

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
Φυσιολογίας
Ζωικών
Οργανισμών



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Βιοτεχνολογία- Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ



ΚΑΡΑΔΗΜΑ ΟΛΥΜΠΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ

Assessment of the antioxidant activity of pomegranate extracts.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Βεσκούκης Αριστείδης: Μεταδιδακτορικός ερευνητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών

Σ' αυτές τις κατάσπρες αυλές όπου φυσά ο νοτιάς
Σφυρίζοντας σε θολωτές καμάρες, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που σκιρτάει στο φως σκορπίζοντας το καρποφόρο γέλιο της
Με ανέμου πείσματα και ψιθυρίσματα, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που σπαρταράει με φυλλωσιές νιογέννητες τον όρθρο
Ανοίγοντας όλα τα χρώματα ψηλά με ρίγος θριάμβου;

Όταν στους κάμπους που ξυπνούν τα ολόγυμνα κορίτσια
Θερίζουνε με τα ξανθά τους χέρια τα τριφύλλια
Γυρίζοντας τα πέρατα των ύπνων, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που βάζει ανύποπτη μεσ' στα χλωρά πανέρια τους τα φώτα
Που ξεχειλίζει από κελαηδισμούς τα ονόματά τους, πέστε μου
Είναι η τρελή ροδιά που μάχεται τη συννεφιά του κόσμου;

Στη μέρα που απ' τη ζήλεια της στολίζεται μ' εφτά λογιά φτερά
Ζώνοντας τον αιώνιον ήλιο με χιλιάδες πρίσματα
Εκτυφλωτικά, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που αρπάει μια χαίτη μ' εκατό βιτσιές στο τρέξιμό της
Πότε θλιμμένη και πότε γκρινιαρά, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που ξεφωνίζει την καινούρια ελπίδα που ανατέλλει;

Πέστε μου, είναι η τρελή ροδιά που χαιρετάει στα μάκρη
Τινάζοντας ένα μαντίλι φύλλων από δροσερή φωτιά
Μια θάλασσα ετοιμόγεννη με χίλια δυο καράβια
Με κύματα που χίλιες δυο φορές κινάν και πάνε
Σ' αμύριστες ακρογιαλιές, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που τρίζει τ'άρμενα ψηλά στον διάφανον αιθέρα;

Πανύψηλα με το γλαυκό τσαμπί που ανάβει κι εορτάζει
Αγέρωχο, γεμάτο κίνδυνο, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που σπάει με φως καταμεσίς του κόσμου τις κακοκαιριές του δαίμονα
Που πέρα ως πέρα την κροκάτη απλώνει τραχηλιά της μέρας
Την πολυκεντημένη από σπαρτά τραγούδια, πέστε μου είναι η τρελή ροδιά
Που βιαστικά ξεθλυκώνει τα μεταξωτά της μέρας;

Σε μεσοφούστανα πρωταπριλιάς και σε τζιτζίκια δεκαπενταυγούστου
Πέστε μου, αυτή που παίζει, αυτή που οργίζεται αυτή που ξελογιάζει
Τινάζοντας απ' τη φοβέρα τα κακά μαύρα σκοτάδια της
Ξεχύνοντας στους κόρφους του ήλιου τα μεθυστικά πουλιά
Πέστε μου, αυτή που ανοίγει τα φτερά στο στήθος των πραγμάτων
Στο στήθος των βαθιών ονείρων μας, είναι η τρελή ροδιά;

Στίχοι: Οδυσσέας Ελύτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα λοιπόν, να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτριο Κουρέτα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να αναλάβω μια τόσο σημαντική και ενδιαφέρουσα πτυχιακή εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Κούκα Παρασκευή για την καθοριστική βοήθεια της και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ακόμη ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Πατούνα Αναστασία για την πολύτιμη γνώση, βοήθεια, κατανόηση, ενθάρρυνση και συμπαράστασή που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Γιάννη για την κατανόησή του, τη στήριξη και τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς επίσης και την οικογένεια μου, που πάντα είναι δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μεγάλη αύξηση του αριθμού των ατόμων που άρχισαν να υιοθετούν έναν διαφορετικό, πιο υγιεινό 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 της νέας αυτής τάσης προς την υγιεινή ζωή είναι και η ανάγκη για εμπλουτισμό της διατροφής με προϊόντα τα οποία, εκτός των θρεπτικών ιδιοτήτων τους, έχουν και ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Σε πλήθος μελετών έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης των προαναφερθεισών ασθενειών. Ο βασικός λόγος φαίνεται πως είναι η ύπαρξη φυσικών βιοδραστικών μορίων στις φυτικές τροφές. Μία από αυτές τις κατηγορίες βιομορίων είναι και οι πολυφαινόλες. Σε αυτές έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η σημαντικότερη από τις ιδιότητες αυτές, είναι η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αντιοξειδωτικοί και χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Στα πλαίσια αυτά το ρόδι έχει κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου του, στο οποίο έχει αποδοθεί αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης από εκχυλίσματα του φυτού ροδιά (*Punica granatum*) από την ποικιλία Wonderful. Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μελετήθηκαν εκχυλίσματα 4 δειγμάτων από το φυτό ροδιά. Στα εκχυλίσματα αυτά έγινε εκτίμηση της ικανότητας αναστολής των ελευθέρων ριζών DPPH, ABTS, OH[•]. Επίσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναγωγής του Fe³⁺ σε Fe²⁺, υπολογίστηκε η αναγωγική δύναμη των 4 εκχυλισμάτων ροδιού. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα των δειγμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]). Σε όλα τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν βρέθηκε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς και αντιγενotoξική. Όμως δύο από τα εκχυλίσματα είχε στατιστικά σημαντική ισχυρότερη δράση από τα υπόλοιπα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική σύσταση (περιεκτικότητα) σε φλαβονοειδή και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Abstract

In recent years, an increasing number of people, started to adopt a different lifestyle, both as a means of prevention of chronic illnesses like cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases (Parkinson, Alzheimer) and as a means of confrontation of premature aging and generally as a means of improvement of their health. The result of this turn to a healthier lifestyle was the creation of the necessity for nutrition with products which apart from their nutrients, they also have beneficial effect in the human health. In many researches it has been suggested that the consumption of fruit and vegetables reduces the frequency of the presence of the aforementioned diseases. A reason for this beneficial effect seems to be the existence of natural bioactive molecules in the vegetables' fibers. It's the plant polyphenols, one category of such molecules with very important biological qualities have been ascribed. The most important of these qualities is their ability to eradicate free radicals, which means that they act as antioxidant and chemoprotective factors, protecting the organism from the consequences of oxidative stress. Along these lines, the pomegranate has won a general interest because of its polyphenolic content, to which its antioxidant and chemoprotective action has been attributed. The aim of the present research was the evaluation of the antioxidant and chemoprotective action of the extracts of the pomegranate tree (*Punica granatum*) from the variety Wonderful. In the current research extracts of 4 samples of the pomegranate tree have been investigated. In these extracts an assessment of the ability of inhibition of the free radicals DPPH, ABTS^{•+}, OH[•] was carried out. Also, through the definition of the ability of the reduction of Fe³⁺ into Fe²⁺, the reductive power of 4 extracts of the pomegranate was calculated. Finally, the ability of the samples to protect the DNA from the creation of monoclonal fragments was tested, which are attributed to the action of free radicals and particularly of the radicals of peroxy (ROO[•]). In all four extracts under study we found a strong antioxidant activity. Nevertheless, two of the extracts displayed higher antioxidant activity as well as antigenotoxic activity, probably due to a different antioxidant composition.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Ελεύθερες ρίζες	14
1.2 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.....	15
1.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών.....	16
1.4 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	19
1.5 Οξειδωτικό στρες	20
1.5.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.....	21
1.6 Φυτικές πολυφαινόλες.....	23
1.6.1 Ταξινόμηση και πηγές φυτικών πολυφαινολών	24
1.6.2 Φλαβονοειδή.....	25
1.6.3 Φαινολικά οξέα	26
1.6.4 Στιλβένια και Λιγνάνια.....	27
1.6.5 Τανίνες.....	27
1.6.6 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών.....	28
1.6.7 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών.....	29
1.7 Ροδιά.....	30
1.7.1 Θρεπτικά συστατικά και φυτοχημικές ιδιότητες.....	31
1.7.2 Πολυφαινολική σύσταση του χυμού ροδιού	32
1.7.3 Οφέλη για την υγεία	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
3.1 Εκχυλίσματα.....	35
3.2 Μέθοδοι.....	36
3.2.1 Αρχή μεθόδου DPPH.....	37

3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS ^{•+}	38
3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης (Reducing Power)	39
3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH [•]	40
3.2.5 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA – μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA.....	41
3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	44
3.4 Στατιστική ανάλυση	45
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1 Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς	46
4.2 Αποτελέσματα ABTS ^{•+} εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς	46
4.3 Αποτελέσματα Hydroxyl Radical εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς.....	47
4.4 Αποτελέσματα Reducing Power εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς.....	48
4.5 Αποτελέσματα από την Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO [•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.	49
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Ελεύθερες ρίζες	14
Εικόνα 2: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών ROS.....	15
Εικόνα 3: Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS).....	16
Εικόνα 4: Επίδραση των ελεύθερων ριζών στα βιομόρια	18
Εικόνα 5: Δράση αντιοξειδωτικών μορίων.....	19
Εικόνα 6: Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους.....	20
Εικόνα 7: οξειδωτικό στρες	21
Εικόνα 8: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.....	22
Εικόνα 9: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια.....	22
Εικόνα 10: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων	24

