προσθήκη υλικού εμπλουτισμένου με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της εκάστοτε εξεταζόμενης ουσίας για τον επιθυμητό χρόνο επώασης. Μετά το πέρας της επώασης προστίθεται το MTT και μετά από κατάλληλη επώαση και προσθήκη διαλύτη ισοπροπανόλης γίνεται προσδιορισμός των επιπέδων της φορμαζάνης μέσω μέτρησης της απορρόφησης (OA) στα 550 nm χρησιμοποιώντας το μετρητή πλακών μικροκαλλιέργειας (plate reader) BioRad i-Mark. Ο βαθμός της απορρόφησης του φωτός εξαρτάται από το διαλύτη.

### **Πλεονεκτήματα μεθόδου**

Γενικά έχει μικρό κόστος και χρησιμοποιείται περισσότερο λόγω του ότι αποτελεί σύντομη μέθοδο και δεν χρησιμοποιεί ραδιοϊσότοπα. Επίσης η τεχνική

αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει βελτιστοποιηθεί για διάφορα είδη κυττάρων. Είναι χρήσιμη στην μέτρηση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση προς μιτογόνα, αντιγονικά ερεθίσματα, παράγοντες ανάπτυξης και άλλα αντιδραστήρια που προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη, μελέτες κυτταροτοξικότητας, και την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων.

### ***Μειονεκτήματα μεθόδου***

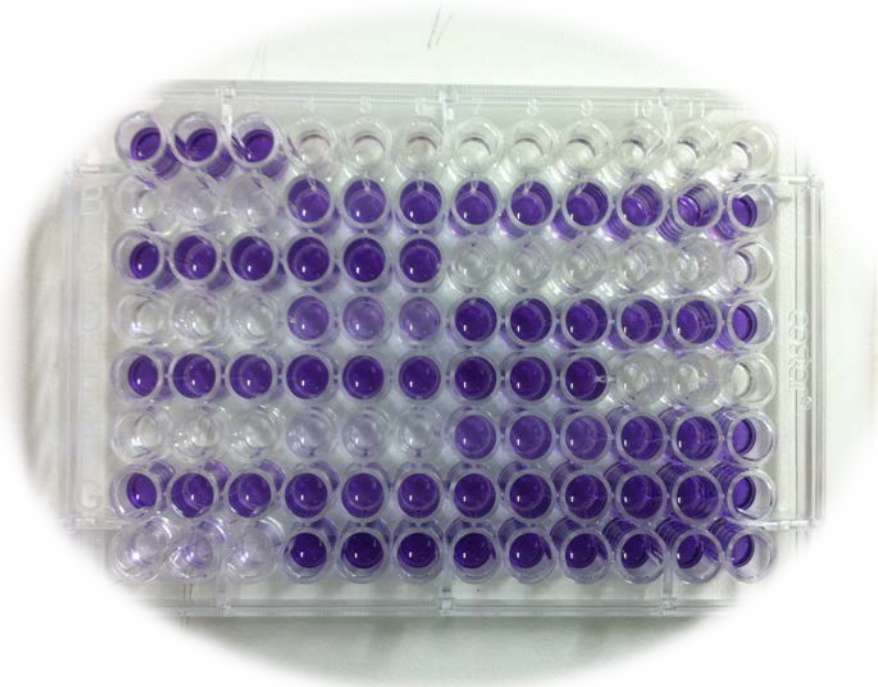
Η χρήση της μεθόδου MTT έχει περιορισμούς και επηρεάζεται από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων και τη διακύμανση στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα της αφυδρογονάσης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Επίσης υπάρχει πτωχή προσομοίωση κλινικών συνθηκών αφού η συγκεκριμένη μέθοδος εκτιμά τον αριθμό κυττάρων από τη μεταβολική δραστηριότητα πράγμα που μπορεί να επιφέρει σύγχυση ανάμεσα σε ένα μικρό ενεργό κυτταρικό πληθυσμό και σε μεγάλο αριθμό λιγότερο ενεργών κυττάρων.

(<http://www.onco.gr/documents/Mpriasoulis.pdf>)

### **4.2.3.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου**

#### ***(έλεγχος κυτταροτοξικότητας)***

- ✚ Συγκεκριμένος όγκος από καρκινικά κύτταρα (HeLa, HepG2) ή φυσιολογικά κύτταρα (λεμφοκύτταρα) επιστρώνονται σε πλάκα μικροκαλλιέργειας (96-well) και καλλιεργούνται με κατάλληλο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες
- ✚ Τα κύτταρα συνεπιάζονται μαζί με τις ουσίες του φραγκόσυκου για 72 ώρες (λεμφοκύτταρα) και 24 ώρες για τα καρκινικά κύτταρα.
- ✚ Σκόνη του MTT διαλύεται σε PBS σε συγκέντρωση 5mg/mL και προστίθεται στα δείγματα τα οποία αφήνονται για 4 ώρες.
- ✚ Το διάλυμα του MTT αφαιρείται και προστίθεται ισοπροπανόλη σε όλα τα «πηγάδια» με σκοπό να διαλύσει τα φορμαζανικά άλατα στο έγχρωμο διάλυμα.
- ✚ Μέτρησης της απορρόφησης (OA) στα 550 nm χρησιμοποιώντας το μετρητή πλακών μικροκαλλιέργειας (plate reader) BioRad i-Mark.
- ✚ Υπολογισμοί του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης για κάθε σειρά δειγμάτων.

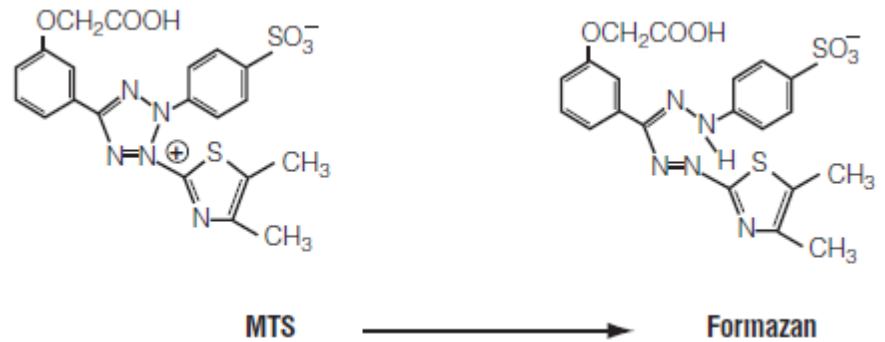


**Εικόνα 18:** πλάκidia κυτταροκαλλιιεργειών 96 μικροφρεατίων όπου είναι ευδιάκριτος ο σχηματισμός μπλε/μωβ χρώματος μετά την διάλυση του ιζήματος της φορμαζάνης σε ισοπροπανόλη

#### ***4.2.4 Μέθοδος μελέτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTS***

Η δοκιμασία MTS (3- (4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-5-(3-καρβοξυμεθοξυφαινυλ)-2-(4σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζολίου) προσδιορίζει την μεταβολική δραστικότητα των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών, οι οποίες παράγονται από τα ζωντανά κύτταρα.

Οι δοκιμασίες με άλατα τετραζολίου έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια, για την διάκριση των ζωντανών κυττάρων από τα νεκρά. Τα άλατα τετραζολίου μετατρέπονται σε φορμαζάνη από το σύστημα του κυτοχρώματος των ζωντανών κυττάρων, και το χρώμα που παράγεται είναι ανάλογο των κυττάρων που έχουν επιβιώσει στην καλλιέργεια (Malich, G et al, 1997).



**Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του MTS σε φορμαζίνη**

Η αναγωγή του άλατος τετραζολίου MTS σε φορμαζίνη είναι αποτέλεσμα της δράσης των αφυδρογονασών που παράγουν αναγωγικά ισοδύναμα, όπως το NADH ή NADPH. Στην συνέχεια το NADH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του σε ένα αντιδραστήριο μεταφοράς ηλεκτρονίων όπως η μεθοθειική φαιναζίνη (PMS) με αποτέλεσμα την αναγωγή αυτών των ενώσεων. Οι αναχθείσες ETRs, με την σειρά τους, αλληλεπιδρούν άμεσα και ανάγουν την ένωση τετραζολίου MTS με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός έντονα χρωματισμένου διαλυτού υδατικού προϊόντος φορμαζίνης, το οποίο μπορεί να μετρηθεί χρωματομετρικά (Riss, T.L. and Moravec, R.A,1992).

### ***Πλεονεκτήματα***

Η μέθοδος υπερτερεί σε διαλυτότητα σε καλλιεργητικό μέσο σε αντίθεση με την πρόγονό του, την δοκιμασία MTT είναι ανώτερη από όλες τις άλλες παραλλαγές της δοκιμασίας ανίχνευσης με χρήση αλάτων τετραζολίου, τόσο ως προς την ακρίβεια και την αξιοπιστία της όσο και σε ότι αφορά την ευκολία χρήσης (Niles et al, 2009, Barltrop, J.A. et al.1991; Berridge, M.V. and Tan, A.S. 1993; Cory, A.H. et al. 1991; Mosmann, T,1983; Bernabei, P.A. et al.,1989; Chen, C. H. et al, 1990).

Επειδή είναι μη ραδιενεργό, δεν απαιτεί την απομάκρυνση ραδιενεργών αποβλήτων. Μπορεί η μέθοδος να διενεργείται με την ανάλυση σε μικροπλάκες 96 θέσεων χωρίς πλύσεις ή κυτταρική συγκομιδή οπότε παρέχει περισσότερη ταχύτητα στους ερευνητές. Επιπλέον είναι πιο ευέλικτο σε αντίθεση με το MTT, μπορεί να διαβαστεί (σε φωτόμετρο) και στην συνέχεια να επιστραφεί στον επωαστή για περαιτέρω ανάπτυξη του χρώματος.

Επίσης η χρήση του είναι πιο ασφαλής για τον ερευνητή, αφού δεν απαιτεί πτητικό οργανικό διαλύτη για τη διάλυση του προϊόντος φορμαζίνης και τέλος είναι πολύ βολικό άλας αφού παρέχεται έτοιμο προς χρήση με την μορφή σταθερού, παγωμένου, στείρου διαλύματος (Malich, G et al, 1997; da Costa A.O et al, 1999 ; Eirheim, H.U 2004).

Επομένως, η διαλυτότητα του αντιδραστηρίου MTS, επιτρέπει πολλαπλές μετρήσεις, εξοικονομεί χρόνο επεξεργασίας και ενδεχομένως επιτρέπει την καλύτερη ενσωμάτωση σε ένα αυτοματοποιημένο μοντέλο (Bouhifd et al, 2012).

#### 4.2.4.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου

##### (Μετρηση κυτταροτοξικότητας λεμφοκυτταρων)

- ✚ Συλλογή και τοποθέτηση λεμφοκυττάρων σε μικροπλάκα 96 θέσεων
- ✚ Πρόσθεση 20 µl MTS
- ✚ Επώαση 1- 4 ώρες στον επωαστήρα 5% CO<sub>2</sub>
- ✚ Μέτρηση της πλάκας στα 490 nm

#### 4.2.5 Μέθοδος γH2AX In Cell Western (ICW)

Η τεχνική γH2AX In Cell Western (ICW) είναι μια high throughput μέθοδος προσδιορισμού κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας που βασίζεται στη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX (γH2AX). Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX (γH2AX) προκαλείται ύστερα από την επαγωγή θραυσμάτων διπλής έλικας στο DNA του κυττάρου και αποτελεί έναν γενικό βιοδείκτη γονοτοξικότητας (global genotoxic insult) όπως αναφέρεται από τους Sedelnikova *et al.*, 2011. Επίσης αποτελεί ένα καλά αναγνωρισμένο προ-καρκινικό δείκτη *in vivo* (Bonner *et al.*, 2008) και έχει χρησιμοποιηθεί για μελέτες βιοπαρακολούθησης γονοτοξικότητας πληθυσμών (Ivashkevich *et al.*, 2012; Valdiglesias *et al.*, 2013). Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες δοκιμές για την ανίχνευση γονοτοξικότητας βασισμένες στην ποσοτικοποίηση αυτού του βιοδείκτη με τεχνικές ELISA, κυτταρομετρία ροής (fluorescence-activated cell sorter, FACS) ή τεχνικές μικροσκοπίας με χρήση ανοσοφθορισμού (Zhou *et al.*, 2006; Watters *et al.*, 2009; Matsuzaki *et al.*, 2010; Smart *et al.*, 2011; Tsamou *et al.*, 2012).

Η μέθοδος γH2AX-InCellWestern (γH2AX –ICW) έχει προταθεί πρόσφατα ως μία καινούργια *in vitro* τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πιθανής γονοτοξικής δράσης διαφόρων χημικών. Η δοκιμή γίνεται σε μικροπλάκα καλλιέργειας 96 θέσεων και βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της γH2AX με την τεχνική “in-cellWestern (ICW)” και επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας διαφόρων ξеноβιοτικών σε κύτταρα ανθρώπου (Audebert *et al.*, 2010, 2011, 2012; Graillet *et al.*, 2012a,b; Jamine *et al.*, 2013; Martine *et al.*, 2013). Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιούνται κύτταρα ηπατοκαρκινώματος ανθρώπου (HepG2) καθώς η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει περιγραφεί ως κατάλληλο μοντέλο για την ανίχνευση της γονοτοξικής δράσης διαφόρων ουσιών της European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές (Westerlink *et al.*, 2010, 2011; Tsamou *et al.*, 2012). Επιπλέον τα κύτταρα αυτά εκφράζουν p53 το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την μείωση του αριθμού των ψευδώς θετικών



αποτελεσμάτων στις δοκιμές γονοτοξικότητας που χρησιμοποιούν κύτταρα θηλαστικών.

#### **4.2.5.1 Πειραματική Διαδικασία Μεθόδου $\gamma$ H2AX ICW (έλεγχος κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας)**

- ✚ Συλλογή και επίστρωση κυττάρων HepG2 σε ειδική μικροπλάκα 96 θέσεων (32.000/well)
- ✚ Επώαση με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 0.312, 0.625, 1.25 και 2.5 mg/ml για 24h ή με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ως θετικός μάρτυρας) σε ορισμένες θέσεις τις μικροπλάκας.
- ✚ Απομάκρυνση των ουσιών και ξέπλυμα των κυττάρων με PBS
- ✚ Μονιμοποίηση με 4% PFA
- ✚ Ξέπλυμα των κυττάρων με PBS και neutralization buffer (20μN NH<sub>4</sub>Cl).
- ✚ Ξέπλυμα των κυττάρων με permeabilization buffer
- ✚ Επώαση των κυττάρων με saturation buffer
- ✚ Ξέπλυμα των κυττάρων με PST και επώαση με πρωτογενές αντίσωμα anti- $\gamma$ H2AX Rabbit O/N
- ✚ Ξέπλυμα των κυττάρων με PST και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα anti-Rabbit 800 και RedDot2 (για τη σήμανση του DNA) για 1 h
- ✚ Ξέπλυμα των κυττάρων και μέτρηση της απορρόφησης στο Odyssey Infrared Imaging Scanner (LiCor Science Tec) σε μήκη κύματος 700 και 800 nm.
- ✚ Με το κατάλληλο λογισμικό του οργάνου, γίνεται αυτόματα υπολογισμός των μέσων όρων των επαναλήψεων σε κάθε πλάκα καθώς και διόρθωση του υποβάθρου (background). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία δίνουν ταυτόχρονα τα επίπεδα γονοτοξικότητας και κυτταροτοξικότητας για κάθε πειραματικό χειρισμό.

