



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ ΑΠΟ ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ
(PUNICA GRANATUM)



ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Α. ΜΠΕΣΙΟΣ
Χημικός Μηχανικός

ΛΑΡΙΣΑ 2012

***ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY USING MOLECULAR METHODS
IN POLYPHENOLIC EXTRACTS OF PRODUCTS AND BY-PRODUCTS OF
PROCESS PRODUCING POMEGRANATE JUICE FROM PUNICA GRANATUM***

***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΕ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
ΚΑΙ ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΥΜΟΥ
ΑΠΟ ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΡΟΔΙΑ (PUNICA GRANATUM)***

© 2012 ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΜΠΕΣΙΟΣ

Η έγκριση της μεταπτυχιακής εργασίας, από το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στους γονείς μου,
ιδιαίτερα στον πατέρα μου
που πάντα με προέτρεπε στη γνώση
και στην αγαπημένη μου Αγγελική.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή του και την κατανόησή του .

Ευχαριστώ επίσης τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του, τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας καθώς και την λέκτορα κ. Καλλιόπη Λιαδάκη για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησής μου.

Ευχαριστώ ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό και ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Ευαγγελία για τη στήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε καθώς και τους συναδέλφους μου και πολύ καλούς φίλους Ανδρομάχη Μπόκαρη και Κώστα Γερασόπουλο για τη συνεργασία τους, τόσο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και κατά τη διάρκεια της φοίτησης στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ατόμων άρχισε να υιοθετεί έναν διαφορετικό τρόπο ζωής, τόσο ως μέσο πρόληψης χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ) όσο και ως μέσο αντιμετώπισης της πρόωρης γήρανσης και γενικότερα ως μέσο βελτιστοποίησης της υγείας τους. Αποτέλεσμα αυτού ήταν και η ανάγκη για διατροφή με προϊόντα τα οποία, εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, έχουν και ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Σημαντικές ενδείξεις ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης των προαναφερθέντων ασθενειών έχουν αναφερθεί σε πλήθος μελετών. Ένας βασικός λόγος αυτού είναι η ύπαρξη φυσικών βιοδραστικών μορίων στις φυτικές τροφές. Στις φυτικές πολυφαινόλες, μια κατηγορία τέτοιων μορίων, έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η σημαντικότερη είναι η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες.

Εξ αιτίας της αυξημένης ζήτησης ειδών διατροφής, πλούσιων σε φυτικές πολυφαινόλες, οι βιομηχανίες τροφίμων εντείνουν την έρευνα και παραγωγή τέτοιων καινοτόμων προϊόντων. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής και αντιμεταλαξιγόνου δράσης σε εκχυλίσματα δειγμάτων τόσο του τελικού όσο και των ενδιάμεσων προϊόντων και παραπροϊόντων, της γραμμής βιομηχανικής παραγωγής χυμών καρπών του φυτού *Punica Granatum* (Ροδιά). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) *in vitro* μέθοδοι. Οι δύο πρώτες από αυτές στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από τις πολυφαινολικές ενώσεις. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι, τόσο το τελικό προϊόν όσο και τα ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης και των δύο ριζών, με σημαντικότερες τις περιπτώσεις του χυμού αλλά και των παραπροϊόντων (φλοιοί και σπέρματα). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν οφείλονται στη διαφορετική φύση των ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]) και υδροξυλίου (OH[•]), επιβεβαιώθηκε με

την βοήθεια των δύο επόμενων μοριακών μεθόδων. Η αναστολή της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική, αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξιγόνου δράσης

Κατά συνέπεια και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων, των φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στα παραπροϊόντα (απορρίμματα) της παραγωγικής διαδικασίας, και η χρήση τους είτε για την ενίσχυση των τελικών προϊόντων (χυμοί) είτε για την δημιουργία νέων προϊόντων (καλλυντικά, συμπληρώματα διατροφής κ.α.).

ABSTRACT

In recent years, a growing number of people started to adopt a different way of life, both as a means of preventing chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer's) and premature aging and in general as a way to improve their health. The result was the need for a diet with products which, their nutritional properties, also have beneficial effect on human health. Important evidence that increased consumption of fruits and vegetables reduces the frequent incidents of the aforementioned diseases have been reported in numerous studies. A key reason for this is the existence of natural bioactive molecules in plant foods. Plant polyphenols, a group of such molecules exhibit many important biological properties. The most important is their ability to neutralize free radicals, and so they act as antioxidants and chemopreventive factors, protecting from oxidative stress.

Because of the increased demand for food, rich in plant polyphenols, the food companies intensify their research and production of such innovative products. The aim of this study was to assess the possible antioxidant action and antimutagenic effects of extracts from both final and intermediary products and by-products of industrial production line of fruit juices of the plant *Punica Granatum* (Pomegranate). In total 4 in vitro methods were used. The first two are based on the neutralization of stable chemical radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}. The results showed that the final product, the intermediary and the by-products possess strong neutralizing capacity of both radicals, with most potent the extracts of juice and two of the by-products (peelings and seeds). The observed differences are due to the different nature of the roots and the different chemical polyphenolic composition found in the extracts.

The ability of extracts to protect the DNA damage induced by free radicals and especially peroxy (ROO[•]) and hydroxyl (OH[•]), was confirmed using DNA plasmid breakage assay. Inhibition of converting supercoiled form to the open circular plasmid or linear suggests a mechanism of antioxidant and antimutagenic activity.

Consequently, and based on the results of this study it is proposed to recover, using modern and safe for human health methods, plant polyphenols found in large quantities in the by-products (waste) of production process and their use for either enhancing the antioxidant activity of the final products (juices) or for creating new products (cosmetics, dietary supplements, etc.)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	15
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	18
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
1.1. Χημειοπροστασία	20
1.1.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και η χημειοπροστασία	20
1.2. Ελεύθερες ρίζες	22
1.2.1. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	22
1.2.2. Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες.	24
1.2.3. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού	25
1.2.4. Οξειδωτικό Στρές	26
1.3. Φυτικές πολυφαινόλες.....	28
1.3.1. Γενικά	28
1.3.2. Ταξινόμηση και πηγές φυτικών πολυφαινολών	28
1.3.2.1. Φλαβονοειδή.....	29
1.3.2.2. Φαινολικά οξέα.....	31
1.3.2.3. Στιλβένια και Λιγνάνια.....	32
1.3.2.4. Τανίνες.....	33
1.3.3. Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών.....	33
1.3.3.1. Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση.....	34
1.3.3.2. Αντιμεταλλαξιγόνος και άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών.....	36
1.4. Η Ροδιά και τα προϊόντα της	38
1.4.1. Η ιστορία του Ροδιού.....	38
1.4.2. Βοτανολογικά Χαρακτηριστικά	38
1.4.2. Καλλιέργεια και Παραγωγή	40
1.4.4. Φυτικές πολυφαινόλες ροδιού και υγεία	43
1.5. Συγκομιδή και Βιομηχανική επεξεργασία Ροδιού για την παραγωγή χυμού.....	47

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	50
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.1. Υλικά	51
2.1.1. Πλασμιδιακό DNA	51
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια	51
2.1.3. Εκχυλίσματα.....	52
2.1.3. Διαδικασία απόκτησης εκχυλισμάτων	53
2.1.3. Ολικά Φαινολικά και Ολικά Φλαβονοειδή	54
2.1.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών των εκχυλισμάτων.....	56
2.2. Μέθοδοι.....	58
2.2.1. Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	58
2.2.1.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH [•]	58
2.2.1.1.i Αρχή της μεθόδου	58
2.2.1.1.ii Πειραματική διαδικασία.....	59
2.2.1.1.iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση.....	61
2.2.1.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ^{•+}	61
2.2.1.2.i Αρχή της μεθόδου	61
2.2.1.2.ii Πειραματική διαδικασία.....	63
2.2.1.2.iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση.....	65
2.2.2. Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.	66
2.2.2.1. Γενικά	66
2.2.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	68
2.2.2.3. Επαγόμενη από ρίζες ROO [•] πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στοDNA	70
2.2.2.3.i Αρχή της μεθόδου	70
2.2.2.3.ii Πειραματική διαδικασία.....	71
2.2.2.3.iii Στατιστική ανάλυση.....	75
2.2.2.4. Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH [•]).....	75
2.2.2.4.i Αρχή της μεθόδου	75
2.2.2.4.ii Πειραματική διαδικασία.....	76
2.2.2.4.iii Στατιστική ανάλυση.....	78

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	79
3.1. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•.....	79
3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{•+}	85
3.3. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους.....	91
3.4. Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.....	94
3.5. Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH [•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.	100
3.6. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα	103
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1	: Δραστικές μορφές οξυγόνου	23
Πίνακας 2	: Αντιοξειδωτικές ουσίες του οργανισμού	24
Πίνακας 3	: Διαιτητικές πηγές Φλαβονοειδών	29
Πίνακας 4	; Σημαντικότερες χώρες παραγωγής Ροδιών	39
Πίνακας 5	: Είδος και περιεχόμενο δειγμάτων	51
Πίνακας 6	; Απόδοση Εκχύλισης	52
Πίνακας 7	; Ολικά Φαινολικά των δειγμάτων	53
Πίνακας 8	: Ολικά Φλαβονοειδή των δειγμάτων	54
Πίνακας 9	: Συγκεντρώσεις Μονομερών Πολυφαινολών των εκχυλισμάτων	56
Πίνακας 10	: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (DPPH)	59
Πίνακας 11	: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (DPPH)	59
Πίνακας 12	: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων (ABTS)	63
Πίνακας 14	: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (ABTS)	63
Πίνακας 15	: Ποσότητες αντιδραστηρίων (ROO [•])	71
Πίνακας 16	: Ποσότητες αντιδραστηρίων (OH [•])	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1	: Δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων	20
Εικόνα 2	: Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας	21
Εικόνα 3	: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών	22
Εικόνα 4	: Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών	24
Εικόνα 5	: Οξειδωτικό στρες	25
Εικόνα 6	: Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών	26
Εικόνα 7	: Κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με ROS	26
Εικόνα 8	: Χαρακτηριστική δομή Φλαβονοειδούς	28
Εικόνα 9	: Χημικές δομές Φλαβονοειδών (R: -OH ή -H)	28
Εικόνα 10	: Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων	30
Εικόνα 11	: Χημική δομή στυλβενίων (A) και δομή trans-ρεσβερατρόλης (B)	31
Εικόνα 12	: Χημική δομή λιγνανίου (Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη)	32
Εικόνα 13	: Άνθη και καρποί ροδιάς (Punica Granatum)	38
Εικόνα 14	: Σχηματικό διάγραμμα ροής επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων.	47
Εικόνα 15	: Διάγραμμα Ροής Διαδικασίας Παραγωγής Χυμού Ροδιού	48
Εικόνα 16	: Η αναγωγή του DPPH [•] σε DPPH:H	58
Εικόνα 17	: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα	61
Εικόνα 18	: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS ^{•+}	61
Εικόνα 19	: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA	66
Εικόνα 20	: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO [•]	69
Εικόνα 21	: Συσκευή ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin	21
Εικόνα 22	: Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης	72
Εικόνα 23	: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.	72
Εικόνα 24	: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης, στάδια απομάκρυνσης χρωματισμένων ζωνών.	73
Εικόνα 25	: Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech	73
Εικόνα 26	: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.	93
Εικόνα 27	: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1	: Εκτάσεις ροδιών ανά νομό το έτος 2006	40
Γράφημα 2	: Συνολικές Εκτάσεις ροδιών στην Ελλάδα	40
Γράφημα 3	: Γραφική απεικόνιση ολικών φαινολικών των δειγμάτων	53
Γράφημα 4	: Γραφική απεικόνιση ολικών φλαβονοειδών των δειγμάτων	54
Γράφημα 5	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 1</u> (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα)	78
Γράφημα 6	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 2</u> (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων)	79
Γράφημα 7	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 3</u> (φλοιοί ροδιού)	79
Γράφημα 8	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 4</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)	80
Γράφημα 9	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 5</u> (σπέρματα)	80
Γράφημα 10	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 6</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)	81
Γράφημα 11	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 7</u> (μια μορφή πούλπας)	81
Γράφημα 12	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 8</u> (μια μορφή πούλπας)	82
Γράφημα 13	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH [•] από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 9</u> (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν)	82
Γράφημα 14	: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων δειγμ. γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλ. τους με τη ρίζα DPPH [•] .	83
Γράφημα 15	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 1</u> (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα).	84
Γράφημα 16	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 2</u> (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων).	85
Γράφημα 17	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 3</u> (φλοιοί ροδιού).	85
Γράφημα 18	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 4</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ).	86
Γράφημα 19	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 5</u> (σπέρματα)	86
Γράφημα 20	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 6</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)	87

Γράφημα 21	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 7</u> (μια μορφή πούλπας)	87
Γράφημα 22	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 8</u> (μια μορφή πούλπας)	88
Γράφημα 23	: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS ^{•+} από το εκχύλισμα του <u>Δείγματος 9</u> (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν)	88
Γράφημα 24	: Γραφική απεικόνιση τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα ABTS ^{•+}	89
Γράφημα 25	: Απεικόνιση των τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους	90
Γράφημα 26	: Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS)	91
Γράφημα 27	: Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τα Ολικά Φαινολικά	91
Γράφημα 28	: Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου ABTS με τα Ολικά Φαινολικά	91
Γράφημα 29	: Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τα Ολικά Φλαβονοειδή	92
Γράφημα 30	: Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου ABTS με τα Ολικά Φλαβονοειδή	92
Γράφημα 31	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 1</u> (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	94
Γράφημα 32	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 2</u> (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	94
Γράφημα 33	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 3</u> (φλοιό ροδιού), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•] .	95
Γράφημα 34	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 4</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	95
Γράφημα 35	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 5</u> (σπέρματα), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•] .	96
Γράφημα 36	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 6</u> (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	96
Γράφημα 37	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 7</u> (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	97

Γράφημα 38	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 8</u> (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	97
Γράφημα 39	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 9</u> (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν), στις επαγόμενες από ρίζες ROO [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO [•]	98
Γράφημα 40	: Γραφική απεικόνιση τιμών IC ₅₀ των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων από ρίζες ROO [•] ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA	98
Γράφημα 41	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 3</u> (φλοιό ροδιού), στις επαγόμενες από ρίζες OH [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH [•]	100
Γράφημα 42	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 7</u> (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες OH [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH [•]	100
Γράφημα 43	: Επίδραση εκχυλίσματος του <u>Δείγματος 9</u> (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν), στις επαγόμενες από ρίζες OH [•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH [•]	101
Γράφημα 44	: Γραφική απεικόνιση τιμών IC ₅₀ των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων από ρίζες OH [•] ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA	101
Γράφημα 45	: Απεικόνιση των τιμών IC ₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις τρεις μεθόδους	102
Γράφημα 46	: Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των μεθόδων DPPH – ROO [•]	103
Γράφημα 47	: Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ των μεθόδων ABTS – ROO [•]	103
Γράφημα 48	: Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ της μεθόδου ROO [•] με τα Ολικά Φαινολικά	104
Γράφημα 49	: Συσχέτιση των τιμών IC ₅₀ της μεθόδου ROO [•] με τα Ολικά Φλαβονοειδή	104

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	[2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride)]	
ABTS	[azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]	
DMSO	(Dimethyl Sulfoxide)	Διμέθυλο σουλφοξείδιο
DNA	(Deoxyribonucleic Acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	(1,1-didhenyl-2-picrylhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πυκνιδραζύλιο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ
HDL	(High-Density Lipoprotein)	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HRP	(Horseradish Peroxidase)	Υπεροξειδάση
LDL	(Low-Density Lipoprotein)	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
NFC	(Not From Concentrated)	(χυμός) μη προερχόμενος από συμπύκνωμα
PON 1	(Paraoxonase)	Παραοξονάση 1
PPARγ	(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma)	γ -υποδοχείς του ενεργοποιητή του πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων
RNAse	(Ribonuclease)	Ριβονουκλεάση
RNS	(Reactive Nitrogen Species)	δραστικές μορφές αζώτου
RO\cdot	(alkoxyl radical)	ρίζα του αλκοξυλίου
ROO\cdot	(peroxyl radicals)	ρίζες περοξυλίου
ROS	(Reactive Oxygen Species)	δραστικές μορφές οξυγόνου
SET	(Single Electron Transfer)	μεταφορά ηλεκτρονίου
TGFβ1	(Transforming Growth Bactor beta 1)	
UV	(ultra violet)	υπεριώδης ακτινοβολία
H$_2$O$_2$	(hydrogen peroxide)	υπεροξείδιο του υδρογόνου
O$_2^{\cdot-}$	(superoxide radicals)	ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
OH\cdot	(hydroxyl radicals)	ρίζες υδροξυλίου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος “χημειοπροφύλαξη” εισήχθη για πρώτη φορά το 1976 από τον Dr. Michael B. Sporn και αφορούσε στην πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου μέσω της χορήγησης βιοδραστικών, μη θρεπτικών συστατικών των φυτικών τροφών (τα οποία ονομάζονται φυτοχημικά συστατικά), είτε ως μέρος της διαίτας είτε ακόμα και με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής (Sporn, 1976). Σήμερα η χημειοπροφύλαξη θεωρείται μία από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την αντιμετώπιση της νόσου. Σημαντικά μεγάλος είναι ο αριθμός των πολύτιμων φυτοχημικών συστατικών που ως μέρος της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου, αποτελούν ισχυρό σύμμαχό του στην πρόληψη τόσο του καρκίνου όσο και άλλων σοβαρών ασθενειών.

Στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, στο οποίο εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια πλήθος φυτικών εκχυλισμάτων, σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους, που οφείλονταν κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιείχαν. (Stagos D et al., 2012)

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού, τόσο από τα γίγαρτα και τους βόστρυχους όσο και από τα στέμφυλα. Επιπλέον εξετάστηκε η βιολογική δράση εκχυλισμάτων (μεθανολικών και υδατικών) και πολυφαινολικών κλασμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, [πχ. Μανδηλαριά Σαντορίνης (κόκκινα σταφύλια) και Ασσύρτικο Σαντορίνης (άσπρα σταφύλια)], καθώς και μονομερών φυτικών πολυφαινολών που ανιχνεύτηκαν σε αυτά. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και εξαιρετική προστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης από τις ελεύθερες ρίζες, βλάβη του DNA. (Stagos D et al., 2007; Spanou C et al. 2007)

Ακόμη και στα πλαίσια της αναζήτησης από το εργαστήριο νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων μελετήθηκαν υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από έναν μεγάλο αριθμό φυτών ελληνικών ψυχανθών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι, τα εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA . Επιπλέον επηρέαζαν τη

δραστηριότητα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. (Spanou CI et al., 2012; Spanou CI et al., 2008;)

Καθώς σε μεγάλο αριθμό μελετών πολλά είδη αρωματικών φυτών φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες στο εργαστήριο μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση εκχυλισμάτων ενδημικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας, και τσαγιού. Από τη μελέτη μεγάλου αριθμού εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών όλα σχεδόν τα εκχυλίσματα επέδειξαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με ελεύθερες ρίζες παρουσιάζοντας έντονη αντιοξειδωτική δράση.

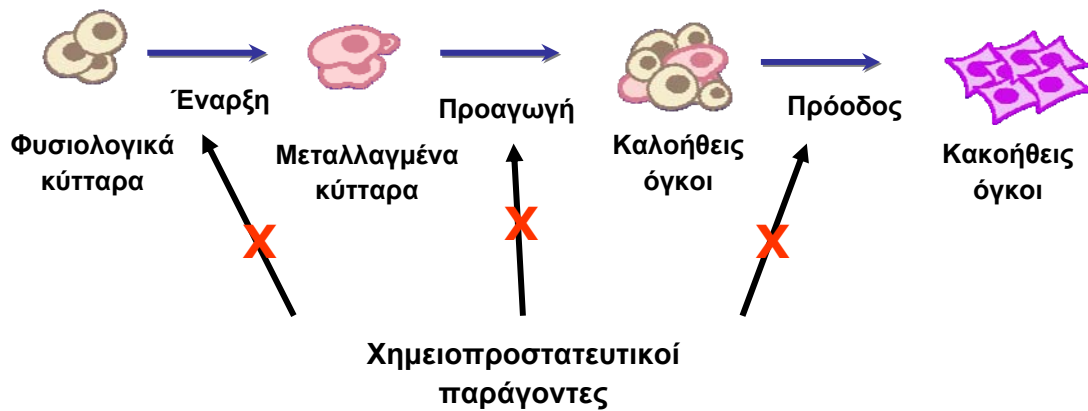
1.1 Χημειοπροστασία

1.1.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και η χημειοπροστασία

Καρκινογένεση είναι ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό μέσω μιας πολυδιάστατης διαδικασίας. Είναι μία μεταβολική ασθένεια η πορεία της οποίας διαιρείται σε τρία γενικά στάδια (Bishop 2000). Το αρχικό στάδιο ή στάδιο έναρξης (initiation), το στάδιο της προαγωγής (promotion) και το στάδιο της προόδου (progression). Στο πρώτο στάδιο συμβαίνουν οι γενετικές βλάβες στο DNA, στο δεύτερο στάδιο εμφανίζονται οι φαινοτυπικές ανωμαλίες και στο τρίτο στάδιο μέσω σύνθετων μηχανισμών, οι γενετικές και φαινοτυπικές ανωμαλίες. Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μία εκτεταμένη χρονικά, ασυμπτωματική περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης μέχρι και την εμφάνιση της νόσου. Έτσι οι μελέτες σχετικά με την χημειοπροστασία βασίζονται στην υπόθεση, ότι η διακοπή αυτής της μεταβολικής διαδικασίας σε κάποιο από τα στάδια, θα αναστείλει ή θα ανατρέψει την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Ο όρος χημειοπροστασία χρησιμοποιείται στην πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή μέσω των φυσικών συστατικών των τροφών. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροστατευτικής

δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια (Greenwald, 1995). (Εικόνα 1)



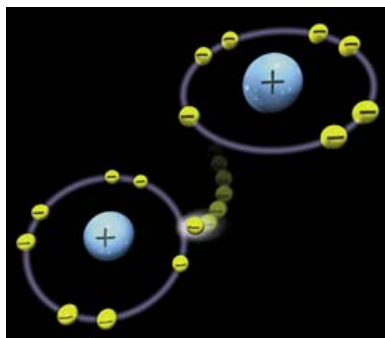
Εικόνα 1 : Δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Οι παράγοντες οι οποίοι εμφανίζουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: στους ανασταλτικούς παράγοντες (blocking agents) και στους κατασταλτικούς παράγοντες (suppressing agents) (Wattenberg 1985). Οι ανασταλτικοί παράγοντες εμποδίζουν την προσέγγιση των ιστών-στόχων από τα καρκινογόνα, εμπλεκόμενοι στην μεταβολική τους ενεργοποίηση ή στην αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με σημαντικά μακρομόρια του κυττάρου (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι κατασταλτικοί παράγοντες παρεμποδίζουν την κακοήθη μεταμόρφωση των αρχικών κυττάρων είτε κατά την προαγωγική φάση (promotion) είτε κατά την προοδευτική (progression) φάση της καρκινογένεσης.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να παρεμποδίσουν ή να αναστρέψουν το προκαρκινογόνο στάδιο (αρχική φάση και φάση προαγωγής) της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί δράσης των φυτικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων περιλαμβάνουν το μεταβολισμό των καρκινογόνων παραγόντων από τα ένζυμα του μεταβολισμού, την επιδιόρθωση του DNA, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την επίδραση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση, την έκφραση και λειτουργική ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την επίδραση στην αγγειογένεση και την μετάσταση καθώς και την ορμονική και αυξητική κατάσταση των κακοήθων κυττάρων (Caragay, 1992; Steinmetz et al,1991).

1.2. Ελεύθερες ρίζες

Τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας των ατόμων και των μορίων βρίσκονται συνήθως σε ζεύγη, τα οποία κινούνται σε μία καθορισμένη περιοχή που ονομάζεται αντίστοιχα ατομικό ή μοριακό τροχιακό. Τα άτομα ή μόρια, που φέρουν στην εξωτερική τους στοιβάδα ένα ή περισσότερα ασύζευκτα (unpaired) ηλεκτρόνια ονομάζονται ελεύθερες ρίζες (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που έχει στον πυρήνα ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο. Το μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο, γενικά, αυξάνει τη δραστηριότητα του μορίου ή του ατόμου γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος ηλεκτρονίων. Όσο σταθερότερη είναι μια ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της. Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστηριότητα (Valavanidis, 2006) (Εικόνα 2). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell& Gutteridge, 1990). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη ελεύθερη ρίζα τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).

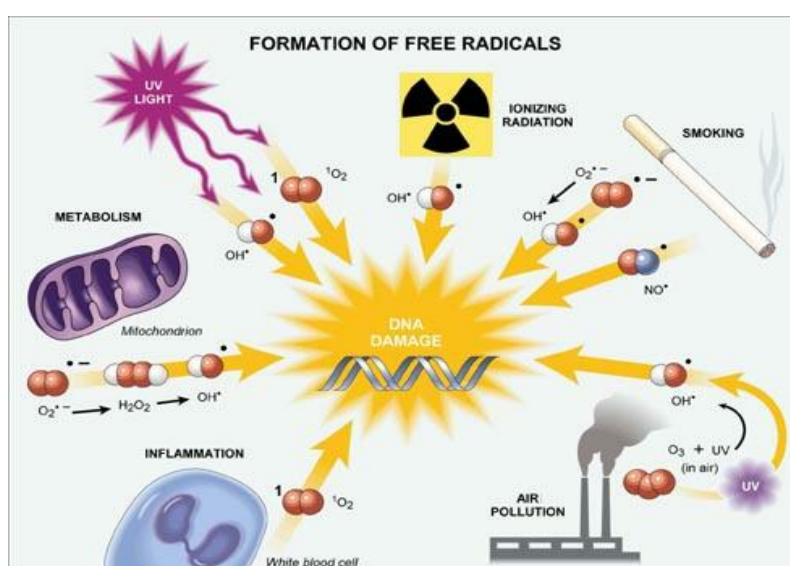


Εικόνα 2: Η δραστηριότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

1.2.1. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε ένα ευρύ φάσμα χημικών και βιολογικών συστημάτων, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, της παλαίωσης των χρωμάτων, της καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό

(Halliwell B, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν ως παραπροϊόν κατά την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, και κατά τη λιπιδική οξείδωση. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν η ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία), η φλεγμονή, το κάπνισμα και η ρυπασμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες στα βιολογικά συστήματα είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.



Εικόνα 3 : Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες :

- Είναι ρυθμιστές της ομοιόστασης και ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών
 - συμμετέχοντας στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων
 - ενεργοποιώντας τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
- Ενεργοποιούν ένζυμα και προστατευτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς
- Αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων έναντι παθογόνων οργανισμών
- Η ρίζα NO^\bullet είναι σημαντικός ρυθμιστής της πίεσης του αίματος, προκαλώντας αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυϊκών ινών

Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται ο όρος “δραστικές μορφές οξυγόνου” (Reactive oxygen species, ROS) (Πίνακας 1). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που

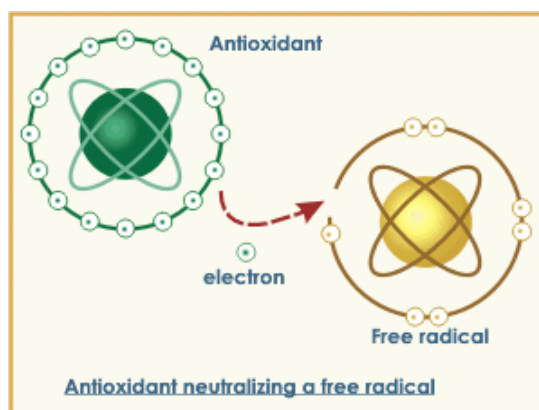
έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\bullet-}$, και το OH^{\bullet} . Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet-}$), του υδροξυλίου (OH^{\bullet}), του αλκοξυλίου (RO^{\bullet}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\bullet}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\bullet}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\bullet}) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$). Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξείδιο (NO^{\bullet}) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^{\bullet}) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες [π.χ. το νιτρώδες οξύ (HNO_2) και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ($ONOO^-$)] (Halliwell & Gutteridge, 1998, Halliwell, 2001).

Όνομα	Τύπος
Ρίζα του σουπεροξειδίου	$O_2^{\bullet-}$
Υδροξυλική ρίζα	HO^{\bullet}
Υδροξυπεροξυλική ρίζα	H_2O^{\bullet}
Υπεροξειδική ρίζα	ROO^{\bullet}
Αλκοξειδική ρίζα	RO^{\bullet}
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	H_2O_2

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

1.2.2. Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες.

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει, αναστέλλει ή παρεμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001). Η δράση των αντιοξειδωτικών συνίσταται είτε στην παρεμπόδιση της οξείδωσης των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε στον περιορισμό του σχηματισμού ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά δρουν είτε προσφέροντας στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει εμποδίζοντας έτσι τη δράση τους (Εικόνα 4) είτε ενεργοποιώντας τα ενδογενή αμυντικά συστήματα των οργανισμών (Halliwell B, 2001).



Εικόνα 4: Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών

1.2.3. Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών του οργανισμού

Το σύστημα της αντιοξειδωτικής άμυνας ενός οργανισμού απαρτίζεται από ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς. Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι μη ενζυμικές πρωτεΐνες καθώς και μικρού μοριακού βάρους μόρια χωρίς ενζυμική δράση. Στον Πίνακα 2 φαίνεται η κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών ουσιών ενός οργανισμού.

Αντιοξειδωτικές Ενώσεις	
I.	Ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση
	➤ Υπεροξειδική Δισμουτάση
	➤ Καταλάση
	➤ Γλουταθειόνη
	➤ Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης
	➤ Αναγωγή της Γλουταθειόνης
II.	Μη ενζυμικές πρωτεΐνες
	➤ Τρανσφερρίνη – Φερριτίνη
	➤ Σερουλοπλασμίνη
	➤ Αλβουμίνη
III.	Αντιοξειδωτικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους
	➤ Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)
	➤ Ουρικό Οξύ
	➤ Βιταμίνη E (α-Τοκοφερόλη)
	➤ Συνένζυμο Q-10
	➤ Καροτένια

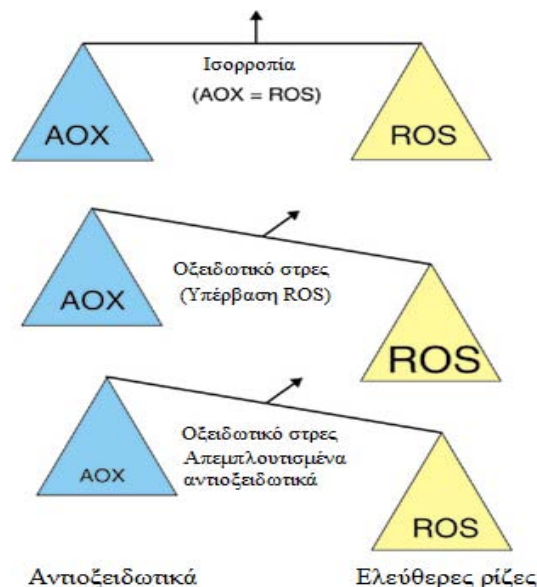
Πίνακας 2 : Αντιοξειδωτικές ουσίες του οργανισμού.

