



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ROSACEAE ΚΑΙ ΑΠΟ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ PUNICA
GRANATUM (ΡΟΔΙΑ)

ASSESSMENT OF PROTECTIVE ACTIVITY OF EXTRACTS FROM
ROSACEAE FAMILY AND PUNICA GRANATUM (POMEGRANATE)
PLANTS AGAINST ROS-INDUCED DNA DAMAGE



ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΙΑ Π. ΓΑΒΡΙΕΛΛΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ
ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΑΠΟ
ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ROSACEAE ΚΑΙ ΑΠΟ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ PUNICA GRANATUM (ΡΟΔΙΑ)

ASSESSMENT OF PROTECTIVE ACTIVITY OF EXTRACTS FROM
ROSACEAE FAMILY AND PUNICA GRANATUM
(POMEGRANATE) PLANTS AGAINST ROS-INDUCED DNA
DAMAGE

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Σέρκος Χαρουτουιάν: Καθηγητής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Στους γονείς μου,
στην αδελφή μου
και στους ανθρώπους
που πίστεψαν σε μένα
περισσότερο και από μένα.



The Rose Family

*The rose is a rose
And was always a rose;
But the theory now goes
That the apple's a rose,
And the pear is, and so's
The plum, I suppose.
The dear only knows
What will next prove a rose.
You, of course, are a rose,
But were always a rose.*

Robert Frost

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του λέκτορα κ. Δημητρίου Στάγκου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για τη συνεχή παρουσία και υποστήριξή του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, καθώς και τον καθηγητή κ. Χαρουτουγιάν Σέρκο, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησής μου.

Ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου κ. Τάσο Μπέζο, κ. Κώστα Γερασόπουλο, κ. Γιάννη Καφαντάρη και κ. Νίκο Γκουτζουρέλα για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους και για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Η καθημερινή αλληλεπίδραση με τη συγκεκριμένη ομάδα μου χάρισε γνώσεις, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε επαγγελματικό επίπεδο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ψυχολογική και οικονομική υποστήριξή τους, την αδελφή μου Νεφέλη και τους καλούς μου φίλους Τζανή και Μαρία, για την αγάπη τους καθώς και τη συνεχή στήριξη και βοήθεια που μου προσέφεραν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες έχει τεκμηριωθεί ότι σχετίζονται με πολλές ασθένειες, καθώς και με τη γήρανση. Τα εκχυλίσματα πολλών φυτών είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Στα πλαίσια αυτά εξετάστηκαν εκχυλίσματα από διάφορες ποικιλίες Ροδιών (*Punica Granatum*) και φυτών της οικογένειας *Rosaceae*.

Μία από τις βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες τόσο των Ροδιών όσο και των *Rosaceae* είναι η αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση αυτής της αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξογόνου δράσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο *invitro* μέθοδοι, δηλαδή εξετάστηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στην δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO^{\bullet}) και ριζών υδροξυλίου (OH^{\bullet}).

Η αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική, αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξογόνου δράσης. Οι ρίζες περοξυλίου (ROO^{\bullet}) και υδροξυλίου (OH^{\bullet}) παράχθηκαν από τη θερμική διάσπαση του 2,2'-Azobis 2-amidinopropanehydrochloride (AAPH) και τη φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας αντίστοιχα. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν εξαιρετική προστατευτική δράση απέναντι στη επαγόμενη από τις παραπάνω ρίζες βλάβη του DNA. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι της επαγόμενης τοξικής δράσης ριζών περοξυλίου (ROO^{\bullet}) σε σχέση με την αντίστοιχη δράση των ριζών υδροξυλίου (OH^{\bullet}), υποδηλώνοντας και ένα διαφορετικό μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων πολυφαινολών τους. Οι τιμές των IC_{50} κυμαίνονταν από 12 έως 64 $\mu\text{g/ml}$ έναντι της επαγόμενης τοξικής δράσης ριζών περοξυλίου και από 180 έως 1120 $\mu\text{g/ml}$ έναντι της επαγόμενης τοξικής δράσης ριζών υδροξυλίου για τα εκχυλίσματα των φυτών *Rosaceae*. Αντίστοιχα οι τιμές των IC_{50} για τα εκχυλίσματα από τις ποικιλίες Ροδιών ήταν 14 έως 29 $\mu\text{g/ml}$ έναντι της ρίζας του περοξυλίου και 320 έως 655 $\mu\text{g/ml}$ έναντι της ρίζας του υδροξυλίου. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την αντιμεταλλαξογόνο δράση των εκχυλισμάτων τόσο των Ροδιών όσο και των *Rosaceae*.

ABSTRACT

Free radicals and oxidative stress have long been documented to be related with many diseases. The extracts derived from many plants are rich in polyphenols. Many significant biological activities are attributed to polyphenols. In the above context, we examined extracts from different pomegranate varieties and Rosaceae family plants.

One of the most important biological activities, which are attributed to the polyphenols is their antioxidant activity. The aim of the present study was the assessment of the antioxidant and anti-mutagenic activity of extracts from pomegranate varieties and *Rosaceae* family plants. For this purpose, two *invitro* methods were used in order to examine the ability of the extracts to protect DNA from free radical-induced monoclinal fragments, specifically from peroxy (ROO^{\bullet}) and hydroxyl (OH^{\bullet}) radicals.

The inhibition of the free radical-induced conversion of DNA plasmid supercoiled form to relaxed form indicates a mechanism of antioxidant/anti-mutagenic activity. The peroxy (ROO^{\bullet}) and hydroxyl (OH^{\bullet}) radicals were generated from thermal decomposition of 2,2' - Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH) and photolysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) under the presence of ultraviolet (UV) radiation respectively. Most of the extracts exhibited exceptional protective activity against the free radical-induced DNA damage. In addition, these extracts were more effective against ROO^{\bullet} -induced DNA damage compared to OH^{\bullet} -induced damage suggesting a different mechanism of antioxidant activity of the polyphenols found in the extracts. The IC_{50} values ranged from 12 to 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against peroxy radicals induced DNA damage and from 180 to 1120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against hydroxyl radicals induced DNA damage for the Rosaceae plants extracts. Likewise, the IC_{50} values for the cultivars pomegranate extracts was 14 to 29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against peroxy radicals and 320 to 655 $\mu\text{g}/\text{ml}$ against hydroxyl radicals. The results of the present study provide for the first time significant indications especially for the protective activity of extracts from Rosaceae plants against free radical-induced DNA damage.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ – ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	5
Ελεύθερες Ρίζες.....	5
Εύρεση ελευθέρων ριζών στη φύση.....	6
Ο κύριος ρόλος του οξυγόνου στην αερόβια ζωή	7
Η τοξικότητα του οξυγόνου	8
Σημαντικές ενεργές μορφές οξυγόνου	9
(α) Οξυγόνο αυξημένης ενέργειας.....	9
(β) Ιόν Ρίζας Υπεροξειδίου - Υπεροξειδικό ανιόν $O_2^{\cdot-}$ - Υπεροξειδίου του Υδρογόνου H_2O_2	9
(γ) Ρίζες Υδροξυλίου HO	10
(δ) Υδροϋπεροξειδίου HO_2^{\cdot}	10
Δημιουργία ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα	10
Μοριακοί μηχανισμοί προσβολής και τοξικότητας από ελεύθερες ρίζες.	12
Άμυνα του οργανισμού έναντι της τοξικότητας του οξυγόνου και της προσβολής από ελεύθερες ρίζες: Οξειδωτικό stress	13
Εμπλοκή της δράσης των ελευθέρων ριζών-οξειδωτικού stress σε παθολογικές καταστάσεις.....	15
<i>A. Φλεγμονή</i>	15
<i>B. Επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη</i>	15
<i>Γ. Καρδιαγγειακό, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αγγειοπάθειες</i>	16
<i>Δ. Νευρωνική εκφύλιση</i>	17
Παγίδες ελευθέρων ριζών (Αντιοξειδωτικά).....	18
Τα αντιοξειδωτικά και η Βιομηχανία τροφίμων.....	18
Συμπεράσματα.....	19
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ – ΦΑΙΝΟΛΕΣ	19
Πολυφαινόλες.....	20
<i>A) Φλαβονοειδή</i>	20
<i>B) Φαινολικά οξέα</i>	21
Υδροξυβενζοϊκά οξέα.....	21
Υδροξυκινναμωμικά οξέα	22
Λειτουργικότητα των Φλαβονοειδών και Φαινολικών οξέων στα φυτά.....	22
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των φαινολικών ενώσεων	23
Αντιοξειδωτική δράση των φαινολών	24
Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση.....	25

Αντιοξειδωτική δύναμή των φλαβονοειδών και διαφοροποιήσεις αυτής ανάλογες με τη δομή των μορίων.	26
Αντιοξειδωτικά σε λιπόφιλα συστήματα.....	26
Αντιοξειδωτικά σε υδρόφιλα συστήματα.....	27
Αντιοξειδωτική δύναμή των φαινολικών οξέων και διαφοροποιήσεις αυτής ανάλογες με τη δομή των μορίων.....	28
Άλλες δράσεις που αποδίδονται στις φυσικές φαινόλες	29
Αναστολή ενζύμων	30
Δράση κατά καρδιοαγγειακών παθήσεων.....	30
Αντιφλεγμονώδης δράση	31
Αγγειακές δράσεις των φλαβονοειδών.....	31
Κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των φλαβονοειδών.....	31
Άλλες αναφερόμενες δράσεις των φλαβονοειδών.....	32
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ROSACEAE	33
Ταξινόμηση	34
Βιβλιογραφικές αναφορές για τη σύσταση του καρπού, των σπερμάτων, του φλοιού και των φύλλων ειδών της οικογένειας Rosaceae.	36
Φυτοχημικές και φαρμακολογικές αναφορές σχετικά με τη χημική σύσταση των καρπών της οικογένειας <i>Rosaceae</i>	40
Φυτά από την οικογένεια Rosaceae που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	42
1. <i>Pyracantha coccinea</i>	42
2. <i>Pyrus spinosa</i>	43
3. <i>Rosa canina</i>	43
4. <i>Crataegus orientalis</i>	44
5. <i>Rubus. Sanctus:</i>	45
6. <i>Prunus webbii</i>	45
7. <i>Rosa sempervirens</i>	46
8. <i>Rosa pulverulenta</i>	46
9. <i>Prunus mahaleb</i>	46
10. <i>Potentilla recta</i>	46
11. <i>Sorbus umbellata</i>	46
12. <i>Aremonia agrimonoides</i>	46
13. <i>Geum urbanum</i>	47
14. <i>Potentilla pedata</i>	47
15. <i>Alchemilla bulgarica</i>	47
16. <i>Alchemilla xanthochlora</i>	47
17. <i>Potentilla speciosa</i>	47

18.	Fragaria vesca.....	47
19.	Rubus idae.....	47
20.	Prunus prostrata.....	48
21.	Rosa arvensis.....	48
22.	Sanguisorba officinalis.....	48
23.	Potentilla hybridiana.....	48
	PUNICA GRANATUM.....	49
	Ταξινόμηση και καταγωγή του είδους Punica granatum (Ρόδι).....	49
	Βιοποικιλότητα.....	49
	Συνθήκες καλλιέργειας – Πολλαπλασιασμός.....	50
	Η θρεπτική σημασία του ροδιού.....	51
	Φαρμακευτική αξία.....	52
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	55
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	55
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
	Πλασμιδιακό DNA.....	56
	Χημικά αντιδραστήρια.....	56
	Εκχυλίσματα.....	56
	Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.....	59
	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	60
	Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	63
	Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•).....	67
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
	Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων Rosaceae και Punica Granatum (Ροδιά) στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.....	71
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ROSACEAE.....	72
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΡΟΔΙΩΝ.....	85
	Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων Rosaceae και Punica Granatum (Ροδιά) στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.....	91
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ROSACEAE.....	92
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΡΟΔΙΩΝ.....	105
	Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα.....	111
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	116

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Από όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την υγεία μας ο σημαντικότερος είναι ίσως το είδος και η ποιότητα της διατροφής μας. Καθημερινά διαπιστώνουμε, πως όλο και περισσότερα άτομα στρέφονται προς την υγιεινή διατροφή για να βελτιώσουν την υγεία τους, για να επιβραδύνουν το γήρας και - γιατί όχι - να αυξήσουν το προσδόκιμο ζωής τους. Παγκόσμιοι οργανισμοί υγείας μας βεβαιώνουν πως οι δίαιτες πολλών χιλιάδων ατόμων, ακόμη και σε οικονομικά ανθηρές κοινωνίες, εμφανίζουν έλλειψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Γι' αυτό, τα συμπληρώματα διατροφής χρησιμοποιούνται ευρέως.

Ενδεικτικό της διαπίστωσης αυτής είναι ότι στη ΗΠΑ το 75% του πληθυσμού, είτε ευκαιριακά είτε σε μόνιμη βάση, λαμβάνει συμπληρώματα διατροφής. Θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό πως τα συμπληρώματα διατροφής περιέχουν ουσίες οι οποίες ή υπάρχουν αυτούσιες ή είναι ενδιάμεσα προϊόντα βιοχημικών διεργασιών του ανθρώπινου οργανισμού. Υπάρχουν όμως και άλλες ουσίες, όπως είναι οι βιταμίνες, τις οποίες δεν παράγει ο ανθρώπινος οργανισμός, αλλά είναι και αυτές απαραίτητες για την καλή λειτουργία του. Ακόμη πολλά συμπληρώματα προέρχονται από βότανα τα οποία είναι ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου. Το εμπορικό ενδιαφέρον των φυτικών συμπληρωμάτων διατροφής είναι τεράστιο.

Ιδιαίτερα σημαντικά θεωρούνται τα συμπληρώματα διατροφής με φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Ορισμένες από αυτές παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ οι πιο πολλές βρίσκονται στις τροφές. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν εξιδικευμένη δράση. Για παράδειγμα, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) προστατεύει τα λιπίδια (τριγλυκερίδια, χοληστερίνη) από την πολύ επιζήμια οξείδωση, ενώ δεν μπορεί να προστατεύσει τις πρωτεΐνες. Εκτός όμως από το γεγονός ότι μπορεί να δράσουν η καθεμία χωριστά, όταν οι αντιοξειδωτικές ουσίες συνυπάρχουν πολλές μαζί εμφανίζουν πολύ καλύτερα αποτελέσματα, διότι μπορεί να έχουν συνεργική δράση, δηλαδή η μία να ενισχύει τη δράση της άλλης. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι πρέπει να φροντίζουμε να υπάρχει στον οργανισμό μας επαρκής ποσότητα και σωστός συνδυασμός αντιοξειδωτικών, για να επιτύχουμε καλύτερα αποτελέσματα. Αν δεν το επιτύχουμε, ο οργανισμός μας θα γίνεται έρμαιο των καταστρεπτικών συνεπειών που προκαλεί η περίσσεια των ελευθέρων ριζών γιατί η διατροφή μας πολλές φορές δεν μας εφοδιάζει με τα απαραίτητα αντιοξειδωτικά.

Υπάρχουν όμως και ομάδες ατόμων που έχουν ανεπάρκεια και από άλλες αιτίες, όπως είναι οι ηλικιωμένοι, οι ασθενείς με χρόνια νοσήματα, οι αθλητές, καθώς επίσης οι νέοι που δεν τρέφονται με ποικιλία τροφίμων και οι φανατικοί χορτοφάγοι. Ακόμη, οι ανάγκες μας σε αντιοξειδωτικά είναι αυξημένες, όταν καπνίζουμε, όταν πίνουμε πολύ, όταν εισπνέουμε ρύπους, όταν παίρνουμε φάρμακα σε χρόνια βάση και όταν εκθέτουμε πολύ το σώμα μας στον ήλιο.

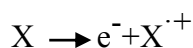
Με την ονομασία φυτοχημικά (phytochemicals), στο πεδίο των συμπληρωμάτων διατροφής, αναφερόμαστε σε φυτικές ουσίες ευεργετικές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα φυτοχημικά δεν είναι απαραίτητο να ανήκουν στις

βιταμίνες, στα αμινοξέα ή στα απαραίτητα λιπαρά οξέα. Βρίσκονται στα φρούτα, στα λαχανικά, στους σπόρους ή στα φαρμακευτικά βότανα. Οι περισσότερες από τις ουσίες αυτές – εκτός των άλλων – έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ – ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ – ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Ελεύθερες Ρίζες

Στις περισσότερες οργανικές ενώσεις, η ύπαρξη των ηλεκτρονίων σθένους κατά ζεύγη επιτρέπει στις μαγνητικές ροπές τους να έχουν αντίθετη κατεύθυνση και έτσι να μην αλληλεπιδρούν με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Όμως, μερικές οργανικές ενώσεις έχουν διαφορετική δομή ώστε να ανήκουν σε ομάδα ενώσεων που χαρακτηρίζονται σαν "ελεύθερες ρίζες", ενώσεις που υφίστανται ανεξάρτητες (από εδώ προκύπτει ο χαρακτηρισμός "ελεύθερες"), και που στο μόριό τους υπάρχει ένα ή περισσότερα "ασύζευκτα ηλεκτρόνια". Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Η παρουσία του αδέσμευτου ηλεκτρονίου επιτρέπει στις ελεύθερες ρίζες να έλκονται από μαγνητικά πεδία (π.χ. παραμαγνητικό) και αυτό τις καθιστά τις περισσότερες φορές έντονα δραστικές. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα που συναντάται είτε σε χημικό είτε σε βιολογικό περιβάλλον είναι αυτή του ατομικού υδρογόνου (H), που έχει μόνο ένα αδέσμευτο ηλεκτρόνιο. Οι ρίζες σχηματίζονται είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου:



είτε με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου:



Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά τη διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού αν το ένα ηλεκτρόνιο από κάθε κοινό ζεύγος παραμένει στο ένα άτομο, διαδικασία γνωστή ως ομολυτική διάσπαση (**Von Sonntag, 1987**). Σ' αυτή την περίπτωση η ενέργεια που απαιτείται για την αποδόμηση του ομοιοπολικού δεσμού μπορεί να προέρχεται π.χ. από τη θέρμανση της ένωσης, από την έκθεσή της σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, κ.α. Πολλοί ομοιοπολικοί δεσμοί, όπως οι δεσμοί C-C, C-H και C-O, απαιτούν θερμοκρασίες της τάξης 450-600 °C για να αποδομηθούν. Η ομολυτική διάσπαση μπορεί να συμβολιστεί ως εξής (όπου : είναι ο ομοιοπολικός δεσμός):



Για παράδειγμα, η ομολυτική διάσπαση ενός δεσμού O-H από ένα μόριο νερού θα καταλήξει σε μία ρίζα υδρογόνου (H·) και μια ρίζα υδροξυλίου (OH·).

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται με οξειδώσεις, αναγωγές ή έκθεση σε ακτινοβολία. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες έχουν γενικά εξαιρετικά μικρή διάρκεια ζωής, π.χ. 10⁻³ sec και καταλήγουν είτε σε διμερή, είτε αντιδρούν με διαφορετικές ρίζες, είτε αρχίζουν ή συμμετέχουν σε αυτοσυντηρούμενες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Λίγες μόνο από αυτές είναι σταθερότερες και διαρκούν μακρό χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου. Ακόμα

υπάρχουν "ελεύθερες ρίζες-ιόντα", δηλαδή ελεύθερες ρίζες που ταυτόχρονα έχουν θετικό ή αρνητικό φορτίο.

Η έρευνα στις ελεύθερες ρίζες βοηθήθηκε πάρα πολύ με τη χρήση της φασματοσκοπίας e.p.r. (Electron paramagnetic resonance), που δίνει χαρακτηριστικό φάσμα για κάθε ελεύθερη ρίζα. Με τη χρήση των κατάλληλων ελεύθερων ριζών και της φασματοσκοπίας e.p.r. έγινε δυνατή η μελέτη και διευκρίνιση σημαντικών βιολογικών διαδικασιών με την εισαγωγή και ανάπτυξη της χρήσης των "μοριακών ανιχνευτών ή διερευνητών". Οι τελευταίοι, είναι σχετικά σταθερές ρίζες που όπως το διετερσιο-βουτυλο-νιτροξειδίο, το οποίο μπορεί να συνδεθεί π.χ. με ένζυμα, ή γενικότερα πρωτεΐνες και στα οποία προσδίδει τις παραμαγνητικές του ιδιότητες. Έτσι, είναι δυνατό να μελετηθούν τα προς εξέταση πρωτεϊνικά μόρια με e.p.r., και μ' αυτόν τον τρόπο, να ληφθούν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία τους σε συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες. Η παραπάνω μεθοδολογία έχει χρησιμοποιηθεί π.χ. με επιτυχία στην παρακολούθηση της οξειδωσης της αιμοσφαιρίνης κατά τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς (**Brackett et al., 1998**).

Εύρεση ελευθέρων ριζών στη φύση

Τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον για τη δημιουργία των ελευθέρων ριζών, αφού βρέθηκε ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία συγκεκριμένων νοσημάτων, όπως τα φλεγμονώδη και νευροεκφυλιστικά. Επίσης, είναι σήμερα αποδεκτή η άποψη ότι οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη των βιολογικών συστημάτων, ενώ εμπλέκονται στη μεταφορά σημάτων στα κύτταρα, στην μεταγραφή των γονιδίων, κ.α. (**Zheng et al., 2000; Lander et al., 1997**). Για παράδειγμα, η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}$) παίρνει μέρος σε αρκετές κυτταρικές διαδικασίες που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες διαφόρων οργάνων (**Ignarro et al., 1999**). Το $\cdot\text{NO}$ το οποίο παράγεται φυσιολογικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της χάλασης των μυϊκών κυττάρων και συνεπώς του αγγειακού τόνου (αγγειοχάλαση-αγγειοσύσπαση), τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, την αγγειογένεση και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (**Ignarro et al., 1999**). Επίσης λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής και ως διαμεσολαβητής μεταφοράς μηνυμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα (**Fridovich, 1999**).

Η εύρεση ελευθέρων ριζών σε ζωντανούς οργανισμούς πριν από κάποια χρόνια ήταν δυνατό να αποδειχθεί μόνο έμμεσα με πειράματα παρουσίας «παγίδων» ηλεκτρονίων (scavengers, π.χ. ριβοφλαβίνης, ενεργών κινονών κ.λ.π.). Σήμερα όμως, μπορεί να αποδειχθεί η ύπαρξή τους με τη χρήση της φασματοσκοπίας e.p.r. Έτσι βρέθηκε ότι σε κάθε φάση των κυττάρων στους οργανισμούς υπάρχουν ελεύθερες ρίζες που αυξάνουν σημαντικά τη συγκέντρωσή τους σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως καταστάσεις έντονης μεταβολικής δραστηριότητας, ή κάτω από επίδραση ακτινοβολίας κ.λ.π. Σχηματίζονται για παράδειγμα στα βλαστώνοντα σπέρματα, στη μεταβολική φάση των ζυμών, στα φύλλα (χλωροπλάστες) κατά την επίδραση φωτός κ.α. (**Brackett et al., 1998**). Επιπρόσθετα, το σύμπλοκο

χλωροφύλλης - λιποπρωτεΐνης βαθμιαία μεταφέρει ηλεκτρόνια, δίνοντας ενδιάμεσως ελεύθερες ρίζες. Τέλος, η μελανίνη (χρωστική του δέρματος) που αν και ενδογενώς έχει την ικανότητα να δίνει τη δική της ελεύθερη ρίζα, εν τούτοις χρησιμεύει για την παγίδευση ηλεκτρονίων ή άλλων ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται με την ακτινοβολία στο δέρμα, προστατεύοντάς το με αυτόν τον τρόπο από επιβλαβείς δράσεις, π.χ. καρκινογένεση.

Γενικά, η έντονη μεταβολική δραστηριότητα και η ακτινοβολία αποτελούν πηγές ελευθέρων ριζών ($\text{HO}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$) που θεωρούνται ως ιδιαίτερα τοξικές για τα κύτταρα. Έτσι, πολλές φορές η πρόκληση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και η ανάπτυξη καρκίνου, καθώς και η κυτταρική γήρανση αποδίδονται σ' αυτές. Σε μερικούς μάλιστα καρκίνους («αυθόρμητους» καρκίνους ή από χημικά καρκινογόνα) κατά τη μελέτη με φασματοσκοπία e.p.r. ορισμένων κυτταρικών διαδικασιών παρατηρούνται αλλαγές στο σήμα που καταγράφεται, γεγονός που αποδίδεται και σε αποτοξινωτικές διαδικασίες του οργανισμού κατά του καρκινογόνου αιτίου. Γι' αυτό το λόγο, η ύπαρξη ουσιών που μπορούν να παγιδεύσουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες ενδοκυτταρικά, θεωρείται σήμερα ως ένας τρόπος μείωσης της πιθανότητας ανάπτυξης καρκινογένεσης. Ως ένα τέτοιο παράδειγμα, ενδείκνυται η βιταμίνη E που είναι μια από τις καλές «παγίδες» ελευθέρων ριζών στον οργανισμό και γι' αυτό η παρουσία σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στα κύτταρα θεωρείται προστατευτική γι' αυτά.

Ο κύριος ρόλος του οξυγόνου στην αερόβια ζωή

Το οξυγόνο εμπλούτισε την ατμόσφαιρα της γης πριν από περίπου 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια λόγω της έντονης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των κυανοβακτηρίων. Η αύξηση αυτή του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα της γης είχε σαν αποτέλεσμα την εκτεταμένη παραγωγή όζοντος (O_3) στην στρατόσφαιρα. Η στοιβάδα αυτή του όζοντος που είχε την ικανότητα να φιλτράρει την έντονη ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία, βοήθησε τους οργανισμούς να εγκαταλείψουν σταδιακά την θαλάσσια ζωή και έδωσε ουσιαστικά την ώθηση για την εξέλιξη της ζωής στην ξηρά. Σίγουρα όμως προκάλεσε και έντονη καταπόνηση στους μέχρι τότε ζώντες οργανισμούς, που ήταν κυρίως αναερόβιοι και πολλοί από αυτούς εξαφανίστηκαν εξαιτίας της αύξησης του οξυγόνου της ατμόσφαιρας. Άλλοι όμως οργανισμοί ανέπτυξαν αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς για να επιβιώσουν από την «τοξικότητα» του οξυγόνου. Προσάρμοσαν λοιπόν τα βιολογικά τους συστήματα, έτσι ώστε να χρησιμοποιούν το οξυγόνο για μεταβολικές διεργασίες με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων (π.χ. οξειδάσες, οξυγενάσες και ένζυμα υδροξυλάσης, όπως υδροξυλάση της τυροσίνης και ένζυμα του κυτοχρώματος P450) και για παραγωγή ενέργειας, αναπτύσσοντας αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων με το O_2 ως τελικό αποδέκτη, όπως αυτές που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Σήμερα, στην αερόβια ζωή το οξυγόνο χρησιμοποιείται από όλους τους οργανισμούς ως ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων σχεδόν σε όλες τις μεταβολικές διεργασίες (Halliwell & Gutteridge, 1998). Έτσι τελικά, οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μεταφοράς του οξυγόνου σε όλα τα κύτταρά τους, ενώ το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω της αιμοσφαιρίνης.

Περίπου το 85-90% του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια, τα οργανίδια του κυττάρου που αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) σε όλα τα θηλαστικά. Πηγή της ενέργειας είναι η τροφή, η οποία οξειδώνεται. Τα προϊόντα διάσπασης των τροφών χάνουν ηλεκτρόνια που προσλαμβάνονται από μεταφορείς ηλεκτρονίων. Η σύζευξη της οξείδωσης στην αναπνευστική αλυσίδα με τη φωσφορυλίωση του ADP αποτελεί πηγή ενέργειας για τη διατήρηση της ζωής. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το χρησιμοποιούμενο οξυγόνο στα βιολογικά συστήματα ανάγεται με τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων προς τον σχηματισμό νερού από την οξειδάση του κυτοχρώματος (cytochrome oxidase). Οξυγόνο επίσης καταναλίσκεται από το ενζυμικό σύστημα της υπερ-οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450: CYP), ένα σύστημα που εμπλέκεται και στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Ο κύριος ρόλος του τελευταίου είναι η απομάκρυνση των λιπόφιλων, στο φυσιολογικό pH, φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών από τον οργανισμό. Στο σύστημα P450 χρησιμοποιείται οξυγόνο για τις βιομετατροπές των ουσιών προς οξειδωμένα μεταβολικά προϊόντα και νερό, σε δύο διαδοχικές αναγωγές κάθε φορά ενός ηλεκτρονίου (**Halliwell & Gutteridge, 1998**).

Η τοξικότητα του οξυγόνου

Το οξυγόνο για τους αερόβιους οργανισμούς είναι ένα τοξικό αέριο. Έχει βρεθεί ότι η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας είναι οριακή, για να μην υπάρξουν βλάβες στους οργανισμούς. Οξυγόνο σε υψηλή πίεση προκαλεί οξείες βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αν και οξυγόνο σε πίεση 1 atm δεν προκαλεί βλάβες στον οργανισμό, σε συγκεντρώσεις 50% και άνω σταδιακά βλάπτουν τους πνεύμονες (**Balentine 1982**). Επίσης, παρατεταμένη έκθεση σε οξυγόνο προκαλεί νέκρωση των κυττάρων. Τον προηγούμενο αιώνα υπήρξαν πολλές θεωρίες που επιχειρούσαν να εξηγήσουν αυτές τις τοξικές δράσεις του οξυγόνου. Μόλις όμως το 1954 οι **R. Gershman και D.L. Gilbert** απέδωσαν για πρώτη φορά την τοξικότητα αυτή στη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (ή ριζών οξυγόνου) (**Gilbert, 1981**).

Το διατομικό μόριο του οξυγόνου (O₂) διαθέτει δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια, κάθε ένα σε διαφορετικό π αντιδεσμικό τροχιακό. Αυτά τα δύο ηλεκτρόνια έχουν τον ίδιο κβαντικό αριθμό, έχουν δηλαδή παράλληλα spin. Αυτή η κατάσταση είναι και η πλέον σταθερή, ενώ το O₂ μπορεί να δράσει σαν οξειδωτικός παράγοντας. Παρόλα αυτά, αν το O₂ «επιχειρήσει» να οξειδώσει κάποιο άλλο άτομο ή μόριο λαμβάνοντας ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από αυτό, αυτά τα δύο ηλεκτρόνια θα πρέπει να έχουν αντιπαράλληλο spin, έτσι ώστε να προσαρμοστούν στις κενές θέσεις των π τροχιακών (αρχή Pauli). Η συγκεκριμένη κατάσταση είναι αυξημένης ενέργειας και επιβάλλει λοιπόν έναν περιορισμό στην μεταφορά των ηλεκτρονίων, υποχρεώνοντας το O₂ να δέχεται τα ηλεκτρόνιά του ένα-ένα κάθε φορά, δικαιολογώντας ταυτόχρονα γιατί μπορεί να αντιδράσει το συγκεκριμένο μόριο έστω και ασθενώς με μη ρίζες μορίων (**Gilbert, 1981**). Θεωρητικά, οι πολύπλοκες οργανικές ενώσεις του ανθρώπινου σώματος θα έπρεπε να αντιδρούν και να καταστρέφονται

από το O₂ της ατμόσφαιρας, αλλά αυτός ο περιορισμός του spin, καθώς και άλλοι παράγοντες, αναιρούν ή καθυστερούν αυτή τη διαδικασία.

Σημαντικές ενεργές μορφές οξυγόνου (Halliwell & Gutteridge, 1998)

(α) Οξυγόνο αυξημένης ενέργειας

Η πιο δραστική μορφή του O₂ είναι αυτή που σχηματίζεται με εισροή ενέργειας. Σύμφωνα με τον ορισμό της ελεύθερης ρίζας, αυτή δεν αποτελεί ριζικό σύστημα, αφού δεν υπάρχει αδέσμευτο ηλεκτρόνιο, όμως είναι μορφή με πολύ υψηλότερη οξειδωτική ικανότητα από το οξυγόνο λόγω κατάστασης αυξημένης ενέργειας που υποχρεώνει τα δύο ηλεκτρόνια του π τροχιακού να καταλάβουν αντιπαράλληλα spin.

(β) Ιόν Ρίζας Υπεροξειδίου - Υπεροξειδικό ανιόν O₂^{•-} - Υπεροξειδίο του Υδρογόνου H₂O₂

Αν ένα ηλεκτρόνιο προστίθεται στην κατάσταση ηρεμίας του μορίου του O₂, τότε αυτό θα πρέπει να καταλάβει ένα από τα π αντιδεσμικά τροχιακά. Το προϊόν είναι η υπεροξειδική ρίζα O₂^{•-}. Με προσθήκη ενός ακόμα ηλεκτρονίου στο O₂^{•-} προκύπτει το υπεροξειδικό ιόν O₂²⁻ που και πάλι δεν θεωρείται ρίζα. Εφόσον τα επιπλέον ηλεκτρόνια στα O₂^{•-} και O₂²⁻ εισέρχονται σε αντιδεσμικά τροχιακά, η ισχύς του δεσμού O-O μειώνεται. Στο O₂ της βασικής κατάστασης τα άτομα συνδέονται αποτελεσματικά μέσω δύο ομοιοπολικών δεσμών, όμως στην περίπτωση του O₂^{•-} και του O₂²⁻ οι δεσμοί είναι σαφώς ασθενέστεροι. Η εισροή άλλων δύο ηλεκτρονίων στο μόριο O₂²⁻ καταλήγει σε διάλυση του δεσμού και δημιουργία 2O₂^{•-}. Συνήθως, στα βιολογικά συστήματα το προϊόν αναγωγής του O₂ με δύο ηλεκτρόνια είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου και με τέσσερα ηλεκτρόνια το νερό.

Συνοπτικά:

Αναγωγή, πρόσληψη ενός e⁻: O₂ → O₂^{•-}

Αναγωγή, πρόσληψη δύο e⁻: O₂ → H₂O₂ (πρωτονιωμένο O₂²⁻)

Αναγωγή, πρόσληψη τεσσάρων e⁻: O₂ → 2H₂O (πρωτονιωμένο O₂²⁻)

Το υπεροξειδικό ανιόν σχηματίζεται κυρίως σε βιολογικά συστήματα μέσω αναγωγής ενός ηλεκτρονίου του οξυγόνου τριπλής κατάστασης με τη συμμετοχή ενζύμων, της οξειδάσης των ξανθινών και της οξειδάσης της αλδεύδης.

Ξανθίνη+H₂O+O₂ → οξειδάση των ξανθινών → ουρικά ιόντα + O₂^{•-}

RCHO+H₂O+2O₂ → οξειδάση αλδεύδης → RCOO⁻+2O₂^{•-} +3H⁺

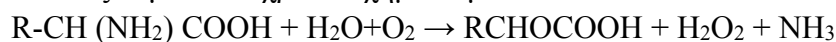
Η οξειδάση των ξανθινών παράγεται από την αφυδρογονάση της ξανθίνης.

Το O₂^{•-} λόγω της ηλεκτρονικής του διαμόρφωσης και αναλόγως των συνθηκών, μπορεί να συμπεριφέρεται ως ελεύθερη ρίζα, ασθενές πυρηνόφιλο, οξειδωτικό ενός ηλεκτρονίου ή αναγωγικό ενός ηλεκτρονίου.

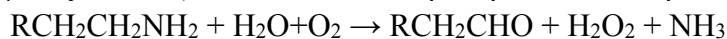
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται με τη δράση των υπεροξειδασών στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Οι οξειδάσεις φέρουν φλαβινοσυνένζυμα (FMN, FAD).

Πυριδοξίμη - Pi + H₂O + O₂ → Πυριδοξάλη - Pi + NH₃ + H₂O₂ (Pi: φωσφορική ομάδα)

Οξειδάσες των αμινοξέων που βρίσκονται στο ΚΝΣ μετατρέπουν τα αμινοξέα σε κετο-οξέα με ταυτόχρονο σχηματισμό H_2O_2 :



Η σημαντικότερη οξειδάση του ΚΝΣ είναι η οικογένεια των ΜΑΟ (μονοαμινοξειδασών) που καταλύουν την παρακάτω αντίδραση:



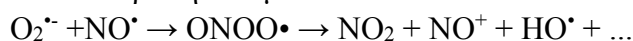
(γ) Ρίζες Υδροξυλίου HO

Η ρίζα $HO\cdot$ σχηματίζεται από το H_2O_2 εφόσον δε διασπαστεί από το ένζυμο καταλάση μετά από αναγωγή ενός ηλεκτρονίου. Σχηματισμός $HO\cdot$ in vivo λαμβάνει χώρα κατά τους ακόλουθους τρόπους:

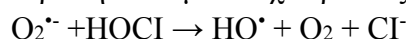
I. Κατάλυση του H_2O_2 με τη βοήθεια ιόντων μεταβατικών μετάλλων, ιδιαίτερα Fe ή Cu (Αντίδραση Fenton): $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow$ ενδιάμεσα σύμπλοκα $\rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH\cdot$
Η διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού O-O του H_2O_2 μπορεί επίσης να συμβεί και λόγω υπεριώδους ακτινοβολία, που καταλήγει στην παραγωγή δύο $OH\cdot$.

II. Έκθεση του H_2O σε ακτινοβολία (υψηλής ενέργειας)

III. Αντίδραση $O_2\cdot^-$ με $NO\cdot$



IV. Αντίδραση $O_2\cdot^-$ με υποχλωριώδες οξύ (Folkes et al., 1995):



Η $HO\cdot$ θεωρείται η περισσότερη δραστική μορφή του οξυγόνου με ενδοκυτταρική ημιπερίοδο ζωής $(t_{1/2})_{10-9}sec$. Καταστρέφει σχεδόν κάθε μόριο που συναντά μέσα στα ζώντα κύτταρα και έχει την ικανότητα να ενώνεται με νουκλεοτίδια στις δύο έλικες του DNA (crosslink) και να προκαλεί ρήξη των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα, αλλά επίσης και στη μεταλλαξιγένεση και στην καρκινογένεση. Επιπρόσθετα, αυτό το είδος θεωρείται ότι προκαλεί την έναρξη της διαδικασίας της λιπιδικής υπεροξειδωσης αποσπώντας άτομα υδρογόνου από ακόρεστα λιπαρά οξέα.

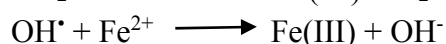
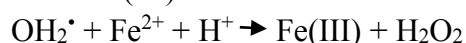
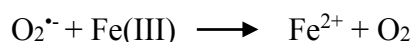
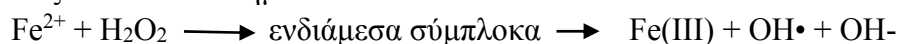
(δ) Υδροϋπεροξειδίου $HO_2\cdot$

Το ιόν ρίζας υπεροξειδίου σε όξινο περιβάλλον δίνει το πολύ τοξικότερο υδροϋπεροξειδίου: $O_2\cdot^- + H^+ \rightarrow HO_2\cdot$

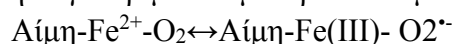
Δημιουργία ελεύθερων ριζών σε βιολογικά συστήματα

Στον οργανισμό των θηλαστικών, μέρος, περίπου 5%, του χρησιμοποιούμενου οξυγόνου ανάγεται μερικώς. Η αναγωγή αυτή διεκπεραιώνεται εν μέρει από ένζυμα που δίνουν με αυτόν τον τρόπο μερικώς ανηγμένο οξυγόνο, δηλαδή ενεργές μορφές οξυγόνου όπως: ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος $O_2\cdot^-$, ρίζα υδροϋπεροξειδίου $HO_2\cdot$, ρίζα υδροξυλίου $HO\cdot$, υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 (De Groot, 1989). Από αυτά τα ένζυμα η οξειδάση της ξανθίνης είναι αυτή που έχει μελετηθεί περισσότερο. Σε διαδικασίες γένεσης ενεργών

μορφών οξυγόνου εμπλέκονται και τα συστήματα P450, δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και συνθετάσης των προσταγλανδινών με την εμπλοκή μεταβατικών μετάλλων, κυρίως Fe και Cu (αλλά και Mn, Mo) (Halliwell, 1992). Τα μεταβατικά μέταλλα γενικά παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην γένεση ενεργών μορφών οξυγόνου. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι η αντίδραση *Fenton* (Halliwell, 1992). Μείγμα H₂O₂ και άλατος Fe²⁺ μπορεί να οξειδώσει διάφορα οργανικά μόρια. Ο Fenton πρώτος περιέγραψε τη οξείδωση του ταρταρικού οξέος μέσω αυτού του συστήματος το 1876. Η αντίδραση Fenton εμπλέκει διάφορα οξειδωτικά συστήματα:



Επίσης στα βιολογικά συστήματα, βιολογικός σημαντικά μόρια οξειδώνονται παρουσία οξυγόνου και δίνουν O₂^{•-}. Αυτές είναι οι λεγόμενες αντιδράσεις αυτοοξειδωσης που στις περισσότερες περιπτώσεις καταλύονται από μεταβατικά μέταλλα, όπως είναι ο σίδηρος και ο χαλκός. Σε αυτές εμπλέκονται η γλυκεραλδεϋδη, νευροδιαβιβαστές όπως η αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και ντοπαμίνη, η L-DOPA, FMDH₂, FADH₂ κ.α. (Davis et al., 1988). O₂^{•-} επίσης δίνουν και οι πρωτεΐνες που περιέχουν ως προσθετική ομάδα την αίμη (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, κυτοχρώματα), στις οποίες ο δισθενής σίδηρος που φέρουν οξειδώνεται από το οξυγόνο προς τρισθενή κυρίως υπό την παρουσία νιτρωδών ιόντων (NO₂⁻) ή συγκεκριμένων μεταβατικών μετάλλων, κυρίως χαλκού:



Ο εμπλουτισμός των υδροφόρων οριζώντων με νιτρικά υπολείμματα από φυτοφάρμακα (NO₃⁻), τα οποία ανάγονται προς NO₂⁻ από βακτήρια είναι πραγματικά μεγάλος κίνδυνος για κατοίκους αγροτικών περιοχών και ευθύνονται για την πρόκληση ασθενειών του αιμοποιητικού συστήματος, κυρίως αναιμιών (Winterbourn, 1976).

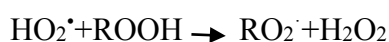
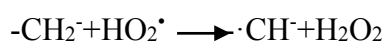
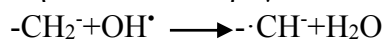
Η πλέον σημαντική πηγή O₂^{•-} στα βιολογικά συστήματα είναι η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, που αφορά και τις διαδικασίες σχηματισμού ενέργειας στο κύτταρο (Turrens, 1997). Αυτή η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια από «διαρροές» κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων μπορεί να προκαλέσει βλάβες στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA, διαδικασίες πιο συχνές σε μεγάλες ηλικίες (Hayakawa et al, 1992; Shigenaga et al, 1994).

Πολλά ακόμη μέταλλα, όχι αναγκαστικά μεταβατικά, συμμετέχουν στο σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου και άλλων ριζών με άλλους μηχανισμούς π.χ. διαταραχές στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας, στη δομή των βιομεμβρανών ή στις φυσιολογικές ομοιοστατικές λειτουργίες π.χ. του Ca²⁺. Τέτοια μέταλλα είναι Al, Hg, Cd, Pb, Ce. Επιπλέον, ο υδράργυρος και άλλα βαριά μέταλλα συνδέονται με την γλουταθειόνη (GSH), αναστέλλουν τη γλουταθειονική μεταφοράση και αναγωγή και έτσι ελαττώνουν δραστικά τα ενδοκυτταρικά αποθέματα αυτού του μορίου που φυσιολογικά λειτουργεί ως «παγίδα» ελεύθερων ριζών. Με αυτό τον τρόπο ο οργανισμός είναι πολύ πιο ευάλωτος έναντι των τοξικών δράσεων δυνητικά πολύ επικίνδυνων χημικών, που δρουν μέσω

δραστηκότητας ενδιάμεσων, ηλεκτρονιόφιλων ή ελευθέρων ριζών (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Μοριακοί μηχανισμοί προσβολής και τοξικότητας από ελεύθερες ρίζες.

Θεμελιώδεις κυτταρικές και μοριακές δομές, όπως βιομεμβράνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα (DNA πυρήνα και μιτοχονδρίων) περιέχουν στα μόρια τους περιοχές πολύ ευαίσθητες σε προσβολή από ελεύθερες ρίζες (Yakes & Van Houten, 1997). Γίνεται δεκτό ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν είτε άμεσα, με ομοιοπολική σύνδεση με λιπίδια βιομεμβρανών και πρωτεΐνες και πιθανή απενεργοποίησή τους, είτε έμμεσα με αλληλεπίδραση με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα βιολογικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την εκκίνηση "λιπιδικής υπεροξειδωσης". Χαρακτηριστική διαδικασία ελευθέρων ριζών είναι η λιπιδική υπεροξειδωση, πολύπλοκη οξειδωτική διαδικασία αλυσιδωτών αντιδράσεων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Η λιπιδική υπεροξειδωση αρχίζει με την επίδραση δραστικών μορφών οξυγόνου επί πολυακόρεστου λιπαρού οξέος και την απόσπαση αλλυλικού υδρογόνου από το λιπαρό οξύ.



Ακολουθεί πολύπλοκη σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων, με παραγωγή πλήθους αλκυλο- και αλκοξυ- διαλδεΐδης, άλλων αλδεΐδων, αλκανίων και συζευγμένων διενίων. Τελικό αποτέλεσμα είναι η δομική αποδιοργάνωση και η λειτουργική βλάβη των βιολογικών μεμβρανών.

Η υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των βιολογικών μεμβρανών, που εκκινεί με την απόσπαση ενός αλλυλικού υδρογόνου, ελαττώνει τη ρευστότητα των μεμβρανών, σημαντική ιδιότητα για τη φυσιολογική τους λειτουργία. Επιπλέον, ο σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων σε υδρόφοβες περιοχές φωσφολιπιδίων οδηγεί στη δημιουργία υδρόφιλων κέντρων, και ως εκ τούτου τροποποιούνται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών - ligands. Η λιπιδική υπεροξειδωση λοιπόν προκαλεί σταδιακή αποσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ένα στοιχείο με τεράστια σημασία για τη βιομηχανία των τροφίμων, αφού για τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση μέχρι την κατανάλωση θα πρέπει να ανασταλλεί αυτή η διαδικασία. Επίσης στον οργανισμό θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στην πρόωρη γήρανση, αιμόλυση, καρκινογένεση, αρτηριοσκλήρυνση, φλεγμονή και στην τοξικότητα σιδήρου (Bus & Gibson, 1979; Recknagel & Glende, 1979;).

Μεταξύ των τελικών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι δικαρβονυλικές ενώσεις, κυρίως μηλονική αλδεΐδη (O:CH-CH₃-CH:O). Αυτή γεφυρώνει μακρά ευρισκόμενες περιοχές ενός πολυπεπτιδίου ή δύο διαφορετικών πεπτιδίων, μετά από αντίδραση των καρβονυλίων της με ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες, ασκώντας έτσι κυτταροτοξική δράση. Οι καρβονυλικές αυτές ενώσεις μπορούν να κινηθούν πέρα από την περιοχής εμφάνισής τους και να δράσουν και σε απομακρυσμένες περιοχές σε σχέση με την περιοχή παραγωγής τους (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Ενεργές μορφές οξυγόνου και πολλά ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσής αλληλεπιδρούν με λειτουργικές σουλφυδρυλο-(HS)-ομάδες, μεταξύ των οποίων και με την γλουταθειόνη (GSH), αδρανοποιώντας ένα κύριο αμυντικό σύστημα αποτοξίνωσης ελευθέρων ριζών του οργανισμού (**Chance et al., 1979**).

Αλλαγές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} (αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+}), ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2 (PLA2), με περαιτέρω διαταραχές στις βιομεμβράνες, και επαγωγή της σύνθεσης παραγόντων φλεγμονής καθώς και μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης είναι περαιτέρω συνέπειες της λιπιδικής υπεροξειδωσής που οδηγούν σε διαδικασίες κυτταρικής εκφύλισης (**Nicotera & Orrenius, 1994**).

Μερικές από τις παραπάνω αλλαγές προκαλούν ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεασών (καλπαΐνες) με συνέπεια αλλοιώσεις του κυτταρικού σκελετού (**Nicotera & Orrenius, 1994**).