#### **4.2.6 Στατιστική Ανάλυση μεθόδων**

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων αλλά και της γονοτοξικότητας υφίστανται επεξεργασία με σκοπό να βρεθούν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις από κάθε σειρά δειγμάτων. Έπειτα ακολουθεί η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων η οποία έγινε με τη μέθοδο ANOVA χρησιμοποιώντας το πακέτο SPSS 16.0 για Windows. Οι συγκρίσεις μεταξύ πολλαπλών μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με την ανάλυση της διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA). Ύστερα από τον έλεγχο της ισότητας της διακύμανσης (homogeneity of variance) με το Levene's test, η εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των ομάδων (του δείγματος ελέγχου και των



υπό εξέταση εκχυλισμάτων) ελέγχθηκε με το Tukey's posthoc test στην περίπτωση που βρέθηκε ίση διακύμανση (equal variances assumed) και με το Games-Howell posthoc test στην περίπτωση που δε βρέθηκε ίση διακύμανση (equal variances not assumed). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμές του  $p$  που ήταν μικρότερες από 0,05.

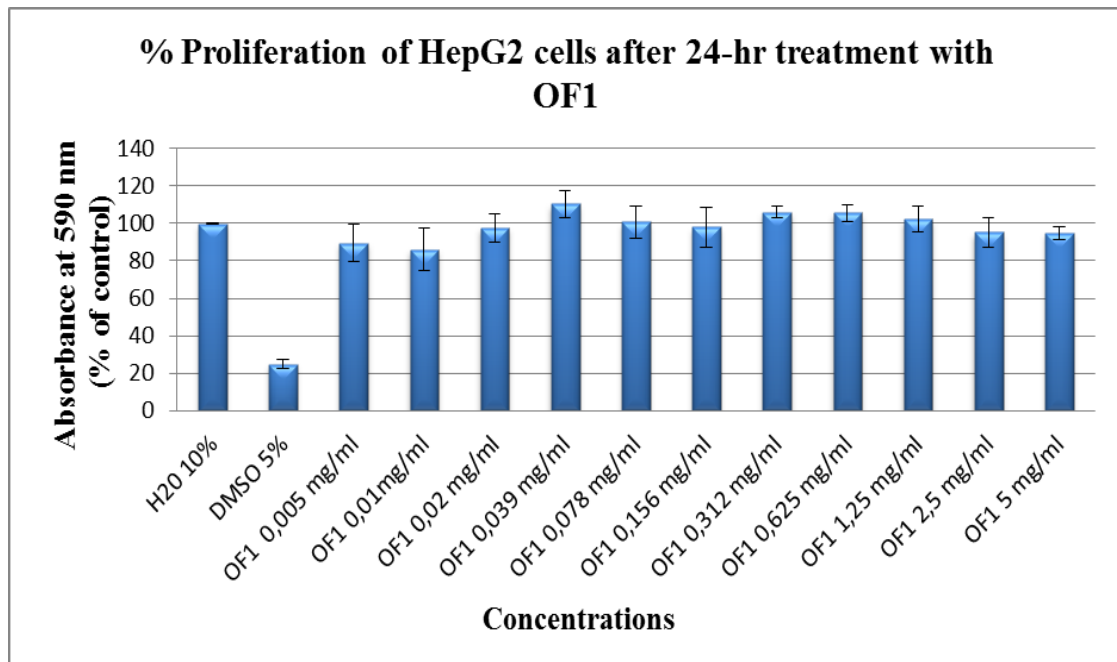
## ***Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα***

### ***5.1 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT σε in vitro σύστημα***

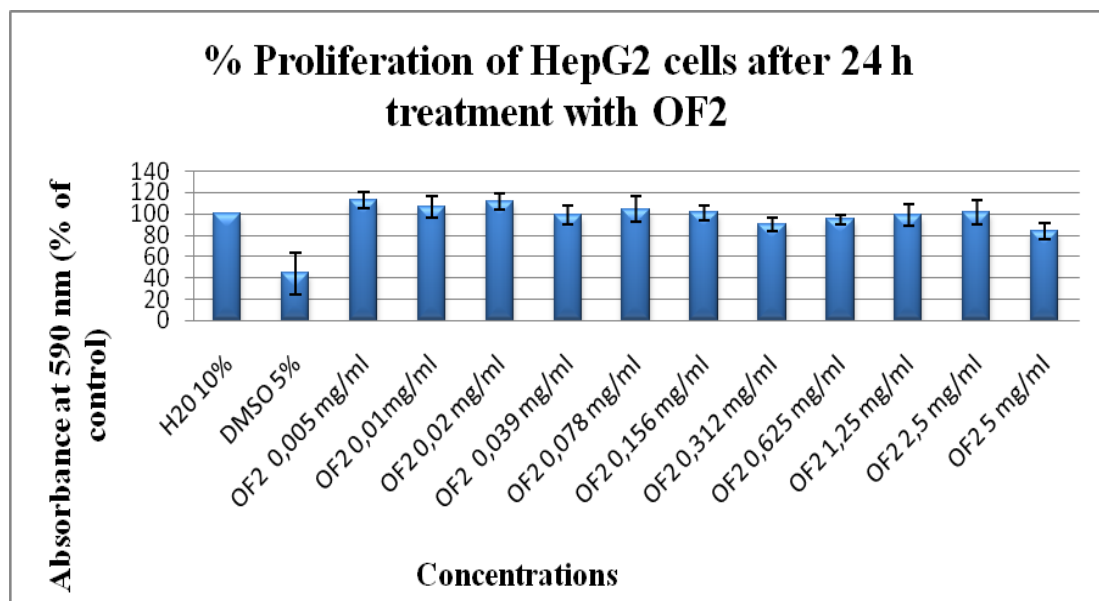
#### ***5.1.1 Κύτταρα HepG2***

Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν να μελετηθεί κατά πόσο τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα έχουν επίδραση στον πολλαπλασιασμό και άρα στη βιωσιμότητα των κυττάρων HepG2. Με τον τρόπο αυτό αξιολογήσαμε την κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

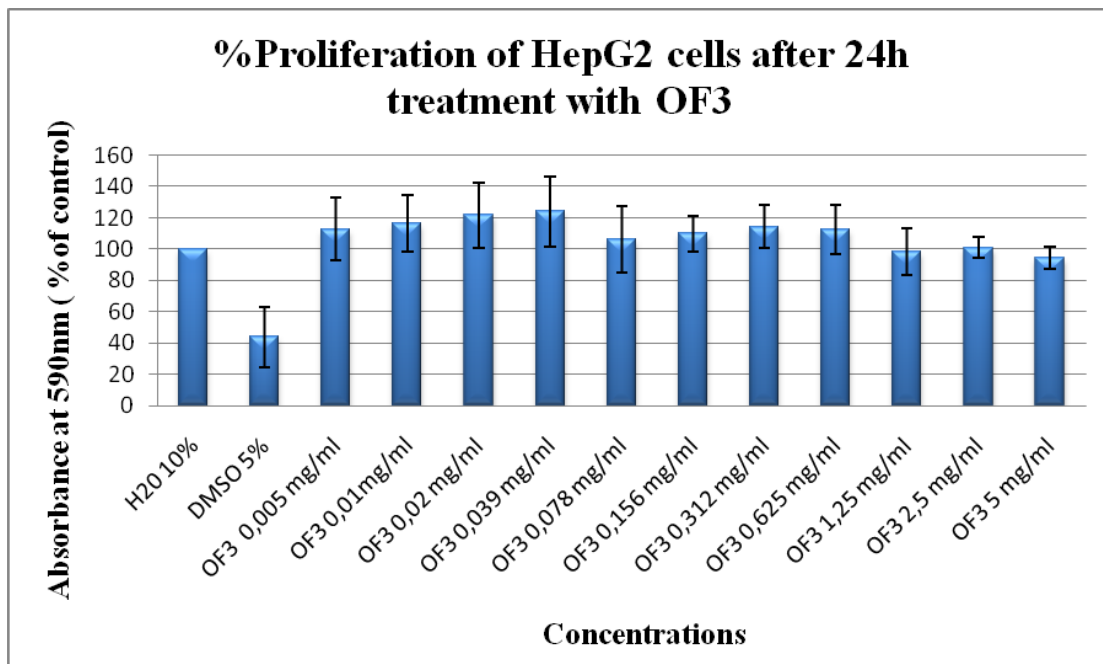
Για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT στα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιήθηκαν 11 συγκεντρώσεις από κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα, οι οποίες κυμαίνονταν από 0.005 έως 5 mg/L (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στα Γραφήματα 1, 2, 3, 4 και 5, κανένα από τα εκχυλίσματα δεν είχε κυτταροτοξική δράση σε καμιά από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, καθώς η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των υπό εξέταση εκχυλισμάτων ( $p > 0.05$ ).



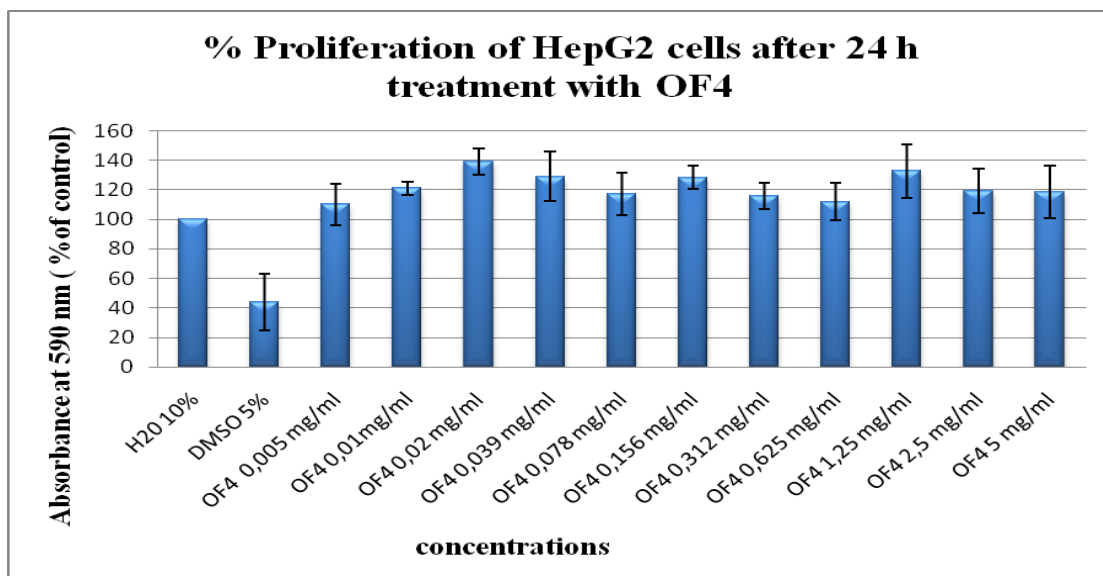
Γράφημα 1: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)



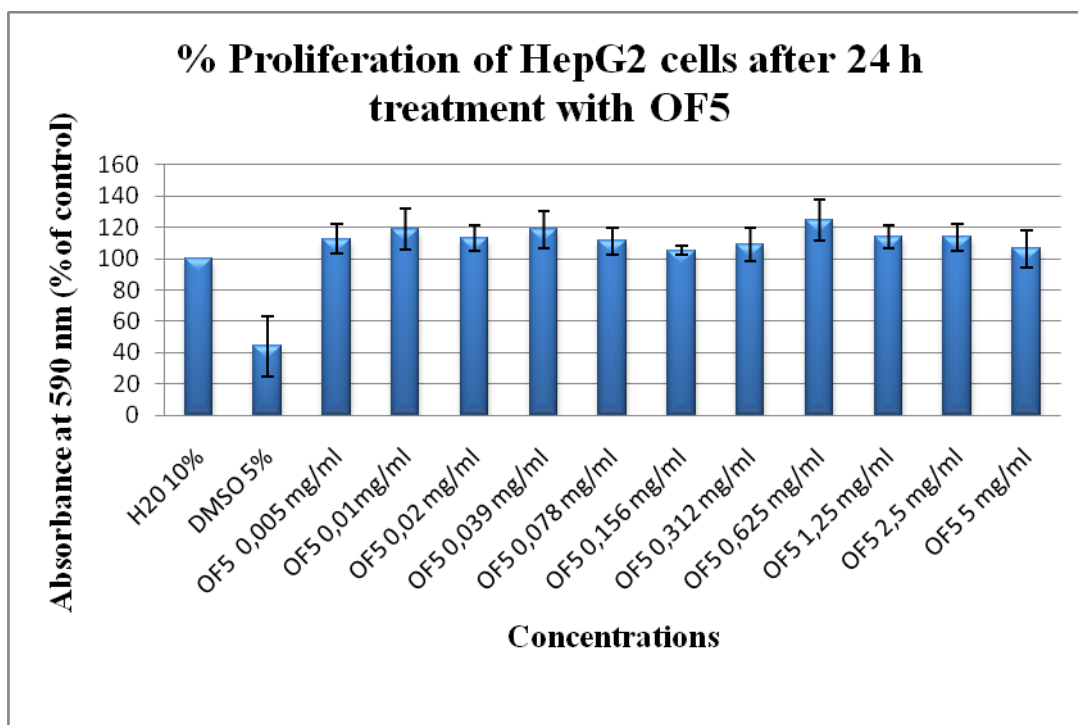
Γράφημα 2: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF2. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)



Γράφημα 3: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF3. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

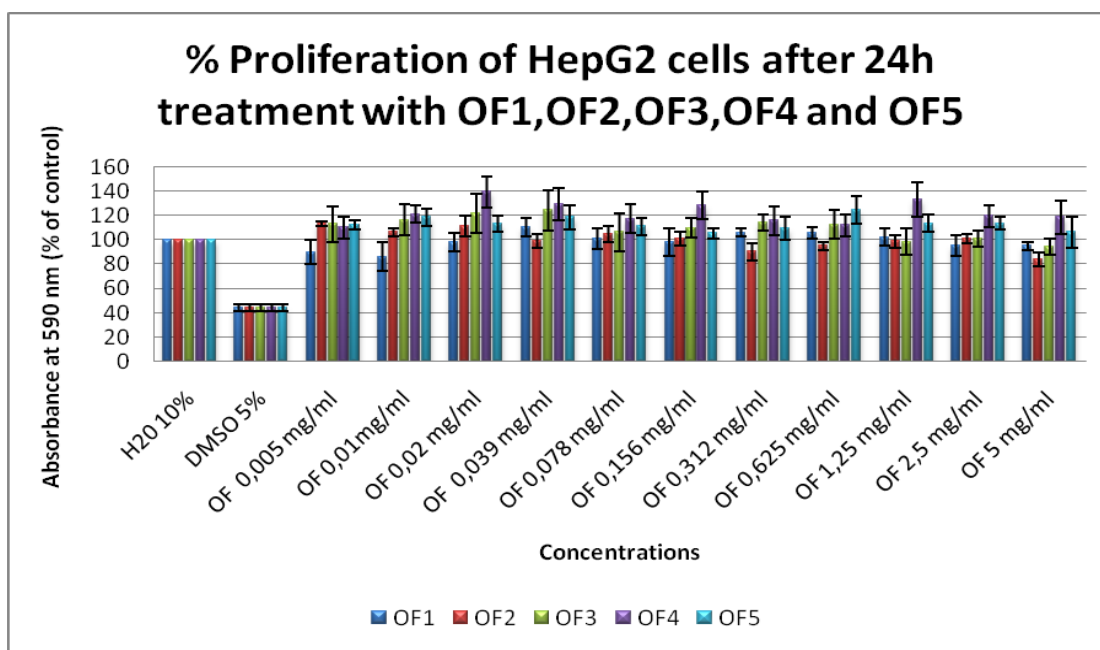


Γράφημα 4 : Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF4. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)



Γράφημα 5: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF5. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

Τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στο παρακάτω Γράφημα 6.