1.2.4. Οξειδωτικό Στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 5) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

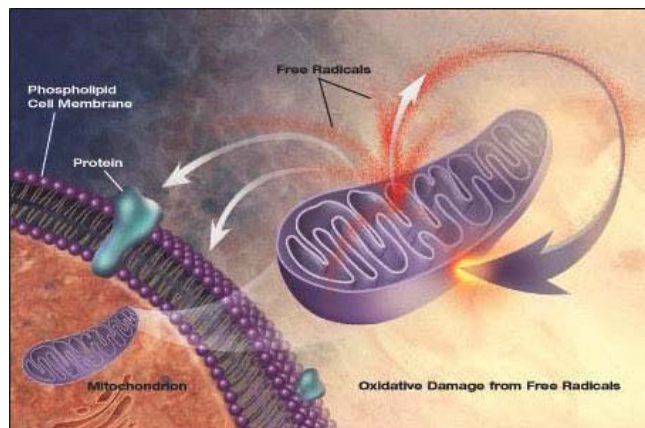
1. *Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.* Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. *Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS).* Αυτό συμβαίνει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



Εικόνα 5: Οξειδωτικό στρες

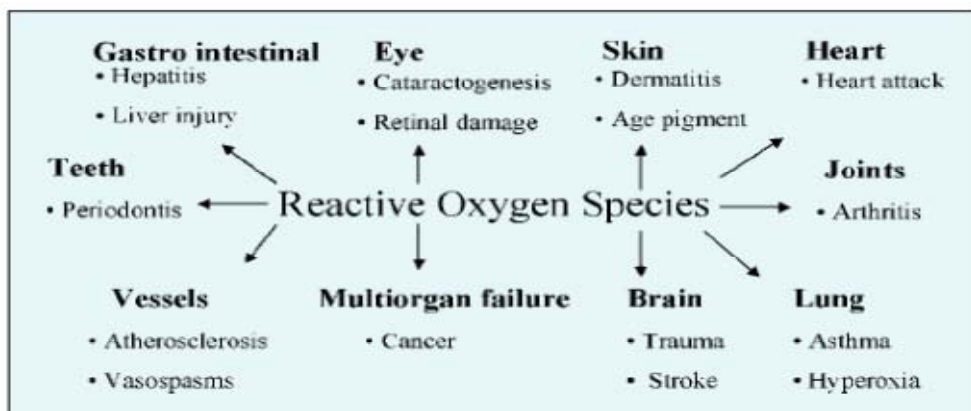
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με σημαντικά βιομόρια, βασικά συστατικά του κυττάρου (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα) και να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος (Εικόνα 6). Οι ελεύθερες ρίζες

μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D-ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων. Πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται και μετουσιώνονται (Lygas et al, 1977). Επίσης οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν λιπιδική υπεροξειδωση ενώ έρευνες έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge, 1998).



Εικόνα 6 : Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001), για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες (Εικόνα 7), αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει εκτός από τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), και τον καρκίνο (Toyokuni, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) κ.ά.



Εικόνα 7: Κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με ROS

1.3. Φυτικές πολυφαινόλες

1.3.1 Γενικά

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998). Έχουν αναγνωρισθεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005).

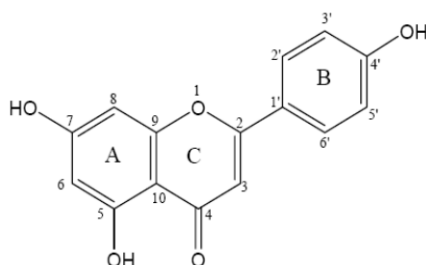
1.3.2. Ταξινόμηση και πηγές φυτικών πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως καταναμημένες ομάδες ουσιών στο φυτικό βασίλειο, με περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές γνωστές έως σήμερα. Προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια, το μονοπάτι του οξικού και το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (Harborne, 1989). Οι πολυφαινόλες είναι ένα εξαιρετικά ευρύ και σύνθετο σύνολο φυτικών ουσιών. Μια πολυφαινολική ένωση αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες δεσμευμένες στους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα.

Η ταξινόμηση των πολυφαινολών σε κατηγορίες γίνεται με βάση τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι διακρίνονται σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή, με τα τελευταία να χωρίζονται σε φαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνια.

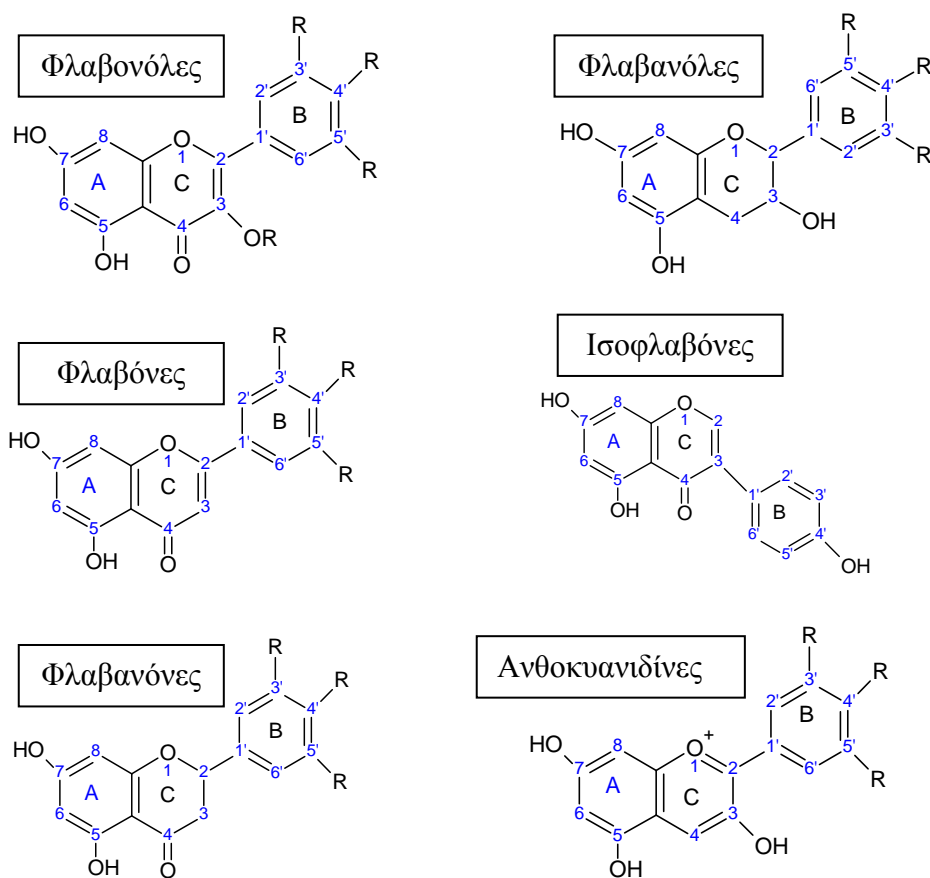
1.3.2.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η σημαντικότερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινόλων. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 13 υποκατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν περισσότερες από 5000 ενώσεις (Harborne, 1993). Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί (βενζοϊκοί) δακτύλιοι (A και B), οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 : Χαρακτηριστική δομή Φλαβονοειδούς

Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 9)



Εικόνα 9 : Χημικές δομές Φλαβονοειδών (R: -OH ή -H)

Τα φλαβονοειδή στα φυτά βρίσκονται στα φύλλα, στους σπόρους, στον φλοιό και στα άνθη. Παρέχουν σε αυτά προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, από παθογόνους παράγοντες και από φυτοφάγα ζώα (Harborne et al., 2000).

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 (Afaq et al., 2005). Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία από ανθοκυανίνες στο ρόδι, κυρίως με την γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, με κυριότερες την κυανιδίνη, την δελφινιδίνη και την πελαργονίνη (Lansky et al., 2007).

Οι φλαβονόλες αποτελούν την ομάδα των φλαβονοειδών με την υψηλότερη συγκέντρωση στη διατροφή. Οι κυριότερες ενώσεις αυτής της κατηγορίας, η κερκετίνη και η καμπφερόλη, περιέχονται στον φλοιό (περικόρπιο) και στον χυμό του ροδιού. Στον φλοιό του ροδιού επίσης περιέχεται και λουτεολίνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των φλαβονών. Οι ισοφλαβόνες είναι φλαβονοειδή με δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα. Η δομή τους καθώς και η ικανότητά τους να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων τις κατατάσσει ως φυτοοιστρογόνα. Η γενιστεΐνη είναι μια ισοφλαβόνη που περιέχεται στους σπόρους του ροδιού (Syed et al., 2007). Στον πίνακα 3 φαίνονται οι κατηγορίες των φλαβονοειδών καθώς και οι διαιτητικές τους πηγές.

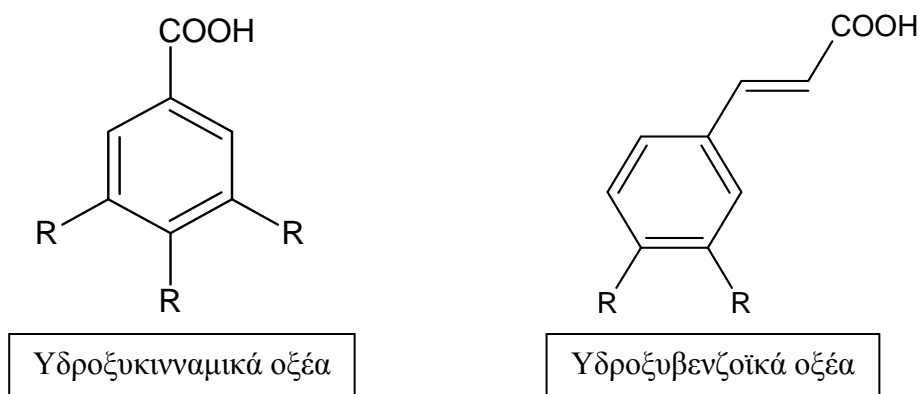
Φλαβονοειδή	Διατητικές Πηγές
Φλαβονόλες	Ρόδι, μήλα, βατόμουρα, ελιές, κρεμμύδια, πράσα, κρασί, τσάι.
Φλαβανόλες	Βερίκοκα, σταφύλια, κρασί, πράσινο τσάι, σοκολάτα.
Φλαβόνες	Ρόδι, σέλινο, μαϊντανός, δημητριακά, εσπεριδοειδή.
Ισοφλαβόνες	Ρόδι, όσπρια (σόγια).
Φλαβανόνες	Τομάτες, εσπεριδοειδή, αρωματικά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

Πίνακας 3 : Διαιτητικές πηγές Φλαβονοειδών.

Το πρόσφατο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή οφείλεται στις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, που αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Heim et al., 2002). Λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL τα φλαβονοειδή έχουν επιδείξει μοναδική καρδιοπροστατευτική δράση (Mazur et al., 1999). Ο σημαντικός και προστατευτικός ρόλος των φλαβονοειδών στην διατροφή του ανθρώπου έχει αναδειχθεί από ορισμένες μεγάλες προοπτικές μελέτες. Για παράδειγμα, η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών προέβλεψε χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο και χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου στους άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας (Hertog et al., 1993) και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 38% σε γυναίκες σε ηλικίες μετά την εμμηνόπαυση (Yochum et al 1999).

1.3.2.2. 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 (Εικόνα 10).



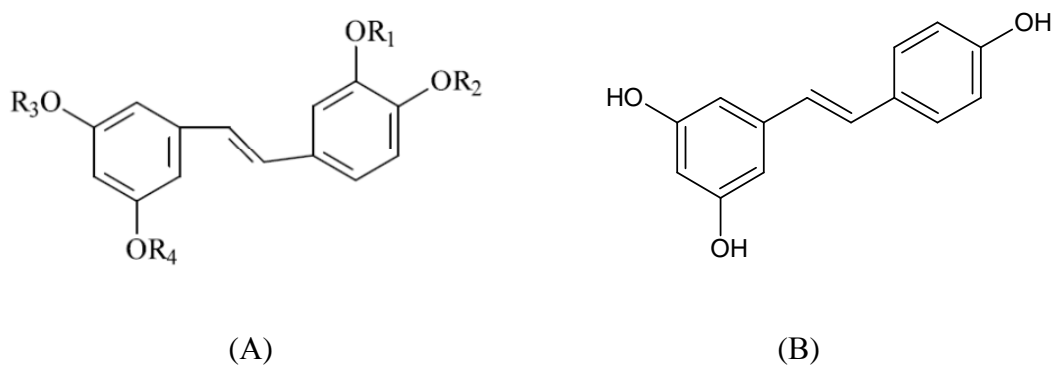
Εικόνα 10 : Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων.

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Στα φυτά τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται συχνότερα από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, με κυριότερα μέλη τους το καφεϊκό οξύ, και το κουμαρικό οξύ. Το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ είναι από τα πιο χαρακτηριστικά μέλη των υδροξυβενζοϊκών οξέων (Manach et al., 2004).

Στο ρόδι και ειδικότερα στο χυμό του περιέχονται τόσο υδροξυκινναμικά οξέα (κυρίως καφεϊκό αλλά και χλωρογενικό και p-κουμαρικό οξύ) (Poyrazoglu et al., 2000) όσο και υδροξυβενζοϊκά οξέα (κυρίως γαλλικό αλλά και ελλαγικό οξύ) (Amakura et al., 2000).

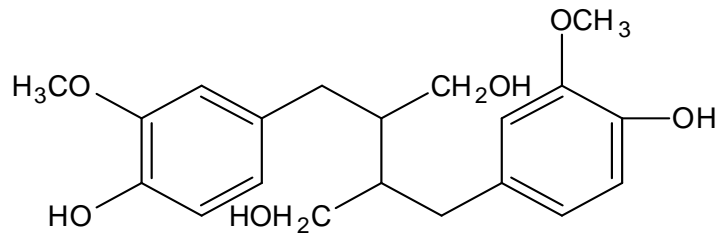
1.3.2.3. Στιλβένια και Λιγνάνια

Τα στιλβένια είναι μια κατηγορία πολυφαινολών που περιέχεται σε μικρά ποσοστά στα τρόφιμα. Τα στιλβένια παράγονται από τα φυτά όταν αυτά βρεθούν σε καταστάσεις stress (Schultz et al., 1990). Έτσι όταν ένα φυτό αντιμετωπίσει έναν εξωτερικό παράγοντα κινδύνου (μικρόβιο, αντίξοες καιρικές συνθήκες) τότε ενεργοποιεί μηχανισμούς σύνθεσης στιλβενίων. Το σημαντικότερο μέλος αυτής της ομάδας πολυφαινολών είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται κυρίως στο κρασί και στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών (Εικόνα 11). Στην *ρεσβερατρόλη* αποδίδεται αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση και θεωρείται ένας καλός χημειοπροστατευτικός, έναντι του καρκίνου, παράγοντας (Bhat et al., 2002).



Εικόνα 11 : Χημική δομή στιλβενίων (A) και δομή *trans*-ρεσβερατρόλης (B)

Τα λιγνάνια, μια ακόμη κατηγορία πολυφαινολών η οποία απαντάται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου, σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες (Εικόνα 12). Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, τα οποία μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα των θηλαστικών στα αντίστοιχα ζωικά παράγωγα την εντεροδιόλη και την εντερολακτόνη. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες στα ψυχανθή (φακές), στα δημητριακά (σιτάρι), στα λαχανικά (σκόρδο, σπαράγγια, καρότα), και στα φρούτα (αχλάδια, δαμάσκηνα) (Manach et al., 2004).



Εικόνα 12 : Χημική δομή λιγνανίου (Σεκοΐσολαρισρεσινόλη).

1.3.2.4. Τανίνες

Οι τανίνες είναι μέσου και υψηλού μοριακού βάρους φυτικές πολυφαινόλες οι οποίες χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες τανίνες. Μια τρίτη κατηγορία τανινών, οι phlorotannins βρίσκονται στα καφέ θαλάσσια άλγη, και δεν αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διαίτας (Ragan et al., 1986). Οι υδρολυόμενες τανίνες αποτελούν κύρια παράγωγα του ελλαγικού οξέος (ελλαγιτανίνες) και του γαλλικού οξέος (γαλλοτανίνες) (Seeram et al., 2005a). Υδρολυόμενες τανίνες υπάρχουν στα βατόμουρα, στις φράουλες αλλά και στον χυμό του ροδιού. Πλούσιος σε υδρολυόμενες τανίνες είναι και ο φλοιός (περικόρπιο) του ροδιού κυρίως ως punicalin, pedunculagin, και punicalagin (Seeram et al., 2005b). Οι συμπυκνωμένες τανίνες ή αλλιώς προανθοκυανιδίνες είναι μια ετερογενής ως προς την χημική δομή και το μοριακό βάρος ομάδα ενώσεων, που αποτελείται από διμερή, ολιγομερή, ή πολυμερή μιας φλαβαν-3-όλης, όπως η κατεχίνη ή η επικατεχίνη. Ονομάζονται προανθοκυανιδίνες διότι υπό την επίδραση ισχυρών οξέων υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, και βρίσκονται στο τσάι, στα σταφύλια, στα βατόμουρα και αλλού. Οι τανίνες έχουν την ικανότητα να συνδέονται και να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μειώνουν την βιοδιαθεσιμότητά τους. Παρόλα αυτά, στις τανίνες αποδίδονται αντιοξειδωτικές ικανότητες και αντικαρκινικές, αντιμεταλλαξιγόνες, αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Cos et al., 2003)

1.3.3 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών

Στις φυτικές πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές δράσεις, τόσο για το ίδιο το φυτό όσο και για τον άνθρωπο.

Έχει μελετηθεί ότι συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού απέναντι στην υπερϊώδη ακτινοβολία και την προσβολή από παθογόνα. Στις πολυφαινόλες επίσης οφείλεται το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al, 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Di Carlo et al, 1999; Harborne 1986).

1.3.3.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινόλων που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών και χηλικών μετάλλων (Blokchina et al, 2003; Ferguson, 2001).

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

- i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας,
- ii) 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

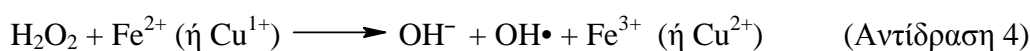
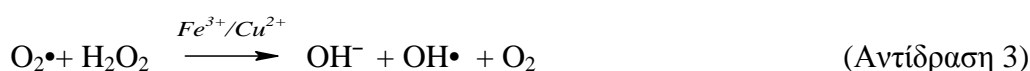
PPH : πολυφαινολική ένωση

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 (Ferguson et al., 2001).



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 (Nijveldt et al., 2001). 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 (Heim et al., 2002).



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 (Li και Trush 1994; Rahman et al., 1989). 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 (Yoshino et al., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό $OH\bullet$.

Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση (Yoshino και συν., 1999) 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 (Yamamoto et al., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).

1.3.3.2 Αντιμεταλλαξιγόνος και άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών

Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο δράση των φυτικών πολυφαινολών. Αυτές έχουν αποδοθεί μετά από παρατήρηση δράσεων των πολυφαινολών παρουσία μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, όσο και *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές τις δράσεις είναι μη εξειδικευμένες όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιγόνων μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001).

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 ξενοβιοτικών ουσιών

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog et al., 1993; Knekt et al., 1996). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτή η προστατευτική δράση όπως η αναστολή της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Frankel 1993). Η οξείδωση της LDL θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία.

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι πολυφαινόλες μειώνουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και έτσι μειώνεται ο σχηματισμός θρόμβων (Tzeng et al., 1991).

Επιδημιολογικές μελέτες επίσης, έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να προσφέρουν προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt et al., 2002), του στήθους (Dai et al., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas et al., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand et al., 2000).

Στις φυτικές πολυφαινόλες, έχουν επίσης αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες, όπως προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994), δράση κατά του έλκους (Alarcon et al., 1994), αντιυικές (Chu et al., 1992), αντιαλλεργικές (Di Carlo et al., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia et al., 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach et al., 2004).

1.4. Η Ροδιά και τα προϊόντα της

1.4.1. Η ιστορία του Ροδιού

Η ροδιά είναι από τα πρώτα καταγεγραμμένα δέντρα που καλλιεργηθήκαν από τον άνθρωπο. Οι αντιμικροβιακές και θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού είχαν γίνει αντιληπτές από τα αρχαία χρόνια και στην Αρχαία Ελλάδα το ρόδι αποτελούσε σύμβολο ζωής και γονιμότητας. Οι ευεργετικές του ιδιότητες αναφέρονται σε έργα του Ομήρου, του Θεοφράστου και του Πλινίου με τον τελευταίο να ξεχωρίζει τα ρόδια από τα Καρτάγενα ως την καλύτερη ποικιλία της εποχής. Το ρόδι αποτελεί μέρος της κουλτούρας πολλών αρχαίων πολιτισμών. Οι Αιγύπτιοι έθιβαν ένα ρόδι μαζί με τους νεκρούς τους ενώ για τους βουδιστές αποτελεί ένα από τα τρία ευλογημένα φρούτα (μαζί με το ροδάκινο και το κεδρόμηλο). Ο Μωάμεθ προέτρεπε τους πιστούς του να καταναλώνουν ρόδια ώστε έτσι να εξιλεώνονται από όλα τα κακά της ανθρώπινης φύσης. Στην Ελλάδα συνδέεται με το μύθο της Περσεφόνης στην οποία ο Πλούτωνας προσφέρει ένα ρόδι για να μείνει στον Άδη. Στις σημαντικές θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού, πολύ πριν αναγνωριστούν από σύγχρονους επιστήμονες και ερευνητές, είχαν αναφερθεί διάσημοι της αρχαιότητας όπως ο Ιπποκράτης, ο Γαληνός, και ο Διοσκουρίδης. Στη Μέση Ανατολή τα ρόδια χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία της αμυγδαλίτιδας, των αιμορροΐδων και της κερατοειδίτιδας. Το ρόδι όμως αποτελεί μέρος και της σύγχρονης παράδοσης. Στην Ελλάδα σπάμε ένα κάθε Πρωτοχρονιά για καλοτυχία ενώ για τον ίδιο λόγο στην Κίνα οι νιόπαντροι τρώνε ένα ρόδι. Υπάρχουν πολλά ακόμη παραδείγματα της ξεχωριστής εκτίμησης που τυγχάνει το ρόδι από διάφορους πολιτισμούς. Σήμερα η επιστήμη έρχεται να επιβεβαιώσει τη σοφία των αρχαίων πολιτισμών.

1.4.2 Βοτανολογικά Χαρακτηριστικά

Η ροδιά (*Punica Granatum L.*) ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*, με ένα μόνο γένος *Punica* και ένα κυρίαρχο είδος *Granatum*. Το όνομά της *Pomegranate* προέρχεται από τις δύο Λατινικές λέξεις *romum* που σημαίνει μήλο και *granatus* που σημαίνει 'με σπόρια'.

Το φυτό (Εικόνα 13) είναι θάμνος με ύψος που μπορεί να φτάσει τα 5 μέτρα αλλά με κατάλληλο κλάδεμα μπορεί να διαμορφωθεί και σε δέντρο που μπορεί να φτάσει τα 7 μέτρα. Τα φύλλα είναι λεία, λογχοειδή, μικρά με αντίθετη διάταξη (Δρογούδη και άλλοι, 2007). Τα άνθη της είναι μεγάλα, συνήθως κόκκινα και σπανιότερα λευκά. Έχουν συνήθως 5-6 κυματιστά πέταλα που φυτρώνουν γύρω από τους στήμονες και τον ύπερο με πορτοκαλοκόκκινο σαρκώδη κάλυκα. Η ροδιά ανθοφορεί για πρώτη φορά μετά το 4^ο με 5^ο

έτος της ζωής της. Η ανθοφορία της διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα ξεκινώντας από τα τέλη Μαΐου. Η επικονίαση γίνεται είτε από το ίδιο το φυτό (αυτογόνιμη) είτε από τα έντομα. Ο καρπός της έχει κόκκινο εξωτερικό φλοιό που περικλείει τα εδώδιμα αρίλια (arils) των οποίων το χρώμα κυμαίνεται από λευκό μέχρι σκούρο κόκκινο και μωβ. Η ροδιά πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα ή παραφυάδες και οι καρποί της μετά την ωρίμανση θέλουν ξηρό κλίμα. Η ροδιά ευδοκίμει σε εύκρατα και υποτροπικά κλίματα με ψυχρούς χειμώνες και θερμά καλοκαίρια. Θεωρείται πιο ανθεκτική στο ψύχος από τα εσπεριδοειδή και την ελιά και είναι ανθεκτική στην ξηρασία. (Pradeepkumar et al., 2008; Janick et al., 2008). 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 (Δρογούδη και άλλοι, 2007).



Εικόνα 13 : Άνθη και καρποί ροδιάς (*Punica Granatum*).

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες ροδιάς που διαφέρουν στο χρώμα και το σχήμα του καρπού, στη σκληρότητα και το χρώμα των αριλίων καθώς και στην περιεκτικότητά τους σε χυμό. Ανάλογα με την ποικιλία ο χυμός μπορεί να διαφέρει ως προς τη γλυκύτητα και την οξύτητα ή να είναι περισσότερο ή λιγότερο στυφός.

Η ροδιά κατάγεται από την κεντρική Ασία αλλά λόγω της καλής της προσαρμοστικότητας σε μεγάλο εύρος κλιματολογικών και εδαφικών συνθηκών, καλλιεργείται πλέον σε πολλές περιοχές του πλανήτη, όπως στη Μεσόγειο, την Αμερική, τη Νότια Αφρική και την Αυστραλία.

Στην Ελλάδα οι βασικές ποικιλίες που καλλιεργούνται σήμερα είναι η ποικιλία της *Ερμιόνης* (Νότια Ελλάδα) και η ποικιλία *Αλπάνικα* (Βόρεια Ελλάδα).

Στον κόσμο, από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι η ποικιλία *Wonderful*. Σήμερα στην Καλιφόρνια η ποικιλία *Granada* αρχίζει να αντικαθιστά την *Wonderful* λόγω καλύτερου χρωματισμού. Σε μικρότερη έκταση καλλιεργείται και η παλαιότερη, σε

σύγκριση με τη Wonderful, ποικιλία η *Spanish Ruby*. 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 ζωνρά. 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 για αυτό και καλλιεργείται στις περισσότερες χώρες. Στην παρούσα εργασία οι καρποί και ο χυμός του ροδιού ανήκουν στην ποικιλία Wonderful.

1.4.2 Καλλιέργεια και Παραγωγή

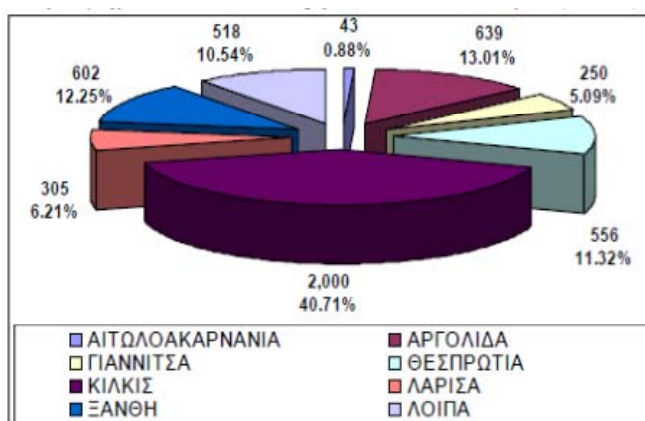
Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται σε 2.250.000 τόνους (Πίνακας 4). Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία, φαίνεται ότι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά, λόγω νέων φυτεύσεων σε πολλές χώρες και κυρίως στο Ισραήλ. (Tzourmani et al., 2008).

Χώρα	Παραγωγή (τόνοι)	Ποσοστό (%)
Ινδία	1.200.000	53,33
Ιράν	650.000	28,89
Η.Π.Α.	100.000	4,44
Τουρκία	75.000	3,33
Ισπανία	60.000	2,67
Ισραήλ	20.000	0,89
Λοιπές	145.000	6,44
Σύνολο	2.250.000	

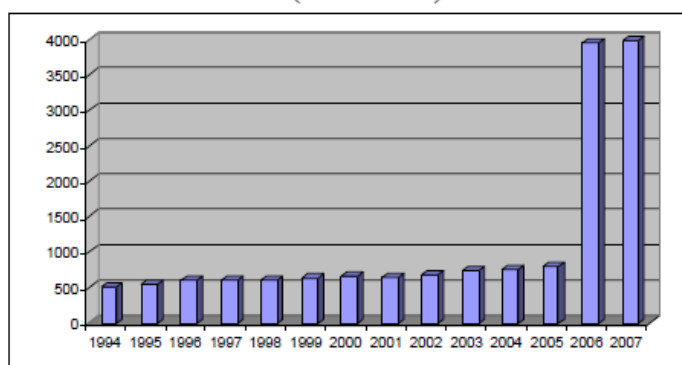
Πίνακας 4 : Σημαντικότερες χώρες παραγωγής Ροδιών (Tzourmani et al., 2008)

Σύμφωνα με παλαιότερα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (1989), μόνο το 10% του συνόλου των δέντρων βρίσκονταν σε οργανωμένους οπωρώνες ενώ η συνολική ετήσια παραγωγή, ανερχόταν σε 2.700 τόνους περίπου. Τη δεκαετία του '90, τόσο οι εκτάσεις κανονικών οπωρώνων όσο και η συνολική παραγωγή, μειώθηκαν σημαντικά. Σήμερα, στην περιοχή της Ερμιόνης, όπου η ροδιά αποτελεί παραδοσιακή καλλιέργεια, παράγεται ο κύριος όγκος (300-400 τόνοι) ροδιών στην Ελλάδα.

Τα τελευταία χρόνια, πολλοί παραγωγοί έχουν προβεί σε νέες φυτεύσεις δέντρων ροδιάς κυρίως της ποικιλίας Wonderful, στην Αργολίδα, στην Ηλεία, στη Λακωνία, στα Γιαννιτσία, στην Ξάνθη, στη Λάρισα και στα Φάρσαλα. Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, τα τελευταία χρόνια, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις έχουν αυξηθεί τουλάχιστον κατά 3 χιλιάδες στρέμματα, φτάνοντας συνολικά τα 4000 στρέμματα περίπου (Γραφήματα 1, 2).



Γράφημα 1: Εκτάσεις ροδιών ανά νομό το έτος 2006 (Tzourmani et al., 2008)



Γράφημα 2 : Συνολικές Εκτάσεις ροδιών στην Ελλάδα (Tzourmani et al., 2008)

Τα τελευταία χρόνια βρίσκεται σε εξέλιξη μεγάλη διαφημιστική καμπάνια στις Η.Π.Α. που έχει ως σκοπό να ενημερώσει του καταναλωτές για τις ευεργετικές ιδιότητες του ροδιού. Από το 2003 και μετά, 961 προϊόντα με βάση το ρόδι εισήλθαν στην αγορά των Η.Π.Α. Η διαφήμιση οδήγησε σε κατακόρυφη αύξηση της ζήτησης στις Η.Π.Α., ενώ ο απόηχος έφτασε και στην Ευρώπη τονώνοντας τη ζήτηση σε πολλές ευρωπαϊκές αγορές. Όμως οι προσφερόμενες ποσότητες ροδιών δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής πώλησης. Το μεγαλύτερο βάρος της διαφημιστικής εκστρατείας, δόθηκε στην ανάδειξη της θεραπευτικής αξίας των ροδιών. Από το 2002 και μετά, πάρα πολλές μελέτες ανέδειξαν τις ευεργετικές ιδιότητες των ροδιών που οφείλονται στην παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αντιοξειδωτικών Η ελληνική αγορά εισάγει μεγάλες ποσότητες ροδιών (κυρίως από την Τουρκία, το Ιράν, την Ινδία, την Αίγυπτο και το Ισραήλ) προκειμένου να καλύψει τις ανάγκες της. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, η ελληνική αγορά απορροφά ποσότητες ροδιών που κυμαίνονται μεταξύ 1.000-1.200 τόνων, εκ των οποίων οι 800 τόνοι εισάγονται. Οι εισαγόμενες ποσότητες αφορούν κυρίως ρόδια ξινών ή ημίξινων, ποικιλιών που χαρακτηρίζονται από πολύ καλή εξωτερική εμφάνιση. Επίσης, τα τελευταία χρόνια προωθούνται στην αγορά ολοένα και περισσότερα επώνυμα προϊόντα που περιέχουν ρόδι. Η ποικιλία των προϊόντων αυτών δεν περιορίζεται μόνο σε προϊόντα διατροφής (χυμοί, ποτά, αναψυκτικά, γιαούρτια, παγωτά, μαρμελάδες, καφές) αλλά περιλαμβάνει και καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής (Tzourmani et al., 2008).