Εικόνα 11: :Το εσωτερικό μέρος του ροδιού.....	30
Εικόνα 12: ποικιλία wonderful	31
Εικόνα 13: Η πρέσα και η διαδικασία εκχύμωσης	36
Εικόνα 14: Η αναγωγή του DPPH.....	37
Εικόνα 15: Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂	38
Εικόνα 16: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS•+.....	39
Εικόνα 17: ABTS Ο αποχρωματισμός είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού	39
Εικόνα 18: Reducing power.....	40
Εικόνα 19: Hydroxyl radical.....	41
<i>Εικόνα 20: Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA</i>	<i>43</i>
<i>Εικόνα 21: Πήκτωμα αγαρόζης.....</i>	<i>43</i>
Εικόνα 22: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ροδιού μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ± SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p <0,05).	46
Εικόνα 23: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•+. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ± SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p <0,05)......	47
Εικόνα 24: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας Hydroxyl Radical. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ± SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p <0,05).....	48
Εικόνα 25: Μέτρηση αναγωγικής δυναμικής των εκχυλισμάτων ροδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ± SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p <0,05).	49
Εικόνα 26: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC ₅₀ και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p <0,05).	50

Εικόνα 27: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 1 με IC50:0,57 μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).....	50
Εικόνα 28: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 2 με IC50:0,44 μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).....	51
Εικόνα 29: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 3 με IC50:0,76μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).....	51
Εικόνα 30: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 4 με IC50:0,51μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).....	52
Εικόνα 31: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 1. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 1, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	52
Εικόνα 32: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 2. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 2, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	53
Εικόνα 33: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 3. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 3, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....	53
Εικόνα 34: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 4. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την	

προστατευτική δράση του δείγματος 4, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.....54

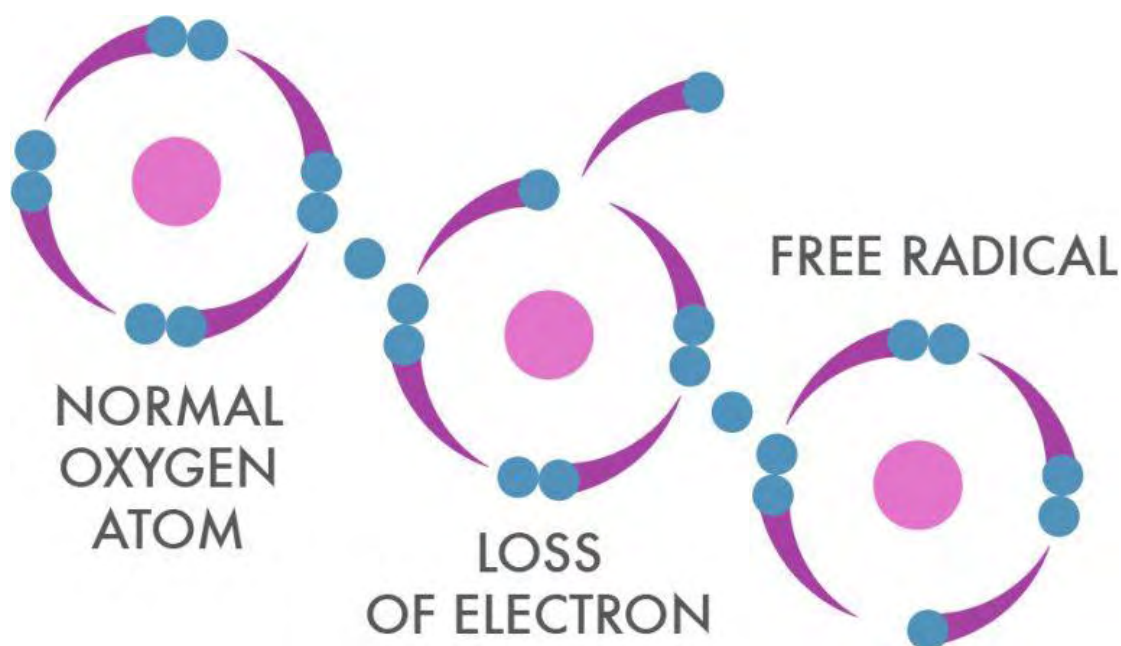
Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων	69
Πίνακας 2: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.....	69
Πίνακας 3: σειράς προσθήκης διαλυμάτων	71
Πίνακας 4: προσθήκης διαλυμάτων καμπύλη ουσίας.....	71
Πίνακας 5: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος REDUCING POWER).....	73
Πίνακας 6: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων αυτή	74
Πίνακας 7: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων	77

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες ορίζονται όπως φαίνεται παρακάτω και στην εικόνα 1 ως μόρια ή άτομα που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα σθένους (Halliwell B και Gutteridge, 1990), και μπορεί να δημιουργηθούν είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή τους στιβάδα (Mylonas C και Kouretas D, 1999). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια πράγμα που έχει ως συνέπεια να επηρεάσουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού (Lobo V *et al*, 2010). Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta J *et al*, 2004) , το θείο ή τον άνθρακα (Battin TJ *et al*, 2009).

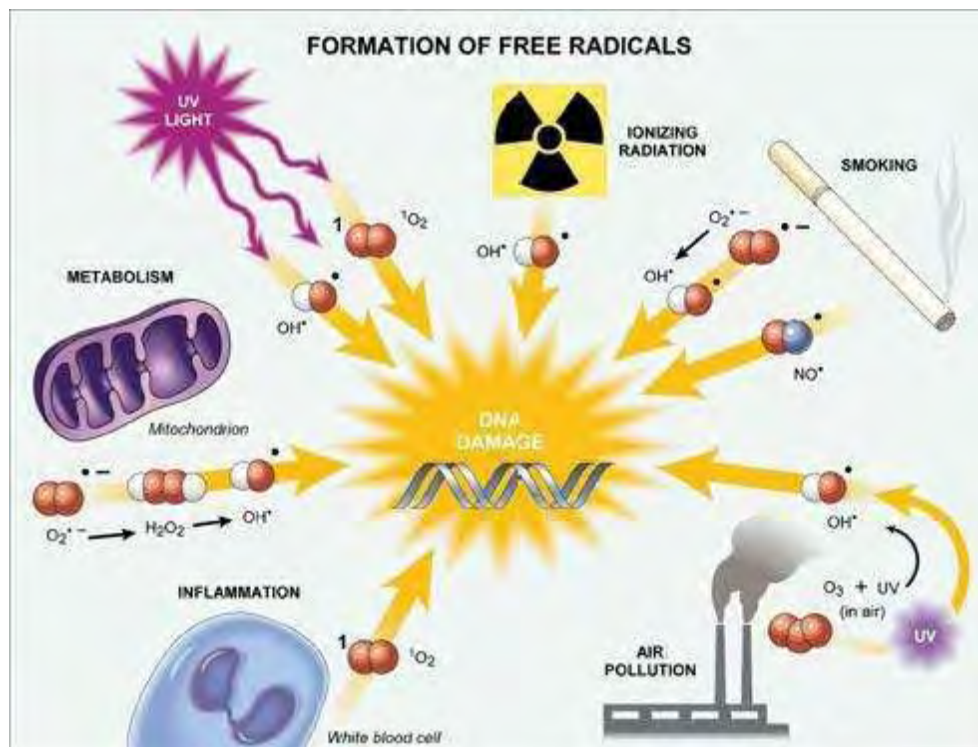


Εικόνα 1: Ελεύθερες ρίζες

(πηγή: <https://envymedical.com/skin-concerns/oxidative-stress/>)

1.2 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε βιολογικά συστήματα κατά τις αντιδράσεις στην αναπνευστική αλυσίδα, από προ-οξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ιοντίζουσα ακτινοβολία, την φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα (Halliwell *et al*, 2015). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ώστε να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αποτελούν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.