Εκ των ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου, το O_2 δεν είναι απευθείας πολύ τοξικό, η τοξικότητά του πάντως αυξάνει σε όξινο περιβάλλον όπου βρίσκεται με την πρωτονιωμένη του μορφή HO_2^{\bullet} (ρίζα υπεροξειδίου υδρογόνου, υδροϋπεροξειδική ρίζα). Το HO^{\bullet} είναι εξαιρετικά δραστικό και αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα οξειδωτικά μέσα. Φυσιολογικές διαδικασίες όπως η φαγοκυττάρωση περιλαμβάνουν το σχηματισμό HO^{\bullet} και η τοξικότητά τους προφανώς οφείλεται στις χημικές αντιδράσεις που προκαλούν αυτές οι δραστικές μορφές. Οι ρίζες HO^{\bullet} έχει αποδεχτεί ότι προκαλούν θραύση της διπλής έλικας του DNA και απώλειες K^+ των κυττάρων, διαταράσσοντας έτσι τόσο τη διαδικασία μεταγραφής του DNA, όσο και το ηλεκτροχημικό δυναμικό των κυτταρικών μεμβρανών (**Moraes et al., 1990; Duprat et al., 1995**).

Άμυνα του οργανισμού έναντι της τοξικότητας του οξυγόνου και της προσβολής από ελεύθερες ρίζες: Οξειδωτικό stress

Αναφέρθηκε παραπάνω πως το O_2 είναι για τους αερόβιους οργανισμούς ένα "δηλητηριώδες" μόριο. Οι αερόβιοι επιβιώνουν μόνο επειδή έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικές άμυνες. Επίσης χρειάζονται άμυνα κατά των ενεργών μορφών αζώτου (RNS) όπως το υπεροξυνιτρίδιο.

Κάποιοι κινητοί οργανισμοί αποφεύγουν την τοξικότητα του O_2 απομακρυνόμενοι από περιοχές με υψηλή συγκέντρωση O_2 . Σε πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένης και της *Salmonella typhimurium* και της *Escherichia coli*, υπάρχει ένας ενδοκυτταρικός ανιχνευτής ριζών που μετρά την περιεκτικότητα των ριζών και αναλόγως μεταφέρει σήμα στα κινητήρια όργανα αυτών των μικροοργανισμών. Μια εναλλακτική προσαρμογή, αποτελεί η ανάπτυξη αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιορίζουν την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ με τη συσσώρευση των ριζών, έτσι ώστε η αποβολή ηλεκτρονίων προς το O_2 να είναι λιγότερο πιθανή. Για παράδειγμα, η οξειδάση του κυτοχρώματος καταλύει την πρόσληψη (σταδιακά) $4e^-$ από το O_2 για την παραγωγή $2H_2O$, χωρίς τη δημιουργία ενεργών μορφών O_2 (ROS) (**Poderoso et al., 1996**).

Μια άλλη προσαρμογή στους πολυκύτταρους οργανισμούς αποτελεί η χρήση των ελάχιστων επιπέδων διασωματιδιακού O_2 για την αερόβια αναπνοή. Οι διακυτταρικές και

κυρίως οι διαμιτοχονδριακές συγκεντρώσεις O₂ είναι πολύ χαμηλότερες από το κανονικό και αυτό πιθανώς οδηγεί σε μείωση του οξειδωτικού stress *in vivo*. Οι βιομηχανίες τροφίμων συχνά εκμεταλλεύονται αυτή την τεχνική όταν σφραγίζουν τα τρόφιμα υπό άζωτο ή σε κενό (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Η προσαρμογή λοιπόν, είναι μια από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες της ζωής στα αερόβια κύτταρα που, με την τεράστια ικανότητα προσαρμογής τους, έχουν αναπτύξει στη μακρά διαδρομή της εξέλιξης της ζωής αμυντικούς μηχανισμούς για να αντισταθούν στις βλαπτικές επιδράσεις του O₂. Μερικοί από αυτούς τους μηχανισμούς είναι:

α) Χαμηλού μοριακού βάρους παράγοντες που παγιδεύουν ελεύθερες ρίζες. Στα βιολογικά συστήματα τέτοιου είδους ανήκουν τα φυσικά αντιοξειδωτικά η γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη, η κυστεΐνη, το ασκορβικό οξύ, διάφορα φλαβονοειδή, οι κατεχόλες, η βιταμίνη Α και τα καροτενοειδή (Halliwell & Gutteridge, 1998).

β) Παράγοντες (ένζυμα) που δρώντας καταλυτικά απομακρύνουν από τον οργανισμό ελεύθερες ρίζες και άλλα (δραστικά είδη) π.χ. Δισμουτάσες (όπως η υπεροξειδική δισμουτάση -SOD), καταλάσες και υπεροξειδάσες .

γ) Πρωτεΐνες που προστατεύουν τα βιομόρια από την οξείδωση, π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) (Chance et al., 1979).

δ) Ένζυμα υπεύθυνα για την επιδιόρθωση οξειδωτικής βλάβης.

ε) Πρωτεΐνες που ελαχιστοποιούν τη διαθεσιμότητα των προ-οξειδωτικών παραγόντων (π.χ. ιόντων Fe, ιόντων Cu). Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι τρανσφερρίνες, μεταλλοθειονίνες κ.α. Σ' αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες που οξειδώνουν ιόντα Fe, όπως οι σερουλοπλασμίμες.

Είναι προφανές λοιπόν, ότι υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες υγείας, στον οργανισμό υπάρχουν δυο ομάδες αμοιβαία αντιτιθεμένων διαδικασιών, μία προ-οξειδωτική και μια αντι-οξειδωτική, που βρίσκονται σε ισορροπία. Η διαταραχή της ισορροπίας "προ-οξειδωτική / αντι-οξειδωτική" στον οργανισμό, προς όφελος της προ-οξειδωτικής, αποτελεί κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως "οξειδωτικό stress". Η εμφάνιση οξειδωτικού stress οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών.

Το οξειδωτικό stress έχει σαν επακόλουθο το βιολογικό stress που εκδηλώνεται με αδυναμία απόκρισης του οργανισμού σε κάθε ερέθισμα και απαίτηση ενέργειας. Οι συνέπειες, καθώς και η προστασία από τη δράση ελευθέρων ριζών ή και την πρόληψη του οξειδωτικού stress αποτελούν το αντικείμενο δραστηρίας και έντονης επιστημονικής έρευνας τα τελευταία χρόνια.

Εμπλοκή της δράσης των ελευθέρων ριζών-οξειδωτικού stress σε παθολογικές καταστάσεις.

Οι διαδικασίες ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό stress έχουν σαν αποτέλεσμα την κυτταρική εκφύλιση και εμπλέκονται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται, τουλάχιστον μερικώς, υπεύθυνες (Halliwell et al., 1992). Ακολούθως, δίδονται μερικά παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων με την περιγραφή του ρόλου των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση και εκδήλωση της νόσου.

Η γνώση σε μοριακό επίπεδο της βιοχημικής «απόκλισης» ή βλάβης σε νόσο μπορεί να βοηθήσει αποφασιστικά στο σχεδιασμό φαρμακομοριών για την θεραπευτική αντιμετώπιση της συγκεκριμένης παθολογικής κατάστασης.

A. Φλεγμονή (Halliwell, 1995; Stein et al., 1996).

Η φλεγμονή συνδέεται με φαινόμενα ελευθέρων ριζών με περισσότερους του ενός τρόπου, μέσω i) της σύνθεσης μεσολαβητών φλεγμονής όπως των προσταγλανδινών, του θρομβοξανίου και των λευκοτριενίων. Στις βιοσυνθετικές αυτές διαδικασίες εμπλέκεται ο σχηματισμός υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών. Ταυτόχρονα, ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα στις διαδικασίες αυτές, η συνθετάση των προσταγλανδινών, όχι μόνο μπορεί να ενεργοποιήσει το οξυγόνο απευθείας, δίδοντας δραστικές μορφές αυτού, αλλά μπορεί να συμμετέχει σε βιομετατροπές ξενοβιοτικών, παρέχοντας ενδιάμεσους δραστικούς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν το οξυγόνο. ii) Κατά την κυτταρική φάση της φλεγμονής - φαγοκυττάρωση, κύτταρα όπως πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα ανάγουν οξυγόνο σε ενεργές μορφές αυτού προκαλώντας τη λεγόμενη "αναπνευστική έκρηξη". Αυτές οι δραστικές μορφές οξυγόνου καταστρέφουν το παθογόνο αίτιο (μικρόβιο και όχι μόνο) που φαγοκυτταρώνεται από τα συγκεκριμένα λευκοκύτταρα. Είναι όμως δυνατό να προξενηθεί και εξωκυτταρική βλάβη στους γύρω ιστούς. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συμβάλλει σε βλάβη ιστών και κακοήθεις ανωμαλίες, που ακολουθούν τις φλεγμονώδεις και άλλες αυτοάνοσες νόσους.

B. Επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη (Rosen et al., 1998; Spycher et al., 1997; Thorpe & Baynes, 1996).

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

Κατά τον σακχαρώδη διαβήτη, οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν κορεσμό στο ένζυμο εξοκινάση, το κυρίως υπεύθυνο ένζυμο για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Έτσι, η γλυκόζη εισρέει στο κύτταρο όπου αυξάνονται οι συγκεντρώσεις της με αποτέλεσμα: α) να «επιλαμβάνεται» του μεταβολισμού της γλυκόζης το ενζυμικό σύστημα των πολυολών, η αναγωγή της αλδόξης και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης. Το πρώτο

ένζυμο ανάγει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη, το δεύτερο, πολύ βραδύτερα από το πρώτο, ενώ με αφυδρογόνωση οξειδώνεται η σορβιτόλη σε φρουκτόζη, β) το ενζυμικό αυτό σύστημα επάγεται, έτσι ο οργανισμός αρχίζει, μέσω της αυξημένης έκφρασης των αντίστοιχων mRNAs, να παράγει τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε ακόμη μεγαλύτερες ποσότητες. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι να συγκεντρώνονται ενδοκυτταρικά μεγάλα ποσά σορβιτόλης, τα οποία και λόγω της πολικότητάς τους δεν μπορούν να διαχυθούν έξω από το κύτταρο με συνέπεια την εισροή ύδατος (για λόγους οσμωτικούς) και σημαντική κυτταρική βλάβη. Για να έχει συνέχεια η (αναγωγική) δράση της αναγωγάσης της αλδόζης το ένζυμο είναι συζευγμένο με NADPH.

Έτσι, καθώς η γλυκόζη ανάγεται από την αναγωγή της αλδόζης σε σορβιτόλη, καταναλίσκεται NADPH και σωρεύεται NADP⁺ ενδοκυτταρικά. Η μείωση του NADPH και η συσώρευση NADP⁺ οδηγούν σε οξειδωτικό stress. Το τελευταίο, έχει δειχθεί, (μετρήθηκαν αυξημένα ποσά λιπο-υπεροξειδίων, μηλονικής διαλδεύδης, περιορισμό της GSH, ελάττωση των συγκεντρώσεων Cu, Zn και Mn-SOD καθώς και βιταμίνης E), και σε διαβητικούς ασθενείς και σε πειραματόζωα που τους προκλήθηκε πειραματική υπεργλυκαιμία. Πολλοί ακόμη παράγοντες που έχουν σχέση με το οξειδωτικό stress παρεμβαίνουν άμεσα ή έμμεσα στην κυτταρική βλάβη που ακολουθεί: i) Προβλήματα στην ομοιόσταση του Ca⁺⁺ (από την απομάκρυνση της μυοϊνοσιτόλης λόγω της υπερώσμωσης). ii) Διαταραχή της φυσιολογικής σύνθεσης του NO που ρυθμίζει το μυϊκό τόνο των τοιχωμάτων των αγγείων. Για τη βιοσύνθεση του NO από αργινίνη απαιτείται απαραίτητως NADPH, το οποίο όμως λόγω του οξειδωτικού stress έχει εξαντληθεί. Λόγω του stress αυτού, το NO εύκολα οξειδώνεται από το O₂⁻, σε ONOO (υπεροξυνιτρίλιο) το οποίο επίσης είναι πάρα πολύ τοξικό. Σε όξινο περιβάλλον δίνει το ασταθές υπεροξυνιτρώδες οξύ που διασπάται σε NO₂ και HO·. iii) Σε διαβητικούς ασθενείς και σε πειραματόζωα έχουν βρεθεί αυξημένα ποσά μεθυλογλυοξάλης και μηλονικής διαλδεύδης όπως ήδη αναφέραμε. Οι καρβονυλικές αυτές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν με πλευρικές ή τελικές αμινο-ομάδες πεπτιδίων με ποικίλους τρόπους γεφυρώνοντας τις πεπτιδικές αλυσίδες ενδο- ή διαμοριακά.

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

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

Γ. Καρδιαγγειακό, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, αγγειοπάθειες (Ross, 1993; Darley-Usmar & Halliwell, 1996)

Από τους σημαντικότερους παράγοντες και παθογενετικά αίτια των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι οι οξειδωτικές με ελεύθερες ρίζες διαδικασίες και το οξειδωτικό stress. Μόρια της LDL (Low Density Lipoprotein: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) μέσω της μεμβράνης του εσωτερικού τοιχώματος των αγγείων διεισδύουν στη στοιβάδα του

ενδοθηλίου, όπου οξειδώνονται από δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται από το ενδοθήλιο κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών. Οι οξειδωμένες oxLDL δεν αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς της φυσιολογικής LDL αλλά από άλλους υποδοχείς, τους λεγόμενους «σαμποτέρ» (Saboteur). Η αλληλεπίδραση της oxLDL με τους υποδοχείς αυτούς έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων και παραγόντων φλεγμονής, κυρίως κυτοκινών. Αυτό μέσω πολύπλοκων βιοχημικών διεργασιών οδηγεί σε αύξηση των λιπιδίων, εξωκυτταρικά αυξημένη συγκόλληση αιμοπεταλίων και άλλων ευμόρφων συστατικών του αίματος, σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου, ασβέστωση και σκλήρυνση της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον η οξειδωμένη LDL, μειώνει τα διαθέσιμα ποσά NO[·] (διατομική ρίζα, υπεύθυνη για την αγγειοδιαστολή) μετατρέποντας αυτό το μόριο στα πολύ τοξικά υπεροξυνιτρόδη (NO[·]+O₂⁻ → ONOO⁻). Τέλος, η oxLDL προκαλεί διέγερση παραγωγής ενδοθηλίνης-1 η οποία δρα αγγειοσυσταλτικά.

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

Τα τελευταία χρόνια, ο περιορισμός της αθηρωμάτωσης-αρτηριοσκλήρυνσης και της υπερχοληστεροναιμίας με την θεραπευτική εφαρμογή αντιοξειδωτικής προσέγγισης συνεχώς κατακτά έδαφος. Έτσι έχουν συντεθεί ενώσεις με αντιχοληστεριναιμική και αντιοξειδωτική δράση [π.χ. η χρήση του φαρμάκου προβουκόλη (Probucol)]. Επίσης συνιστάται διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες (E, C, A). Τέτοια διατροφή φαίνεται ότι εμποδίζει ή τουλάχιστον σημαντικά επιβραδύνει την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Σημειώνεται τέλος η ευεργετική δράση της HDL (High Density Lipoprotein: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη). Η λιποπρωτεΐνη αυτή έχει αντι-αθηρωματική ικανότητα επειδή μεταφέρει τη χοληστερόλη από τα αγγεία στο ήπαρ. Έχει βρεθεί επιπλέον ότι η HDL έχει και αντιοξειδωτική ικανότητα (Garner et al., 1998).

4. Νευρωνική εκφύλιση (Sims & Zaidan, 1995)

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

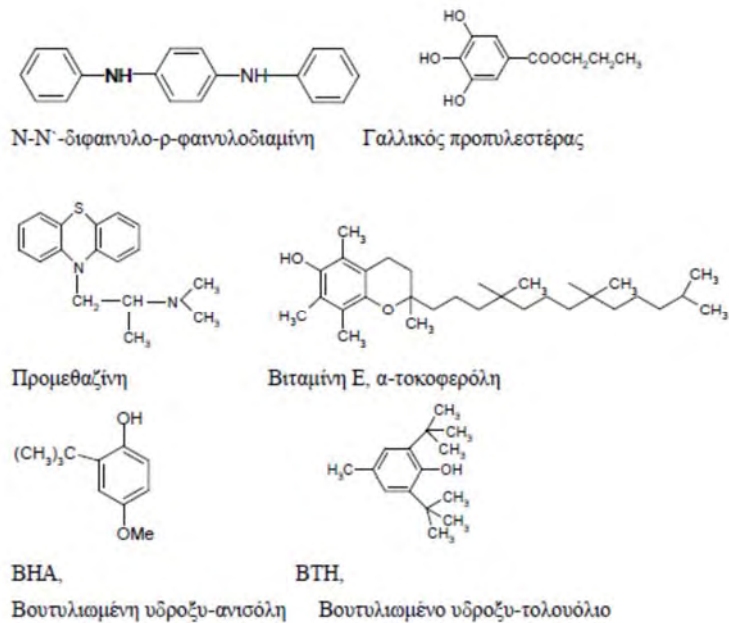
Παγίδες ελευθέρων ριζών (Αντιοξειδωτικά)

Πολλές ενώσεις που εύκολα μπορούν να πάρουν μέρος σε οξειδοαναγωγικές διαδικασίες, μπορούν να δεσμεύουν τις επικίνδυνες, εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες. Από τις ενώσεις αυτές, σε ορισμένες συγκεντρώσεις οι μη τοξικές χρησιμοποιούνται σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών σκευασμάτων. Πολλές από αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί με σχετική επιτυχία στην αντιμετώπιση της επιβλαβούς δράσης χημικών ενώσεων, όπως ειδικότερα φαρμάκων που μέσα στον οργανισμό δίνουν τοξικούς μεταβολίτες για τους οποίους υπάρχει η υπόνοια ότι είναι ελεύθερες ρίζες (αναλγητικά παράγωγα της *p*-αμινο-φαινόλης, αρωματικές ή μη ενώσεις που ενδιάμεσα δίνουν εποξειδία, CCl₄-ζιζανιοκτόνα κ.α.).

Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται μερικές από τις κοινές παγίδες ελευθέρων ριζών (free radical scavengers) - αντιοξειδωτικοί παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων.

Τα αντιοξειδωτικά και η Βιομηχανία τροφίμων

Η βιομηχανία τροφίμων δίνει πολύ μεγάλη σημασία στην αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τροφίμων, ιδιαίτερα αυτών με υψηλή συγκέντρωση σε λιπαρά (**Kanner, 1994**). Αυτό συμβαίνει γιατί τα λιπίδια, κυρίως τα ακόρεστα, είναι εξαιρετικά επιρρεπή στην οξείδωση με την οποία σχηματίζονται διάφορα προϊόντα που προσδίδουν δυσάρεστη γεύση, αλλοιώσεις στο χρώμα, απώλεια θρεπτικότητας και παραγωγή τοξικών ενώσεων στις τροφές (**Halliwell et al, 1989**). Για τη συντήρηση λοιπόν των τροφίμων απαιτείται η χρήση αντιοξειδωτικών. Μέχρι πρόσφατα γινόταν χρήση κυρίως συνθετικών αντιοξειδωτικών, όπως το BHA και BHT, των οποίων όμως η ασφάλεια είναι υπό συζήτηση. Για παράδειγμα, έρευνες έδειξαν ανάπτυξη όγκων στο στομάχι επιμύων μετά από κατανάλωση BHA (**Hudson, 1990**). Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχουν ενταθεί οι έρευνες από τη βιομηχανία τροφίμων σχετικά με τη χρήση αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης (**Hudson, 1990**).



Εικόνα 1: Παγίδες ελευθέρων ριζών-αντιοξειδωτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων

Συμπεράσματα

Φαίνεται λοιπόν ότι ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό είναι βασικός υπεύθυνος, ή τουλάχιστον συμμετέχει, στην παθοφυσιολογία κάποιων σοβαρότατων ασθενειών, ενώ φαίνεται ότι είναι η κύρια αιτία γήρανσης των κυττάρων.

Τα αντιοξειδωτικά είναι αυτά που μέσα στον οργανισμό ανταγωνίζονται τη δράση των ελευθέρων ριζών και στην ουσία προστατεύουν τα κύτταρα. Για κάποια συνθετικά αντιοξειδωτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα, κυρίως για την προστασία των τροφίμων από την υπεροξείδωση των λιπών (π.χ. BHA, BHT) σταδιακά περιορίζεται η χρήση τους σήμερα, γιατί για μερικά από αυτά, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι θα μπορούσαν να δράσουν και ως καρκινογόνα. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί στην αναζήτηση ασφαλών αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης.

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ – ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών με δομή που περιλαμβάνει τουλάχιστο έναν βενζολικό δακτύλιο που φέρει ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Η ενέργεια των υδροξυλίων αυτών είναι αυξημένη λόγω του συζυγιακού (+R) φαινομένου που προκαλούν και εμφανίζονται λιγότερο ή περισσότερο όξινα ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες λοιπόν των φαινολών οφείλονται κυρίως στο οξειδοαναγωγικό τους δυναμικό που ουσιαστικά τις καθιστά ικανές να δράσουν σαν αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνων. Έτσι είναι εξαιρετικά εύκολο να αντιδράσουν

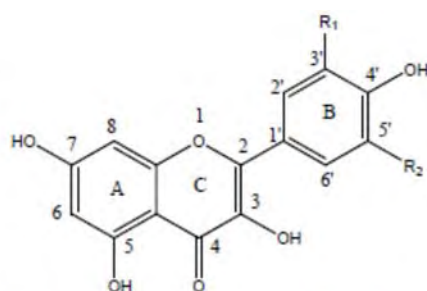
απευθείας με ενεργές μορφές οξυγόνου, π.χ. $\text{OH}\cdot$, και με αυτόν τον τρόπο να τις αδρανοποιήσουν χημικά (Rice-Evans et al., 1996).

Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες ανήκουν στα φυτικά αντιοξειδωτικά και είναι μια πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια, τις τανίνες και τις λιγνάνες

A) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η σημαντικότερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 13 υποκατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν περισσότερες από 5000 ενώσεις. Είναι ενώσεις που περιέχουν τον ίδιο πυρήνα φλαβόνης C₁₅ (C₆-C₃-C₆) και συνίστανται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (A & B), οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός ετεροκυκλικού οξυγονούχου δακτυλίου γ-πυρανίου ή πυρονίου (Εικόνα 2). Αυτή η δομή είναι κοινή για τα 3-δεοξυφλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και νεοφλαβόνες) και για τα 3-υδροξυφλαβονοειδή (φλαβονόλες, ανθοκυανίνες, φλαβαν-3,4-διόλες και φλαβαν-3-όλες), ανάλογα με το αν υπάρχει υδροξύλιο στην θέση 3 του φλαβονοειδούς.



Γενική χημική δομή των φλαβονολών: Καμπφερόλη, $R_1=H$, $R_2=H$; Κερκετίνη, $R_1=OH$, $R_2=H$; Μυρικήτίνη, $R_1=OH$, $R_2=OH$

Εικόνα 2: γενική χημική δομή φλαβονολών

Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες. Οι φλαβονόλες (καμπφερόλη, κερκετίνη και μυρικήτίνη) (Εικόνα 2) έχουν χρώμα κιτρινωπό, είναι δυσδιάλυτες ουσίες, παρούσες στα άνθη και τα φύλλα τουλάχιστο του 80% των ανώτερων φυτών, καθώς επίσης και στους καρπούς (Kuhnau 1976). Στις τροφές οι φλαβονόλες απαντώνται συνήθως σαν Ο-γλυκοζίτες, και συνήθως το σάκχαρο είναι η D-γλυκόζη. Άλλα σάκχαρα που απαντώνται είναι η D-γαλακτόζη, η L-ραμνόζη, η L-αραβινόζη, η D-ξυλόζη και το D-γλυκουρονικό οξύ. Συνήθως η γλυκοσυλίωση λαμβάνει χώρα στον C3 και σπανιότερα στον C7 (Herrmann, 1988).

Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν την μη γλυκοζυλιωμένη μορφή των ανθοκυανινών. Επειδή οι ανθοκυανιδίνες απουσία του σακχάρου είναι ασταθή μόρια, οι πολυφαινόλες

αυτές βρίσκονται στην γλυκοζυλιωμένη τους μορφή. Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη και σημαντικότερη ομάδα φλαβονοειδών που υπάρχει στα επισπέρματα και στον χυμό του ροδιού. Αυτή η φυσική χρωστική δίνει στο φρούτο και στον χυμό του ροδιού το κόκκινο χρώμα. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι κατηγορίες των φλαβονοειδών καθώς και οι διατητικές τους πηγές.

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

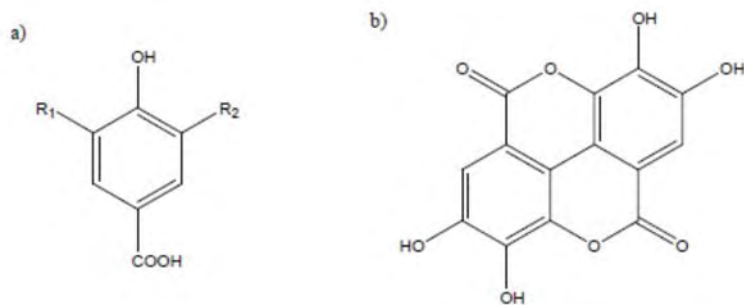
Πίνακας 1: κατηγορίες των φλαβονοειδών και διατητικές πηγές τους

B) Φαινολικά οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη κατηγορία πολυφαινολών, μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και τα παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος.

Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα έχουν μία γενική δομή C6-C1, που προκύπτει απευθείας από το βενζοϊκό οξύ (**Εικόνα 3α**). Οι διαφορετικές δομές των υδροξυβενζοϊκών οξέων προκύπτουν από τις υδροξυλιώσεις και μεθυλιώσεις του αρωματικού δακτυλίου. Τέσσερα οξέα απαντώνται συνήθως: *p*-υδροξυ-βενζοϊκό, βανιλλικό, πρωτοκατεχικό και συριγγικό. Αυτά βρίσκονται σε διαλυτή μορφή, συζευγμένα με σάκχαρα, ή οργανικά οξέα, καθώς επίσης και πάνω σε συστατικά κυτταρικού τοιχώματος, όπως στις λιγνίνες (**Strack, 1997**). Ένα ακόμη συνηθισμένο υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι το σαλικυλικό (2-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ). Το γαλλικό οξύ είναι ένα τριυδροξυ-παράγωγο που συμμετέχει στο σχηματισμό των υδρολυόμενων γαλλοτανινών (**Strack 1997**). Το διμερισμένο προϊόν του γαλλικού οξέος και η σχετική διλακτόνη, το ελλαγικό οξύ (**Εικόνα 3β**) είναι συνήθεις φυτικοί μεταβολίτες. Το ελλαγικό οξύ συνήθως απαντάται στις ελλαγιτανίνες σαν εστέρες του αναλόγου του διφαινικού οξέος με γλυκόζη.

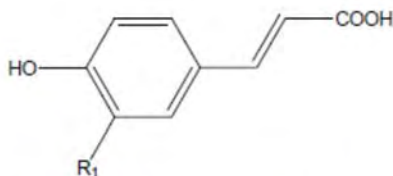


Γενικές χημικές δομές (α) Υδροξυβενζοϊκών οξέων: *p*-υδροξυ βενζοϊκό οξύ, $R_1=H$, $R_2=H$; γαλλικό οξύ, $R_1=OH$, $R_2=OH$; πρωτοκατεχικό οξύ $R_1=OH$, $R_2=H$; βανιλλικό οξύ, $R_1=OCH_3$, $R_2=H$ (β) ελλαγικό οξύ.

Εικόνα 3: Γενικές χημικές δομές υδροξυβενζοϊκών οξέων

Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα τέσσερα περισσότερο διαδεδομένα υδροξυκινναμωμικά οξέα που απαντώνται στους καρπούς είναι το *p*-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό (Εικόνα 4). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα συνήθως απαντούν εντός του φυτού σε διάφορες συζευγμένες δομές και οι ελεύθερες δομές είναι αποτέλεσμα χημικής ή ενζυματικής υδρόλυσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Συνήθως λοιπόν απαντώνται ως εστέρες με υδροξυοξέα, όπως κινικό, τρυγικό, σικιμικό ή στη γλυκοζιτική τους μορφή.



Γενική χημική δομή τριών υδροξυκινναμωμικών οξέων: *p*-κουμαρικό οξύ, $R_1=H$; καφεϊκό οξύ $R_1=OH$; φερουλικό οξύ, $R_1=OCH_3$.

Εικόνα 4: γενική χημική δομή υδροξυκινναμικών οξέων

Λειτουργικότητα των Φλαβονοειδών και Φαινολικών οξέων στα φυτά

Υπολογίζεται ότι περίπου 2% του άνθρακα που φωτοσυντίθεται από τα φυτά, δηλαδή περίπου 1×10^9 τόνους κάθε χρόνο, μετατρέπεται σε φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά παράγωγα (Smith, 1972). Με ελάχιστες εξαιρέσεις μόνο, τα φυτά έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν τέτοιες ενώσεις σε αντίθεση με τα ζώα και τους μύκητες. Κάποια φαινολικά, ειδικά οι ερυθρές και κυανές ανθοκυανίνες, και οι κίτρινες αουρόνες και χαλκόνες, ελκύουν τα έντομα. Άλλες φαινόλες συντίθενται από τα φυτά για αντιοξειδωτική άμυνα και επιδιόρθωση των καταστροφών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Η σόγια είναι πλούσια σε τοκοφερόλες, ισοφλαβόνες και καφεϊκό οξύ, τα φυστίκια σε ταξιφολίνη με επιβεβαιωμένη αντιοξειδωτική δράση και το ρύζι στο φλαβονοειδές ισοβιτεξίνη. Το λάδι του σουσαμιού είναι πλούσιο σε εστέρες καφεϊκού οξέος και το τσάι σε κατεχίνες, όπου αποδίδεται και η αντιοξειδωτική του δύναμη. Η κατεχίνη, επικατεχίνη και το γαλλικό οξύ έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στην συνολική εμφάνιση αντιοξειδωτικής δύναμης του κόκκινου κρασιού.

Τα φαινολικά έχουν μεγάλη σημασία σαν υλικά υποστήριξης των κυτταρικών μεμβρανών στα φυτικά κύτταρα. Σχηματίζουν εν μέρει μία εσωτερική πολυμερισμένη δομή, όπως οι λιγνίνες, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη, καθώς και προστασία ενάντια μικροβιακών μολύνσεων (**Strack, 1997**).

Από τις πλέον σημαντικές λειτουργίες των φλαβονοειδών, κυρίως των ανθοκυανινών, με τη συνέργεια και των φλαβονολών και φλαβονών, είναι να δίνουν χρώμα στα άνθη και στους καρπούς (**Strack, 1997**). Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό για την προσέλκυση εντόμων και πτηνών που βοηθούν τη γονιμοποίηση και τη διασπορά σπερμάτων.

Επίσης οι φαινολικές ενώσεις πολλές φορές συντίθενται για να καταστήσουν ένα φυτό ανταγωνιστικό όσο αφορά φαινόμενα αλληλοπάθειας. Εκτός από τα πτητικά τερπενοειδή, και πολλά υδατοδιαλυτά φαινολικά, όπως απλές φαινόλες, υδροξυβενζοϊκά οξέα και υδροξυκιναμωμικά οξέα ενδέχεται σύμφωνα με μελέτες να συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών ως αλληλοπαθητικοί παράγοντες (**Strack, 1997**). Μία σημαντικότερη λειτουργία των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων είναι ο ρόλος τους στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού (**Dixon & Paiva, 1995**). Συνθήκες καταπόνησης, όπως έντονη υπεριώδης ακτινοβολία, μόλυνση ή τραυματισμός επάγει τη βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων. Έτσι, περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο για την περιεκτικότητα του κάθε φυτού σε φαινολικά. Οι φαινόλες φαίνεται πως συνεισφέρουν στην αντοχή των φυτών σε ασθένειες με δύο τρόπους: με απευθείας τοξική επίδραση (π.χ. ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται από πρόδρομες λιγνίνες) και με άμεση μηχανική παρεμπόδιση της εισβολής (**Bennet & Wallsgrove, 1994; Strack, 1997**).

Οι φυτοαλεξίνες, που παράγονται στα φυτά μετά από μικροβιακή επίθεση, μπορεί να αποτελούνται και από φαινόλες. Οι πιο σημαντικές φαινολικές φυτοαλεξίνες είναι οι υδροξυκουμαρίνες και τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, αλλά και τα φλαβονοειδή παίζουν κάποιο ρόλο στην άμυνα (**Strack, 1997**).

Η σύνθεση των φαινολών επάγεται από το φως και την υπεριώδη ακτινοβολία (**Dixon & Paiva, 1995**). Μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* που δεν είχαν τη δυνατότητα να συνθέτουν φαινόλες εμφάνισαν μεγαλύτερη οξειδωτική καταστροφή από υπεριώδη ακτινοβολία (**Landry et al., 1995**).

Επίσης, η σύνθεση των φλαβονοειδών και των άλλων φαινολικών επάγεται στους φυτικούς ιστούς κατά τη μόλυνση ή τραυματισμό από παθογόνους οργανισμούς ή φυτοφάγα (**Dixon & Paiva, 1995; Strack, 1997**). Χλωρογενικό οξύ και φερουλικό εστέρες δρουν απευθείας σαν αμυντικές ουσίες ή σαν πρόδρομοι άλλων προστατευτικών ουσιών, όπως τανινών και λιγνινών.

Τέλος, άλλες καταστάσεις στρες, όπως θερμοκρασίας και λίπανσης επάγουν ή περιορίζουν τη σύνθεση των φαινολών. Χαμηλά ποσοστά σιδήρου αυξάνουν τα ποσοστά φαινολικών οξέων (**Dixon & Paiva, 1995**), ενώ χαμηλά ποσοστά αζώτου αυξάνουν την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή.

Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των φαινολικών ενώσεων

Οι περισσότερες φλαβόνες και φλαβονόλες εμφανίζουν δύο κύριες ζώνες απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους/ορατού. Η ζώνη I εμφανίζεται στην περιοχή 320-385nm και αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του δακτυλίου B του φλαβονοειδούς, ενώ η ζώνη II εμφανίζεται στην περιοχή 250-285nm και αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του A δακτυλίου (Mabry et al, 1970). Θεωρητικά, αύξηση του αριθμού των υδροξυλίων και στους δύο δακτυλίους προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση στις αντίστοιχες ζώνες. Η απουσία του υδροξυλίου της θέσης 3 στις φλαβόνες, μετατοπίζει υψιχρωμικά την απορρόφηση της ζώνης I κατά 20-30nm σε σχέση με τις αντίστοιχες φλαβονόλες. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία του υδροξυλίου αυτής της θέσης επεκτείνει τη συζυγία του B δακτυλίου προκαλώντας έτσι την απορρόφηση της ζώνης I σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Οι φλαβανόνες και φλαβανόλες έχουν έναν κορεσμένο ετεροκυκλικό C δακτύλιο και αυτή η έλλειψη σύζευξης μεταξύ των δακτυλίων A και B, σε αντίθεση με τις φλαβόνες και φλαβονόλες, έχει σαν αποτέλεσμα καθολική διαφοροποίηση στην απορρόφηση UV, καθώς και μειωμένη αντιοξειδωτική δύναμη. Η απορρόφηση τους χαρακτηρίζεται από ένα μέγιστο (ζώνη II) στα 270-285nm, ενώ η ζώνη I εμφανίζεται μόνο σαν ένας 'ώμος' περίπου στα 325nm (Mabry et al, 1970). Η ζώνη I στις ανθοκυανίνες εμφανίζεται στα 450-560nm λόγω του υδροξυλιωμένου κινναμωμικού συστήματος του B δακτυλίου (Mabry et al; 1970).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα έχουν διαφορετικές απορροφήσεις ανάλογα με τις θέσεις υδροξυλίωσης. Τα *p*- μονο-υποκατεστημένα, και τα *p*-,*m*- τρι-υποκατεστημένα, έχουν μία απλή απορρόφηση από τα 255-278nm, ανάλογα με τον τύπο της υποκατάστασης. Αντίθετα τα *p*-, *m*- δι-υποκατεστημένα, όπως το βανιλικό και το πρωτοκατεχικό οξύ, εμφανίζουν δύο μέγιστα στην απορρόφηση τους: μία πρώτη ζώνη χαμηλής έντασης περίπου στα 290nm και μία δεύτερη, κύρια περίπου στα 260nm.

Τα *p*- και *m*-, *p*- υποκατεστημένα υδροξυκινναμωμικά οξέα γενικά εμφανίζουν απορρόφηση με μία κύρια κορυφή από 310-325nm με έναν ώμο στα 290-300nm. Αν το καρβοξύλιό τους είναι δεσμευμένο (γλυκοζυλιωμένο ή εστεροποιημένο), η απορρόφηση μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος κατά 10-15nm περίπου. Τα *o*- υποκατεστημένα παράγωγα εμφανίζουν τελείως διαφορετικό φάσμα απορρόφησης με μία κύρια απορρόφηση περίπου στα 275nm και μία χαμηλότερης έντασης ζώνη στα 325nm περίπου.

Αντιοξειδωτική δράση των φαινολών

Οι φαινόλες, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης E, έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro* ως σαρωτές υπεροξειδικών ριζών, διακόπτοντας την αλυσίδα των οξειδώσεων. Επίσης φαινόλες που φέρουν υδροξύλια, μπορούν να δεσμεύσουν ιόντα μεταβατικών μετάλλων, (ιδίως σίδηρο και χαλκό), έτσι ώστε να εμποδίσουν την έναρξη δημιουργίας ελευθέρων ριζών (Rice-Evans et al., 1996; Shahidi et al., 1992).

Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

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

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

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



RO• : ελεύθερη ρίζα

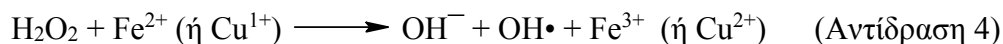
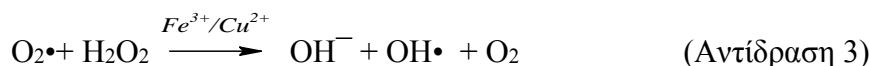
PPH : πολυφαινολική ένωση

PP• : φαινολική ρίζα

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



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



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

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

Αντιοξειδωτική δύναμή των φλαβονοειδών και διαφοροποιήσεις αυτής ανάλογες με τη δομή των μορίων.

Τα φλαβονοειδή, όπως αναφέρθηκε είναι ενώσεις που έχουν πολύ αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, η οποία επιβεβαιώνεται με διάφορες μετρήσεις. Τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι δρουν σαν σαρωτές οξειδωτικών ειδών, π.χ. υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ρίζα υδροξυλίου και υπεροξειδικές ρίζες. Αυτό οφείλεται στο χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό τους που τα καθιστά ικανά να ανάγουν οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες φλαβονοειδών (Pieta, 2000).

Αντιοξειδωτικά σε λιπόφιλα συστήματα

Πολλά φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (ενζυμική ή μη ενζυμική) (Cos et al., 2001). Τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι ευνοούν τη σταθερότητα λιπαρών οξέων, λιπιδίων, ελαίων και λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας εμποδίζοντας την οξείδωσή τους (Terao et al., 1994). Οι πολυφαινόλες ως αντιοξειδωτικά σε αυτές τις περιπτώσεις εικάζεται ότι δρουν: α) σχηματίζοντας χηλικά με τα ιόντα χαλκού μέσω ο-διϋδροξυ φαινολικών δομών β) σαρώνοντας ρίζες σαν δότες ηλεκτρονίων, ή τέλος γ) αναγεννώντας την α-τοκοφερόλη μέσω αναγωγής της αντίστοιχης ρίζας.

Η ρίζα που σχηματίζεται από την αντίδραση ενός φαινολικού αντιοξειδωτικού με μία λιπιδική ρίζα σταθεροποιείται από την κίνηση των π ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό δακτύλιο. Η ο-διϋδρόξυ υποκατάσταση στον Β δακτύλιο του φλαβονοειδούς είναι πολύ σημαντική για τη σταθεροποίηση της ρίζας που

δημιουργείται. Αυτός ο τύπος αντίδρασης κυρίως ισχύει για αλειφατικές υπεροξειδικές ρίζες που αντιδρούν με φαινολικά αντιοξειδωτικά.

Η συγκριτική μελέτη σε ένα μεγάλο εύρος φλαβονών και φλαβονολών σε σχέση με την ικανότητά τους να περιορίζουν την οξείδωση των λιπών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ιδανική αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται με τα δομικά χαρακτηριστικά του φλαβονοειδούς (**Hudson, 1983**). Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι στην καλύτερη δράση συμβάλλουν οι πολλαπλές φαινολικές ομάδες, ειδικά η ο-διϋδροξυ υποκατάσταση στον Β δακτύλιο και η παρουσία της καρβονυλομάδας στον C δακτύλιο. Σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική δράση σε υδρόφιλη φάση, ο διπλός 2,3 δεσμός εμφανίζεται λιγότερο σημαντικός, αφού η ταξιφολίνη είναι περισσότερο αποτελεσματική από το ακόρεστο ανάλογό της κερκετίνη.

Η κατεχίνη, στην οποία απουσιάζει η καρβονυλομάδα στην 4 θέση, καθώς και ο διπλός 2,3 δεσμός είναι επίσης σχετικά αναποτελεσματική. Η παρουσία υδροξυλίων στις θέσεις 3 και 5 παίζει σημαντικό ρόλο επίσης στα λιπόφιλα συστήματα. Έτσι η λουτεολίνη, από την οποία απουσιάζει το υδροξύλιο στην 3-θέση εμφανίζεται λιγότερο αποτελεσματική από την κερκετίνη και άλλες συναφείς δομές. Πάντως, δεν είναι απολύτως σαφές εάν η αντιοξειδωτική ικανότητα σε λιπόφιλα συστήματα εξαρτάται αποκλειστικά από την προσφορά των υδρογόνων, ή και από το βαθμό υδροφοβίας που έχουν σε σχέση με τους στόχους.

Αντιοξειδωτικά σε υδρόφιλα συστήματα

Τα περισσότερα φλαβονοειδή εμφανίζουν εξαιρετικά αξιόλογη αντιοξειδωτική δύναμη σε υδρόφιλα συστήματα σε σχέση με πρότυπες ενώσεις. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποια δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τη δράση τους.

Συγκριτική μελέτη που έγινε σε 3,5,7,3',4'- πενταϋδροξυ- πολυφαινολικά συστήματα με τη δοκιμή TEAC, έδειξε ότι η κερκετίνη, η οποία στη δομή της περιέχει τον διπλό 2,3 δεσμό και την καρβονυλομάδα στην θέση 4, εμφανίζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δύναμη, παρόμοια με αυτή της κυανιδίνης με έναν κεντρικό δακτύλιο C ανθοκυανιδίνης, που επιτρέπει τη σύζευξη. Αντίθετα, η κατεχίνη με κορεσμένο κεντρικό δακτύλιο C εμφανίζει σχεδόν τη μισή αντιοξειδωτική δύναμη (**Rice-Evans, 1995**).

Η γλυκοσυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα άγλυκα (**Shahidi & Wanasundara, 1992**). Έτσι για παράδειγμα η ρουτίνη έχει μειωμένη δράση σε σχέση με την κερκετίνη. Φαίνεται λοιπόν ότι το μέγιστο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα προκύπτει από το συνδυασμό της παρουσίας του υδροξυλίου στη θέση 3, τον διπλό 2,3 δεσμό και την παρουσία της καρβονυλομάδας στη θέση 4. Αυτό το σύστημα επιτρέπει την κίνηση των ηλεκτρονίων προς τον Α δακτύλιο, καθιστώντας τη δομή ενεργή. Επίσης, φαίνεται ότι η ο-διφαινολική διάταξη του Β δακτυλίου ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε

σύγκριση με διατάξεις που περιέχουν μία μόνο υδροξυλομάδα (**Rice-Evans, 1996**). Η προσθήκη και τρίτου υδροξυλίου στον Β δακτύλιο δεν επηρεάζει τη δράση σε σχέση με την Ο-δифαινολική διάταξη. Υπολογίζεται ότι η συμμετοχή του 3',4'-διυδροξυ συστήματος του Β δακτυλίου στην ολική αντιοξειδωτική δύναμη είναι περίπου 25%. Τέλος, φαίνεται πως και η παρουσία του 5-OH σε συνδυασμό με την παρουσία 4-καρβονυλο συστήματος είναι σημαντική (**Rice-Evans, 1996**).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η κερκετίνη, η οποία πληροί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις, είναι από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά ανάμεσα στα φλαβονοειδή που απαντάμε στη φύση.

Αντιοξειδωτική δύναμή των φαινολικών οξέων και διαφοροποιήσεις αυτής ανάλογες με τη δομή των μορίων.

Η αντιοξειδωτική δύναμη των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλίων που φέρουν στο μόριό τους (**Dziedzic & Hudson, 1983**). Η ηλεκτραρνητικότητα της καρβοξυλικής ομάδας στα βενζοϊκά οξέα, έχει αρνητική επίδραση στην ικανότητα προσφοράς υδρογόνων από τα φαινολικά υδροξύλια, μειώνοντας έτσι την αναγωγική δύναμη του μορίου. Κατά συνέπεια, τα υδροξυλιωμένα κινναμωμικά παράγωγα είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά σε σύγκριση με τα απλά βενζοϊκά.

Υδροξυβενζοϊκά οξέα.

Τα μονο-υδροξυλιωμένα βενζοϊκά οξέα στις θέσεις *όρθο*- και *πάρα*- δεν εμφανίζουν καμία αντιοξειδωτική δύναμη, όσο αφορά την ικανότητά τους να λειτουργούν σαν δότες υδρογόνων ώστε να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Τα *μέτα*-υδροξυ βενζοϊκά οξέα όμως, εμφανίζουν κάποια αντιοξειδωτική δύναμη. Αυτό έχει να κάνει με την ηλεκτραρνητικότητα της καρβοξυλομάδας, η οποία επηρεάζει τις *όρθο*- και *πάρα*- θέσεις του βενζολικού δακτυλίου, αλλά όχι και τις θέσεις *μέτα*-. Παρόλα αυτά, τα μονο-υδροξυβενζοϊκά οξέα εξουδετερώνουν αποτελεσματικά ρίζες υδροξυλίου, λόγω της αυξημένης τάσης τους προς υδροξυλίωση. Εάν προστεθεί μία μεθυλενική ομάδα μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου και του καρβοξυλίου, τότε τα *όρθο*- και *μέτα*- υδροξυ παράγωγα εμφανίζουν κάποια αντιοξειδωτική δράση, ενώ τα *πάρα*- υδροξυ παράγωγα εξακολουθούν να είναι ανενεργά.

Τα διυδροξυβενζοϊκά παράγωγα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δύναμη ανάλογα με τη σχετική θέση των υδροξυλίων στο δακτύλιο. Διυδροξυλίωση στις *όρθο*- κι *μέτα*-θέσεις δίνουν αντιοξειδωτική δύναμη χαμηλή, αλλά κάπως ισχυρότερη από διυποκατεστημένα παράγωγα στις *μέτα*- και *πάρα*- θέσεις (πρωτοκατεχικό οξύ), ενώ η ικανότητά τους ουσιαστικά δεν αλλάζει με διυποκατάσταση στις *όρθο*- θέσεις. Η παρεμβολή ενός μεθυλενίου μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου και της καρβοξυλομάδας περιορίζει την ηλεκτραρνητική επίδραση του καρβοξυλίου και σχεδόν διπλασιάζει την αντιοξειδωτική δύναμη των μορίων (**Rice-Evans, 1996**).

Το γαλλικό οξύ, δηλαδή 3,4,5-τριϋδρόξυ βενζοϊκό οξύ είναι το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό ανάμεσα στα βενζοϊκά οξέα, καθώς έχει δύο *μέτα*- υδροξύλια στο μόριό του. Η μεθοξυλίωση στις *μέτα*- θέσεις μειώνει την αντιοξειδωτική δύναμη, όμως και πάλι είναι μεγαλύτερη από του *p*-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Rice-Evans, 1996). Είναι ενδιαφέρον ότι το γαλλικό οξύ δεν εμφανίζει καμία αντιοξειδωτική δράση σε λιπόφιλα συστήματα (Choibi et al, 1991).

Υδροξυκιναμωμικά Οξέα.