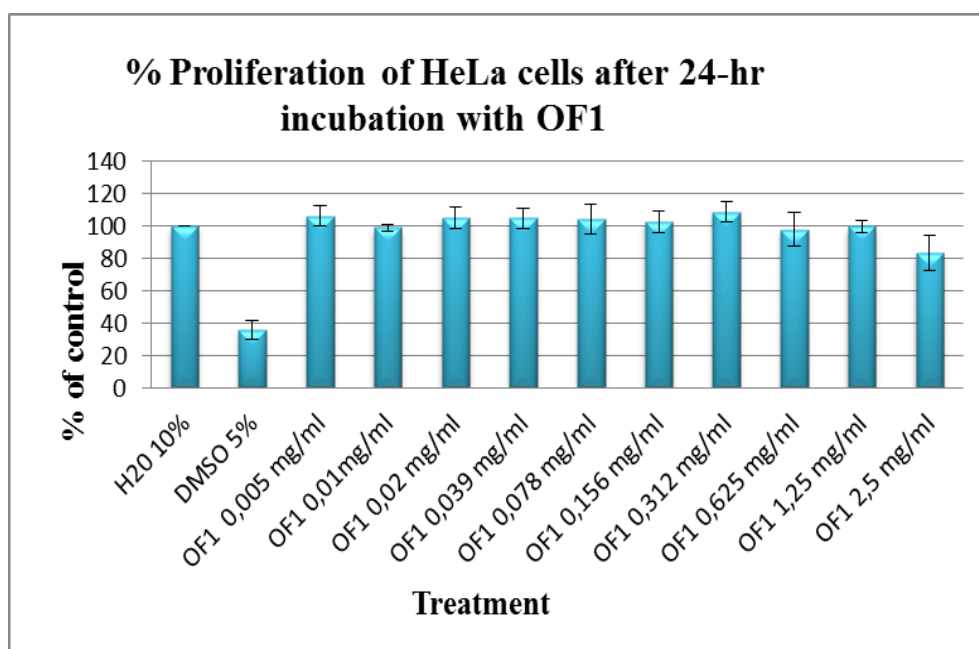
Γράφημα 6 : Αποτελέσματα συνολικών πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικά εκχύλισματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4 και OF5)

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα , φαίνεται ότι κανένα από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα HepG2, ως την ανώτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 5 mg/ml και ούτε επηρέασε αρνητικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αντίθετα σε ορισμένες περιπτώσεις ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αυξήθηκε, χωρίς ωστόσο αυτές οι αλλαγές να είναι στατιστικά σημαντικές.

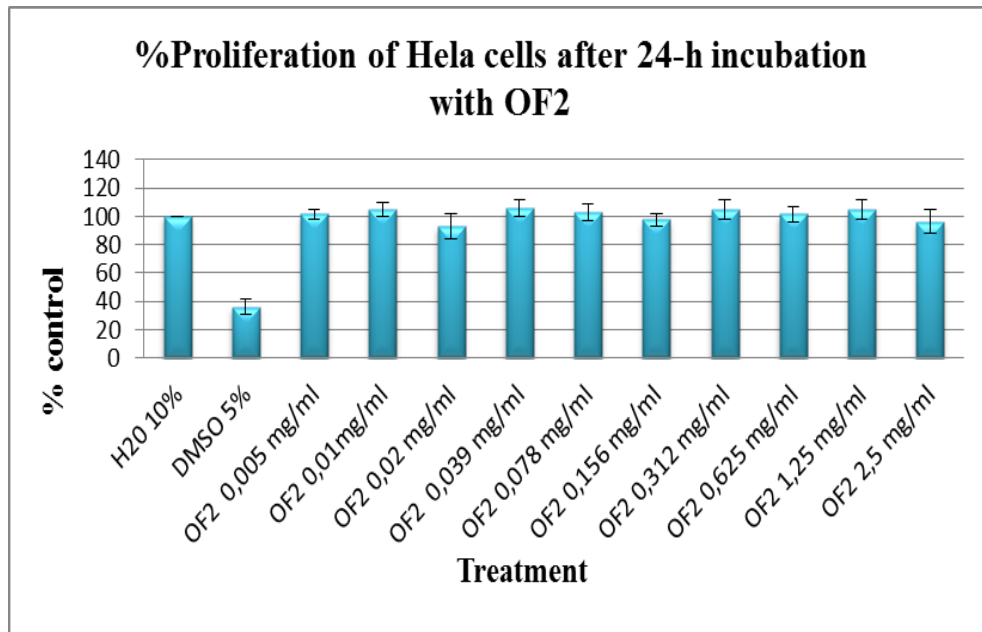
### 5.1.2 Κύτταρα HeLa

Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν να μελετηθεί κατά πόσο τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα έχουν επίδραση στον πολλαπλασιασμό και επομένως και στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa. Με τον τρόπο αυτό αξιολογήσαμε την κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

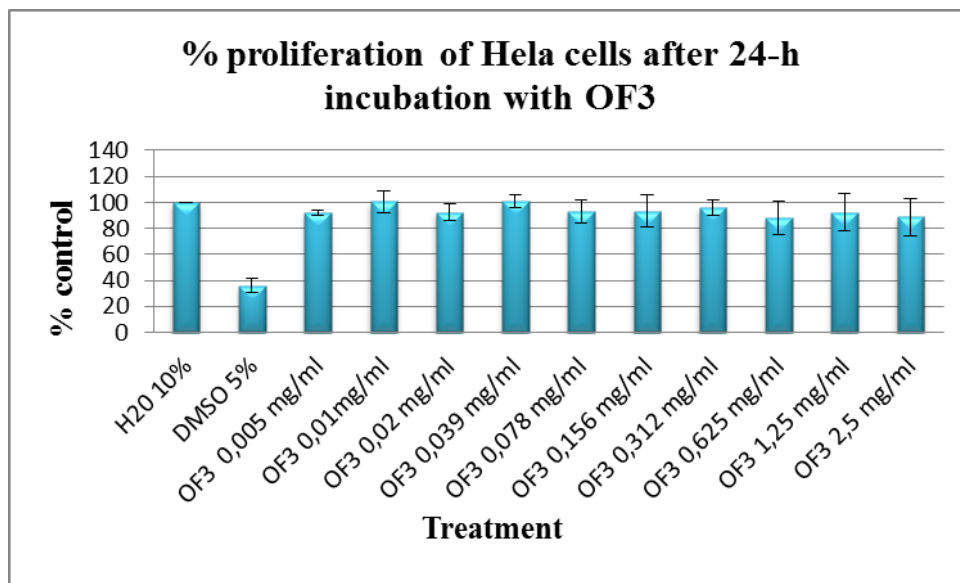
Για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTT στα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν 10 συγκεντρώσεις από κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα, οι οποίες κυμαίνονταν από 0.005 έως και 2.5 mg/L (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στα Γραφήματα 7, 8, 9, 10,11 και 12 κανένα από τα εκχυλίσματα δεν είχε κυτταροτοξική δράση σε καμιά από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, καθώς η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των υπό εξέταση εκχυλισμάτων ( $p > 0.05$ ).



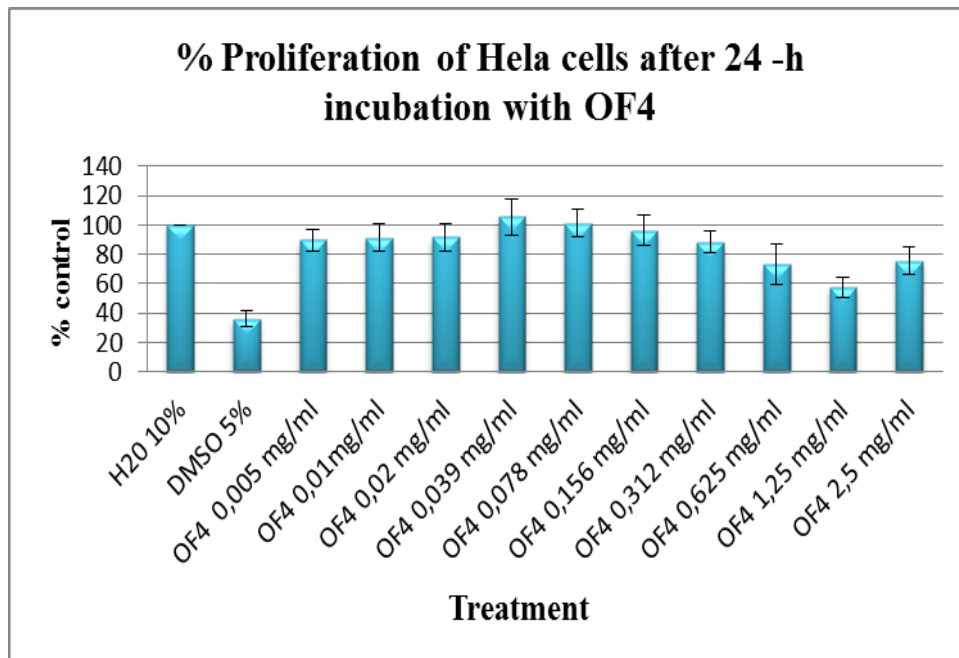
Γράφημα 7: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)



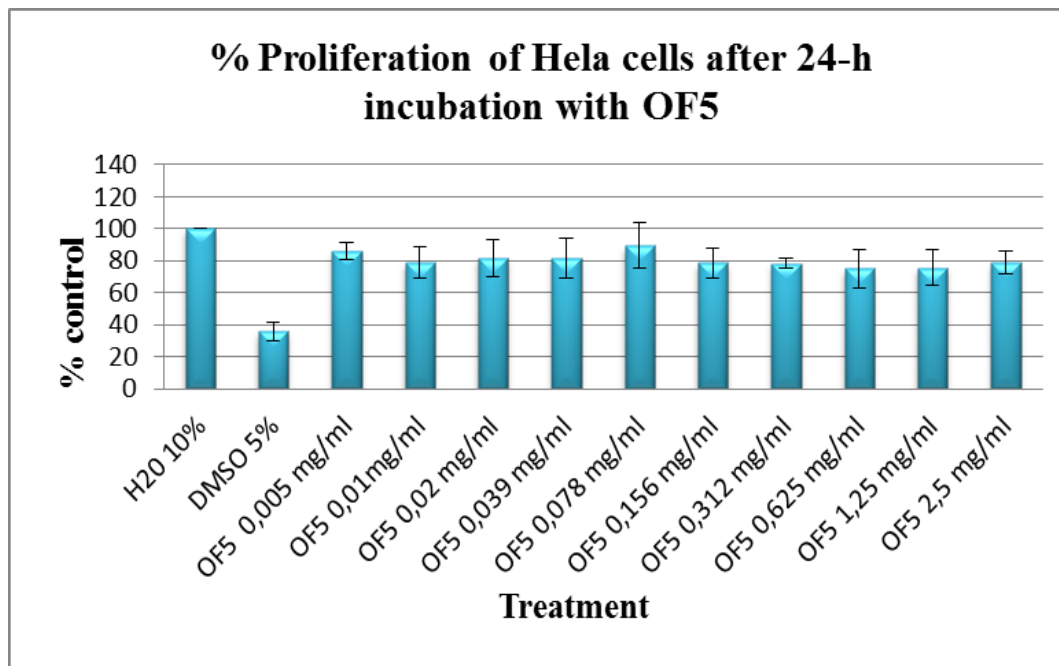
Γράφημα 8: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF3 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)



Γράφημα 9 : Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3).



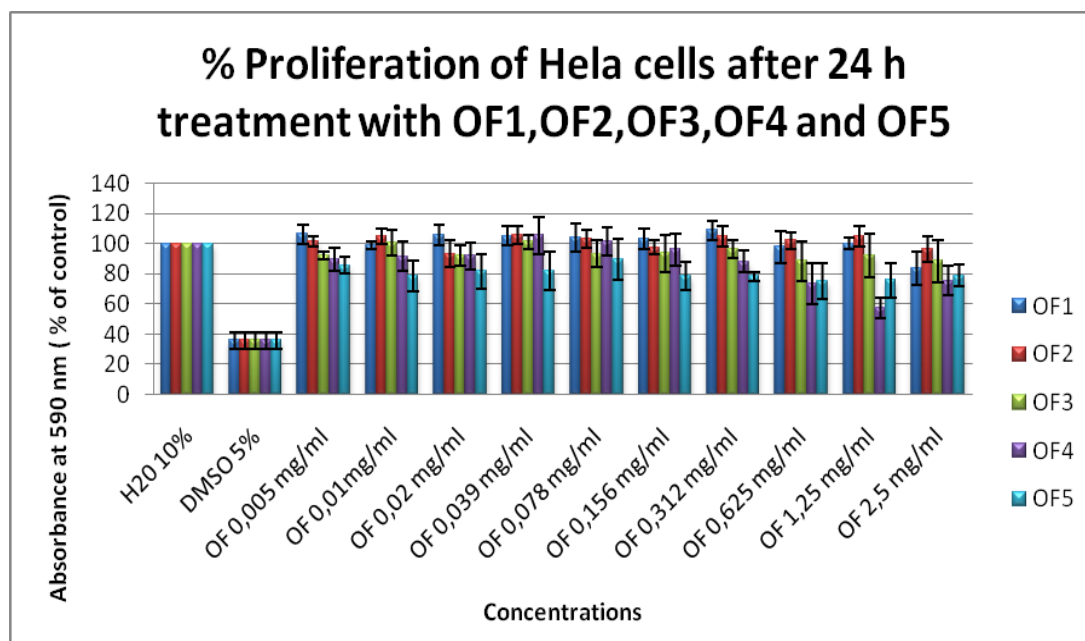
Γράφημα 10 : Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Hela μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3).



Γράφημα 11 : Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα Hela μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF5 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3).



Τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στο παρακάτω Γράφημα 12.



Γράφημα 12: Αποτελέσματα συνολικών πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4 και OF5)

Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι κανένα από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα HeLa, ως την ανώτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση των 2.5 mg/ml. Μόνο το εκχύλισμα από σπόρους (OF4) έδειξε κάποια σχετική μείωση του πολλαπλασιασμού των HeLa κυττάρων (αύξηση της κυτταροτοξικότητας) από τη συγκέντρωση 0.625 mg/ml και πάνω, αλλά αυτή η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

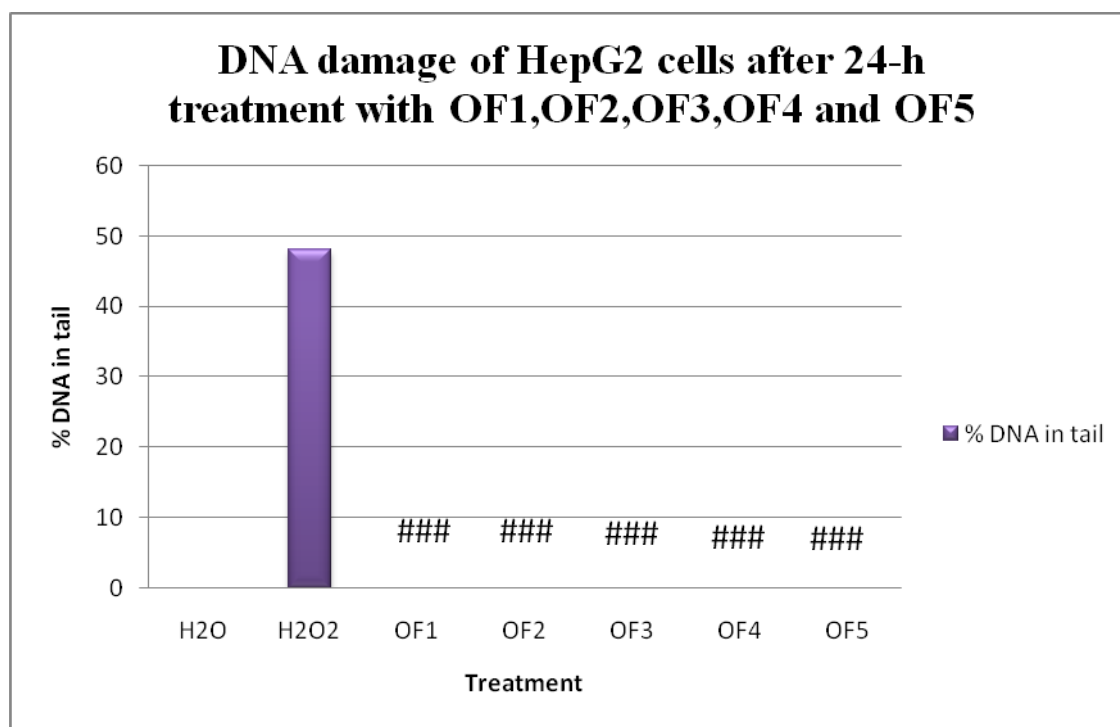
## 5.2 Μελέτη εκτίμησης γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet assay

Ως επόμενο βήμα στη μελέτη των τοξικών ιδιοτήτων των υδατικών εκχυλισμάτων ήταν ο προσδιορισμός των γονοτοξικών τους ιδιοτήτων με τη μέθοδο του comet assay. Τα κύτταρα HepG2 είναι κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη των γονοτοξικών ιδιοτήτων ουσιών σε *in vitro* συνθήκες, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στην ενότητα των μεθόδων.