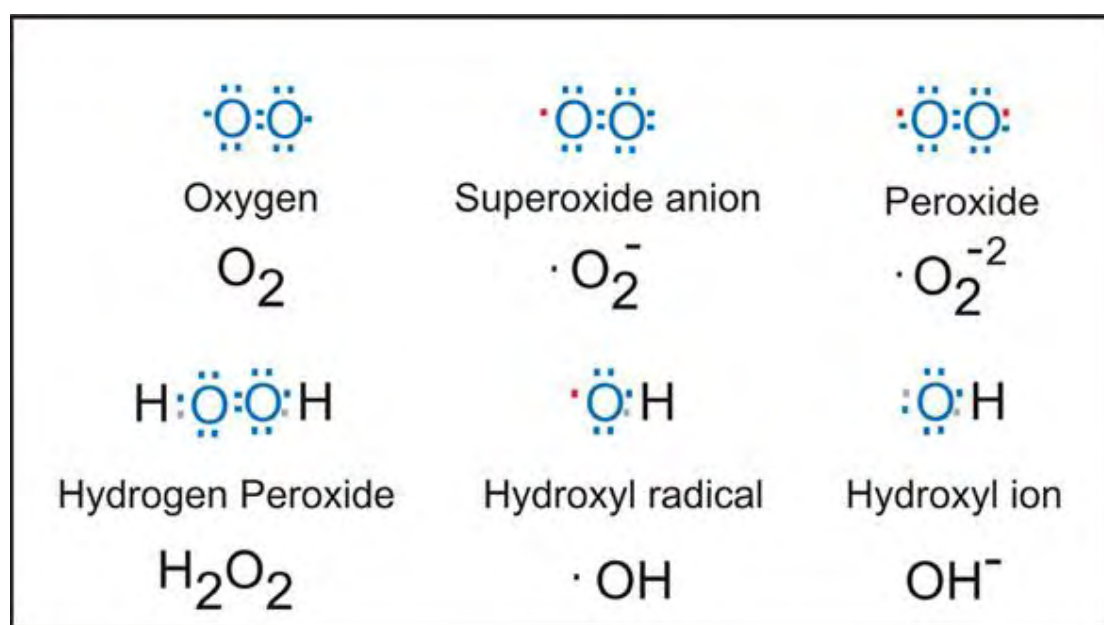


Εικόνα 2: Σχηματισμός ελεύθερων ριζών ROS

(πηγή: Pharmacogn Rev. 2010 Jul-Dec; 4(8): 118–126.)

Παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), του σουπεροξειδίου ($\text{O}\bullet_2^-$), του μονοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$), του αλκοξυλίου ($\bullet\text{RO}$), του υδροπεροξυλίου ($\text{HO}_2\bullet$), του τριχλωρομεθυλίου ($\bullet\text{CCl}_3$) και οι θειούχες ρίζες ($\bullet\text{RS}$). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών, εκείνες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Με τον όρο δραστικές

μορφές οξυγόνου αναφερόμαστε στις ενώσεις αυτές που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Halliwell *et al*, 1990). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) .



Εικόνα 3: Δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS)

(πηγή: <https://www.biotech.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>)

1.3 Επιδράσεις ελεύθερων ριζών

Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Mylonas C και Kouretas D, 1999). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση ή οποία προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Reid, 2002). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές παίζουν τον ρόλο

σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων. Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης (Valko *et al*, 2006).

Αρνητικές

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να έχει και αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό, για την ακρίβεια, η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη μυϊκή καταστροφή και την κόπωση όπως έχει δείχτεί σε αρκετές έρευνες. (Nikolaides *et al*, 2008). Προηγούμενες μελέτες άλλωστε έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O₂) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin *et al*, 1990). Μία ακόμα αρνητική επίδραση είναι η οξείδωση από τις ελεύθερες ρίζες διαφόρων βιομορίων όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, των πρωτεϊνών και του DNA. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell *et al*, 1990).

Λιπίδια

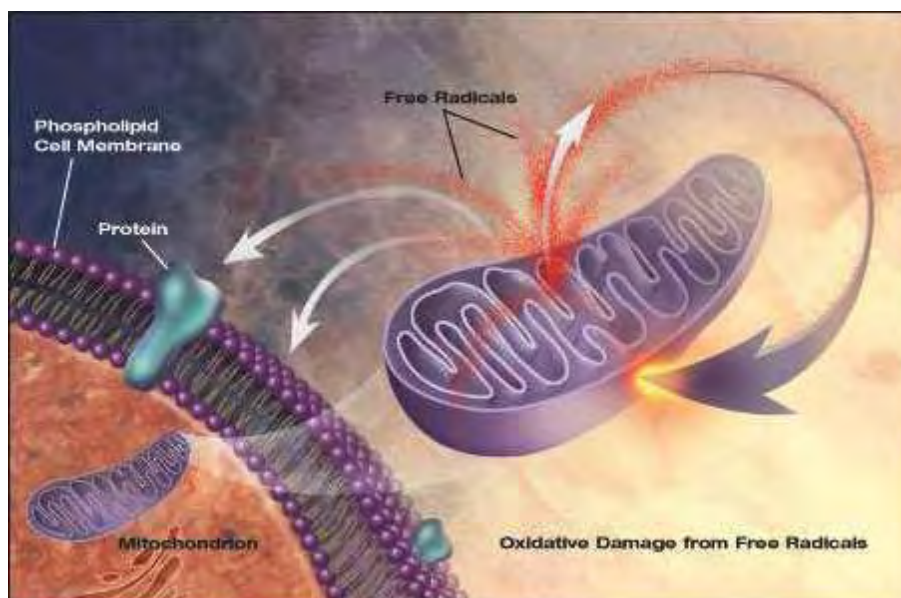
Όσον αφορά στα λιπίδια, πρόκειται για βιομόρια ευαίσθητα σε οξείδωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια, όπου μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου •ROO, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεϋδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young *et al*, 2005).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine *et al*, 2002) .

DNA

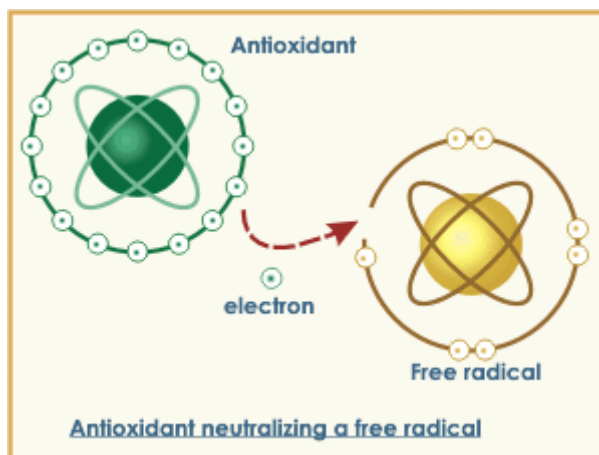
Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών και πυριμιδινών, ζημιά στην εξόζη (D-ριβόζη) αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε καρκινογένεση (Radak *et al*, 1999).



Εικόνα 4: Επίδραση των ελεύθερων ριζών στα βιομόρια

1.4 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

<Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος> (Halliwell B, 2001). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Scalbert *et al.*, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Δράση αντιοξειδωτικών μορίων

(Πηγή: <http://kayjayr-akshay.blogspot.com/2016/11/free-radicals-ii.html>)

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες.

- 1) Στους ενζυμικούς στους οποίους ανήκουν κατά κύριο λόγο τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία δρουν μετατρέποντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).
- 2) Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς στους οποίους περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E, οι πολυφαινόλες που

υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q10.

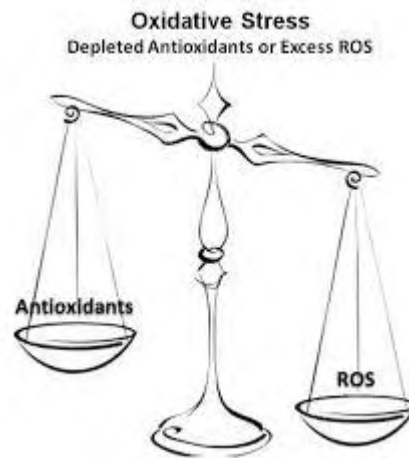
Αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους	
Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (Mn, Cu, Zn)	Απομακρύνει τη $O_2^{\bullet -}$
Καταλάση (Fe)	Απομακρύνει το H_2O_2 (σε υψηλές συγκεντρώσεις)
Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Se)	Απομακρύνει τα υδροϋπεροξειδία και το H_2O_2 (σε χαμηλές συγκεντρώσεις)
Αναγωγή της Γλουταθειόνης	Ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη
Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης	Απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Οξειδάση του Κυτοχρώματος (Cu)	Παράγει O_2 στην αναπνευστική αλυσίδα
Γλουταθειόνη	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες απομακρύνει τα ξενοβιοτικά
Ουρικό οξύ	Αδρανοποιεί τη ROO^{\bullet} και τη OH^{\bullet}
Αλβουμίνη	Δεσμεύει Cu, αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες (HClO)
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	Αδρανοποιεί τη OH^{\bullet}
Βιταμίνη E (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες)	Διασπάει τις αλυσίδες των ελευθέρων ριζών
β-Καροτένιο	Αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες
Ουβικινόλη	Παράγει O_2 στην αναπνευστική αλυσίδα
Ουβικινόνη (Συνένζυμο Q)	Συμμετέχει στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας
Χολερυθρίνη	Αδρανοποιεί τη ROO^{\bullet}
Τρανσφερίνη	Δεσμεύει τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+})
Λακτοφερίνη	Δεσμεύει τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) σε μικρότερο pH

Εικόνα 6: Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά και οι λειτουργίες τους

1.5 Οξειδωτικό στρες

Με τον όρο οξειδωτικό στρες εννοούμε την διαταραχή που δημιουργείται ανάμεσα στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία υπέρ της πρώτης, οδηγώντας σε πιθανή βλάβη (εικόνα 7), (Scalbert *et al*, 2005). Αφορά την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ τόσο της παραγωγής ελευθέρων ριζών όσο και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, με αποτέλεσμα είτε να υπάρχει πλεόνασμα ελευθέρων ριζών είτε να υπάρχει μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, πχ του μηχανισμού της γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Η σοβαρότητα των προβλημάτων από το οξειδωτικό στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών που προκαλούνται. Τα κύτταρα είναι ικανά να ανακτήσουν την αρχική τους κατάσταση μετά από μικρή οξειδωτική βλάβη. Μια πιο εκτενής βλάβη μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία του

προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είτε με κυτταρική νέκρωση (Espinoza *et al*, 2015).