Το κόστος εγκατάστασης της φυτείας ανέρχεται περίπου στα 1330 €στρέμμα, και περιλαμβάνει τις δαπάνες που πραγματοποιούνται κατά τα πρώτα τρία χρόνια, όσο δηλαδή θεωρείται ότι διαρκεί η περίοδος εγκατάστασης της φυτείας. Ένας καλός σπωρώνας 8-10 ετών αποδίδει 1,8-2,5 τόνους ανά στρέμμα εμπορεύσιμο ρόδι. Η απόδοση ελαττώνεται βαθμιαία μετά το 25^ο-30^ο έτος των δέντρων. Το καθαρό εισόδημα υπολογίζεται σε 1000-1200 €στρέμμα (Δρογούδη και άλλοι, 2007).. Επισημαίνεται ότι η εμπορική αξία του καρπού επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από το μέγεθός του. Έτσι, τα μεγαλύτερου μεγέθους ρόδια (>400g), πωλούνται ακριβότερα, ενώ τα πολύ μικρού μεγέθους έχουν ελάχιστη εμπορική αξία. Επίσης, ο καρπός πρέπει να έχει έντονο κόκκινο χρώμα και καλά διαμορφωμένο στέμμα για να έχει αυξημένη εμπορική αξία.

1.4.4 Φυτικές πολυφαινόλες ροδιού και υγεία

Παρά το γεγονός ότι τα στοιχεία υπέρ της χρήσης των προϊόντων του ροδιού είναι ελπιδοφόρα, απαιτούνται εκτεταμένες μελέτες για την πλήρη κατανόηση της ενδεχόμενης συμβολής του στην ανθρώπινη υγεία και για την σύσταση για τακτική κατανάλωσή του (Syed et al., 2007). Λίγα είναι γνωστά σχετικά με την απορρόφηση, τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοκατανομή και τον μεταβολισμό των βασικών βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν στα ρόδια και σε άλλα φρούτα, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες, παρότι αυτές πιθανόν μοιράζονται κοινά μονοπάτια (Petti and Scully, 2009). Μια *in vitro* μελέτη σχετικά με την πέψη του χυμού του ροδιού έδειξε ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις του ροδιού είναι διαθέσιμες κατά τη διάρκεια της πέψης κατά ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (29%). Παρόλα αυτά όμως και λόγω του pH οι ανθοκυανίνες υποβαθμίζονται σε πολύ υψηλό ποσοστό (97%) με παρόμοια αποτελέσματα και για την βιταμίνη C (Pérez-Vicente et al., 2002).

Το ρόδι θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα λειτουργικό τρόφιμο (functional food) λόγω της παρουσίας σε αυτό φυσικών βιοδραστικών μορίων για τα οποία υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις/αποδείξεις ότι ασκούν προστατευτικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου και στην πρόληψη πολλών χρόνιων ασθενειών. Οι ουσίες που υπάρχουν στα διάφορα μέρη του ροδιού (φλοιός, σπέρματα, χυμός) μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Çam et al., 2009), αντικαρκινικοί (Hamad and Al-Momene 2009), αντιηπατοξικοί (Celik et al., 2009) και καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες (Davidson et al., 2009).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου είναι η δυσλιπιδαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και/ή μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης. Η οξείδωση της LDL θεωρείται ότι συμβάλει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων (Heinecke JW, 2006). Η αθηροσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση λιπιδίων στο εσωτερικό των αρτηριών. Η οξείδωση της συσσωρευμένης εκεί LDL, είτε λόγω ελευθέρων ριζών είτε με την βοήθεια οξειδωτικών ενζύμων, διεγείρει τη φλεγμονώδη απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την παρουσία μονοκυττάρων στην περιοχή. Αυτά διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και σχηματίζουν αφρώδη κύτταρα. Με τον θάνατο αυτών και τις περαιτέρω οξειδώσεις των λιποπρωτεϊνών, ξεκινά η συσσώρευση κολλαγόνου και αιμοπεταλίων, τα οποία μαζί με τη συσσώρευση λίπους μειώνουν την

διάμετρο των αρτηριών, με συνέπεια την παρεμπόδιση της ροής του αίματος και της μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς. Αν η αθηρωματική πλάκα αυξηθεί πολύ μπορεί να σπάσει προκαλώντας θρόμβωση και έμφραγμα (Steinberg, 1997; Fuster, 1994). Σε έρευνα που έγινε σε ποντίκια φάνηκε πως η αυξημένη χορήγηση χυμού ροδιού οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής της εστεράσης της παραοξυνάσης-1 (PON-1) η οποία λειτουργεί εμποδίζοντας την οξείδωση της LDL. Στην ίδια έρευνα φάνηκε πως τα ποντίκια που κατανάλωναν χυμό ροδιού είχαν χαμηλότερο βάρος και παρουσίασαν μείωση της γλυκόζης στο αίμα. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενδείξεις πως η κατανάλωση χυμού ροδιού μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά σε καρδιαγγειακές παθήσεις και μπορεί να ρυθμίσει τον διαβήτη (Betanzos-Cabrera et al., 2011). Σε άλλη έρευνα, σχετικά με τις επιπτώσεις της κατανάλωσης, από υγιείς άντρες, χυμού ροδιού, στην οξείδωση της LDL, φάνηκε ότι αυξάνεται κατά 20% η δράση της παραοξυνάσης του ορού, εστεράσης που δρα ενάντια της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Aviram et al., 2000). Σε άλλη έρευνα που έγινε σε ασθενείς με με υπερχοληστερολαιμία, παρατηρήθηκε μείωση της ολικής χοληστερόλης και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) στην ομάδα που κατανάλωνε χυμό ροδιού (Apoosha et al., 2010). Η υψηλή αρτηριακή πίεση ή υπέρταση είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (López et al., 2006). Αναφέρεται ότι, μετά από ενός χρόνου κατανάλωση χυμού ροδιού, η συστολική αρτηριακή πίεση μειώθηκε κατά 21%, μια επίδραση για την οποία η ερευνητές πιστεύουν ότι οφείλεται στις ιδιαίτερα ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτικών πολυφαινολών του ροδιού (Aviram et al., 2004). Σε άλλη έρευνα που έγινε σε ασθενείς που έπασχαν από μυοκαρδιακή ισχαιμία εξετάστηκε η επίδραση της κατανάλωσης χυμού ροδιού στην αιμάτωση του μυοκαρδίου. Μετά από 3 μήνες, οι ασθενείς που κατανάλωναν χυμό ροδιού παρουσίασαν μείωση της ισχαιμίας που προκαλείται από στρες (Sumner et al., 2005).

Η φλεγμονή η πρώτη αντίδραση του ανθρώπινου σώματος σε λοιμώξεις ή ερεθισμούς. Αυτό το αμυντικό σύστημα μπορεί να καταστρέψει μολυσματικούς μικροοργανισμούς, να εξαλείψει ερεθιστικές ουσίες και να διατηρήσει τις κανονικές φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο μακράς διάρκειας φλεγμονές μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργίες της κανονικής φυσιολογίας όπως άσθμα ή ρευματική αρθρίτιδα (Lee et al., 2010). Υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση του ροδιού. In vino μελέτη έδειξε ότι το πουνικικό οξύ (punisic acid), ένα συζευγμένο λιπαρό οξύ που υπάρχει στο έλαιο των σπερμάτων του ροδιού, έχει

αντιφλεγμονώδη δράση περιορίζοντας την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και τις συνέπειες της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Boussetta et al., 2009). Σε έρευνα που έγινε σε ποντίκια που έπασχαν από μεταβολικό σύνδρομο, σχετικά με την δράση του χυμού αλλά και εκχυλισμάτων ροδιού φάνηκε η σημαντική επίδραση (μείωση) στην έκφραση δύο δεικτών καρδιαγγειακής φλεγμονής, της θρομβοσπορίνης (TSP) και της κυτοκίνης (TGFb1). Παράλληλα υπήρξε αύξηση των επιπέδων οξειδίου του Αζώτου (NO) στο πλάσμα, μιας ουσίας που βοηθά στην διεύρυνση των αγγείων (De Nigris et al., 2007).

Είναι γνωστό ότι πολλά φυτοχημικά συστατικά φρούτων και λαχανικών εμφανίζουν δυναμική δράση ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες κατά του καρκίνου. Έχουν γίνει πολλές έρευνες για την επίδραση των συστατικών του ροδιού στην ανάπτυξη του καρκίνου. Οι Lansky et al., (2005a) αναφέρουν ότι εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του ροδιού (φλούδα, χυμός, σπέρματα) δρουν συνεργικά στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη καθώς επίσης και στην έκφραση της λιποπρωτεϊνικής φωσφολιπάσης A2, ενός προφλεγμονώδους ενζύμου, αυξημένα επίπεδα του οποίου συσχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Σε άλλη έρευνα φάνηκε ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος ροδιού εμποδίζει την φωσφοριλίωση που προκαλούν οι ακτίνες UV-A και UB-B στα επιδερμικά κύτταρα και οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου (Afaq et al., 2005). Σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια διαπιστώθηκε πως το ελλαγικό οξύ του ροδιού εμποδίζει την ανάπτυξη όγκων στους πνεύμονες και πως η παρεμπόδιση αυτή ήταν λογαριθμικά ανάλογη της δόσης του οξέος (Huang et al., 2004).

Ο διαβήτης αποτελεί την πιο συχνή μεταβολική νόσο στον κόσμο και την τρίτη πιο διαδεδομένη ασθένεια μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο. Αρκετές μελέτες περιγράφουν την αντιδιαβητική δράση των συστατικών του ροδιού. Οι Huang et al., (2005) παρουσίασαν έναν πιθανό μηχανισμό της αντιδιαβητικής δράσης εκχυλίσματος από άνθη ροδιάς ο οποίος αφορούσε την ενεργοποίηση του PPAR γ , ενός πυρηνικού υποδοχέα που παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων που ευθύνονται για τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τη ομοιοστάση της γλυκόζης. Υπεύθυνο για αυτό είναι το γαλλικό οξύ (gallic acid), το οποίο βρίσκεται και στο χυμό του ροδιού, και αποτελεί συστατικό ευρέως διαδεδομένο σε αντιδιαβητικά φάρμακα φυτικής προελεύσεως. Ένα ακόμη συστατικό του ροδιού, και συγκεκριμένα του χυμού του, το καφεϊκό οξύ, αυξάνει την πρόληψη της γλυκόζης από τα λιποκύτταρα αρουραίων και τους μυοβλάστες ποντικών (Hsu et al., 2000).

Σημαντική επίσης, είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα των συστατικών του ροδιού, ο προσδιορισμός της οποίας αποτελεί προτεραιότητα τόσο των ερευνητών όσο και εκείνων που εμπλέκονται στον τομέα των γεωργικών ειδών διατροφής, για την χρήση τους ως φυσικά πρόσθετα και αντικατάσταση με αυτά των συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών. 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* (Gil et al., 2000; Noda et al., 2002). 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 (Tzulker et al., 2007). Μελέτες αναφέρουν ότι ο χυμός του ροδιού παρουσιάζει 3 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το κόκκινο κρασί ή το πράσινο τσάι (Gil et al., 2000), 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 (Azadzoï et al., 2005; Rosenblat and Aviram 2006b).

Τέλος, τα συστατικά στα διάφορα μέρη του ροδιού αναφέρεται ότι παρουσιάζουν αντι-ικές (Haidari et al., 2009), και αντιμικροβιακές (Duman et al., 2009) ιδιότητες και συμβάλουν στην στοματική υγεία (Di Silvestro et al., 2009) και στην υγεία του δέρματος (Aslam et al., 2006). Επίσης φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της ασθένειας του Αλτσάιμερ (Singh et al., 2008) ενώ βοηθούν στην βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος (Türk et al., 2008) και στην αντιμετώπιση της στυτικής δυσλειτουργίας σε άνδρες ασθενείς (Forest et al., 2007).

1.5 Συγκομιδή και Βιομηχανική επεξεργασία Ροδιού για την παραγωγή χυμού.

1.5.1 Συγκομιδή Ροδιού

Αποτελεί το πρώτο στάδιο για την παραγωγή του χυμού ροδιού, ενός από τα κυριότερα προϊόντα του ροδιού λόγω των θρεπτικών και φυτοχημικών συστατικών που περιέχει. Η υψηλή ποιότητα χυμού απαιτεί συλλογή του καρπού στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης. Όλα τα είδη φρούτων πετυχαίνουν το βέλτιστο της ωρίμανσής τους αν ωριμάσουν στο δέντρο. Ορισμένα φρούτα μπορεί να συλλεχθούν σε στάδιο που έχουν μεν σχηματιστεί αλλά δεν έχουν ακόμη ωριμάσει και μπορούν να ωριμάσουν μετά την συγκομιδή. Το ρόδι σταματά να ωριμάζει μετά την συγκομιδή, γι αυτό πρέπει να συλλέγεται στο βέλτιστο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκομιδή γίνεται είτε χειρωνακτικά είτε μηχανικά με χρήση μηχανημάτων που οδηγούνται ανάμεσα στις συστοιχίες των δέντρων.

1.5.2 Βιομηχανική παραγωγή χυμού ροδιού

Τα βασικά στάδια επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων περιλαμβάνουν τα παρακάτω στάδια:

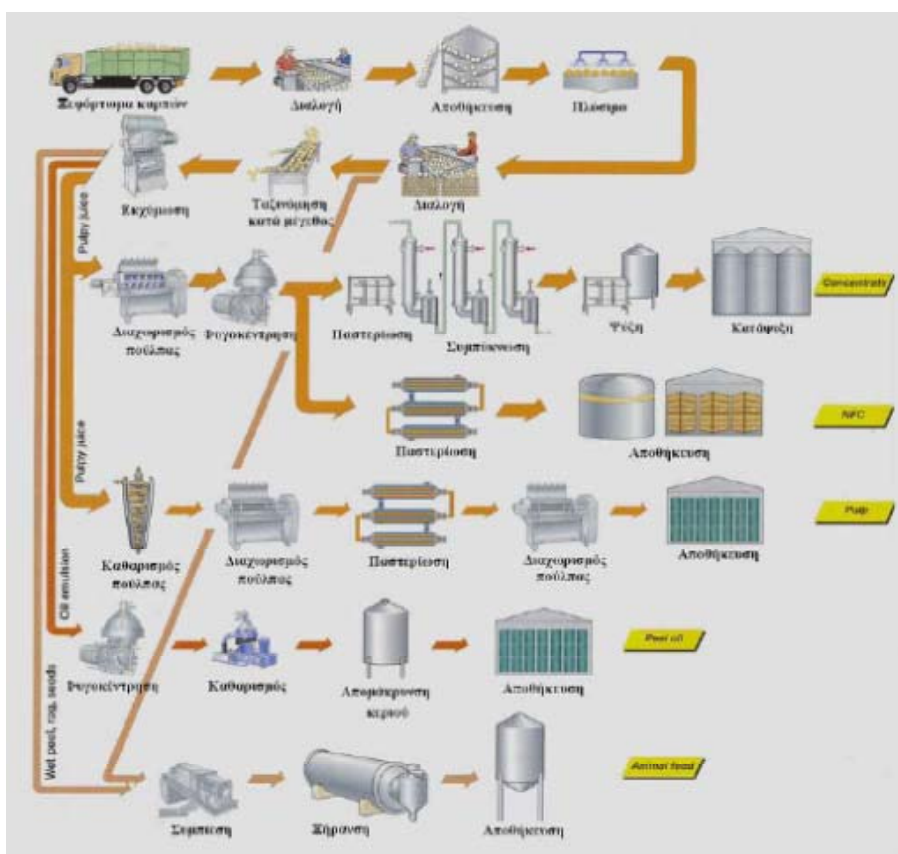
- Παραλαβή και διαλογή πρώτης ύλης.
- Πλύσιμο
- Εκχύμωση
- Διαχωρισμός Πούλπας-Φυγοκέντρωση-Παστερίωση και παραλαβή NFC (Not From Concentrate) χυμού ή και συμπύκνωση για παραλαβή συμπυκνωμένου χυμού.
- Επεξεργασία φλούδας και παραλαβή αιθέριων ελαίων (peel oil)
- Επεξεργασία παραπροϊόντων για την παραγωγή πχ. ζωοτροφών.

Στην εικόνα 14 δίνεται ένα σχηματικό διάγραμμα ροής με τα βασικά στάδια επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων.

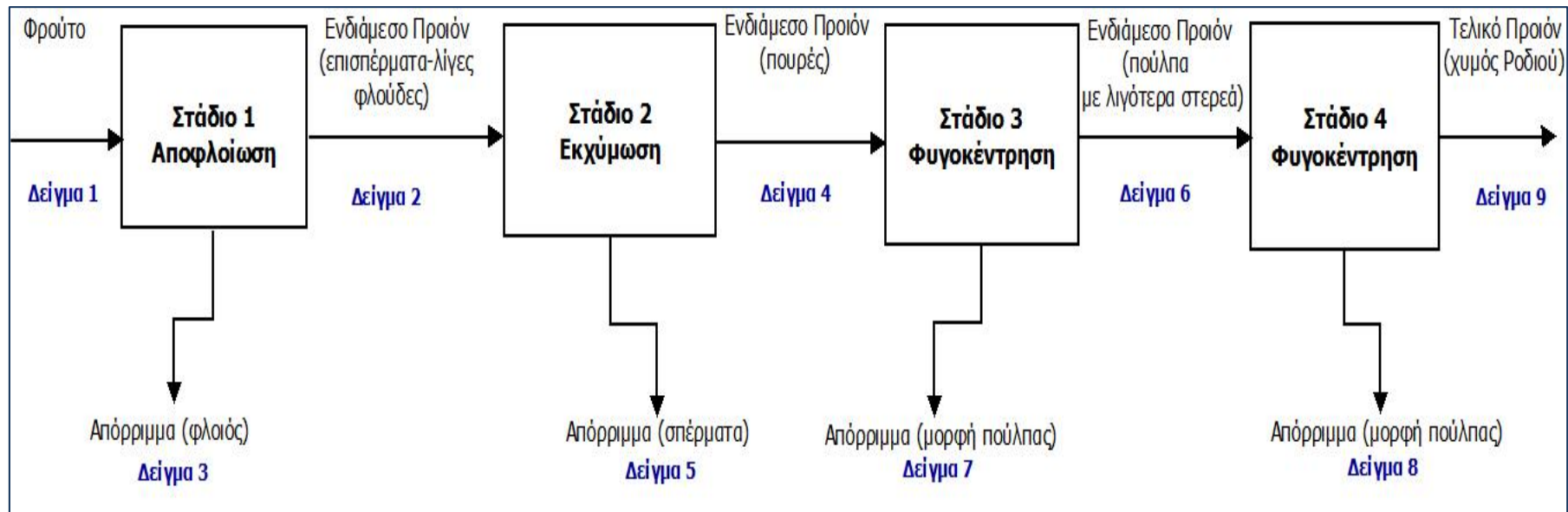
Το κομμάτι της παραγωγικής διαδικασίας που αφορά την παρούσα εργασία ξεκινά από την πρώτη ύλη (ρόδι) και φτάνει μέχρι την παραλαβή του χυμού ροδιού αμέσως πριν την παστερίωση.

Συνοπτικά τα στάδια αυτής της διαδικασίας είναι τα παρακάτω (εικόνα 15):

- Παραλαβή, πλύσιμο και τεμαχισμός του φρούτου (ρόδι).
- Αφαίρεση φλούδας και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν)–Στάδιο 1.
- Εκχύμωση και απομάκρυνση - παραλαβή σπερμάτων ως απόρριμμα (παραπροϊόν) – Στάδιο 2.
- Φυγοκέντρωση του παραγόμενου από το στάδιο 2 πουρέ ροδιού για την αφαίρεση μέρους της πούλπας, και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν) – Στάδιο 3.
- Φυγοκέντρωση του παραγόμενου από το στάδιο 3 ενδιάμεσου προϊόντος (μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά), για την αφαίρεση της επιπλέον πούλπας, και παραλαβή της ως απόρριμμα (παραπροϊόν) – Στάδιο 4
- Παραλαβή του τελικού προϊόντος – (διαυγασμένου) χυμού ροδιού και απαέρωσή του για την αφαίρεση του διαλυμένου οξυγόνου (προστασία από οξειδώσεις).



Εικόνα 14 : Σχηματικό διάγραμμα ροής επεξεργασίας φρούτων για την παραγωγή χυμού και άλλων προϊόντων.



Εικόνα 15 : Διάγραμμα Ροής Διαδικασίας Παραγωγής Χυμού Ροδιού.

Στο διάγραμμα φαίνονται τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, η πρώτη ύλη (φρούτο), τα ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα (απορρίμματα), καθώς και το τελικό προϊόν (χυμός ροδιού). Φαίνονται επίσης οι θέσεις λήψης των εξεταζόμενων στην εργασία δειγμάτων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων βιομηχανικής παραγωγής χυμού, από καρπούς του φυτού *Punica Granatum* (Ροδιά). Στο πρώτο μέρος της μελέτης και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων 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 ($\text{ROO}\bullet$) και υδροξυλίου ($\text{OH}\bullet$). 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 του αντιοξειδωτικού δυναμικού τόσο στο τελικό προϊόν (χυμός), όσο και στα παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας (φλοιός, σπέρματα) θα βοηθήσει στην ενίσχυση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και στην προσπάθεια δημιουργίας νέων και καινοτόμων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακό DNA

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

2.1.2 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 (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics-Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Merck-Γερμανία)
- DPPH (1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma- Germany)
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Merck- Germany)
- DMSO (Διμεθυλοσουλφοξείδιο) [$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$] (Merck-Γερμανία)
- H_2O_2 (Υπεροξειδίου του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

2.1.3 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα, των οποίων η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση μελετήθηκε, απομονώθηκαν από δείγματα γραμμής βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού που διατέθηκαν τον Νοέμβριο του 2011 από την εταιρεία ‘‘VITOM - Αφοί Χριστοδούλου’’. Στο διάγραμμα ροής της παραγωγικής διαδικασίας (Εικόνα 15) φαίνονται οι θέσεις λήψης των δειγμάτων. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στον Πίνακα 5 δίνονται οι θέσεις δειγματοληψίας και το είδος και περιεχόμενο των δειγμάτων.

Αρ. Δείγματος	Θέση Δειγματοληψίας	Περιγραφή
1	Πρώτη ύλη (Είσοδος)	Φρούτο (Ρόδι) Μόνο το εδώδιμο μέρος (χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα) ¹
2	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 1 ^ο Σταδίου (Αποφλοιώση)	Επισπέρματα (Arils) και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων
3	Απόρριμμα 1 ^ο Σταδίου	Φλοιοί (peels)
4	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 2 ^ο Σταδίου (Εκχύμωση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ.
5	Απόρριμμα 2 ^ο Σταδίου	Σπέρματα (seeds)
6	(Ενδιάμεσο) Προϊόν 3 ^ο Σταδίου (1 ^η Φυγοκέντρωση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά.
7	Απόρριμμα 3 ^ο Σταδίου	Μορφή Πούλπας
8	Απόρριμμα 4 ^ο Σταδίου (2 ^η Φυγοκέντρωση)	Μορφή Πούλπας
9	Τελικό Προϊόν (Εξοδος)	Χυμός Ροδιού

Πίνακας 5 : Είδος και περιεχόμενο δειγμάτων

¹ Το δείγμα που εξετάστηκε δεν αφορούσε ολόκληρο το Φρούτο (ρόδι) αλλά μόνο το εδώδιμο μέρος του (είχαν αφαιρεθεί φλοιός και άσπρα τοιχώματα)

2.1.3 Διαδικασία απόκτησης εκχυλισμάτων .

Η επεξεργασία των δειγμάτων και η απομόνωση των εκχυλισμάτων από αυτά, έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Μετά την παραλαβή των δειγμάτων από την παραγωγική διαδικασία ακολούθησε η λυοφιλίωσή τους, εκτός του δείγματος 5 (επισπέρματα) του οποίου η ξήρανση έγινε με αέρα.

Μετά τη λυοφιλίωση (ή ξήρανση για τα επισπέρματα) τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν και ζυγίστηκαν. Ένα μέρος από κάθε δείγμα (περίπου 30g) τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εκχυλίστηκε για 40 min, σε λουτρό υπερήχων, με καθαρή μεθανόλη, λαμβάνοντας μέριμνα η θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 25°C.

Στη συνέχεια, το μίγμα διηθήθηκε σε χωνί Büchner με χάρτινο ηθμό και συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C, λαμβάνοντας ένα παχύρευστο υπόλειμμα. Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίησή του σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια, το δείγμα εκχυλίστηκε τρεις φορές με καθαρό εξάνιο για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών. Το διάλυμα που έμεινε συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω των 35°C, δίνοντας το ζητούμενο εκχύλισμα σε στερεή μορφή. Το παραπάνω στερεό κατανεμήθηκε δυο φορές μεταξύ υδάτινης και οργανικής φάσης (οξικός αιθυλεστέρας). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με την προσθήκη μικρής ποσότητας Na₂SO₄ (για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων υγρασίας) και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Μετά το τέλος της διαδικασίας το στερεό υπόλειμμα (σε μορφή σκόνης) ζυγίστηκε για να προσδιοριστεί η συνολική απόδοση. Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί δίνονται τα βάρη των δειγμάτων (g) πριν και μετά την εκχύλιση.

Δείγματα	Βάρος Δείγματος (g)		Απόδοση %
	Πριν την Εκχύλιση	Μετά την εκχύλιση	
1	23,37	0,2307	0,99
2	15,27	0,1719	1,13
3	30,74	0,2633	0,86
4	8,64	0,1397	1,62
5	30,85	0,1008	0,33
6	30,30	0,3308	1,09
7	30,46	0,6490	2,13
8	31,25	0,6490	2,08
9	20,78	0,2997	1,44

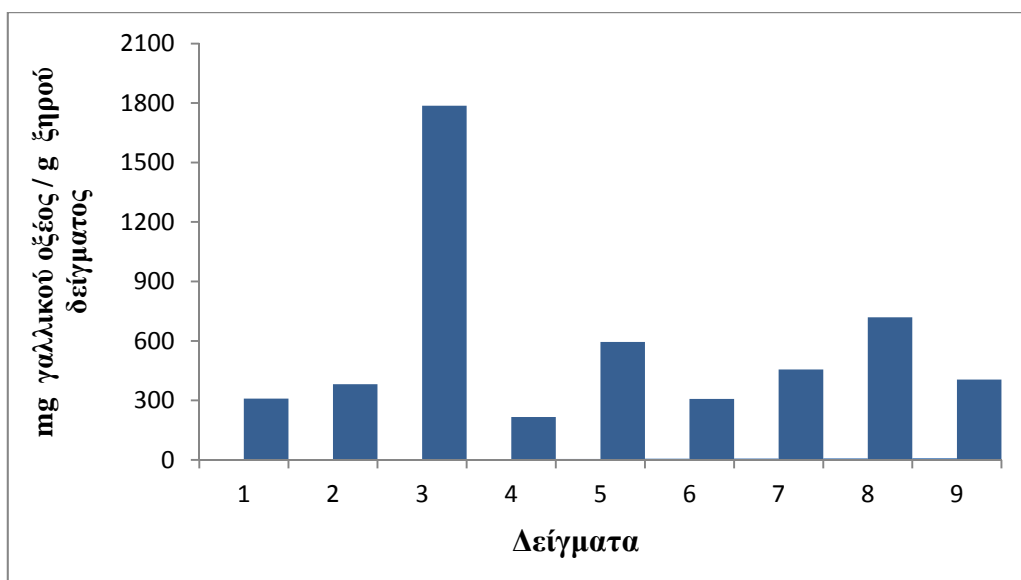
Πίνακας 6 : Απόδοση Εκχύλισης.

2.1.3 Ολικά Φαινολικά και Ολικά Φλαβονοειδή

Ακολούθως προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά των δειγμάτων. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, ήταν η μέθοδος των Folin-Ciocalteu. Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 7 με τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και το Γράφημα 3 με την γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών των εξεταζόμενων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ και έχουν εκφραστεί σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος.

Δείγματα	Ολικά Φαινολικά (mg γαλλικού οξέος / g ξηρού δείγματος)
1	309
2	382
3	1786
4	216
5	595
6	308
7	456
8	719
9	405

Πίνακας 7 : Ολικά Φαινολικά των δειγμάτων.

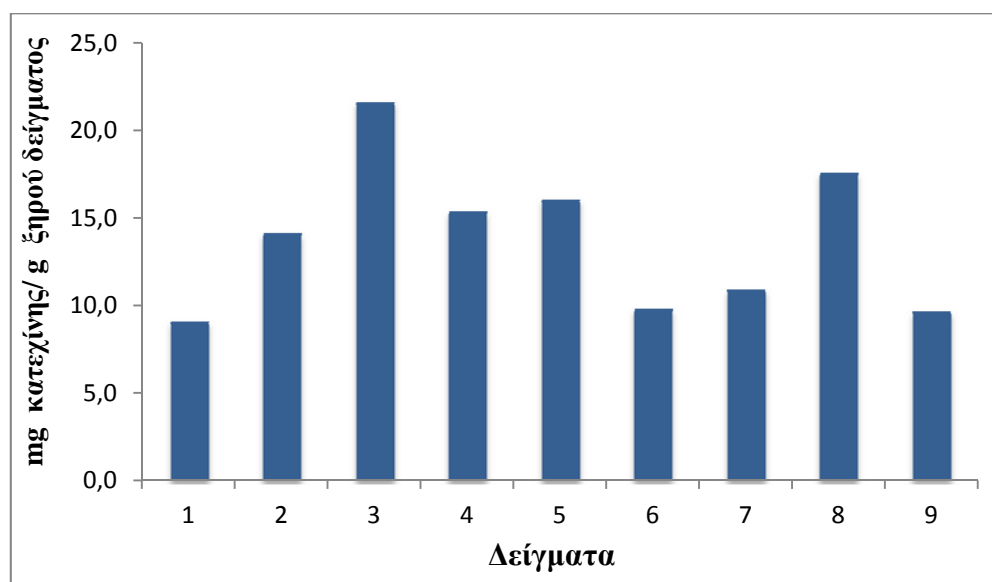


Γράφημα 3: Γραφική απεικόνιση ολικών φαινολικών των δειγμάτων.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα ολικά φλαβονοειδή των δειγμάτων. Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών, ήταν μια παραλλαγή της μεθόδου των Guner και των συνεργατών του. Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 8 με τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς και το Γράφημα 4 με την γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των ολικών φλαβονοειδών των εξεταζόμενων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς με πρότυπη ουσία την κατεχίνη και έχουν εκφραστεί σε mg κατεχίνης ανά g ξηρού δείγματος.

Δείγματα	Ολικά Φλαβονοειδή (mg κατεχίνης / g ξηρού δείγματος)
1	9,1
2	14,1
3	21,6
4	15,4
5	16,1
6	9,8
7	10,9
8	17,6
9	9,7

Πίνακας 8 : Ολικά Φλαβονοειδή των δειγμάτων



Γράφημα 4: Γραφική απεικόνιση ολικών φλαβονοειδών των δειγμάτων.

2.1.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών των εκχυλισμάτων.

Στα εκχυλίσματα των δειγμάτων της γραμμής βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά οι εμπεριεχόμενες πολυφαινόλες. Ο προσδιορισμός έγινε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography).