Λόγω του ότι δεν παρουσιάστηκε κυτταροτοξικότητα σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων και επειδή η συγκέντρωση των 5 mg/ml θεωρήθηκε αρκετά μεγάλη τα πείραματα γονοτοξικότητας

διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση 2.5 mg/ml για κάθε ένα από τα πέντε εκχυλίσματα.

Για κάθε εκχύλισμα, έγιναν 4 επαναλήψεις των συγκεκριμένων πειραμάτων και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Γραφήμα 13. Όπως φαίνεται κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν προκαλεί αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Ο έλεγχος με ANOVA (SPSS) δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των υπό εξέταση εκχυλισμάτων ( $p > 0.05$ ). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η μέση τιμή της παραμέτρου % DNA in tail length στο θετικό μάρτυρα ( $H_2O_2$ ) είναι περίπου 48%, ενώ η αντίστοιχη τιμή στον αρνητικό μάρτυρα και στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα είναι κοντά στο 0%.



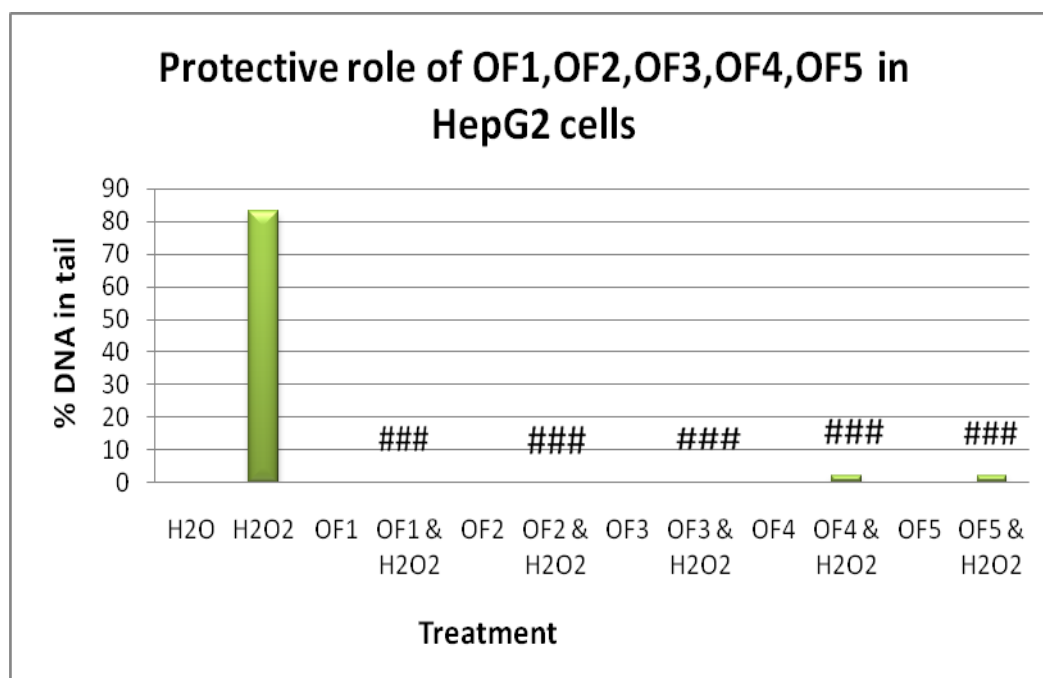
Γράφημα 13: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης επαγωγής γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4, OF5). (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*:vs $H_2O$ , #: vs  $H_2O_2$ ) Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα,  $n=4$

### 5.3 Μελέτη της τυχόν προστατευτικής δράσης έναντι του οξειδωτικού stress ή/και της γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet assay

Στις συγκεκριμένες πειραματικές δοκιμές, κύτταρα HepG2 εκτίθενται σε παράγοντες που είναι γνωστό ότι προκαλούν αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό (π.χ.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) παρουσία ή απουσία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ύπαρξη των εκχυλισμάτων αυτών δρα προστατευτικά στο κύτταρο, μειώνοντας τις αλλοιώσεις που προκαλεί το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα εν λόγω πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση 2.5 mg/ml για κάθε ένα από τα 5 εκχυλίσματα, η οποία δεν έδειξε καμιά γονοτοξική δράση στα προηγούμενα πειράματα.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρουσιάζουν αλλοιώσεις στο DNA τους και το ποσοστό DNA στην ουρά του κομήτη (αλλοιωμένο DNA) ξεπερνά σε ποσοστό το 80%. Αντίθετα τα κύτταρα που είχαν προεπαστεί με εκχύλισμα OF1 πριν να επιδράσουμε σε αυτά με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> φαίνεται ότι δεν εμφανίζουν αλλοιώσεις όταν επωαστούν με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αυτό το γεγονός φανερώνει ότι η επίδραση με το εξεταζόμενο εκχύλισμα δρα προστατευτικά στα κύτταρα, στο DNA των οποίων δεν προκαλούνται αλλοιώσεις από την επίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται σε όλα τα άλλα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF2-OF5). Ο έλεγχος με ANOVA (SPSS) έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των υπό εξέταση εκχυλισμάτων οπότε παρατηρούμε προστασία (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



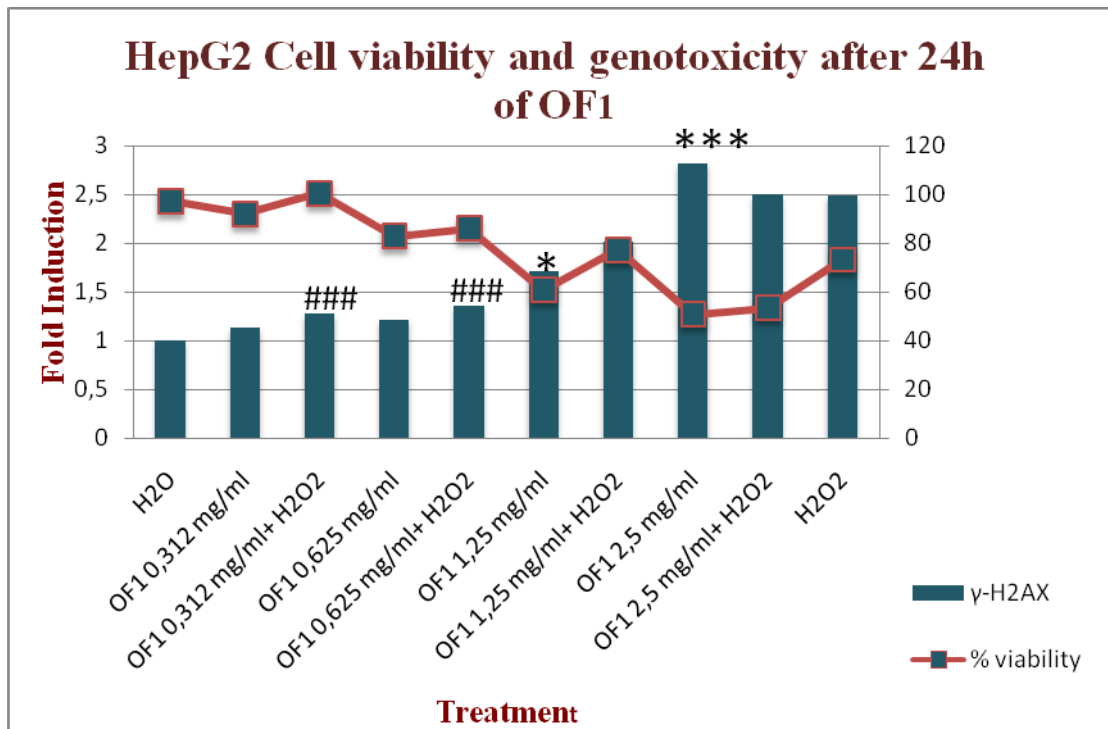
**Γράφημα 14:** Αποτελέσματα μελέτης πιθανής προστατευτικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4, OF5) έναντι του οξειδωτικού stress ή/και της γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet assay σε κύτταρα HepG2. (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα,n=4

#### **5.4 Μελέτη κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με την μέθοδο $\gamma$ H2AX In Cell Western (ICW)**

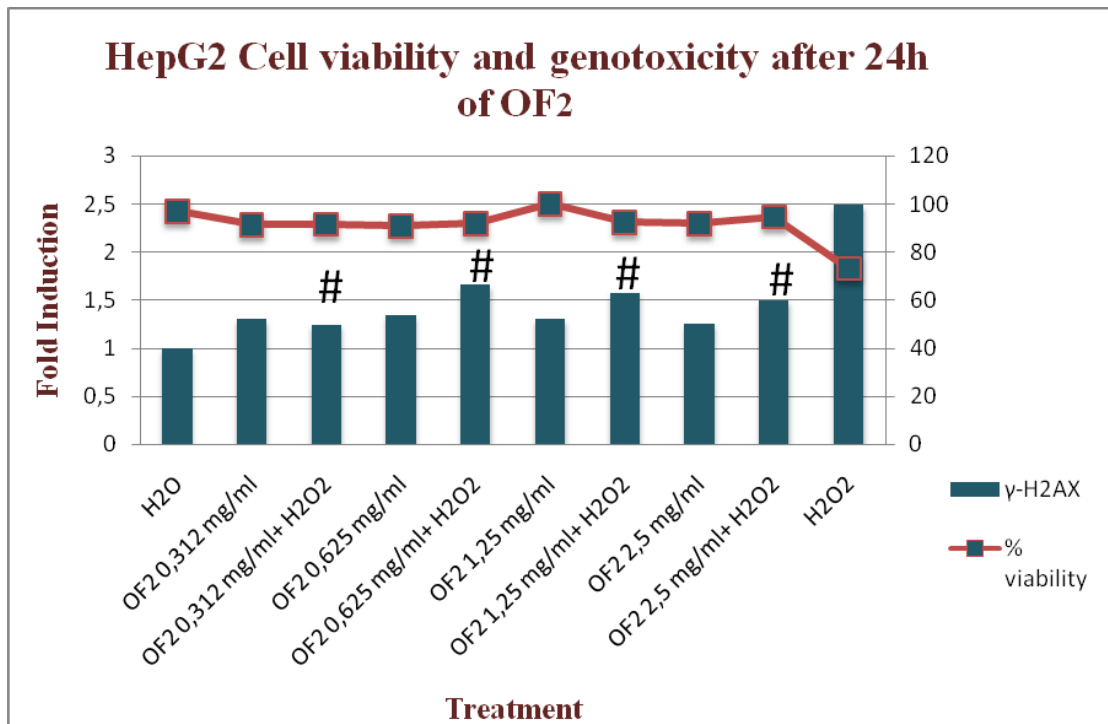
Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας είναι η μελέτη της γονοτοξικότητας των μελετούμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο  $\gamma$ H2AX In Cell Western (ICW), η οποία είναι μια νέα μέθοδος που θεωρείται πιο ευαίσθητη από την κλασική μέθοδο προσδιορισμού γονοτοξικότητας comet. Επιπλέον, σκοπός μας είναι και η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο αυτών μεθόδων, ώστε να επιβεβαιώσουμε ή όχι τη μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου αυτής στο δικό μας πειραματικό σύστημα.

Τα εν λόγω πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας τέσσερις συγκεντρώσεις από 0,312 mg/ml μέχρι 2,5 mg/ml για κάθε ένα από τα 5 εκχυλίσματα. Όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα για το εκχύλισμα OF1 υπάρχει μια αύξηση της θνησιμότητας σε συγκεντρώσεις ίσες και πάνω από 1,25 mg/ml. Ως αποτέλεσμα της αύξησης της κυτταροτοξικότητας που εμφανίζεται σε αυτές τις συγκεντρώσεις παρατηρείται δευτερεύουσα επίδραση στην αύξηση της γονοτοξικότητας στις ίδιες συγκεντρώσεις.

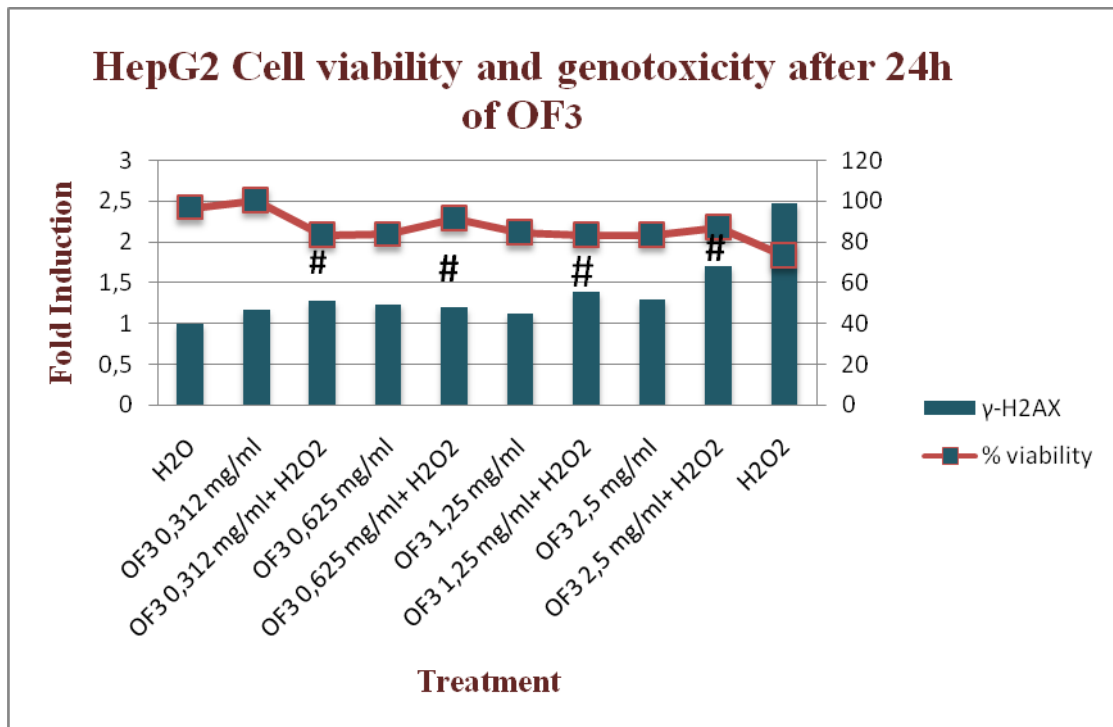
Τα υπόλοιπα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF2-OF5) δεν παρουσιάζουν καμία κυτταροτοξικότητα, όπως φαίνεται στα Γραφήματα 16 έως 19 ως και την ανώτερη συγκέντρωση και καμία γονοτοξικότητα. Επιπλέον και με αυτή τη μέθοδο παρατηρούμε ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα προκαλούν προστασία των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα παραπάνω αποτελέσματα εκτός από το πρώτο εκχύλισμα συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων μεθόδων οπότε και τα πιστοποιούν.