Από τα πιο διαδεδομένα φαινυλοπροπανοειδή στη φύση είναι τα υδροξυκιναμωμικά οξέα. Το κιναμωμικό οξύ εμφανίζει μηδενική αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ το *p*-υδροξυ κιναμωμικό οξύ εμφανίζει σαφώς μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, λόγω των αναγωγικών ιδιοτήτων της υδροξυλο-ομάδας. Οι *όρθο*- και *μέτα*- μονοϋποκαταστάσεις προκαλούν μείωση της αντιοξειδωτικής δύναμης. Η πρόσληψη ενός ακόμα υδροξυλίου, όπως στο καφεϊκό οξύ, μειώνει την αντιοξειδωτική δύναμη, ακόμα περισσότερο και από το αντίστοιχο φαινυλοξικό οξύ. Αυτή η διαπίστωση έχει προφανώς να κάνει με την ικανότητα των δύο υποκαταστατών COOH-CH=CH- και COOH-CH₂- να έλκουν ηλεκτρόνια και τη σχέση που έχει αυτό με τον αριθμό και τις θέσεις των υδροξυλίων στον αρωματικό δακτύλιο. Γι' αυτόν τον λόγο φαίνεται ότι η μονο-υποκατάσταση στα κιναμωμικά οξέα είναι περισσότερο αποτελεσματική από τα φαινυλοξικά οξέα.

Αντίθετα, η προσθήκη ενός επιπλέον υδροξυλίου έχει αντίθετα αποτελέσματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα λοιπόν του καφεϊκού οξέος είναι παρόμοια με αυτή του πρωτοκατεχοϊκού και η μεθυλίωση του 3- υδροξυλίου του καφεϊκού (φερουλικό) ενισχύει την δράση. Γλυκοσυλίωση του καρβοξυλίου δεν επηρεάζει τη αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου (Rice-Evans, 1996).

Σε λιπόφιλα συστήματα όμως το καφεϊκό και το πρωτοκατεχικό εμφανίζονται σχετικά αποτελεσματικά σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μονο-υδροξυ υποκατεστημένα οξέα. Επίσης σε αυτά τα συστήματα το φερουλικό οξύ είναι κατά 150% αποτελεσματικότερο από το καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ (Miller et al., 1995).

Άλλες δράσεις που αποδίδονται στις φυσικές φαινόλες

Τα φλαβονοειδή είναι αποδεδειγμένο ότι δρουν σαν αντιοξειδωτικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Εφόσον λοιπόν τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να σαρώνουν επιθετικές ρίζες έχουν γενικότερη ευεργετική επίδραση στον οργανισμό και θεωρείται ότι προλαμβάνουν ασθένειες που η γένεσή τους σχετίζεται, έστω και εν μέρει, με επιθετικές μορφές ελευθέρων ριζών. Έτσι λοιπόν φαίνεται, ότι τα φλαβονοειδή έχουν προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης καρκίνου (LeMarchand, 2002; Le Marchand et al., 2000), την αρτηριοσκλήρυνσης (Aviram & Fuhrman, 2002) και καρδιοπαθειών (Mojzisova & Kuchta, 2001). Επίσης, είναι από διάφορες μελέτες γνωστό, ότι καθυστερούν την εμφάνιση των συμπτωμάτων του διαβήτη II και βελτιώνουν την κατάσταση των ασθενών (Ramana et al.; 2006; Srivastava et al., 2005; Aquilano et al., 2007).

Αναστολή ενζύμων

Τα φλαβονοειδή έχει δειχτεί πειραματικά, τουλάχιστον *in vitro*, ότι επηρεάζουν σημαντικά ενζυμικά συστήματα των ανώτερων οργανισμών και η δράση τους ποικίλει ανάλογα με τη δομή τους. Συγκεκριμένα, με μελέτες δομής-δράσης των φλαβονοειδών αποδείχθηκε ότι κάποια από αυτά έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν σημαντικά ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Βρέθηκε ότι ο διπλός C2,3-δεσμός, η C4-κετο-ομάδα και το 3',4',5'-τρι-ϋδροξυ σύστημα του Β-δακτυλίου είναι χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που έχουν ισχυρή ικανότητα αναστολής της οξειδάσης του NADPH.

Επίσης, κάποια φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, το οποίο καταλύει την οξείδωση της ξανθίνης και υποξανθίνης σε ουρικό οξύ. Κατά την επανα-οξείδωση της οξειδάσης της ξανθίνης παράγονται υπεροξειδικές ρίζες και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Έχει βρεθεί ότι η κερκετίνη και διάφορα άλλα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικοί αναστολείς του ενζύμου.

Επίσης φαίνεται ότι φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δράση και άλλων ενζύμων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, όπως της υαλουρονιδάσης (Kuppusamy et al., 1990), της πρωτεϊνικής κινάσης C (Ferriola et al., 1989), της λιποξυγενάσης, της κυκλο-οξυγενάσης (Yamamoto et al., 1984), της αναγωγάσης της αλδόζης (Varma et al., 1977) κ.α

Δράση κατά καρδιαγγειακών παθήσεων

Τα αντιοξειδωτικά φλαβονοειδή που βρίσκονται σε καρπούς, λαχανικά, τσάι, κρασί κ.α., έχει βρεθεί από πολλές μελέτες ότι *in vitro* παρεμποδίζουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Οι Frankel και συν., 1993α έδειξαν ότι το κόκκινο κρασί παρεμποδίζει την επαγόμενη από χαλκό οξείδωση της LDL σε ποσοστό ανάλογο με την καθαρή κερκετίνη, και σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από την α-τοκοφερόλη. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι, τα μη αλκοολικά συστατικά του κρασιού είναι υπεύθυνα για τη δράση αυτή. Στις περισσότερες χώρες, η υψηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπών σχετίζεται με την υψηλή θνησιμότητα του πληθυσμού από καρδιαγγειακές παθήσεις. Όμως, στην περίπτωση χωρών με υψηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών και ταυτόχρονα κόκκινου κρασιού παρατηρείται χαμηλή θνησιμότητα από αυτά τα αίτια, αυτό που ονομάζεται «Γαλλικό παράδοξο». Η παρατήρηση αυτού του φαινομένου αποδίδεται στο υψηλό ποσοστό φαινολών του κόκκινου κρασιού, το οποίο περιέχει κατεχίνες, γαλλικό οξύ, επικατεχίνη, ρουτίνη, κερκετίνη, μυρικετίνη, καφεϊκό οξύ, κυανιδίνη, ρεσβερατρόλη και άλλες φαινόλες σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Frankel et al., 1993β). Πολλές από αυτές, όπως η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και η επικατεχίνη, αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί αναστολείς της οξείδωσης της LDL, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το ρίσκο για καρδιαγγειακές νόσους (Frankel et al., 1993β).

Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν επίσης αξιόλογες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας τις οδούς της κυκλο-οξυγενάσης και 5-λιποξυγενάσης του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Πολλά φλαβονοειδή, όπως η σαντίνη (3,6,4'-τρι-μεθυλο καιμφερόλη), η 6-υδροξυ-, 3,6-διμεθυλο καιμφερόλη, η υπολαετίνη (8-υδροξυ-λουτεολίνη), κ.α. ανέστειλαν σε μεγάλο βαθμό και τα δύο ένζυμα (**Williams et al., 1995, 1999**).

Επίσης, ανθοκυανίνες ελέγχθηκαν σχετικά με την αντιφλεγμονώδη ικανότητά τους, αφού υπήρχαν αναφορές ότι, η κατανάλωση κερασιών μειώνει τους πόνους που προκαλούνται σε ασθενείς με αρθρίτιδα. Βρέθηκε ότι, οι ανθοκυανίνες δεν είχαν καμία δράση, όμως το μη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή τους, η κυανιδίνη, ανέστειλε αποτελεσματικά τα ένζυμα σύνθεσης 1 και 2 των προσταγλανδινών (PGHS: prostaglandin endoperoxide hydrogen synthase) (**Wang et al., 1999**). Αντιφλεγμονώδη δράση σε διάφορα πειραματικά συστήματα εμφάνισαν επίσης συγκεκριμένοι γλυκοζίτες της κερκετίνης (**Recio et al., 1995**), το άγλυκο (**Shoskes, 1998**) και η απιγενίνη (**Koganov et al., 1999**).

Αγγειακές δράσεις των φλαβονοειδών

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

Κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των φλαβονοειδών

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

- Επίδραση στη σύνθεση του DNA
- Επίδραση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- Επίδραση στη δέσμευση των μεταλλαξιγόνων στο DNA
- Αντιοξειδωτική-Χημειοπροστατευτική Δράση
- Παρεμπόδιση της νιτροσυλίωσης
- Αναστολή ή επαγωγή των ενζύμων μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών

Υπάρχουν πολλές μελέτες που ασχολούνται με τις κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ιδιότητες συστατικών των φυτών, ιδιαίτερα των φυτών που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό στην παραδοσιακή ιατρική πρακτική. Αυτό οδήγησε στην απομόνωση συγκεκριμένων ουσιών που έχουν αξιόλογη δράση.

Το γεγονός της ύπαρξης μεγάλης ετερογένειας στην παθοφυσιολογία και μοριακή βιολογία του καρκίνου οδήγησε στη χρησιμοποίηση διαφόρων κυτταρικών σειρών καρκινικών κυττάρων ως πρότυπων συστημάτων μελέτης αντικαρκινικής δράσης των ουσιών. Η ποικιλία που εμφανίζουν από άποψη ιστικής προέλευσης, επιτρέπει την καλύτερη αξιολόγηση σε πειραματικές μελέτες *in vitro*. Με αυτόν τον τρόπο δείχθηκε ότι κάποιες χαλκόνες έχουν μέτρια δράση κατά των P-388 λευχαιμικών κυττάρων (**Wang et al, 1998**). Επίσης, δώδεκα κυτταροτοξικά φλαβονοειδή: επτά φλαβάνες, τρεις φλαβόνες και δύο διφλαβάνες απομονώθηκαν από τις ρίζες του φυτού *Muntingia calabura* (**Kaneda et al., 1991**).

Επιπρόσθετα, διάφορες φλαβόνες και φλαβονόλες βρέθηκε ότι διαθέτουν κυτταροτοξικές ιδιότητες αναστέλλοντας την κυτταρική ανάπτυξη αρκετών σειρών καρκινικών κυττάρων (**Silva et al., 1995; Wall et al., 1994; Liu et al., 1990**). Σ' αυτήν την κατεύθυνση αναφέρεται επίσης ότι η απιγενίνη εμποδίζει την αγγειογένεση στον ανθρώπινο καρκίνο των πνευμόνων, αφού βρέθηκε ότι αναστέλλει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (VEGF Vascular Endothelial Growth Factor) και του επαγόμενου από υποξία παράγοντα (HIF-1 Hypoxia- Inducible Factor) (**Liu et al., 2005**). Παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι πολυφαινόλες, και κυρίως η κερκετίνη, αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος μέσω επαγωγής της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (**Mouria et al., 2002**).

Τέλος, πολλές ουσίες φυσικής προέλευσης επάγουν την απόπτωση, ένα στοιχείο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού σήμερα η μελέτη των μηχανισμών απόπτωσης και συνακόλουθα της επαγωγής τους στα καρκινικά κύτταρα, αποτελεί έναν από τους πιο ελπιδοφόρους στόχους ανάπτυξης καινοτόμων και εξειδικευμένων φαρμάκων για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου (**Gunji et al., 1991**).

Άλλες αναφερόμενες δράσεις των φλαβονοειδών

Πολλά φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιϊικές ιδιότητες (**Cushnie & Lamb, 2005**), ηπατοπροστατευτικές (**Middleton & Kandaswami, 1994**) και αντισπασμολυτικές (**Middleton & Kandaswami, 1994**).

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ROSACEAE

Η οικογένεια των Rosaceae ανήκει στην κλάση *Magnoliata*, υποκλάση *Rosidae*, και υπεριοικογένεια *Rosanae* (δικότυλα, αγγειόσπερμα) είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια, γνωστή και ως η οικογένεια των ρόδων, από ανθοφόρα φυτά και συμπεριλαμβάνει περίπου 2.830 είδη σε 95 γένη.

Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από το γένος της *Rosa*. Μεταξύ των πιο πλούσιων σε είδη γένη των Rosaceae είναι το *Alchemilla* (270 είδη), το *Sorbus* (260 είδη), το *Crataegus* (260 είδη), το *Cotoneaster* (260 είδη), και το *Rubus* (250 είδη), αλλά το μεγαλύτερο γένος από όλα είναι το *Rubus* (περιλαμβάνει τις δαμασκηνιές, κερασιές, ροδακινιές, βερικοκιές και αμυγδαλιές) με περίπου 430 είδη.

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

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



Εικόνα 5: άνθος από *Rosa arvensis*

Τα φυτά της οικογένειας των Rosaceae μπορεί να είναι βότανα, θάμνοι ή δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, αλλά μερικά είναι αιιθαλή.

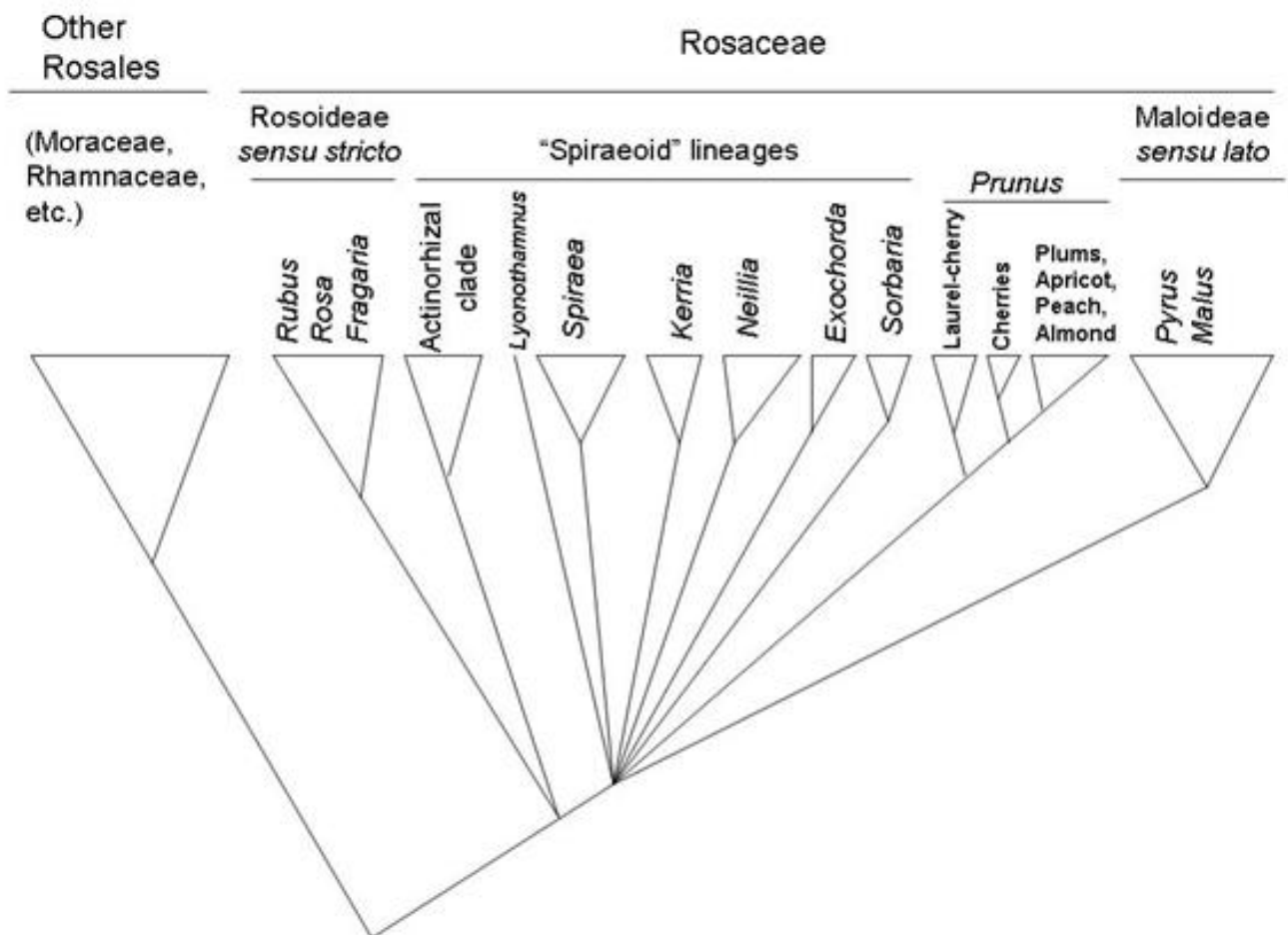
Πολλά οικονομικά σημαντικά προϊόντα προέρχονται από τα φυτά της Rosaceae, συμπεριλαμβανομένων πολλών βρώσιμων φρούτων (όπως μήλα, αχλάδια, κυδώνια, βερικόκα, δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βατόμουρα, μούσμουλα, και

φράουλες), των αμυγδάλων καθώς και καλλωπιστικών δέντρων και θάμνων (όπως τριαντάφυλλα , meadowsweets , photinias , firethorns , σορβιές , και hawthorns).

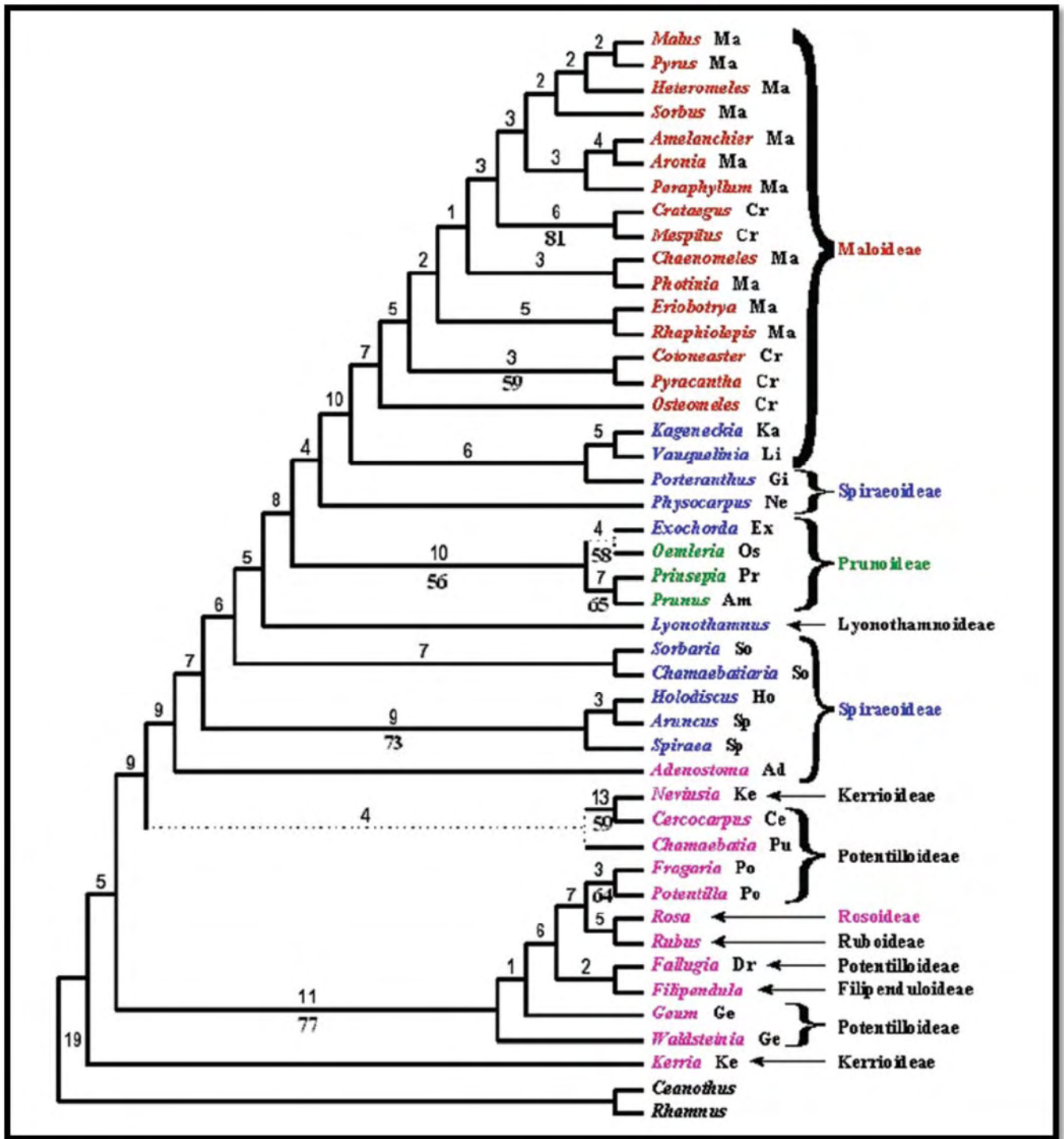
Τα φυτά Rosaceae αν και μπορούν να βρεθούν σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης, ευημερούν κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και σε περιοχές που δεν έχουν έρημο ή τροπικά δάση.

Ταξινόμηση

Η οικογένεια παραδοσιακά χωρίζεται σε 6 υποοικογένειες : Rosoideae, Spiraeoideae , Maloideae (Pomoideae), Amygdaloideae (Prunoideae), Neuradoideae και Chrysobalanoideae. Αν και αυτή η κατάταξη αμφισβητείται από πολλούς συγγραφείς. (Kim E. Hummer and Jules Janick, 2009)



Εικόνα 6: κλαδόγραμμα του γένους Rosaceae σύμφωνα με την παραδοσιακή ταξινόμηση



Εικόνα 7: φυλλόγραμμα που παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτών της οικογένειας *Rosaceae*. Για την ταξινόμηση συνδυάστηκε η σύγκριση 125 χαρακτηριστικών (61 μη-μοριακών και 64 μοριακών) (Dickinson et al. (2002)). Τα χρώματα αναπαριστούν τις παραδοσιακά ταξινομημένες υποοικογένειες (κόκκινο = maloideae, μπλέ = spiraeoideae, πράσινο = amygdaloideae, ρόζ = rosoideae). Τα *Ceanothus* και *Rhamnus* αποτελούν την εξω-ομάδα.

Αν και η μοριακή ανάλυση συμφωνεί με παραδοσιακή ταξινόμηση στο γεγονός ότι η οικογένεια *Rosaceae* είναι σθεναρά μονοφυλετική, υπήρξε διαμάχη σχετικά με τις υπο-οικογένειες και τα είδη που περιλαμβάνουν. Έγινε γενετική ανάλυση για να

εξεταστούν φυλλογενετικά τόσο η οικογένεια όσο και κάθε υποοικογένεια ξεχωριστά και τα μεγαλύτερα γένη. Ο **Dickinsonetal. (2002)** δημιούργησε ένα φυλλόγραμμα διαφορετικό από τα ήδη υπάρχοντα. Για το σχηματισμό του, χρησιμοποίησε κλαδική ανάλυση από 125 χαρακτηριστικά που σχετίζονται τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά για τα μέλη της Rosaceae και πρόσθεσε αρκετά γένη στις Maloideae. Το γένος Spiraeoideae το χώρισε με τα Amygdaloideae (Prunoideae) και τα Rosoideae τα υποδιαίρεσε σε επιμέρους φύλα. **(Εικόνα 7)**.

Αν και η ταξινόμηση που έγινε από τον Dickinsonetal για τα φυτά Rosaceae μπορεί να μην ισχύει από ταξινόμική άποψη, αυτή η ομαδοποίηση εξακολουθεί να έχει μεγάλη χρησιμότητα από οικονομικής και γεωπονικής σκοπιάς. Η περαιτέρω μοριακή ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με μεθόδους της βιοπληροφορικής, μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τελική σωστή ταξινόμηση της οικογένειας Rosaceae. **(Kim E. Hummer and Jules Janick, 2009)**

Βιβλιογραφικές αναφορές για τη σύσταση του καρπού, των σπερμάτων, του φλοιού και των φύλλων ειδών της οικογένειας Rosaceae.

Μία έρευνα για το είδος *Sorbus domestica* του **Olschager et al., 2004** αναφέρει την ύπαρξη υδροξυκιναμωμικών οξέων, φλαβονολών, φλαβονολών και ολιγομερών και πολυμερών προανθοκυανιδινών. Η ποιοτική ανάλυση στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε σε καρπούς οικιακής σορβιάς που συλλέχθηκαν στη Γερμανία και εκχυλίστηκαν στη μεθανόλη. Ακολούθησε κατανομή με οξικό αιθυλεστέρα και έτσι αναλύθηκαν σε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα και υδατικό εκχύλισμα. Στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα και σε σύγκριση με πρότυπες ενώσεις ανιχνεύθηκαν χλωρογενικό οξύ, νεοχλωρογενικό οξύ, επικατεχίνη και το φλαβονοειδές κερκετίνη. Επίσης αναφέρεται στο ίδιο δείγμα η παρουσία των διμερών προκυανιδινών B2 και B5, της τριμερούς προκυανιδίνης C1 και μιας τετραμερούς προκυανιδίνης. Στο υδατικό εκχύλισμα επιβεβαιώθηκε η παρουσία των υδρόφιλων πολυμερών προανθοκυανιδινών με συλλογή των επιμέρους κορυφών του χρωματογραφήματος και ανάλυση σε Υγρή χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, όπου χρωματογραφικά χαρακτηριστικά των ουσιών συγκρίθηκαν με βιβλιογραφικά δεδομένα. Οι ενώσεις που αναφέρονται στη συγκεκριμένη εργασία, ήδη είχαν αναφερθεί ως συστατικά του καρπού του μήλου, το οποίο ανήκει και στην ίδια υποοικογένεια με την οικιακή σορβιά (*Maloideae*) **(Treutter, 2001)**.



Εικόνα 8: σορβιά (*Maloideae*)

Επίσης, υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με το συγγενές είδος *S. aucuparia* (rowanberries), το οποίο είναι εξαιρετικά διαδεδομένο στην Ευρώπη. Μάλιστα σε πολλές χώρες είναι καλλιεργούμενο και ο καρπός του είναι εμπορεύσιμος. Ευδοκιμεί στις ίδιες περιοχές με το *S. domestica*, όμως είναι αυτοφυές και στις χώρες της Β. Ευρώπης και στη Σκανδιναβία.

Το είδος *S. aucuparia* έχει συμπεριληφθεί ως φαρμακευτικό φυτό στην 10η Γαλλική Φαρμακοποιεία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των καρπών σε σορβιτόλη. Η σορβιτόλη είναι γνωστό αντιδιαρροϊκό φάρμακο και χορηγείται σε τέτοιες περιπτώσεις και σαν σκεύασμα σε πολλές χώρες (**Brunetton, 1993**).

Σε έρευνα που έγινε σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του χυμού από καρπούς του *S. aucuparia* διαπιστώθηκε η παρουσία 3-O-γαλακτοζίτη της κερκετίνης, 3-O-γλυκοζίτη της κερκετίνης, δύο 3-O-διεξοζιτών της κερκετίνης, πεντοζυλεξοζίτη της κερκετίνης, εξοζυλπεντοζίτη της κερκετίνης και δύο διεξοζιτών της καιμφορόλης. Η συνολική περιεκτικότητα σε αυτά τα φλαβονοειδή που ανιχνεύθηκαν ήταν 291mg/L, ενώ οι διεξοζίτες της κερκετίνης ήταν σε ποσοστό 78% των συνολικών φλαβονοειδών του χυμού. Σε σχέση πάντως με τα φλαβονοειδή, στα δείγματα των χυμών που ελέγχθηκαν, κυρίαρχες φαινόλες ήταν το χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ σε συγκεντρώσεις 544 και 273 mg/L αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συστήματα HPLC- MSn και HPLC-DAD αντίστροφης φάσης (**Gil-Izquierdo & Mellenthin, 2001**).

Σε συγκριτική μελέτη που αφορά την περιεκτικότητα των καρπών έντεκα μικρών οπωροφόρων σε άγλυκα και γλυκοζίτες κερκετίνης, μυρικετίνης και καιμφορόλης, ανιχνεύθηκαν άγλυκα κερκετίνης και καιμφορόλης σε εκχυλίσματα των καρπών *S. aucuparia* μετά από υδρόλυση ώστε να απομακρυνθούν τα σάκχαρα. Επίσης σε ακατέργαστα εκχυλίσματα καρπών διαπιστώθηκε η παρουσία διεξοζίτη της κερκετίνης, δεοξυεξοζυλεξοζίτη της κερκετίνης, εξοζίτη της κερκετίνης και εξοζυλπεντοζίτη της καιμφορόλης. Σε όλες τις περιπτώσεις τα φλαβονοειδή διευκρινίστηκαν από τους χρόνους κατακράτησης σε στήλη αντίστροφης φάσης, τις απορροφήσεις τους στο υπεριώδες – ορατό και τις θραυσματώσεις τους σε συστήματα MS, MS-MS και MS3. Η ταυτότητα των σακχάρων διευκρινίστηκε μετά από την υδρόλυση των ουσιών και στη συνέχεια με έγχυση σε σύστημα GC-MS (**Hakkinen & Auriola, 1998**).

Σε άλλη συγκριτική έρευνα για την περιεκτικότητα 25 εδώδιμων μικρών καρπών στα φλαβονοειδή κερκετίνη, μυρικετίνη και καιμφορόλη, φαίνεται ότι οι καρποί του *S. aucuparia* έχουν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή (μετά από υδρόλυση) και κυρίως σε κερκετίνη (63mg/kg) σε σχέση με άλλους καρπούς. Επίσης διαπιστώθηκε η μεγάλη περιεκτικότητα των καρπών σε βιταμίνη C σε σχέση με άλλους μικρούς καρπούς, όπως τα μυρτίδια και οι φράουλες, αποδεικνύοντας πως ο καρπός είναι μία σημαντική πηγή βιταμίνης C για την καθημερινή διαίτα. Στην ίδια έρευνα ελέγχθηκαν και οι καρποί του υβριδίου του *S. aucuparia* με ένα είδος του

γένους *Crataegus*, που ονομάζεται sweet rowan για το οποίο βρέθηκε ακόμα μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κερκετίνη (85mg/kg), αλλά πολύ μικρότερη σε βιταμίνη C (**Hakkinen et al., 1999**).

Σε μελέτη σχετικά με την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα 19 μικρών καρπών μελετήθηκαν συγκριτικά τα ποσοστά των φλαβονολών, των φαινολικών οξέων, του ελλαγικού οξέος και άλλων υδροξυβενζοϊκών οξέων στο μεθανολικό εκχύλισμα καρπών από αυτοφυή δέντρα *S. aucuparia* και καρπών από καλλιεργούμενα sweet rowans. Η σχετική περιεκτικότητα και των δύο δειγμάτων σε υδροξυβενζοϊκά οξέα, συμπεριλαμβανομένου και του ελλαγικού, ήταν πολύ χαμηλή, ενώ τα υδροξυκιναμωμικά οξέα βρέθηκαν σε πολύ μεγάλες περιεκτικότητες (70.6% και 76.1% του συνολικού περιεχομένου των ουσιών που μελετήθηκαν). Κυρίαρχο οξύ και στις δύο περιπτώσεις ήταν το φερούλικό οξύ (52.6% και 52.7% αντίστοιχα). Τα δύο είδη του γένους *Sorbus* ήταν καρποί που περιείχαν από τα υψηλότερα ποσοστά υδροξυκιναμωμικών οξέων σε σύγκριση με τους άλλους μικρούς καρπούς. Η περιεκτικότητά τους όμως σε φλαβονοειδή ήταν μειωμένη σε σχέση με τα άλλα δείγματα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τους καρπούς *S. aucuparia* ήταν περίπου 200mg/100g ξηρού βάρους καρπών, ενώ για κάποια είδη του γένους *Vaccinium*, η αντίστοιχη τιμή ήταν περίπου 350mg/100g ξηρού βάρους (**Hakkinen et al., 1999**). Η περιεκτικότητα του χλωρογενικού οξέος στους καρπούς είναι ιδιαίτερα υψηλή σε σχέση με άλλα είδη. Το χλωρογενικό οξύ αποτελεί το κύριο φαινολικό συστατικό των καρπών (**Clifford, 1999**).

Και άλλες έρευνες συμφωνούν ότι στους καρπούς του *S. aucuparia* κυριαρχούν τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, χωρίς όμως να λείπουν και οι αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις σε φλαβονοειδή. Οι **Kahkonen et al., 2001** έδειξαν ότι από 26 δείγματα καρπών μικρών οπωροφόρων οι καρποί του *S. aucuparia* είχαν αισθητά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδροξυκιναμωμικά οξέα από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, σχεδόν σε τριπλάσιες τιμές από τα μυρτίδια και τα μήλα και 13 φορές μεγαλύτερες από τις φράουλες. Αλλά και τα ολικά φλαβονοειδή είναι σε αυξημένες συγκεντρώσεις στον καρπό, περίπου 16 φορές περισσότερο από τις φράουλες και 3 φορές περισσότερο από τα μήλα. Τελικά, τα ολικά φαινολικά στον καρπό του *S. aucuparia* ήταν σχεδόν διπλάσια από τα μήλα και περίπου στα ίδια επίπεδα με τα μυρτίδια και τις φράουλες.

Ομοίως και η συγκριτική φυτοχημική μελέτη των **Maata-Riihinen et al., 2004** απέδειξε πως το χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ ήταν από τα κύρια συστατικά των καρπών του *S. aucuparia* σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μικρά οπωροφόρα που ελέγχθηκαν.

Επίσης βρέθηκαν μεγάλα ποσοστά κερκετίνης, ίχνη καιμφερόλης και μικρές ποσότητες ανθοκυανών.

Υβρίδια που δημιουργήθηκαν με διασταυρώσεις του *S. aucuparia* με είδη των γενών *Aronia*, *Mespilus*, *Pyrus* και *Malus* καλλιεργούνται συστηματικά στη Ρωσία και Φιλανδία γιατί αποδείχθηκαν πολύ ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες. Υποκαθιστούν έτσι καρπούς που η καλλιέργειά τους σε τόσο ψυχρά κλίματα δεν είναι δυνατή. Η περιεκτικότητα αυτών των υβριδίων σε φαινολικά ποικίλλει. Πάντως υπάρχουν υβρίδια που καλλιεργούνται σε δυσμενείς συνθήκες που περιέχουν μεγάλα ποσοστά ανθοκυανινών, φλαβονολών και οξέων. Σε όλες τις περιπτώσεις και πάλι ανάμεσα στα οξέα κυριαρχεί το χλωρογενικό. Οι φλαβονόλες είναι γενικά σε χαμηλότερα των οξέων ποσοστά. Οι πιο εντυπωσιακές μεταβολές στη σύσταση αφορούν τις ανθοκυανίνες. Το υβρίδιο bilberry περιέχει 705.3mg ανθοκυανινών/ 100g καρπών, ενώ το υβρίδιο rosina 5.7mg ανθοκυανινών/ 100g καρπών (**Hukkanen et al., 2006**).

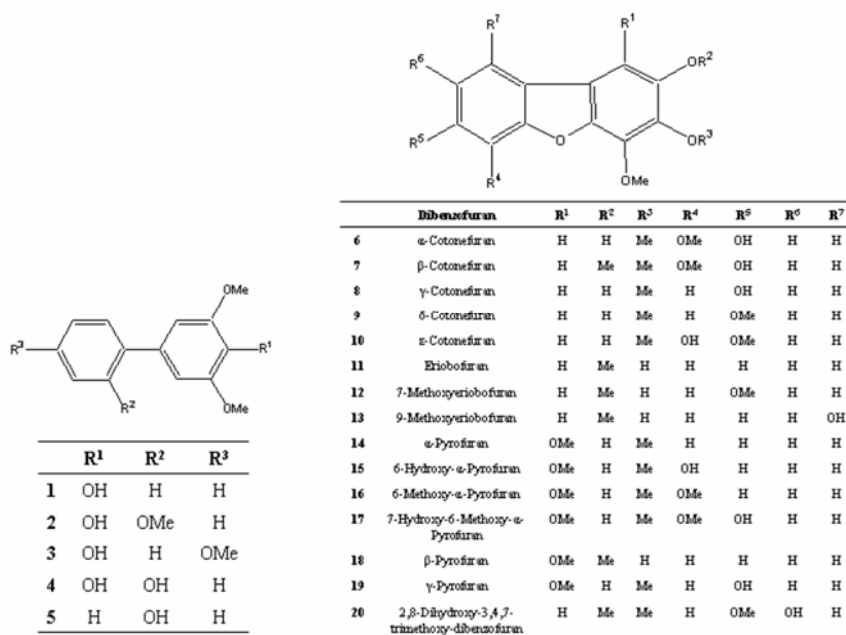
Μελέτες έχουν επίσης ασχοληθεί με τη σύσταση των λιπαρών οξέων από σπέρματα του *S. aucuparia*. Από αυτές προκύπτει ότι από τη σύσταση των λιπαρών των σπερμάτων απουσιάζει εντελώς το α-λινολενικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στους καρπούς όλων των σπερμάτων, ακόμα και σε γένη που ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια *Rosanae*.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό για τα σπέρματα όλων των γενών της οικογένειας *Rosaceae* είναι η πλήρης απουσία γ-λινολενικού οξέος. Αντίθετα η σύσταση του ελαίου χαρακτηρίζεται από τα μεγάλα ποσοστά ολεϊκού οξέος. Βασικό συστατικό του ελαίου είναι επίσης το λινολεϊκό οξύ. Βρέθηκαν επίσης σε μικρότερα ποσοστά παλμιτικό και στεαρικό οξύ (**Johansson et al., 1997**).

Φαίνεται λοιπόν ότι τα σπέρματα της σορβιάς μπορούν να αποτελέσουν μια πλούσια πηγή λιπαρών οξέων, κυρίως ολεϊκού και λινολεϊκού για εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων και την κοσμετολογία.

Από το φλοιό και τα φύλλα διαφόρων ειδών της οικογένειας *Rosaceae* απομονώθηκαν φυτοαλεξίνες που λειτουργούν σαν αντιμυκητιακοί παράγοντες. Η πρώτη φυτοαλεξίνη που απομονώθηκε από την οικογένεια ήταν το βενζοϊκό οξύ από τους φλοιούς και φύλλα των γενών *Malus*, *Pyrus* κ.α..

Σε μεγάλες ποσότητες όμως απομονώθηκαν φυτοαλεξίνες που έχουν δομή διφαινυλίων (**Εικόνα 9, 1-6**) και διβενζοφουρανίων (**Εικόνα 9, 7-20**). Από τα διφαινύλια το πιο γνωστό είναι η αουκουπαρίνη (1) που θεωρείται βασικός παράγοντας της αντιμυκητιακής προστασίας των φυτών *Rosaceae* (**Kokubun et al, 1995; Kokubun & Harborne, 1995**).



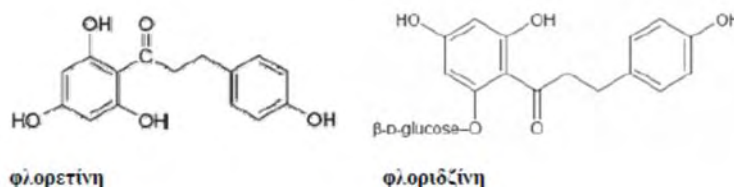
Εικόνα 9: Η αουκουπαρίνη (1) και άλλες φυτοαλεξίνες που απομονώθηκαν από το φλοιό και τα φύλλα του *S. aucuparia*. 1-5: διφαινύλια, 6-20: διβενζοφουράνια (Kokubun & Harborne, 1995).

Φυτοχημικές και φαρμακολογικές αναφορές σχετικά με τη χημική σύσταση των καρπών της οικογένειας *Rosaceae*

Έρευνες διαπίστωσαν την ύπαρξη πολλών φαινολικών στον καρπό του μήλου (*Malus*). Έχουν απομονωθεί εστέρες φαινυλοπροπανοϊκών οξέων με κινικό οξύ, όπως το χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ, που είναι από τα κύρια συστατικά εκχυλισμάτων του μήλου. Ακόμη, έχουν βρεθεί απλά υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως καφεϊκό, φερουλικό, σιναπικό κ.α.. Έχουν επίσης βρεθεί άγλυκα και γλυκοζίτες φλαβονοειδών, κυρίως κερκετίνης και καιμπερόλης. Από τους γλυκοζίτες, βρέθηκαν κυρίως μονογλυκοζίτες και διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Ο καρπός του μήλου είναι πλούσιος σε προκυανιδίνες, ανθοκυάνες, κατεχίνες και επικατεχίνες, ουσίες με ισχυρή αντιοξειδωτική δύναμη (Berregi et al., 2003; Sanchez-Rabaneda et al., 2004; Osmianski et al., 2007; Shoji et al., 2006). Τέλος από ιστοκαλλιέργειες μηλιάς, όπως και της σορβιάς, απομονώθηκαν διφαινύλια και παράγωγα αυτών (φυτοαλεξίνες) (Borejsza-Wysocki et al., 1999).

Μια πολύ ενδιαφέρουσα ένωση και με δράση στο διαβήτη, που απομονώθηκε από τον καρπό του μήλου, είναι η φλορετίνη και ο γλυκοζίτης της φλοριδιζίνης (**Εικόνα 10**) (DeSimon et al., 1992; Crespy et al., 2001). Η φλοριδιζίνη έχει βρεθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικός υπογλυκαιμικός παράγοντας που παρεμποδίζει την απορρόφηση της γλυκόζης στο έντερο μέσω της οδού των συμμεταφορέων νατρίου, όπως και παρεμποδίζει την επαναπορρόφηση της γλυκόζης από τα νεφρά (Boccia et al., 1999). Η φλοριδιζίνη επαναφέρει τη φυσιολογική σχέση της ινσουλίνης με τη γλυκόζη στο

συκώτι και άλλους περιφερικούς ιστούς, όπως φαίνεται σε διαβητικές σειρές εοιμών (Rossetti et al., 1987). Από την άλλη, πειραματική μελέτη αποδεικνύει ότι οι ίδιες ενώσεις μειώνουν δυσλειτουργίες των β-κυττάρων του παγκρέατος σε διαβητικά πειραματόζωα (Rossetti et al., 1987). Τέλος φαίνεται ότι χορήγηση φλοριζιδίνης επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα την ανοχή στη γλυκόζη και την ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ διακοπή της θεραπείας επαναφέρει σταδιακά την κατάσταση ανοχής στην ινσουλίνη (Zhang et al., 1998).



Εικόνα 10: Η φλορετίνη και φλοριδζίνη, φαινολικά συστατικά του καρπού του μήλου. Στην φλοριδζίνη αποδίδονται πολλές φαρμακολογικές ιδιότητες

Σε επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με τα ευεργετικά αποτελέσματα της συστηματικής κατανάλωσης μήλων αναφέρεται ότι γυναίκες που κατανάλωναν συστηματικά τουλάχιστο μια μερίδα, είχαν μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο των πνευμόνων από εκείνες που δεν κατανάλωναν. Αυτή η παρατήρηση έγινε επίσης και για την κατανάλωση κρεμμυδιού, ενώ δεν φαίνεται το ίδιο για άλλα φρούτα ή αφεψήματα, όπως για παράδειγμα το τσάι. Αυτή η δράση τελικά αποδόθηκε στα υψηλά ποσοστά φλαβονοειδών του μήλου και του κρεμμυδιού και κυρίως κερκετίνης (Feskanich et al., 2000; Le Marchand et al., 2000). Ακόμη, καθημερινή κατανάλωση μήλου από γυναίκες βρέθηκε να μειώνει το ρίσκο καρδιαγγειακών παθήσεων κατά 35% περίπου πριν και μετά την εμμηνόπαυση (Sesso et al., 2003). Συστηματική κατανάλωση μήλου έχει επίσης βρεθεί ότι μειώνει την πιθανότητα εμφάνιση βρογχίτιδας και άσθματος και βελτιώνει την λειτουργία των πνευμόνων (Woods et al., 2003; Butland et al., 2000). Η κατανάλωση μήλων έχει επίσης σχετιστεί με μειωμένο ρίσκο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 (Knekt et al., 2002).

Εκχυλίσματα μήλου, κυρίως φλοιών, σε πειραματόζωα έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δύναμη που μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη ηπατικού καρκίνου και καρκίνου του παχέος εντέρου (Wolfe et al., 2003; Eberhardt et al. 2000), ενώ φάνηκε ότι παρεμποδίζουν την λιπιδική υπεροξειδωση (Mabley et al., 2005) ασκώντας θετική επίδραση στη μείωση της χοληστερόλης σε υπερχοληστεροναιμικά πειραματόζωα (Aprikian et al., 2001).

Σε είδη του γένους *Aronia*, συγγενούς του *Sorbus*, που έχουν αναλυθεί σχετικά με το φαινολικό τους περιεχόμενο των καρπών, βρέθηκε πως έχουν αρκετές ομοιότητες στο φυτοχημικό τους περιεχόμενο με τους καρπούς του *Sorbus aucuparia*. Είναι πλούσιοι σε υδροξυκινναμικά οξέα και κυρίως χλωρογενικό και νεοχλωρογενικό οξύ, καθώς και σε κερκετίνη και ανθοκυάνες (Maata-Riihinen et al., 2004). Χυμός από καρπούς της *A. melanocarpa* έδειξε υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικά πειραματόζωα

(Valcheva-Kuzmanoova et al., 2007) και αντίστοιχη αντιυπερλιπιδαιμική δράση σε υπερχοληστεροναιμικά πειραματόζωα (Valcheva-Kuzmanoova et al., 2007).

Φυτά από την οικογένεια Rosaceae που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Τα φυτά της οικογένειας Rosaceae, που παρτίθενται στην συνέχεια, εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Λίγα είναι γνωστά για τα είδη και τα υποείδη των Rosaceae. Αναλυτική βιβλιογραφία υπάρχει κυρίως για φυτά που έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον λόγω της χρήσης τους στην παραδοσιακή εναλλακτική ιατρική, ενώ για τα υπόλοιπα φυτά υπάρχει μεγάλο περιθώριο έρευνας. Επίσης, λόγω του γεγονότος ότι η ταξινόμηση των ειδών και υποείδων της οικογένειας Rosaceae δεν έχει ολοκληρωθεί, η βιβλιογραφία αναφέρει τόσο τον μικρότερο όσο και τον μεγαλύτερο αριθμό υειδών που υπολογίζεται για κάθε γένος.

1. *Pyracantha coccinea*: το είδος αυτό βρίσκεται κυρίως στην Ευρώπη και αποτελεί ένα καλλωπιστικό φυτό που καλλιεργείται στους κήπους από τον 16ο αιώνα. Ανήκει στο γένος των Πυράκανθων (επιστημονική ονομασία: *Pyracantha*) είναι γένος μεγάλων αγκαθωτών αειθαλών θάμνων, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Ροδοειδών. Είναι ενδημικά φυτά της Ασίας και της νοτιοανατολικής Ευρώπης. Φτάνει σε ύψος περίπου τα τέσσερα με έξι μέτρα. Έχει λευκά άνθη την άνοιξη και κόκκινους καρπούς, οι οποίοι παραμένουν πάνω στο φυτό καθ' όλη τη διάρκεια του χειμώνα (Εικόνα 11). Οι καρποί είναι μη τοξικοί και μπορούν να γίνουν μαρμελάδες, ζελέ και γλυκό αλλά είναι αδύνατο να καταναλωθούν ωμοί λόγω της πικρής γεύσης τους. Τα φύλλα είναι μικρά ωειδή και έχουν κοντούς μίσχους. Είναι κοινό διακοσμητικό φυτό και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ψηλών και αδιαπέραστων φρακτών. Είναι ανθεκτικό στο ψύχος, την ξηρασία και τα ασβεστώδη εδάφη.



Εικόνα 11: άνθη από *Pyracanthacoccinea*

2. *Pyrus spinosa*: Φυλλοβόλο, αγκαθωτό δέντρο, που φτάνει τα 6 μέτρα ύψος. Τα νεαρά κλαδιά στην αρχή έχουν λευκές τρίχες, αργότερα όμως είναι γυμνά. Τα φύλλα είναι πράσινα επάνω και γαλαζωπά κάτω. Τα άνθη είναι λευκά. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες θέσεις και απαντάται σε ξέφωτα δασών, περιθώρια χωραφιών και δίπλα σε δρόμους. Η γκορτσιά (κοινή ονομασία) είναι ένα παμπάλαιο ελληνικό δέντρο. Ο καρπός (γκόρτσι) είναι σφαιρικός με χρώμα κιτρινοκάστανο και αρκετά στυφός, που όμως γίνεται νοστιμότατο γλυκό (**Εικόνα 12**) Εξαιρετικά ανθεκτικό είδος, ανταπεξέρχεται πολύ καλά σε κάθε είδους υπόστρωμα, με προτίμηση σε pH ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο. Οι γνωστές φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι :
- Αιμοστατικό, κατά της δυσπεψίας, κατά της διάρροιας, ψυκτικό, αντισπασμωδικό, ευεργετικό στις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και στην οδοντική δυσμηνόρροια.
- Γνωστά συστατικά και ουσίες του είναι: Οξέα φρούτων: μαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, κουϊνικό οξύ, κυανογενικά γλυκοσίδια (αμυγδαλίνη), αρωματικές ουσίες, παράγωγα του καφεϊκού οξέος και κυρίως 5-κοφεοϋλ-κουϊνικό οξύ, πηκτίνη.