Τα εκχυλίσματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη (1mg εκχύλισμα / 1 mL μεθανόλης χρωματογραφικής καθαρότητας) και διηθήθηκαν με φίλτρα σύριγγος PVD F 0,45 μm για να είναι δυνατή η εισαγωγή τους στην HPLC. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαλύτες ως κινητή φάση:

- Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα: Μεθανόλη/Οξικό οξύ/Νερό (Methanol/Acetic Acid/Water) (10:2:88 v/v/v)
- Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile) (C₂H₃N)
- Νερό (Water)

Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας και πριν τη χρήση τους διηθήθηκαν από ειδικά φίλτρα υπό κενό (ώστε να κατακρατηθούν στερεά σωματίδια) και απαερώθηκαν (προκειμένου να μην δημιουργηθούν υπερβολικές φυσαλίδες κατά τη ροή τους διαμέσου της στήλης). Χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution).

Αρχικά έγινε ανάλυση διαλυμάτων πρότυπων πολυφαινολικών ενώσεων και υπολογίστηκαν οι χρόνοι κατακράτησης των (Retention time). Για κάθε μία από τις πρότυπες ενώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης (stock solution) συγκέντρωσης 1000 ppm σε μεθανόλη. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώσεις πολυπρότυπα διαλύματα φαινολών διαφόρων συγκεντρώσεων προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολών πραγματοποιήθηκε με βάση το χρόνο κατακράτησης τους (Retention time) και του φάσματος απορρόφησης των προτύπων μορίων. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, μέσω των οποίων προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους στα δείγματα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Πίνακας 9). Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις καμπύλες αναφοράς των πρότυπων πολυφαινολικών ενώσεων και έχουν εκφραστεί σε mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινολών (mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)								
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9
Π-κουμαρικό οξύ - Ελλαγικό οξύ	98,37	298,98	167,74	253,08	238,52	434,90	189,82	269,04	494,12
Χλωρογενικό οξύ	48,99	49,25	48,76	47,69	48,43	48,11	47,73	47,86	47,67
Κατεχίνη	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Κερκετίνη	33,61	37,25	35,76	34,42	40,53	36,91	34,24	35,58	34,67
Επικατεχίνη	65,41	38,21	36,38	47,99	58,42	66,65	58,24	40,74	42,96
Trans-ρεσβερατρόλη	44,94	44,99	44,76	44,77	44,79	45,47	44,94	45,15	45,77
Φλοριζίν (phloridzin)	36,94	40,78	33,59	32,98	33,84	34,19	33,30	32,58	33,32
Προτοκατεχικό οξύ	75,84	62,18	52,40	66,05	47,28	48,65	40,42	64,29	44,04
Γαλλικό οξύ	181,76	149,47	150,02	143,76	135,47	148,80	134,52	136,96	138,79
Καφεικό οξύ	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Φερουλικό οξύ	45,96	46,93	45,89	45,84	48,63	46,15	45,91	45,61	46,20
Ρουτίνη	93,78	101,76	117,54	91,33	124,29	97,016	93,12	88,92	95,05

Πίνακας 9 : Συγκεντρώσεις Μονομερών Πολυφαινολών των εκχυλισμάτων

2.2 Μέθοδοι

Τέσσερις συνολικά μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

2.2.1 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκαν κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Πρόκειται για δύο, κατά βάση ποιοτικές, *in vitro* μεθόδους οι οποίες ανιχνεύουν την αντιοξειδωτική ή μη ικανότητα ενός συγκεκριμένου συστατικού. Και οι δύο μέθοδοι, βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν ρίζες όπως η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ή DPPH[•] (Brand-Williams et al., 1995) και 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS^{•+} (Rice-Evans et al., 1996).

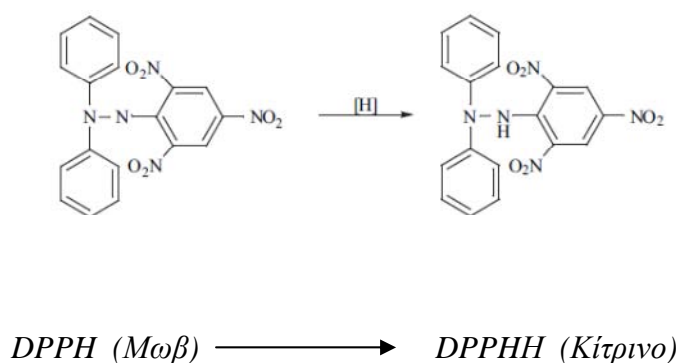
Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης του συστατικού επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό του IC₅₀, της συγκέντρωσης δηλαδή στην οποία οι εξεταζόμενες ουσίες προκαλούν την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH[•] ή ABTS^{•+}, κατά 50% (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

2.2.1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•]

2.2.1.1.i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-

πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 16). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 16: Η αναγωγή του DPPH[•] σε DPPH:H

2.2.1.1.ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει την μέθοδο. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH[•]) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα

που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 11). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DMSO	50 μl	50μl					
DPPH[•]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
DMSO	50 μl	50μl					
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 11: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

2.2.1.1iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

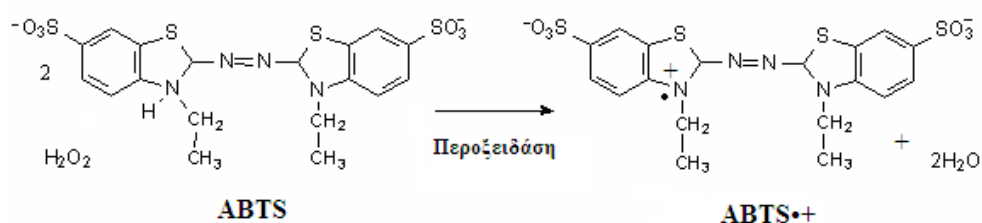
2.2.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

2.2.1.2.i Αρχή της μεθόδου

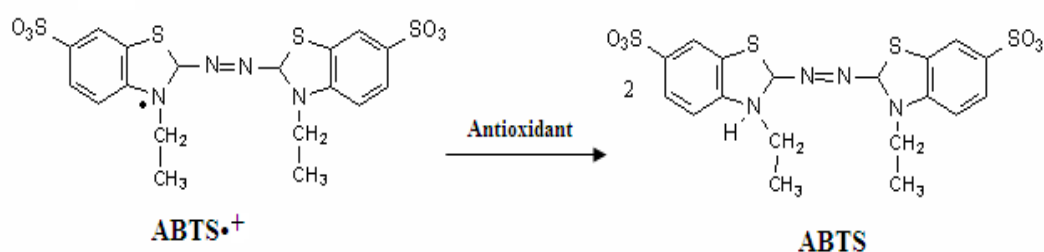
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της

αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα $ABTS^{•+}$. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα $ABTS^{•+}$ (κατιόν) (Εικόνα 17). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{•+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 18) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



Εικόνα 17: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Εικόνα 18: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα $ABTS^{•+}$

2.2.1.2.ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50,100 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50,100 $\mu\text{g/ml}$), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 11). Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση DMSO και με τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση 5%. Ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει την μέθοδο. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H_2O_2 , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 12).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
DMSO	50μl	50μl	-	-	-	-	-
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 11: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Εκχύλισμα	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
DMSO	50μl	-	-	-	-	-
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 12: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

2.2.1.2.iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

2.2.2 Μέθοδοι εκτίμησης αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

2.2.2.1 Γενικά

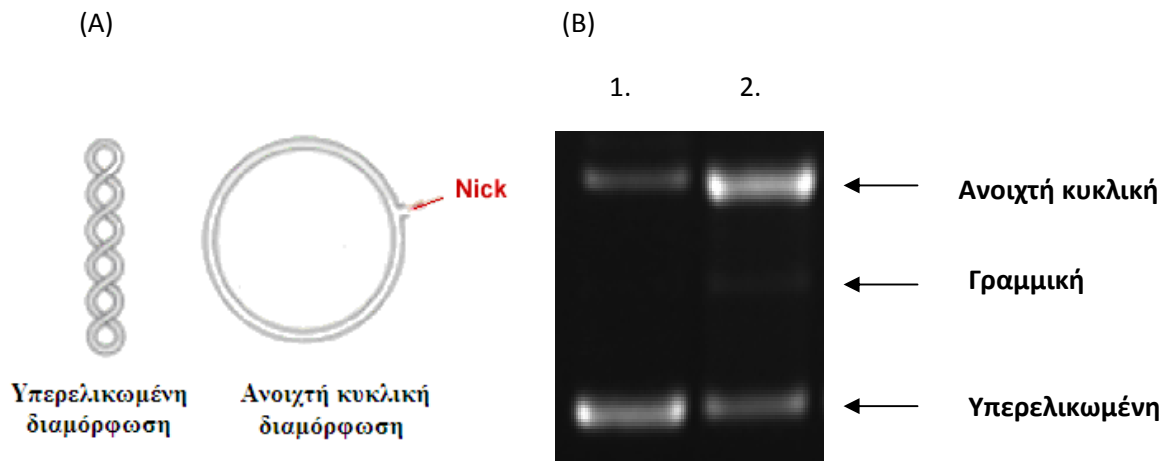
Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών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

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 19).

- 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 μονόκλινα 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 δίκλινα 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 19: 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.

2.2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Τα κύρια χημικά αντιδραστήρια, το αντιβιοτικό αμπικιλίνη, το διάλυμα SDS (10%) και το ένζυμο ριβονουκλεάση (RNase) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Το θρεπτικό μέσο LB Broth αποκτήθηκε από την Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-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 φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το 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, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 µg/mL για τη διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech . Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech 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.

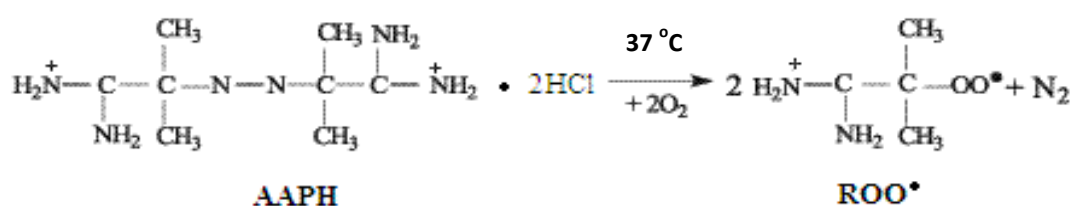
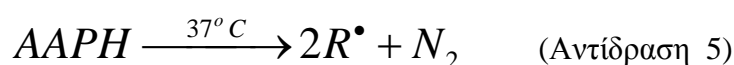
2.2.2.3 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

2.2.2.3.i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (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 5,6)(Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

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 υπερελεικωμένης 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•.

2.2.2.3.ii Πειραματική διαδικασία

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

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.
- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 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 (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM

προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% 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 13. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex) (Εικόνα 21)

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control (-)	8 μ l	-	2 μ l	-
AAPH 15mM (+)	4 μ l	-	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (4 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (8 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (16 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (32 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (64 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	5 μ l	3 μ l	2 μ l	-

Πίνακας 13 : Ποσότητες αντιδραστηρίων.

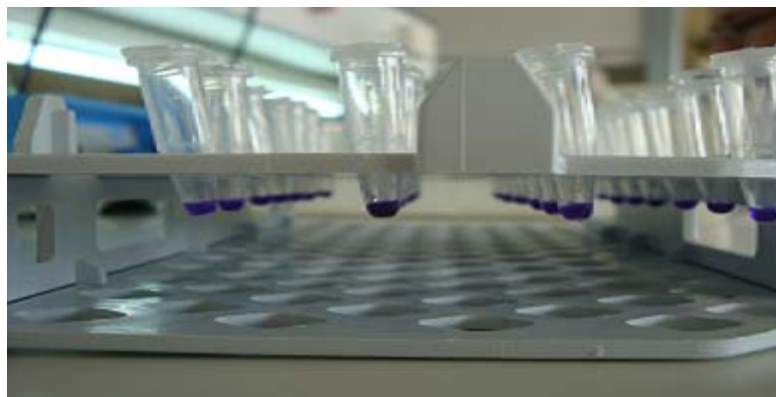


Εικόνα 21: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin

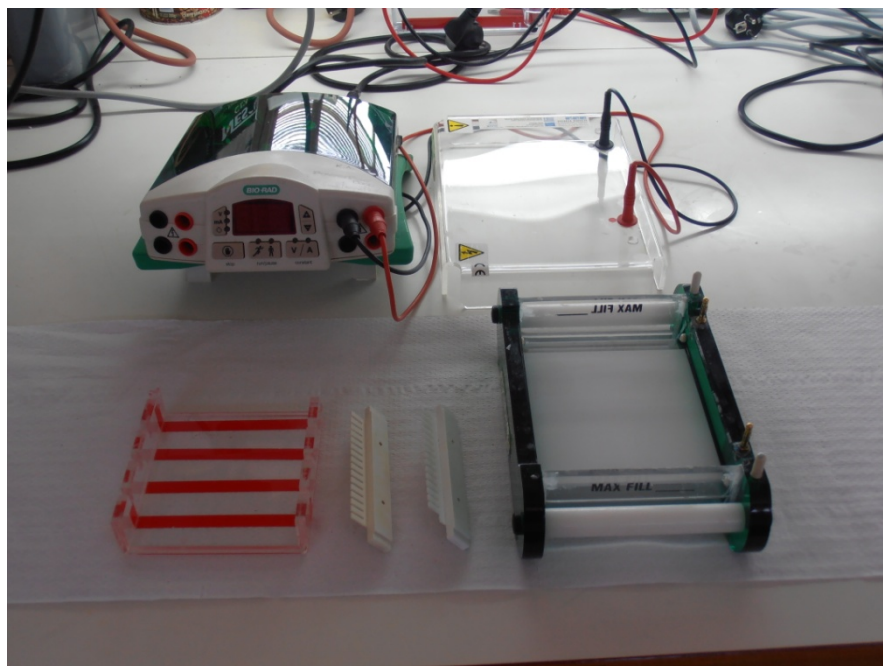
Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μ l διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 22) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αгарόζης 0,8% w/v στα 70 V για 60 min (Εικόνες

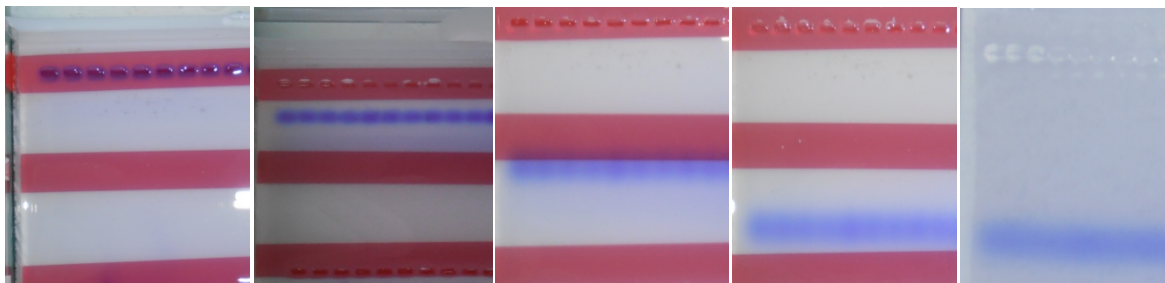
23 και 24). Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech (Εικόνα 25). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.



Εικόνα 22: Απεικόνιση δειγμάτων μετά την προσθήκη διαλύματος φόρτωσης



Εικόνα 23: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 24: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης, στάδια απομάκρυνσης χρωματισμένων ζωνών.



Εικόνα 25: Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech

2.2.2.3.iii Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^{\bullet} , 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 + 2,5mM AAPH) και
 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 (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

2.2.2.4 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH^{\bullet})

2.2.2.4.i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης μιας ουσίας απέναντι στη δράση των ριζών OH^{\bullet} βασίζεται στη μέθοδο των Keum et al. (2000).

Οι ρίζες OH^{\bullet} 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 (H_2O_2) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH^{\bullet} (Αντίδραση 7).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH^{\bullet} 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 $\text{OH}\cdot$.

2.2.2.4.ii 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 αντιοξειδωτική δράση τριών εκ των εννέα εκχυλισμάτων και σε έξι συγκεντρώσεις μεταξύ των 75, 150, 300, 600, 1200, 2400, 4800 $\mu\text{g/ml}$. Τα συγκεκριμένα τρία δείγματα (3,7,9) ήταν τα μόνα τα οποία διαλύθηκαν σε νερό, κάτι το οποίο δε συνέβη στα υπόλοιπα έξι. Για το λόγο αυτόν μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεθανόλης, αιθανόλης και DMSO με τις ρίζες $\text{OH}\cdot$. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η μεθανόλη και η αιθανόλη σε συγκεντρώσεις $\geq 0,1\%$ και το DMSO σε συγκεντρώσεις $\geq 0,05\%$ έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $\text{OH}\cdot$. Δοκιμάστηκε έτσι η δυνατότητα διάλυσης των έξι δειγμάτων τόσο σε συγκεντρώσεις κάτω του 0,1% μεθανόλης και αιθανόλης όσο και συγκεντρώσεις κάτω του 0,05% DMSO, χωρίς αποτέλεσμα.

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 στον Πίνακα 14.

	Tris-HCl EDTA	H ₂ O	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H ₂ O ₂	UV
Control (-)	2 μl	6 μl	-	2μl	-	-
H ₂ O ₂ +UV (+)	2 μl	4 μl	-	2μl	2μl	+
Εκχ. (150 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (300 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (600 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (1200 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (2400 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (4800 μg/ml)	2 μl	1 μl	3μl	2μl	2μl	+
Εκχ. (4800 μg/ml)	2 μl	3 μl	3μl	2μl	-	-

Πίνακας 14: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μL. Στο μίγμα της αντίδρασης περιέχονται 1μg (2μL) πλασμιδιακού DNA Bluescript-SK+, ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl και 1 mM EDTA (pH 8), το εξεταζόμενο δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (3 μL) και 40 mM H₂O₂ (2 μL).

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 τερματίζεται με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αгарόζης 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, 1mM EDTA, pH 8).

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

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1μg πλασμίδιο), ένα θετικό control (1μg πλασμίδιο + 40mM H₂O₂-UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ώστε να παρατηρηθεί τυχόν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA.

2.2.2.4.iii Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH^\bullet , που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H_2O_2 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 H_2O_2 και UV ακτινοβολία) και

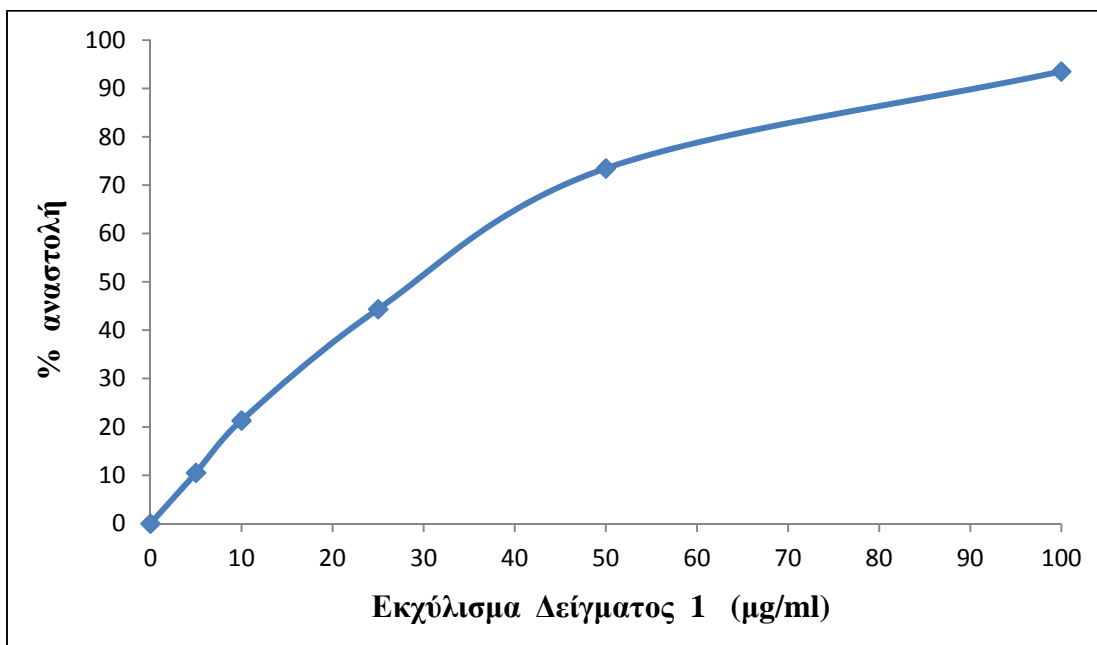
S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H_2O_2 και UV ακτινοβολία.

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) 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.

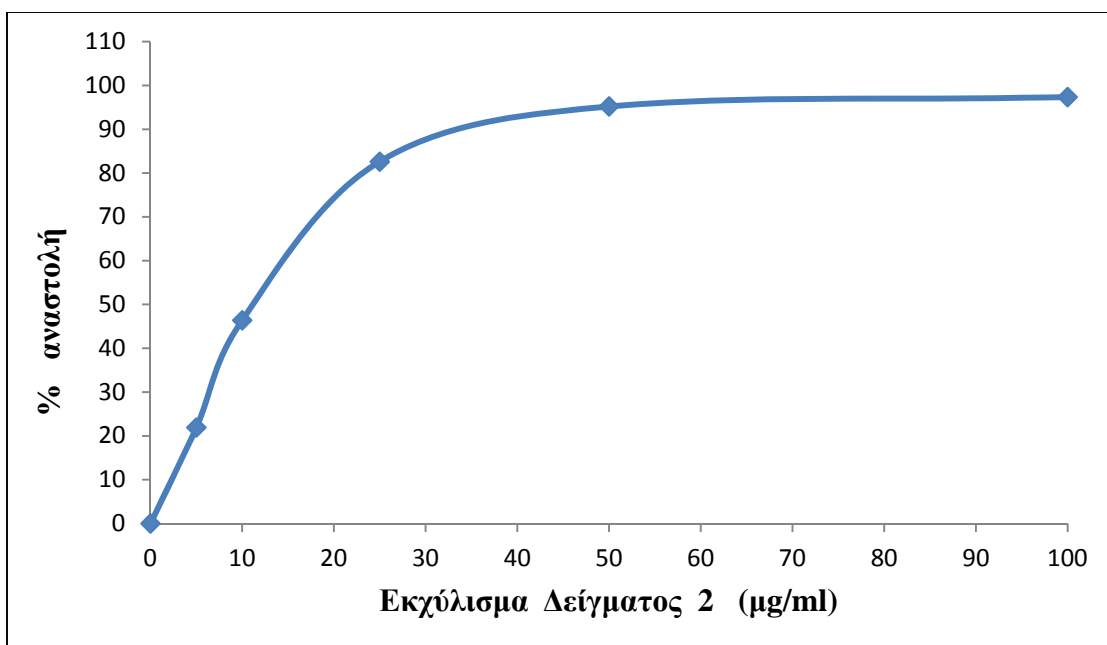
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

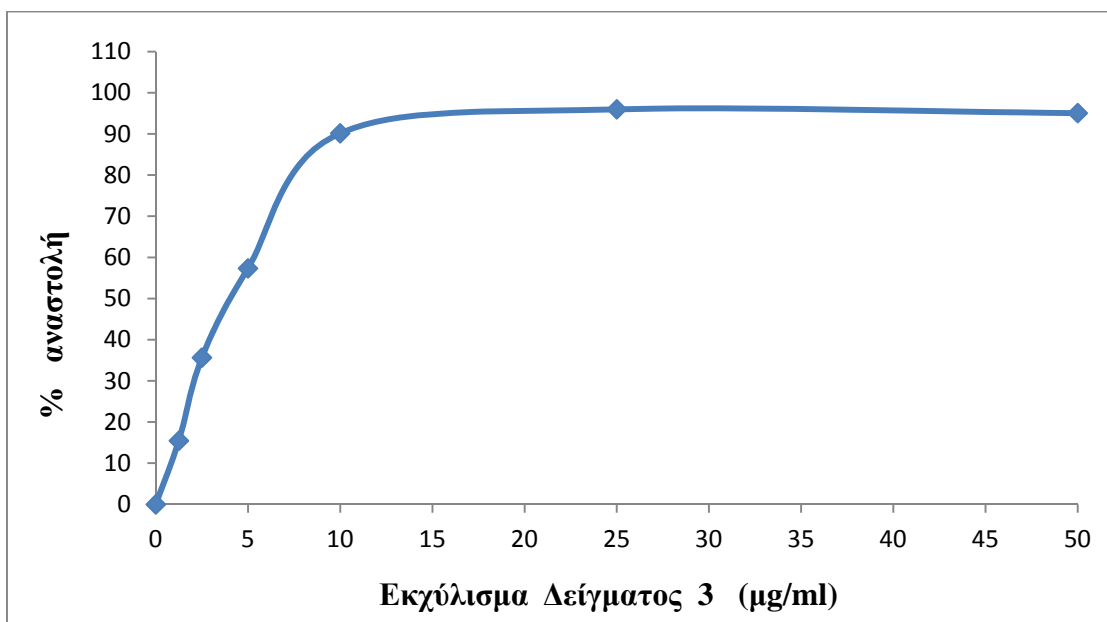
Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα δειγμάτων της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 1,2,4,5,8,9 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 6 στις συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ και το δείγμα 3 στις συγκεντρώσεις 1.5, 2.5, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαινόταν από 4 $\mu\text{g/ml}$ έως 28 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 3 (απόρριμμα-φλοιοί) (Γράφημα 7) με IC_{50} ίσο με 4 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 1 (φρούτο-ρόδι χωρίς φλοιό και άσπρα τοιχώματα) (Γράφημα 5) με IC_{50} ίσο με 28 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



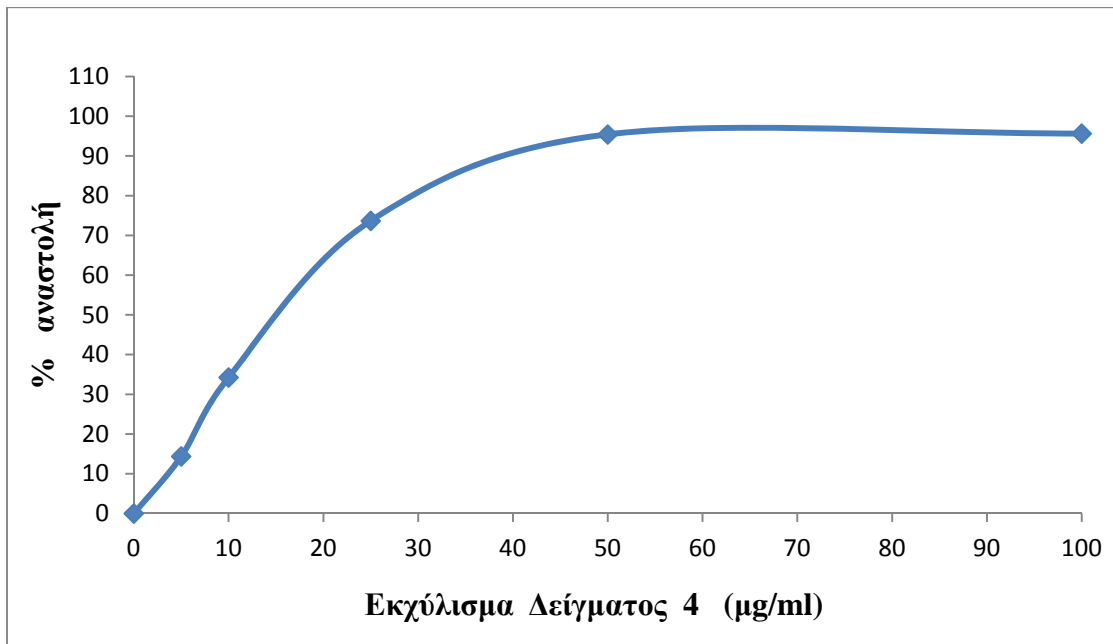
Γράφημα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα του Δείγματος 1 (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα)



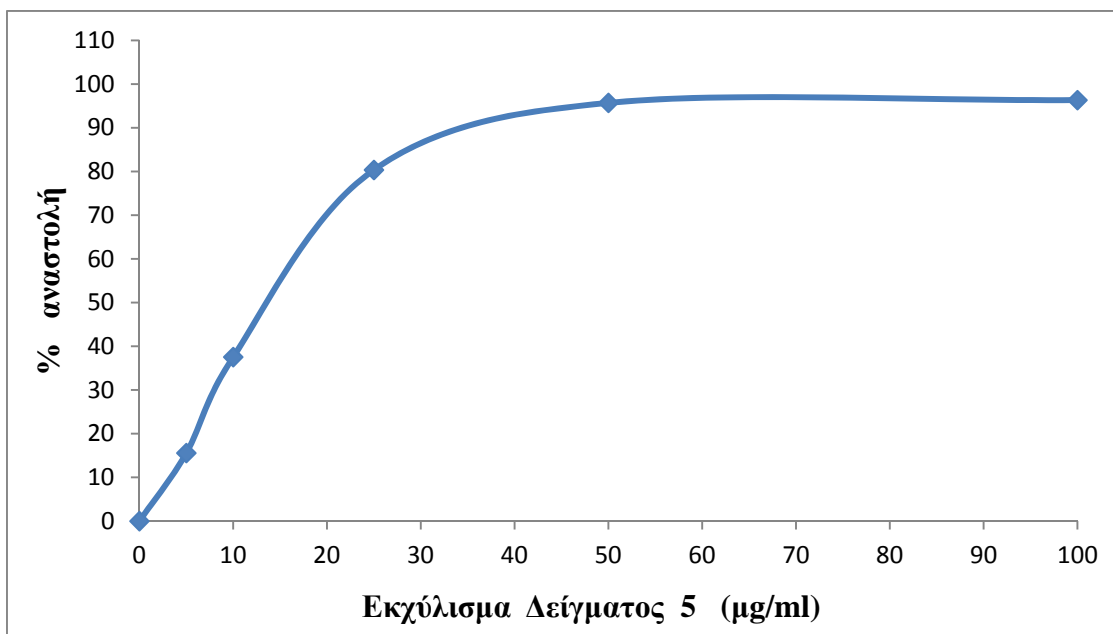
Γράφημα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων)



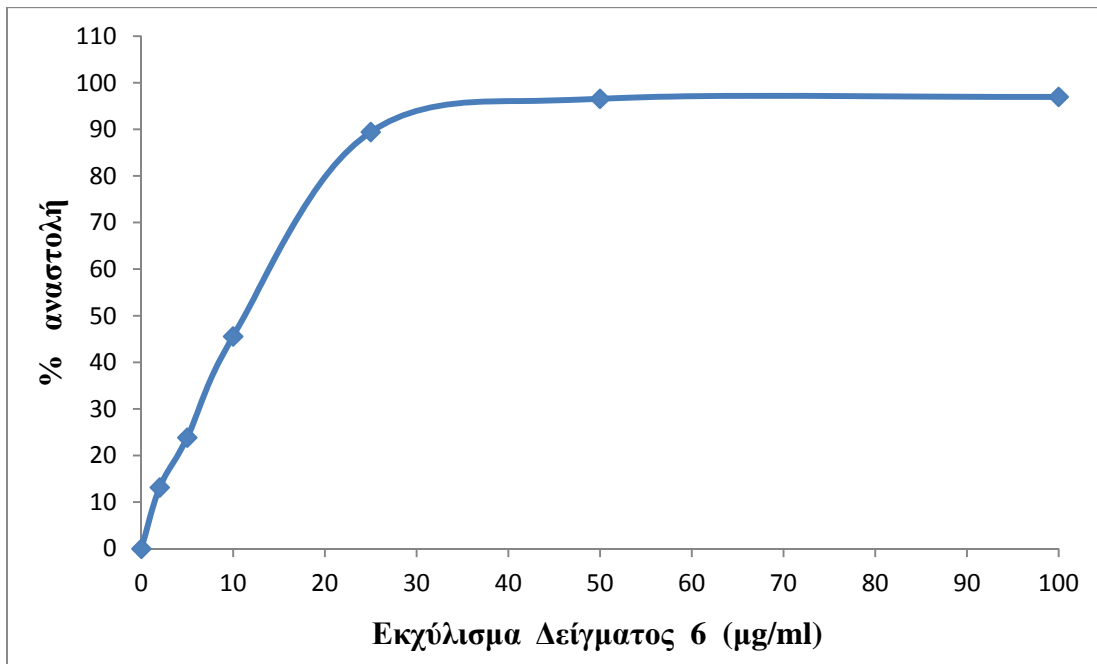
Γράφημα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 3 (φλοιοί ροδιού)