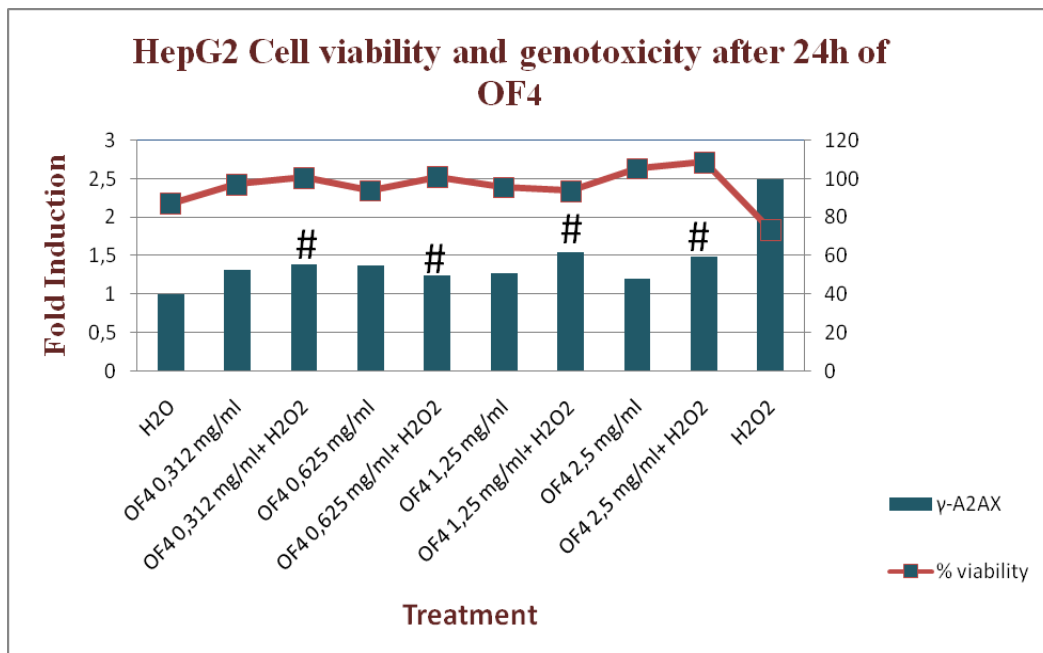
Γράφημα 15: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4) (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



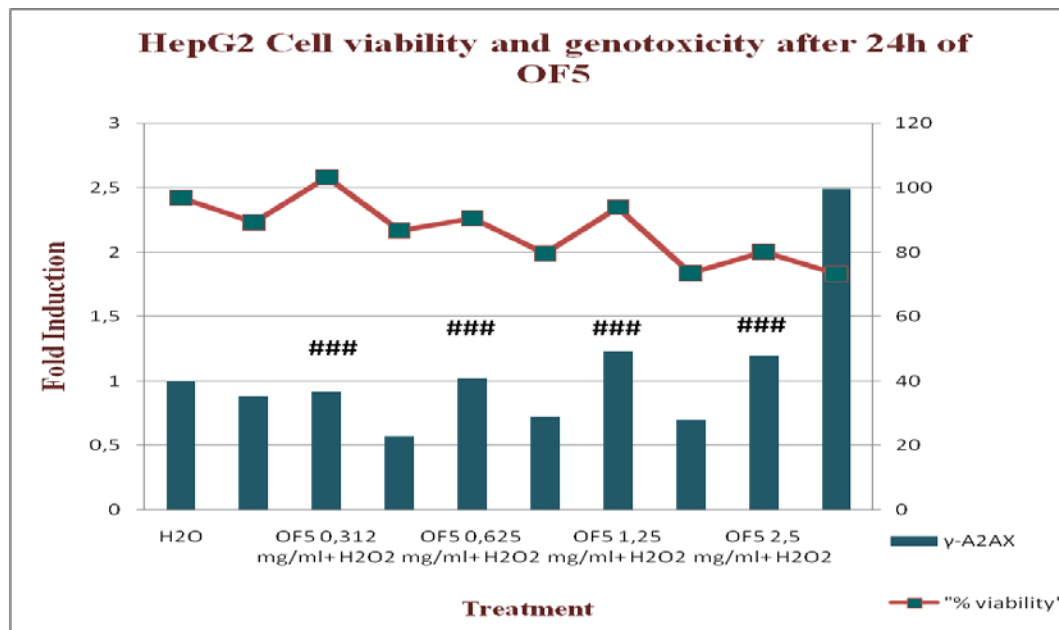
Γράφημα 16: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF2 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4) (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



Γράφημα 17: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF3 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4) (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



Γράφημα 18: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4) (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*:p<0.001, \*:vsH<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



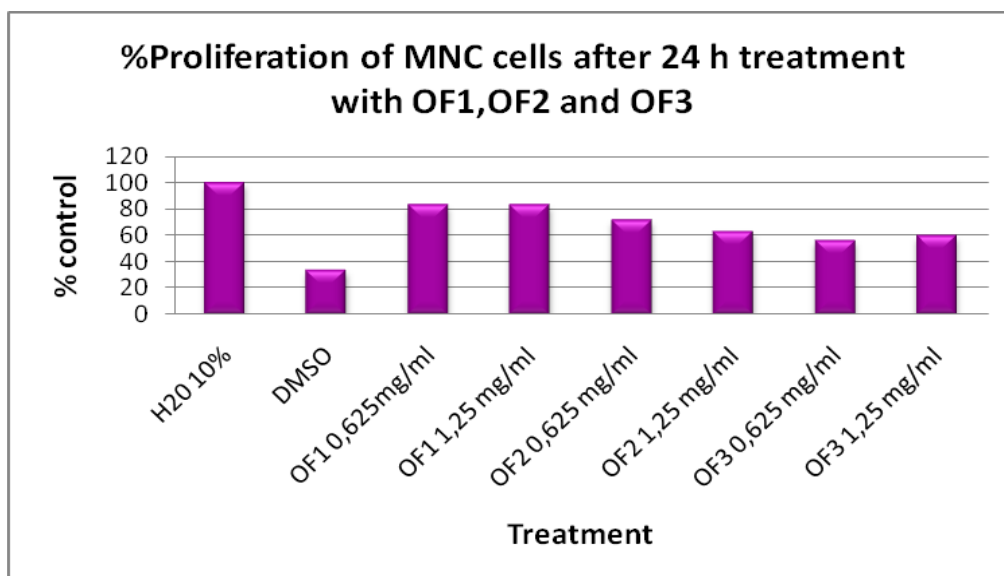
Γράφημα 19: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF5 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4) (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*: vs H<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

## 5.5 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας με τη χρήση χρωμογόνου MTS σε *in vitro* σύστημα

### 5.5.1 Λεμφοκύτταρα

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων με τη χρήση κυττάρων από καρκινικές κυτταρικές σειρές, έγιναν ορισμένα πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση ορισμένων από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1-OF3) και σε πρωτογενή κύτταρα και συγκεκριμένα σαν μοντέλο διαλέχθηκαν τα λεμφοκύτταρα. Στα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1, OF2 και OF3) σε δύο συγκεντρώσεις 0.625 mg/ml και 1,25 mg/ml παρατηρήθηκε πολύ μικρή θνησιμότητα των κυττάρων στην μέγιστη συγκέντρωση. Αν και δεν έχουν γίνει οι απαραίτητες επαναλήψεις για την επιβεβαίωση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων παρακάτω εναποτίθεται το διάγραμμα της μελέτης της κυτταροτοξικότητας που παρατηρείται σε λεμφοκύτταρα με την μέθοδο MTS.





Γράφημα 20: Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTS σε ανθρώπινα Λεμφοκύτταρα μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* ( OF1,OF2 και OF3)

## Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ο προσανατολισμός του γενικού πληθυσμού προς τα προληπτικά μέτρα για την υγεία. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση και η μελέτη των φυτών και των φυσικών προϊόντων έχει αυξηθεί θεαματικά τα τελευταία 5-10 χρόνια λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που παρατηρούνται από την παραδοσιακή χρήση τους στην θεραπεία και πρόληψη ασθενειών. Όπως ένα νόμισμα έχει δύο πλευρές, έτσι και στη περίπτωση των φυσικών προϊόντων η χρήση τους ενδέχεται να έχει και αρνητικές πτυχές όπως οι τοξικές επιδράσεις που ενδεχομένως προκαλούν σε διάφορους οργανισμούς και στον άνθρωπο. Επομένως ακόμα και για τα φυσικά προϊόντα είναι απαραίτητο να διενεργούνται μελέτες προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές τοξικές τους επιδράσεις.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε ο τοξικολογικός έλεγχος υδατικών εκχυλισμάτων από διάφορα μέρη του φυτού *Opuntia ficus* ευρέως γνωστό ως φραγκόσυκο. Το εν λόγω φυτό έχει δειχθεί από διεθνείς μελέτες ότι εμφανίζει ευεργετικές επιδράσεις σε διάφορα συστήματα (αντιοξειδωτική δράση, ευεργετική δράση σε έλκος, προστατευτική δράση ενάντια σε ηπατοτοξικές ουσίες, προστατευτική δράση έναντι γαστρικών αλλοιώσεων, κ.α.)

Το φραγκόσυκο περιέχει σημαντικές ποσότητες ουσιών, όπως ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E, καροτενοειδή, αμινο- οξέα και αντιοξειδωτικές ενώσεις (φαινόλες, φλαβονοειδή), οι οποίες έχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία όπως υπογλυκαιμική και υπολιπιδαιμική δράση, και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Flores et al, 2014). Αρκετές

μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αφθονία των βιταμινών και ανόργανων συστατικών σε κάκτους και το φραγκόσυκο δεν αποτελεί εξαίρεση αφού είναι μια πολύτιμη πηγή θρεπτικών συστατικών, καθώς θεωρείται αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό, νευροπροστατευτικό, ηπατοπροστατευτικό κ.α. Το εκχύλισμα του φραγκόσυκου από λουλούδια (flowers) περιέχει διάφορα φλαβονοειδή, ενώ η φλούδα του φραγκόσυκου (peel), η οποία είναι πλούσια σε βασικά λιπαρά οξέα και λιποδιαλύτες αντιοξειδωτικών, αλλά και οι σπόροι (seeds) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ελαίου. Το εκχύλισμα από το σκληρό μέρος του φυτού (cladodes) περιέχει βιταμίνες, αντιοξειδωτικά και διάφορα φλαβονοειδή, που είναι αποτελεσματικά μέσα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και μπορεί να μειώσει το επίπεδο της χοληστερόλης, να δράσει κατά του έλκους και να βοηθήσει τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε φλεγμονές καθώς το υδατικό του εκχύλισμα βελτιώνει αξιοσημείωτα την επούλωση του τραύματος. Συνολικά, τα εκχυλίσματα από όλα τα μέρη του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες όπως διάφορα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

Τα μέρη του φυτού φραγκόσυκου που μελετήθηκαν τόσο για την τοξικότητα τους αλλά και για την προστατευτική δράση τους ήταν τα εξής πέντε: Λουλούδια (flower), σκληρό μέρος του φυτού (cladode), η φλούδα (peel), οι σπόροι (seed) και το σάρκωμα (flesh).

Για τον τοξικολογικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* συστήματα με χρήση ανθρώπινων κυττάρων (κυτταρικές σειρές και πρωτογενείς καλλιέργειες). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 και τα κύτταρα της μήτρας HeLa καθώς και ως πρωτογενή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα λευκοκύτταρα. Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται ευρέως στην επιστημονική έρευνα. Αρχικά μελετήθηκε στα ηπατικά κύτταρα η κυτταροτοξική δράση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε 11 συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν από 5 έως 0.005 mg/L. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν αναλυτικότερα παραπάνω κανένα από τα εκχυλίσματα δεν είχε κυτταροτοξική δράση σε καμιά από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις για τα κύτταρα HepG2 και τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με την επόμενη εξεταζόμενη καρκινική σειρά. Για τα καρκινικά κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν 10 συγκεντρώσεις από κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα, οι οποίες κυμαίνονταν από 2.5 έως 0.005 mg/L. Ούτε και σε αυτή την κυτταρική σειρά δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξική δράση σε καμιά από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Ενώ στα πρωτογενή κύτταρα, λευκοκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις 0,625 mg/ml και 1,25 mg/ml, και ούτε εδώ υπήρξε ένδειξη κυτταροτοξικής δράσης αφού παρατηρήθηκε πολύ μικρή θνησιμότητα κυττάρων. Σημειώνεται ότι είναι η πρώτη φορά που μελετώνται αυτές οι ιδιοότητες των υδατικών εκχυλισμάτων του φραγκόσυκου σε αυτές τις κυτταρικές σειρές.

Στην συνέχεια προσδιορίστηκε η γονοτοξική δράση των εξεταζόμενων υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού φραγκόσυκου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης μεμονομένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (Comet assay). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων που παρουσιάζονται παραπάνω κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν προκαλεί στατιστικά σημαντικές αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, άρα δεν εμφανίζει γονοτοξικότητα.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε και η ικανότητα του φυτού φραγκόσυκου να εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό που προκαλούνται από μικρές δόσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου σε *in vitro* συνθήκες σε κυτταρα ηπατοκαρκινώματος ανθρώπου HepG2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επώαση των κυττάρων HepG2 στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ανέστρεψε πλήρως τις αλλοιώσεις που προκλήθηκαν στο DNA ύστερα από την σύντομη επώαση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αναλυτικότερα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα εκχυλίσματα του φραγκόσυκου προστατεύουν τα εν λόγω ηπατικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρές. Η συγκεκριμένη δράση των υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού *ficus oruntia* είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται, ενώ στη διενθή βιβλιογραφία υπάρχουν δεδομένα μόνο για την προστατευτική δράση του σκληρού μέρους του φυτού (cladode) αλλά στην περίπτωση της σύζευξης με φυτοχημικό σύμπλοκο ( Brahmi D et al 2012).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η νέα μέθοδος In Cell Western ( ICW) με τη βοήθεια του σύγχρονου συστήματος απεικόνισης (Odyssey, LI Cor), με την οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας και της γονοτοξικότητας που προκαλεί η μελετούμενη κάθε φορά ουσία. Τα αποτελέσματα που πήραμε με αυτή τη μέθοδο δεν έδειξαν καμία κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα στο μοντέλο των HepG2 στα οποία εφαρμόστηκε. Επομένως και τα αποτελέσματα που πήραμε με αυτή την νέα και πολύ πιο ευαίσθητη μέθοδο επιβεβαιώνουν σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα των κλασσικών μεθόδων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας.