Εικόνα 12: καρπός από *Pyrus spinosa*

3. *Rosa canina*: Το βότανο *Rosa canina* (Ροδή η κυνοροδή) ανήκει στην οικογένεια των Ροδοειδών. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες του φυτού. Τα αυτοφυή είδη στη χώρα μας υπολογίζονται σε 25 εκ των οποίων τα πιο αξιόλογα είναι η Αειθαλής (το κυνόσβατο του Διοσκουρίδη), η κανθοδεστάτη (η Ροδωνιά του Θεόφραστου), η Αρουραία, η Γαλλική, η Κυνοροδή και η Μόσχομος. Στη χώρα μας συναντούμε το φυτό με τις ονομασίες ροδαριά, κυνοροδή ή αγριοτριανταφυλλιά. Είναι

θεραπευτικό και μελισσοτροφικό φυτό. Χρησιμοποιείται και ως υποκείμενο της δενδροειδούς τριανταφυλλιάς. Είναι φυλλοβόλο και το ύψος του κυμαίνεται από 1-3 μέτρα. Έχει στελέχη τοξοειδή με κυρτά αγκάθια. Φύλλα πτεροειδή με οδοντωτά φυλλάρια. Οι καρποί (κυνόροδα) είναι ωοειδείς, λείοι με χρώμα πορτοκαλί και κόκκινοι όταν ωριμάσουν. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, συνήθως με 5 σέπαλα, 5 πέταλα, ανοιχτού ρόδινου χρώματος (σπάνια λευκά ή κίτρινα), μυρωδάτα. Οι καρποί σχηματίζονται από την ανθοδόχη που καθίσταται σαρκώδης. Τους καρπούς τους χρησιμοποιούσαν εδώ και αιώνες ως ξινό φρούτο αλλά μόνο στη διάρκεια του δεύτερου παγκόσμιου πολέμου αναγνωρίστηκαν ως πλούσια πηγή βιταμίνης C. Τα φύλλα της αγριοτριανταφυλλιάς τα χρησιμοποιούσαν στο παρελθόν ως υποκατάστατο τσαγιού και για να φτιάχνουν σιρόπια, ενώ τον πολτό των καρπών τον χρησιμοποιούσαν για γλυκά. Οι καρποί είναι πολύ πλούσιοι σε βιταμίνη C. Περιέχουν επίσης βιταμίνες A, B και K, οργανικά οξέα, τανίνη και φλαβονοειδείς χρωστικές (βιταμίνη P), καροτινοειδή (προβιταμίνη A), πηκτίνη, φυτικά οξέα και έλαιο.

Το βότανο είναι θρεπτικό και δρα ως ήπιο υπακτικό, ήπιο διουρητικό και ήπιο στυπτικό.

Τα κυνόροδα είναι μία από τις καλύτερες φυσικές πηγές της βιταμίνης C. Είναι χαρακτηριστικό ότι 3 καρποί του φυτού αντιστοιχούν με τη βιταμίνη που μας προσφέρει ένα πορτοκάλι.

Βοηθούν στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και ιδιαίτερα στα κρυολογήματα. Επίσης υπάρχουν αναφορές ότι μειώνει την πίεση, αυξάνει την ελαστικότητα των αγγείων, διεγείρει την αιμοποίηση, αυξάνει τα λευκά αιμοσφαίρια και βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία και έχει νευροπροστατευτική δράση. Είναι εξαιρετικό τονωτικό και βοηθά σε περιπτώσεις γενικής εξασθένησης και εξάντλησης.



Εικόνα 13: καρπός από *Rosa canina*

4. *Crataegus orientalis*: Γνωστό με το όνομα Κράταιγος ο ανατολικός (*C. orientalis*), είναι θάμνος- δέντρο φυλλοβόλο που φύεται σε ορεινές περιοχές, φτάνει σε ύψος

από 5 μέχρι 15 μέτρα και είναι κοινός κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο. Έχει κόκκινους καρπούς (τσιάτσια) που χρησιμοποιούνται στην εναλλακτική ιατρική ως τονωτικά του κυκλοφορικού συστήματος. Σε ερευνητικό πεδίο έχει βρεθεί ότι τα αιθανολικά του εκχυλίσματα από φύλλα του έχουν αντιθρομβωτικές ιδιότητες και ανέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από την καραγενάνη θρόμβωση σε ουρές ποντικών in vivo. Η καραγενάνη είναι πολυσακχαρίτης, που χρησιμοποιείται ως προσθετικό τροφίμων (Arslan Ret al, 2010).

5. Rubus. Sanctus: Ανήκει στην στο γένος Βάτος (rubus) της οικογενείας των Ροδοειδών. Σε εξειδικευμένα βιβλία η γνωστή βατομουριά αναφέρεται ως Βάτος ο θαμνώδης. Καλλιεργείται σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες για τον εύγευστο καρπό του που κονσερβοποιείται, αλλά και χρησιμοποιείται για την παρασκευή μαρμελάδας και αρωματικού λικέρ. Το είδος αυτό συναντάται σε δασώδεις κυρίως περιοχές, φράκτες, θαμνότοπους, στις όχθες των ρυακιών ακόμα και στις άκρες των δρόμων. Βγάζουν άφθονες παραφυάδες, οι οποίες σχηματίζουν μακρείς και ευλύγιστους τοξοειδείς βλαστούς με ισχυρά αγκάθια. Έχουν βαθυπράσινα σύνθετα φύλλα με 3-5 οδοντωτά φυλλάκια από τα οποία το επάκριο έχει μακρύτερο μίσχο. Τα άνθη έχουν υπόλευκα πέταλα και είναι διατεταγμένα κατά αραιές φόβες. Οι εδώδιμοι καρποί τους, τα γνωστά άγρια βατόμουρα, είναι χυμώδεις και εύγευστοι, στην αρχή πράσινοι, έπειτα κοκκινόξανθοι και τελικά μαύροι και γυαλιστεροί. Είναι ανθεκτικά φυτά και αντέχουν στις παγωνιές.

Το Rubus. Sanctus μελετάται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Το εξωτερικό των καρπών τους είναι αποτελεσματικό σε δερματοπάθειες και σε αποστήματα. Οι καρποί περιέχουν πολλές βιταμίνες, κυρίως A, B, C, μία ουσία που περιέχουν πολλά σιρόπια για την καταπολέμηση του πονόλαιμου και του βήχα και ένα πτητικό αιθέριο έλαιο. Χρησιμοποιείται επίσης ως φάρμακο κατά της φαρυγγίτιδας, της αναιμίας, της λαρυγγίτιδας, της διάρροιας, της ουλίτιδας και βοηθά στις λοιμώξεις του αναπνευστικού. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται σε έγχυμα κατά της δυσεντερίας, των διαρροιών και των εσωτερικών αιμορραγιών. Επίσης χρησιμοποιείται σε γαργάρες για την καταπολέμηση του πονόλαιμου, της ουλίτιδας, της φαρυγγίτιδας, της διάρροιας, της αιματουρίας κτλ. Συχνά χρησιμοποιείται και για την επούλωση των πληγών. (Ipek Süntar et al, 2009).

Από αναλύσεις που έγιναν βρέθηκε ότι το φυτό περιλαμβάνει: 3,6-Di-O-caffeoylglucose, 1-O-caffeoylxlylose και 2,3-O-hexahydroxydiphenoyl-4,6-O-sanguisorboyl-(α/β)-glucose.

6. Prunus webbii : Ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Το κοινό του όνομα είναι άγρια αμυγδαλιά και πρόκειται για δέντρο ή θάμνο ύψους μέχρι 8 μέτρα. Είναι άγριο φυτό και έχει αγκαθωτά κλαδιά που είναι ευρέως αποκλίνοντα. Τα φύλλα του έχουν διαστάσεις 3·5×0·9 εκατοστά, ενώ το σχήμα τους είναι επιμήκη – στενό και παρομοιάζεται με σχήμα λόγχης. Το φύλλωμα του είναι παράλληλα τοποθετημένο, ενώ οι άκρες των φύλλων είναι στρογγυλεμένες ή αιχμηρές και δείχνουν προς τα εμπρός. Επίσης το φύλλωμα του έχει δόντια στο περιθώριό του και είναι άτριχο. Τα άνθη του έχουν μέγεθος 20 mm, έρχονται σε δυάδες ή

μοναχικά, ενώ το χρώμα τους είναι σκούρο ροζ. Οι καρποί του έχουν μέγεθος 20-25 mm, είναι πικροί στη γεύση και ο πυρήνας του καρπού περιέχει υδροκυάνιο. Προτιμά τα βραχύδη μέρη και είναι διαδεδομένο σε όλη τη Μεσόγειο, αλλά κυρίως στη περιοχή της Κρήτης.

7. Rosa sempervirens : Πρόκειται για ένα φυτό που ενδημεί στους Μεσογειακούς θαμνότοπους και είναι γνωστό για τα λευκά του λουλούδια. Έχει λαμπερό φύλλωμα που αποτελείται από 3- 5 φύλλα τα οποία είναι ως επί το πλείστον αιθαλή. Πρόκειται για θάμνο που έχει αγκάθια. Τα φύλλα του μαραίνονται το χειμώνα αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν στο φυτό. Τέλος να αναφέρουμε ότι ο καρπός του είναι ξηρός, σαρκώδης και δεν σχίζεται κατά την ωρίμανση.
8. Rosa pulverulenta: είναι ένα είδος στο γένος Rosa που περιέχει περίπου 180 με 623 είδη. Είναι θάμνος και φτάνει σε ύψος τα 70 έως 120 εκατοστά. Είναι φυλλοβόλο και φέρει αστεροειδή ροζ άνθη. Ανθίζει από το Μάιο έως τον Ιούνιο και είναι ντόπιο στην Νοτιοανατολική Ευρώπη, στην Ιταλία, στην Δυτική Ασία, στην Τουρκία, στο Λίβανο, στον Καύκασο, στο Ιράν και στο Αφγανιστάν. Προτιμά ηλιόλουστα με ημι-σκιάδη μέρη με μέτρια η καθόλου υγρασία στο χώμα. Τέλος χρησιμοποιείται στην κοσμητική για το άρωμά του.
9. Prunus mahaleb: Είναι ένα είδος στο γένος Prunus που περιέχει περίπου 198 με 491 είδη και ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Τα φυτά έχουν σχήμα θόλου και ευρεία διάδοση, φτάνουν σε ύψος τα 8 με 10 μέτρα και σε πλάτος τα 3 με 10 μέτρα. Ο φλοιός έχει χρώμα ασημί-γκρί με πράσινο. Είναι φυλλοβόλο και παράγει λευκά, αστεροειδούς τύπου λουλούδια τα οποία δίνουν καρπούς σε σχήμα τσαμπιών. Ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι το Μάιο και εντοπίζεται σε Κεντρική και Νότια Ευρώπη, καθώς και στη Βόρεια Αμερική. Χρησιμοποιείται στην κοσμητική.
10. Potentilla recta : Είναι είδος που ανήκει στο γένος Potentilla που περιέχει περίπου 246 με 686 είδη και ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Φτάνει σε ύψος τα 30 με 40 εκατοστά. Είναι φυλλοβόλο και παράγει καρπούς από κίτρινα αστεροειδή άνθη. Βρίσκεται στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη καθώς και στη Βόρεια Αμερική. Χρησιμοποιούνται ως βοσκότοποι για μελίτσια.
11. Sorbus umbellata : Ανήκει στο γένος Sorbus που περιέχει 99 έως 207 είδη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Rosaceae. Είναι φυλλοβόλο, ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι το Μάιο, ενώ το λουλούδι του είναι άσπρο και αστεροειδές. Εντοπίζεται στη Βαλκανική χερσόνησο, στη Ρουμανία, στη Κύπρο, στη Τουσκία, στη Συρία, στο Λίβανο, στο Καύκασο και στο Ιράν. Προτιμά ημισκιάδες περιβάλλον με αρκετή υγρασία χώματος και αντεχει έως τους -23 °C.
12. Aremonia agrimonoides : Είναι το μόνο είδος το οποίο ανήκει στο γένος Aremonia που ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Είναι αιθαλές φυτό, το οποίο φτάνει σε ύψος τα 5 έως 40 εκατοστά. Είναι φυλλοβόλο ανθίζει από τον Μάιο έως

τον Ιούνιο και παράγει κίτρινα αστεροειδή λουλούδια. Εντοπίζεται στην κεντρική Ευρώπη, στην ανατολική κεντρική Ευρώπη, στα βαλκάνια, στη Ρουμανία, στην Τουρκία και στις Βρετανίδες Νήσοι. Προτιμά ημισκιώδες με σκιώδες περιβάλλον και υγρασία στο έδαφος

13. Geum urbanum : Ανήκει στο γένος Geum που περιέχει 26 έως 83 είδη και ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Φτάνει σε ύψος τα 20 έως 60 εκατοστά και είναι φυλλοβόλο. Εντοπίζεται σε ολόκληρη την Ευρώπη στην Τουρκία στην Συρία στον Καύκασο στο βόριο Ιράν και στην δυτική Σιβηρία. Προτιμά ηλιόλουστο περιβάλλον με μέτρια υγρασία χώματος και μπορεί να αντέξει έως τους -23 °C. Χρησιμοποιείται ευρέως ως βοσκότοποι για μελίσσια
14. Potentilla pedata : Ανήκει στο γένος Potentilla. Αυτό το φυτό έχει μορφολογικά χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ P. hirta και P. recta . Το ύψος του φτάνει τα 15 με 60 cm. Τα άνθη του έχουν ένα πολύ φωτεινό κίτρινο χρώμα και διαθέτει φύλλα που είναι λιγότερο οδοντωτά από εκείνα του P. recta και του P.hirta.
15. Alchemilla bulgarica : Ανήκει στο γένος Alchemilla
16. Alchemilla xanthochlora : Ανήκει στο γένος Alchemilla
17. Potentilla speciosa : Ανήκει στο γένος Potentilla που περιλαμβάνει 246 με 686 είδη. Φτάνει τα 20 με 30 εκατοστά. Ανθίζει τον Ιούνιο με Ιούλιο και παράγει άσπρα αστεροειδή λουλούδια. Εντοπίζεται στα Βαλκάνια, στην Τουρκία, στην Συρία και στο Βόρειο Ιράν. Χρειάζεστε ηλιόλουστο περιβάλλον με μέτρια υγρασία εδάφους και αντέχει μέχρι τους -23 °C.
18. Fragaria vesca : Ανήκει στο γένος Fragaria (μούρα) που έχει 31 έως 59 είδη. Το χαρακτηριστικό του είναι ότι έχει εδαφοκαλυπτική κατανομή και φτάνει στο ύψος των 5 έως 30 εκατοστών. Είναι φυλλοβόλο, ανθίζει από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο. Παράγει αστεροειδή άσπρα άνθη και καρπούς οι οποίοι είναι βρώσιμοι. Βρίσκεται σε ολόκληρη την Ευρώπη στην κεντρική Ασία και στην Βόρεια Αμερική. Προτιμά ημισκιώδες περιβάλλον και υγρό χώμα.
19. Rubus idaeus : Ανήκει στο γένος Rubus, το οποίο περιέχει 422 έως 1892 είδη. Είναι θάμνοι με μικρό χρόνο ζωής, που φτάνουν σε ύψος 1 με 2,5 μέτρα σε πλάτος περίπου 1 μέτρο. Μεγαλώνουν την άνοιξη και έχουνε φολιιδωτό μαύρο κορμό. Είναι φυλλοβόλα. Παράγουν άσπρα αστεροειδή άνθη και είναι ερμαφρόδιτα. Βρίσκονται σε ολόκληρη την Ευρώπη, στην κεντρική Ασία και στην Βόρεια Αμερική. Χρειάζονται ηλιόλουστο περιβάλλον, μέτρια υγρασία, pH εδάφους 5 έως 7,5, 30 εκατοστά βάθος για να φυτρώσει και μπορεί να αντέξει μέχρι τους -40°C. Οι καρποί του είναι βρώσιμοι.

20. Prunus prostrata : Ανήκει στο γένος Prunus με 198 με 421 είδη. Είναι θάμνος που έχει ύψος από 20 εκατοστά έως 1,5 μέτρα. Είναι φυλλοβόλο. Ανθίζει από Απρίλιο έως Μάιο και παράγει αστεροειδή ρόζ άνθη. Εντοπίζεται στην βορειοδυτική Αφρική, στην Νότια Ευρώπη και στη Δυτική Ασία. Απαιτεί ηλιόλουστο περιβάλλον και υγρό χώμα και αντέχει μέχρι τους -23°C .
21. Rosa arvensis : Ανήκει στο γένος Rosa που έχει 180 έως 623 είδη. Είναι θάμνος που φτάνει τα 2 μέτρα σε ύψος και πλάτος. Ο κορμός έχει πράσινο χρώμα. Είναι φυλλοβόλο και παράγει άσπρα αστεροειδή άνθη. Βρίσκεται σε όλη την Ευρώπη με εξαίρεση την Βόρεια Ευρώπη και την Τουρκία. Προτιμά ηλιόλουστο με ημισκιώδες περιβάλλον και χώμα με μέτρια υγρασία. Αντέχει μέχρι θερμοκρασίες -29°C . Χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία.
22. Sanguisorba officinalis : Ανήκει στο γένος Sanguisorba που έχει 15 έως 39 είδη. Φτάνει σε ύψος τα 120 εκατοστά. Είναι φυλλοβόλο και τα άνθη του έχουν ραβδοειδές σχήμα και σκούρο κόκκινο χρώμα. Ανθίζει από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο. Εντοπίζεται σε όλη την Ευρώπη, στην Σιβηρία και στην κεντρική Ασία. Χρειάζεται ημισκιώδες περιβάλλον, υγρό χώμα και αντέχει σε θερμοκρασίες μέχρι -35°C .



Εικόνα 14: άνθη του είδους *Sanguisorba officinalis*

23. Potentilla hiyraldiana
Αυτό το είδος δεν έχει μελετηθεί ακόμα και δεν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες στη βιβλιογραφία.

PUNICA GRANATUM

Ταξινόμηση και καταγωγή του είδους *Punica granatum* (Ρόδι)

Η ροδιά (*Punica granatum* L.) είναι είδος που ευδοκίμει σε εύκρατα κλίματα και απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες για κανονική ωρίμανση. Η καλλιέργειά της είναι διαδεδομένη σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου, Νότια Ασία και σε αρκετές χώρες της Βόρειας και Νότιας Αμερικής. Θεωρείται ότι κατάγεται από την περιοχή της Μέσης Ανατολής, όπου και απαντάται αυτοφυές (**Vavilov ,1992**). Ανήκει στην Οικογένεια *Punicaceae*, που περιλαμβάνει το γένος *Punica*. Σε αυτό το γένος ανήκουν δύο είδη:

1. *Punica protorunica*, το οποίο είναι ενδημικό στην Υεμένη.
2. *Punica granatum*, που είναι η καλλιεργούμενη ροδιά η οποία προήλθε από το προηγούμενο είδος (**Zukvskij 1950, Moriguchi κ.ά. 1987, Guarino κ.ά.1990**).

Η ροδιά είναι διπλοειδής οργανισμός με $2n=16$ (**Westwood 1982**). Έχει δε περιγραφεί ότι είναι αυτογονιμοποιούμενη καθώς και σταυρογονιμοποιούμενη (**Jalikor και Kumar 1990**).



Βιοποικιλότητα

Η ροδιά καλλιεργείται σε όλη την περιοχή της Μεσογείου αλλά και σε περιβάλλοντα με μεγάλες διαφορές και έχει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα λόγω του ότι οι σπόροι της ροδιάς φυτρώνουν εύκολα (**Melgarejo 1992**). Αυτό αποδεικνύεται από την μεγάλη συλλογή γενοτύπων που περιγράφονται σε διάφορες χώρες της Ανατολής και της Δ. Μεσογείου. Στην κεντρική τράπεζα φυτογενετικών πόρων της Ευρώπης στην Ισπανία έχουν καταγεγραμμένες πάνω από 104 γενοτύπους ροδιάς (**Melgarejo 1992**).

Η ροδιά είναι ένα είδος που καλλιεργείται για τον καρπό αλλά και ως καλλωπιστική. Η κυριότερη Ελληνική ποικιλία που καλλιεργείται στην Ελλάδα είναι η ποικιλία «ΕΡΜΙΟΝΗ» ενώ από τις ξένες η «WONDERFUL» (**Δρογούδη κ.ά. 2012**). Οι κυριότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται διεθνώς είναι : WONDERFUL (ΗΠΑ), GRENADA (ΗΠΑ), HICAZNAR(Τουρκία), AKKO (Ισραήλ), MOLLAR DE ELCHE (Ισπανία), SWEET (ΗΠΑ) , GABSI (Τυνησία), AK ANAR (Τουρκία), AKMAR (ΙΡΑΚ), MELLASI (Αραβία), GANESH (Ινδία), RUBY (Ινδία), ZAOXUAN (Κίνα), (**Γάτσιος, 2010 ; Πουλημένος, 2012 ; Δρογούδη κ.ά., 2012**).

Οι κυριότερες Ελληνικές ποικιλίες – πληθυσμοί είναι: ΕΡΜΙΟΝΗ, ΠΟΛΙΤΙΚΗ, ΚΑΡΑΒΕΛΟΣ, ΓΛΥΚΙΑ ΠΑΤΡΩΝ, ΤΑΝΑΓΡΑΣ, ΧΙΟΥ (**Γάτσιος 2010**) (**Δρογούδη κ.ά. 2012**).

Παρακάτω δίνονται μερικά στοιχεία σχετικά με τις δύο βασικές ποικιλίες Ροδιάς:

- Wonderful: Προήλθε από τη Φλόριντα των ΗΠΑ και άρχισε να πολλαπλασιάζεται στην Καλιφόρνια το 1896. Ο καρπός της έχει πολύ μεγάλο μέγεθος και σχήμα ελλειψοειδές, με σκούρο μωβ-κόκκινο χρωματισμό. Ο φλοιός είναι μετρίου πάχους με βαθύ κόκκινο χρώμα και έχει χυμώδη αρίλια, με γίγαρτα μέσης σκληρότητας. Τα δέντρα είναι παραγωγικά και ζωηρά. Παράγει καλά σε αλκαλικά εδάφη.
- Granada: Προήλθε από την Καλιφόρνια το 1966 και πρόκειται για οφθαλμική μετάλλαξη της Wonderful. Ωριμάζει ένα μήνα νωρίτερα σε σύγκριση με τη Wonderful. Ο καρπός μοιάζει με αυτόν της Wonderful, αλλά έχει καλύτερο κόκκινο χρωματισμό όταν είναι ώριμος. Τα άνθη της έχουν επίσης βαθύτερο κόκκινο χρωματισμό. Το δέντρο είναι ίδιο με αυτό της Wonderful.

Η ποικιλία Wonderful παράγει πολλούς καρπούς και αναπτύσσεται γρήγορα γι αυτό και καλλιεργείται στις περισσότερες χώρες.

Συνθήκες καλλιέργειας – Πολλαπλασιασμός

Σύμφωνα με τους **Maas και Hoffman (1977)**, η ροδιά προσαρμόζεται σε πλήθος εδαφών, όμως για ικανοποιητική και ποιοτική παραγωγή απαιτούνται πλούσια βαθιά, αμμοαργιλώδη εδάφη με pH 5,5-7,0 και αρδευόμενα. Σε ελαφρά αμμώδη εδάφη η παραγωγή είναι μικρή, ενώ σε βαριά πηλώδη εδάφη ο καρπός δεν χρωματίζεται ικανοποιητικά. Θεωρείται ένα ιδανικό φυτό για άγονες περιοχές λόγω της αντοχής του στην ξηρασία και στην περίσσεια ασβεστίου. Οι **Δρογούδη κ. ά. (2007)** ανέφεραν ότι ευδοκιμεί σε θερμές περιοχές με εύκρατο κλίμα. Θεωρείται πιο ανθεκτική στο ψύχος από τα εσπεριδοειδή αλλά και από την ελιά. Η ανθεκτικότητα σε ανοιξιάτικους και χειμερινούς παγετούς διαφέρει ανάλογα την ποικιλία. Η υψηλή θερμοκρασία του καλοκαιριού ευνοεί την ωρίμανση των καρπών οι οποίοι παίρνουν καλό κόκκινο χρωματισμό και πιο γλυκιά γεύση. Ο πολλαπλασιασμός της γίνεται κυρίως με

μοσχεύματα σκληρού ξύλου και έχει υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί και με παραφυάδες αλλά και με σπόρους (Δρογούδη κ.ά. 2007).

Η θρεπτική σημασία του ροδιού

Ο νωπός καρπός της ροδιάς αποτελείται περίπου από 70% του βάρους του από νερό, ενώ το 13-30% από σάκχαρα, οργανικά οξέα, ενώ περιέχει σε μεγάλες ποσότητες βιταμίνη C (Ρογροζογλου κ.ά. 2002). Τα οργανικά οξέα που περιέχονται ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία και επηρεάζεται τόσο από τον τρόπο καλλιέργειας όσο και από τον τρόπο αποθήκευσης των καρπών (Aarabi κ.ά. 2008). Σε έρευνες αναφέρονται τα εξής κυρίως οργανικά οξέα: το κιτρικό, το μηλικό (Melgarejo κ.ά. 2000 ; Legua κ.ά. 2000) το οξαλικό και το ταρταρικό (Miguel κ.ά. 2004). Σύμφωνα με στοιχεία του USDA (United States Department of Agriculture –Nutrient Database) η σύσταση των σπόρων του ροδιού αναφέρεται στην εικόνα 15 (Γάτσιος 2010). Σύμφωνα με τους Gil κ.ά. (2000), η μέθοδος έκθλιψης και παραγωγής χυμού ροδιού μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωσή του σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Ο χυμός του ροδιού που παράχθηκε με ειδικό μηχάνημα έκθλιψης είχε διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με αυτό που παράχθηκε με το χέρι, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης πουνικαλαγίνης, μιας ουσίας που βρίσκεται κυρίως στον φλοιό και τις μεμβράνες του καρπού και πιθανόν πέρασε στον εμπορικό χυμό κατά την διαδικασία παραγωγής του.

Συστατικά	Περιεκτικότητα(σε 100g σπόρων ροδιού)
Υδατάνθρακες	17,170(g)
Σάκχαρα	16,570(g)
Φυτικές ίνες	0.600(g)
Λίπη	0.300(g)
Πρωτεΐνες	0.950(g)
Θειαμίνη (B1)	0.030(mg)
Ριβοφλαβίνη (B2)	0.063(mg)
Νιασίνη (B3)	0.300(mg)
Παντοθενικό οξύ (B5)	0.596(mg)
Βιταμίνη (B6)	0.105(mg)
Φολικό (B9)	6.000(μg)
Βιταμίνη C	3.000(mg)
Ασβέστιο	3.000(mg)
Σίδηρος	0.300(mg)
Μαγνήσιο	3.000(mg)
Φώσφορος	8.000(mg)
Κάλιο	259.000(mg)
Ψευδάργυρος	0.120(mg)

Εικόνα 15.: Θρεπτική αξία των 100g σπόρων ροδιάς από στοιχεία του USDA (Γάτσιος 2010)

Ο Γάτσιος (2010) αναφέρει ότι ο φλοιός της ροδιάς περιέχει λουτεολίνη, κερκετίνη, καμπερόλη, ηλιανθίνη, πιπεριδίνη, ισοπελλετιερίνη, πελλετιερίνη. Ο φλοιός της ροδιάς έχει 12 στυπτικές, αντιδιαρροϊκές, αντιβακτηριδιακές, αντιαμορραγικές και αντιρρευματικές ιδιότητες. Στην παραδοσιακή ιατρική πολλών λαών χρησιμοποιείται σαν αντιπαρασιτικό του εντέρου (ταινίες). Σήμερα ο φλοιός της ροδιάς χρησιμοποιείται στην παρασκευή ομοιοπαθητικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα. Τα άνθη της ροδιάς επίσης χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ενός κόκκινου χρώματος. Έχουν επίσης στυπτικές, αντιδιαρροϊκές και αντιαμορραγικές ιδιότητες (**Γάτσιος 2010 ; Bagri et al 2010**). Από τα σπέρματα του ροδιού εξάγεται ένα είδος ελαίου το οποίο είναι πολύ πλούσιο σε α-πουνισικό οξύ που φθάνει σε ποσοστό 60% και το οποίο είναι ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας. Το έλαιο του ροδιού αποτελεί βασικό συστατικό υψηλής αξίας, διαφόρων καλλυντικών και αντιγηραντικών σκευασμάτων (**Γάτσιος 2010**).

Φαρμακευτική αξία

Από τα αρχαία χρόνια η ροδιά θεωρείται φαρμακευτικό φυτό. Τόσο οι καρποί, αλλά και οι σπόροι και τα άνθη της χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων στην Μ. Ανατολή, την Ασία και την Ν. Αμερική. Παραδοσιακά η ροδιά χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση γαστρεντερικών παθήσεων και των διαφόρων προσβολών από τα παράσιτα. Τα τελευταία χρόνια η ροδιά είναι το αντικείμενο επιστημονικής έρευνας, επειδή θεωρείται σαν ένας προστατευτικός παράγοντας έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου (**Γάτσιος 2010**).

Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών του ροδιού συσχετίζεται με τις φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα διάφορα μέρη του ροδιού, όπως η πουνικαλαγίνη (punicalagin), τα παράγωγα του γαλλικού οξέος, τις ανθοκυανίνες κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πελαργονιδίνη και άλλες. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για τις ιδιότητές τους να καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση in vitro. Η πουνικαλαγίνη, η οποία προέρχεται κυρίως από τον φλοιό του ροδιού, έχει την μεγαλύτερη συμβολή στην αντιοξειδωτική δράση του χυμού του ροδιού (που προέρχεται από σύνθλιψη όλου του καρπού), με τις ανθοκυανίνες να έχουν την μικρότερη. Μελέτες αναφέρουν ότι ο χυμός του ροδιού παρουσιάζει 3 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το κόκκινο κρασί ή το πράσινο τσάι, 2 φορές μεγαλύτερη από τους χυμούς του σταφυλιού και του βατόμουρου, 6 φορές από το χυμό του γκρέιπφρουτ και 8 φορές από το χυμό πορτοκαλιού.

Αναλυτικότερα οι φαρμακευτικές ιδιότητες του ροδιού που αναφέρονται σε επιστημονικές έρευνες είναι:

1. Αντιοξειδωτική δράση: Μετά από μελέτες που έγιναν, ο χυμός της ροδιάς έχει αποδειχθεί ότι περιέχει περισσότερα αντιοξειδωτικά στοιχεία σε σχέση με 40

άλλα διαφορετικά είδη χυμών καρπών που θεωρούνται σαν καρποί με πολλά αντιοξειδωτικά, όπως π.χ. του μύρτιλλου, του χυμού του πορτοκαλιού, του κόκκινου κρασιού, του χυμού του κρανμπέρυ και του πράσινου τσαγιού (Wolfe κ.ά. 2008) (Adhami και Mukhtar 2006.) (Gil κ.ά. 2000).

2. Προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών ασθενειών: Οι αντιοξειδωτικές και αντι-αθηρωματικές ιδιότητες των πολυφαινόλων του χυμού της ροδιάς έχουν αποδειχθεί τόσο in vitro όσο και in vivo και σε ανθρώπους και σε ζώα (Aviram 2000), (Fuhrman κ.ά. 2010).
3. Αντικαρκινική δράση: Έχει αποδειχθεί ότι τέσσερις χημικές ουσίες που περιέχονται στο χυμό του ροδιού, το ελλαγικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η λουτεολίνη, και το πουνισικό οξύ, παρουσιάζουν ανασταλτικές ιδιότητες, όσον αφορά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων in vitro, ιδίως του καρκίνου του προστάτη. (Seeram κ.ά. 2005, Seeram κ.ά. 2007).
4. Νευροπροστατευτική δράση και δράση εναντίον της ασθένειας του Alzheimer: Σε ερευνητική εργασία το 2006 αποδείχθηκε ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως είναι τα ρόδια, είχε νευροπροστατευτική δράση στα ενήλικα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν, σε περιπτώσεις ασθενειών όπως της ισχαιμίας και της ασθένειας του Alzheimer, γιατί μειώνει στο μισό την απόθεση της πρωτεΐνης β-αμυλοειδούς που είναι η χαρακτηριστική πρωτεΐνη της ασθένειας του Alzheimer (Hartman κ.ά. 2006).
5. Αντιμικροβιακή δράση: Αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και δράση κατά της ελονοσίας παρουσίασε σε έρευνα το 2007 ο χυμός του ροδιού λόγω της άφθονης περιεκτικότητάς του σε τανίνες και ελλαγικό οξύ (Reddy 2007). Αλλά και σε άλλες έρευνες αποδείχθηκε η αντιμικροβιακή δράση του χυμού της ροδιάς (Ahmet κ.ά. 2009). Σήμερα γίνονται πειραματικές εργασίες με σκοπό την παρασκευή χαμηλού κόστους μικροβιοκτόνων σκευασμάτων για την αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων με την χρήση του χυμού της ροδιάς (Bialonska κ.ά. 2010), (Bialonska κ.ά. 2009).
6. Δράση εναντίον του διαβήτη: (Rosenblat κ.ά. 2006) (Roc κ.ά. 2008) (McFarlin κ.ά. 2009).
7. Ρευματοειδή αρθρίτιδα : (Shukla κ.ά. 2008)
8. Αντιφλεγμονώδη δράση (Rasheed κ.ά. 2009)

Το μεγαλύτερο μέρος των επιστημονικών εργασιών που αφορούν την ευεργετική δράση του χυμού της ροδιάς στην υγεία και ευεξία του ανθρώπου, είναι αποτέλεσμα χρηματοδότησης της αμερικανικής εταιρείας Pom Wonderful με σκοπό να αναδείξει την χρησιμότητα της ροδιάς και να διαφημίσει έτσι τα προϊόντα της.



Εικόνα 16 : κύριες πολυφαινολικές ενώσεις ροδιού

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση με τη χρήση μοριακών μεθόδων της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα από είδη της οικογένειας Rosaceae καθώς και εκχυλισμάτων των προϊόντων και υποπροϊόντων του φυτού *Punica Granatum* (Ροδιά). Η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων εξετάστηκε έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) και υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$). Οι ρίζες περοξυλίου παράχθηκαν από την θερμική διάσπαση του 2,2 -azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) ενώ οι ρίζες υδροξυλίου από την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία UV ακτινοβολίας.

Η εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τόσο στα φυτά Rosaceae, όσο και στη Ροδιά, θα βοηθήσει στην κατανόηση των πιθανών φαρμακευτικών εφαρμογών τους, στην ενίσχυση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων καθώς και στην προσπάθεια δημιουργίας καινοτόμων προϊόντων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μικρή κλίμακα.

Χημικά αντιδραστήρια

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

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

Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα, των οποίων η αντιμεταλλαξιγόνος δράση μελετήθηκε, απομονώθηκαν τόσο από φυτά τις οικογένειας των Rosaceae (πίνακας 3) τόσο και από ποικιλίες ροδιών Wonderful, Περσεφόνη, Πορφυρογέννητη, Ξινή Ερμιόνης, Πλούτο (Πίνακας 2). Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κ.Δ.	Ποικιλία	Τμήμα Καρπού
W1	Wonderful	Βρώσιμο
W2	Wonderful	Φλοιός
Π1	Περσεφόνη	Βρώσιμο
ΠΕ	Περσεφόνη	Βρώσιμο
ΠΛ	Πλούτο	Βρώσιμο
ΠΟ	Πορφυρογέννητη	Βρώσιμο
ΞΙΝΗ	Ξινή Ερμιόνης	Βρώσιμο
A1	Wonderful	Υποπροϊόντα χυμοποίησης

Πίνακας 2 :δειγμάτων από τις ποικιλίες ροδιού που μελετήθηκαν καθώς και τα τμήματα του καρπού από τα οποία δημιουργήθηκαν τα εκχύλισματα

Δείγμα 1	<i>Pyracantha coccinea</i>
Δείγμα 2	<i>Pyrus spinosa</i>
Δείγμα 3	<i>Rosa canina</i>
Δείγμα 4	<i>Crataegus orientalis</i>
Δείγμα 5	<i>Rubus sanctus</i>
Δείγμα 6	<i>Prunus webii</i>
Δείγμα 7	<i>Rosa sempervirens</i>
Δείγμα 8	<i>Rosa pulverulenta</i>
Δείγμα 9	<i>Prunus mahaleb</i>
Δείγμα 10	<i>Potentilla recta</i>
Δείγμα 11	<i>Sorbus umbellate</i>
Δείγμα 12	<i>Aremonia agrimonoides</i>
Δείγμα 13	<i>Geum urbanum</i>
Δείγμα 14	<i>Potentilla pedata</i>
Δείγμα 15	<i>Alchemilla bulgarica</i>
Δείγμα 16	<i>Alchemilla xanthochlora</i>
Δείγμα 17	<i>Potentilla speciosa</i>
Δείγμα 18	<i>Fragaria vesca</i>
Δείγμα 19	<i>Rubus idaeus</i>
Δείγμα 20	<i>Prunus prostrate</i>
Δείγμα 21	<i>Rosa arvensis</i>
Δείγμα 22	<i>Sanguisorba officinalis</i>
Δείγμα 23	<i>Potentilla hiyraldiana</i>

Πίνακας 3 : με τα είδη των φυτών της οικογένειας Rosaceae που χρησιμοποιήθηκαν για την Παρασκευή των εκχυλισμάτων

Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

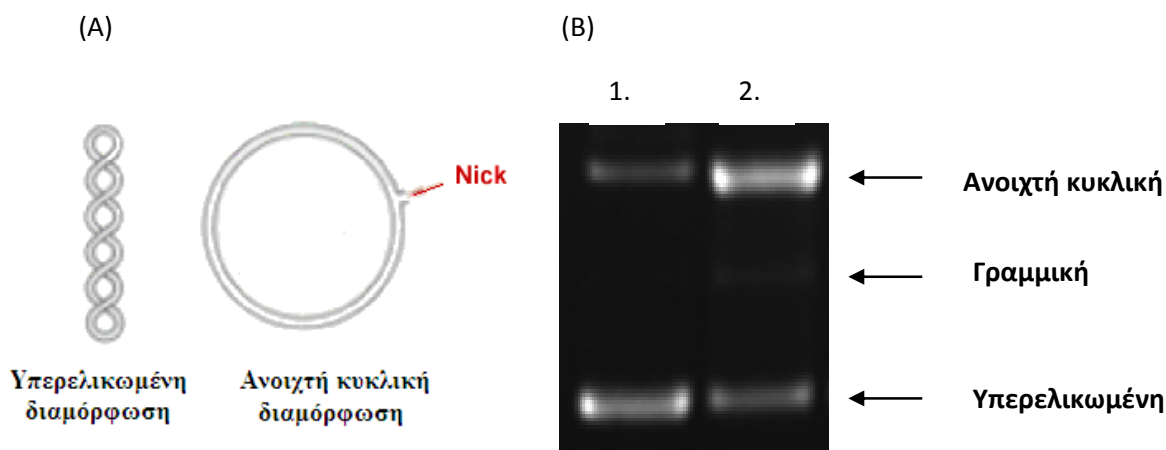
Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών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

Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, και δύο ρίζες αντίστοιχα. Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}) και η ρίζα περοξυλίου (ROO^{\bullet}).

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 17).

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

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



Εικόνα 17: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks). (B) Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Στήλη 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Στήλη 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

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

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

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την ScharlauChemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNABluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli*DH5A.

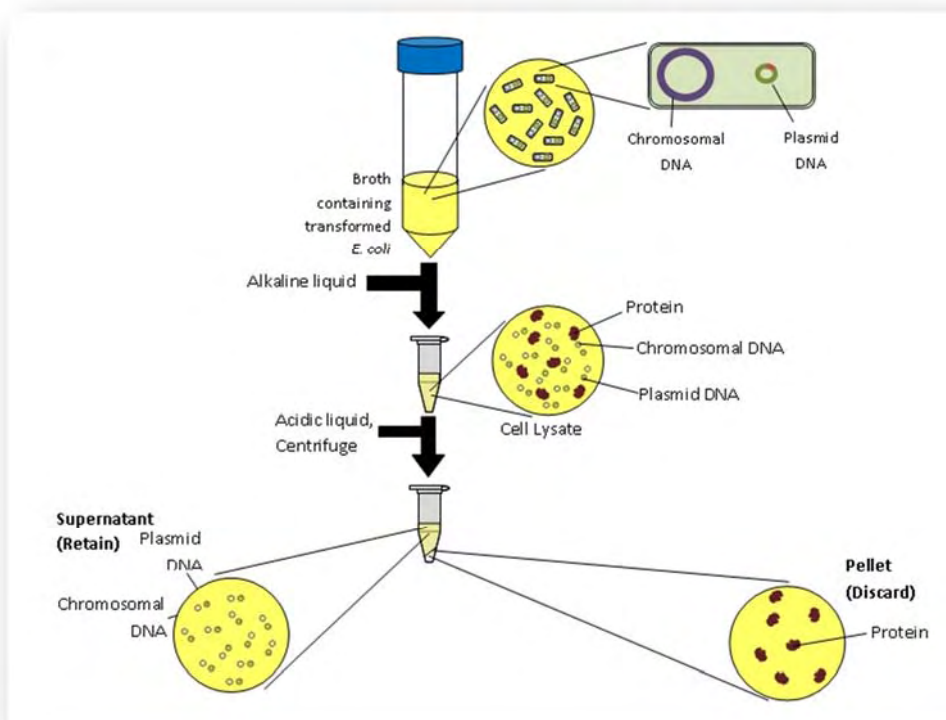
Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων E. Coli που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων E. Coli που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA.

Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, για αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται για 20 min στα 3214g στους 4°C.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.



Εικόνα 18 : απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια *E. Coli* με την μεθοδολογία *Alkaline Lysis Mini-Plasmid Preparation*

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1 OD 260→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγμα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min.

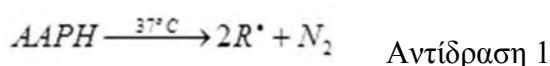
Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της AlphaInnotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

Αρχή της μεθόδου

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

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



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

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

Πειραματική διαδικασία

Τόσο για τα εκχυλίσματα από Ροδιά όσο και από Rosaceae η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία είναι η ίδια.

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

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

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

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

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 1,4,16, 32, 64, 256 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA plasmid, AAPH 3 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-20mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 3mM προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 80% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μεταβιβάζει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 4. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex) (Εικόνα 18)

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control(-)	9 μl	-	1μl	-
AAPH 3 mM(+)	5 μl	-	1μl	4μl
Εκχ. (1 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (4 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (16 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (32 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (64 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (256 μg/ml)	2 μl	3μl	1μl	4μl
Εκχ. (256 μg/ml)	6 μl	3μl	1μl	-

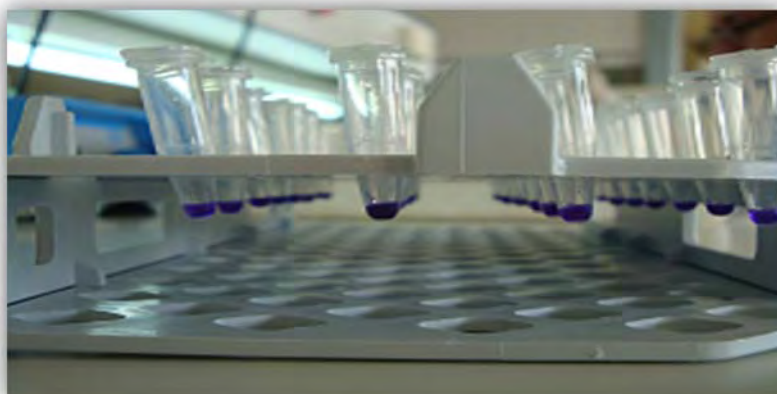
Πίνακας 4 : Ποσότητες αντιδραστηρίων.



Εικόνα 18: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

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

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 19) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) (Εικόνα 20) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mMEDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της Alpha Innotech (Εικόνα 21). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.



Εικόνα 19 : Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης



Εικόνα 20 : Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 21 : Σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της Alpha Innotech

Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^{*}, που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

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

Όπου:

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

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

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

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

Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH^{*})

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης μιας ουσίας απέναντι στη δράση των ριζών OH^{*} βασίζεται στη μέθοδο των Keumetal. (2000). Οι ρίζες OH^{*} είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH^{*} (Αντίδραση 7).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH^{*} στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH^{*}.

Πειραματική διαδικασία

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

Εξετάστηκε η αντιμεταλλαξογόνος δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 48, 95, 191, 382, 765, 1530 $\mu\text{g/ml}$ στα δείγματα 1,3,20,2,10,11,19 και στα δείγματα του ροδιού (Πίνακας 5) που από την μέθοδο της επαγόμενης από ρίζες $\text{ROO}\cdot$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA εμφάνισαν μεγαλύτερη δράση. Στα δείγματα 21,6,7, 16, 15, 4 οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ήταν 160, 317, 633, 844, 1120, 1530 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 6). Στα δείγματα 23,22, 9, 14, 17, 12, 13 που έδειξαν την ασθενέστερη δράση την μέθοδο της επαγόμενης από ρίζες $\text{ROO}\cdot$ πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 317, 633, 844, 1125, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 7)

Αμέσως πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 40mM. Το stock διάλυμα H_2O_2 (8,8M), αλλά και το αντίστοιχο αραιωμένο (40mM -αραίωση 1/44) είναι φωτοευαίσθητα, γι' αυτό και τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή τους διατηρούνται στον πάγο.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στους Πίνακες

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1 μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (48 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (95 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (191 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (382 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (765 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1530 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1530 $\mu\text{g/ml}$)	2 μl	4 μl	3 μl	1 μl	-	-

Πίνακας 5 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για τα δείγματα 1,3,20,2,10,11,19 για τα δείγματα του ροδιού

	Tris HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNAPlas mid	H ₂ O ₂	UV
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1 μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (160 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (317 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (633 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (844 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1120 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1530 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1530 μg/ml)	2 μl	4 μl	3 μl	1 μl	-	-

Πίνακας 6 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για τα δείγματα 21,6,7, 16, 15, 4

	Tris HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNAPlas mid	H ₂ O ₂	UV
Control(-)	2 μl	7 μl	-	1 μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	5 μl	-	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (317 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (633 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (844 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1125 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (1500 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (2000 μg/ml)	2 μl	2 μl	3 μl	1 μl	2 μl	+
Εκχ. (2000 μg/ml)	2 μl	4 μl	3 μl	1 μl	-	-

Πίνακας 7 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για τα δείγματα 23,22, 9, 14, 17, 12, 13

Αμέσως μετά την προσθήκη του H₂O₂ τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται κάτω από μια λάμπα UV ακτινοβολίας 300 W (OSRAM) για 3 min σε απόσταση 50 cm. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mMEDTA, pH 8).

Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multi Image Light Cabinet της AlphaInnotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού AlphaView της AlphaInnotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (μόνο πλασμίδιο), ένα θετικό control (πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ώστε να παρατηρηθεί τυχόν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA.

Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH[•], που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H₂O₂ υπολογίστηκαν ως εξής:

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

όπου:

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

S_0 : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία)

S : το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H₂O₂ και UV ακτινοβολία.

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

Στην μέθοδο αυτή εξετάστηκαν 22 εκχυλίσματα Rosaceae (το δείγμα 5, Rubussanctus, δεν ήταν διαλυτό στο νερό με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει η εξέτασή του) και 8 δείγματα από ποικιλίες Ροδιών.

Τα εκχυλίσματα επέδειξαν δοσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO•. Σύμφωνα με τις IC₅₀ τιμές τους (Διάγραμμα 65 και Διάγραμμα 66), τα εκχυλίσματα αυτά επέδειξαν ισχυρότερη δράση στην επαγόμενη από ROO• ρίζες βλάβη σε σχέση την αντίστοιχη των ριζών OH•, με τις τιμές IC₅₀ να κυμαίνονται από 12 έως 64μg/ml στα Rosaceae και από 14 έως 29 μg/ml στα Ρόδια.