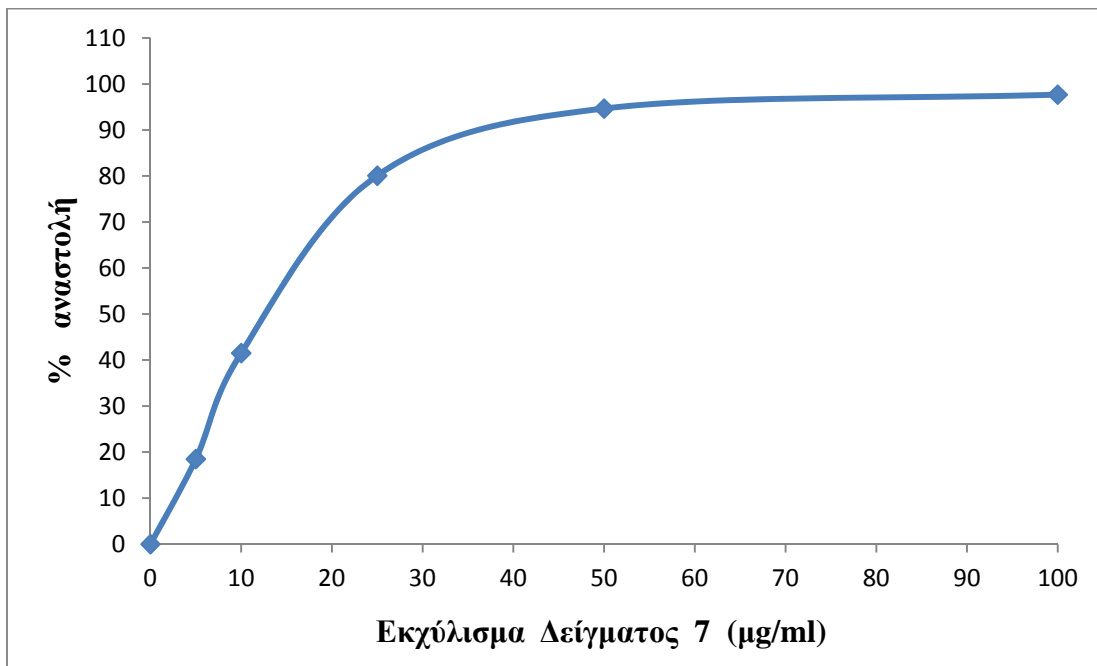
Γράφημα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ)



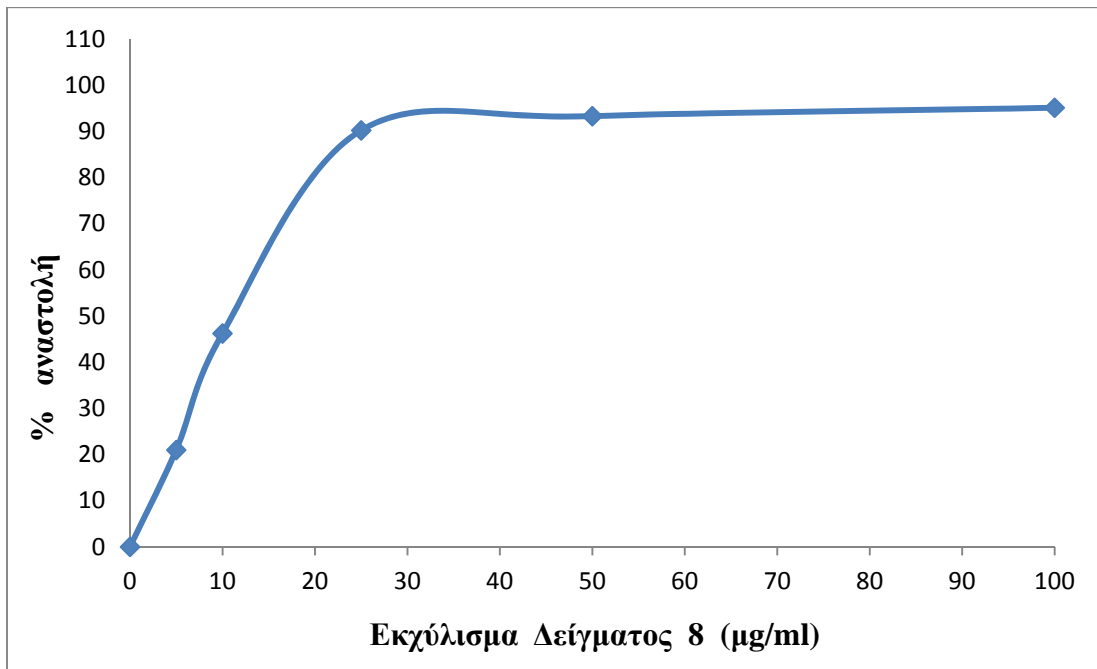
Γράφημα 9: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 5 (σπέρματα)



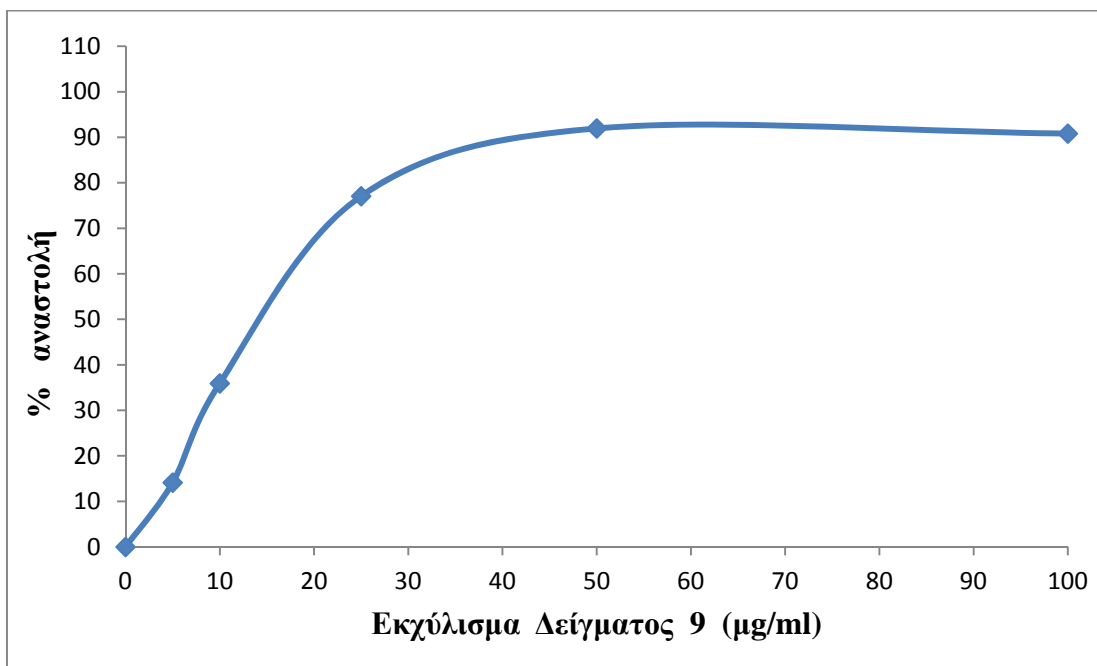
Γράφημα 10: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 6 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)



Γράφημα 11: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 7 (μια μορφή πούλπας)



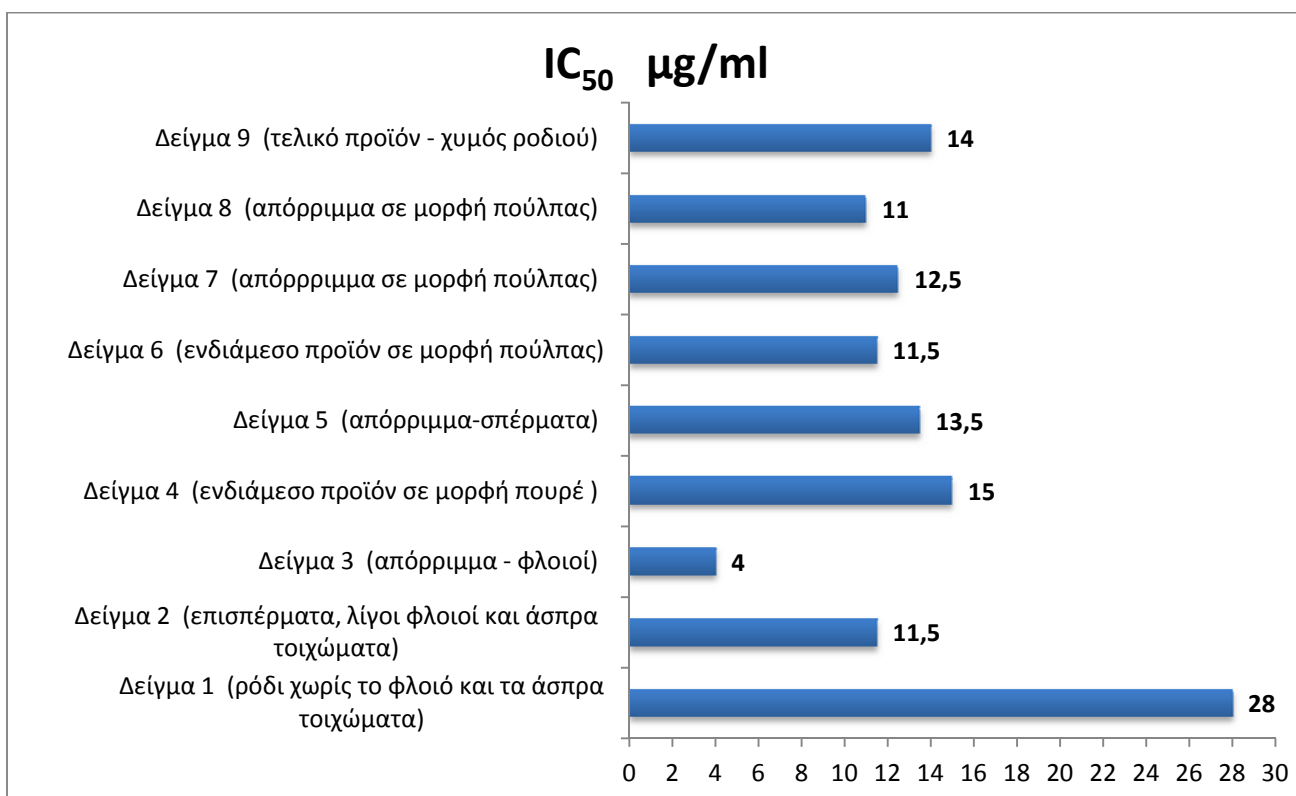
Γράφημα 12: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 8 (μια μορφή πούλπας)



Γράφημα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το εκχύλισμα του Δείγματος 9 (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν)

Στο παρακάτω γράφημα (14) απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} και των 9 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα DPPH• και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 517nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

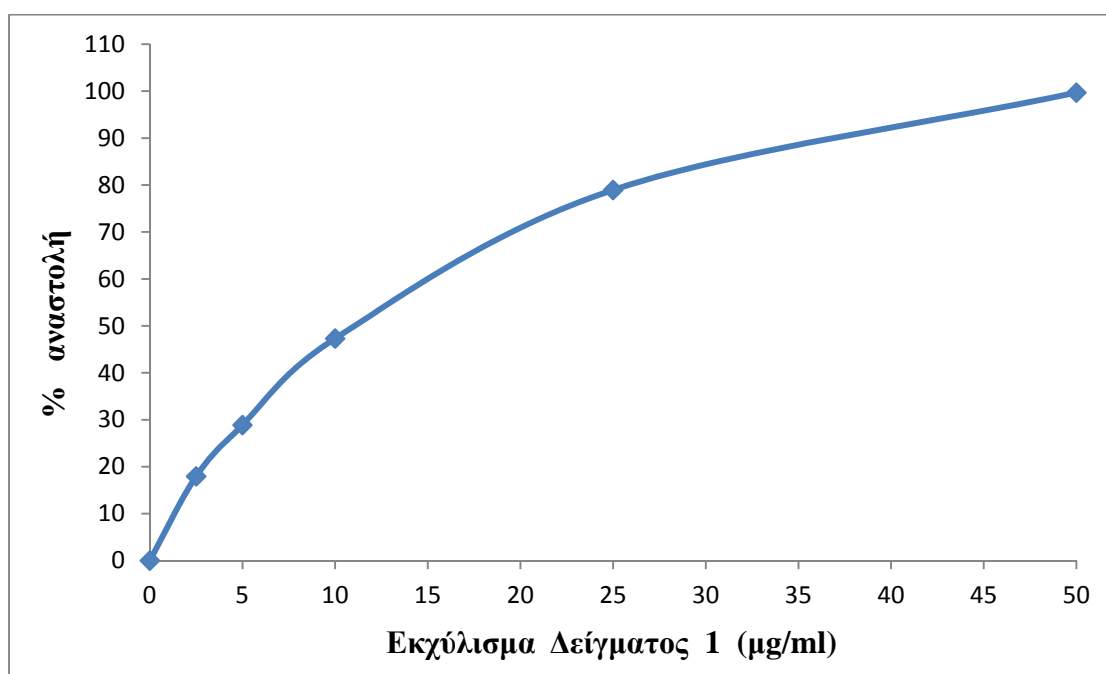


Γράφημα 14: Γραφική απεικόνιση τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα DPPH•.

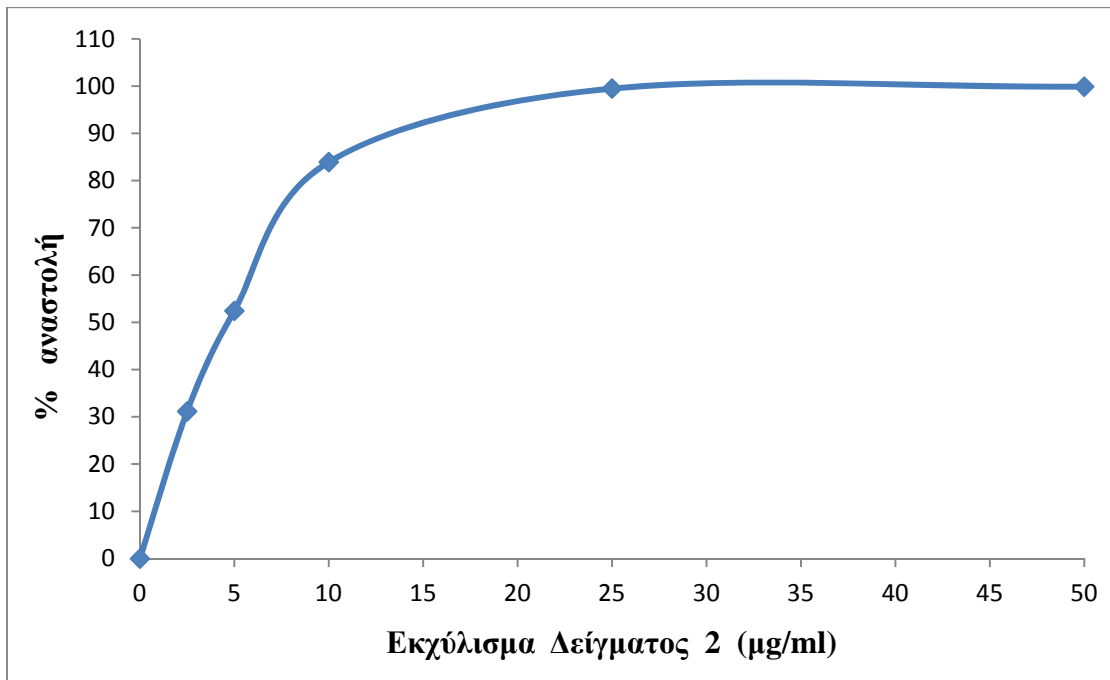
3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}

Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα δειγμάτων της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 1,2,3,4 και 5 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 25, 50, $\mu\text{g/ml}$, τα δείγματα 6 και 7 στις συγκεντρώσεις 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, το δείγμα 8 στις συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 25, 50 και το δείγμα 9 στις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$.

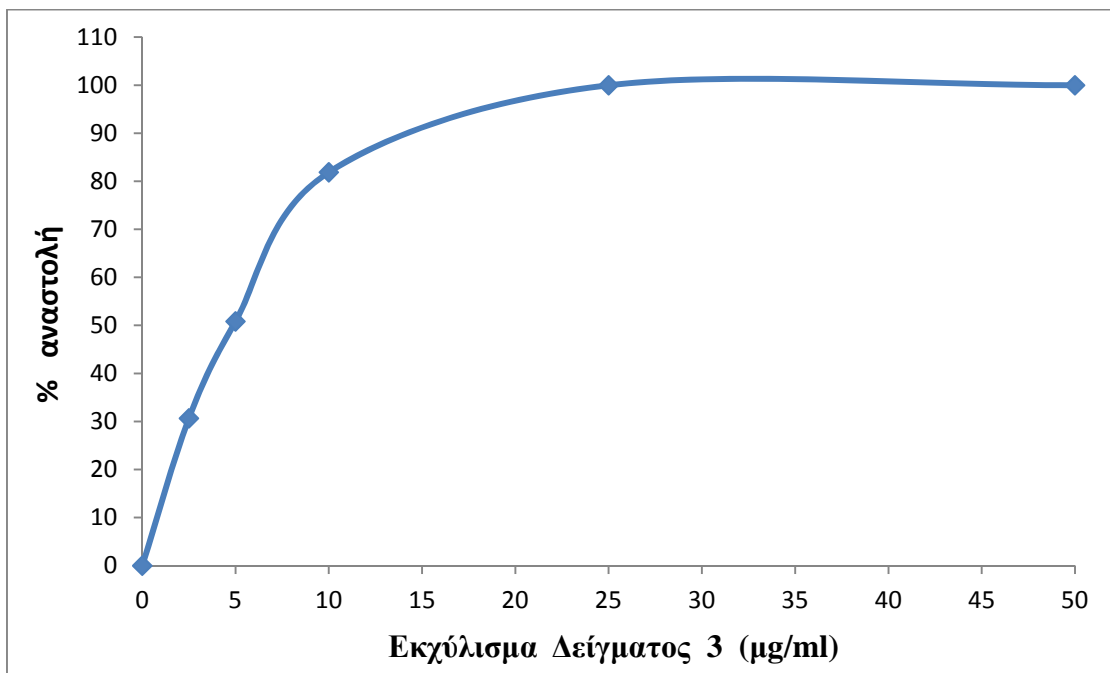
Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 4,2 $\mu\text{g/ml}$ έως 13,0 $\mu\text{g/ml}$. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 8 (απόρριμμα σε μορφή πούλπας από το στάδιο της δεύτερης φυγοκέντρωσης) (Γράφημα 22) με IC₅₀ ίσο με 2,9 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 7 (απόρριμμα σε μορφή πούλπας από το στάδιο της πρώτης φυγοκέντρωσης) (Γράφημα 21) με IC₅₀ ίσο με 13 $\mu\text{g/ml}$. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



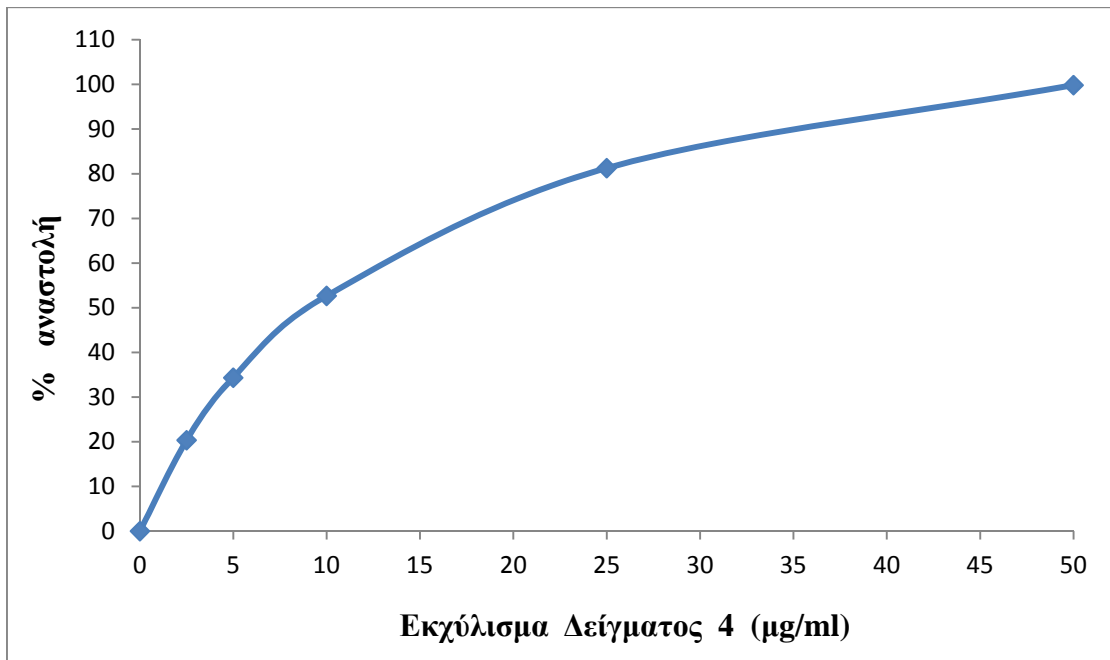
Γράφημα 15: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 1 (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα).



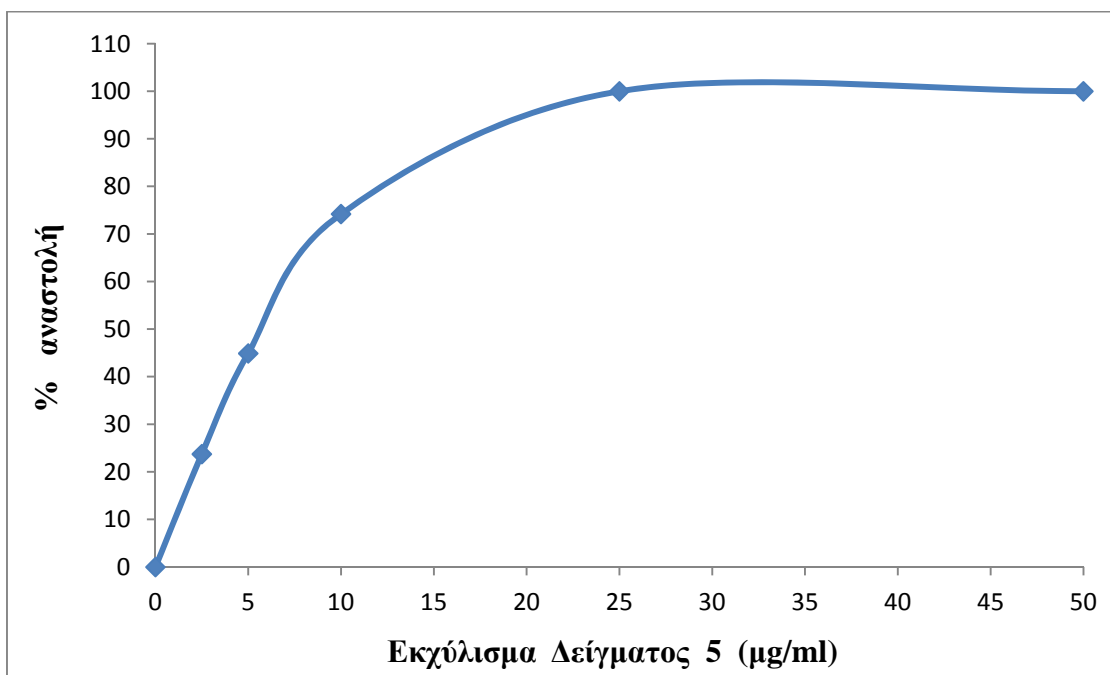
Γράφημα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων).



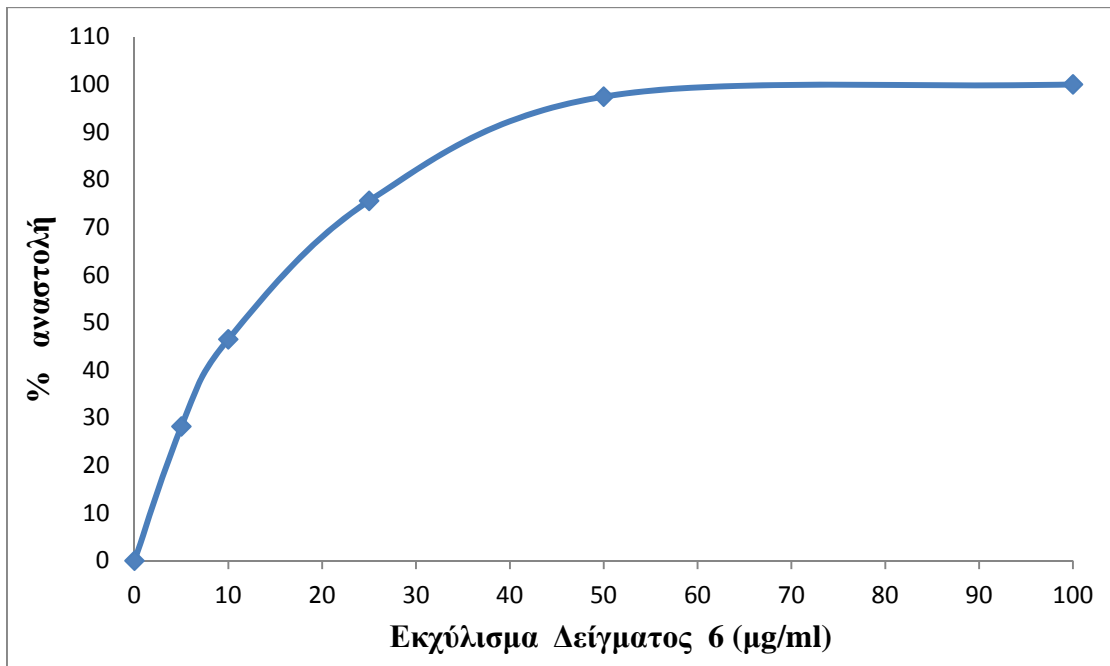
Γράφημα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 3 (φλοιοί ροδιού).



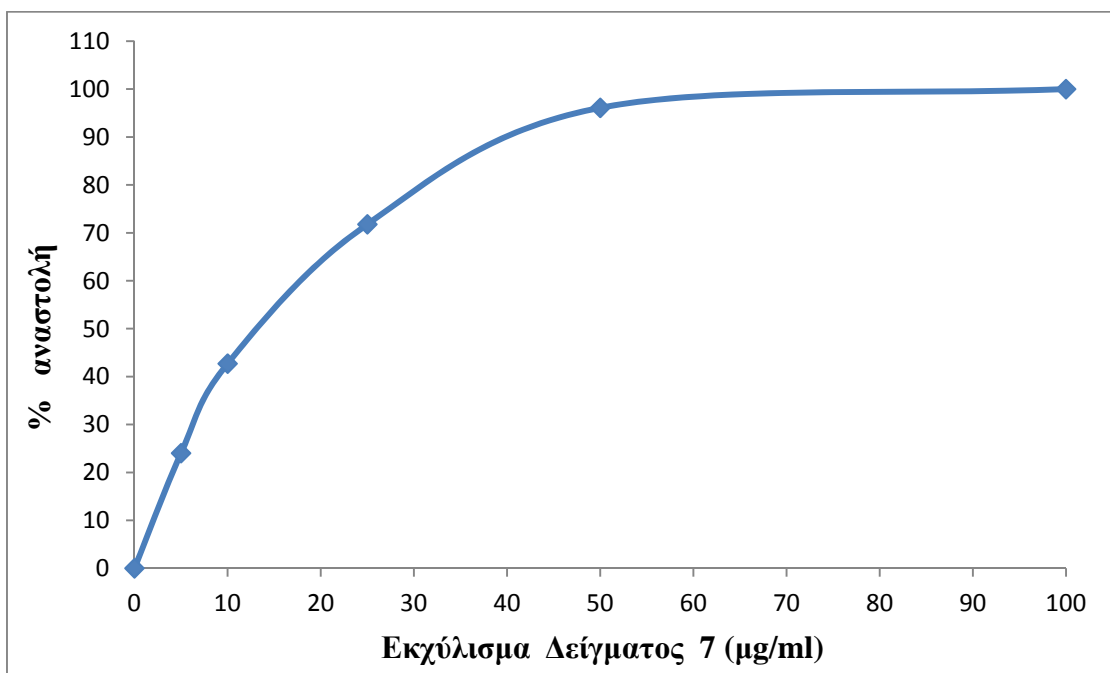
Γράφημα 18: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ).