Μια μικρή διαφορά στην μέθοδο ICW σε σχέση με τις μεθόδους MTT και Comet παρατηρείται στην κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα που προσδιορίστηκε στις συγκεντρώσεις 1,25 mg/ml και 2,5mg/ml στο εκχύλισμα των λουλουδιών (OF1). Αυτή η διαφορά είναι αναμενόμενη, καθώς η μέθοδος In Cell Western είναι πολύ πιο ευαίσθητη από τις κλασσικές μεθόδους προσδιορισμού κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας. Επιπλέον η αύξηση της κυτταροτοξικότητας στις παρατηρούμενες συγκεντρώσεις μπορεί να θεωρηθεί ως θετική επίδραση καθώς το πειραματικό μας σύστημα είναι τα καρκινικά κύτταρα

ήπατος (HepG2). Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν ανάλογα με τα αποτελέσματα που είχαν παρατηρηθεί στη μελέτη των Flores Naselli et al, 2014, όπου δείχθηκε ότι το εκχυλίσμα φραγκόσυκου από το φρούτο μείωσαν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (CaCo -2).

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων με τη χρήση κυττάρων από καρκινικές κυτταρικές σειρές, έγιναν ορισμένα πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση ορισμένων από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1-OF3) και σε πρωτογενή κύτταρα ανθρώπου (λεμφοκύτταρα) με την μέθοδο MTS. Στα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα (OF1, OF2 και OF3) σε δύο συγκεντρώσεις 0.625 mg/ml και 1,25 mg/ml παρατηρήθηκε πολύ μικρή θνησιμότητα των κυττάρων στην μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως όλα τα εξετασθέντα υδατικά εκχυλίσματα από τα λουλούδια (flower), το σκληρό μέρος του φυτού (cladode), τη φλούδα (peel), τους σπόρους (seed) και το σάρκωμα (flesh) του φραγκόσυκου δεν έδειξαν καμιά γονοτοξικότητα ή κυτταροτοξικότητα σε καμιά από τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές και την πρωτογενή σειρά που μελετήθηκαν. Αντίθετα εμφάνισαν θετικές επιδράσεις, καθώς δείχθηκε ότι έχουν προστατευτική δράση έναντι στο οξειδωτικό stress στο πειραματικό μοντέλο των HepG2 κυττάρων.

## **6.1 Προτάσεις για Μελλοντικές Μελέτες**

Γενικότερα, μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με την μελέτη της τοξικότητας των εξεταζόμενων φυτικών εκχυλισμάτων από φραγκόσυκο. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι σε *in vitro* συνθήκες τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα ή γονοτοξικότητα, ενώ αντίθετα εμφανίζουν μια σημαντική προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού stress. Ενδιαφέρον θα είχε η ολοκλήρωση των πειραμάτων σε πρωτογενείς κύτταρα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν παρατηρούνται παρόμοιες ιδιότητες των μελετούμενων εκχυλισμάτων και σε πρωτογενή κύτταρα.

Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν οι αντίστοιχες ιδιότητες σε *in vivo* συνθήκες, με τη μέθοδο προσδιορισμού συχνότητας εμφάνισης μικροπυρήνα ή με τη μέθοδο comet σε ορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Φυσικά θα είχε ενδιαφέρον και η μελέτη της οξείας τοξικότητας (acute toxicity) καθώς η εκτίμηση της οξείας τοξικότητας από στόματος αποτελεί από τα πρώτα βήματα διερεύνησης της τοξικότητας μιας ουσίας, εκχυλίσματος ή μίγματος ουσιών. Τέλος θα ήταν ενδιαφέρον να γίνουν περαιτέρω μελέτες για να διερευνηθεί ο πιθανός προστατευτικός ρόλος των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων και στην υπεροξείδωση των

λιπιδίων, ενώ παράλληλα θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω η προστατευτική δράση έναντι σε οξειδωτικό στρες σε *in vivo* συνθήκες με την βοήθεια δεικτών.

## 7. Παραρτήματα

### 7.1 Παράρτημα Εικόνων

**Εικόνα 20:** Μέρη του κακτοειδούς φυτού φραγκόσυκου ( *Opuntia Ficus Indica*)

**Εικόνα 21:** Τα φυτά στην διάθεση της ιατρικής

**Εικόνα 22:** Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

**Εικόνα 23:** Κακτοειδές φυτό φραγκόσυκο (*Opuntia ficus indica*)

**Εικόνα 24 :** Ο Ελβετός πατέρας της τοξικολογίας Θεόφραστος Παράκελσος, είχε διατυπώσει την περίφημη φράση "η δόση κάνει το δηλητήριο"

**Εικόνα 25:** Εικόνα λεμφοκυττάρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

**Εικόνα 26:** Ανθρώπινα ηπατοκύτταρα της κυτταρικής σειράς HepG2

**Εικόνα 27:** Μορφολογική σύγκριση ηπατοκυττάρων ( A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 ( B). Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα εμφανίζουν το τυπικό κυβικό σχήμα, και τα HepG2 κύτταρα δείχνουν μορφολογία παρόμοια με επιθηλιακά κύτταρα

**Εικόνα 28:**Εικόνα ενός αποπτωτικού HeLa κυττάρου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

**Εικόνα 29:** Πραγματοποίηση πειραμάτων σε συνθήκες ασηψίας

**Εικόνα 30:** Διαχωρισμός στρωμάτων αίματος μετά από την φυγοκέντρηση

**Εικόνα 31:** Πλακίδιο Neubauer. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που θα καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι 0.1mm<sup>3</sup> ή 1\*10<sup>-4</sup> ml

**Εικόνα 32:** Τοποθέτηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο

**Εικόνα 33:**Μικροσκόπιο φθορισμού για οπτική παρατήρηση της βλάβης του γενετικού υλικού

**Εικόνα 34 :**1: Ανάμειξη των κυττάρων με αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως,2:Μεταφορά σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα, 3:Λύση των κυττάρων για απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών και ιστονών, 4: Επώαση με αλκαλικό διάλυμα προκειμένου να ξεδιπλωθεί η διπλή έλικα του DNA, 5: Ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό διάλυμα, χρώση με φθορίζουσα χρωστική και μικροσκοπική παρατήρηση

**Εικόνα 35:**Καρκινικά κύτταρα HepG2 σε πήκτωμα αгарόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση με SYBR Gold. Αριστερά, κύτταρα χωρίς αλλοιώσεις του DNA και δεξιά κύτταρα που έχουν υποστεί εκτεταμένες αλλοιώσεις του DNA.

**Εικόνα 36:** Αντίδραση αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου( MTT) σε μπλέ/μώβ φορμαζάνη από το ένζυμο μιτοχονδριακή ρεδοουκτάση

**Εικόνα 37:**πλακίδια κυτταροκαλλιιεργειών 96 μικροφραεατίων όπου είναι ευδιάκριτος ο σχηματισμός μπλε/μωβ χρώματος μετά την διάλυση του ιζήματος της φορμαζάνης σε ισοπροπανόλη

**Εικόνα 38:** Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του MTS σε φορμαζάνη

## **7.2 Παράρτημα Πινάκων**

**Πίνακας 5:** Βιοδραστικές φυτικές ουσίες και τα οφέλη τους στην υγεία

**Πίνακας 6:** Κατανομή και περιεχόμενο φαινολών και φλαβονοειδών στα διάφορα μέρη του *Opuntia ficus Indica*

**Πίνακας 7:**Σημαντικές βιοδραστικές επιδράσεις του φραγκόσυκου σε διάφορα πειραματικά μοντέλα

**Πίνακας 8:** Αναλογίες για την απομόνωση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

## **7.3 Παράρτημα Γραφημάτων**

**Γράφημα 21:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 22:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF2. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 23:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF3. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 24 :** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF4. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 25:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα με *Opuntia ficus* OF5. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)



**Γράφημα 26 :** Αποτελέσματα συνολικών πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4 και OF5)

**Γράφημα 27:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)

**Γράφημα 28:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF3 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)

**Γράφημα 29 :** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4. (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)

**Γράφημα 30 :** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)

**Γράφημα 31 :** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF5 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 3 ανεξάρτητα πειράματα, n=3)

**Γράφημα 32:** Αποτελέσματα συνολικών πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT σε κύτταρα HeLa μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4 και OF5)

**Γράφημα 33:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης επαγωγής γονοτοξικότητας με τη μέθοδο comet σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4, OF5). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4

**Γράφημα 34 :** Αποτελέσματα πρώτου πειραμάτος μελέτης πιθανής προστατευτικής δράσης των υδατικών εκχυλίσματων *Opuntia ficus* (OF1, OF2, OF3, OF4, OF5) έναντι του οξειδωτικού stress ή/και της γονοτοξικότητας με τη μέθοδο COMET assay σε κύτταρα HepG2. (\*: p< 0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001, \*: vs H<sub>2</sub>O, #: vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4

**Γράφημα 35:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο γH2AX ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF1 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 36:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο γH2AX ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF2 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 37:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο γH2AX ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF3 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 38:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο γH2AX ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF4 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 39:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας και γονοτοξικότητας με τη μέθοδο γH2AX ICW σε κύτταρα HepG2 μετά από επώαση με υδατικό εκχύλισμα *Opuntia ficus* OF5 (Οι τιμές είναι ο μέσος όρος από 4 ανεξάρτητα πειράματα, n=4)

**Γράφημα 40:** Αποτελέσματα πειραμάτων μελέτης κυτταροτοξικότητας με την μέθοδο MTS σε ανθρώπινα Λεμφοκύτταρα μετά από επώαση με υδατικά εκχυλίσματα *Opuntia ficus* ( OF1,OF2 και OF3)

## 7.4 Παράρτημα Στατιστικής Ανάλυσης Ανοva ( SPSS)

```
ONEWAY VAR00002 BY VAR00001
  /STATISTICS HOMOGENEITY
  /MISSING ANALYSIS.
```

### Oneway

#### Notes

Output Created	2015-04-01T12:36:18.605	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	843
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY VAR00002 BY VAR00001 /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	0:00:00.000
	Elapsed Time	0:00:00.000

[DataSet0]

#### Test of Homogeneity of Variances

VAR00002

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
104.492	11	831	.000

#### ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	412382.200	11	37489.291	102.023	.000
Within Groups	305359.707	831	367.461		
Total	717741.907	842			

```
ONEWAY VAR00002 BY VAR00001
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=GH ALPHA(0.05).
```

## Oneway

### Notes

Output Created	2015-04-01T12:36:59.321	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	843
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY VAR00002 BY VAR00001 /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=GH ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	0:00:00.109
	Elapsed Time	0:00:00.110

[DataSet0]

### ANOVA

VAR00002					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	412382.200	11	37489.291	102.023	.000
Within Groups	305359.707	831	367.461		
Total	717741.907	842			

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

VAR00002 Games-Howell						
(I) VAR0 0001	(J) VAR0 0001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-81.44129*	2.73072	.000	-90.7605	-72.1221
	3	1.39214	.98376	.958	-1.8992	4.6835
	4	-40.02528*	5.81546	.000	-60.2494	-19.8012

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

VAR00002  
Games-Howell

(I) VAR0 0001	(J) VAR0 0001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	5	-4.88792*	2.41159	.674	-12.9531	3.1773
	6	-60.88279*	7.64829	.000	-88.0052	-33.7603
	7	1.05923	1.09094	.998	-2.5662	4.6846
	8	-26.12880*	4.09288	.000	-39.9158	-12.3418
	9	.70749	1.05200	1.000	-2.7943	4.2092
	10	-10.19382*	2.25038	.001	-17.7036	-2.6841
	11	1.20988	1.02138	.989	-2.1967	4.6165
12	-28.32122*	5.21042	.000	-46.1692	-10.4732	
2	1	81.44129*	2.73072	.000	72.1221	90.7605
	3	82.83342*	2.55003	.000	74.0167	91.6501
	4	41.41601*	6.27331	.000	19.9168	62.9152
	5	76.55336*	3.36907	.000	65.2705	87.8362
	6	20.55850	8.00195	.335	-7.4564	48.5734
	7	82.50051*	2.59326	.000	73.5666	91.4345
	8	55.31249*	4.72086	.000	39.5429	71.0821
	9	82.14878*	2.57712	.000	73.2589	91.0387
	10	71.24746*	3.25562	.000	60.3291	82.1658
	11	82.65117*	2.56478	.000	73.7947	91.5076
	12	53.12007*	5.71694	.000	33.7767	72.4634
	3	1	-1.39214	.98376	.958	-4.6835
2		-82.83342*	2.55003	.000	-91.6501	-74.0167
4		-41.41742*	5.73283	.000	-61.4263	-21.4085
5		-6.28006	2.20491	.182	-13.7206	1.1604
6		-62.27492*	7.58565	.000	-89.2479	-35.3020
7		-.33291	.48578	1.000	-1.9694	1.3036
8		-27.52094*	3.97460	.000	-40.9587	-14.0832
9		-.68465	.39057	.839	-1.9889	.6196
10		-11.58596*	2.02733	.000	-18.4159	-4.7560
11		-.18225	.29843	1.000	-1.1777	.8132
12		-29.71336*	5.11804	.000	-47.3053	-12.1215
4		1	40.02528*	5.81546	.000	19.8012
	2	-41.41601*	6.27331	.000	-62.9152	-19.9168
	3	41.41742*	5.73283	.000	21.4085	61.4263
	5	35.13736*	6.14112	.000	14.0267	56.2481
	6	-20.85751	9.50757	.561	-53.2970	11.5820
	7	41.08450*	5.75219	.000	21.0255	61.1435
	8	13.89648	6.97490	.697	-9.6796	37.4726

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

VAR00002  
Games-Howell

(I) VAR0 0001	(J) VAR0 0001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
4	9	40.73277*	5.74494	.000	20.6926	60.7729
	10	29.83145*	6.07962	.001	8.8927	50.7702
	11	41.23516*	5.73941	.000	21.2093	61.2610
	12	11.70406	7.68415	.930	-14.1840	37.5921
5	1	4.88792	2.41159	.674	-3.1773	12.9531
	2	-76.55336*	3.36907	.000	-87.8362	-65.2705
	3	6.28006	2.20491	.182	-1.1604	13.7206
	4	-35.13736*	6.14112	.000	-56.2481	-14.0267
	6	-55.99486*	7.89874	.000	-83.7378	-28.2520
	7	5.94715	2.25477	.277	-1.6413	13.5356
	8	-21.24088*	4.54373	.001	-36.4155	-6.0662
	9	5.59541	2.23619	.354	-1.9376	13.1284
	10	-5.30590	2.99300	.830	-15.2436	4.6318
	11	6.09781	2.22195	.225	-1.3930	13.5886
	12	-23.43330*	5.57156	.004	-42.3238	-4.5428
	6	1	60.88279	7.64829	.000	33.7603
2		-20.55850	8.00195	.335	-48.5734	7.4564
3		62.27492*	7.58565	.000	35.3020	89.2479
4		20.85751*	9.50757	.561	-11.5820	53.2970
5		55.99486*	7.89874	.000	28.2520	83.7378
7		61.94201*	7.60029	.000	34.9343	88.9497
8		34.75399*	8.56306	.010	5.2245	64.2835
9		61.59028*	7.59480	.000	34.5956	88.5849
10		50.68896*	7.85102	.000	23.0671	78.3109
11		62.09267*	7.59062	.000	35.1079	89.0774
12		32.56157*	9.15002	.034	1.2824	63.8408
7		1	-1.05923	1.09094	.998	-4.6846
	2	-82.50051*	2.59326	.000	-91.4345	-73.5666
	3	.33291	.48578	1.000	-1.3036	1.9694
	4	-41.08450*	5.75219	.000	-61.1435	-21.0255
	5	-5.94715	2.25477	.277	-13.5356	1.6413
	6	-61.94201*	7.60029	.000	-88.9497	-34.9343
	8	-27.18802*	4.00248	.000	-40.7075	-13.6686
	9	-.35174	.61228	1.000	-2.3842	1.6807
	10	-11.25305*	2.08144	.000	-18.2447	-4.2614
	11	.15066	.55804	1.000	-1.7082	2.0095
	12	-29.38044*	5.13972	.000	-47.0320	-11.7288