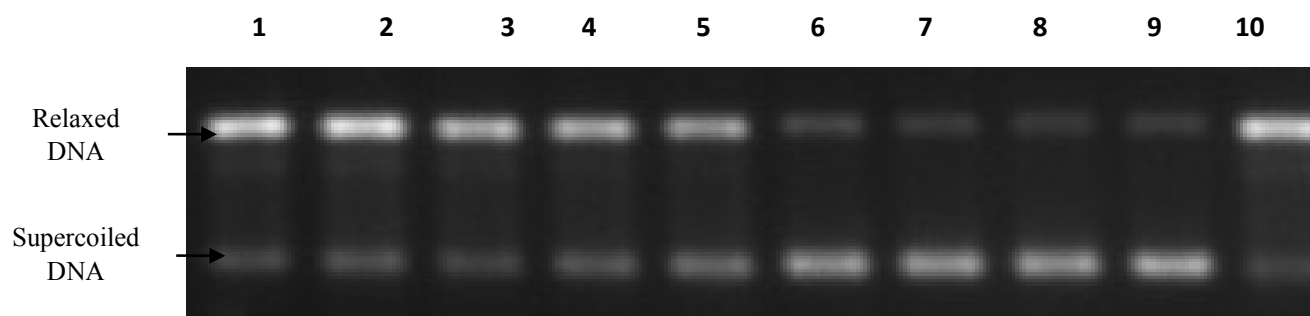
Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 23 (Rosaceae) και 32 (ρόδια) και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της δράσης αναστολής των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επίδρασης του AAPH διαφέρει από εκχύλισμα σε εκχύλισμα με τα εκχυλίσματα από *Pyracantha coccinea* (Διάγραμμα 1) και *Rosa canina* (Διάγραμμα 3) να υπερισχύουν. Το εκχύλισμα από *Geum urbanum* (Διάγραμμα 12) παρουσίασε την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Το βρώσιμο τμήμα της ποικιλίας Wonderfulστα Ρόδια έφερε την μεγαλύτερη αντιμεταλλαξογόνο δράση ενώ το φλοιόδες μέρος του καρπού της την μικρότερη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ROSACEAE



Εικόνα 22 : Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του δείγματος 20 των *Rosaceae* σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 0,5 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 1 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 4 μg/ml εκχυλίσματος

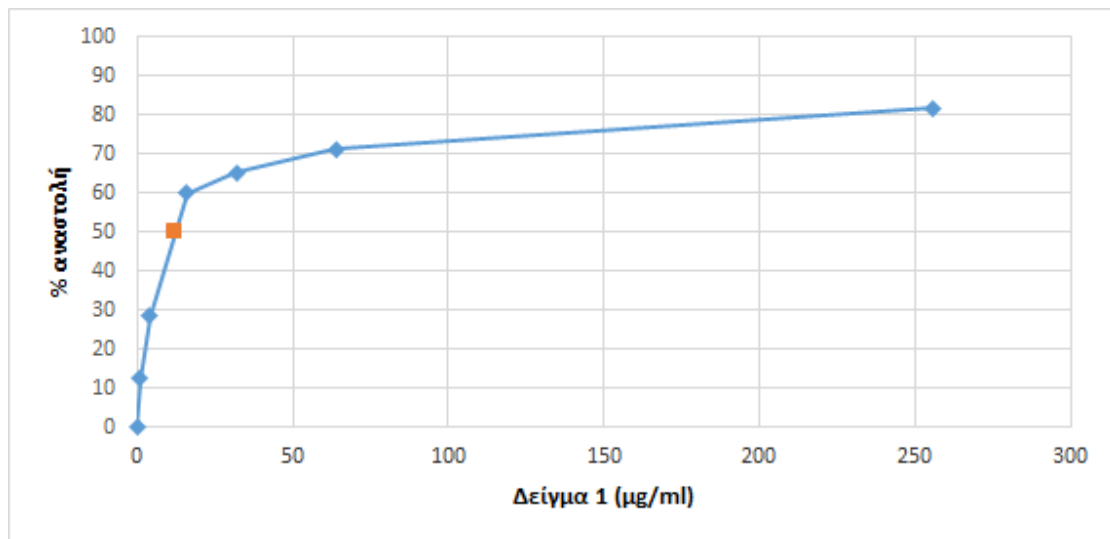
Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 16 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 32 μg/ml εκχυλίσματος

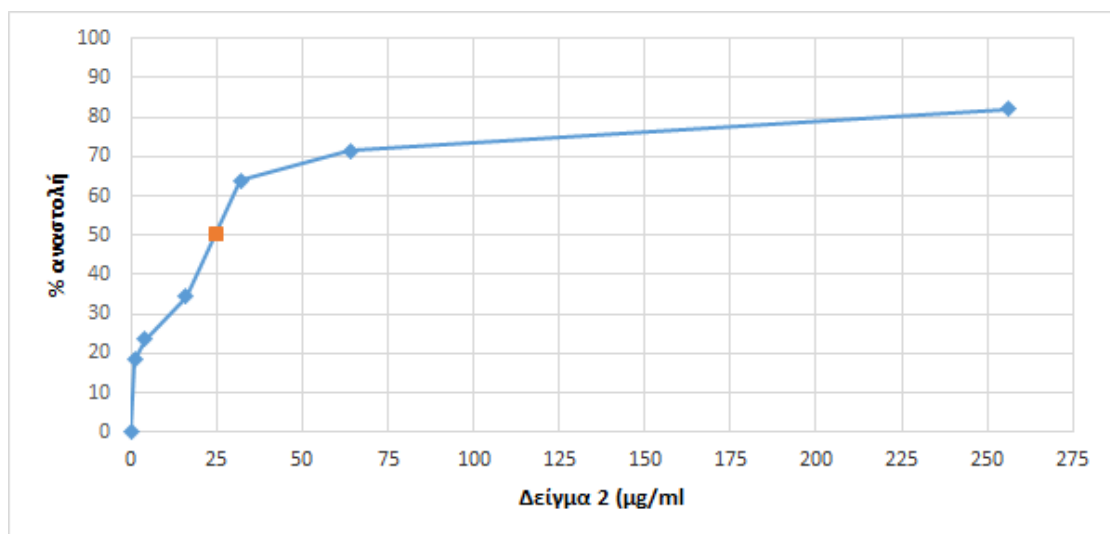
Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 64 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 9: DNA plasmid + AAPH + 256 μg/ml εκχυλίσματος

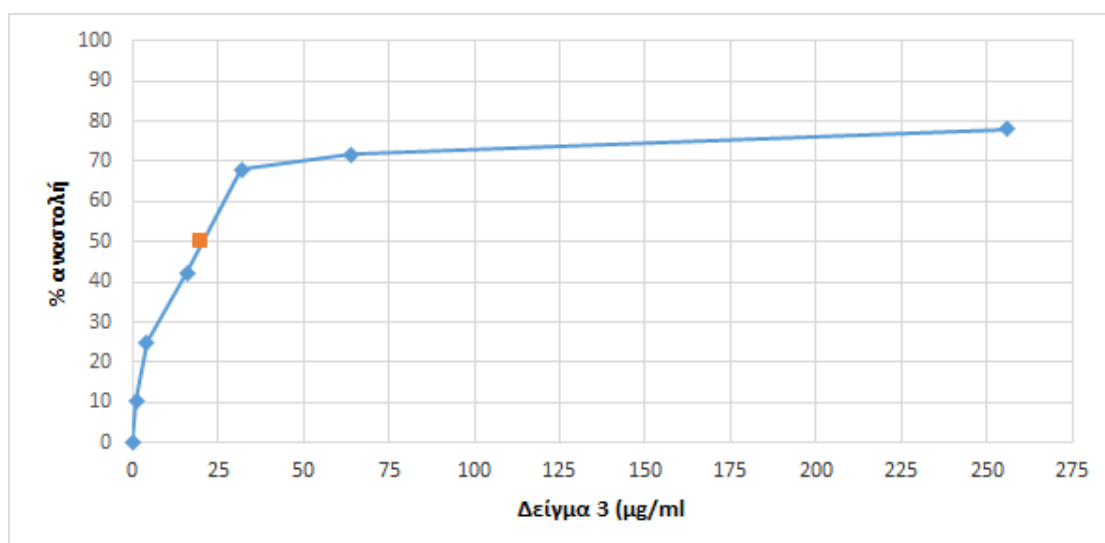
Σειρά 10: DNA plasmid + 256 μg/ml εκχυλίσματος



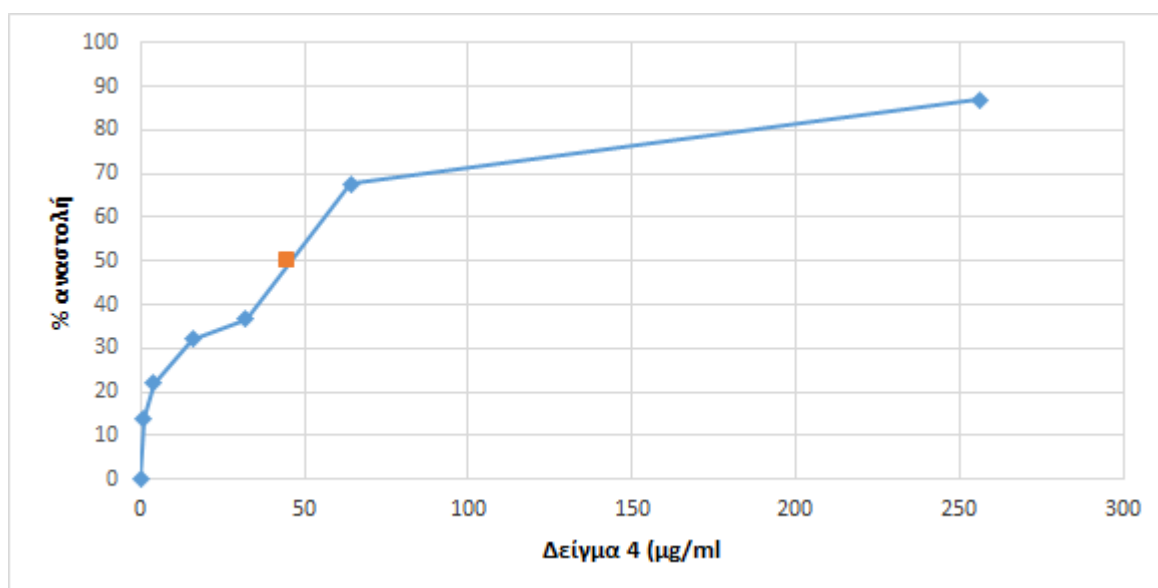
Διάγραμμα 1 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 12 μg/ml) στο δείγμα 1 (**Pyracantha coccinea**).



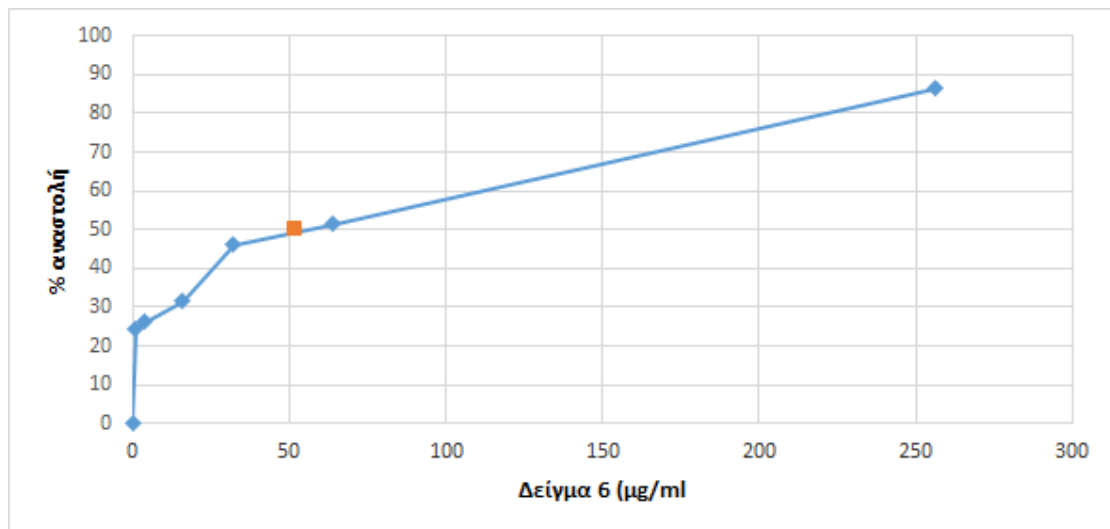
Διάγραμμα 2 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 25 μg/ml) στο δείγμα 2 (**Pyrus spinosa**).



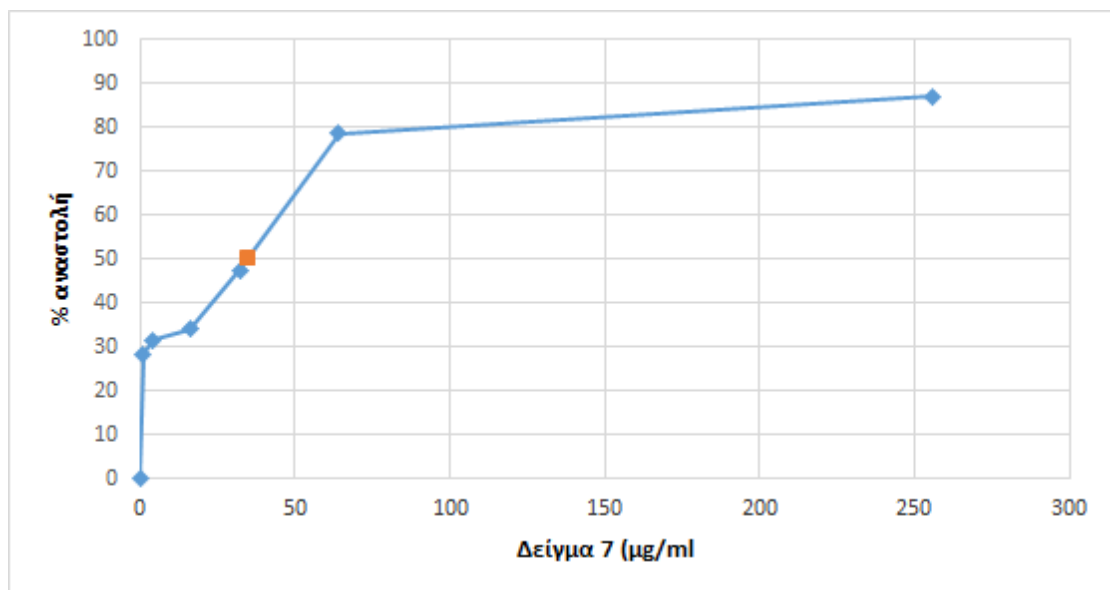
Διάγραμμα 3 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 20 μg/ml) του δείγματος 3 (**Rosa canina**).



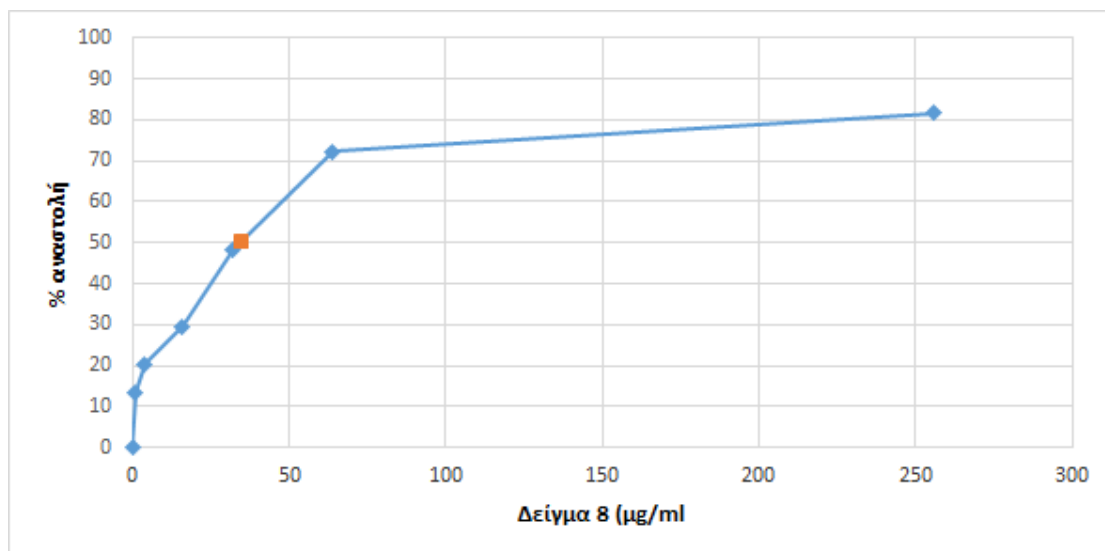
Διάγραμμα 4 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 45 μg/ml) του δείγματος 4 (**Crataegus orientalis**).



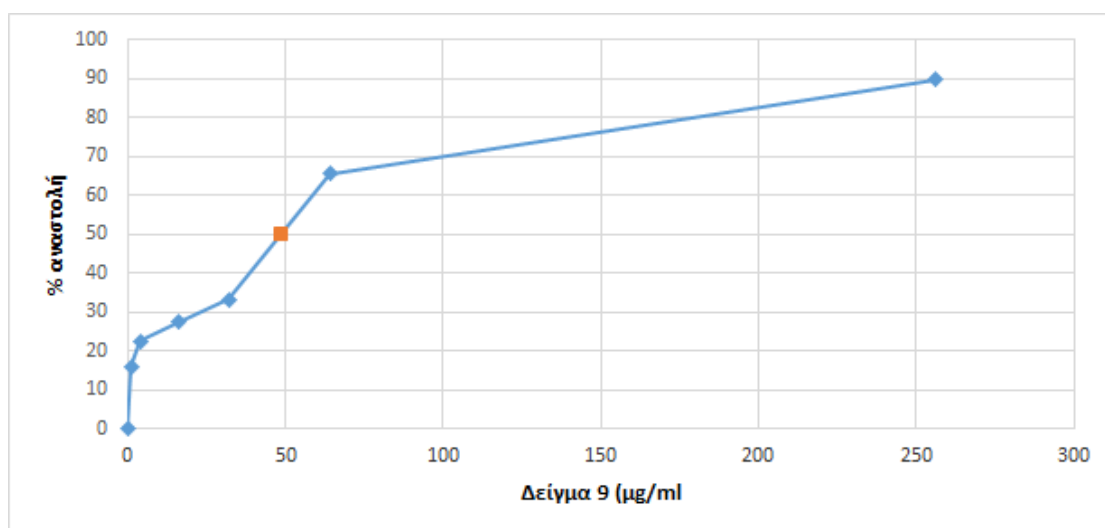
Διάγραμμα 5 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 52 μg/ml) του δείγματος 6 (**Prunus webii**).



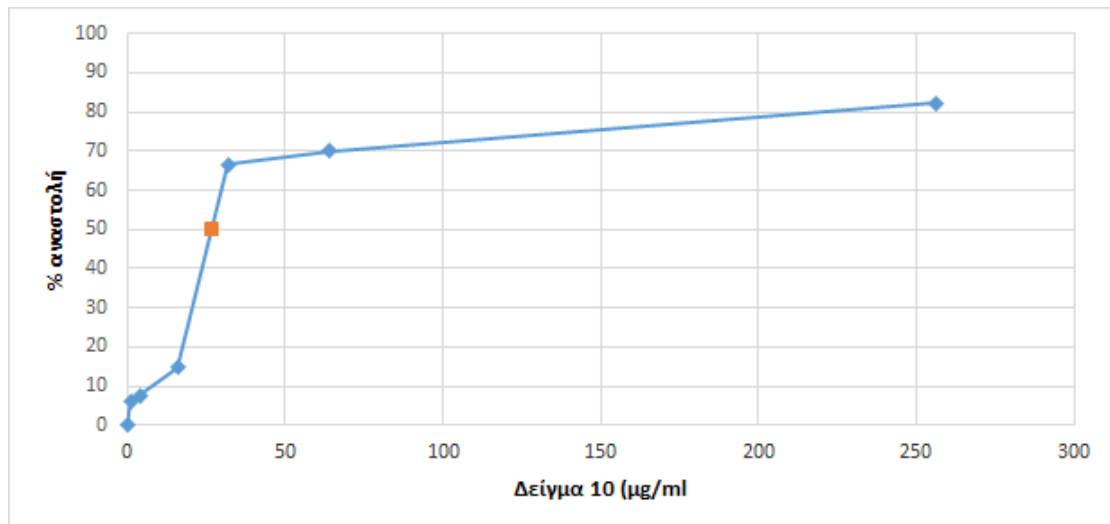
Διάγραμμα 6 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 35 μg/ml) του δείγματος 7 (**Rosa sempervirens**).



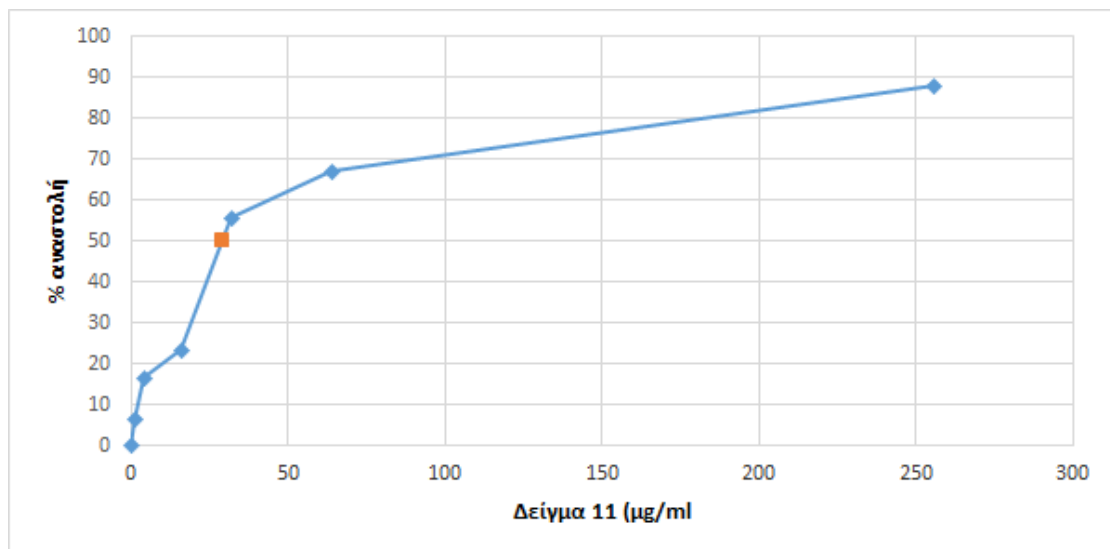
Διάγραμμα 7 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 35 μg/ml) του δείγματος 8 (**Rosa pulverulenta**)



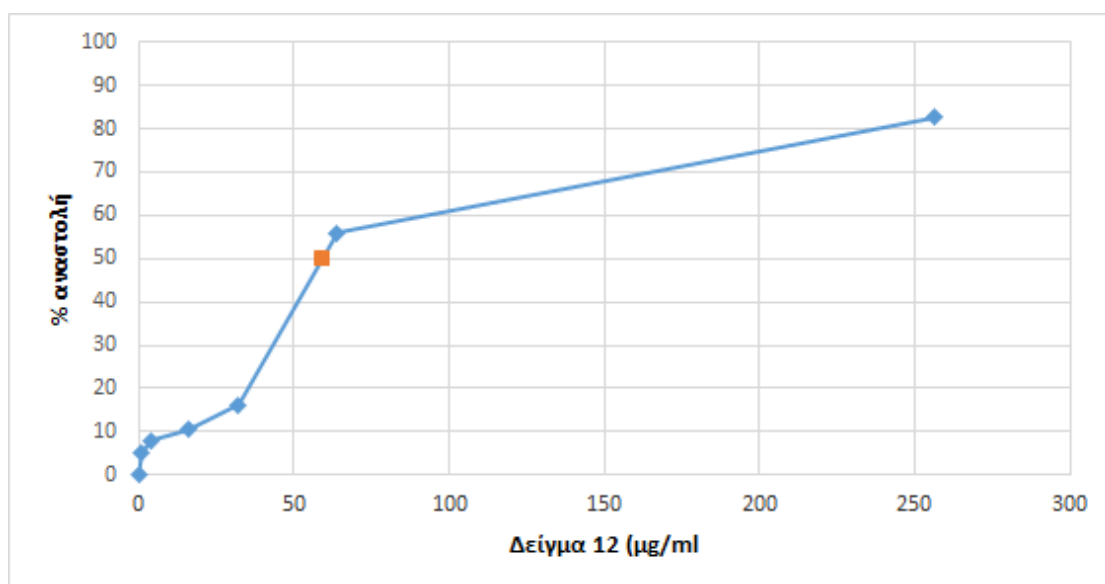
Διάγραμμα 8 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου (IC50: 49 μg/ml) του δείγματος 9 (**Prunus mahaleb**)



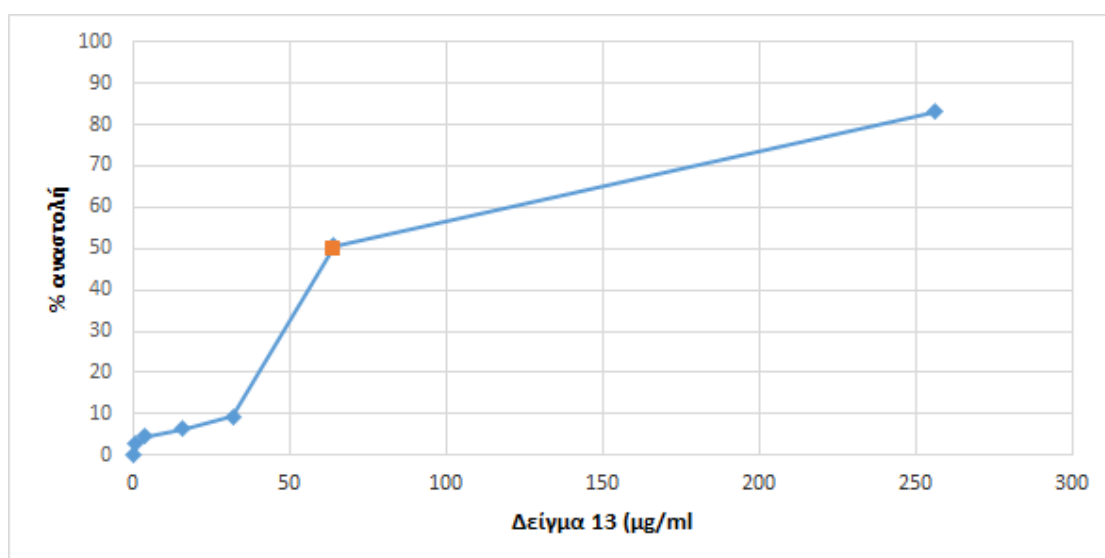
Διάγραμμα 9 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 27 µg/ml) του δείγματος 10 (**Potentilla recta**)



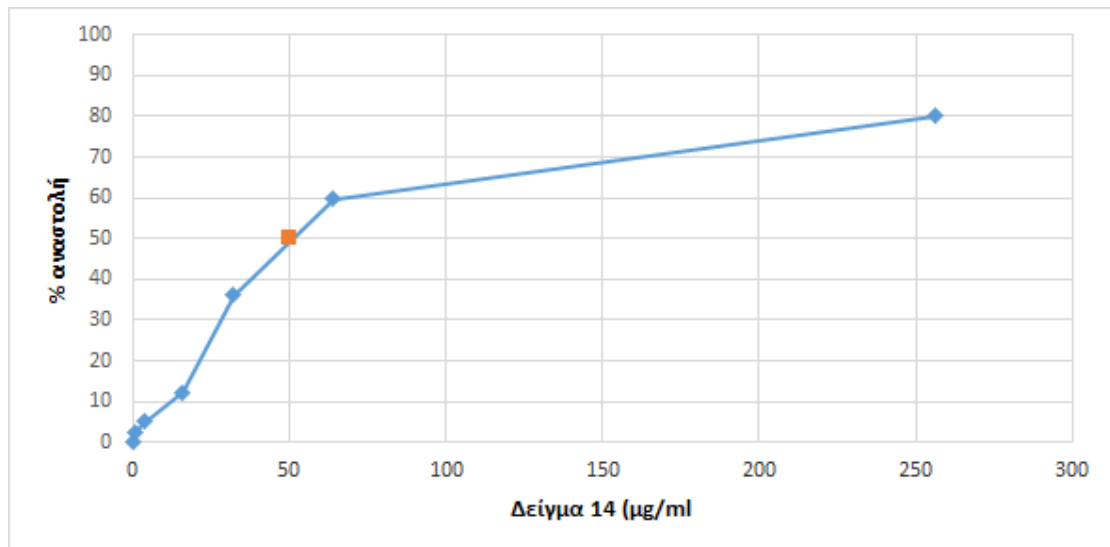
Διάγραμμα 10 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 29 µg/ml) του δείγματος 11 (**Sorbus umbellate**)



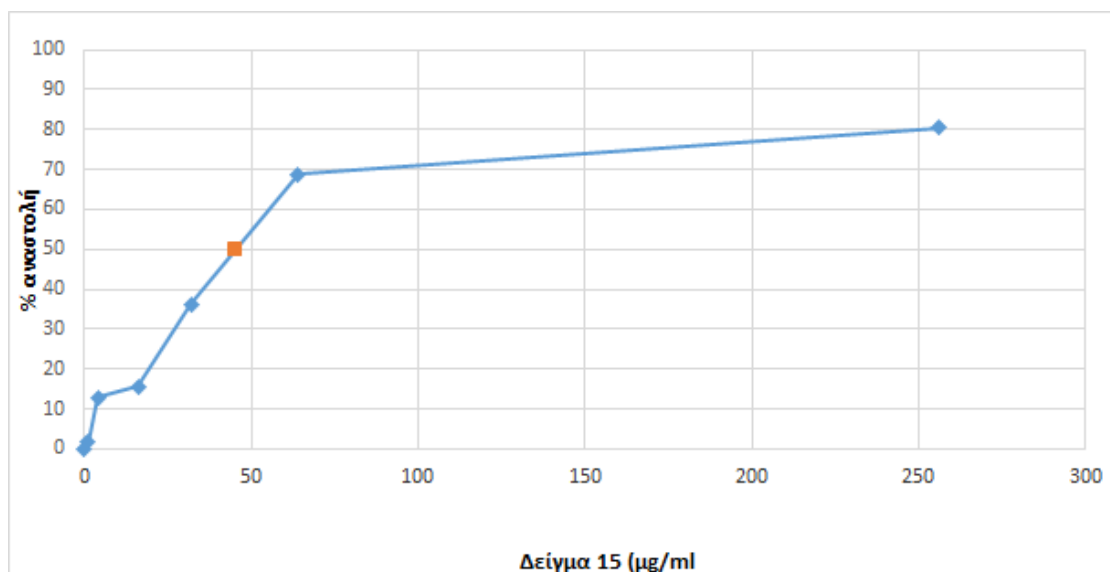
Διάγραμμα 11 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC₅₀: 59 μg/ml) του δείγματος 12 (**Aremonia agrimonoides**)



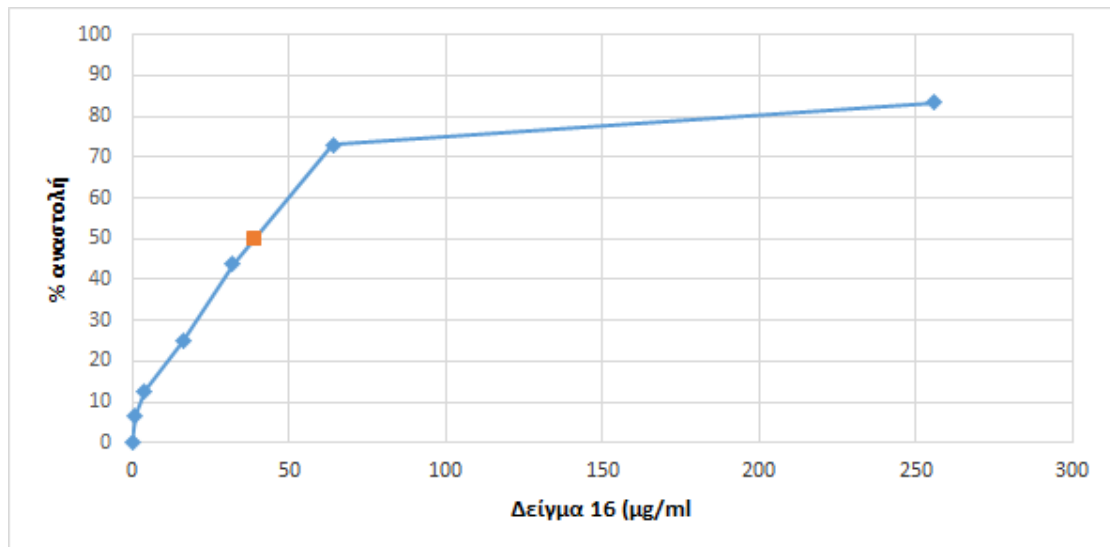
Διάγραμμα 12 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC₅₀: 64 μg/ml) του δείγματος 13 (**Geum urbanum**)



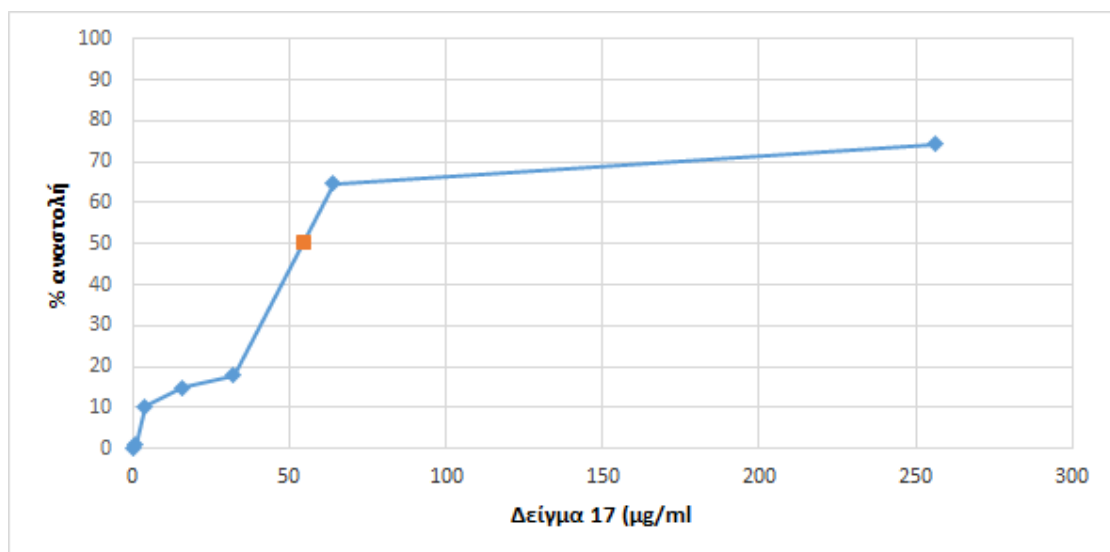
Διάγραμμα 13 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 50 μg/ml) του δείγματος 14 (**Potentilla pedata**)



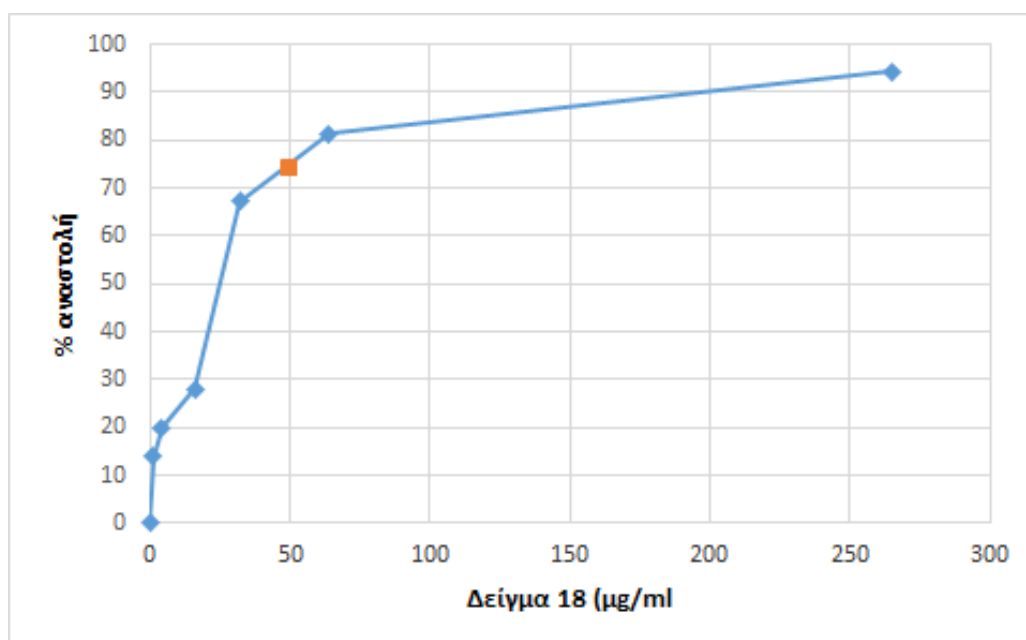
Διάγραμμα 14 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 45 μg/ml) του δείγματος 15 (**Alchemilla bulgarica**)



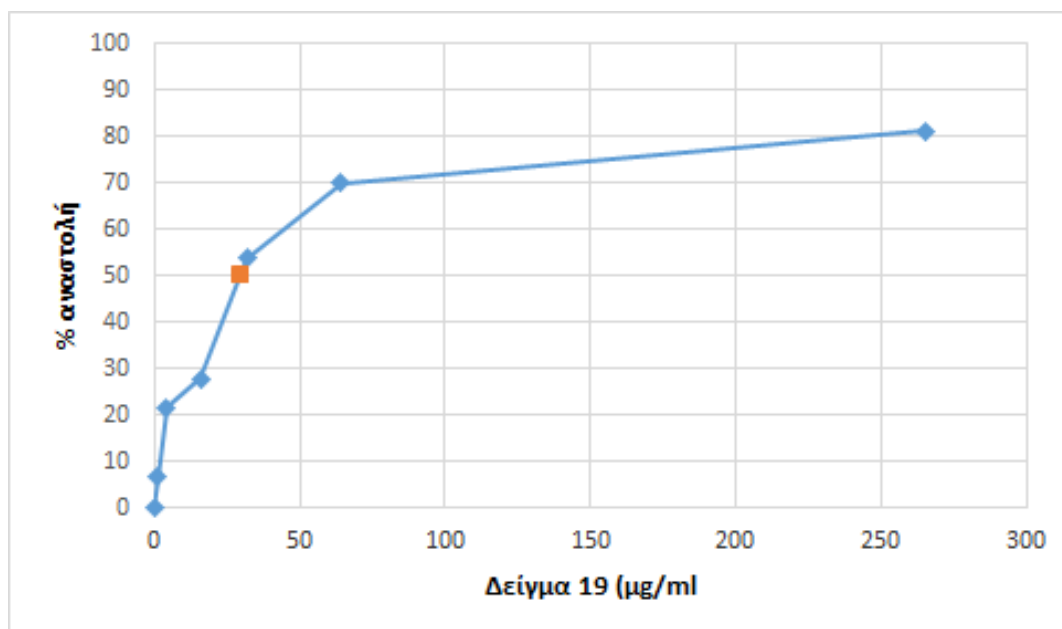
Διάγραμμα 15 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC₅₀: 39 μg/ml) του δείγματος 16 (**Alchemilla xanthochlora**)



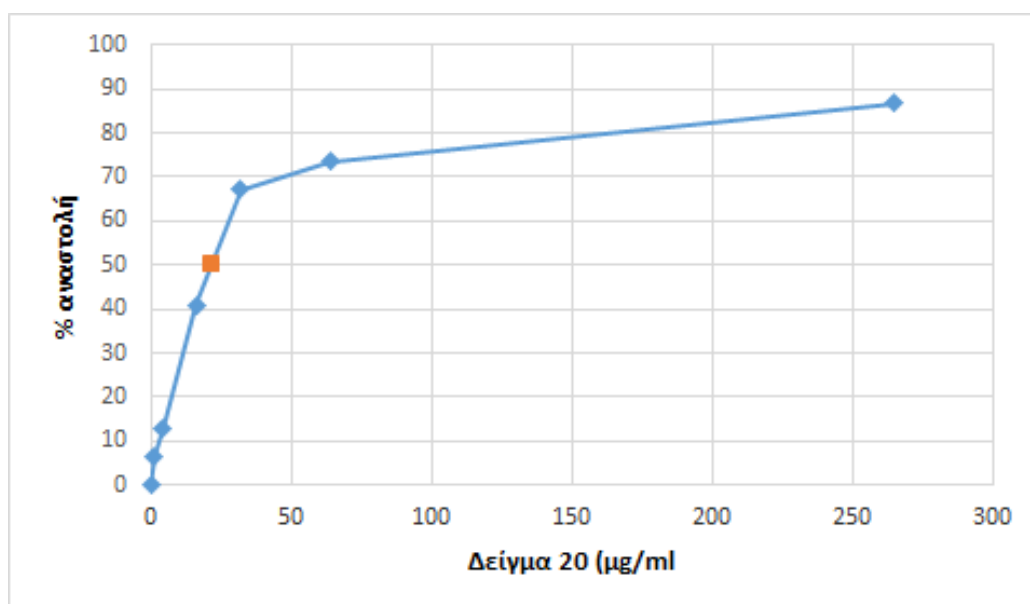
Διάγραμμα 16 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC₅₀: 55 μg/ml) του δείγματος 17 (**Potentilla speciosa**)



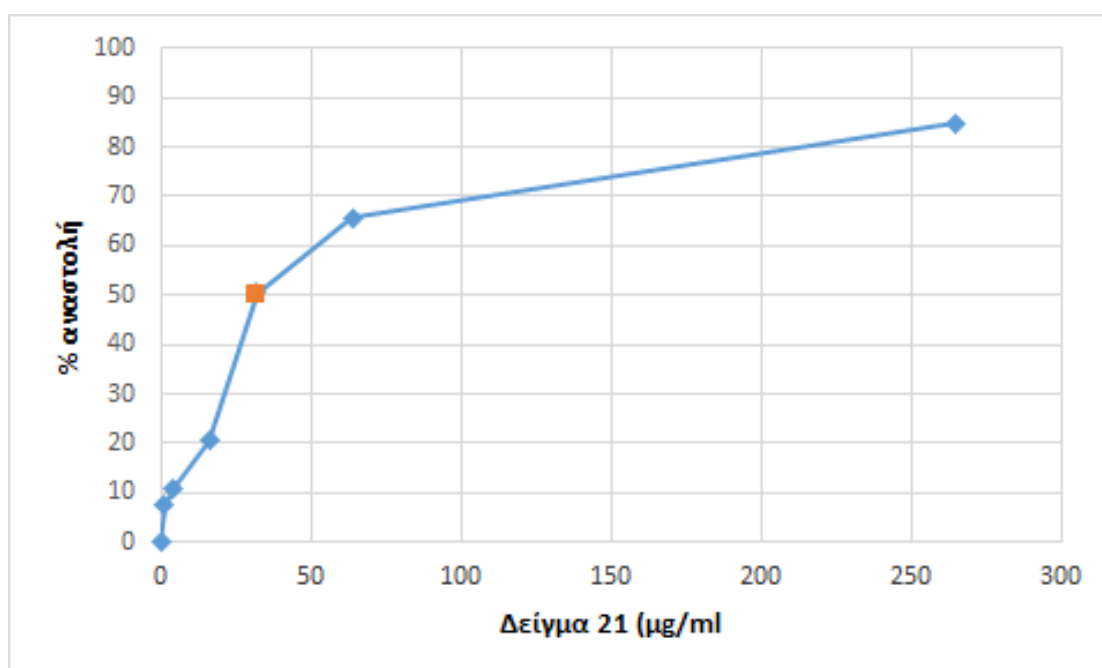
Διάγραμμα 17 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 50 µg/ml) του δείγματος 18 (**Fragaria vesca**)



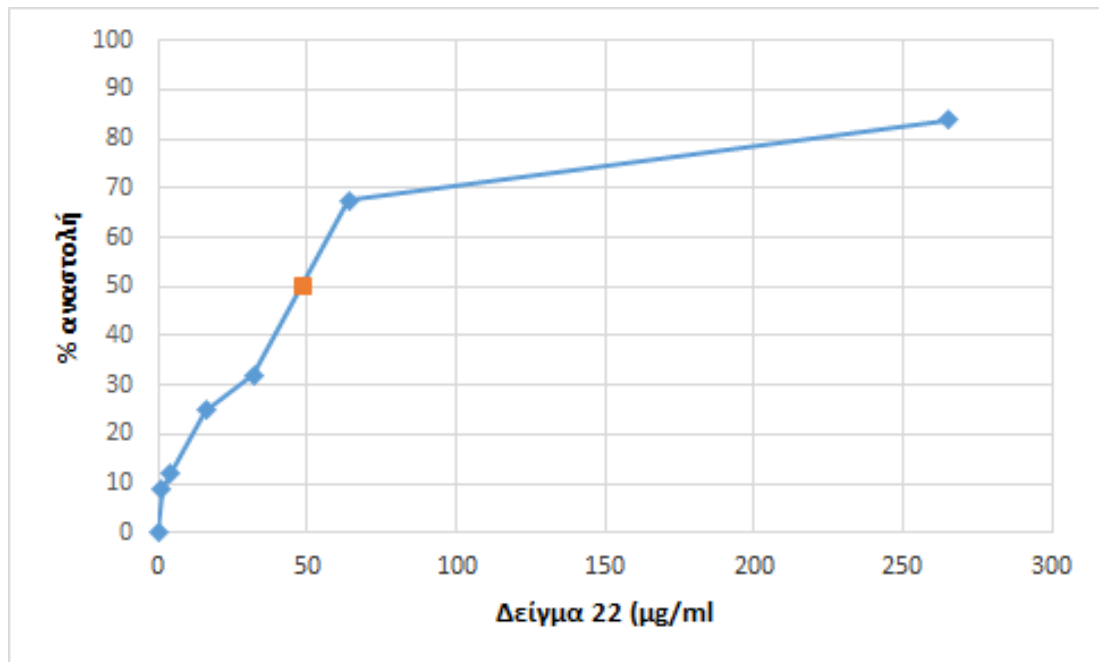
Διάγραμμα 18 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 30 µg/ml) του δείγματος 19 (**Rubus idaeus**)



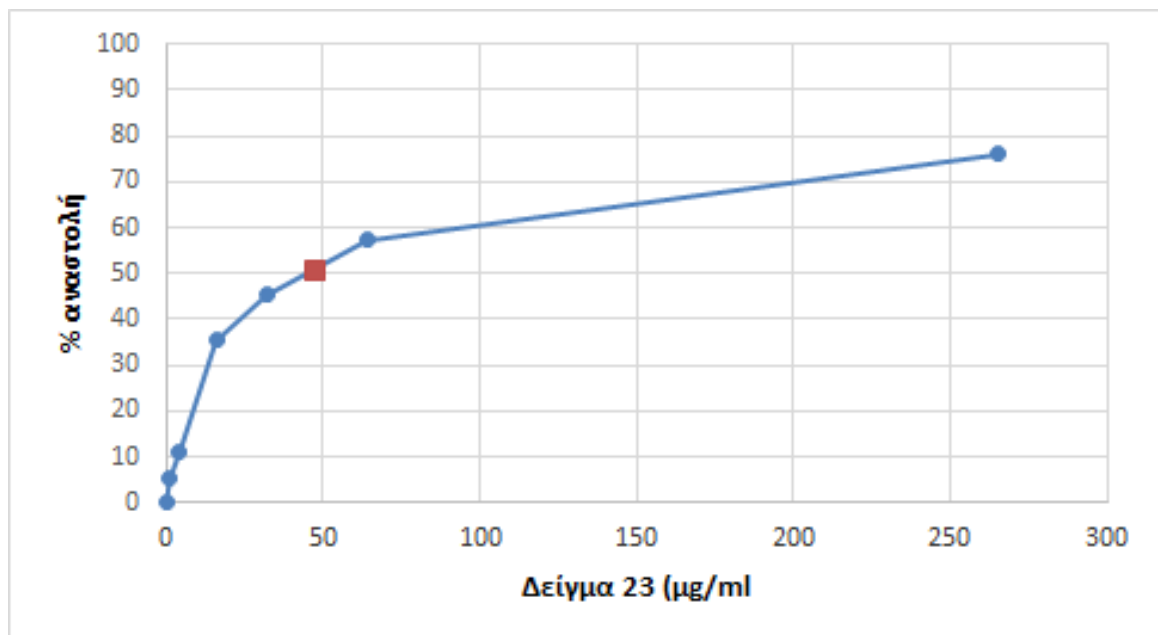
Διάγραμμα 19 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 22 μg/ml) του δείγματος 20 (**Prunus prostrata**)