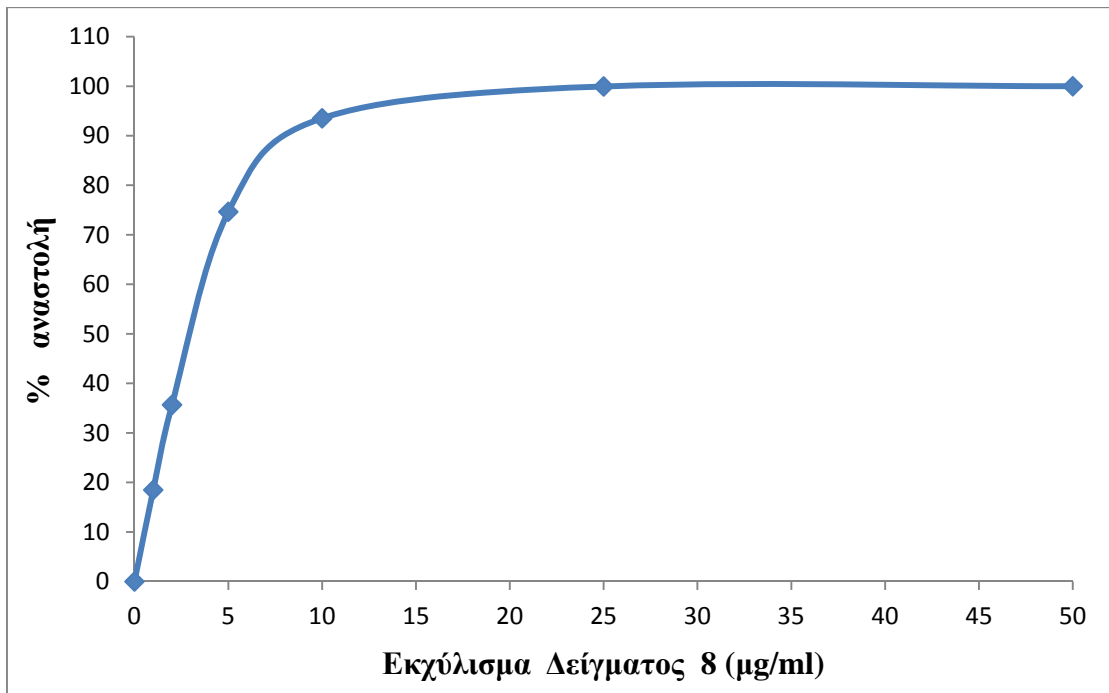
Γράφημα 19: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 5 (σπέρματα)



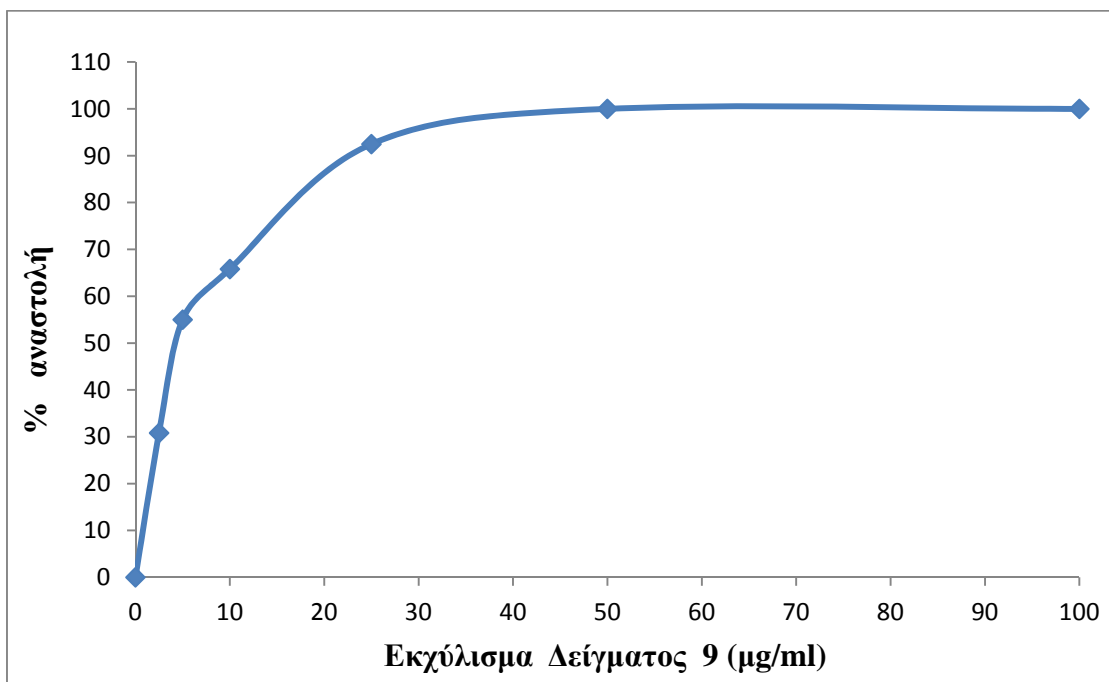
Γράφημα 20: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 6 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας)



Γράφημα 21: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 7 (μια μορφή πούλπας)



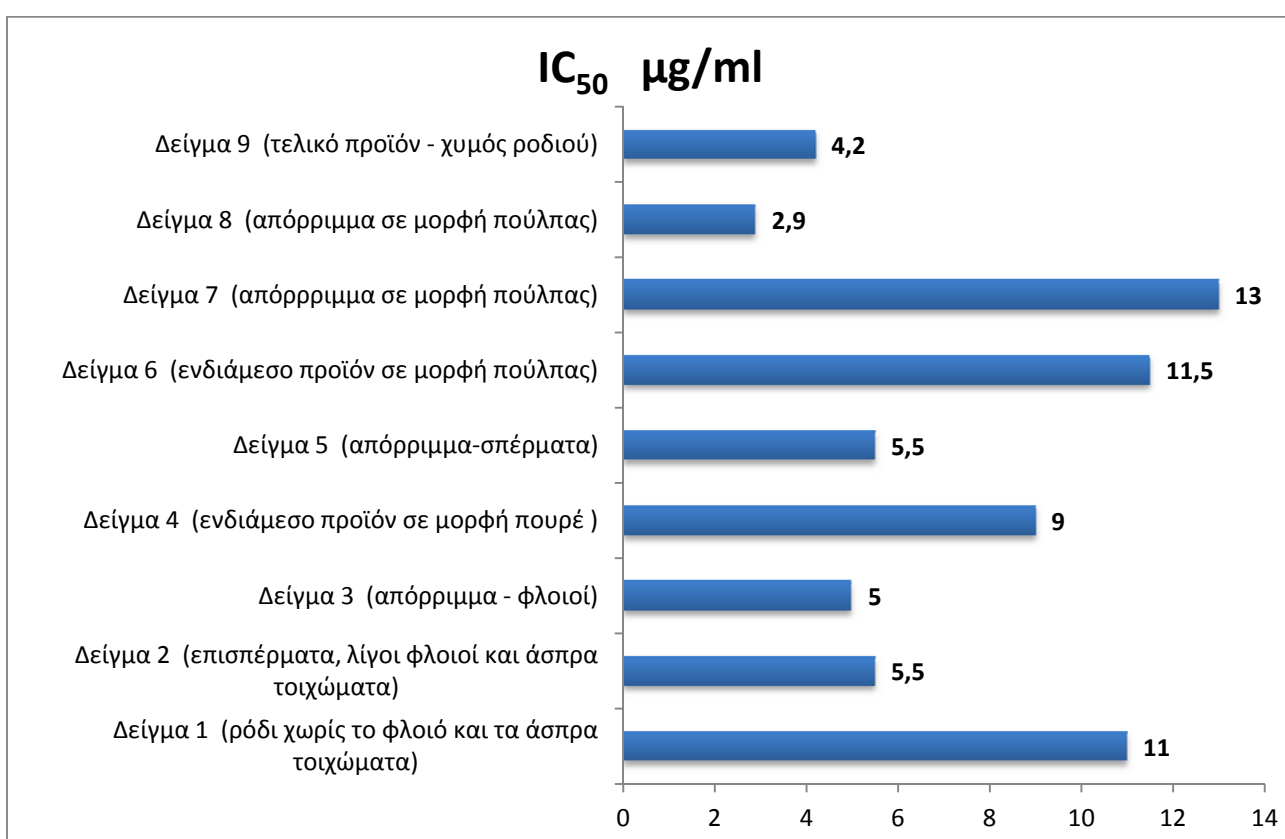
Γράφημα 22: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 8 (μια μορφή πούλπας)



Γράφημα 23: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το εκχύλισμα του Δείγματος 9 (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν)

Στο παρακάτω γράφημα (24) απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} και των 9 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα $ABTS^{*+}$ και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος

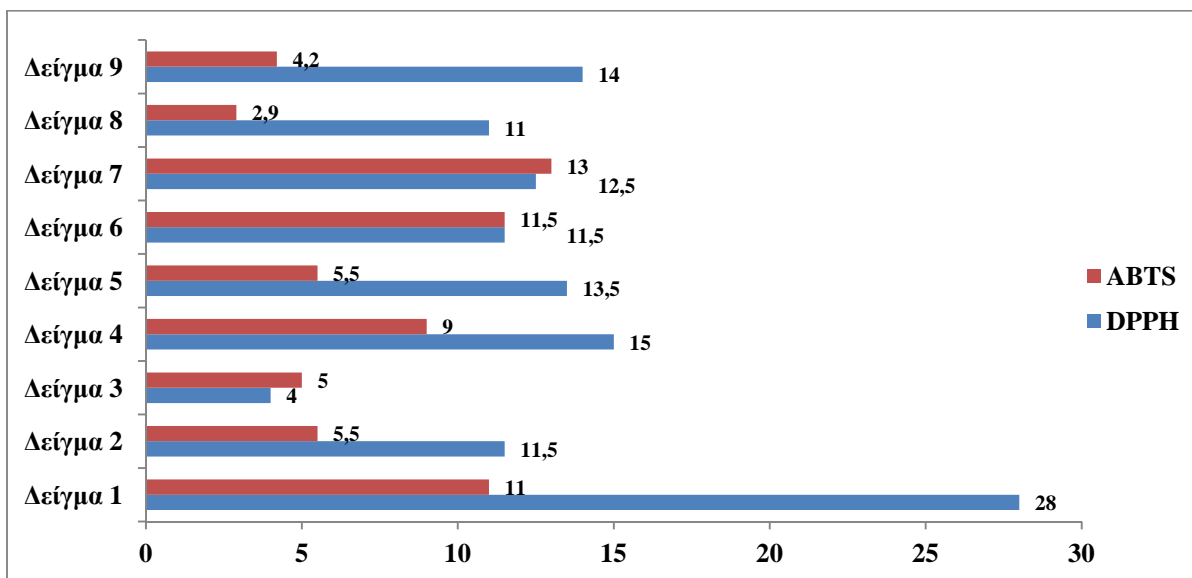
Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 730nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



Γράφημα 24: Γραφική απεικόνιση τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με τη ρίζα $ABTS^{*+}$.

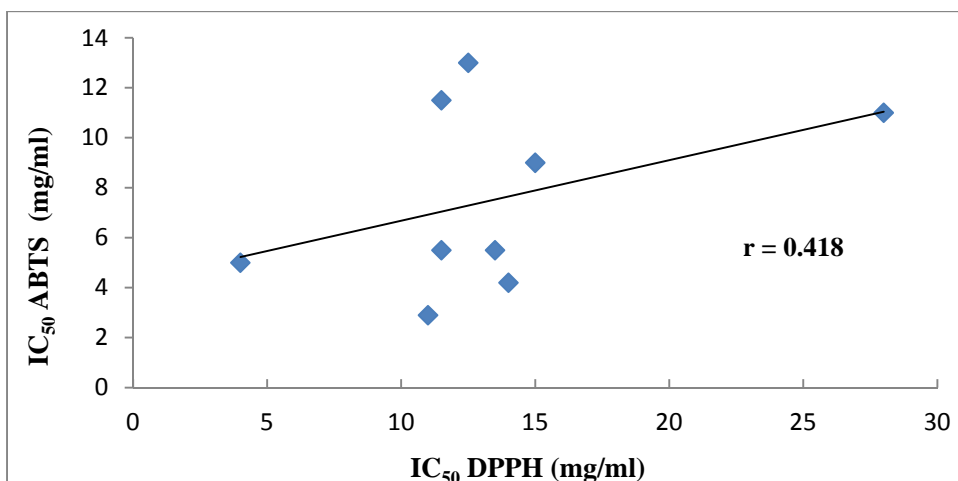
3.3 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το Γράφημα 25 διαπιστώνουμε, ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και με τις δύο ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις. Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμαίνεται από 2,9 $\mu\text{g/ml}$ έως 28 $\mu\text{g/ml}$.

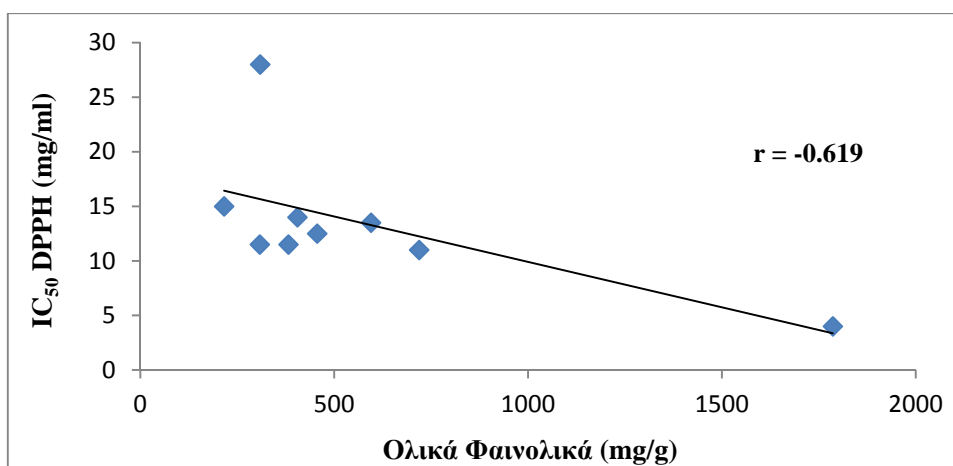


Γράφημα 25: Απεικόνιση των τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους

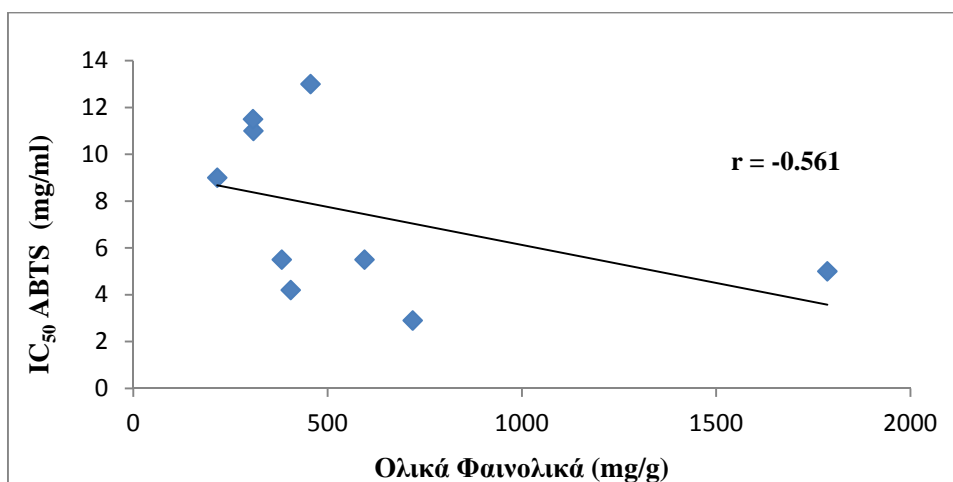
Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των δύο μεθόδων. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC_{50} που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, $r = 0,418$ με $p < 0,01$, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. (Γράφημα 26). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα ανά μία μέθοδο με το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων παρατηρούμε σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση ($r = 0,619$ με $p < 0,01$) για την μέθοδο του DPPH και για τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,561$ με $p < 0,01$) (Γραφήματα 27,28). Ομοίως, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα ανά μία μέθοδο με τα ολικά φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων παρατηρούμε σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση ($r = 0,653$ με $p < 0,01$) για την μέθοδο του DPPH και για τη μέθοδο του ABTS ($r = 0,596$ με $p < 0,01$) (Γραφήματα 29,30).



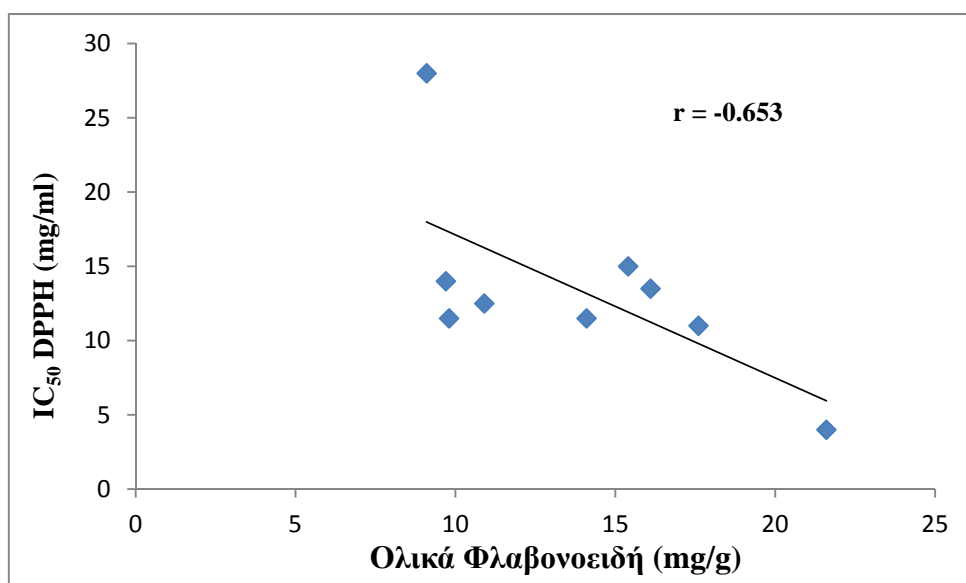
Γράφημα 26 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των δύο μεθόδων (DPPH – ABTS)



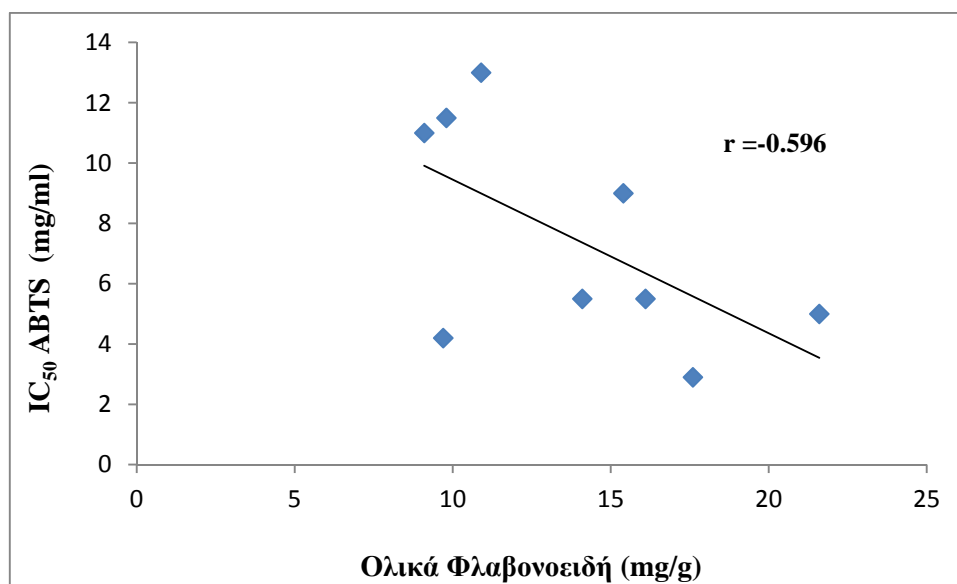
Γράφημα 27 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου DPPH με τα Ολικά Φαινολικά



Γράφημα 28 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου ABTS με τα Ολικά Φαινολικά



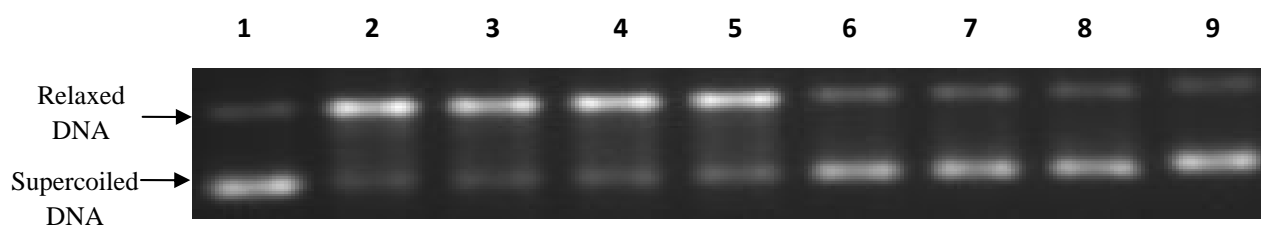
Γράφημα 29 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου **DPPH** με τα Ολικά Φλαβονοειδή



Γράφημα 30 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ της μεθόδου **ABTS** με τα Ολικά Φλαβονοειδή

3.4 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα δειγμάτων της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Τα δείγματα 1, 4, 5, 6, 7 και 9 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml, τα δείγματα 2 και 3 στις συγκεντρώσεις 2, 4, 8, 16, 32, 64, μg/ml, και το δείγμα 9 στις συγκεντρώσεις 4, 8, 12, 16, 32, 64, 128 μg/ml. (Γραφήματα 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες περοξυλίου (ROO[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 5,0 μg/ml έως 41,5 μg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 3 (απόρριμμα-φλοιοί) (Γράφημα 33) με IC₅₀ ίσο με 5,0 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος 7 (απόρριμμα σε μορφή πούλπας από το στάδιο της πρώτης φυγοκέντρωσης) (Γράφημα 37) με IC₅₀ ίσο με 41,5 μg/ml. Στην Εικόνα 26 δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 4 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 8 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

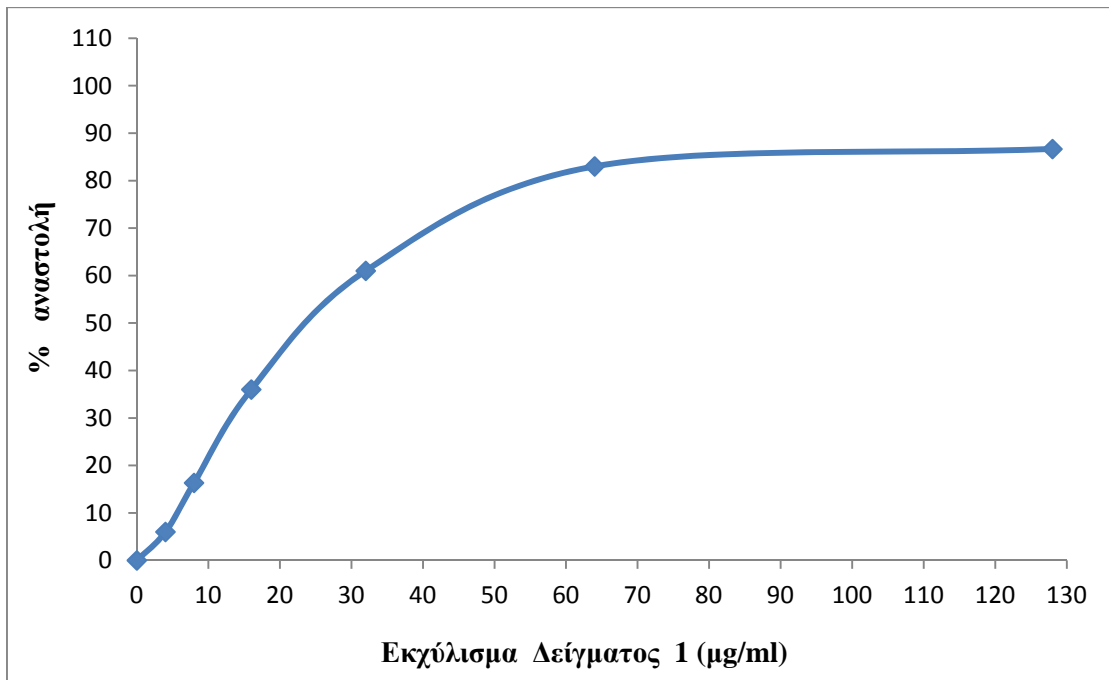
Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 16 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 32 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

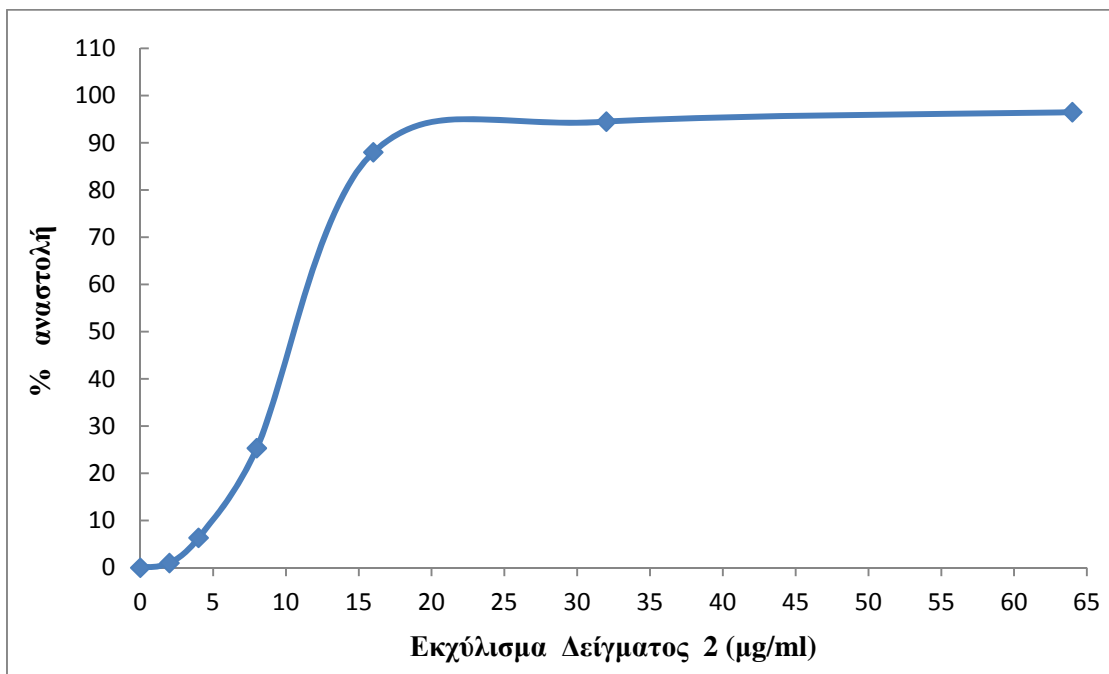
Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 64 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

Σειρά 8: DNA plasmid + AAPH + 128 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4

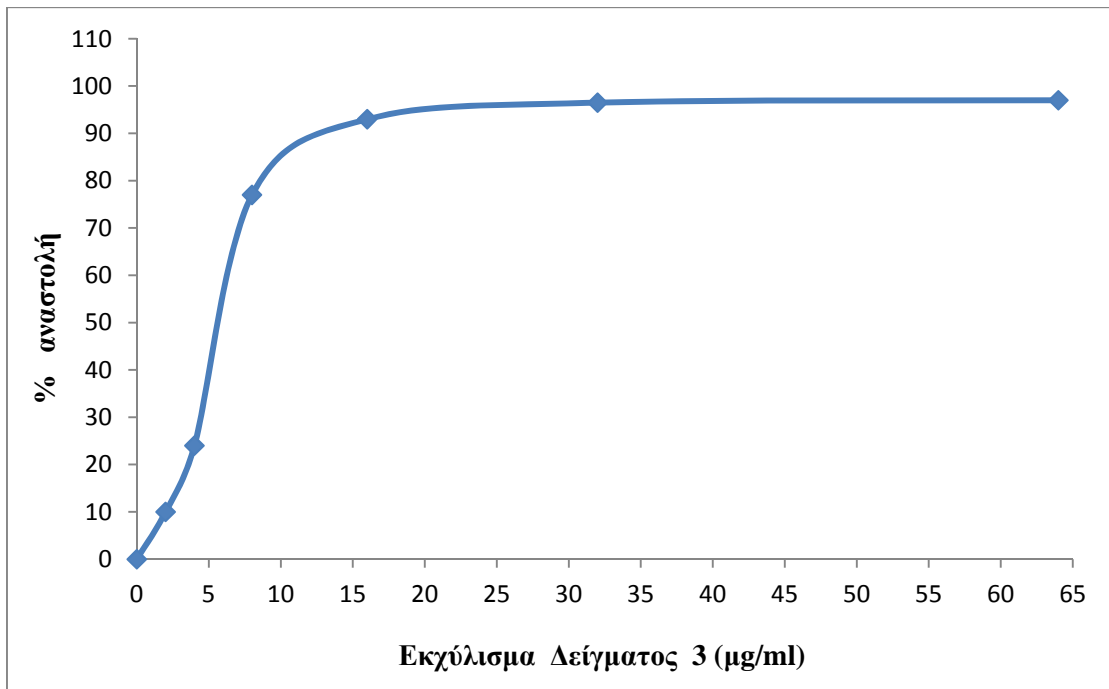
Σειρά 9: DNA plasmid + 128 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 4



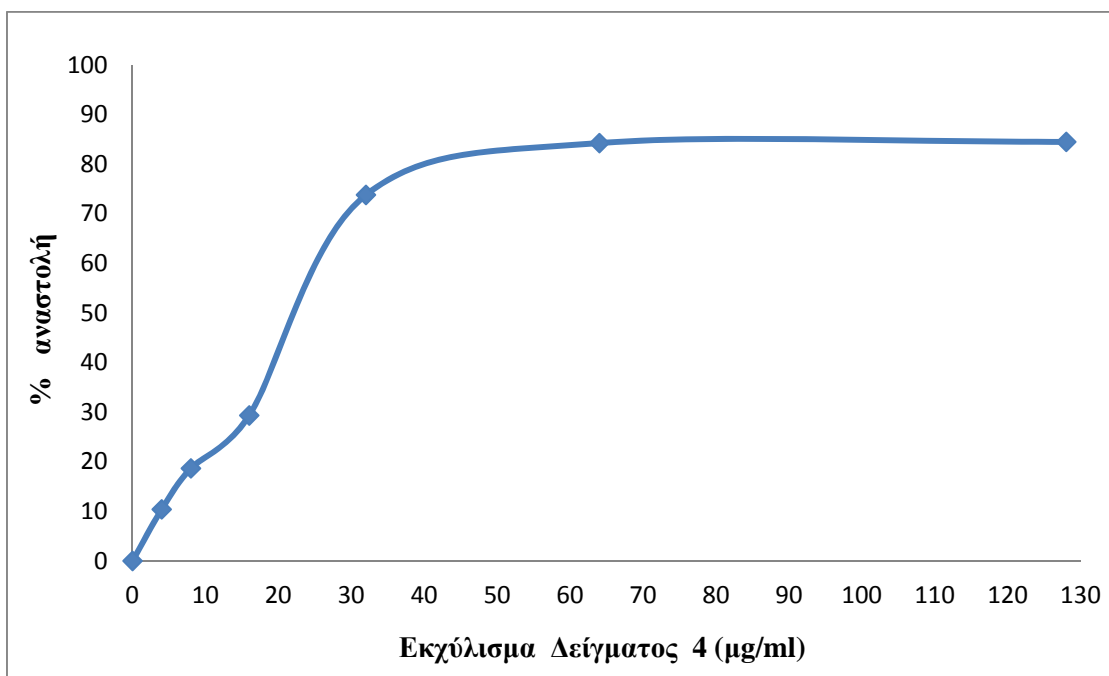
Γράφημα 31: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 1 (Ρόδι χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα – Βρώσιμο τμήμα), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{\bullet} .



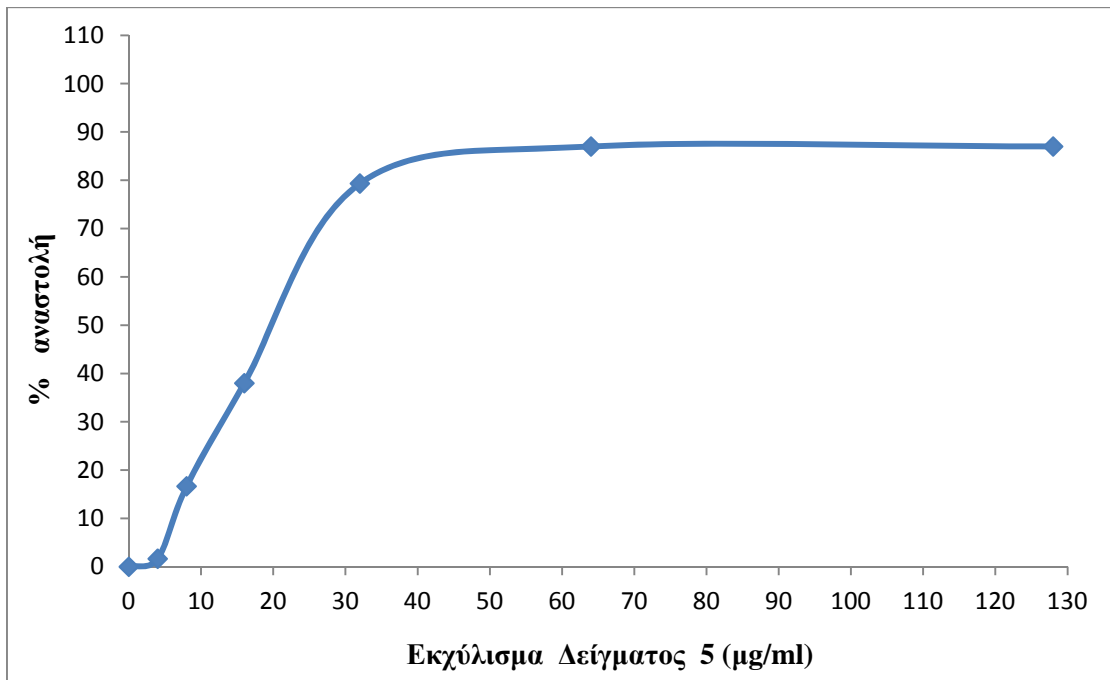
Γράφημα 32: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 2 (επισπέρματα ροδιού και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{\bullet} .