Εικόνα 7: οξειδωτικό στρες

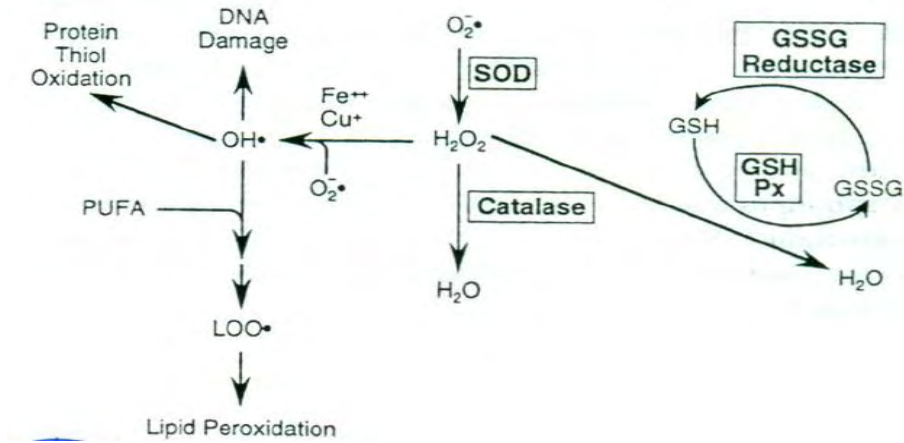
(πηγή: <https://www.horsehealthproducts.com/horsemans-report/performance/what-is-oxidative-stress>)

1.5.1 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

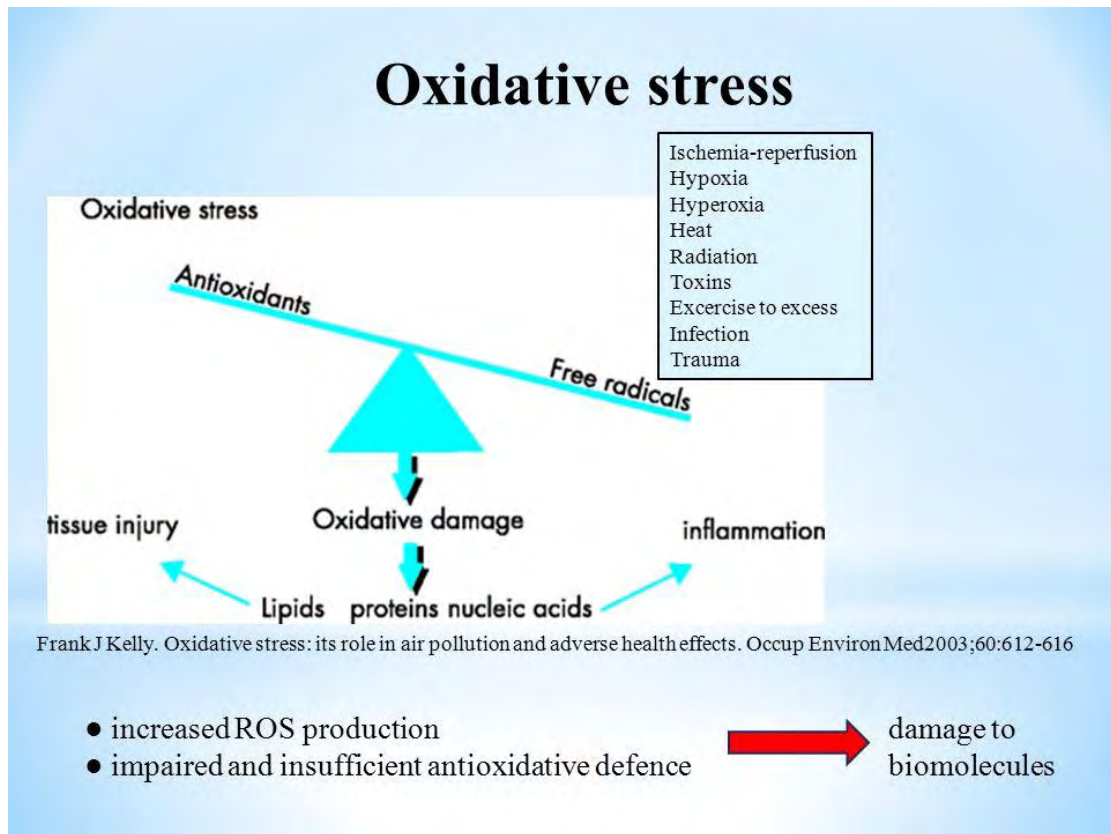
Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει άμεσα τόσο το DNA, όσο και τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Αυτή η κατάσταση είναι πολύ επικίνδυνη για τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσει σε πολλές διαταραχές της ομαλής λειτουργίας του. Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι συμβάλλει σε πάρα πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες (Lobo *et al*, 2010).

- Επίδραση στον εγκέφαλο (ασθένεια Alzheimer, νόσο του Πάρκινσον, μυϊκή δυστροφία)
- Επίδραση στην όραση (καταρράκτης)
- Επίδραση στο καρδιαγγειακό (Καρδιακή προσβολή, αγγειίτιδα)
- Επίδραση στα νεφρά (σπειραματονεφρίτιδα)
- Επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα (ερυθηματώδη λύκο)
- Καρκίνο
- Γαστρικά έλκη
- Προβλήματα με τις αρθρώσεις

Στις δύο εικόνες που ακολουθούν φαίνεται ο τρόπος επίδρασης του οξειδωτικού στρες στα βιομόρια (εικόνες 8 και 9).



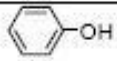

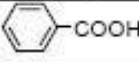
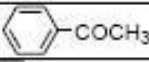
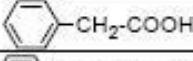
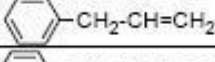
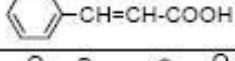
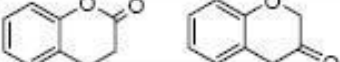
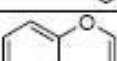
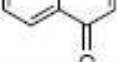
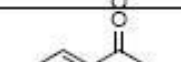
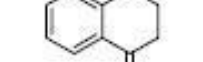
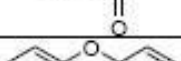
Εικόνα 8: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια



Εικόνα 9: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

1.6 Φυτικές πολυφαινόλες

Η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά, είναι οι πολυφαινόλες. Συναντώνται κυρίως στα φρούτα, τους σπόρους και τα φύλλα (Ding Y *et al*, 2013). Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, οι οποίοι συμβάλουν στην άμυνα από την υπεριώδη ακτινοβολία καθώς και από επιθέσεις προερχόμενες από παθογόνους παράγοντες. Οι πολυφαινόλες μέσα στις τροφές επιδρούν στη στυφότητα, την οσμή, τη γεύση, το χρώμα και την οξειδωτική σταθερότητα (Pandey *et al* 2009). Οι ιδιαίτερες χημικές τους δομές προέρχονται από σύμπλοκα περισσότερων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων (Korkina *et al*, 2009), και βοηθούν σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών και βιολογικών δράσεων (Giovinazzo *et al*, 2015).

Απλές φαινόλες		Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, συριγγικό, βανιλλικό (αλδεύδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνά στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοϊδή		
(Υδροξυ)κινναμωμικά οξέα		Φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στιλβένια		
Ανθρακινόνες		Εμοδίνη κλπ
Φλαβονοϊδή		
Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες		

Εικόνα 10: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

1.6.1 Ταξινόμηση και πηγές φυτικών πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως κατανομημένες 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 *et al*, 1986). 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.

1.6.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η σημαντικότερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 13 υποκατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν περισσότερες από 5000 ενώσεις (Harborne *et al*, 2017). Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί (βενζοϊκοί) δακτύλιοι (Α και Β), οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6). Οι κυριότερες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες. Τα φλαβονοειδή στα φυτά βρίσκονται στα φύλλα, στους σπόρους, στον φλοιό και στα άνθη. Παρέχουν σε αυτά προστασία από την υπερϊώδη ακτινοβολία, από παθογόνους παράγοντες (μύκητες και βακτήρια) και από φυτοφάγα ζώα (Afaq *et al*, 2005).

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 καμπερόλη, περιέχονται στον φλοιό (περικάρπιο) 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). 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, 2007). 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 (Yoshino et al, 1999).

1.6.3 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. 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) (Poyrazoğlu et al, 2002) όσο και υδροξυβενζοϊκά οξέα (κυρίως γαλλικό αλλά και ελλαγικό οξύ) (Amakura et al, 2000).

1.6.4 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 άγχους (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. Στην ρεσβερατρόλη αποδίδεται αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνος δράση και θεωρείται ένας καλός χημειοπροστατευτικός, έναντι του καρκίνου, παράγοντας (Bhat et al, 2002).