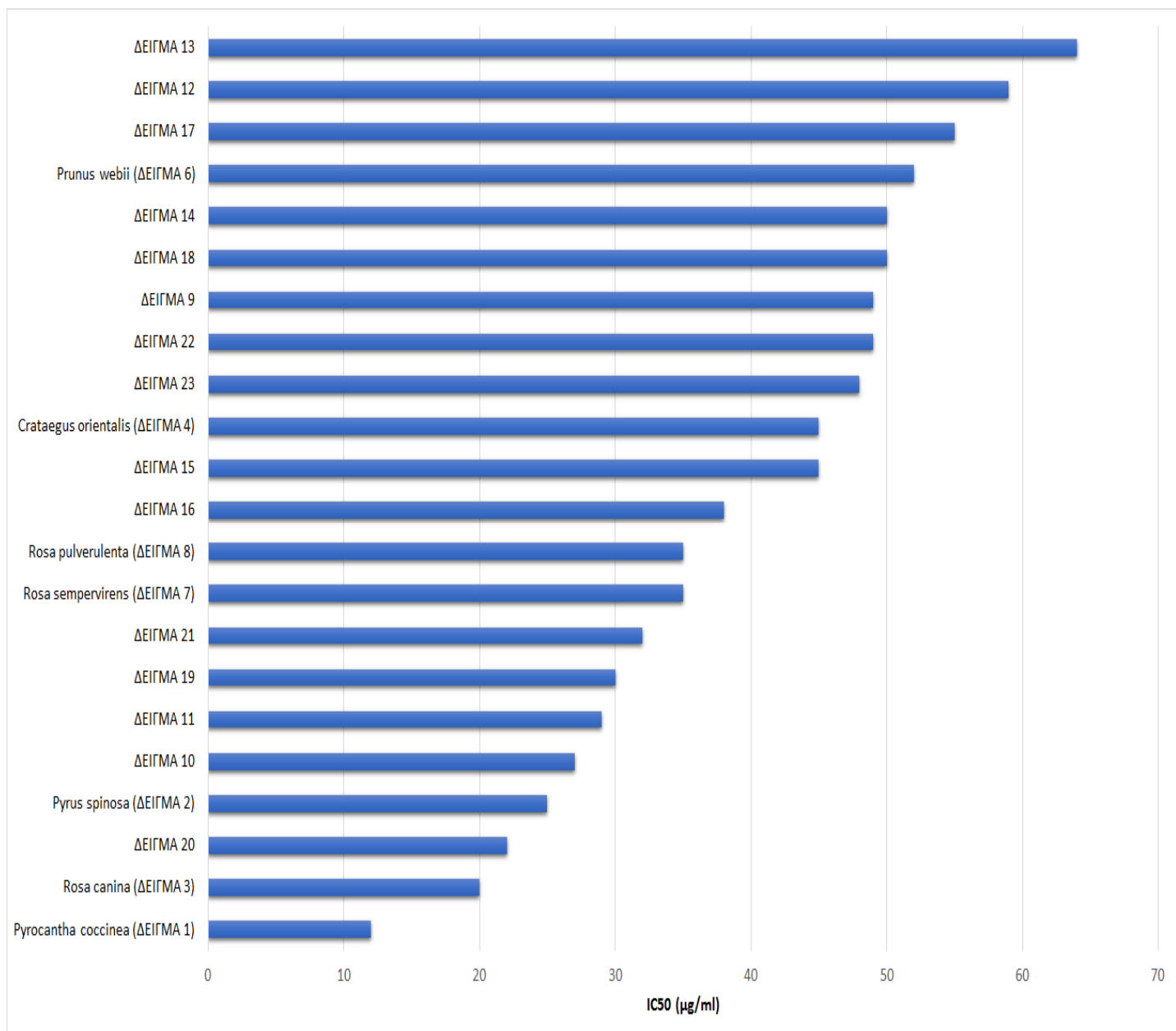
Διάγραμμα 20 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 32 μg/ml) του δείγματος 21 (**Rosa arvensis**)



Διάγραμμα 21 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 49 μg/ml) του δείγματος 22 (**Sanguis orbaofficialis**)

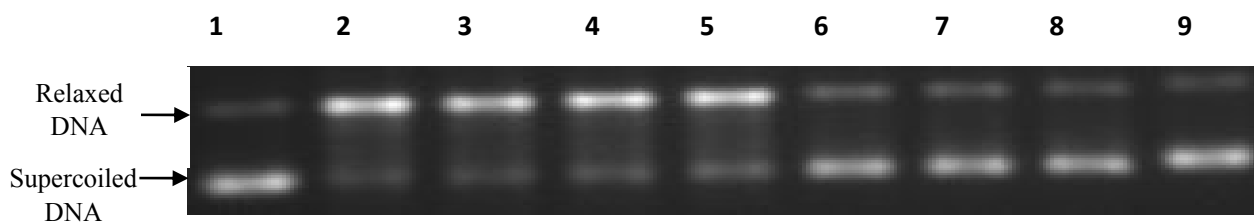


Διάγραμμα 22 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA (IC50: 48 μg/ml) του δείγματος 23 (**Potentilla hiyraldiana**)



Διάγραμμα 23 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 εκχυλισμάτων από φυτά Rosaceae της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΡΟΔΙΩΝ



Εικόνα 23 : Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του δείγματος W1 σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 1 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 4 μg/ml εκχυλίσματος

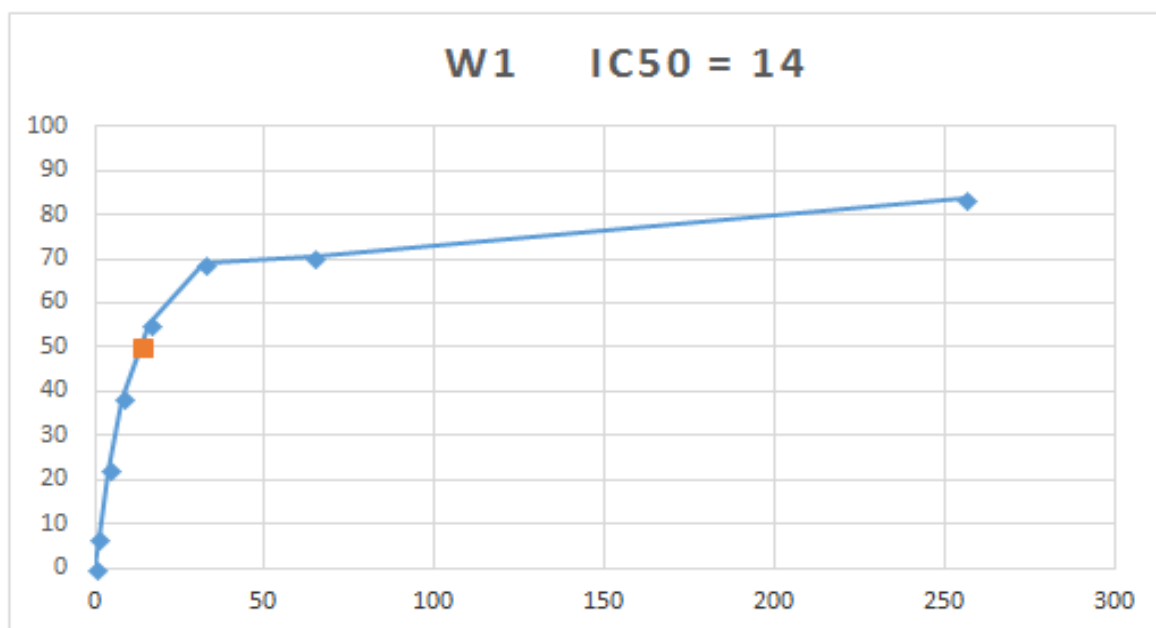
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 16 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 32 μg/ml εκχυλίσματος

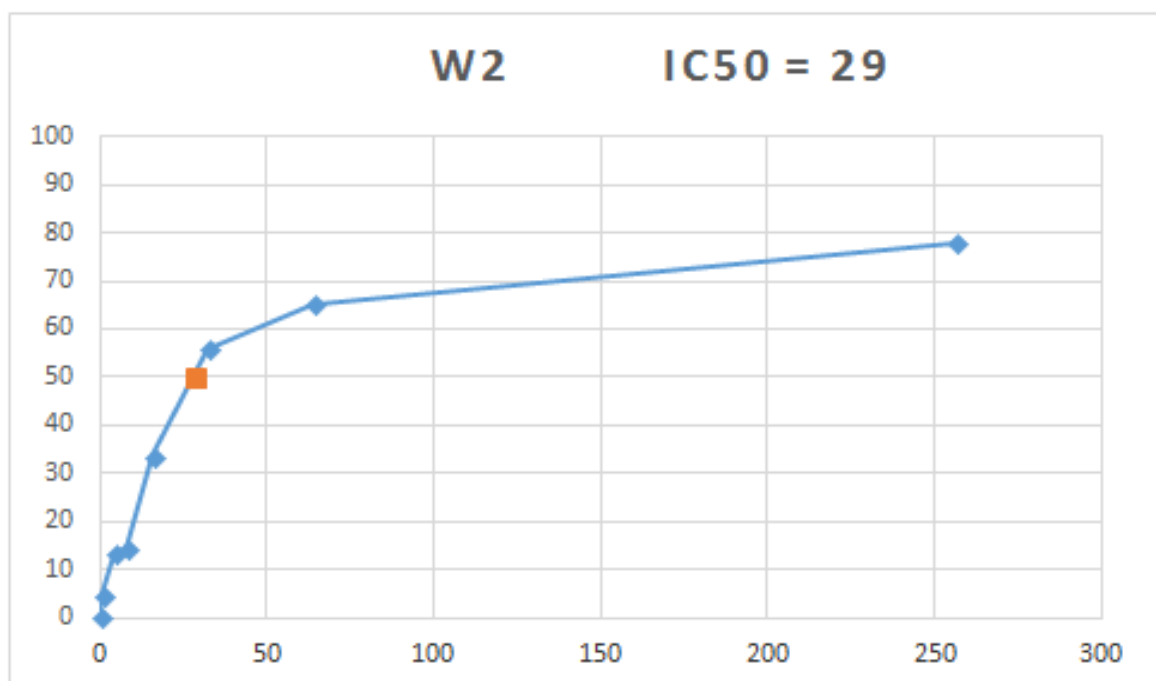
Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 64 μg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 256 μg/ml εκχυλίσματος

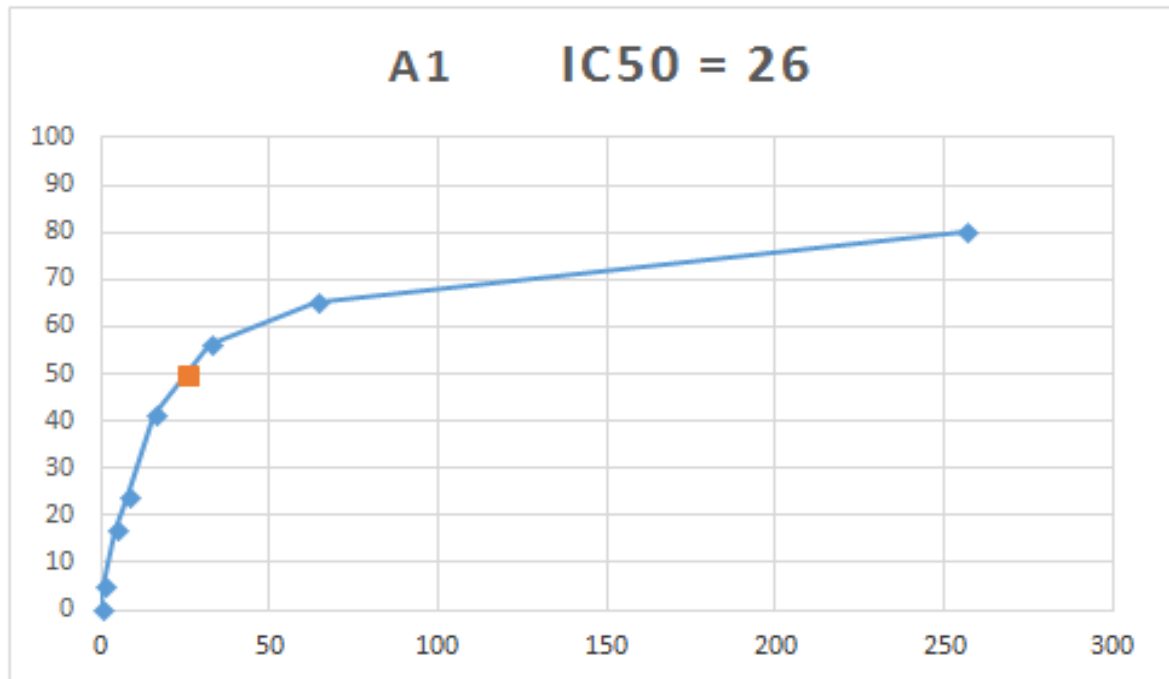
Σειρά 9: DNA plasmid + 256 μg/ml εκχυλίσματος



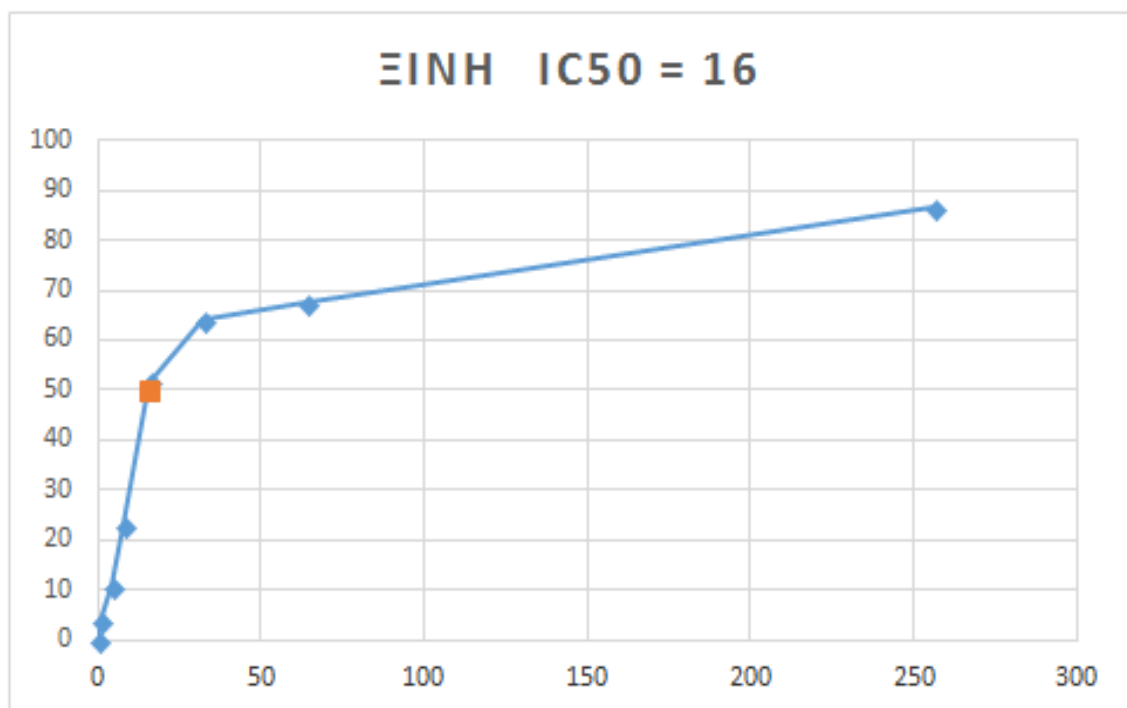
Διάγραμμα 24 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος W1 (Wonderful, βρώσιμο τμήμα)



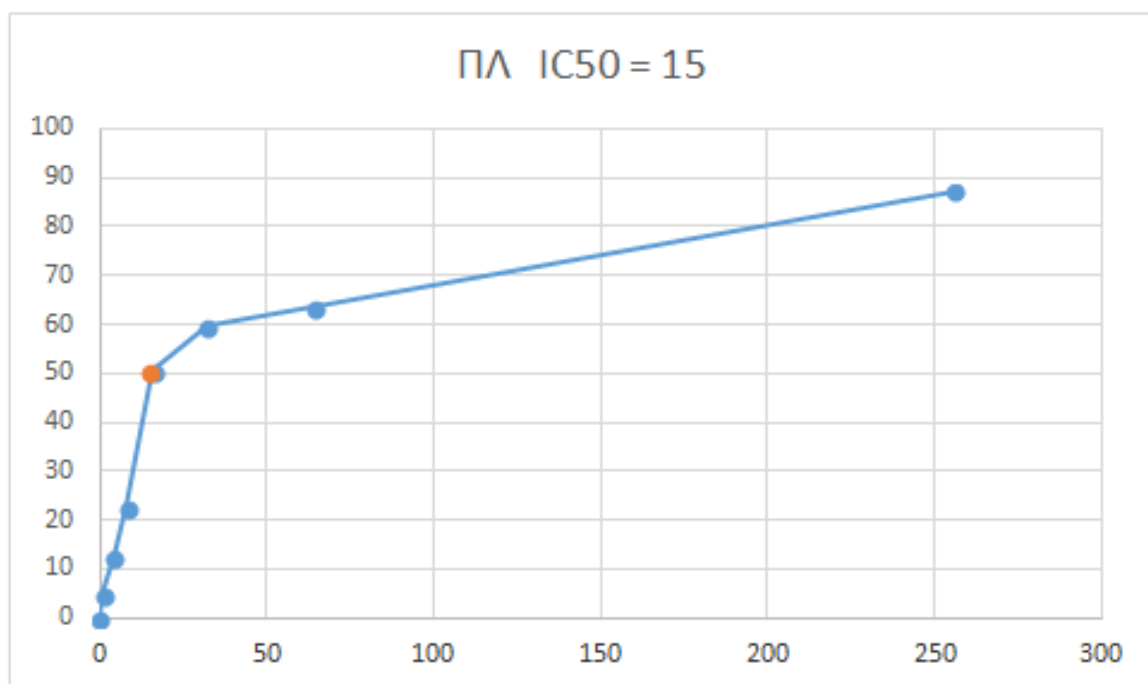
Διάγραμμα 25 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος W2 (Wonderful, φλοιός)



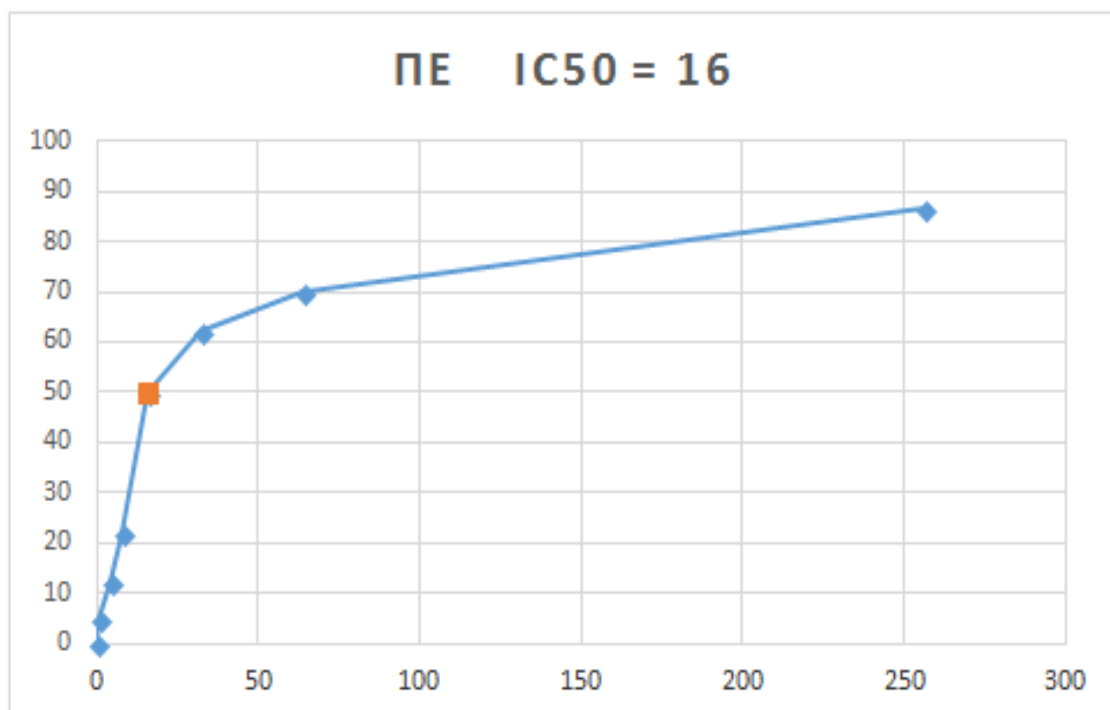
Διάγραμμα 26 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος A1 (Wonderful, από υποπροϋόντα χυμοποίησης)



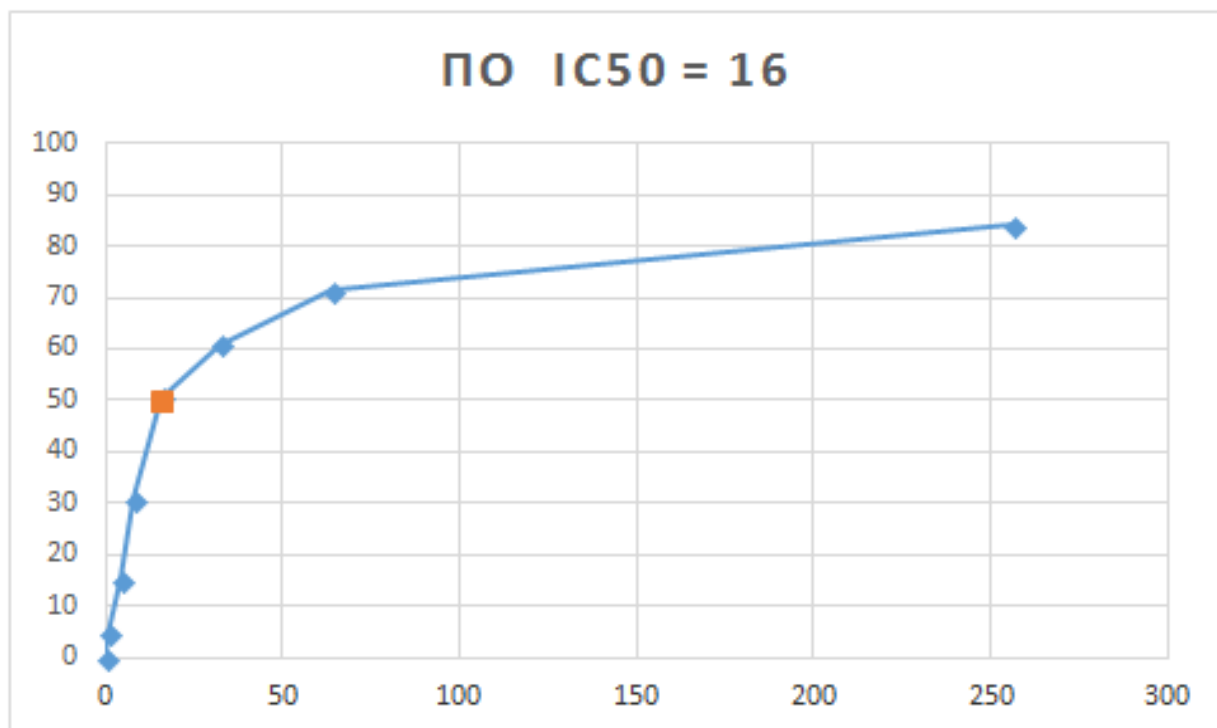
Διάγραμμα 27 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος ΞΙΝΗ (Ξινή Ερμιόνης, βρώσιμο τμήμα)



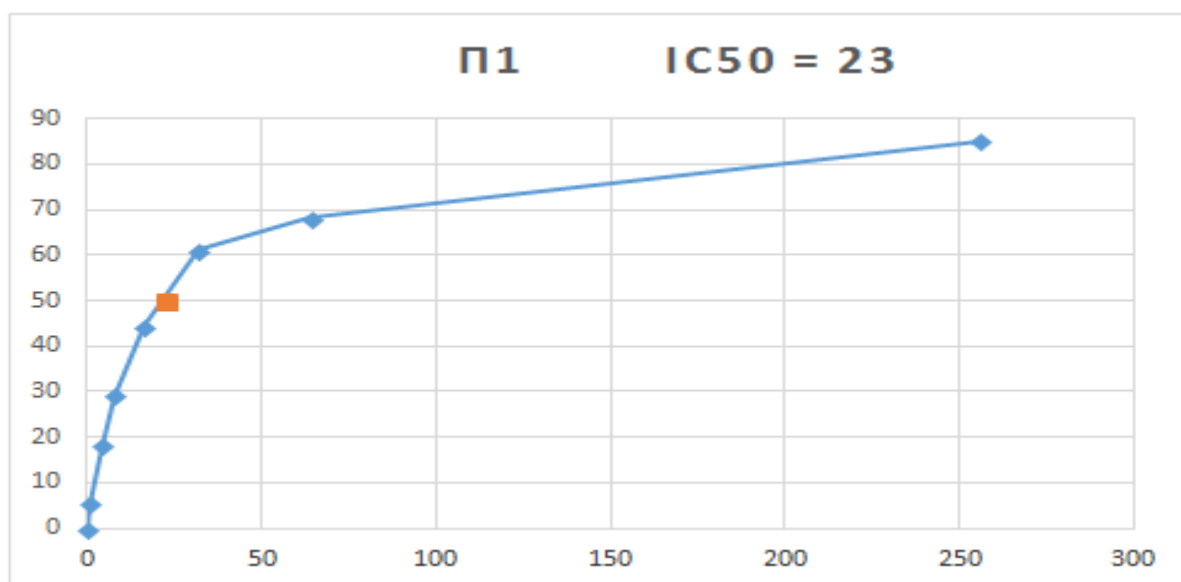
Διάγραμμα 28 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος ΠΛ (**Πλούτο, βρώσιμο τιμήμα**)



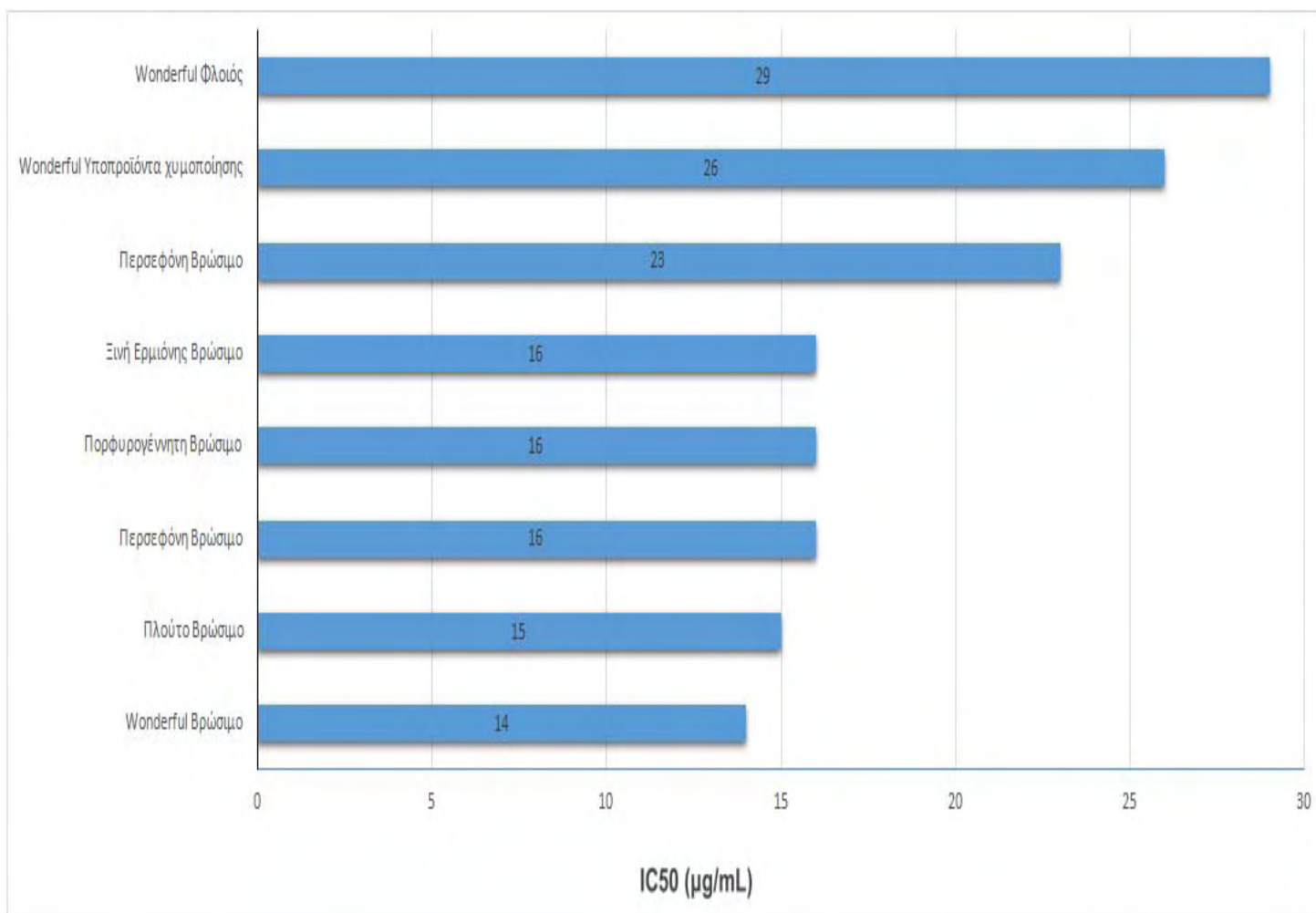
Διάγραμμα 29 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος ΠΕ (**Περσεφόνη, βρώσιμο τιμήμα**)



Διάγραμμα 30 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος ΠΟ (Πορφυρογέννητη, βρώσιμο τμήμα)



Διάγραμμα 31 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα περοξυλίου του δείγματος Π1 (Περσεφόνη, βρώσιμο τμήμα)



Διάγραμμα 32 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ροδιά της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων Rosaceae και Punica Granatum (Ροδιά) στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.

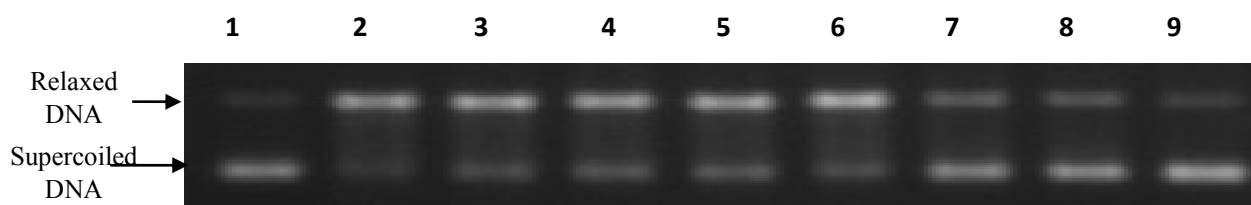
Στην μέθοδο αυτή εξετάστηκαν 22 εκχυλίσματα από τα Rosaceae (το δείγμα 5, Rubussanctus, δεν ήταν διαλυτό στο νερό με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει η εξέτασή του) και 8 από Punica Granatum (Ροδιά). Τα εκχυλίσματα από όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου (OH•), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 55 (Rosaceae) και 64 (ρόδια) είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από 180 μg/ml έως 1120μg/ml για τα Rosaeae και από .

Την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα στα εκχυλίσματα έδειξε το δείγμα 3 (Rosa canina) με τιμή IC₅₀ ίση με 180 μg/ml (Διάγραμμα 35) κοντά στο IC₅₀ του δείγματος 11 (Sorbus umbellata) και 1 (Pyracantha coccinea) με IC₅₀ 245 μg/ml και 250 μg/ml αντιστοιχα. Το εκχύλισμα 13 (Geum urbanum) (Διάγραμμα 44) εμφάνισε πολύ υψηλή τιμή IC₅₀ (1120μg/ml) σε σχέση με τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, δηλαδή παρουσίασε την μικρότερη αντιοξειδωτική/αντιμεταλλαξιγόνο δράση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ROSACEAE



Εικόνα 24 : Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του δείγματος 3 σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNAplasmid

Σειρά 2: DNAplasmid + H₂O₂

Σειρά 3: DNAplasmid + H₂O₂+ 48 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNAplasmid + H₂O₂+ 96 µg/ml εκχυλίσματος

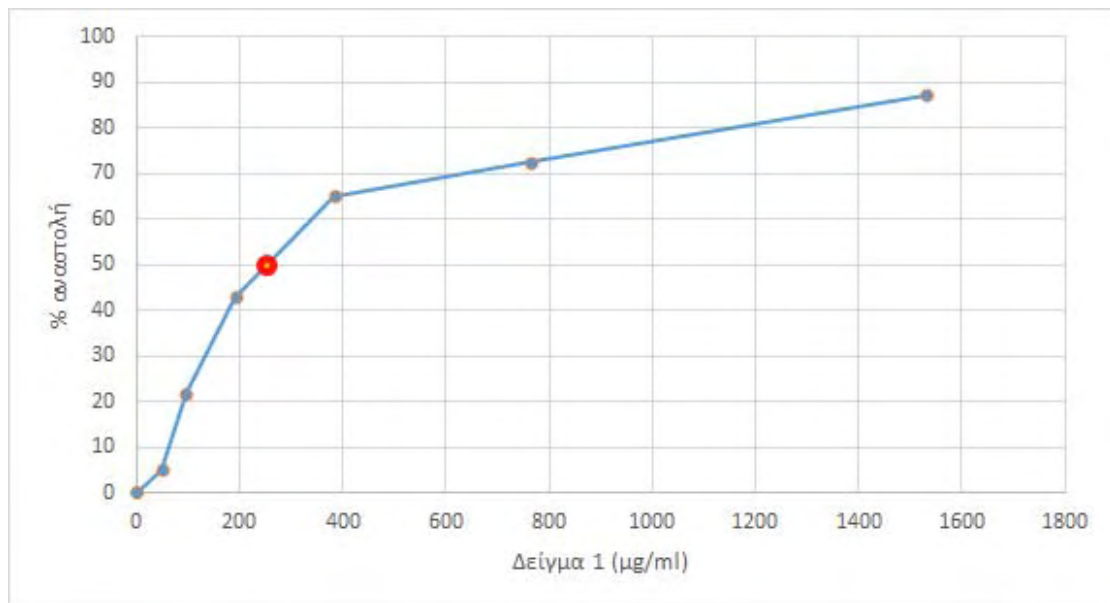
Σειρά 5: DNAplasmid + H₂O₂+ 191 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNAplasmid + H₂O₂+ 383 µg/ml εκχυλίσματος

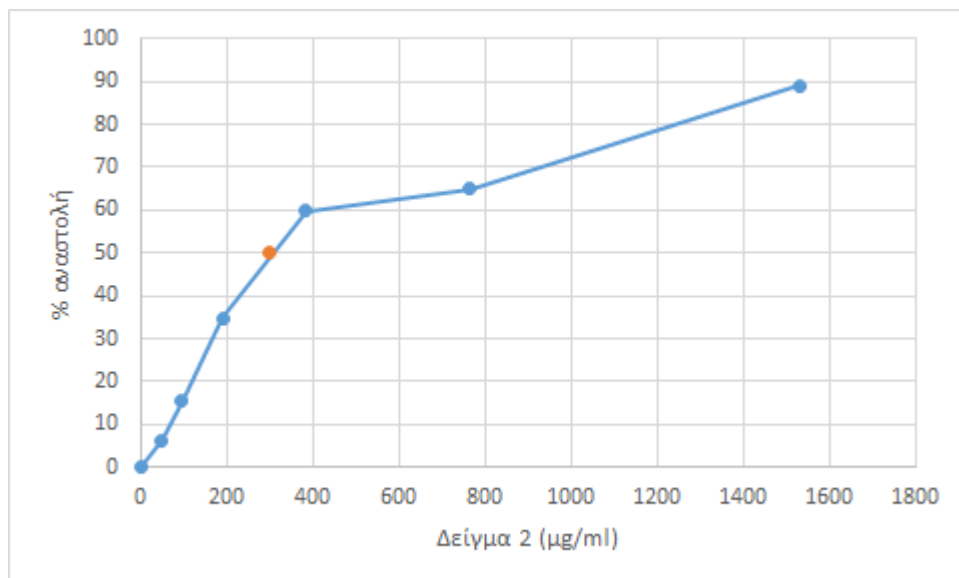
Σειρά 7: DNAplasmid + H₂O₂+ 765 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNAplasmid + H₂O₂+ 1530 µg/ml εκχυλίσματος

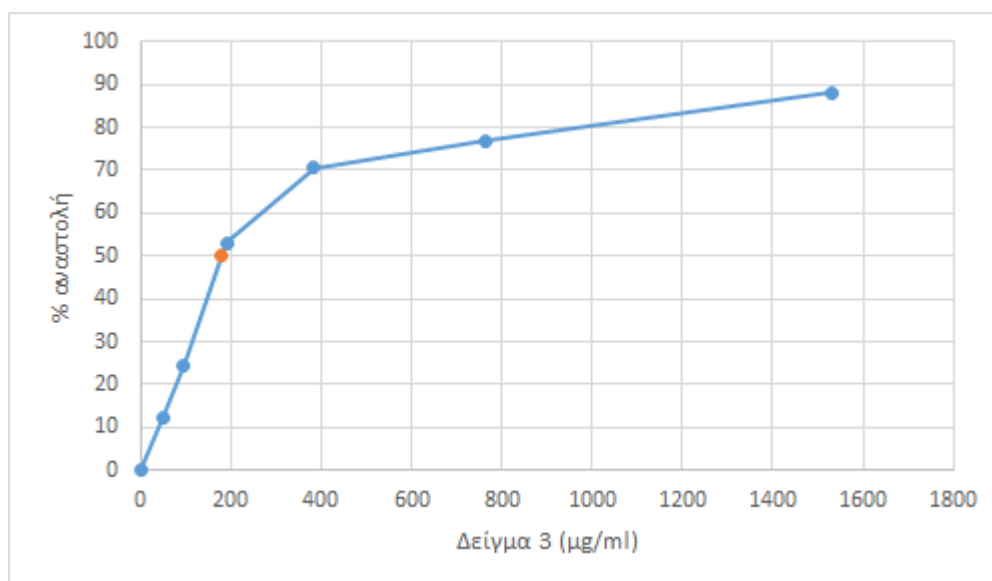
Σειρά 9: DNAplasmid + 1530 µg/ml εκχυλίσματος



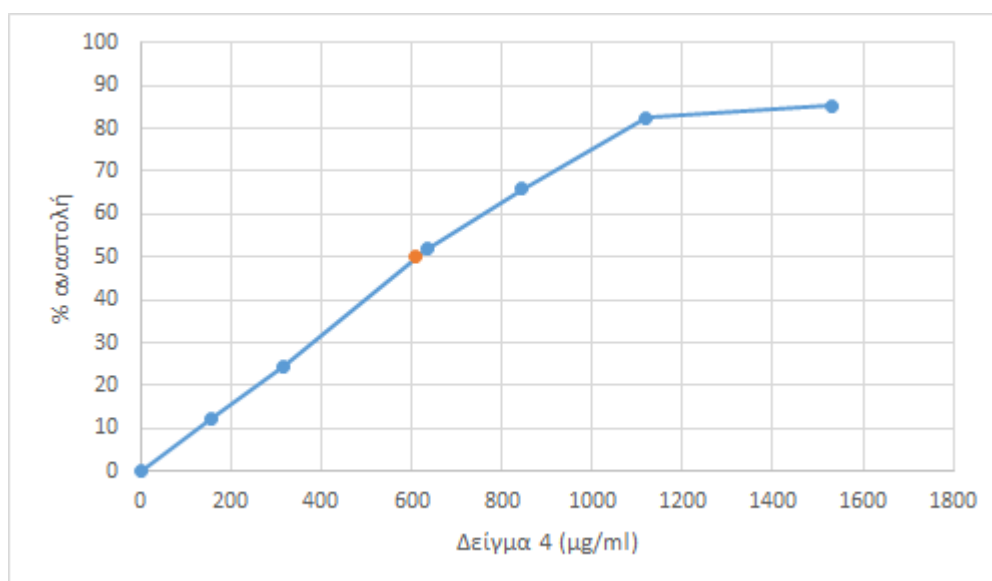
Διάγραμμα 33 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 250 μg/ml) του δείγματος 1 (**Pyracantha coccinea**)



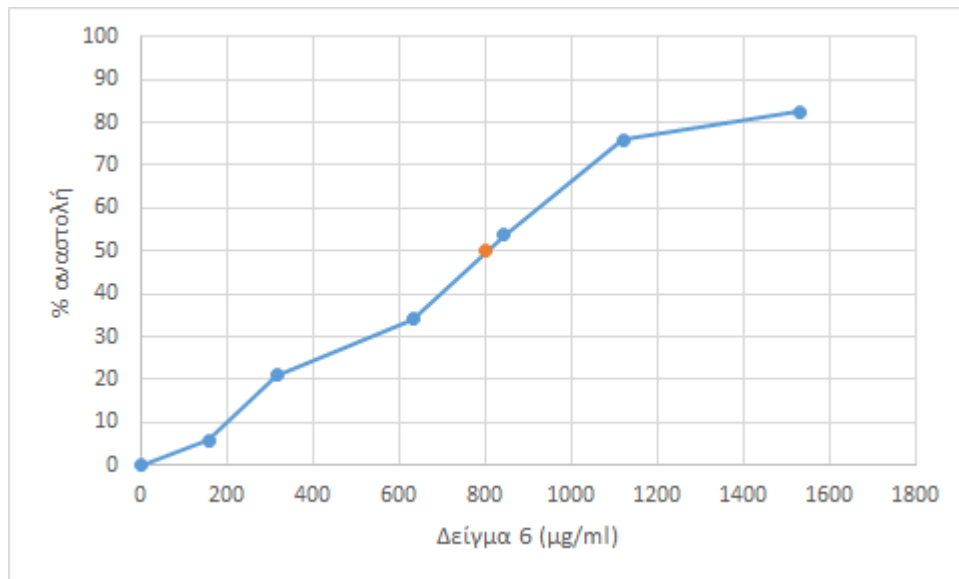
Διάγραμμα 34 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 300 μg/ml) του δείγματος 2 (**Pyrus spinosa**)



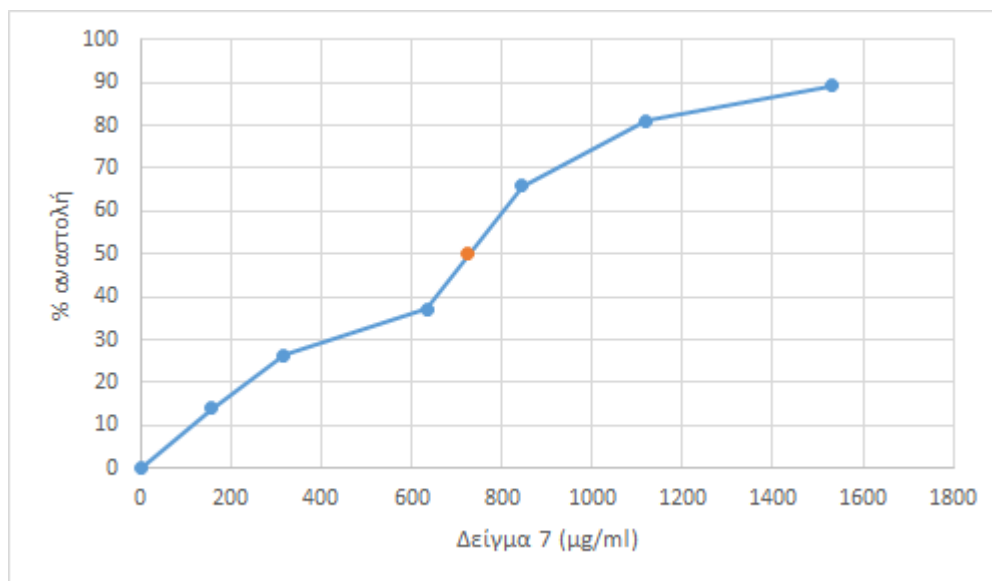
Διάγραμμα 35 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 180 μg/ml) του δείγματος 3 (**Rosa canina**)



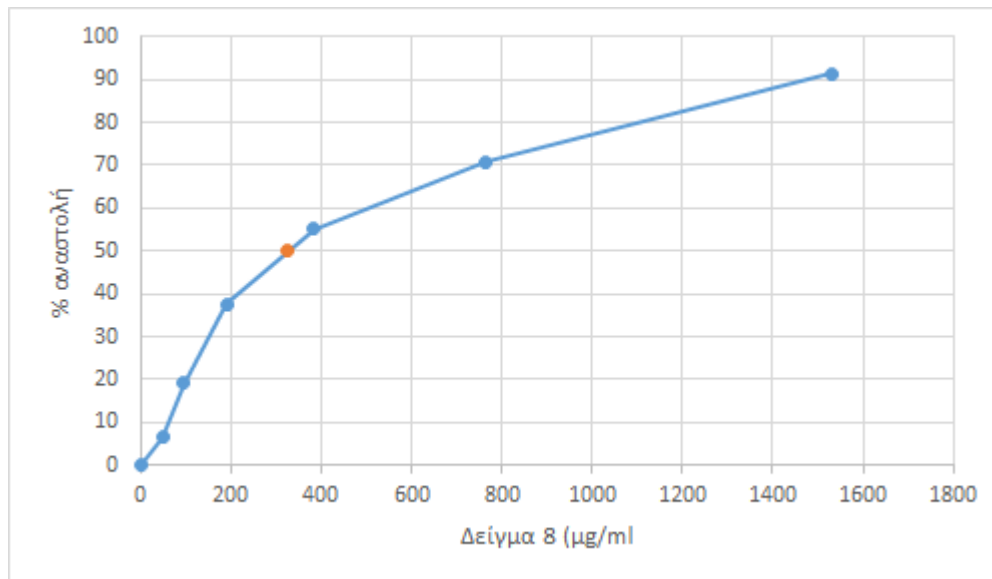
Διάγραμμα 36 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 610 μg/ml) του δείγματος 4 (**Crataegus orientalis**)



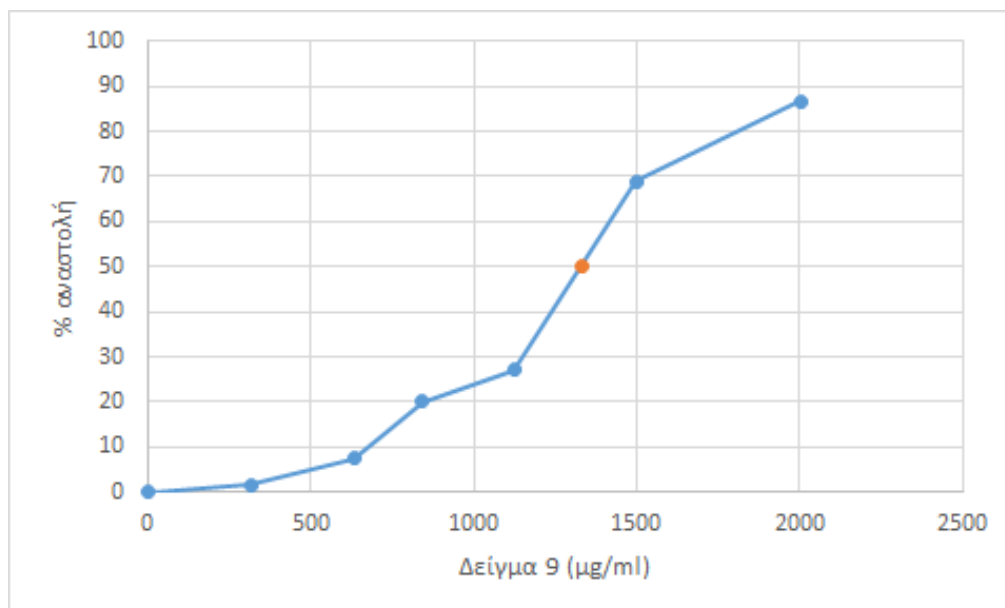
Διάγραμμα 37 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 800 μg/ml) του δείγματος 6 (**Prunus webii**)