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons

VAR0002  
Games-Howell

(I) VAR0 0001	(J) VAR0 0001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
8	1	26.12880*	4.09288	.000	12.3418	39.9158
	2	-55.31249*	4.72086	.000	-71.0821	-39.5429
	3	27.52094*	3.97460	.000	14.0832	40.9587
	4	-13.89648*	6.97490	.697	-37.4726	9.6796
	5	21.24088*	4.54373	.001	6.0662	36.4155
	6	-34.75399*	8.56306	.010	-64.2835	-5.2245
	7	27.18802*	4.00248	.000	13.6686	40.7075
	9	26.83629*	3.99204	.000	13.3475	40.3251
	10	15.93497*	4.46026	.025	1.0234	30.8465
	11	27.33868*	3.98408	.000	13.8732	40.8042
	12	-2.19242	6.47906	1.000	-23.8921	19.5073
	9	1	-.70749	1.05200	1.000	-4.2092
2		-82.14878*	2.57712	.000	-91.0387	-73.2589
3		.68465	.39057	.839	-.6196	1.9889
4		-40.73277*	5.74494	.000	-60.7729	-20.6926
5		-5.59541	2.23619	.354	-13.1284	1.9376
6		-61.59028*	7.59480	.000	-88.5849	-34.5956
7		.35174	.61228	1.000	-1.6807	2.3842
8		-26.83629*	3.99204	.000	-40.3251	-13.3475
10		-10.90131	2.06130	.000	-17.8324	-3.9702
11		.50239	.47747	.996	-1.0780	2.0828
12		-29.02871*	5.13159	.000	-46.6579	-11.3995
10		1	10.19382*	2.25038	.001	2.6841
	2	-71.24746*	3.25562	.000	-82.1658	-60.3291
	3	11.58596*	2.02733	.000	4.7560	18.4159
	4	-29.83145*	6.07962	.001	-50.7702	-8.8927
	5	5.30590	2.99300	.830	-4.6318	15.2436
	6	-50.68896*	7.85102	.000	-78.3109	-23.0671
	7	11.25305*	2.08144	.000	4.2614	18.2447
	8	-15.93497*	4.46026	.025	-30.8465	-1.0234
	9	10.90131*	2.06130	.000	3.9702	17.8324
	11	11.40371*	2.04585	.000	4.5188	18.2887
	12	-18.12739*	5.50370	.065	-36.8172	5.624
	11	1	-1.20988	1.02138	.989	-4.6165
2		-82.65117*	2.56478	.000	-91.5076	-73.7947
3		.18225	.29843	1.000	-.8132	1.1777
4		-41.23516*	5.73941	.000	-61.2610	-21.2093

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Multiple Comparisons

VAR00002  
Games-Howell

(I) VAR0 0001	(J) VAR0 0001	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
11	5	-6.09781	2.22195	.225	-13.5886	1.3930
	6	-62.09267*	7.59062	.000	-89.0774	-35.1079
	7	-.15066	.55804	1.000	-2.0095	1.7082
	8	-27.33868*	3.98408	.000	-40.8042	-13.8732
	9	-.50239	.47747	.996	-2.0828	1.0780
	10	-11.40371*	2.04585	.000	-18.2887	-4.5188
	12	-29.53110*	5.12540	.000	-47.1432	-11.9190
12	1	28.32122*	5.21042	.000	10.4732	46.1692
	2	-53.12007*	5.71694	.000	-72.4634	-33.7767
	3	29.71336*	5.11804	.000	12.1215	47.3053
	4	-11.70406	7.68415	.930	-37.5921	14.1840
	5	23.43330*	5.57156	.004	4.5428	42.3238
	6	-32.56157*	9.15002	.034	-63.8408	-1.2824
	7	29.38044*	5.13972	.000	11.7288	47.0320
	8	2.19242	6.47906	1.000	-19.5073	23.8921
	9	29.02871*	5.13159	.000	11.3995	46.6579
	10	18.12739	5.50370	.065	-.5624	36.8172
	11	29.53110*	5.12540	.000	11.9190	47.1432

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Κεφάλαιο 8 : Βιβλιογραφία

- ✚ "Why should I use XTT instead of MTT" (PDF, 0.1 MB). *aniara.com*. ANIARA. Retrieved 2010-11-19.
- ✚ (Flores Naselli et al( 2014) Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16<sup>INK4a</sup> gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical research communications* 450
- ✚ . Bernabei, P.A. et al. (1989) In vitro chemosensitivity testing of leukemic cells: Development of a semiautomated colorimetric assay. *Hematol. Oncol.* 7, 243–53.
- ✚ Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–82.
- ✚ CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB112, Promega Corporation.
- ✚ Deldicque, L.; van Proeyen, K.; Ramaekers, M.; Pischel, I.; Sievers, H.; Hespel, P. Additive insulinogenic action of *Opuntia ficus-indica* cladode and fruit skin extract and leucine after exercise in healthy males. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2013, 10, 45.
- ✚ Riss, T.L. and Moravec, R.A. (1992) Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)* 3, 184a.
- ✚ A.Boukeloua et al. 2012 :Acute toxicity of *Opuntia ficus indica* and *Pistacia lentiscus* seed oils in mice, *Afr J tradit complement altern Med* 9 (4):607-11
- ✚ A.M. Deters et al, 2012 :Time dependant bioactivity of preparations from cactus pear and ice plant on human skin fibroblasts and keratinocytes, *Journal of Ethnopharmacology* 142(2012) 438-444
- ✚ Ahmad, A.; Davies, J.; Randall, S.; Skinner, G.R.B. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antivir. Res.* 1996, 30, 75–85.
- ✚ Ahmed, M.S.; Tanbouly, N.D.E.; Islam, W.T.; Sleem, A.A.; Senousy, A.S.E. Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. *Phytother. Res.* 2005, 19, 807–809.
- ✚ Alarcon-Aguilar, F.J.; Valdes-Arzate, A.; Xolalpa-Molina, S.; Banderas-Dorantes, T.;Jimenez-Estrada, M.; Hernandez-Galicia, E.; Roman-Ramos, R.

- Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2003, 46, 139–142.
- ✚ Alimi, H.; Hfaiedh, N.; Bouoni, Z.; Hfaiedh, M.; Sakly, M.; Zourgui, L.; Rhouma, K.B. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats. *Phytomedicine* 2010, 17, 1120–1126.
  - ✚ Alimi, H. et al, 2010: Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats, *Phytomedicine* 17.1120-1126
  - ✚ Alimi, H. et al, 2011: Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract (OMFE) in rats *Environ Toxicol Pharmacol* vol 32 (3) :406-416
  - ✚ Allegra, M.; Furtmuller, P.G.; Jantschko, W.; Zederbauer, M.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A.; Obinger, C. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 332, 837–844. *Molecules* 2014, 19 14901
  - ✚ Allegra, M.; Ianaro, A.; Tersigni, M.; Panza, E.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. *J. Nutr.* 2014, 144, 185–192. *Molecules* 2014, 19 14900
  - ✚ Ames BN, Gold LS, Willett WC: The causes and prevention of cancer, 1995, *Proc Nat Acad Sci USA*, 92: 5258-5265
  - ✚ Ammar, I.; Ennouri, M.; Khemakhem, B.; Yangui, T.; Attia, H. Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Ind. Crop. Prod.* 2012, 37, 34–40.
  - ✚ Anderson D, The use of short-term test in detecting carcinogenicity of complex mixtures in complex mixtures and Cancer Risk, cds Vainio, H, Sorsa, M and McMichael, A,J, IARC Scientific Publications, No 104, Lyon 1990
  - ✚ Barltrop, J.A. et al. (1991) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611–4.
  - ✚ Baxevanis, A.N ucl. *Acids Res*,29 (2001)
  - ✚ Bensadón, S.; Hervert-Hernández, D.; Sáyago-Ayerdi, S.G.; Goñi, I. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Food Hum. Nutr.* 2010, 65, 210–216.
  - ✚ Blaauboer, B.J., *The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals.* *Environ Toxicol Pharmacol*, 2002. 11(3-4): p. 213-25.
  - ✚ Blaauboer, B.J., *The necessity of biokinetic information in the interpretation of in vitro toxicity data.* *Altern Lab Anim*, 2002. 30 Suppl 2: p. 85-91.

- ✦ Blaauboer, B.J., *Toxicodynamic modelling and the interpretation of in vitro toxicity data*. Toxicol Lett, 2001. 120(1-3): p. 111-23.
- ✦ Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak k et al ( 2004): Basal oxidative and alkylative Dna damage, Dna repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. Mutation Research 554:139-148
- ✦ Bouhifd, M., et al., *Automation of an in vitro cytotoxicity assay used to estimate starting doses in acute oral systemic toxicity tests*. Food Chem Toxicol, 2012. 50(6): p. 2084-96.
- ✦ Brahmi D et al ( 2012) Protective effect of cactus cladode extracts against cisplatin induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in balb/c mice: Combination with phytochemical composition. BMC Complementary and Alternative Medicine
- ✦ Butera, D.; Tesoriere, L.; di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A.M.; Kohen, R.; Livrea, M.A. Antioxidant activities of sicilian prickly pear ( *Opuntia ficus indica* ) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6895–6901.
- ✦ Butterweck, V.; Semlin, L.; Feistel, B.; Pischel, I.; Bauer, K.; Verspohl, E.J. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. *Phytother. Res.* 2011, 25, 370–375.
- ✦ Cairns J : Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, Nature, 255: 197-200
- ✦ Carere, A, Mohn , G,R, Parry, J.M, Sors A,J and Nolan , C.V , Methods and testing strategies for evaluating the genotoxic properties of chemicals, European Commision, EUR15945 EN 1995)
- ✦ Castell, J.V., et al., *The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity*. Cell Biol Toxicol, 1997. 13(4-5): p. 331-8.
- ✦ Chen, C.-H., Campbell, P.A. and Newman, L.S. (1990) MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 93, 249–55.
- ✦ Chougui, N.; Tamendjari, A.; Hamidj, W.; Hallal, S.; Barras, A.; Richard, T.; Larbat, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chem.* 2013, 139, 796–803. *Molecules* 2014, 19 14896
- ✦ Clark, W.D.; Brown, G.K.; Mays, R.L. Flower flavonoids of *Opuntia* subgenus *Cylindropuntia*. *Phytochemistry* 1980, 19, 2042–2043.
- ✦ Collins ,2004: The comet assay for Dna Damage and repair, Molecular Biotechnology, volume 26.pp 249-261
- ✦ Collins A.R( 2004). The comet assay for Dna damage and repair: principles,applications and limitations. Mol Biotechnol 26 (3):249-261

- ✚ Collins et al ,2008: Review-The Comet assay: tropical issues, *Mutagenesis*.vol 23.pp 143-151
- ✚ Cory, A.H. et al. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207–12.
- ✚ De Leo, M.; Abreu, M.B.D.; Pawlowska, A.M.; Cioni, P.L.; Braca, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochem. Lett.* 2010, 3, 48–52.
- ✚ Denisa Margina, Mihaela Ilie, Daniela Gradinaru, vasilis P. Androutsopoulos, Demetrios Kouretas, Aristidis M.Tsatsakis 2015: Natural products-friends or foes?, *Toxicology Letters* 236. 154-167
- ✚ Dhawan A<sup>1</sup>, Bajpayee M, Parmar D: Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Feb;25(1):5-32.
- ✚ Dhawan A<sup>1</sup>, Bajpayee M, Parmar D: Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Feb;25(1):5-32.
- ✚ Dok-Go, H.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lee, E.H.; Lee, J.; Song, Y.S.; Lee, Y.-H.; Jin, C.; Lee, Y.S.; Cho, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-Methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Brain Res.* 2003, 965, 130–136. *Molecules* 2014, 19 14895
- ✚ Duke J.A., Weeds? Or wonder drugs?, *Organic Gardening*, 38-40, Jul.- Aug. 1994
- ✚ Eirheim, H.U., C. Bundgaard, and H.M. Nielsen, Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. *Toxicol In Vitro*, 2004. 18 (5): p. 649 57.
- ✚ Ennouri, M.; Evelyne, B.; Laurence, M.; Hamadi, A. Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chem.* 2005, 93, 431–437.
- ✚ Eun-Hee Park et al,1998: Studies on the pharmacologic al actions of cactus:Indentification of its Anti-inflammatory effect, *Arch.pharm.res* vol 21.pp 30-34
- ✚ Fairbairn, D.W., Reyes, W.A., Grigsby, R.V. & O'Neill, K.L., 1994. Laser scanning microscopic analysis of DNA damage in frozen tissues. *Cancer Letters*,76: 127-132
- ✚ Fernández-López, J.A.; Almela, L.; Obón, J.M.; Castellar, R. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Food Hum. Nutr.* 2010, 65, 253–259.
- ✚ Fialkow PJ : Clonal origin of human tumors, 1979, *Annu Rev Med*, 30: 135-143

- ✚ Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki, 16: 183-184
- ✚ Frazier, J.M., *Application of the basic toxicological screening process to problems in bound residue toxicity*. Drug Metab Rev, 1990. 22(6-8): p. 821-7.
- ✚ Galati, E.M. et al 2005: *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury (Article), *Phytotherapy research* 19,796-800
- ✚ Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Giuffrida, D.; Dugo, G.; Miceli, N.; Pergolizzi, S.; Taviano, M.F. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4903–4908.
- ✚ Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Lauriano, E.R.; Taviano, M.F.; Galluzzo, M.; Miceli, N. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury. *Phytother. Res.* 2005, 19, 796–800.
- ✚ Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Monforte, M.T.; Galluzzo, M.; Miceli, N.; Tripodo, M.M. Effect of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cladodes in the wound-healing process. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 2003, 5, 1–16.
- ✚ Gallegos-Infante, J.-A.; Rocha-Guzman, N.-E.; González-Laredo, R.-F.; Reynoso-Camacho, R.; Medina-Torres, L.; Cervantes-Cardozo, V. Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus indica* ). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2009, 60, 80–87.
- ✚ Gentile, C.; Tesoriere, L.; Allegra, M.; Livrea, M.A.; D'Alessio, P. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1028, 481–486.
- ✚ Ginestra, G.; Parker, M.L.; Bennett, R.N.; Robertson, J.; Mandalari, G.; Narbad, A.; Lo Curto, R.B.; Bisignano, G.; Faulds, C.B.; Waldron, K.W. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10323–10330.
- ✚ Gluckman A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951;26:59-86
- ✚ Godard, M.P.; Ewing, B.A.; Pischel, I.; Ziegler, A.; Benedek, B.; Feistel, B. Acute blood glucose lowering effects and long-term safety of OpunDia supplementation in pre-diabetic males and females. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 130, 631–634.
- ✚ Grunau C, Renault, E, Rosenthal A and Roizes, C, *Nuc Acids Res*, 29, 270 (2001)
- ✚ Guevara-Figueroa, T.; Jiménez-Islas, H.; Reyes-Escogido, M.L.; Mortensen, A.G.; Laursen, B.B.; Lin, L.-W.; de León-Rodríguez, A.; Fomsgaard, I.S.;