Τα λιγνάνια, μια ακόμη κατηγορία πολυφαινολών η οποία απαντάται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου, σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. 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).

1.6.5 Τανίνες

Οι τανίνες χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμυκνωμένες τανίνες. Μια τρίτη κατηγορία τανινών, οι φλωροτανίνες βρίσκονται στα καφέ θαλάσσια άλγη, και δεν αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διαίτας (Ragan et al 1980). Οι υδρολυόμενες τανίνες αποτελούν κύρια παράγωγα του ελλαγικού οξέος (ελλαγιτανίνες) και του γαλλικού οξέος (γαλλοτανίνες) (Seeram et al, 2005). 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 2005). Οι συμυκνωμένες 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, 2004).

1.6.6 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

Για να κατανοήσουμε, τις επιδράσεις των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, πρέπει να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφούνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα (Celik et al, 2009). Η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1g ανά ημέρα. Τα 2/3 αυτής της ημερήσιας πρόσληψης είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα. Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert et al, 2000). Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές με τη μορφή γλυκοσιδίων ή πολυμερών είναι αρκετά υδρόφιλες για να απορροφηθούν με παθητική διάχυση από το έντερο και έτσι πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο (Hollman et al, 1997). Οι πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών όπως οι προκυανιδίνες (ανήκουν στα φλαβονοειδή) απορροφούνται σε μικρό βαθμό όπου η βιολογική δράση τους περιορίζεται στην περιοχή του εντέρου. Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θειικές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ και η προσθήκη αυτών των ομάδων καταλύεται από θειοτρανσφεράσες, μεθυλοτρανσφεράσες, και από γλυκουρονικές τρανσφεράσες αντίστοιχα (Manach et al 2004). Η προσθήκη αυτή συμβαίνει σε όλες τις ξενοβιοτικές ουσίες με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η απέκκριση τους είτε μέσω

της χολής είτε με τα ούρα. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των πολυφαινολών στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και δέκα μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Manach et al, 2005), (Lee et al, 1999), (Davidson et al, 2009), (Torres et al, 2002). Επίσης, υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωοθήκες) (Chang et al, 2001) (Wang et al, 1999). Επιπλέον, μπορεί στο πλάσμα να υπερτερούν οι αγλυκονικές μορφές των πολυφαινολών και στους ιστούς οι γλυκοσιδικές ή το αντίστροφο ενώ μπορεί να εμφανίζονται στους ιστούς και διαφορετικοί μεταβολίτες λόγω του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού (Hong et al, 2008).

1.6.7 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών

Η εξάπλωση των πολυφαινολών στα φυτά οφείλεται στις πολλές και ποικίλες ιδιότητές τους. Συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασής του φυτού απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα. Επίσης, Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach et al, 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach et al, 2004), (Di Carlo et al, 1999).

1.7 Ροδιά

Το ρόδι με τη βοτανική ονομασία *Punica granatum*, είναι ένα φρούτο που προέρχεται από φυλλοβόλους θάμνους ή από μικρό δέντρο που έχει ύψος μεταξύ 5 και 8 μέτρων. Στο Βόρειο ημισφαίριο, ο καρπός παράγεται συνήθως την περίοδο από τον Σεπτέμβριο μέχρι τον Φεβρουάριο (Lague et al, 1974), και στο νότιο ημισφαίριο από Μάρτιο έως Μάιο. Το ρόδι θεωρείται ότι προέρχεται από την περιοχή του Ιράν και τη βόρεια Ινδία, και έχει καλλιεργηθεί από τους αρχαίους χρόνους. Αναφέρεται σε πολλά αρχαία κείμενα, κυρίως εισήχθη στην Λατινική Αμερική και την Καλιφόρνια από τους Ισπανούς αποίκους στο 1769. Σήμερα, καλλιεργείται ευρέως σε όλη την περιοχή της Μεσογείου, της νότιας Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και της περιοχής του Καυκάσου, τη Βόρεια Αφρική και την τροπική Αφρική, την Ινδική Χερσόνησο, την Κεντρική Ασία, και τα ξηρότερα μέρη της νοτιοανατολικής Ασίας (Morton et al, 1987). Τα τελευταία χρόνια, φαίνεται πως έχει γίνει πιο κοινή στις εμπορικές αγορές της Ευρώπης και του δυτικού κόσμου.



Εικόνα 11: :Το εσωτερικό μέρος του ροδιού

(πηγή: <https://emvolos.gr/petros/wp-content/uploads/2017/10/%CF%81%CF%8C%CE%B4%CE%B9.jpg>)

Η ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η ποικιλία Wonderful. Είναι η πιο ευρέως καλλιεργούμενη ποικιλία στις ΗΠΑ. Τα τελευταία χρόνια, φυτεύσεις ροδιάς στην Ελλάδα έγιναν χρησιμοποιώντας κυρίως αυτή την ποικιλία. Στη Β. Ελλάδα συγκομίζεται το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου. Πιθανώς περιοχές της Β. Ελλάδας να μην είναι οι πλέον κατάλληλες για την καλλιέργειά της αφού μπορεί οι καρποί να αντιμετωπίζουν προβλήματα σχισίματος ή και μετασυλλεκτικών σήσεων εξαιτίας χαμηλών θερμοκρασιών και βροχοπτώσεων κατά τη συγκομιδή(Οκτώβριο- Νοέμβριο). Αναφέρεται πως αυτή η

ροδιά έχει μικρή προς μέτρια απόδοση/στρέμμα, που συνήθως δεν είναι μεγαλύτερη από 1,8 τόνους/στρέμμα, όμως Ισραηλινοί γεωπόνοι υποστηρίζουν πως συγκομίζουν περί τους 4 τόνους/στρέμμα. Η εξωτερική εμφάνιση του καρπού και των σπόρων είναι πολύ ελκυστική. Έχει μεγάλο μέγεθος καρπού, ομοιόμορφο κόκκινο χρώμα φλοιού, βαθύ κόκκινο χρώμα σπόρων, ημίσκληρα σπέρματα και γλυκόξινη γεύση.



Εικόνα 12: ποικιλία wonderful

1.7.1 θρεπτικά συστατικά και φυτοχημικές ιδιότητες

Μια μερίδα 100g των καρπών ροδιού παρέχουν 12% της προτεινόμενης ημερήσιας πρόσληψης (DV) για τη βιταμίνη C και 16% της προτεινόμενης ημερήσιας πρόσληψης για τη βιταμίνη K. Περιέχει πολυφαινόλες, όπως ελλαγιταννίνες και φλαβονοειδή. Οι καρποί ροδιού είναι εξαιρετικές πηγές διαιτητικών ινών, που περιέχονται εξ ολοκλήρου στους βρώσιμους σπόρους. Οι άνθρωποι που επιλέγουν να απορρίψουν τους σπόρους χάνουν θρεπτικά οφέλη από τις ίνες των σπόρων και ιχνοστοιχεία. Τα λίπη του ροδιού περιέχουν πουννικό οξύ (65,3%), παλμιτικό οξύ (4,8%), στεατικό οξύ (2,3%), ελαϊκό οξύ (6,3%), και το λινελαϊκό οξύ (6,6%) (Lague et al,1974).

1.7.2 Πολυφαινολική σύσταση του χυμού ροδιού

Η μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολών που βρίσκονται στον χυμό του ροδιού είναι οι υδρολύσιμες τανίνες που ονομάζεται ellagitannins και σχηματίζονται όταν το ελλαγικό οξύ συνδέεται με υδατάνθρακες. Οι διαφορετικές ελλαγιταννίνες του ροδιού είναι οι granatin A και B. Το κόκκινο χρώμα του χυμού μπορεί να αποδοθεί στις ανθοκυανίνες. Γενικά, μια αύξηση της μελάγχρωσης του χυμού συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού (Hernandez *et al*, 1999). Το φαινολικό περιεχόμενο του χυμού ροδιού επηρεάζεται αρνητικά από τις τεχνικές επεξεργασίας και παστερίωσης (Alper *et al*, 2005).

1.7.3 Οφέλη για την υγεία

Οι ελλαγιταννίνες του ροδιού, που ονομάζονται επίσης και πουνικαλαγίνες, έχουν μελετηθεί διεξοδικά και έχει βρεθεί ότι έχουν ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών (Kulkarni *et al*, 2007), και έχουν πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες στον άνθρωπο και συγκεκριμένα στην θανάτωση καρκινικών κυττάρων (Heber *et al*, 2008).

Κατά τη διάρκεια του εντερικού μεταβολισμού οι ελλαγιταννίνες και πουνικαλαγίνες μετατρέπονται από βακτήρια της εντερικής χλωρίδας σε ουρολιθίνες. Σε μελέτες αποδεικνύεται ότι οι ενδιάμεσοι αυτοί μεταβολίτες του ροδιού έχουν αντιοξειδωτική δράση σε κυτταρικές σειρές (Dobroslawa *et al*, 2008).