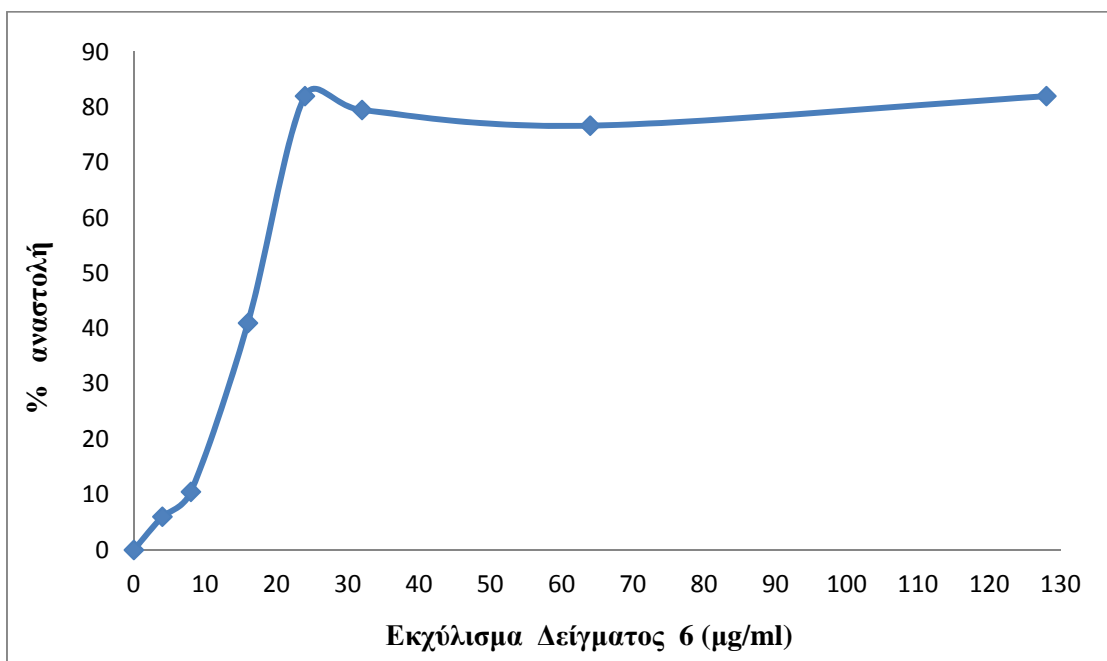
Γράφημα 33: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 3 (φλοιοί ροδιού), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{\bullet} .



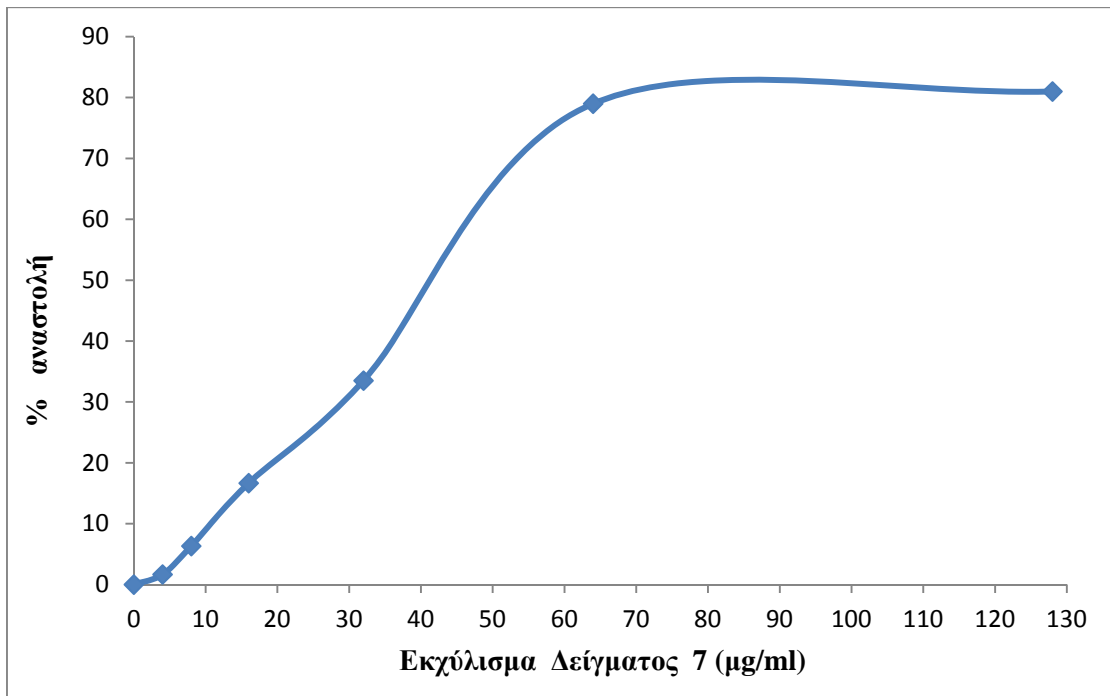
Γράφημα 34: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 4 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{\bullet} .



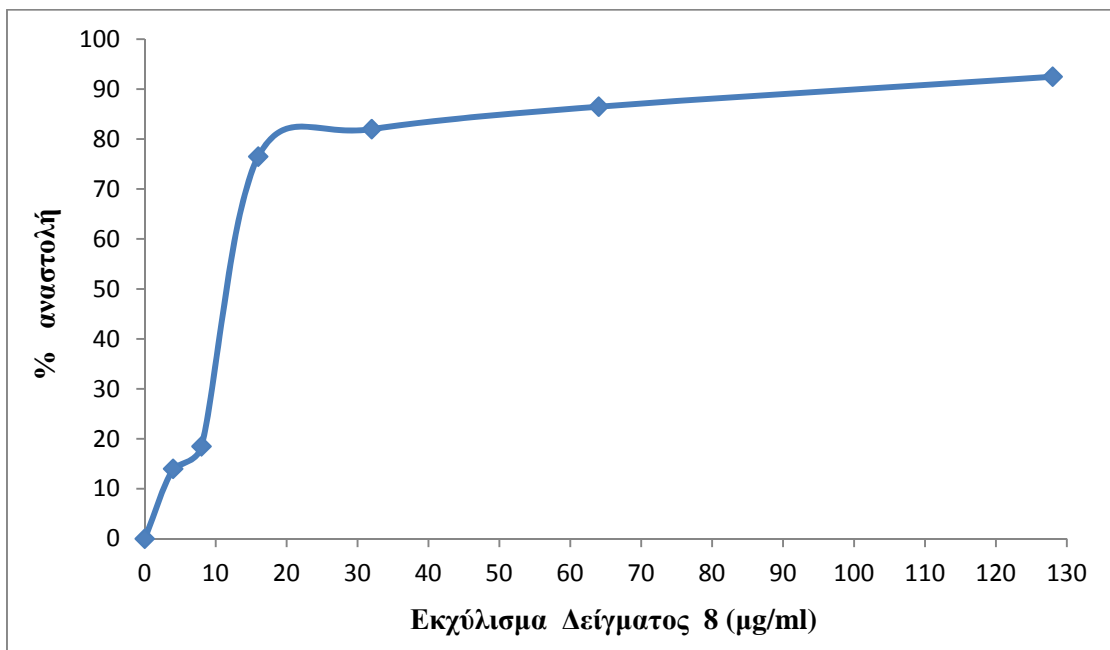
Γράφημα 35: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 5 (σπέρματα), στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].



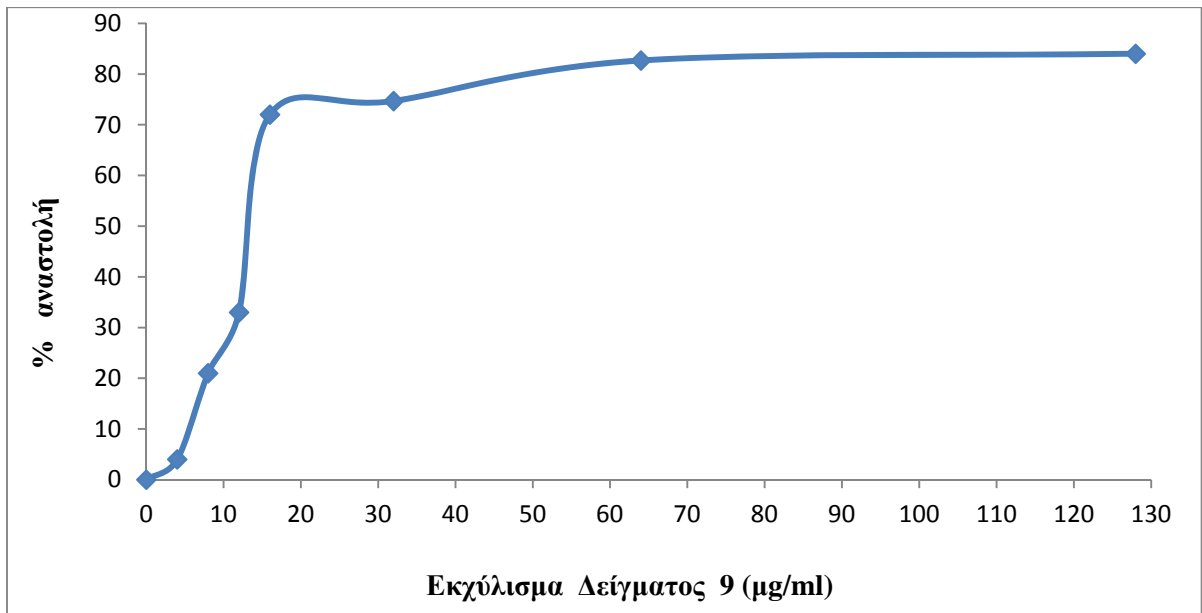
Γράφημα 36: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 6 (ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO[•] ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO[•].



Γράφημα 37: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 7 (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{*} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{*}.

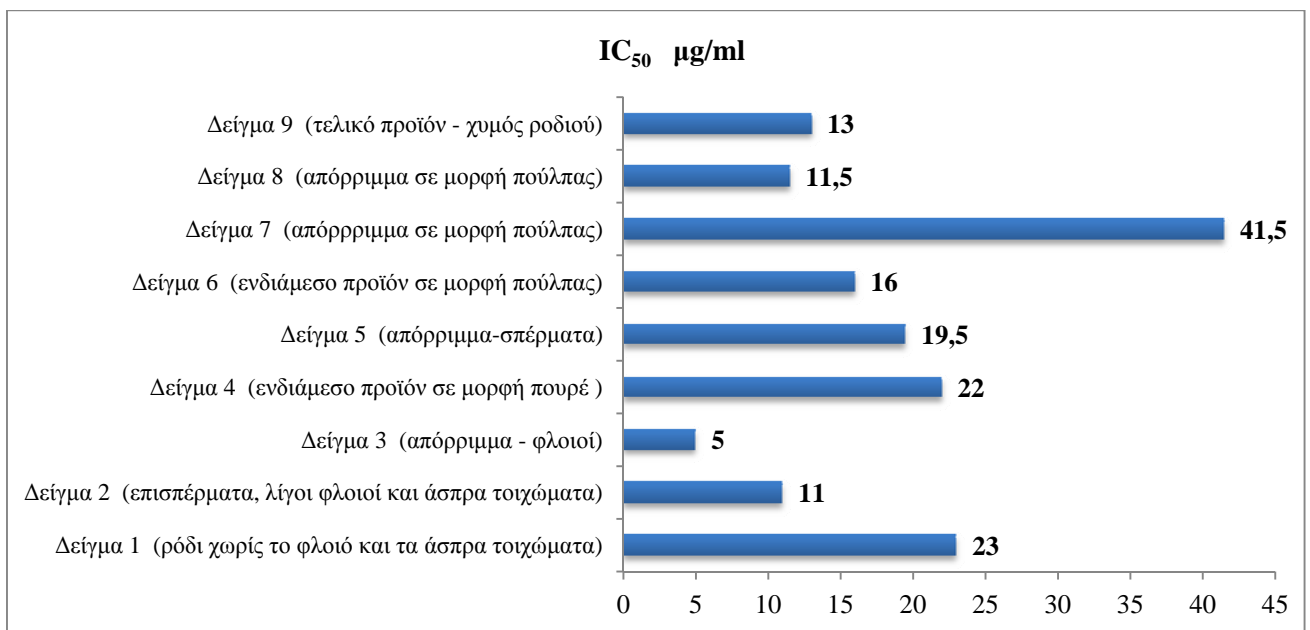


Γράφημα 38: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 8 (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{*} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{*}.



Γράφημα 39: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 9 (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν), στις επαγόμενες από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών ROO^{\bullet} .

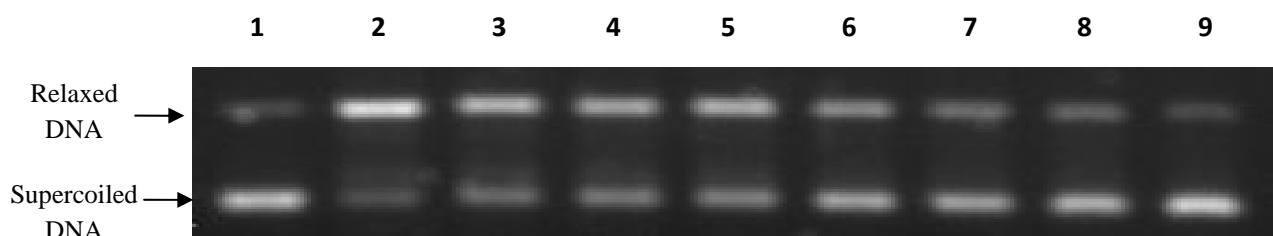
Στο Γράφημα (40) απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} και των 9 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους ρίζες ROO^{\bullet} και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.



Γράφημα 40: Γραφική απεικόνιση τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων από ρίζες ROO^{\bullet} ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA.

3.5 Αποτελέσματα της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης τους.

Μελετήθηκαν μόνο 3 από τα 9 εκχυλίσματα δειγμάτων της διαδικασίας παραγωγής χυμού ροδιού. Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 2.2.2.4ii, τα 3 δείγματα (3,7,9) ήταν τα μόνα τα οποία διαλύθηκαν σε νερό. Η διάλυση των υπολοίπων 6 (1, 2, 4, 5, 6, 8) ήταν αδύνατη, τόσο σε νερό όσο και σε μεθανόλη, αιθανόλη και DMSO, στις συγκεντρώσεις βέβαια που οι διαλύτες δεν αλληλεπιδρούσαν με τις ρίζες OH[•] και δεν επηρέαζαν την μέθοδο και τις μετρήσεις. Τα 3 εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου (OH[•]), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Τα δείγματα 3 και 7 εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 μg/ml, ενώ το δείγμα 9 στις συγκεντρώσεις των 150, 300, 600, 1200, 2400, 4800 μg/ml (Γραφήματα 41, 42, 43). Στην Εικόνα 27 δίνεται μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 27: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + H₂O₂

Σειρά 3: DNA plasmid + H₂O₂ + 150 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

Σειρά 4: DNA plasmid + H₂O₂ + 300 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

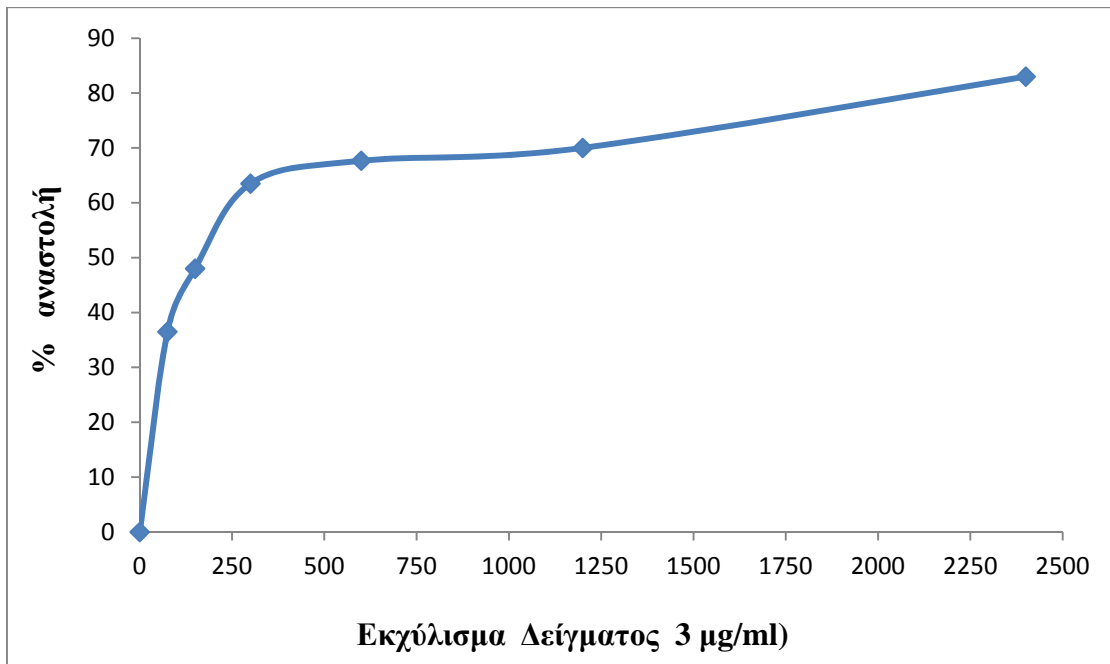
Σειρά 5: DNA plasmid + H₂O₂ + 600 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

Σειρά 6: DNA plasmid + H₂O₂ + 1200 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

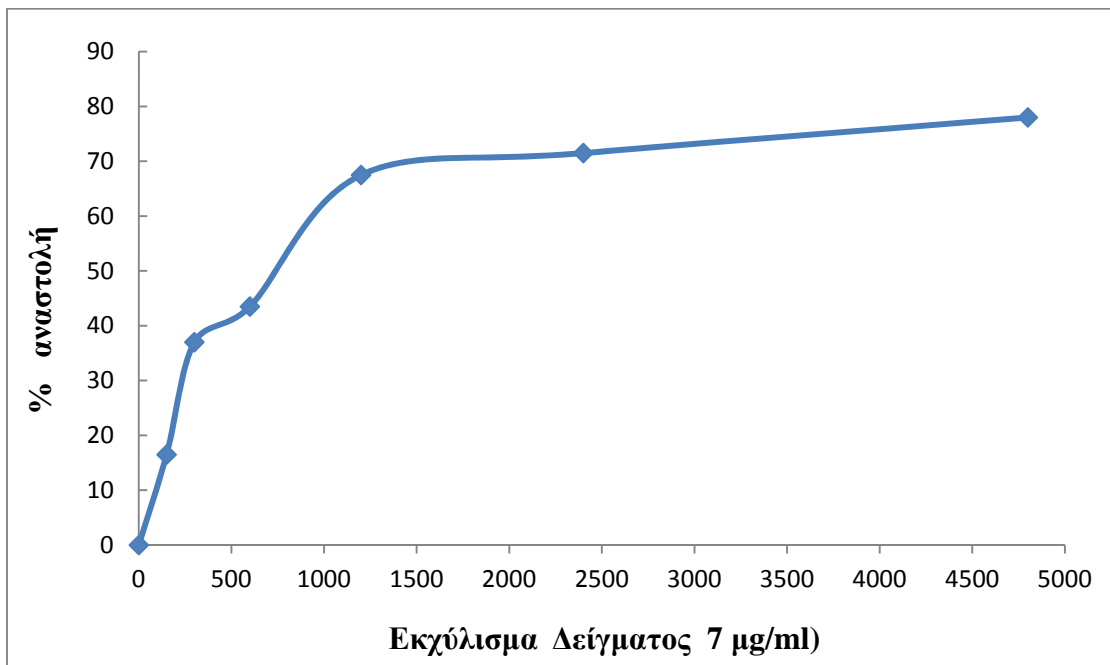
Σειρά 7: DNA plasmid + H₂O₂ + 2400 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

Σειρά 8: DNA plasmid + H₂O₂ + 4800 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9

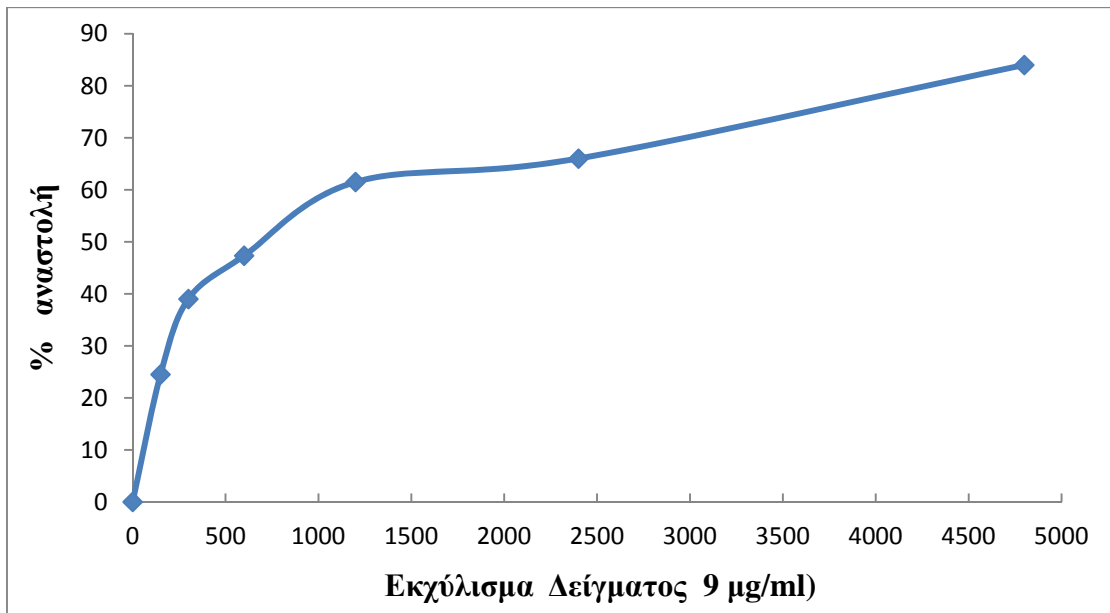
Σειρά 9: DNA plasmid + 4800 μg/ml εκχυλίσματος δείγματος 9



Γράφημα 41: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 3 (φλοιοί ροδιού), στις επαγόμενες από ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH^\bullet .

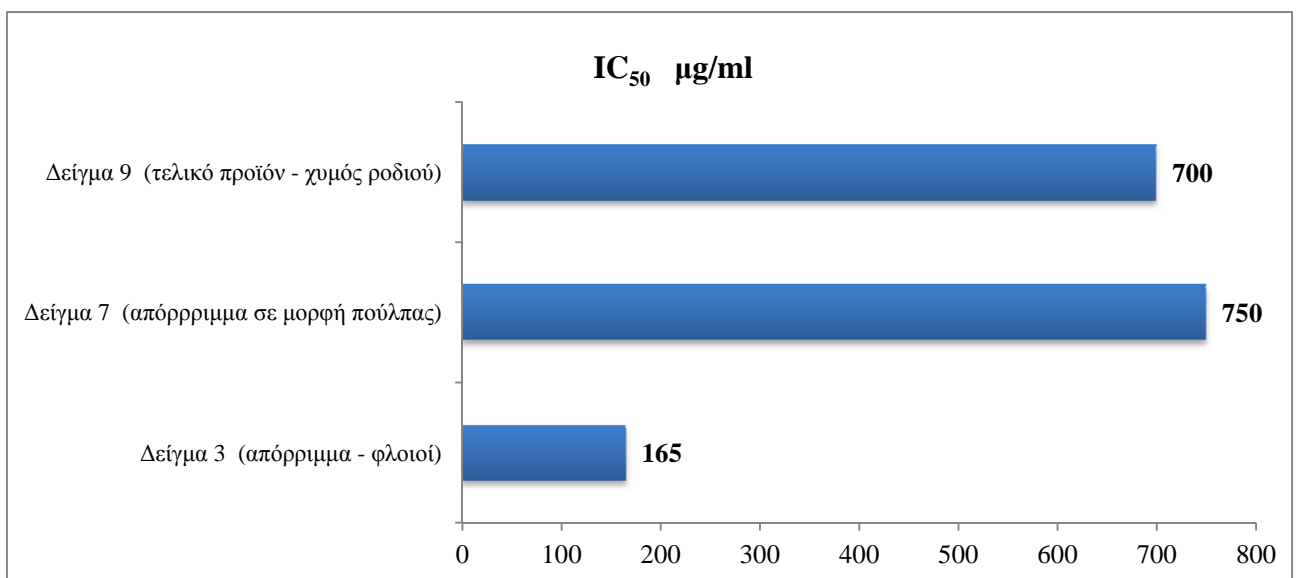


Γράφημα 42: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 7 (μια μορφή πούλπας), στις επαγόμενες από ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH^\bullet .



Γράφημα 43: Επίδραση εκχυλίσματος του Δείγματος 9 (χυμός ροδιού – τελικό προϊόν), στις επαγόμενες από ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA. Ποσοστά αναστολής της δράσης των ριζών OH^\bullet .

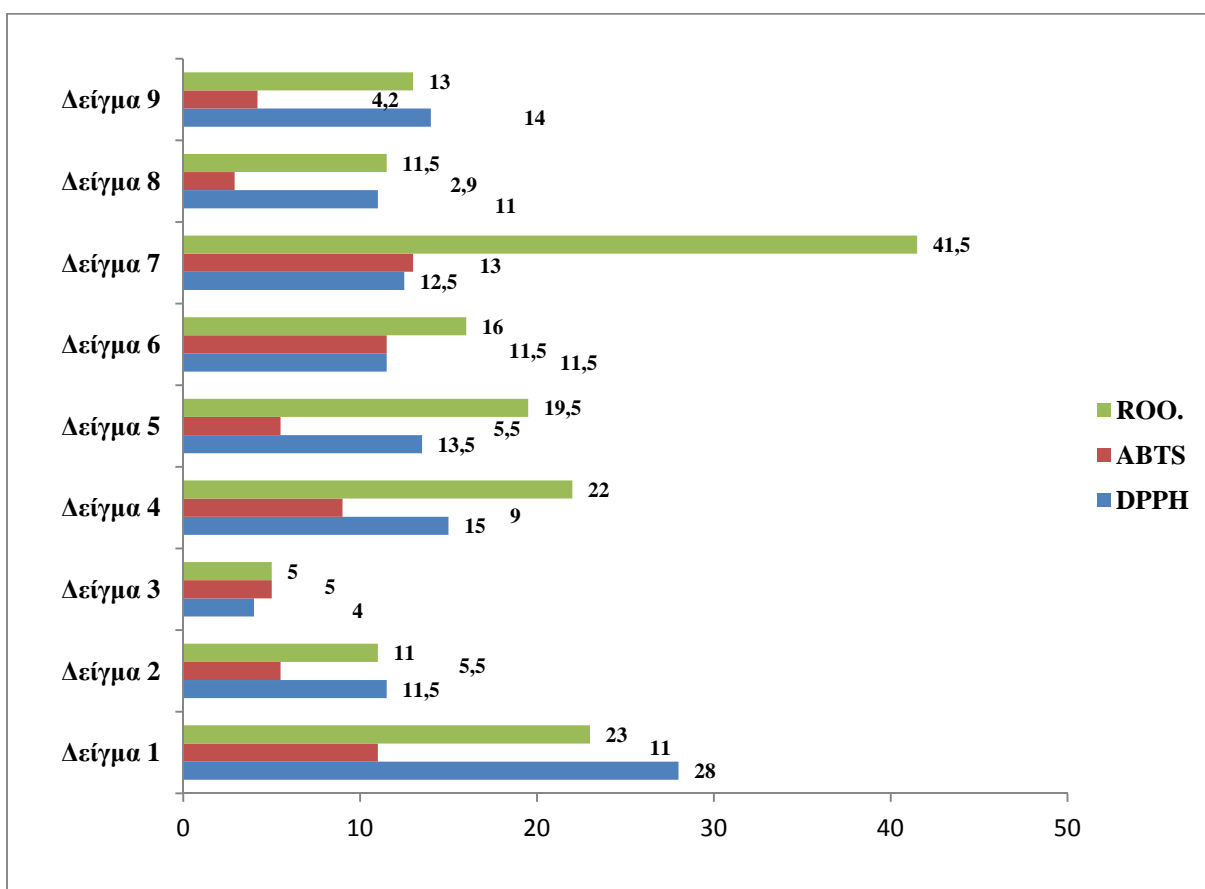
Στο Γράφημα 44 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} των 3 εκχυλισμάτων, σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους ρίζες OH^\bullet και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας τους. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.



Γράφημα 44: Γραφική απεικόνιση τιμών IC_{50} των εκχυλισμάτων δειγμάτων της γραμμής παραγωγής χυμού ροδιού έναντι των επαγόμενων από ρίζες OH^\bullet ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA

3.6 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα

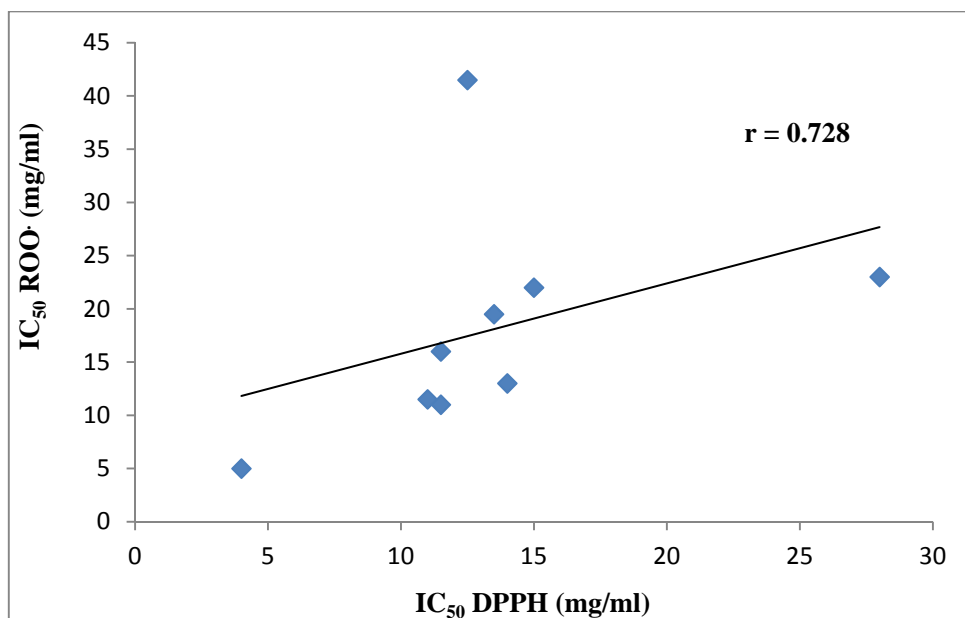
Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρώντας το Γράφημα 45 διαπιστώνουμε, ότι τα αποτελέσματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και με τις τρεις ρίζες, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και ορισμένες αποκλίσεις. (Δεν θα γίνει σύγκριση με την 4^η μέθοδο των ριζών OH[•] καθώς μόνο 3 από τα 9 δείγματα κατέστην δυνατό να εξεταστούν). Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαίνεται από 2,9 μg/ml έως 41,5μg/ml.