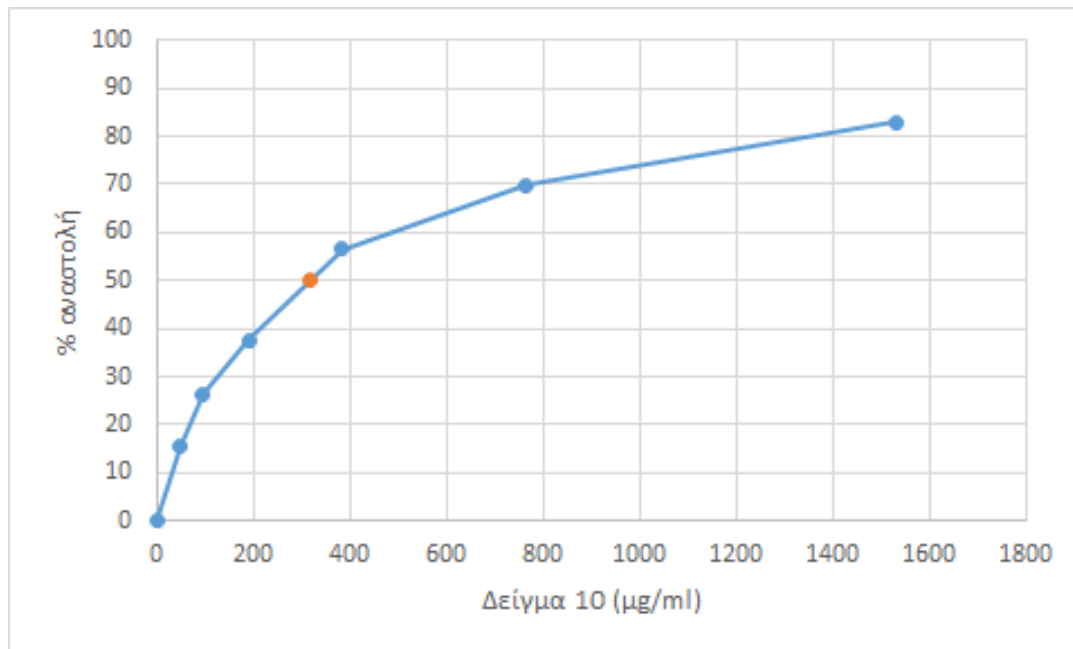
Διάγραμμα 38 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 725 μg/ml) του δείγματος 7 (**Rosa sempervirens**)



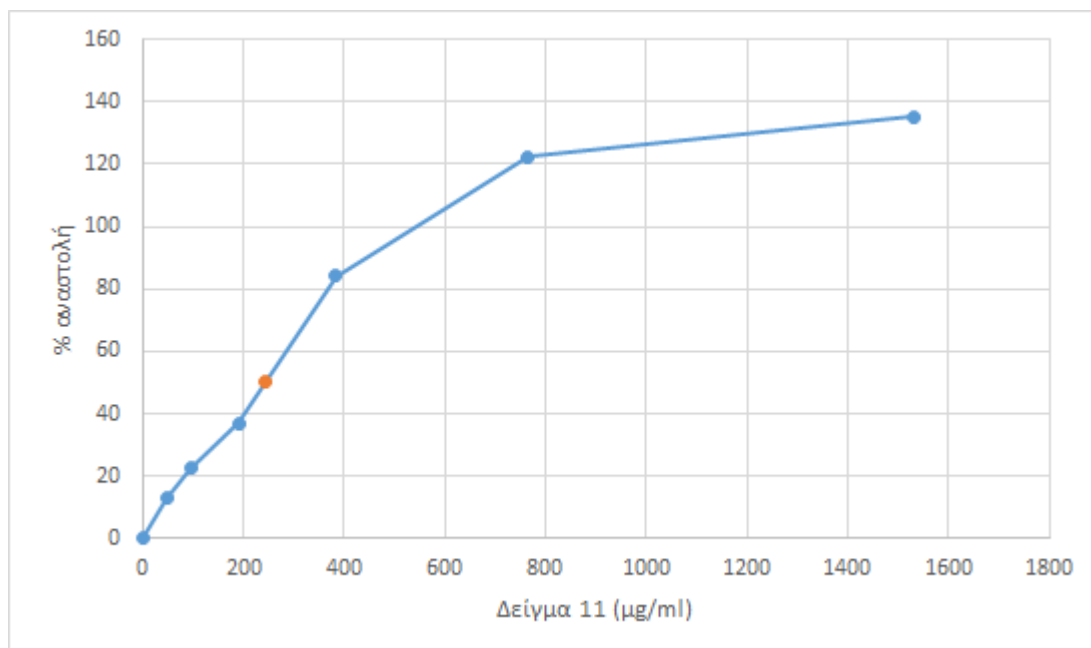
Διάγραμμα 39 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 325 μg/ml) του δείγματος 8 (**Rosa pulverulenta**)



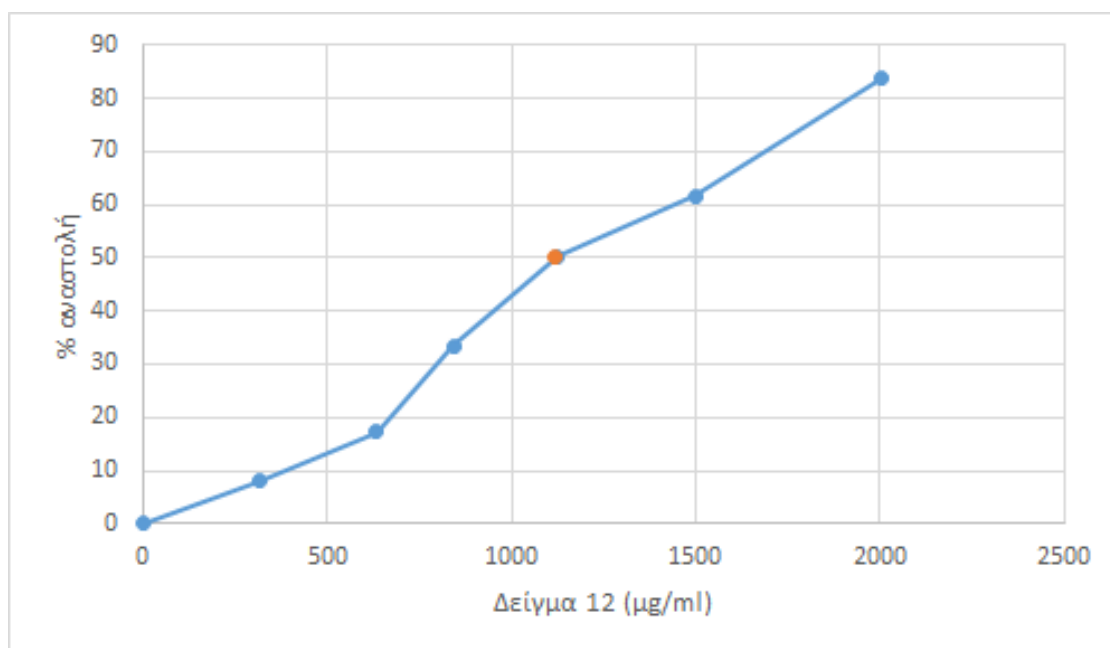
Διάγραμμα 40 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 1330 μg/ml) του δείγματος 9 (**Prunus mahaleb**)



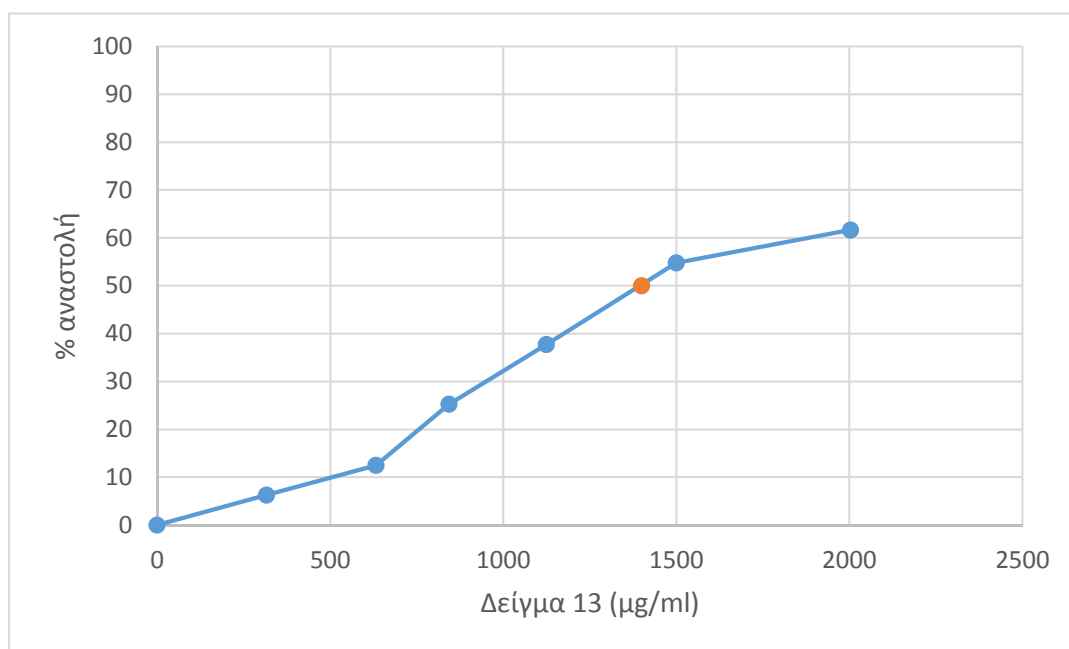
Διάγραμμα 41 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 315 μg/ml) του δείγματος 10 (**Potentilla recta**)



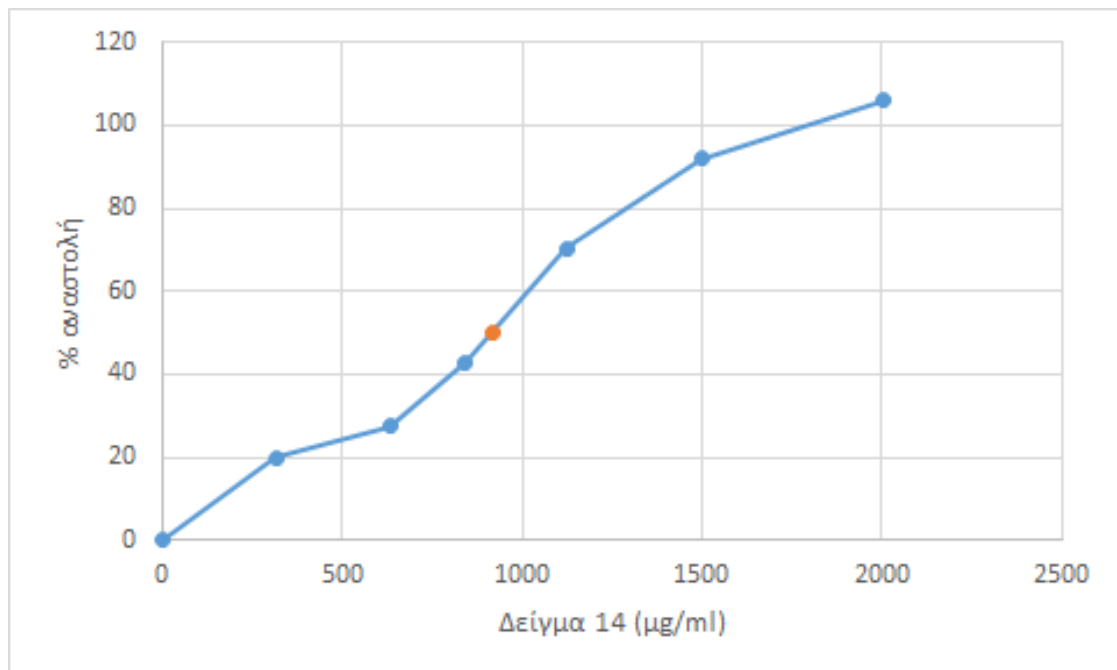
Διάγραμμα 42 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 245 μg/ml) του δείγματος 11 (**Sorbus umbellate**)



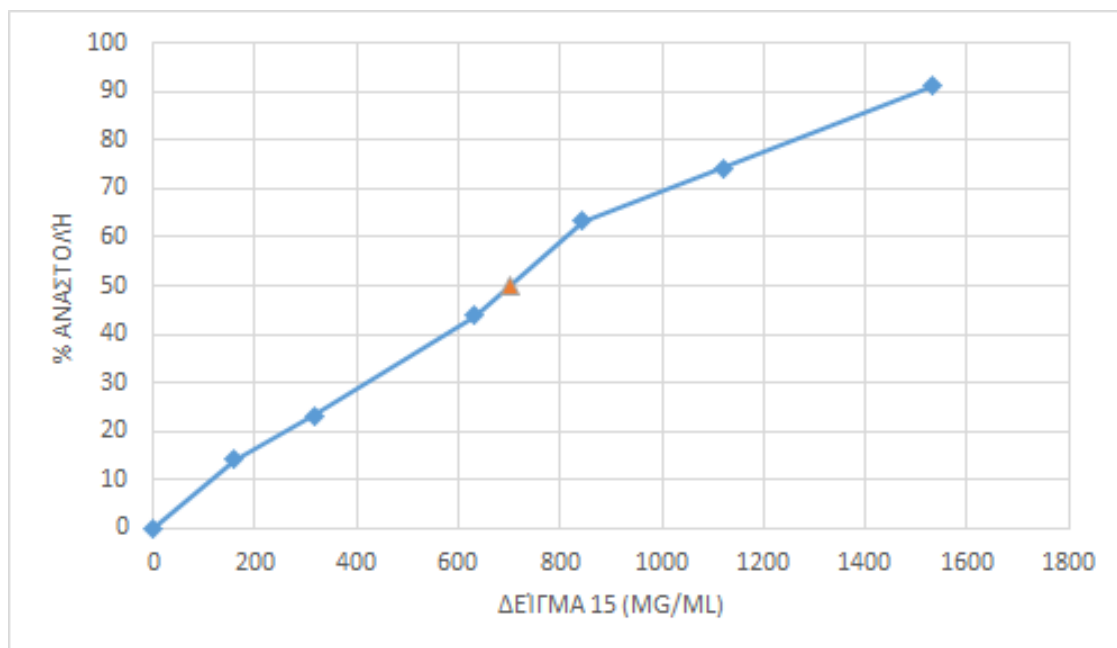
Διάγραμμα 43 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 1120 µg/ml) του δείγματος 12 (**Aremonia agrimonoides**)



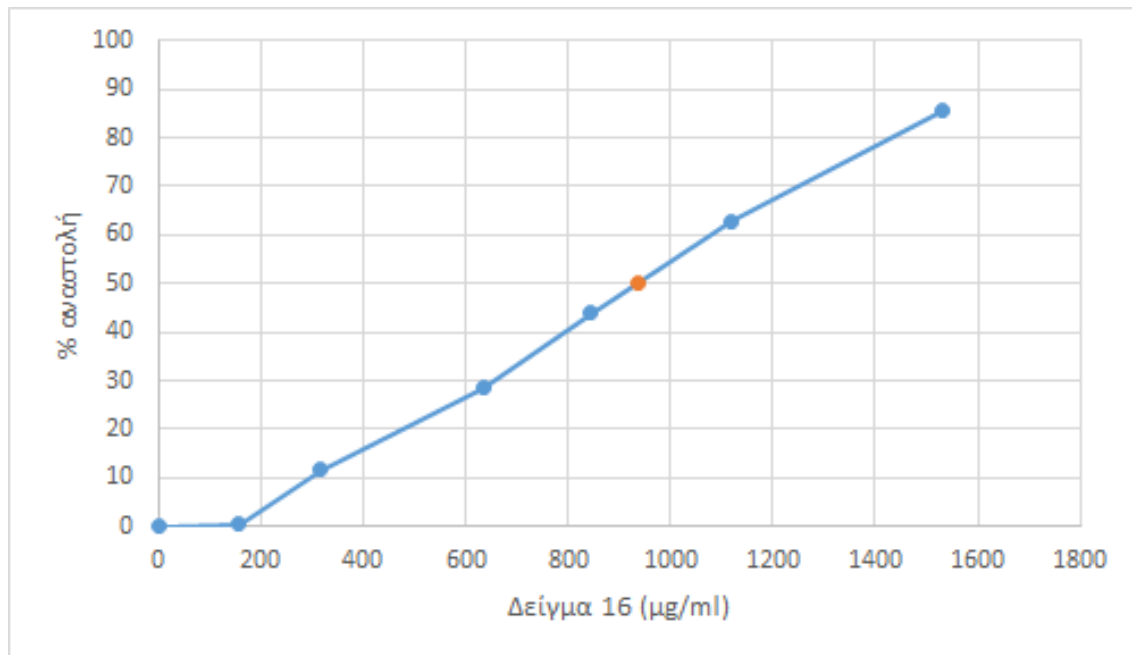
Διάγραμμα 44 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 1400 µg/ml) του δείγματος 13 (**Geum urbanum**)



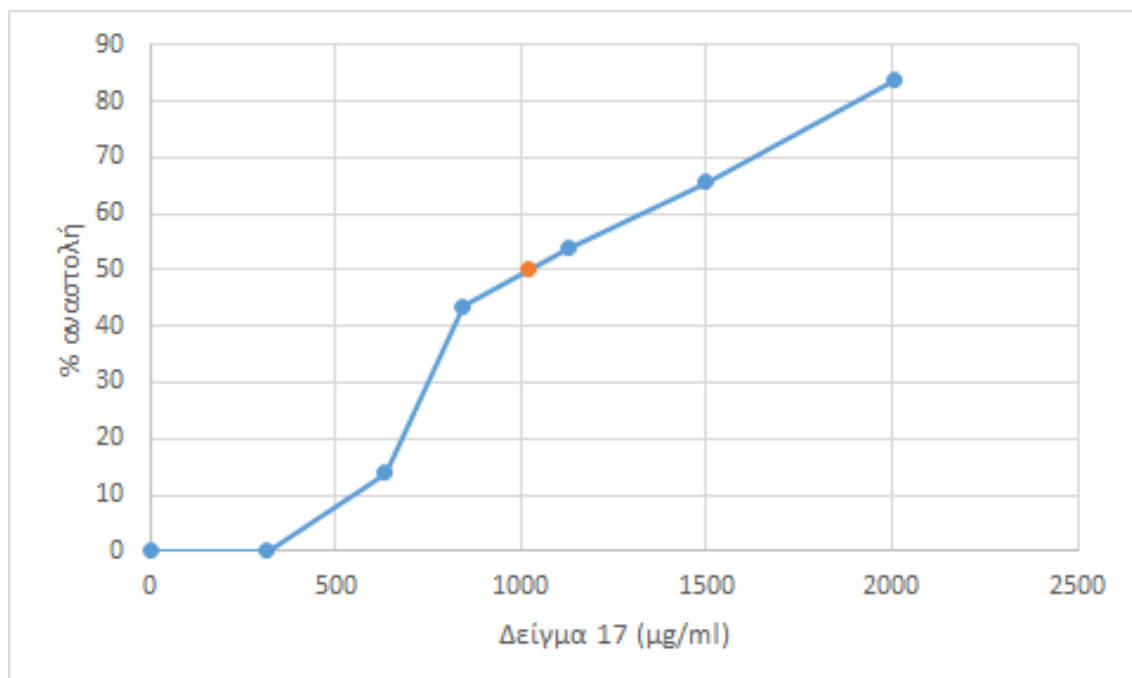
Διάγραμμα 45 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 920 μg/ml) του δείγματος 14 (**Potentilla pedata**)



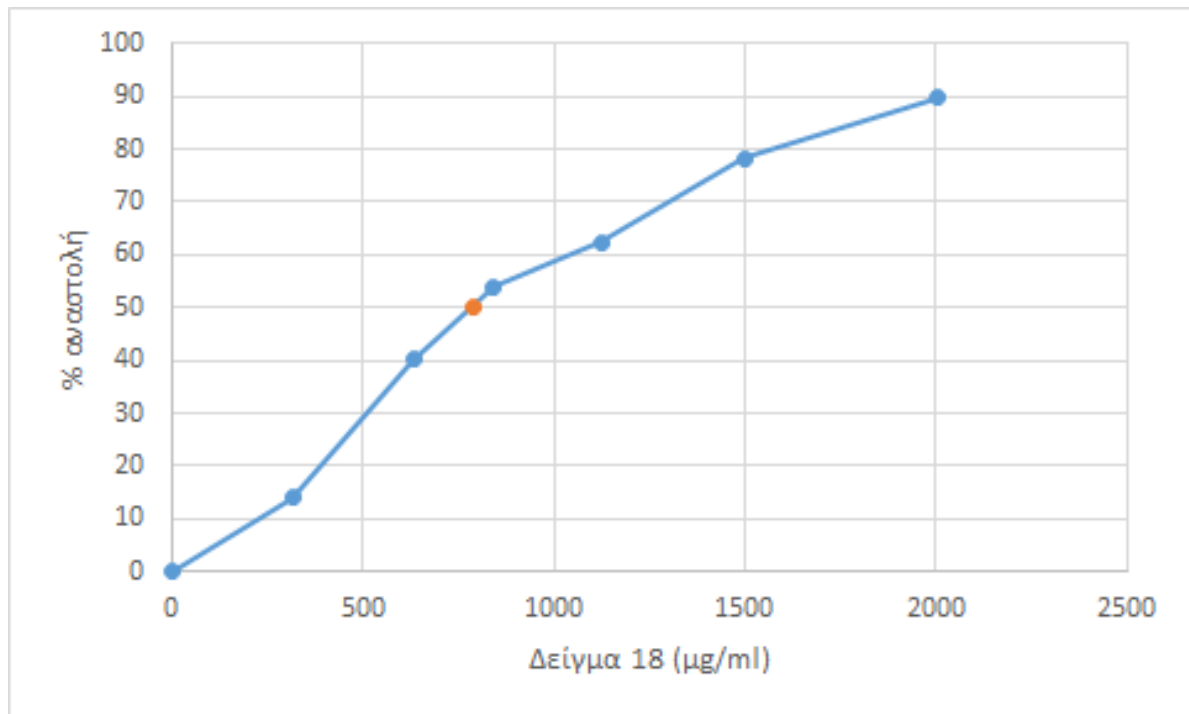
Διάγραμμα 46 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 700 μg/ml) του δείγματος 15 (**Alchemilla bulgarica**)



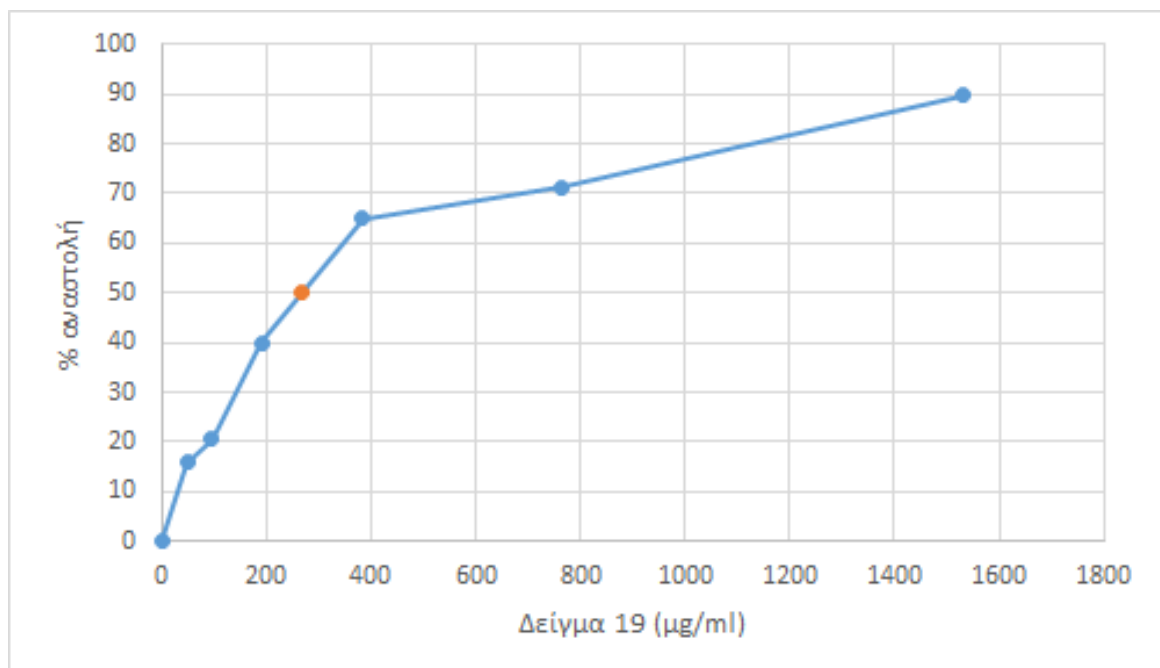
Διάγραμμα 47 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 935 µg/ml) του δείγματος 16 (**Alchemilla xanthochlora**)



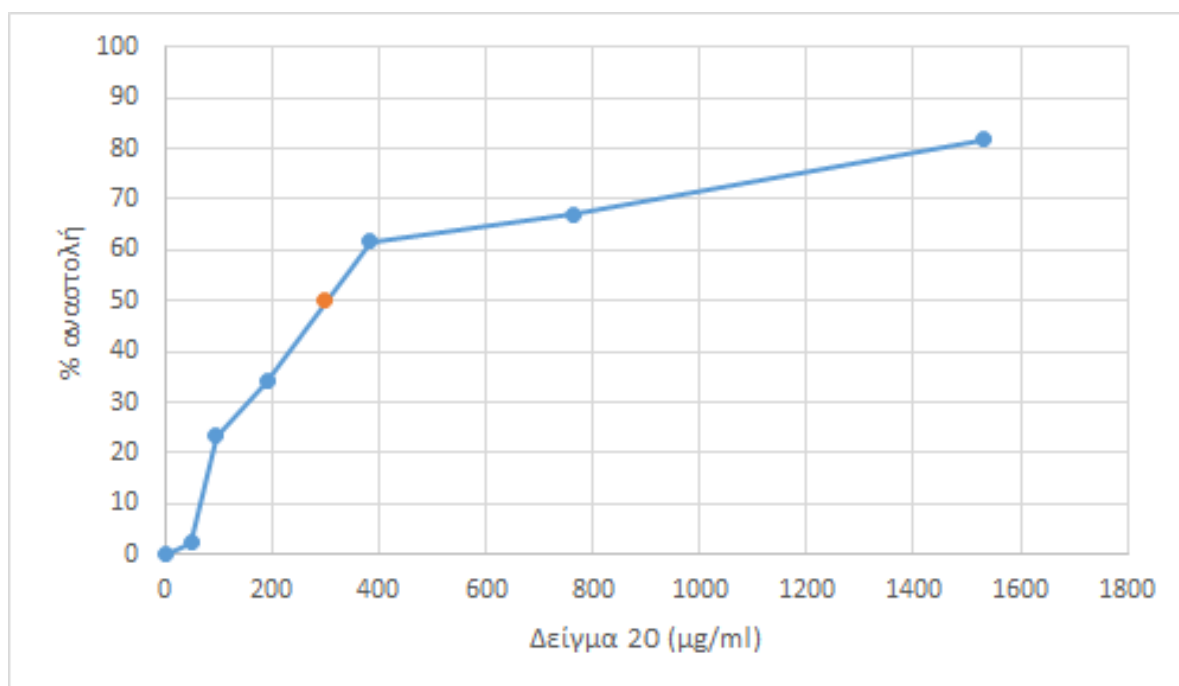
Διάγραμμα 48 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 1020 µg/ml) του δείγματος 17 (**Potentilla speciosa**)



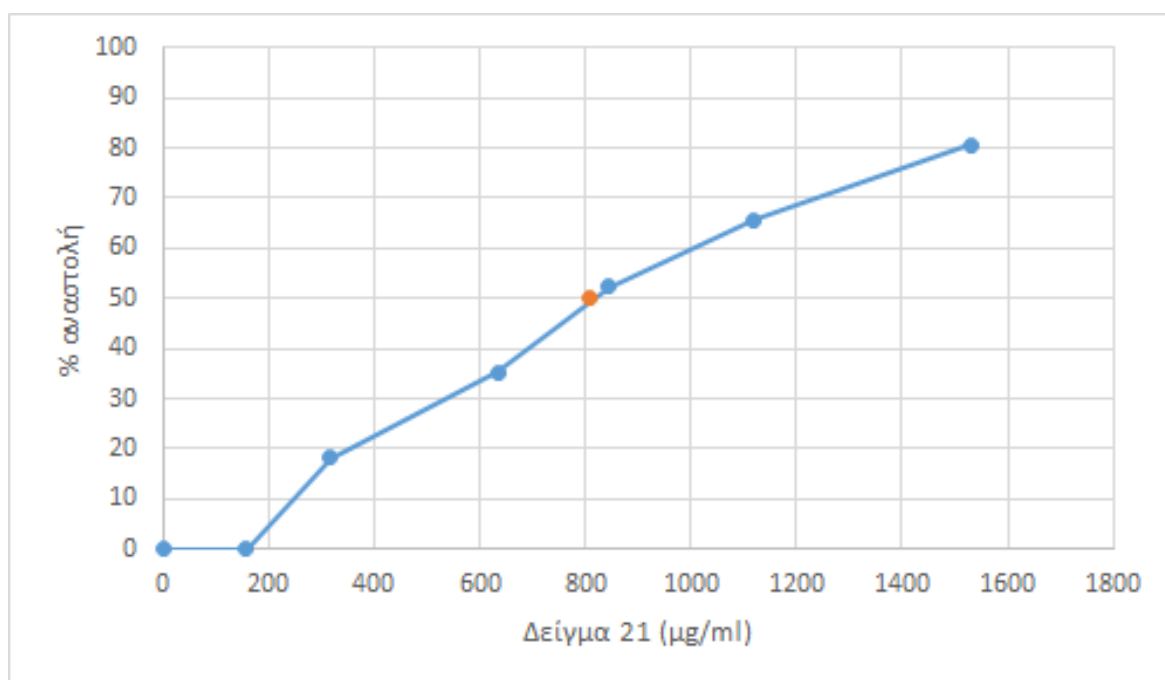
Διάγραμμα 49 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 790 µg/ml) του δείγματος 18 (**Fragaria vesca**)



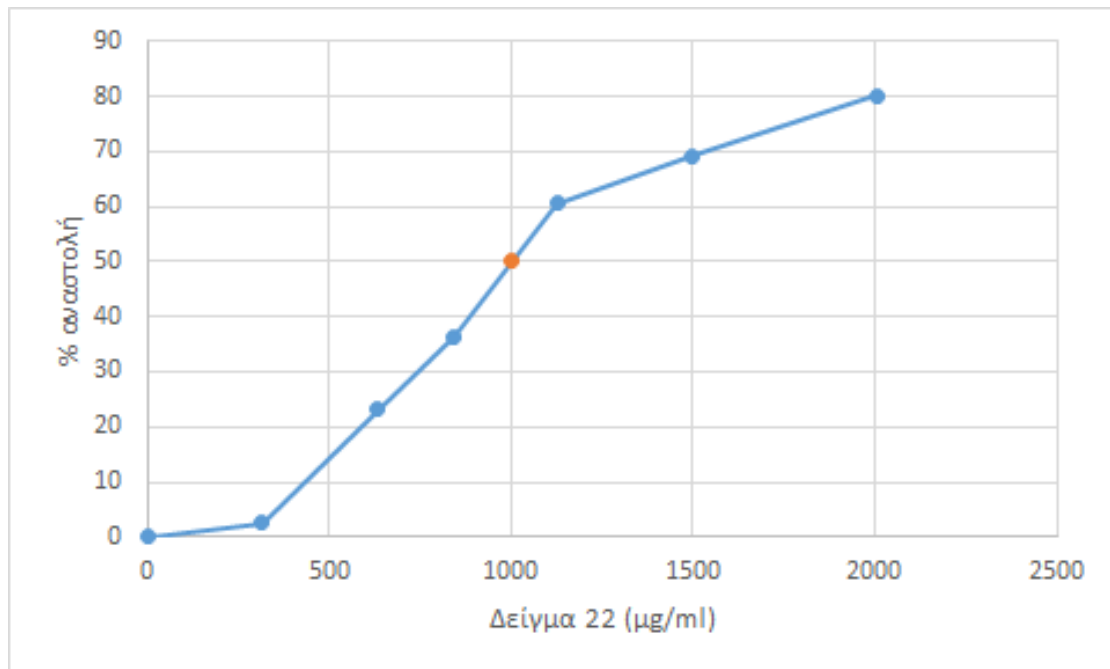
Διάγραμμα 50 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 265 µg/ml) του δείγματος 19 (**Rubus idaeus**)



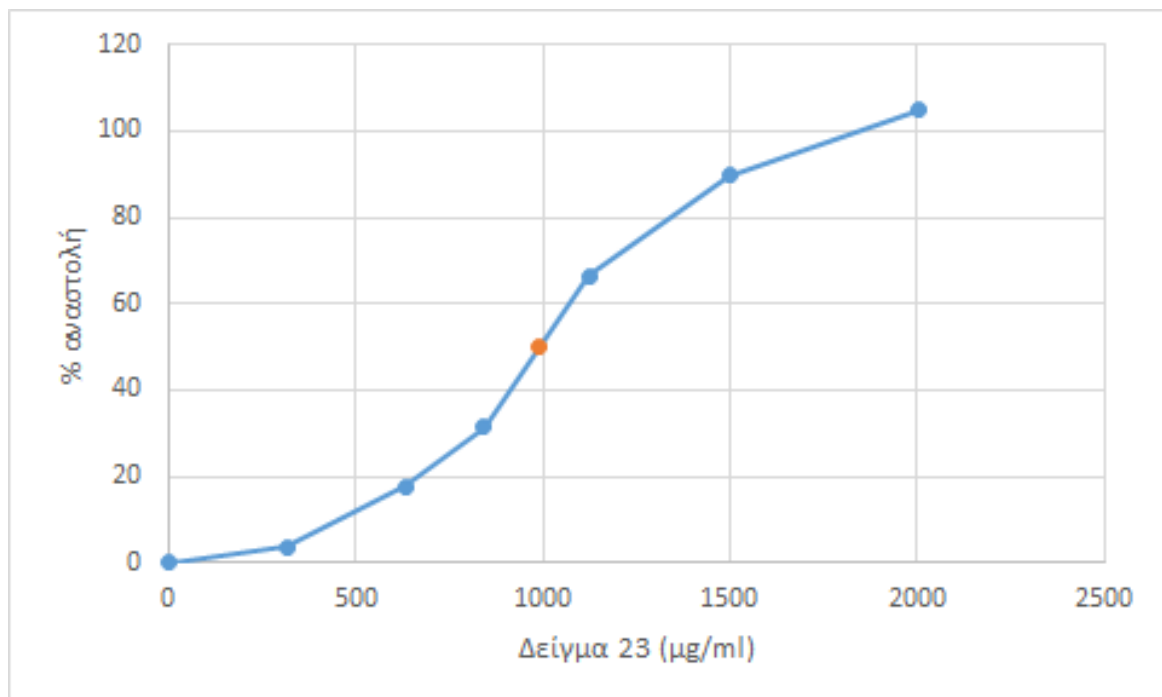
Διάγραμμα 51 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 300 µg/ml) του δείγματος 20 (**Prunus prostrata**)



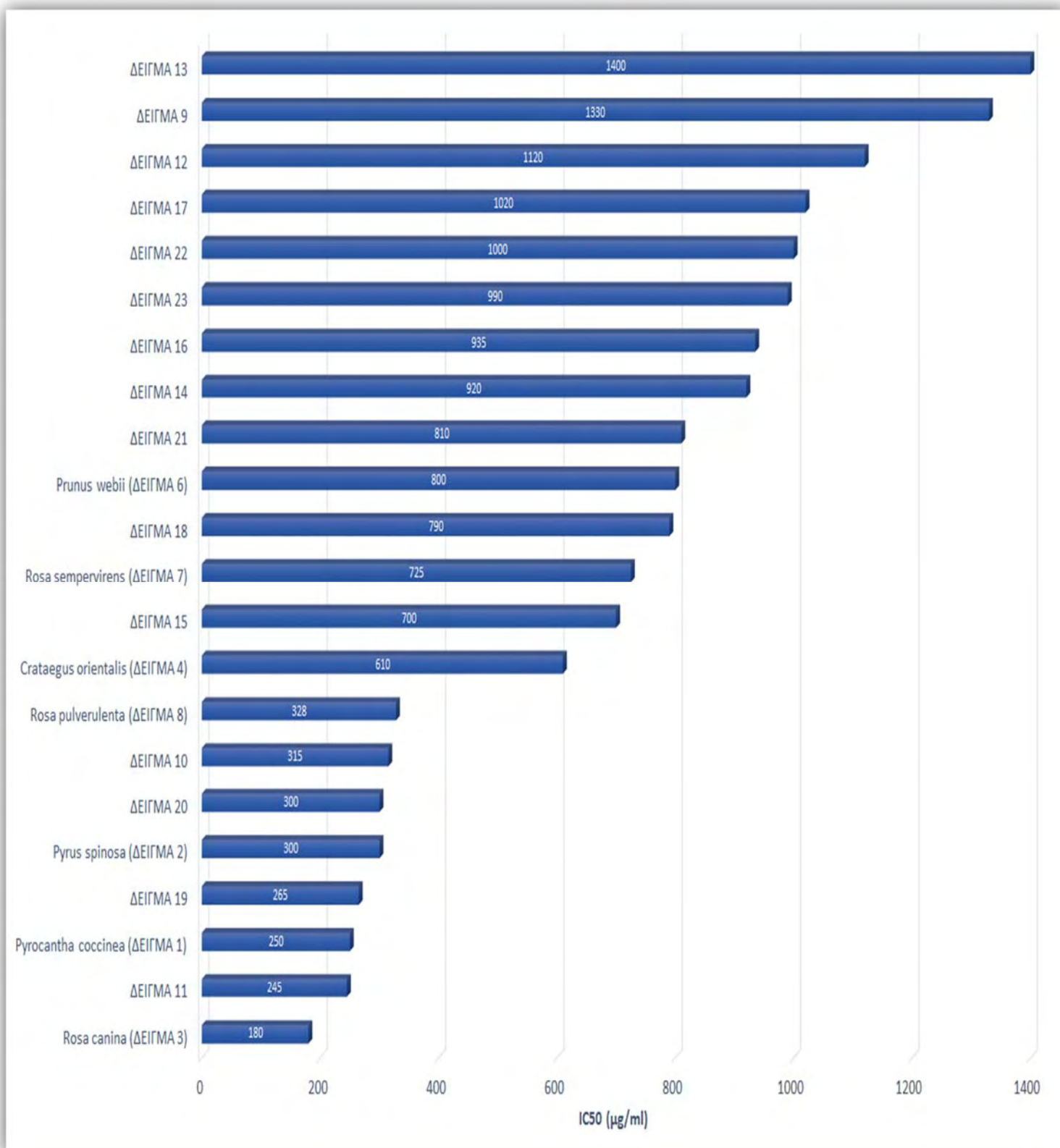
Διάγραμμα 52 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 810 µg/ml) του δείγματος 21 (**Rosa arvensis**)



Διάγραμμα 53 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 1000 µg/ml) του δείγματος 22 (**Sanguis orbaofficinalis**)



Διάγραμμα 54 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 990 µg/ml) του δείγματος 23 (**Potentilla hiyraldiana**)



Διάγραμμα 55 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ εκχυλισμάτων από φυτά Rosaceae της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες υδροξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΡΟΔΙΩΝ



Εικόνα 25: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση του δείγματος W2 σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNAplasmid

Σειρά 2: DNAplasmid + H₂O₂

Σειρά 3: DNAplasmid + H₂O₂+ 48 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 4: DNAplasmid + H₂O₂+ 96 µg/ml εκχυλίσματος

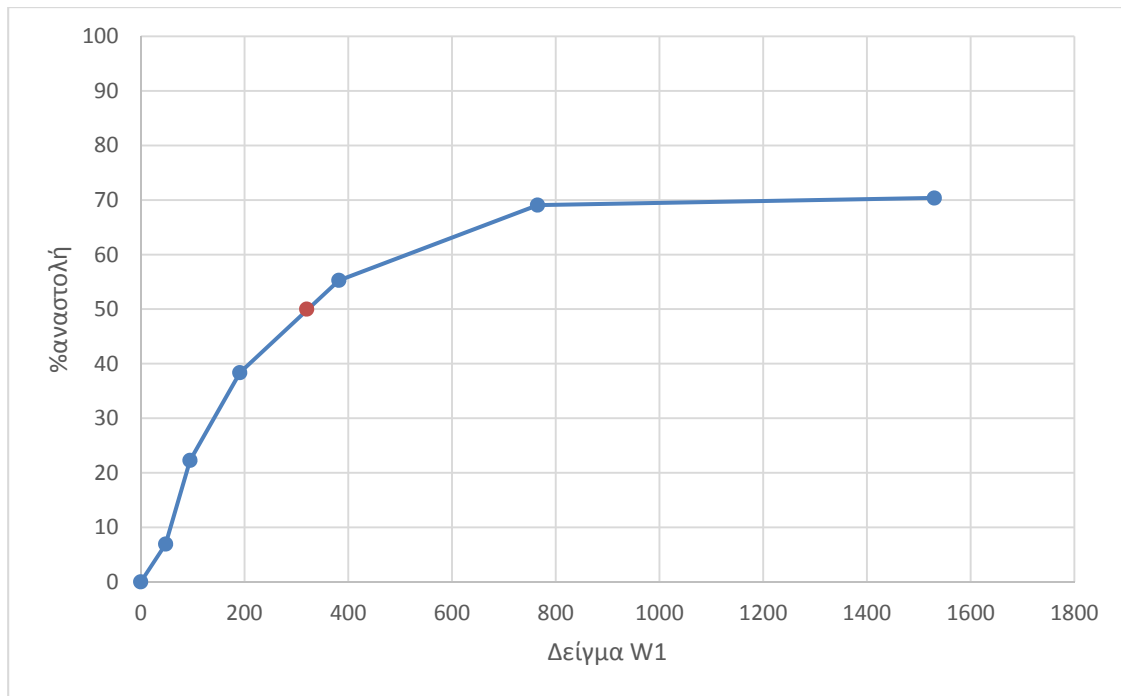
Σειρά 5: DNAplasmid + H₂O₂+ 191 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 6: DNAplasmid + H₂O₂+ 383 µg/ml εκχυλίσματος

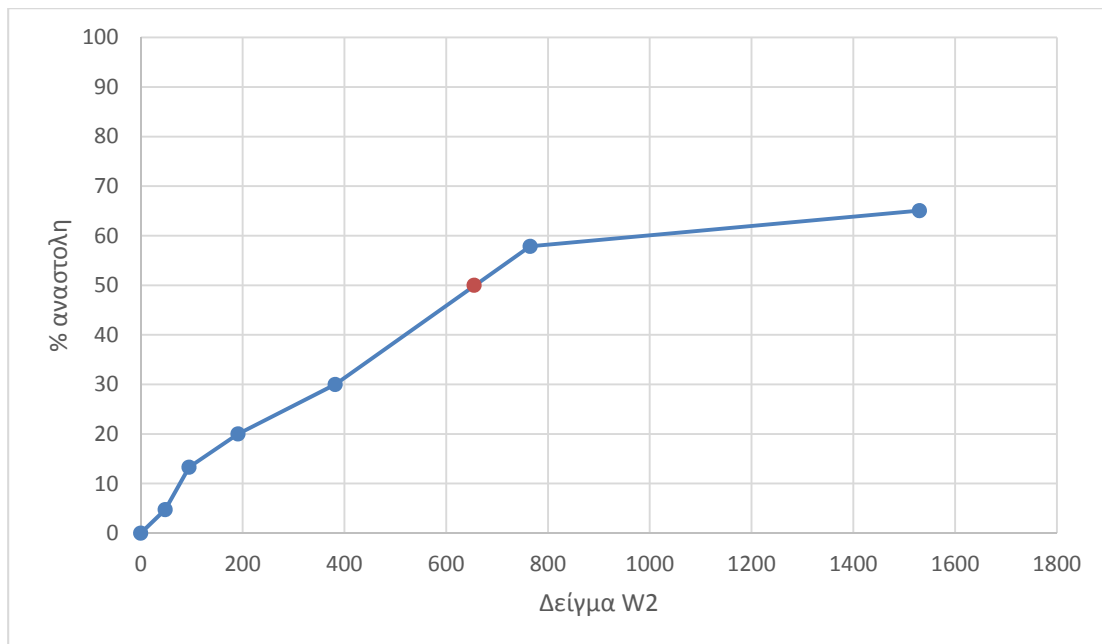
Σειρά 7: DNAplasmid + H₂O₂+ 765 µg/ml εκχυλίσματος

Σειρά 8: DNAplasmid + H₂O₂+ 1530 µg/ml εκχυλίσματος

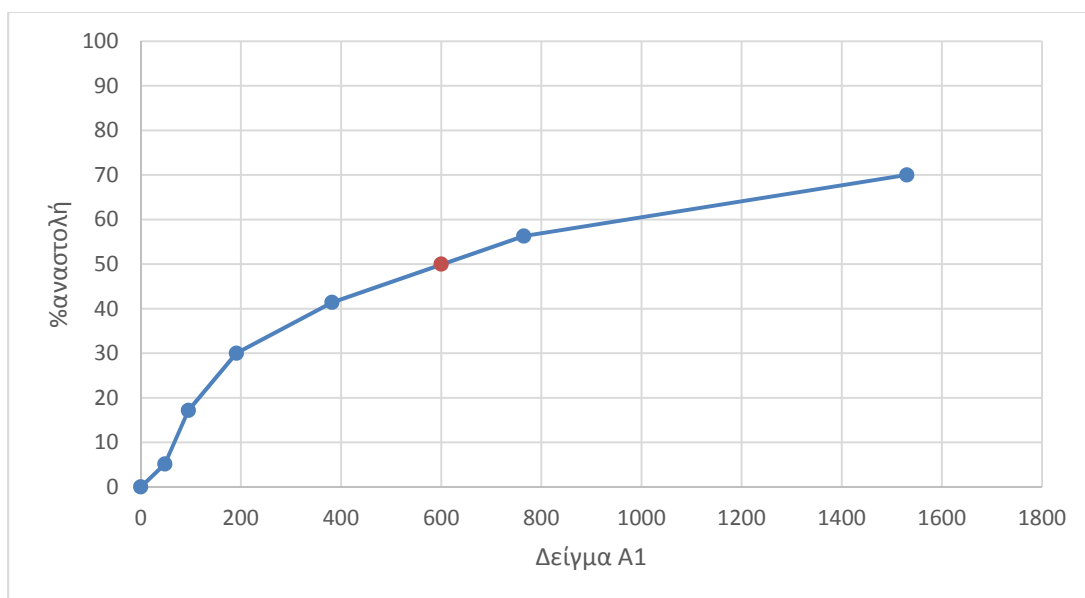
Σειρά 9: DNAplasmid + 1530 µg/ml εκχυλίσματος



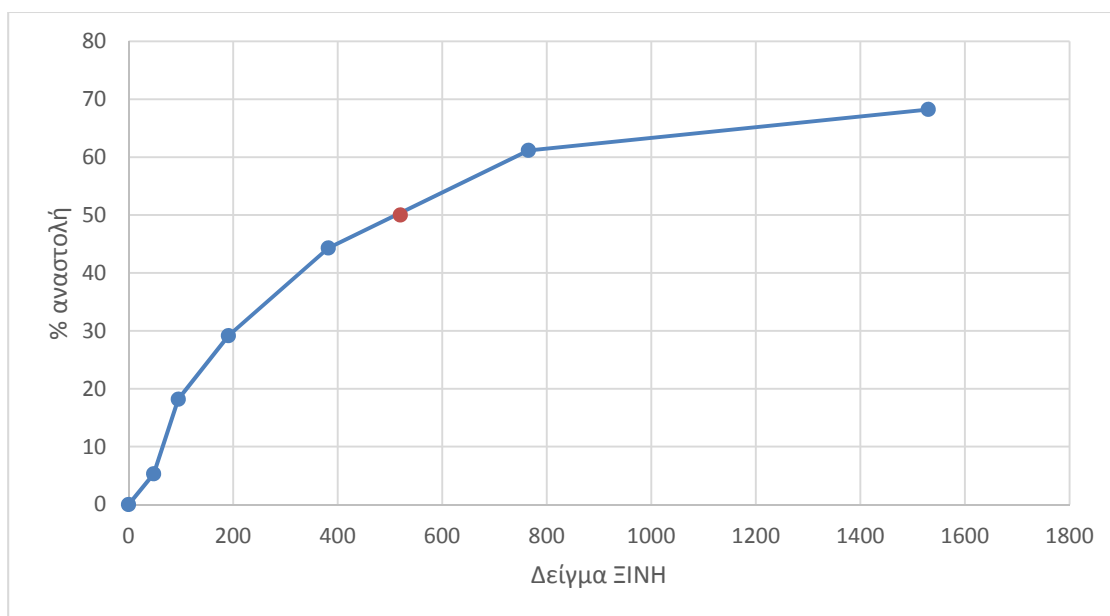
Διάγραμμα 56 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 320 μg/ml) του δείγματος W1 (**Wonderful, βρώσιμο τμήμα**)