Μεγάλο πεδίο έρευνας αποτελεί η διερεύνηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των παραγώγων του ροδιού καθώς και του ίδιου του φρούτου. Φαίνεται ότι η κατανάλωση του ροδιού έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Σε ζωικά μοντέλα και κυτταρικές σειρές φαίνεται ότι η επίδραση που έχουν οι χημικές ουσίες που περιέχονται στο ρόδο αναστέλλουν την καρκινογένεση δερματικών κυττάρων προστατικών κυττάρων και γενικά εμφανίζουν αντικαρκινική δράση (Afaq *et al*, 2005), (Lansky *et al*, 2005), (Lansky *et al*, 2006), (Syed *et al*, 2007), (Hong *et al*, 2008), (Hamad *et al*, 2009).

Σε άλλη εργαστηριακή έρευνα, ο χυμός του ροδιού αποδείχτηκε ότι μπορεί να είναι αποτελεσματικός στη μείωση των παραγόντων κινδύνου καρδιακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης της LDL, την παραγωγή ελευθέρων ριζών από

μακροφάγα και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Seeram *et al*, 2005). Σε άλλη μελέτη που αφορούσε ασθενείς με υπέρταση, η κατανάλωση χυμού ροδιού για δύο εβδομάδες κατάφερε να μειώσει τη συστολική πίεση του αίματος αναστέλλοντας το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης I στο πλάσμα (Aviram *et al*, 2001).

Επιπλέον, σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε ότι η θεραπεία του καρκίνου του προστάτη LAPC4 με 10 μg/mL εκχύλισμα ροδιού, που παρασκευάζεται από το φλοιό και τα επισπέρμια (εκτός των σπερμάτων με τυποποιημένο περιεχόμενο ελλαγιτανινών στο οποίο περιέχονται 37% πουνικαλαγγινες), είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (Koyama *et al*, 2010).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το έλαιο από τα σπέρματα του ροδιού και οι πολυφαινόλες, που έχουν υποστεί ζύμωση, καθυστερούν την οξείδωση και τη σύνθεση των προσταγλανδινών αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και προώθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Arshi *et al*, 2006). Πολλές εταιρίες τροφίμων χρησιμοποιούν τα φαινολικά εκχυλίσματα ροδιού ως πρόσθετα συστατικά στα προϊόντα τους, αντί να χρησιμοποιήσουν χυμό ροδιού αφού έχει αποδειχθεί η δραστηριότητα και τα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία για κάθε ένα από αυτά.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και η εκτίμηση, της αντιοξειδωτικής και αντιγενοτοξικής δράσης, σε δείγματα των προϊόντων των σταδίων βιομηχανικής παραγωγής χυμού, από καρπούς του φυτού *Punica Granatum* (Ροδιά). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 4 εκχυλίσματα ροδιού από τον καρπό της ποικιλίας Wonderful.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν τεχνητές ρίζες (DPPH, ABTS^{•+}) όσο και φυσιολογικές ρίζες (Hydroxyl radical) αλλά και μέσω της ικανότητάς τους να ανάγουν τον σίδηρο (reducing power).

Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η αντιγενοτοξική δράση των δειγμάτων έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.

Επιπλέον θα θέλαμε να αναδείξουμε το χυμό ρόδι ως προς τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες σαν βιολειτουργικό σκεύασμα, σαν προϊόν που βοηθά στην υγεία των ανθρώπων και να ελέγξουμε την ύπαρξη ισχυρής δράσης αυτών των αντιοξειδωτικών ουσιών και στο κλίμα αλλά και τις συνθήκες καλλιέργειας της Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στους Γόμφους-Τρικάλων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα προέρχονται από ένα Κτήμα το οποίο βρίσκεται στους Γόμφους Τρικάλων. Όλα τα εκχυλίσματα προέρχονται από το φυτό ροδιά. Τα 4 εκχυλίσματα ροδιού προέρχονται από τον την σύνθλιψη ολόκληρου του καρπού της ποικιλίας wonderful. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν τις ημερομηνίες 15-20/10/2018. Η συλλογή στο σύνολο της πραγματοποιήθηκε υπό ιδανικές για την εποχή αλλά και τη συγκεκριμένη καλλιεργητική εργασία συνθήκες. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 8 έως 10°C και υπήρχε ηλιοφάνεια. Η αποθήκευση των δειγμάτων έγινε σε ψυγεία και σε θερμοκρασία 2° C . Στη συνέχεια έγινε διαλογή και τα ρόδια τοποθετήθηκαν σε πλαστική κωνική λεκάνη στην οποία ξεπλένονται οι καρποί για να είναι καθαροί από τυχόν σκόνες αλλά και να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει κάποιο έντομο το οποίο πιθανόν να δημιουργήσει προσβολή κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης διαδικασίας. Μετά το στάδιο της πλύσης, επιλέγονται τυχαία κάθε φορά μικρός αριθμός καρπών οι οποίοι κόβονται σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετούνται μέσα στην πρέσα όπως φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 10 . Στη πρέσα οι καρποί συνθλίβονται και συλλέγεται ο χυμός που προέρχεται από αυτούς. Μετά την πρέσα ο χυμός κατευθύνεται αυτόματα σε μια ανοξειδωτή δεξαμενή, η οποία έχει χωρητικότητα 300 lt. Τέλος, κάθε φορά που η δεξαμενή γεμίζει ο χυμός εμφιαλώνεται σε πλαστικά μπουκάλια των 500 ml και του 1 λίτρου.



Εικόνα 13: Η πρέσα και η διαδικασία εκχύμωσης

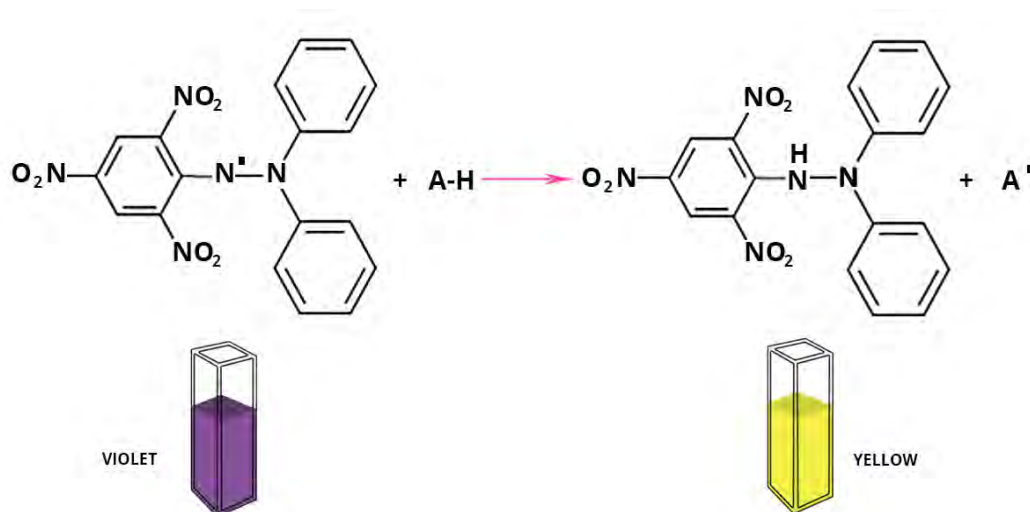
3.2 Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος του ροδιού χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω 5 μέθοδοι.

- 1 Μέθοδος DPPH
- 2 Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+
- 3 Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τον προσδιορισμό αναγωγικής δύναμης (Reducing Power)
- 4 Μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα OH•
- 5 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA – μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA

3.2.1 Αρχή μεθόδου DPPH

Η μέθοδος DPPH ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη 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). 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). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, όπως φαίνεται στην (εικόνα 14), μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

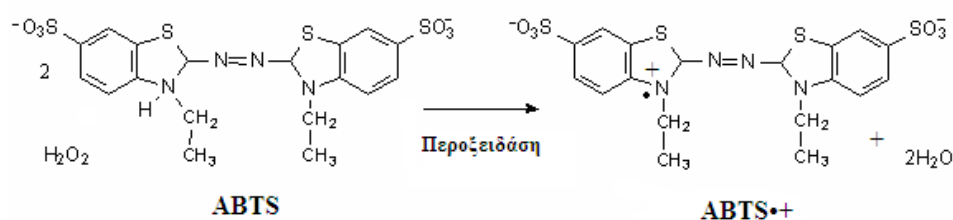


*Εικόνα 14: Η αναγωγή του DPPH
DPPH (Μωβ) → DPPH (κίτρινο)*

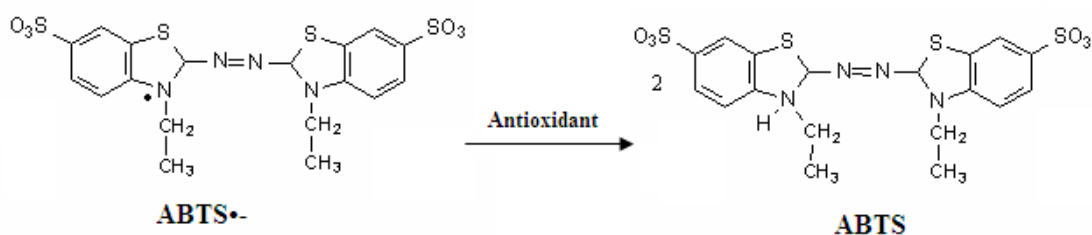
3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας ABTS•+

Αρχή της μεθόδου

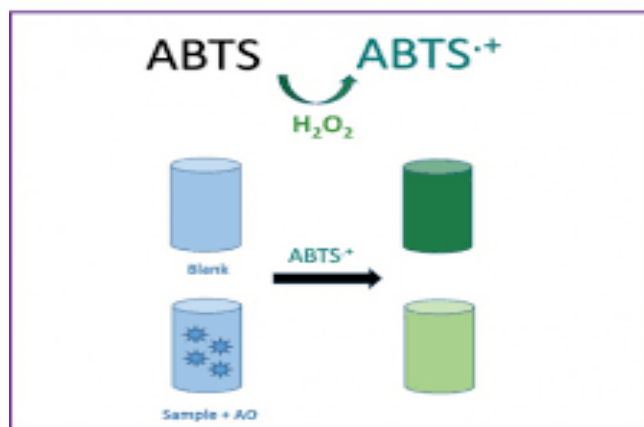
Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans το 1993 (Miller et al, 1993 και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα του ABTS^{•+}. Η ρίζα του ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS⁺) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας (Εικόνα 15) και στην συνέχεια να ακολουθήσει η επώαση με την προς εξέταση ουσία. Η ρίζα του ABTS^{•+} είναι μια ουσία η οποία φέρει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα του ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (Εικόνα 16), με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να μειώνεται και ο αποχρωματισμός να είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (Εικόνα 17) (Prior et al, 2005) (Miller et al, 1993) (Re et al, 1999).