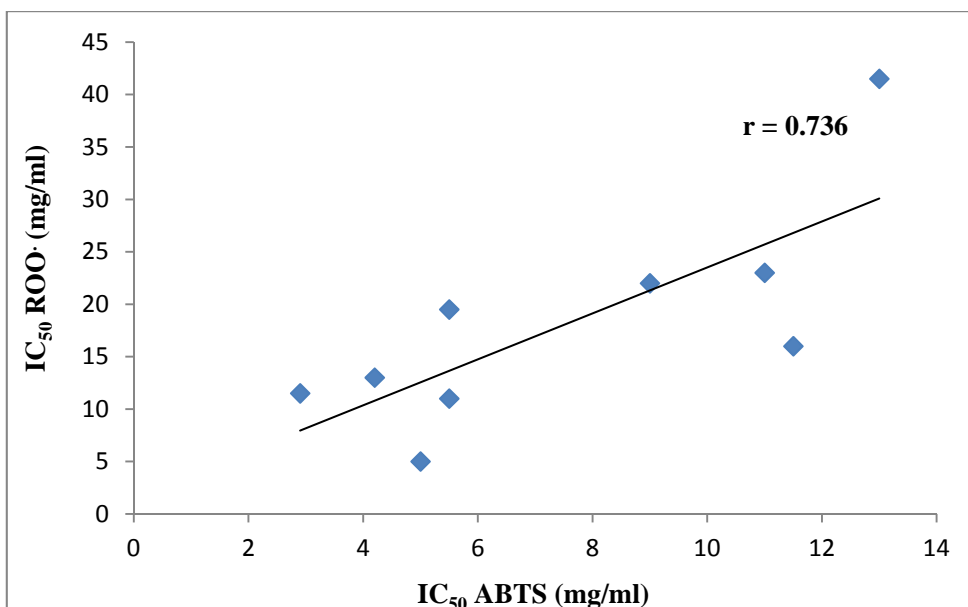
Γράφημα 45: Απεικόνιση των τιμών IC₅₀ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και με τις τρεις μεθόδους

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην ταξινόμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταξύ των τριών μεθόδων (Γράφημα 45). Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν για την μέθοδο DPPH και ROO• ($r= 0,728$ με $p<0,01$), και για τη μέθοδο ABTS και ROO• ($r= 0,736$ με $p<0,01$) παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση. (Γραφήματα 46 και 47). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου ROO• με το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων παρατηρούμε μη ικανοποιητική

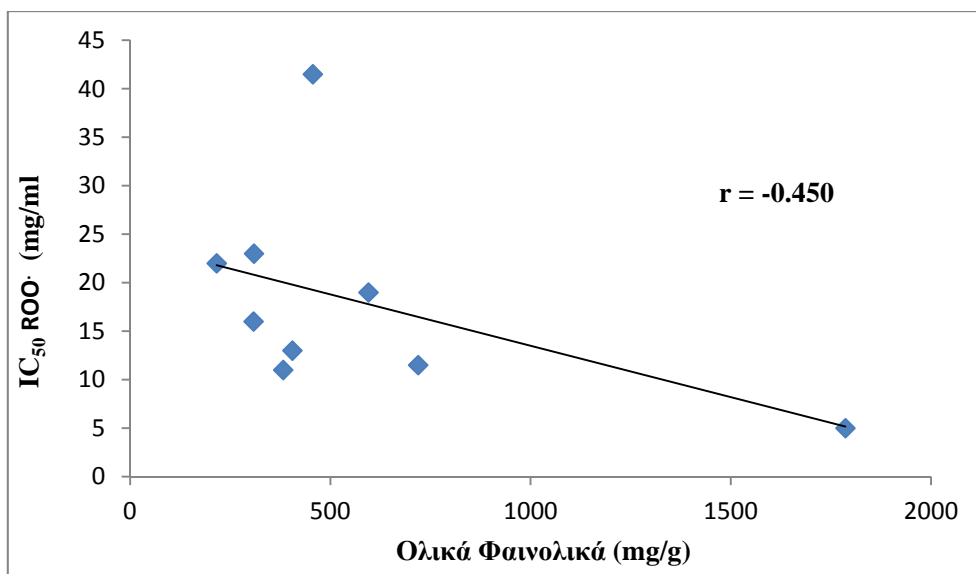
συσχέτιση ($r = 0,450$ με $p < 0,01$). (Γράφημα 48). Σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση παρατηρείται στη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου $ROO\bullet$ με τα ολικά φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων ($r = 0,517$ με $p < 0,01$). (Γράφημα 49).



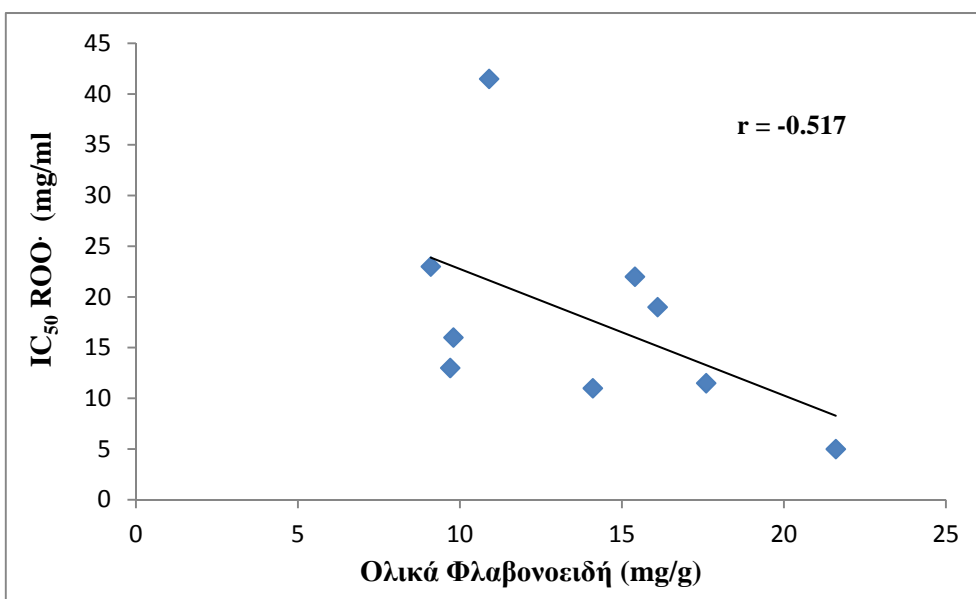
Γράφημα 46 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των μεθόδων **DPPH – ROO•**



Γράφημα 47 : Συσχέτιση των τιμών IC₅₀ των μεθόδων **ABTS – ROO•**



Γράφημα 48 : Συσχέτιση των τιμών IC_{50} της μεθόδου $ROO\bullet$ με τα Ολικά Φαινολικά



Γράφημα 49 : Συσχέτιση των τιμών IC_{50} της μεθόδου $ROO\bullet$ με τα Ολικά Φλαβονοειδή

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια, για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινόλων, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), ο καρκίνος (Toyokuni, 1998), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), η αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), η πρόωγη γήρανση (Wiseman et al., 1995) και το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992). Έτσι καθώς τα φυτά αποτελούν μια ιδιαίτερα πλούσια πηγή βιοδραστικών μορίων, αφού παράγουν αρκετά από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες για την ικανοποίηση λειτουργικών τους αναγκών, αποτελούν τόσο αυτά όσο και τα προϊόντα τους αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης στα πλαίσια αναζήτησης νέων χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Χημειοπροστατευτικές ιδιότητες αποδίδονται για παράδειγμα σε εκχυλίσματα αμπέλου (*Vitis vinifera*) κυρίως λόγω των πολυφαινολικών συστατικών που περιέχουν (Torres et al, 2002). Ομοίως τα ψυχανθή και ιδιαίτερα οι καρποί τους, τα όσπρια, που κατέχουν κυρίαρχη θέση στη διατροφή σε όλο τον κόσμο, θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. εντέρου, μαστού, προστάτη) (Mathers, 2002), καρδιαγγειακές παθήσεις (Anderson et al., 1999) και διαβήτη (Venn & Mann, 2004). Έχει ακόμη αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων, τους προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefter & Milner 2008). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στο δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, τη ρίγανη, τη μέντα και το θυμάρι (Zandi & Ahmadi, 2000) καθώς τα συστατικά των βοτάνων που ανήκουν στην οικογένεια αυτή παρουσιάζουν χημειοπροστατευτική δράση (Craig, 1999).

Αρκετά μελετημένο, ως προς τα βιοδραστικά του συστατικά και κυρίως τις φυτικές του πολυφαινόλες, είναι και το φυτό *Punica Granatum* (Ροδιά), και κυρίως ο καρπός του, το Ρόδι. Οι ουσίες που υπάρχουν στα διάφορα μέρη του ροδιού (φλοιός, σπέρματα, χυμός) αναφέρεται ότι μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Çam et al., 2009), αντικαρκινικοί (Hamad and Al-Momene 2009), αντιηπατοξικοί (Celik et al., 2009) και καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες (Davidson et al., 2009). Μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει, ότι ο χυμός ροδιού αποτρέπει ή επιβραδύνει την ανάπτυξη όγκων σε διάφορες μορφές καρκίνου και συμβάλλει στην επιδιόρθωση της βλάβης στο DNA (Syed et al., 2007, Koyama et al. 2010).

Επιπλέον, τα συστατικά στα διάφορα μέρη του ροδιού αναφέρεται ότι παρουσιάζουν αντι-οξειδωτικές (Haidari et al., 2009), και αντιμικροβιακές (Duman et al., 2009) ιδιότητες και συμβάλουν στην στοματική υγεία (Di Silvestro et al., 2009) και στην υγεία του δέρματος (Aslam et al., 2006). Επίσης φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της ασθένειας του Αλτσάιμερ (Singh et al., 2008). Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι να αυξάνεται τόσο η ζήτηση και η απαίτηση για τρόφιμα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις από τους καταναλωτές όσο και η ανάγκη της βιομηχανίας τροφίμων για έρευνα, παραγωγή και κατοχύρωση τέτοιων καινοτόμων προϊόντων.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, σε εκχυλίσματα των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι οι ρίζες OH[•] και ROO[•]. Άλλωστε, η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Σε όλες τις μεθόδους προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Με βάση τις τιμές των IC₅₀ του Γραφήματος 14 το σύνολο των 9 εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] και μάλιστα τα περισσότερα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 4,0μg/ml έως 28μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν του δείγματος 3 που αφορούσε το απόρριμμα (φλοιοί) του πρώτου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα την αποφλοιώση του φρούτου, με IC₅₀ 4,0μg/ml. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία που αναφέρει το πλούσιο αντιοξειδωτικό δυναμικό του φλοιού του ροδιού λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των φυτικών πολυφαινόλων που περιέχει. Επίσης επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό τόσο των ολικών φαινολικών (Πίνακας 8 και Γράφημα 4) όσο και των ολικών φλαβονοειδών (Πίνακας 7 και Γράφημα 3)

που αναφέρουν ότι το συγκεκριμένο δείγμα έχει την μέγιστη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (1786 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού δείγματος) και ολικών φλαβονοειδών (21,6 mg κατεχίνης /g ξηρού δείγματος). Οι τιμές IC₅₀ των υπολοίπων δειγμάτων κυμαίνονται από 11 έως 15 μg/ml με μοναδική εξαίρεση την τιμή 28 μg/ml του δείγματος 1 που αφορά το φρούτο χωρίς όμως τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα (μόνο το βρώσιμο μέρος του ροδιού). Συγκρίνοντας την τιμή του IC₅₀ του βρώσιμου μέρους του ροδιού (28 μg/ml) και την τιμή του τελικού προϊόντος της παραγωγικής διαδικασίας, του χυμού ροδιού (14 μg/ml), μπορούμε να συμπεράνουμε την αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του χυμού και το γεγονός της διατήρησης και "συμπύκνωσης" αυτής σε σχέση με το βρώσιμο μέρος του φρούτου. Αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει και το απόρριμμα του δεύτερου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας, τα σπέρματα του καρπού, επίσης πλούσια φυτικών πολυφαινόλων, με IC₅₀ 13,5 μg/ml. Το γεγονός αυτό επίσης επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό τόσο των ολικών φαινολικών (Πίνακας 7 και Γράφημα 3) όσο και των ολικών φλαβονοειδών (Πίνακας 8 και Γράφημα 4), καθώς το εκχύλισμά του έχει την τρίτη καλύτερη τιμή και των δύο παραμέτρων.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS⁺ έδειξε, όπως και η μέθοδος της ρίζας του DPPH•, σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσής της. Έτσι, αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 2,9 μg/ml έως 13 μg/ml. Στην περίπτωση αυτής της μεθόδου το εύρος των τιμών IC₅₀ ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μέθοδο του DPPH• (4,0-28μg/ml). Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν του δείγματος 8 που αφορούσε το απόρριμμα (μια μορφή πούλπας) του τελευταίου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα το στάδιο της δεύτερης φυγοκέντρωσης από την οποία προκύπτει το τελικό προϊόν, ο χυμός ροδιού, με IC₅₀ 2,9 μg/ml. Το υψηλό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες αυτού του εκχυλίσματος επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό τόσο των ολικών φαινολικών (Πίνακας 7 και Γράφημα 3) όσο και των ολικών φλαβονοειδών (Πίνακας 8 και Γράφημα 4) που αναφέρουν ότι το συγκεκριμένο δείγμα έχει την δεύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών (719 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού δείγματος) και την δεύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών (17,6 mg κατεχίνης /g ξηρού δείγματος). Και με αυτή την μέθοδο επιβεβαιώνεται το υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό των δειγμάτων 3 (απόρριμμα - φλοιοί) και 5 (απόρριμμα-σπέρματα) με τιμές IC₅₀ 5 μg/ml και 5,5 μg/ml αντίστοιχα, αλλά και του τελικού προϊόντος (χυμού) με IC₅₀ 4,2 μg/ml.

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίζουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων λόγω της αυτονόητης δυσκολίας διαχωρισμού και μέτρησης

κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά αλλά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση ($r=0,418$ με $p<0,01$)

Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση και χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα με αυτές. Μία άλλη πιθανή εξήγηση επίσης είναι ότι πρόκειται για εκχυλίσματα και όχι για απομονωμένα συστατικά των φυτών, γεγονός που μπορεί να μεταβάλλει την ικανότητα αλληλεπίδρασης των πολυφαινολών με τη ρίζα. Επίσης, η μέθοδος του DPPH έδειξε ότι υπήρχε σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση ($r= -0,619$ με $p<0,01$) ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Ομοίως η μέθοδος του ABTS έδειξε ότι υπήρχε σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση ($r= -0,561$ με $p<0,01$) ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Η μη απόλυτα ικανοποιητική συσχέτιση δείχνει ότι κυρίως η ποιοτική και λιγότερο η ποσοτική, σε πολυφαινόλες, σύσταση των εκχυλισμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης και ότι ενδεχομένως υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση. Κατά συνέπεια, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

Εκτός από τις ρίζες DPPH^{*} και ABTS⁺⁺, τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για πιθανή προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO^{*}, με την χρήση της τρίτης μεθόδου και την επίδραση ριζών ROO^{*} επάνω σε πλασμιδιακό DNA. Σύμφωνα με τις τιμές IC₅₀ του Γραφήματος 40 όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν αρκετά ισχυρή δόσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO^{*} βλάβη στο DNA, με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 5 μg/ml έως 41,5 μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα (όπως και στην περίπτωση της ρίζας DPPH^{*}) ήταν του δείγματος 3 που αφορούσε το απόρριμμα (φλοιοί) του πρώτου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα την αποφλοιώση του φρούτου, με IC₅₀ 5,0μg/ml. Αρκετά ισχυρή προστατευτική δράση παρουσιάζει και το απόρριμμα του δεύτερου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας, τα σπέρματα του καρπού, με IC₅₀ 19,5 μg/ml καθώς επίσης και το

εκχύλισμα του δείγματος 8 που αφορούσε το απόρριμμα (μια μορφή πούλπας) του τελευταίου σταδίου της παραγωγικής διαδικασίας και συγκεκριμένα το στάδιο της δεύτερης φυγοκέντρωσης από την οποία προκύπτει το τελικό προϊόν, ο χυμός ροδιού, με IC_{50} 11,5 $\mu\text{g/ml}$. Αρκετά ισχυρή επίσης είναι και η δράση του χυμού ροδιού με IC_{50} 13 $\mu\text{g/ml}$. Υπολογίζοντας το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman ανάμεσα στις τιμές IC_{50} που προέκυψαν για την μέθοδο DPPH και $ROO\bullet$ ($r = 0,728$ με $p < 0,01$), και για τη μέθοδο ABTS και $ROO\bullet$ ($r = 0,736$ με $p < 0,01$) παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση και στις δύο περιπτώσεις. Αυτό σημαίνει ότι οι ουσίες έχουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση, και αναστέλλουν τη δράση των ριζών $ROO\bullet$ προστατεύοντας το DNA, είναι ίδιες με τις ουσίες που, δρώντας ως αντιοξειδωτικά, αναστέλλουν τη δράση των ριζών $DPPH\bullet$ και $ABTS^{++}$. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έδειξαν ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ($r = -0,450$ με $p < 0,01$) ανάμεσα στην αντιμεταλλαξιγόνο δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, συνεπώς μεγαλύτερη σημασία για την δράση των εκχυλισμάτων έχει η ποιοτική και όχι η ποσοτική τους σύσταση.

Η αδυναμία διάλυσης των εκχυλισμάτων σε νερό (εκτός από 3 δείγματα στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις αλλά και η απαγόρευση χρήσης άλλων διαλυτών (μεθανόλη, αθανόλη, DMSO) καθώς επηρέαζαν την μέθοδο και νόθευαν τα αποτελέσματά της, εμπόδισαν τον έλεγχο 6 εκ των 9 εκχυλισμάτων για πιθανή προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τις ρίζες $OH\bullet$. Τα 3 εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, παρουσίασαν αντιμεταλλαξιγόνο δράση καθώς ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου ($OH\bullet$). Το γεγονός ότι οι τιμές IC_{50} έναντι των ριζών $OH\bullet$ (Γράφημα 44) ήταν πολύ μεγαλύτερες σε σύγκριση από αυτές έναντι των ριζών $ROO\bullet$, μπορεί να εξηγηθεί από το ότι οι ρίζες $OH\bullet$ έχουν πολύ μεγάλη ταχύτητα αντίδρασης με το DNA και άρα χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μιας αντιοξειδωτικής ουσίας για να παρεμποδίσει τη δράση τους.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα των δειγμάτων από τα στάδια βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την προστατευτική αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.

Αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση παρουσιάζει το τελικό προϊόν της παραγωγής, ο χυμός ροδιού, παρόμοια αν όχι ισχυρότερη της δράσης που παρουσιάζει το βρώσιμο μέρος του φρούτου. Αυτό σημαίνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του

ωφέλιμου για την υγεία βιοδραστικού περιεχόμενου του φρέσκου φρούτου (ροδιού) διατηρείται στον βιομηχανικά παραγόμενο χυμό.

Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός όμως της έντονης αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης που παρατηρείται στα παραπροϊόντα (απορρίμματα) της παραγωγικής διαδικασίας. Απορρίμματα όπως οι φλοιοί (φλούδες) αλλά και τα σπέρματα του φρούτου παρουσιάζουν ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Παρόμοια δράση έχουν και τα απορρίμματα των δύο άλλων σταδίων της παραγωγής που έχουν την μορφή πούλπας. Συνήθως τα παραπροϊόντα αυτά είτε χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές είτε απορρίπτονται ως απόβλητα ενώ σε πολύ λίγες περιπτώσεις αξιοποιούνται βιομηχανικά. Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόρριψη των παραπροϊόντων είτε αυτά βρίσκονται σε στερεή είτε σε υγρή μορφή έχει οικονομικές συνέπειες για μια βιομηχανία καθώς επιβαρύνει το κόστος λειτουργίας της εγκατάστασης υγρών αποβλήτων ή το κόστος διαχείρισης των στερεών απορριμμάτων.

Κατά συνέπεια, και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι επιτακτική η αξιοποίηση των παραπροϊόντων στην κατεύθυνση της ανάκτησης των φυτικών πολυφαινόλων που περιέχουν και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Ιδιαίτερη απαίτηση βέβαια η χρήση σύγχρονων και ασφαλών, για την ανθρώπινη υγεία, μεθόδων ανάκτησης (π.χ. εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα).

Οι ανακτημένες από τα παραπροϊόντα φυτικές πολυφαινόλες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω ενίσχυση του τελικού προϊόντος (χυμός ροδιού) αλλά και άλλων χυμών φρούτων που ενδεχομένως μια βιομηχανία χυμοποίησης παράγει. Επίσης θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων και 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.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. 2005. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 113:423–33.
- Afaq F., Malik A., Syed D., Maes D., Matsui M.S., Mukhtar H. (2005). Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogenactivated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes. *Photochem Photobiol* 81,38–45.
- Alarcon De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*. 1994 48:56–62.
- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. 2000. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatog A* 896:87–93.
- Anderson J.W., Smith B.M., Washnock C.S. 1999 Cardiovascular and renal benefits of dry beans and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 70: S464-474.
- Anoosh E. , Mojtaba E., Sadeghy Fatemeh S. (2010). Study of the effect of juice of two variety of pomegranate on decreasing plasma LDL cholesterol, *Procedia Social and Behavioral Sciences* 2 620–623.
- Aslam MN, Lansky EP, Varani J. 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol* 103:311–8.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clinl Nutr* 71:1062–76.
- Aviram M, Dornfeld L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin-converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158(1):195–8.
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 23(3):423–33.

- Azadzoï KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urol* 174(1):386–93.
- Baruchel S, Wainberg MA, “The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus”: *Journal of Leukocyte Biology*, 52, 111–114: 1992
- Betanzos-Cabrera G., Guerrero-Solano J. A., Martvnez-Pirez M. M., Calder n-Ramos Z.G., Belefant-Miller H., Cancino-Diaz J. C. (2011) Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet, *Food Research International* 44, 1381–1385.
- Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 957:210–229.
- Bishop DJM, Weinberg RA, “The themes hallmarks in of Cancer”, *Cell*, 00:57-70, 2000.
- Blochina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003 Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Botan* 91: 179-194.
- Boussetta T, Raad H, Lettéron P, Gougerot-Pocidalò MA, Marie JC, Driss F, El-Benna J. 2009. Punicic acid, a conjugated linolenic acid, inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One* 4(7):6458.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Food Science and Technology*, 28, 25–30, 1995
- Bravo L, “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”, *Nutr Rev*, 56, (11): 317-33, 1998.
- Cam M, Hısl Y, Durmaz G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 112:721–6.
- Caragay AB, “Cancer- preventative foods and ingredients” *Food Tech* 46(4), 65-68: 1992.
- Celik I, Temur A, Isik I. 2009. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed rats. *Food Chem Toxicol* 47(1):145–9.
- Chang S.T., Wu J.H., Wang S.Y., Kang P.L., Yang N.S., Shyur L.F. 2001 Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49:3420-4.

- Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : *Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.
- Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod.* 1992 55:179–183.
- Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Vanden Berghe D., Vlietinck A.J. 2003 Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Curr Med Chem* 10: 1345-1359
- Craig WJ, “Health Promoting Properties of Common Herbs”, *Am. J Clin Nutr* 70(3): 491-499, 1999.
- Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 11:815-821.
- Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger MS, Bell M, McGuire DK, Provost JC, Liker H, Aviram M. 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Ame J Cardiol* 104(7):936–42.
- De Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D’Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, Napoli C. 2007. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide* 17:50–4.
- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Progress in Clinical and Biological Research.* 1986 213:481–489.
- Dew T, Day A, Morgan M, “Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components” Department of Food Science, University of Leeds, 2005.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* 1999 65:337-353.
- Di Silvestro RA, Di Silvestro DJ, Di Silvestro DJ. 2009. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phyther Res* 23:1123–7.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, “Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress”, *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, 2004.
- Duman AD, Ozgen M, Dayisoylu KS, Erbil N, Durgac C. 2009. Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules* 14:1808–17.

- *Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. Br J Biomed Sci. 1994 51:358–370.*
- *Elliot RH, Strunin L, “Hepatotoxicity of volatile anaesthetics”, British Journal of Anaesthesia, 70: 339–349, 1993.*
- *Evans PH, “Free radicals in brain metabolism and pathology”, British Medical Bulletin, 49: 577–587, 1993.*
- *Fadavi A, Barzegar M, Azizi HM. 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. J Food Comp Anal 19:676–80.*
- *Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutation Research, 475:89-111*
- *Forest CP, Padma-Nathan H, Liker HR. 2007. Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study. Int J Impot Res 19(6):564–7.*
- *Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet. 1993 341:454-457.*
- *Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem. 2000 48:3597-3604.*
- *Fuster V. (1994) `Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology', Circulation, 90, 2126-2146.*
- *Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. Cancer Causes Control. 1999 10:71-75.*
- *Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem 48:4581–9.*
- *Gilbert D.L, “Fifty years of radical ideas”, Ann NY Acad Sci, 899:1, 2000*
- *Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS “Chemoprevention”, CA Cancer J Clin, 45: 31-49, 1995.*
- *Haidari M, Ali M, Casscells SW, Madjid M. 2009. Pomegranate (Punica granatum) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. Phytomed.*

- Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzymology* 186, 1990.
- Halliwell B, "Free Radicals and other reactive species in Disease", National University of Singapore, 2001.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, "Free Radicals in Biology and Medicine", 11: 416-493, 188-266, 1989
- Hamad AW, Al-Momene W. 2009. Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *New Biotechnol* 25(1):286.
- Harborne JB, Williams C.A., *Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry* 55, 481-504, 2000.
- Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine*. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.
- Harborne JB. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall, 1993
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Heinecke JW. 2006. Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *J Exp Med* 203(4):813-6
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993 342:1007-1011.
- Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. 2000. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* 66:228-30.
- Huang M-T., Osawa T., Ho C-T., Rosen R. T. (1994). *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I - Fruits and Vegetables*, American Chemical Society, ISBN13: 9780841227682 Chapter 24, 294-302.

- Huang THW, Peng G, Kota BP, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. 2005. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR-g and identification of an active component. *Toxicol App Pharmacol* 207:160–9.
- Jahfar M, Vijayan KK, Azadi P. 2003. Studies on a polysaccharide from the fruit rind of *Punica granatum*. *Res J Chem Environ* 7:43–50.
- Jaiswal V, DerMarderosian A, Porter JR. 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem* 118:11–6.
- Janick J., Paull R. E. (2008). *The encyclopedia of fruit & nuts* Cabi Publishing, ISBN0851996388, 9780851996387.
- Kaefer CM, Milner JA, “The role of herbs and spices in cancer prevention”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6): 347-361, 2008.
- Kaur C, Kapoor HC, “Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables”, *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153–161, 2002
- Keum Y.S., Park K.K., Lee J.M., Chun K.S., Park J.H., Lee S.K., Kwon H., Surh Y.J. 2000 Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 150:41-8.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002 76: 560-568.
- Koyama S, Cobb L, Mehta H, Seeram N, Heber D, Pantuck A, Cohen P, “Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF–IGFBP axis Growth Hormone & IGF”, *Research*, 20(1) : 55-62, 2010.
- L. Yochum, L.H. Kushi, K. Meyer, A.R. Folsom, Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *Am J Epidemiol* 149 (1999) 943–949.
- Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman I, Campbell MJ. 2005a. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs* 23:11–20.
- Lansky EP. Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177–206.

- *Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. J Natl Cancer Inst. 2000 92:154-160.*
- *Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. 2010. Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne in vitro and in vivo. Food Chem 118:315–22.*
- *Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. Cancer Res. 1994 54:1895s-1898s.*
- *López AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. Lancet 367:1747–57.*
- *Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, J Neurochem, 68 (5), 2061-69, 1977.*
- *M.G.L. Hertog, E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, D.Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heartdisease: the Zutphen elderly study, Lancet 342 (1993) 1007–1011.*
- *Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004 Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79: 727- 47.*
- *Mathers J.C. 2002 Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. Br J Nutr 88: S273-9.*
- *Mazur A., D. Bayle, C. Lab, E. Rock, Y. Rayssiguier, Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro, Atherosclerosis145 (1999) 421–42*
- *Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Copinathan V., Milner A. 1993 A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 84:407-12*
- *Mirdehghan SH, Rahemi M. 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (Punica granatum L.) fruit. Sci Hort 111(2):120–7.*
- *Molyneux P, “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, J. Sci. Technol., 26(2): 211-219, 2004.*
- *Mousavinejad G, Emam-Djomeh Z, Rezaei K, Khodaparast MHH. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. Food Chem 115:1274–8.*

- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.E.C., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.A.M, (2001), *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential 119ynaecologic*, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25
- Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L. 2002. *Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin*. *J Agric Food Chem* 50:166–71.
- Ozgul-Yucel S. 2005. *Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey*. *J Am Oil Chem Soc* 82(12):893–7.
- Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, “*Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases*”, *flammopharmacology*, 1: 3–36: 1991
- Pérez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. 2002. *In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C*. *J Agric Food Chem* 50:2308–12.
- Petti S, Scully C. 2009. *Polyphenols, oral health and disease: a review*. *J Dent* 37:413–23.
- Poyrazoglu E, Gökmen V, Artık N. 2002. *Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey*. *J Food Comp Anal* 15:567–75.
- Pradeepkumar T., Pradeep K. (2008). *Management of Horticultural Crops: Vol.11 Horticulture Science Series: In 2 Parts, New India Publishing, ISBN 8189422499, 9788189422493 (pages 147-150)*.
- Prior R, Xianli W, Schaich K, “*Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005.
- Ragan MA, Glombitza K. *Phlorotannins: brown algal polyphenols*. *Prog Phycol Res* 1986;4:177-241
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. *Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals*. *Carcinogenesis*. 1989 10:1833-1839
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yan M, Rice- Evans C, “*Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*”, *Free Radicle Biologyl and Medicine*, 26: 1231–1237, 1999.
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), *Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956

- Rosenblat M, Aviram M. 2006b. *Anti-oxidative properties of pomegranate: In vitro studies*. In: Seeram NP, Heber D, editors. *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*. New York : Taylor and Francis Group. p 31–43.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. 2005 *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.
- Schultz T.P., Hubbard T.M.JR., Jin Le H., Fisher T.H., Nicholas D.D. *Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships*. *Phytochemistry*. 1990, 29 (5), 1501-1507.
- Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D. 2005a. *Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry*. *Sep Purif Technol* 41:49–55.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005b. *In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. *J Nut Biochem* 16:360–7.
- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “*The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*”, *CardioVasc Res*, 40: 426-432, 1998
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Morthy V, Ramassamy C. 2008. *Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism and cellular and molecular mechanism*. *J Agric Food Chem* 56:4855–73.
- 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.
- Steinberg D. (1997). 'Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance', *J Biol Chem*, 272, 20963-20966.
- Steinmetz KA, Potter JD, "Vegetables, fruit and cancer preventions a review", *J Am Diet Assoc*, 96: 1027-1039, 1996.
- Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmeier JJ, Chew MH, Marlin R, Raisin CJ, Ornish D. 2005. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 96(6):810–4.
- Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. 2007. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Sem Cancer Biol* 17:377–85.
- Tezcan F, Gültekin-Özgülven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem* 115(3):873–7.
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555
- Toyokuni S, "Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation", *Biotherapy*, 11: 147-154, 1998
- Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, Aksu EH, Aksoy H. 2008. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nut* 27(2):289–96.
- Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res.* 1991 64:91–100.
- Tzouramani E., Liontakis A., Sintori A., Navrouzoglou P., Papaeuthimiou M., Karanikolas P., Alexopoulos G. (2008) *Δεντροκομία-Ποδιά ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.*

- Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. 2007. Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem* 55:9559–70.
- Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, Van Der Greef J. 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochem* 65(2):233–41
- Venn B.J., Mann J.I. 2004 Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr* 58: 1443-1461
- Wattenberg L W, “Chemoprevention of cancer”, *Cancer Res*, 45: 1-8, 1985
- Wilson RL, “Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In *biochemical mechanism of liver injuries*”, New York Academic Press: 123-224, 1978.
- Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.
- Zandi P, Ahmadi L, “Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family”, *J Food Sci Technol*, 37: 436–439, 2000.
- Δρογούδη Π, Πσιμπουρίδης Κ, Πανταζής Σ, “Η καλλιέργεια της Ροδιάς” *Γεωργία –Κτηνοτροφία*,1:24-27, 2007.