- Barba de la Rosa, A.P. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *J. Food Compos. Anal.* 2010, 23, 525–532.
- ✚ Halliwell & Gutteridge 1998: Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications Third Edition.
  - ✚ Halliwell B, 2001 :Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia of life sciences 1-7.
  - ✚ Hartwell J.L., Plants Used Against Cancer. A Survey, 1971
  - ✚ Hayes,AW, Principles and Methods of toxicology, Raven Press (1994)
  - ✚ Hellman, B., Vaghef, H. & Bostrom, B., 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*,336: 123-131
  - ✚ Hfaiedh, N. et al. 2008: Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats ,*Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 3759-3763
  - ✚ Jaffe LF. (2003). "Epigenetic theories of cancer initiation." *Advances in cancer research.* *Advances in Cancer Research* 90: 209–30.
  - ✚ Jorge, A.J.; de La Garza, T.H.; Alejandro, Z.C.; Ruth, B.C.; Noé, A.C. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2013, 3, 436–442.
  - ✚ Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, *Jpn J Physiol*, 35: 693-707
  - ✚ Karym El-Mostafa et al, Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease *Molecules* 2014, 19, 14879-14901
  - ✚ Kasiotis K.M., Kyriakopoulou K., Emmanouil C., Tsantila N., Liesivuori J., Souki H., Manakis S. and Machera K. (2011) Monitoring of Systemic Exposure to Plant Protection Products and DNA Damage in Orchard Workers. *Toxicology Letters* 210 (2): 182-188
  - ✚ Kaur, M.; Kaur, A.; Sharma, R. Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012, 2, 1.
  - ✚ Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA and Elliott BE : Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: Induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment, 1984, *J Cell Physiol*, 3: 87-97
  - ✚ Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br Cancer* 1972;26:239-257



- ✚ Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965;90:419-435
- ✚ Khatabi, O.; Hanine, H.; Elothmani, D.; Hasib, A. Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*). *Arab. J. Chem.* 2013, doi:10.1016/j.arabjc.2011.04.001.
- ✚ Kianbakht S 2009: A Review on medicinal plants used in animal models and clinical trials concerning drugs addiction, *Journal of medical plants*
- ✚ Kim, J.-H.; Park, S.-M.; Ha, H.-J.; Moon, C.-J.; Shin, T.-K.; Kim, J.-M.; Lee, N.-H.; Kim, H.-C.; Jang, K.-J.; Wie, M.-B. *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 104, 257–262.
- ✚ Kirland, DJ and Muller, L,2000
- ✚ Kirsch-Volders, M, Aardema M and Elhajouji,A, 2000
- ✚ Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5<sup>th</sup> Mc Graw-Hill, 1996
- ✚ Kumaravel, T.S, Vilhar, B, Faux S.P and Jha, A( 2009). Comet assay measurements: a prespective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64
- ✚ Kutu, J.O. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.*2004, 85, 527–533.
- ✚ Laughton, M.J.; Evans, P.J.; Moroney, M.A.; Hoult, J.R.; Halliwell, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* 1991, 42, 1673–1681.
- ✚ Lee, J.-A.; Jung, B.-G.; Kim, T.-H.; Lee, S.-G.; Park, Y.-S.; Lee, B.-J. Dietary feeding of *Opuntia humifusa* inhibits UVB radiation-induced carcinogenesis by reducing inflammation and proliferation in hairless mouse model. *Photochem. Photobiol.* 2013, 89, 1208–1215.
- ✚ Lee, J.-A.; Jung, B.-G.; Lee, B.-J. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* on 7, 12-dimethylbenz[ a]anthracene and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13- acetate induced two-stage skin carcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012, 13, 4655–4660.
- ✚ Lee, J.-C.; Kim, H.-R.; Kim, J.; Jang, Y.-S. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6490–6496.
- ✚ Lee, R.F. & Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic(marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43–64
- ✚ Li, R.; Guo, M.; Zhang, G.; Xu, X.; Li, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in



- primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *J. Ethnopharmacol.* 2006, *107*, 143–150.
- # Liao W, Mc Nutt M and ZhuW.G ( 2009). The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cell. *Methods* 48:46-53
  - # Loewenstein WR : Junctional intercellular communication and the control of growth, 1979, *Biochim Biophys Acta*, 560: 1-65
  - # López-Lázaro M. (2010). "A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy". *Molecular medicine* 16 (3–4): 144–153.
  - # Madle S,von der Hude,W, Broschinski, L, and Janig,,2000
  - # Malich, G., B. Markovic, and C. Winder, The sensitivity and specificity of the The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 124: 179-192
  - # Marx J: Many gene changes found in cancer, 1989, *Science*, 246: 1386-1388
  - # McKelvey-Martin et al (1993). The single cell gel electrophoresis assay( comet assay) :A European review. *Mutation Research* 288: 47-63
  - # Miller J.A, and Miller, E.C, Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles in *Origins of Human Cancer*, eds, Hiatt H.H, Watson J.D, Winster, J.A, p605-628, 1977
  - # Morales, P.; Ramírez-Moreno, E.; de Cortes Sanchez-Mata, M.; Carvalho, A.M.; Ferreira, I.C.F.R. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.* 2012, *46*, 279–285. *Molecules* 2014, *19* 14894
  - # Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
  - # Mosmann, Tim (December 1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4. ISSN 0022-1759. PMID 6606682.
  - # Moussa-Ayoub, T.E.; El-Samahy, S.K.; Kroh, L.W.; Rohn, S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chem.* 2011, *124*, 1177–1184.
  - # MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 1997. 124(3): p. 179-92.
  - # Muller, W.U (2007) .Comet assay. *Chromosomal Alterations: Methods, Results and importance in Human health*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 161-176

- ✚ Nakayama, M.; Aihara, M.; Chen, Y.-N.; Araie, M.; Tomita-Yokotani, K.; Iwashina, T. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol. Vis.* 2011, *17*, 1784.
- ✚ Naselli, F. et al. :Anti-proliferative pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco- suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells Biochemical and biophysical research communications, vol 450,pp 652-658
- ✚ Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, *Cancer Res*, 47: 1473-1487
- ✚ Niles, A.L., R.A. Moravec, and T.L. Riss, *In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening*. *Curr Chem Genomics*, 2009. 3: p. 33-41.
- ✚ Nuñez-López, M.A.; Paredes-López, O.; Reynoso-Camacho, R. Functional and Hypoglycemic Properties of Nopal Cladodes (*O. ficus-indica*) at Different Maturity Stages Using *in Vitro* and *in Vivo* Tests. *J. Agric. Food Chem.* 2013, *61*, 10981–10986.
- ✚ OECD Guideline for testing of chemicals, OECD 1997
- ✚ Oh, P.-S.; Lim, K.-T. Glycoprotein (90 kDa) isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten MAKINO lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in Triton WR-1339-induced mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, *29*, 1391–1396.
- ✚ Olive P, Banath J (1990): Heterogeneity in radiation- induced DNA damage and repair in tumor and in normal cells measured using the “comet assay” assay .*Radiat Res* 122:86-94
- ✚ Osorio-Esquivel, O.; Alicia-Ortiz-Moreno; Álvarez, V.B.; Dorantes-Álvarez, L.; Giusti, M.M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.* 2011, *44*, 2160–2168.
- ✚ Paiz, R.C.; Juárez-Flores, B.I.; Aguirre, R.J.R.; Cárdenas, O.C.; Reyes, A.J.A.; García, C.E.; Álvarez, F.G. Glucose-lowering effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* A. Web. Cactaceae) in diabetic rats. *J. Med. Plants Res.* 2010, *4*, 2326–2333.
- ✚ Panico, A.M.; Cardile, V.; Garufi, F.; Puglia, C.; Bonina, F.; Ronsisvalle, S. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. *J. Ethnopharmacol.* 2007, *111*, 315–321.
- ✚ Park, E.-H., 1998: Studies on the pharmacological actions of cactus: Identification of its anti-inflammatory effect . *Arch pharm res* 21.pp 30-34

- ✚ Park, E.H.; Kahng, J.H.; Lee, S.H.; Shin, K.H. An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 2001, 72, 288–290.
- ✚ Piperakis S.M ( 2009). Comet assay :A brief history. *Cell Biology and toxicology* 25 : 1-3
- ✚ Ramadan, M.F.; Moersel, J.-T. Lipid profile of prickly pear pulp fractions. *J. Food Agric. Environ.* 2003, 1, 66–70.
- ✚ Ramadan, M.F.; Mörsel, J.-T. Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food Chem.* 2003, 82, 339–345.
- ✚ Rasnick D, Duesberg PH. (1999). "How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer" *The Biochemical journal* 340 (3): 621–30.DOI:10.1042/0264-6021:3400621. PMC1220292 PMID 10359645
- ✚ Reddy et al 2003
- ✚ Repetto, G., A. del Peso, and J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 2008. 3 (7): p. 1125-31
- ✚ Rojas, E, Lopez, M.C and Valverde. M( 1999). Single cell gel electrophoresis assay: methology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722(1-2):225-254
- ✚ Salim, N.; Abdelwaheb, C.; Rabah, C.; Ahcene, B. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8, 1623–1624.
- ✚ Saraste A, and Pulkki, K ( 2000). Morfologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45( 3): 528-537
- ✚ Schaffer, S.; Schmitt-Schillig, S.; Müller, W.E.; Eckert, G.P. Antioxidant properties of Mediterranean food plant extracts: Geographical differences. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 56 (Suppl. S1), 115–124.
- ✚ Seo, K,Y, Jelinski, S.A and Loechler, E.L *Mutat* (2000)
- ✚ Shaposhnikov et al (2008). Single- cell gel electrophoresis ( the comet assay) :Loops or fragments? *Electrophoresis* 29: 3005-3012.
- ✚ Shureiqietal,2000
- ✚ Sies H, 1985: Oxidative stress: introductory remarks. In oxidative stress ed.H Sies. Academic Inc ( Inserts 1,2)
- ✚ Speit, G, Autrup, H, Crebelli, R, Hendersonn, L, Kirsch-Volders, Madle S, Parry, J.M, Sarif,A.M. and Vrijhof, H (2000)
- ✚ Spju R.W., Perdue R.E., Plant folklore: A tool for predicting sources of antitumor activity?, *Cancer Treat Report*, 60, 8, 979-985, 1976
- ✚ Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Oct;2(10):518-25.
- ✚ Sreekanth, D.; Arunasree, M.K.; Roy, K.R.; Chandramohan Reddy, T.; Reddy, G.V.; Reddanna, P. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine* 2007, 14, 739–746.

- ✚ Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltounis L, Tsatsakis AM, Kouretas D. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek Domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol.* 2012 50(11):4115-24
- ✚ Stintzing, F.C.; Carle, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 175–194.
- ✚ Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 216, 303–311.
- ✚ Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212, 396–407.
- ✚ Sultan, K.R and Haagsmen H.P (2001). Species-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science. *Veterinary Sciences Tomorrow* 1:1-7
- ✚ Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Livrea, M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 941–945.
- ✚ Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M.A. Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- $\kappa$ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 $\beta$ -exposed Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* 2014, 111, 415–423.
- ✚ Tesoriere, L.; Butera, D.; Pintaudi, A.M.; Allegra, M.; Livrea, M.A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: A comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 391–395.
- ✚ Tesoriere, L.; Fazzari, M.; Allegra, M.; Livrea, M.A. Biothiols, Taurine, and Lipid-Soluble Antioxidants in the Edible Pulp of Sicilian Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruits and Changes of Bioactive Juice Components upon Industrial Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7851–7855.
- ✚ Thompson & Thompson, 2011
- ✚ Tice, R.R, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. & Sa-saki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- ✚ Tomczyk, M.; Zovko-Končić, M.; Chrostek, L. Phytotherapy of alcoholism. *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7, 273–280.
- ✚ Tyler V.E., Significant anticancer herbs, *Herbs of Choice: The therapeutic use of phytomedicinals*, 178-179, 1994
- ✚ Valente, L.; Scheinvar, L.; da Silva, G.; Antunes, A.; dos Santos, F.; Oliveira, T.; Tappin, M.; Aquino Neto, F.; Pereira, A.; Carvalhaes, S.; *et al.* Evaluation

- of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. *Pharmacogn. Mag.* 2007, 3, 167–172.
- ✚ Valente, L.M.M.; da Paixão, D.; do Nascimento, A.C.; dos Santos, P.F.P.; Scheinvar, L.A.; Moura, M.R.L.; Tinoco, L.W.; Gomes, L.N.F.; da Silva, J.F.M. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chem.* 2010, 123, 1127–1131.
  - ✚ Van IJzendoorn, M. H., & DeWolff, M.S. (1997). In search of the absent father: Meta-analyses on infant-father attachment. A rejoinder to out discussants. *Child Development*, 63, 840–858.
  - ✚ Van IJzendoorn, M.H., Moran, G., Belsky, J., Pedersen, D., Bakermans-Kranenburg, M.J. & Kneppers, K. (2000). The similarity of siblings' attachments to their mothers. *Child Development*, 71, 1086–1098.
  - ✚ Van Proeyen, K.; Ramaekers, M.; Pischel, I.; Hespel, P. *Opuntia ficus-indica* ingestion stimulates peripheral disposal of oral glucose before and after exercise in healthy men. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2012, 22, 284–291.
  - ✚ Waters, MD, Daniel, F.B, Lewtas J, Moore, MM and Nesnow S, Genetic Toxicology of Complex Mixtures, Series: Environmental Science Research, Vol, 39, Plenum Press New York, 1990
  - ✚ Wilkinson, ML; B Portmann, R Williams (1983). "Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper". *Gut* 24 (8): 767–771
  - ✚ Yang, N.; Zhao, M.; Zhu, B.; Yang, B.; Chen, C.; Cui, C.; Jiang, Y. Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2008, 9, 570–574.
  - ✚ Zou, D.-M.; Brewer, M.; Garcia, F.; Feugang, J.M.; Wang, J.; Zang, R.; Liu, H.; Zou, C. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutr. J.* 2005, 4, 25.
  - ✚ Zourgui, L.a et al, 2008: Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone (ZEN) in Balb/C mice, *Food and chemical Toxicology* 46. 1817-1824

#### Ελληνική Βιβλιογραφία:

- ✚ Καραγκίνη Δέσποινα Αικατερίνη, Μελέτη της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων από τα γένη *Salvia*, *Sideritis* και *menthe* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων ήπατος, Λάρισα 2013

- ✚ Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
- ✚ Κουτελιδάκης Αντώνης, Λειτουργικά τρόφιμα – Ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας, Αθήνα 2015
- ✚ Κρητικός Ανδρέας , Αξιολόγηση της χρήσης των βλαστικών κυττάρων της γέλης του Wharton για δοκιμές τοξικότητας, Αθήνα 2014
- ✚ Μπριασούλης Ε, In vitro έλεγχος ευαισθησίας στα κυτταροτοξικά φάρμακα
- ✚ Σκορίλας Α. Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής. Αθήνα 2008.
- ✚ Σπανού Χρυσούλα, Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών
- ✚ Χονδρου Βασιλική, In vitro διερεύνηση της θραυσματοποίησης και αποπτωγόνου δράσης του αντικαρκινικού αντιβιοτικού Δοξουρουβικίνη στη λευχαιμική κυτταρική σειρά ανθρώπου HL-60, Πάτρα 2013

#### *Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία*

- ✚ <http://www.astrospalio.gr/uploads/fragosika.pdf>
- ✚ <http://www.amjbot.org/content/91/11/1915.full>
- ✚ <http://www.fragosika.gr/>
- ✚ [www.amsbio.com](http://www.amsbio.com)
- ✚ [www.hpacultures.org.uk](http://www.hpacultures.org.uk)
- ✚ [http://www.bremel.gr/content.php?menu\\_id=20&lg](http://www.bremel.gr/content.php?menu_id=20&lg)
- ✚ <http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/magnifier/counting.aspx>
- ✚ <https://biotech-ntua.wikispaces.com/BCA+Protein+Assay>
- ✚ <http://www.nanoimpactnet.eu/uploads/Protocols/Genotoxicity/Comet%20Assay.pdf>