Εικόνα 15: Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂



Εικόνα 16: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS•+



Εικόνα 17: ABTS Ο αποχρωματισμός είναι ανάλογος με την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού

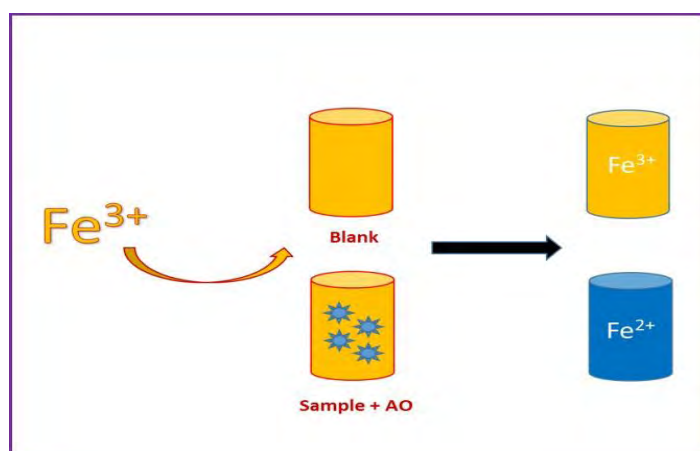
3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης (Reducing Power)

Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγική δύναμη διαφόρων ουσιών προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (Yen & Duh, 1994). Η μέθοδος αυτή σχετίζεται με την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιας ουσίας και μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό

εργαλείο για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων δειγμάτων. Ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δύναμη είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του υπό μελέτη διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε μελετώμενης ουσίας. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe^{+3} /σίδηρο κυανιούχο κάλιο στην ανηγμένη μορφή του σιδήρου (Fe^{+2}). Με τη μέτρηση του σχηματισμού του κυανού χρώματος (Pearl's Prussian blue) στα 700 nm είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ιόντος Fe^{+3} .

Ουσίες με αναγωγική ισχύ αντιδρούν με το σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) (που περιέχει Fe^{+3}) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) (που περιέχει Fe^{+2}), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο και το μετατρέπει σε ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}). Αυτό το προϊόν που σχηματίζεται έχει κυανό χρώμα και φωτομετρείται στα 700 nm (Εικόνα 18). Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί και η συγκέντρωση του ιόντος Fe^{+3} .



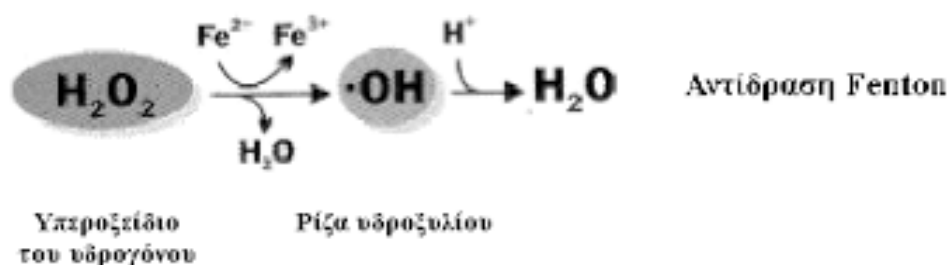
Εικόνα 18: Reducing power

3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $\text{OH}\bullet$

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου ($\text{OH}\bullet$) έγινε με τη μέθοδο του (Chung et al,2009). Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην

παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλοεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2- δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton (Εικόνα 19) και διασπάται σε μαλονδιαλδεΐδη (Gutteridge et al, 1984). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου εκτιμάται ως ο ρυθμός αναστολής της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες υδροξυλίου. Η απορρόφηση μετράται στα 520 nm.



Εικόνα 19: Hydroxyl radical

3.2.5 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA – μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA

Η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιγενοτοξικής δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Για την εκτίμηση αυτής της αντιγενοτοξικής δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες,

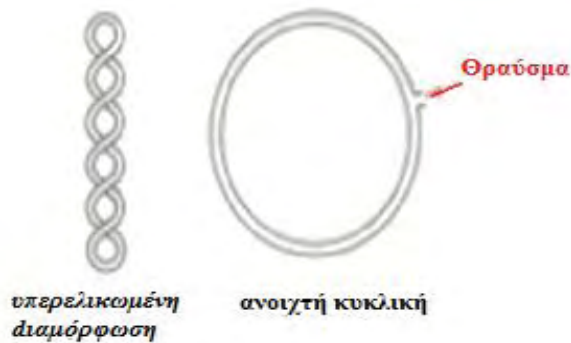
χρησιμοποιήθηκαν δύο in vitro μέθοδοι, και δύο ρίζες αντίστοιχα. Η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) και η ρίζα περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$). Για τον προσδιορισμό της αντιγενοτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τους ζυμομύκητες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες γενετικές οντότητες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα πλασμιδίου, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε δυσμενείς συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA μπορεί να απομονωθεί εύκολα σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε μία γέλη αγαρόζης δημιουργεί κυρίως τρεις διαμορφώσεις.

Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.

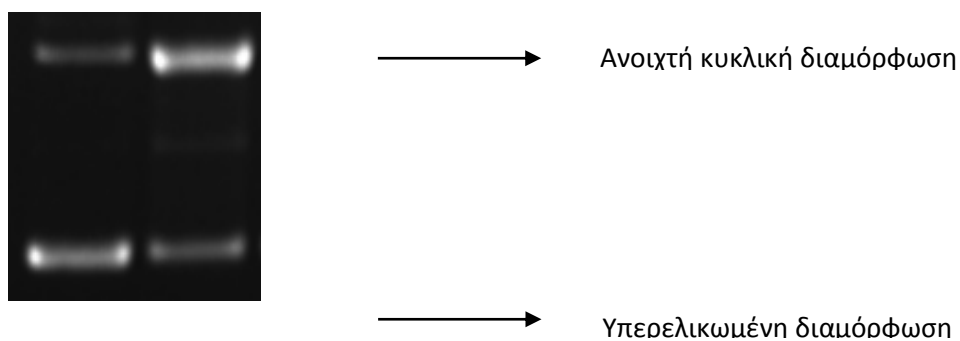
Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.

Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω αναφερόμενες διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα στην πηκτή αγαρόζης. Η ταχύτητα αυτή είναι συνάρτηση του μεγέθους της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 20: Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA



Εικόνα 21: Πήκτωμα αγαρόζης

Εικόνα 20: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. (A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων. Εικόνα 21: 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

3.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

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 τέσσερις επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 (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 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται πολύ απαλά 4-5 φορές. 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 φυγοκέντρωση για 20 min στα 3214 g στους 4°C και στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης 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 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v 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, ένζυμο RNase 10 µg/mL).