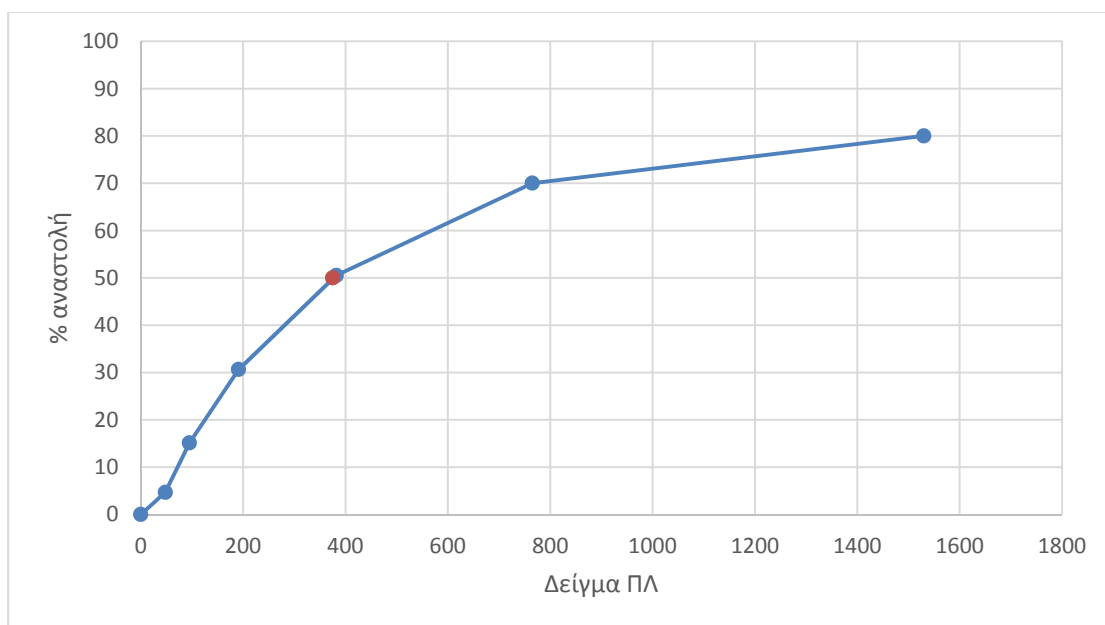
Διάγραμμα 57 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 655 μg/ml) του δείγματος W2 (**Wonderful, Φλοιός**)



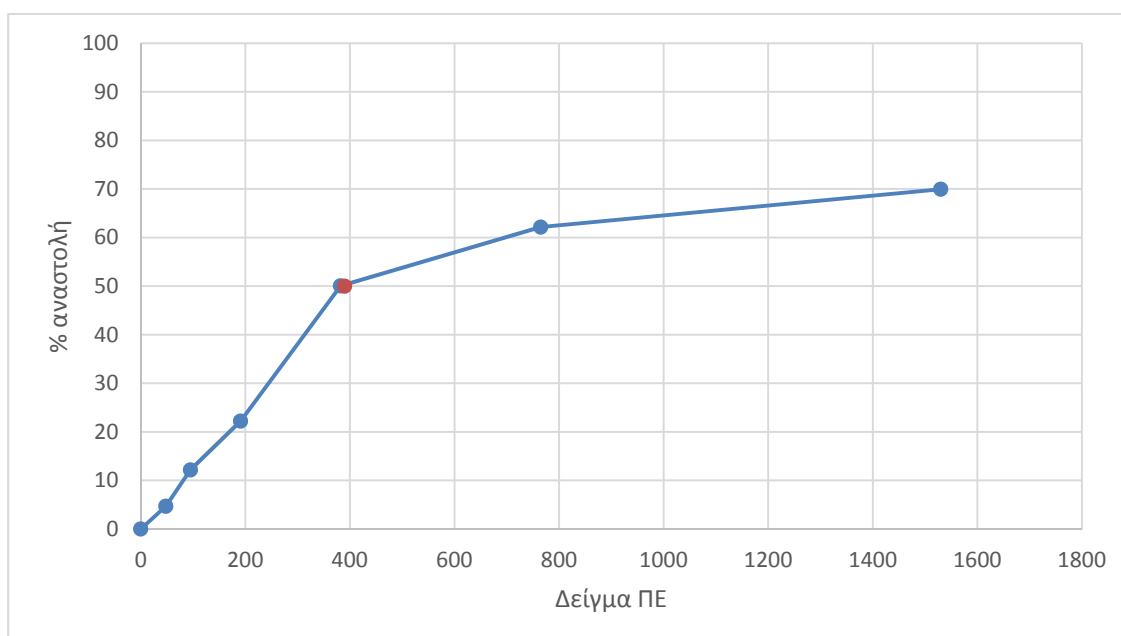
Διάγραμμα 58 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 600 μg/ml) του δείγματος Α1 (**Wonderful, Υποπροϊόντα γυμοποίησης**)



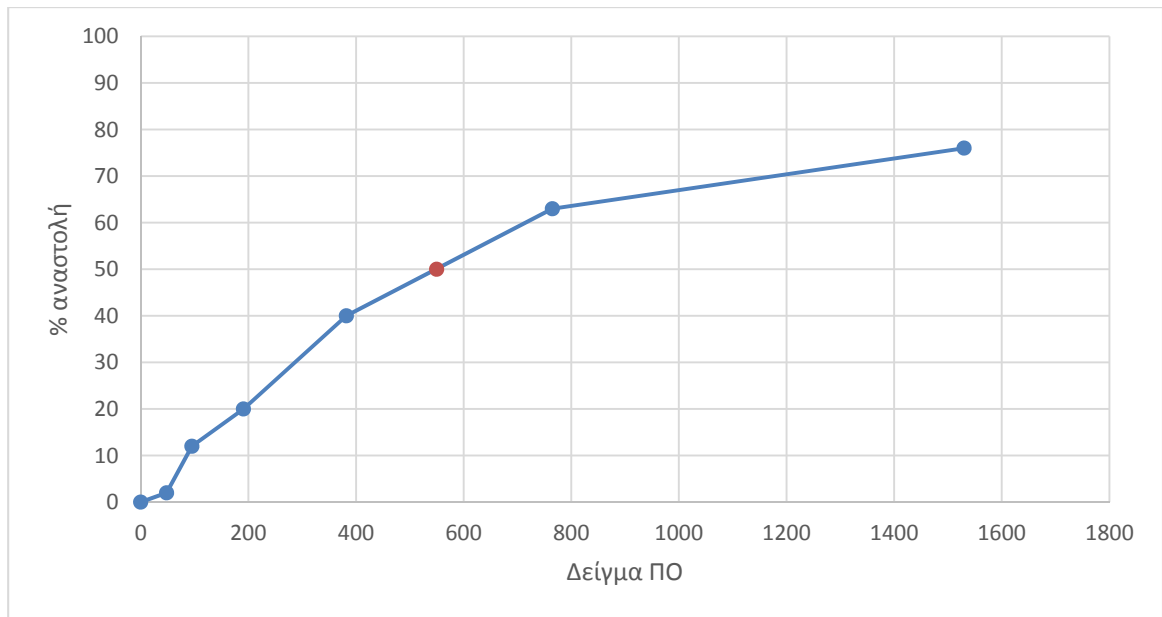
Διάγραμμα 59 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 520 μg/ml) του δείγματος ΕΙΝΗ (**Ξινή Ερμιόνης, βρώσιμο τμήμα**)



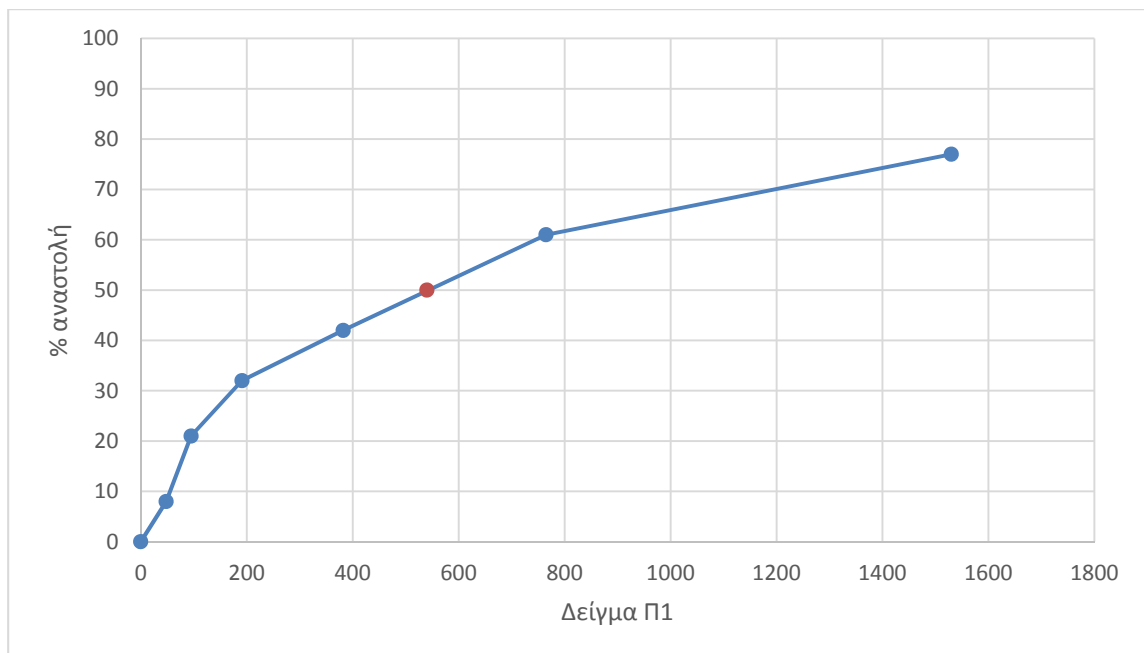
Διάγραμμα 60 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 375 $\mu\text{g}/\text{ml}$) του δείγματος ΠΛ (**Πλούτο, βρώσιμο τμήμα**)



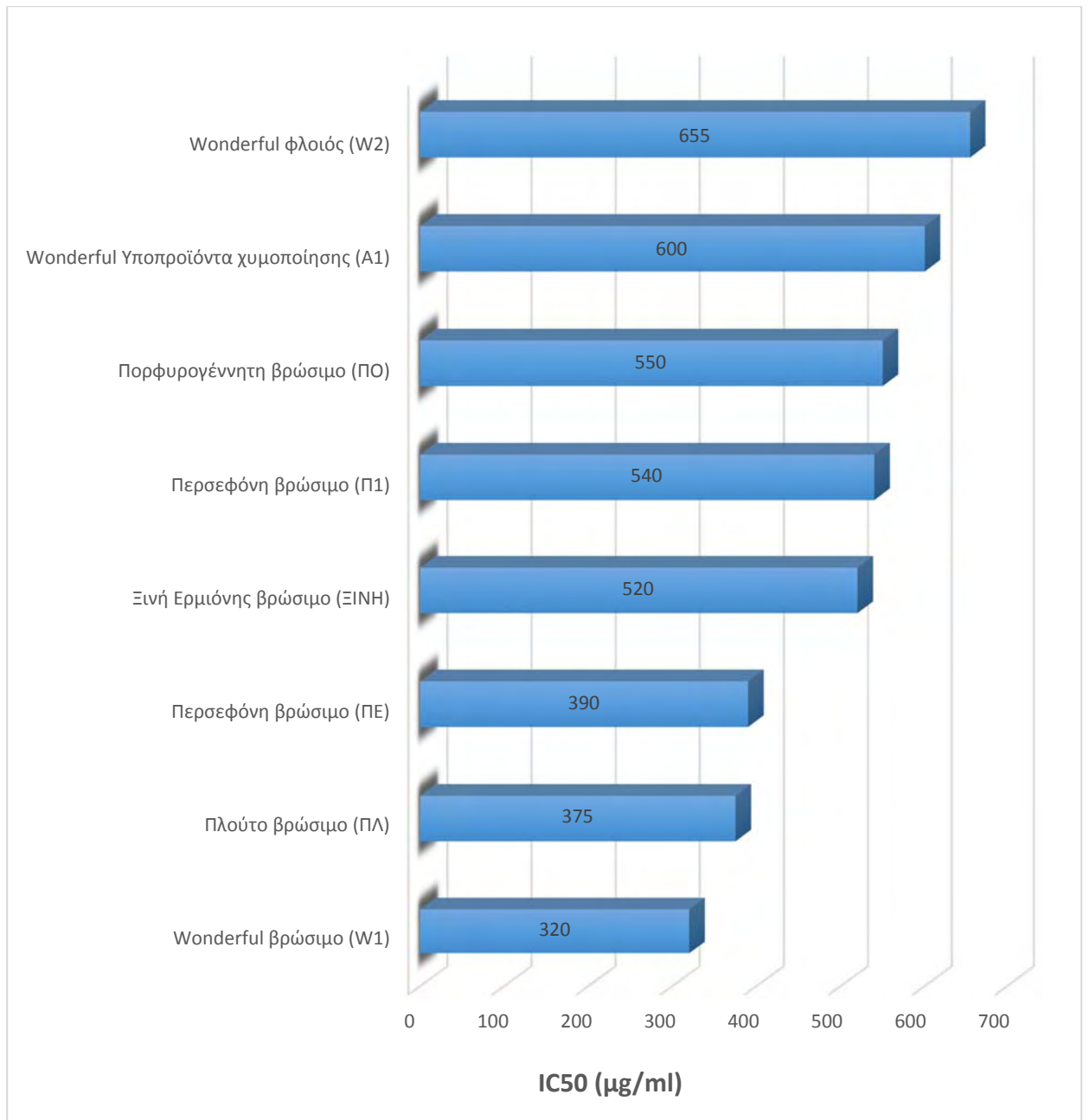
Διάγραμμα 61 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 390 $\mu\text{g}/\text{ml}$) του δείγματος ΠΕ (**Περσεφόνη, βρώσιμο τμήμα**)



Διάγραμμα 62 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 550 μg/ml) του δείγματος ΠΟ (**Πορφυρογέννητη, βρώσιμο τμήμα**)

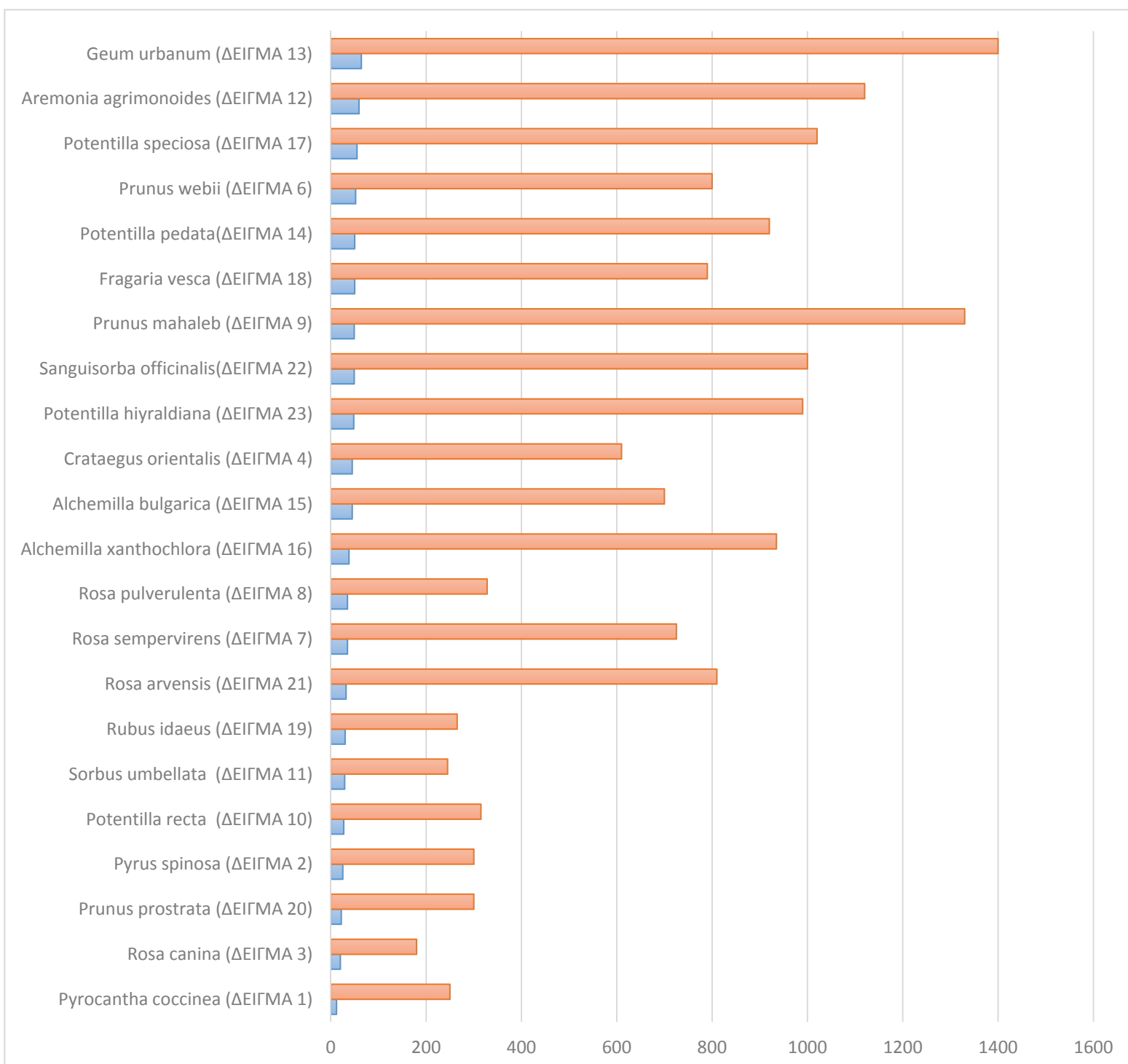


Διάγραμμα 63 : Απεικονίζεται η % αναστολή στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου (IC50: 540 μg/ml) του δείγματος Π1 (**Περσεφόνη, βρώσιμο τμήμα**)

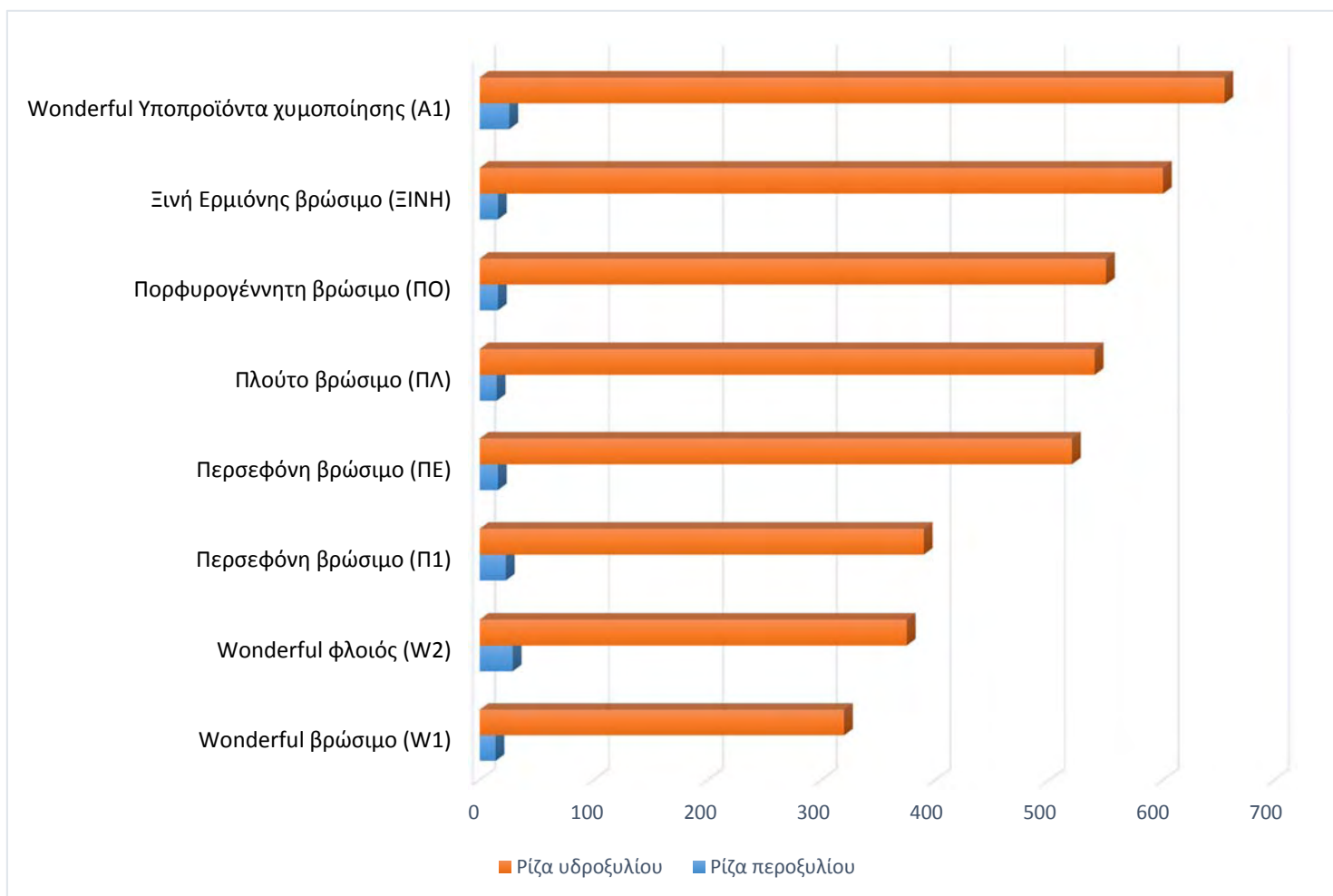


Διάγραμμα 64 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από τα ρόδια στην πρόκληση βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα υδροξυλίου.

Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα



Διάγραμμα 65 : Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από φυτά Rosaceae τόσο της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες υδροξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA όσο και της μεθόδου πρόκλησης βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα του περοξυλίου.



Διάγραμμα 66 : Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από τα Ρόδια τόσο της μεθόδου επαγόμενη από ρίζες υδροξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA όσο και της μεθόδου πρόκλησης βλαβών πλασμιδιακού DNA από τη ρίζα του περοξυλίου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιμεταλλαξογόνου δράσης εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Rosaceae και ποικιλιών ροδιού. Το σύνολο των 30 εκχυλισμάτων των φυτών παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης και εξουδετέρωσης της ρίζας του περοξυλίου. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 12 μg/ml έως 64μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του φυτού *Pyrocanthacoccinea* (ΔΕΙΓΜΑ 1) με IC₅₀ 12 μg/ml, ενώ τα πιο ασθενή ήταν τα εκχυλίσματα των *Aremoniaagrmonoides* (ΔΕΙΓΜΑ 12) και *Geumurbanum* (ΔΕΙΓΜΑ 13), με τιμές IC₅₀ 59 μg/ml και 64 μg/ml, αντίστοιχα.

Η μελέτη της ικανότητας αλληλεπίδρασης των ίδιων εκχυλισμάτων με τη ρίζα του υδροξυλίου έδειξε επίσης, ότι τα περισσότερα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 180 μg/ml έως 1400 μg/ml, με πιο ισχυρό το εκχύλισμα του φυτού *Rosacanina* (ΔΕΙΓΜΑ 3) με IC₅₀ 180 μg/ml. Το πιο ασθενές ήταν πάλι το εκχύλισμα *Geumurbanum* (ΔΕΙΓΜΑ 13) με τιμή IC₅₀ 1400 μg/ml.

Από τα 22 εκχυλίσματα Rosaceae που μελετήθηκαν, τα πιο ισχυρά εκχυλίσματα και με τις δύο μεθόδους ήταν τα εκχύλιστα των *Rosacanina* (ΔΕΙΓΜΑ 3) και *Pyrocanthacoccinea* (ΔΕΙΓΜΑ 1). Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους ήταν του *Geumurbanum* (ΔΕΙΓΜΑ 13).

Τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα φυτά Rosaceae προφανώς οφείλονται στη διαφορετική πολυφαινολική τους σύσταση, κάτι που χαρακτηρίζει όλα τα είδη της οικογένειας Rosaceae ακόμα και αυτά που είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους. Περαιτέρω ανάλυση της πολυφαινολικής σύστασης των εξεταζόμενων

εκχυλισμάτων, θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών σε κάθε εκχύλισμα, καθώς και να δώσει πληροφορίες για το πώς αλληλεπιδρούν τα διαφορετικά φλαβονοειδή τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα υπόλοιπα φυτοχημικά συστατικά των εκχυλισμάτων για να δώσουν την τελική αντιμεταλλαξογόνο και αντιοξειδωτική δράση του κάθε εκχυλίσματος.

Επίσης, σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές, καρποί του ίδιου είδους δείχνουν σημαντικές διαφορές στην πολυφαινολική τους ανάλυση λόγω γεωγραφικής και υψομετρικής διαφοράς. Η διαφορά αυτή αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο που παίζει η θερμοκρασία, καθώς και η ηλιοφάνεια, στην πολυφαινολική σύσταση των καρπών.

Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα δείγματα των *Rosacantha* (ΔΕΙΓΜΑ 3) και *Pyrocantrococcinea* (ΔΕΙΓΜΑ 1) έχουν και στις δύο μεθόδους την ισχυρότερη δράση. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος) που θέτει το φυτό *Rosacantha* ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Επίσης, μελέτες στο συγκεκριμένο φυτό απέδειξαν την αντιμικροβιακή, αγγειοδιασταλτική, νευροσυντηρητική, αντιαιμορραγική δράση και την μεγάλη περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C, A, K και καροτενοειδή. Συμπεραίνουμε ότι, η περαιτέρω μελέτη αυτών των δύο εκχυλισμάτων θα μπορούσε να αποτελέσει αρχή για τη δημιουργία νέων λειτουργικών τροφίμων με μεγάλη αντιοξειδωτική δράση.

Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα της οικογένειας Rosaceae, που μελετήθηκαν έδωσαν όλα στατιστικά σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Από τα 8 εκχυλίσματα ροδιού που μελετήθηκαν, το πιο ισχυρό εκχύλισμα, τόσο στην μέθοδο της επαγόμενης από ρίζα περοξυλίου πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, όσο και στην επαγόμενη από ρίζα υδροξυλίου πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, ήταν το εκχύλισμα του βρώσιμου τμήματος του καρπού της ποικιλίας *Wonderful* (W1) με τιμή IC₅₀ 14 μg/ml και 320 μg/ml αντίστοιχα. Αντίθετα, το πιο ασθενές εκχύλισμα και με τις δύο μεθόδους ήταν το εκχύλισμα του φλοιού της ποικιλίας *Wonderful* (W2) με τιμή IC₅₀ 29 μg/ml με τη μέθοδο της ρίζας περοξυλίου και 655 μg/ml με τη μέθοδο της ρίζας υδροξυλίου.

Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις εξηγούνται από το γεγονός, ότι πρόκειται για διαφορετικές ποικιλίες με διαφορετική χημική σύσταση.

Μια ακόμα παρατήρηση είναι ότι από τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων των ροδιών έδειξαν παρόμοια ταξινόμηση δραστηριότητας και στις δύο μεθόδους.

Συμπερασματικά, όλα τα εκχυλίσματα του ροδιού έδωσαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, στην μέθοδο της επαγόμενης από ρίζα υδροξυλίου μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA, ήταν γενικώς εντυπωσιακή η υψηλή αντιμεταλλαξογόνος δράση του συνόλου των εκχυλισμάτων σε σχέση με αυτήν των φυτών Rosaceae που διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό, είναι σε συμφωνία με μελέτες που δείχνουν ότι εκχυλίσματα ροδιού παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφειλόταν σε βιοδραστικά στοιχεία, όπως η βιταμίνη C, η πουνικαλαγίνη, τα παράγωγα του γαλλικού οξέος, οι ανθοκυανίνες κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πελαργονιδίνη, το ελλαγικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η ηλουτεολίνη, το πουνισικό οξύ και οι τανίνες του. Ο πλούτος των θρεπτικών αυτών συστατικών του και οι αποδεδειγμένες αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές, αντιδιαβητικές και αντιμικροβιακές δράσεις του, έκανε το ρόδι να συμπεριλαμβάνεται στην κατάταξη των 'super-foods'.

Τέλος, πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι, τα αποτελέσματα που παρατίθενται στη δεδομένη εργασία αφορούν εκχυλίσματα και όχι τα απομονωμένα συστατικά των φυτών, γεγονός που μπορεί να μεταβάλλει την ικανότητα αλληλεπίδρασης των καθαρών πολυφαινολών με τη ρίζα. Οπότε, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά των πιο ισχυρών εκχυλισμάτων, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιμεταλλαξογόνος δράση.

Οι εφαρμογές της έρευνας της αντιμεταλλαξογόνου δράσης τόσο των φυτών Rosaceae, όσο και των ροδιών θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων με πλούσιο βιοδραστικό περιεχόμενο, είτε αυτά θα είναι βιοδραστικά τρόφιμα και ποτά, είτε άλλου τύπου προϊόντα, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acuna, U.M.; Atha, D.E.; Ma, J.; Nee, M.N. & Kennelly, E.J. Antioxidant capacities of ten edible north american plants. *Phytother. Res.* **2002**, *16*: 63-65.

Aikens, J. & Dix, J.A. Peroxy radical (HOO·) initiated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*: 15091.

Aprikian, O.; Levrat-Verny, M.; Besson, C.; Busserolles, J.; Remesy, C. & Demigne, C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chem.* **2001**, *75*: 445.

Arts, I.D.J.; Harnack, L.; Gross, M.; Folsom, A. Dietary catechins in relation to coronary heart disease among postmenopausal women. *Epidemiol* **2001**, *12*: 668.

Balentine, J.D. *Pathology of oxygen toxicity.* **1982**, Academic Press, N.Y.

Baret, A. et al., Pharmacokinetic and anti-inflammatory properties in the rat of superoxide dismutases (CuSODs and MnSOD) from various species. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*: 2755.

Bennet, R.C. & Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley review no.72. *New Phytol.* **1994**, *127*: 617-633.

Bracket, D.J.; Wallis, G.; Wilson, M. & McCay, P.B. Spin trapping and electron paramagnetic resonance spectroscopy. Armstrong, D. (ed) In: Free radical and antioxidant protocols. Vol.108, Humana Press, New Jersey, USA, **1998**, pp. 15-25

Braham, H.; Mighri, Z.; Ben Jannet, H.; Matthew, S. & Abreu, P.M. Antioxidant phenolic glycosides from *Moricandia arvensis*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*: 517.

Brand- Williams, W.; Cuvelier, M.E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss und-Technology*, **1995**, *28*: 25.

Bunn, H.F. & Poyton, R.O. O₂ sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* **1996**, *76*: 839.

Bus, J.S. & Gibson, J.E. Lipid Peroxidation and Its Role in Toxicology. *Rev. Biochem.Toxicol.* **1979**, *1*: 125

Butland, B.; Fehily, A.; Elwood, P. Diet, lung function, and lung decline in a cohort of 2512 middle aged men. *Thorax* **2000**, *55*: 102.

Cao, G.; Sofic, E. & Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*: 749.

Cheng, X.; Xia, Z.; Leo, J.M. & Pang, C.C. The effect of Nacetylcysteine on cardiac contractility to dobutamine in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *519*:

Choi, E.J. ; Chee, K. & Lee, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*: 281.

Chung, H.S.; Chang, L.C.; Lee, S.K.; Shamon, L.A.; Van Breemen, R.B.; Mehta, R.G. et al. Flavonoid constituents of chlorizanthe diffuse with potential cancer chemopreventive activity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*: 36.

- Cirico, T & Omaye, S.T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*: 510.
- Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S. & Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSn Identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*: 2900.
- Clifford, M.N.; Knight, S.; Surucu, B. & Kuhnert, N. Characterization by LC-MS of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids and feruloyl- dimethoxycinnamoylquinic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2006a**, *54*: 1957.
- Clifford, M.N.; Zheng, W. & Kuhnert, N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MSn. *Phytochem. Anal.* **2006b**, *17*: 384.
- Constantino, L.; Rastelli, G.; Vescovini, K.; Cignarella, G.; Vianello, P.; Del Corso, A.; Capiello, M.; Mura, U. & Barlocco, D. Synthesis, activity, and molecular modeling of a new series of tricyclic pyridazinones as selective aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*: 4396.
- Cowell, R.M. & Russell, J.W. Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. *J. Investig. Med.* **2004**, *52*: 33.
- Da Ros, R.; Assaloni, R.; Ceriello, A. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs. *Curr. Drug Targets* **2005**, *6*: 503.
- Davis, M.D. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *173*: 345.
- Demaine, A.; Cross, D.; Millward, A. Polymorphism of the aldose reductase gene and susceptibility to retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2000**, *41*, 4064.
- Dixon, R.A & Paiva, N.L. Stress- induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*: 1085.
- Duprat, F. et al., Susceptibility of cloned K⁺ channels to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*: 11796.
- Eberhardt, M.; Lee, C. & Liu, R.H. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* **2000**, *405*: 903.
- Evans, J.L.; Maddux, B.A. & Goldfine, I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistances. *Antioxid. Redox Signal* **2005**, *7*: 1040.
- Fang, N.; Yu, S. & Prior, R. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*: 3579.
- Fang, Y.Z.; Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, *18*: 872.
- Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L. & Kinsella, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **1993b**, *342*: 1103.
- Fujita, T.; Ohira, K.; Miyatake, K.; Nakano, Y. & Nakayama, M. Inhibitory effects of perillosides A and C, and related monoterpene glucosides on aldose reductase and their structure-activity relationships. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*: 920.
- Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J.X. & O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicol.* **2002**, *177*: 91.

- Galvez, A.S.; Ulloa, J.A.; Chiong, M.; Criollo, A.; Eisner, V.; Barros, L.F. & Lavandero, S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: Differential effects of sorbitol and mannitol. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*: 38484.
- Garner, B. et al., Oxidation of HDL. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*: 6080.
- Gilbert, D.L. Oxygen and living processes: an inter-disciplinary approach. **1981**, Springer, N.Y.
- Gotz, M.E. et al., Oxidative stress : free radical production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* **1994**, *63*: 37.
- Graham, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* **1991**, *95*: 594.
- Halliwell, B. Dietary polyphenols: good, bad or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*: 341.
- Halliwell, B. et al., Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*: 598.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. Biologically relevant metal ion-dependent OH• generation. An update. *FEBS Lett.* **1992**, *307*: 108.
- Halliwell, B. Oxygen radicals, NO• and human inflammatory joint disease. *Annu. Rheum. Dis.* **1995**, *54*: 505.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine*, **1998**, Oxford Science Publications.
- Harborne, J.B. The flavonoids: recent advances. In: Goodwin, T.W. ed. *Plant Pigments*. London, UK: Academic Press, **1988**, p.299-343.
- Harborne, J.B. Plant phenolics. In: Dey PM, *Methods in plant Biochemistry*, Vol. 1, **1989**, London, UK: Academic Press.
- Harborne, J.B. *The flavonoids: advances in research since 1986*. **1994**, London, UK: Chapman & Hall.
- Harborne, J. *The Handbook of Natural Flavonoids*, 2534. **1999**, New York: Wiley
- Hamada, Y.; Nakamura, J. Clinical potential of aldose reductase inhibitors in diabetic neuropathy. *Treatments Endocrinol.* **2004**, *3*, 245-255.
- Herrmann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* **1976**, *11*: 433.
- Herrmann, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables: a review. *Z. Lebensm.- Unters. Forsch.* **1988**, *186*: 1.
- Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. & Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease – The Zutphen elderly study. *Lancet* **1993**, *342*: 1007
- Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; van Gameren, Y.; Cnossen, P.J.; de Vries, J.H.M. & Katan, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.* **1999**, *31*: 569.
- Hohman, T.C.; El-Kabbani, O.; Malamas, M.S.; Lai, K.; Putilina, T.; McGowan, M.H.; Wane, Y.Q. & Carper, D.A. Probing the inhibitor-binding site of aldose reductase with site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*: 310.

- Hudson, B.J.F. *Food Antioxidants*. Elsevier applied sciences, **1990**, London & N.Y., 879.
- Hudson, B.J.F & Lewis, L.I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chem.* **1983**, *10*: 47.
- Hussein, S.A.M.; Ayoub, N.A. & Nawwar, M.A.M. Caffeoyl sugar esters and an ellagitannin from *Rubus sanctus*. *Phytochem.* **2003** *63*: 905.
- Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I. & Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*: 4076.
- Kessler, M.; Ubeaud, G & Jung, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*: 131.
- Le Marchand, L.; Murphy, S.; Hankin, J.; Wilkens, L. & Kolonel, L. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Canc. Inst.* **2000**, *92*: 154.
- Li, B.Q.; Fu, T.; Yan, Y.D.; Baylor, N.W.; Ruscetti, F.W. & Kung, H.F. Inhibition of HIV by baicalin. *Cell. Mol. Biolog. Res.* **1997**, *39*: 119
- Lin, Y.M.; Chen, E.C. & Lee, K.H. Hinokiflavone: a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxicity of the related biflavonoids. *Plant. Med.* **1989**, *55*: 166.
- Liu, L.Z.; Fang, J.; Zhou, Q. ; Hu, X. ; Shi, X. & Jiang, B.H. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Molec. Pharmacol.* **2005**, *68* : 635
- Liu, K.C.S. ; Shi-Lin, Y. ; Roberts, M.F. & Phillipson, S.D. Flavonol glycosides with acetyl substitution from *Kalanchoe gracilis*. *Phytochem.* 1989 *28*: 2813.
- Lunec, J. et al., 8OHdG. A marker of oxidative DNA damage in SLE. *FEBS Lett.* **1994**, *348*: 131.
- Maas, J.L.; Galletta, G.J. & Wang, S.Y. Ellagic acid enhancement in strawberries. In: Bills, D.D.; Kung, S.D. eds. *Biotechnology and Nutrition*. Storeham, USA: Butterworth-Heinemann, **1992**, p. 345-362.
- Mabley, J.G. & Soriano, F.G. Role of nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic vascular dysfunction. *Curr Vasc Pharmacol* **2005**, *3*: 247.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R. & Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. **1970**, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
- Macheix, J.; Fleuriet, A. & Billot, J. *Fruit phenolics*. **1990**, Boca Raton, USA: CRC Press.
- Markham, K.H.; Geiger, H. & Jaggy, H. Kaempferol-3-O-glucosyl (1-2) rhamnoside from *Ginkgo biloba* and a reappraisal of other gluco(1-2, 1-3 and 1-4) rhamnoside structures. *Phytochem.* **1992** *29*: 1277.
- Markham, K.R. & Geiger, H. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Harborne, J.B (ed). **1993**, Chapman & Hall, London, U.K.
- Mayer, B.; Schumacher, M.; Branstatter, H.; Wagner, F. & Hermetter, A. High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Analyt Biochem* **2001**, *297*: 144.

- Mellidis, A.S.; Papageorgiou, V.P. & Kokkalou, E. Phenolic constituents from *Onosma heterophylla*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*: 949.
- Miller, N.; Diplock., A.T. & Rice-Evans, C. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice in storage. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*: 1794.
- Moraes, E.C. et al. Mutagenesis by H₂O₂ treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* **1990**, *11*: 283.
- Mouria, M.; Gukovskaya, A.S.; Jung, Y. et al. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*: 761
- Ohkawa, H.; Ohoshi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*: 351.
- Okada, Y.; Miyauchi, N.; Suzuki, K.; Kobayashi, T. ; Tsutsui, C.; Mayusumi, K.; Nishibe, S. & Okuyama, T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*: 1385.
- Olanow, C.W. et al. (eds) *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease* **1996**, Academic Press, London.
- Olschlager, C.; Milde, J.; Schempp, H. & Treutter, D. Polyphenols and antioxidant capacity of *Sorbus domestica* L. fruits. *J. Appl. Bot.* **2004**, *78*: 112.
- Parthasarathy, S. et al., The role of oxidized LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.* **1992**, *43*: 219.
- Pauli, G.F.; Poetsch, F. & Nahrstedt, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*: 177.
- Peiro, C.; Lafuente, N.; Matesanz, N.; Cercas, E.; Llergo, J.L.; Vallejo, S.; Rodriguez-Manas, L. & Sanchez-Ferrer, C.F. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* **2001**, *133*: 967.
- Pieta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*: 1035.
- Poderoso, J.J. et al., No inhibits electron transfer and increases O₂^{•-} production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *97*: 3299.
- Pokorny, J. Major factors affecting the antioxidant of lipids. In: Chan, H. ed. *Autooxidation of unsaturated lipids*. London, UK, Academic Press, **1987**, p. 141-206.
- Ramasamy, R. Aldose reductase: A novel target for cardioprotective interventions. *Current Drug Targets* **2003**, *4*: 625.
- Ravn, H.; Nishibe, S.; Sasahara, M. & Xuebo, L. Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*: 3627.
- Recknagel, R.G. & Glende, E.A. Lipid peroxidation. A specific form of cell injury. *Handb. Physiol.* **1979**, *9*: 591
- Recio, M.C.; Giner R.M.; Manez, S. et al. Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. *Plant. Med.* **1995**, *61*: 502.

- Regenold, W.T.; Kling, M.A.; Hauser, P. Elevated sorbitol concentration in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* **2000**, *25*: 593.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.; Bolwell G.P. & Bramley, P.M. The related antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res.* **1995**, *22*: 375.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. & Paganga, G. Structure-Antioxidant activity of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *30*: 933.
- Richter, C et al., Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*: 67.
- Rosen, P. et al., (eds) *Oxidative stress and antioxidants in diabetes and its complications.* **1998**, Marcel Dekker, USA.
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, *362*: 801.
- Rossetti, L.; Smith, D.; Shulman, G.I.; Papachristou, D. & DeFronzo, R.A. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* **1987**, *79*: 1510.
- Rossetti, L.; Shulman, G.I.; Zawulich, W. & DeFronzo, R.A. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. *J Clin Invest* **1987**, *80*: 1037.
- Ryu, S.H.; Ahn, B.Z. & Pack, M.Y. The cytotoxic principle of *Scutellariae radix* against L 1210 cells. *Plant, Med.* **1985**, *51*: 355.
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H. & Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*: 571.
- Sang, S.; Lapsley, K.; Jeong, W.S.; Lachance, P.A.; Ho, C. & Rosen, R.T. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*: 2459.
- Schlesier, K.; Harwat, M.; Bohm, V. & Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad. Res.* **2002**, *36*: 177.
- Schuster, B. & Herrmann, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochem.* **1985**, *24*: 2761.
- Setter, S.M.; Campbell, R.K. & Cahoon, C.J. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *Ann. Pharmacother.* **2003**, *37*: 1858.
- Sevanian, A. et al., Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Rad. Biol. Med.* **1990**, *8*: 145.
- Severi, F.; Costantino, L.; Benvenuti, S.; Vampa, G. & Mucci, A. Synthesis and description of chalcone-like compounds, inhibitors of aldose reductase. *Med. Chem. Res.* **1996**, *6*: 128.
- Shahidi, F. & Naczk, M. Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc., **1995**.
- Shahidi, F. & Wanasundara, P. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*: 67.
- Shigenaga, M.K. et al. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*: 10771.

Shimizu, M.; Horie, S.; Terashima, S.; Ueno, H.; Hayashi, T.; Arisawa, M.; Suzuki, M.; Yoshizaki, M. & Morita, N. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude drug, 'paraparai mi,' *Phyllanthus niruri*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*: 2531.

Shinoda, M.; Mori, S.; Shintani, S.; Ishikura, S. & Hara, A. Inhibition of Human Aldehyde Reductase by Drugs for Testing the Function of Liver and Kidney. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 741-744.

Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Kanda, T. & Ohtake, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Crom. A* **2006**, *1102*: 206-213.

Sinkkonen, J.; Liimatainen, J.; Karonen, M. & Pihlaja, K. A new dihydroflavonol from *Pinus sylvestris* L. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*: 348.

Silva, G.L.; Chai, H.; Gupta, M.P.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M.; Beecher, C.W. & Kinghorn, A.D. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. *Phytochem.* **1995**, *40*: 129.

Simizu, M.; Ito, T.; Terashima, S. et al. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. *Phytochem.* **1984**, *23*: 1885.

Smith, H. In: *Phytochrome*. Mitrakos, K.; Shropshire, W. eds, Academic Press, London, UK, **1972**, p.433.

Southorn, P.A. Free radicals in medicine. II: involment in human disease. *Mayo Clin. Proc.* **1988**, *63*: 390.

Sutton, H.C. & Winterbourn, C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *6*: 53.

Suzuki, K.; Koh, Y. H.; Mizuno, H.; Hamaoka, R.; Taniguchi, N. Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *J. Biochem.* **1998**, *123*: 353.

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

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

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

Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* 1976 *36*:2699-2702.

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

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

Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D. J "Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes" *Agric Food Chem.* 2007 Jun 27;55(13):5246-52.

Swain, J.A. et al., Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin : implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* **1994**, 342: 49.

Takahashi, M.; Fujii, J.; Teshima, T.; Suzuki, K.; Shiba, T. & Taniguchi, N. Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene*, **1993**, 127: 249-253.

Teramachi, K. & Izawa, M. Rapid induction of apoptosis in human gastric cancer cell lines by sorbitol. *Apoptosis* **2000**, 5: 181.

Ueda, H.; Tachibana, Y.; Moriyasu, M.; Kawanishi, K. & Alves, S.M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomed.* **2001**, 8: 377.

Van Acker, S.; Den Berg, D.; Tromp, M.; Griffioen, D.; Bennekom, W. & Bast, A. Structural aspects of the antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20: 331.

Varma, S.D.; Misuno, A. & Kinoshita, J.H. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, **1977**, 195: 205.

Varma, S.D. Inhibition of aldose reductase by flavonoids. In: Progress in Clinical and Biological Research. Vol.23. Cody, V.; Middleton Jr., E. & Harborne, J.B (eds.) **1986**, AlanR. Liss Inc., N.Y.

Velgosova, V. & Velgos, S. Our medicinal plants, *Slovakian Pedagogical Publishing – House*, Bratislava. **1988**.

Vincent, T.E., Mendiratta, S.T., & May, J.M. Inhibition of aldose reductase in human erythrocytes by vitamin C. *Diabetes Res. Clin.Pract.*, **1999**, 43: 1.

Wagner, B.A. et al., Free radical mediated lipid peroxidation in cells : oxidizability in a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* **1994**, 33: 4449.

Yakes, F.M. & Van Houten, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94: 514

Yamamoto, S.; Yashimoto, T.; Furukawa, M.; Horie, T. & Watanabe-Kohno, S. Arachidonate 5-lipoxygenase and its new inhibitors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984, 74: 349.

Yoshizawa, Y.; Kawaii, S.; Urashima, M.; Fukase, T.; Sato, T.; Morofushi, N. & Nishimura, H. Differentiation- Inducing effects of small fruit juices on HL-20 leukemic cells, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48: 3177.

Yoshizawa, Y.; Kawaii, S.; Urashima, M.; Fukase, T.; Sato, T.; Tanaka, R.; Morofushi, N. & Nishimura, H. Antiproliferative effects of small fruit juices on several cancer cell lines. *Anticanc. Res.* **2000**, *20*: 4285.

Yuting, C.; Rongliang, Z.; Zhongjian, J. and Yong, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **1990**, *9*: 19.

Zhang, S.; Zhu, M. & Shen, D. Experimental study ofn the treatment of diabetes by phloridzin in rats. *J Tongji Med Univ.* **1998**, *18*: 118.

Zheng, G.Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Plant. Med.* **1994**, *60*: 54.

Bialonska D., Ramnani P., Kasimsetty S., Muntha K., Gibson G., Ferreira D. 2010. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol. 140(2-3):175–182.

Currò S., Caruso M., Distefano G., Gentile A., La Malfa S. 2010. New Microsatellite Loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lytheraceae). *American Journal of Botany*, 2010, vol. 97(7):58-60.

De Val A.D.B., Ferreira J.L., Vieira Neto J., Pasqual M., de Oliveira A.F., Borém A., and Cançado G.M.A. 2012. Genetic diversity of Brazilian and introduced olive germplasms based on microsatellite markers. *Genetic Molecular Research*, 2012, vol.11 (1): 556-571.

Drogoudi P., Tsipouridis C., Michailidis Z. 2005. Physical and chemical characters in pomegranate. *Hortscience*, 2005, vol. 40(5) 1200-1203.

Durgaç C., Mustafa Ö., Özhan _im_ek , Aka Kaçar Y., Kıyga Y., Çelebi S., Gündüz K., Serçe S. 2008.Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol.7 (9):1294- 1301.