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 280 nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 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 νερό H₂O για 30 min. Ακολουθεί φωτογράφιση του πηκτώματος με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Vilber Lourmat DP-001 (Torcy, France) μετά από έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

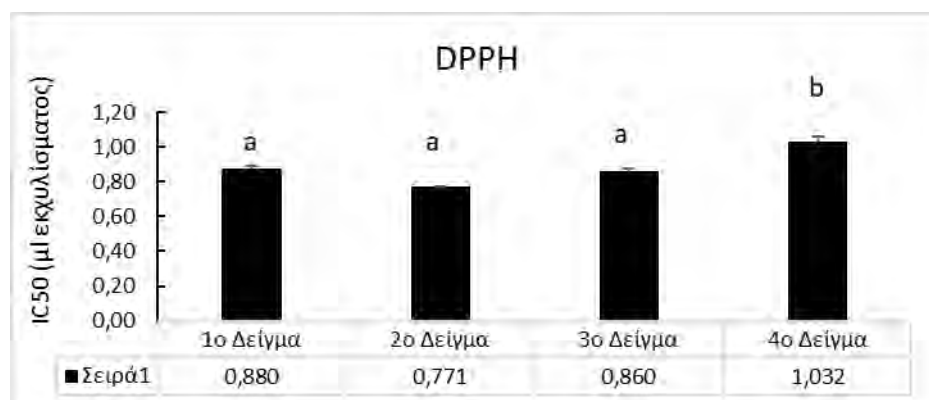
3.4 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) και μέσω μονόδρομης ανάλυσης (One – Way Anova) και το Dunnett test, έγιναν οι συγκρίσεις κατά ζεύγη. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p < 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως \pm standard error of the means (SEM).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα DPPH εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς

Με τη μέθοδο DPPH, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC₅₀, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη τιμή του IC₅₀, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δείγματα 1,2,3 είχαν στατιστικά σημαντική πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με το δείγμα 4, καθώς εμφάνισαν IC₅₀ στα 0,88μl, 0,77μl και 0,86μl εκχυλίσματος αντίστοιχα. Το δείγμα 4 εμφάνισε IC₅₀ στα 1,03μl. Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων 1-2-3 δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

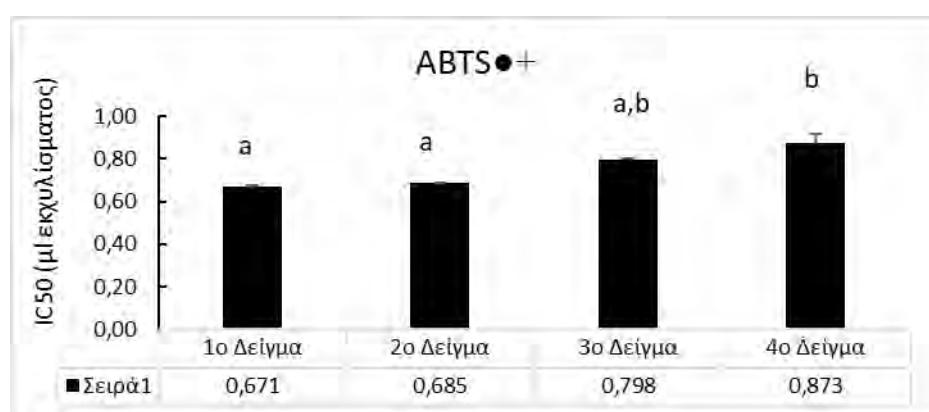


Εικόνα 22: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ροδιού μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές ($n=3$). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.2 Αποτελέσματα ABTS^{•+} εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς

Με τη μέθοδο ABTS^{•+}, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC₅₀, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC₅₀, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα

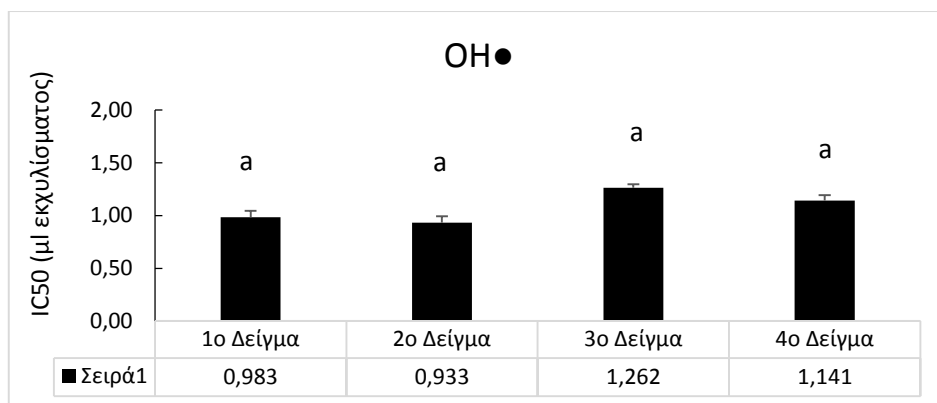
του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δείγματα 1 και 2 είχαν στατιστικά σημαντική πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα δείγματα 3 και 4, καθώς εμφάνισαν IC50 στα 0,67μl, 0,68μl και 0,79μl εκχυλίσματος αντίστοιχα. Το δείγμα 4 εμφάνισε IC50 στα 0,87μl. Επίσης τα δείγματα 3 και 4 δεν φάνηκε να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα.



Εικόνα 23: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS•⁺. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ± SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p < 0,05).

4.3 Αποτελέσματα Hydroxyl Radical εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς

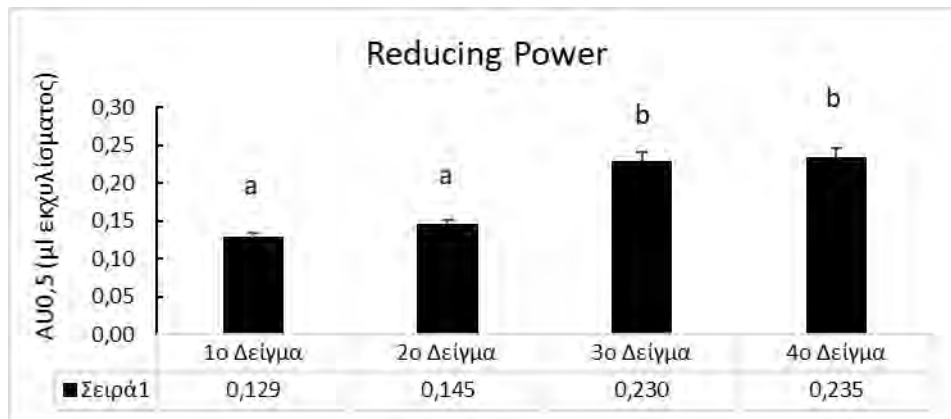
Με τη μέθοδο Hydroxyl Radical, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση της ρίζας στο 50%. Όσο μικρότερη η τιμή του IC50, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δείγματα 1,2,3,4 είχαν ισότιμη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς εμφάνισαν IC50 στα 0,98μl, 0,93 μl, 1,26 μl και 1,14 μl εκχυλίσματος αντίστοιχα. Οι διαφορές μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων, δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 24: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας Hydroxyl Radical. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές ($n=3$). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.4 Αποτελέσματα Reducing Power εκχυλισμάτων φυτών ροδιάς

Με τη μέθοδο Reducing Power, μετρήθηκε η αναγωγική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική αναγωγική δύναμη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μείωση της οπτικής απορρόφησης 0,5 (AU 0,5). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δείγματα 1,2 είχαν στατιστικά σημαντική πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα δείγματα 3,4, καθώς εμφάνισαν (0.5) ίσο με 0,12μl και 0,14μl εκχυλίσματος αντίστοιχα. Τα δείγματα 3,4 εμφάνισαν (0.5) ίσο με 0,230μl και 0,235μl αντίστοιχα. Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων 1-2 και των δειγμάτων 3-4, είναι στατιστικά σημαντικές. Μεταξύ των δειγμάτων 1 και 2 δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά το ίδιο και μεταξύ των δειγμάτων 3 και 4.

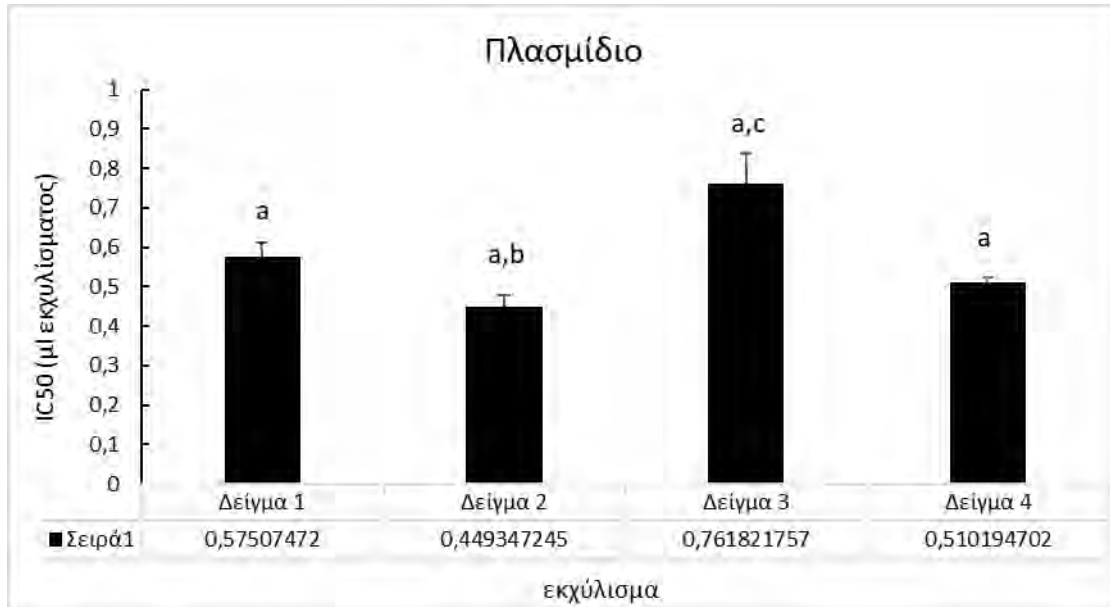


Εικόνα 25: Μέτρηση αναγωγικής δυναμικής των εκχυλισμάτων ροδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως \pm SEM. Τα πειράματα έγιναν τρεις φορές ($n=3$). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.5 Αποτελέσματα από την Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA.

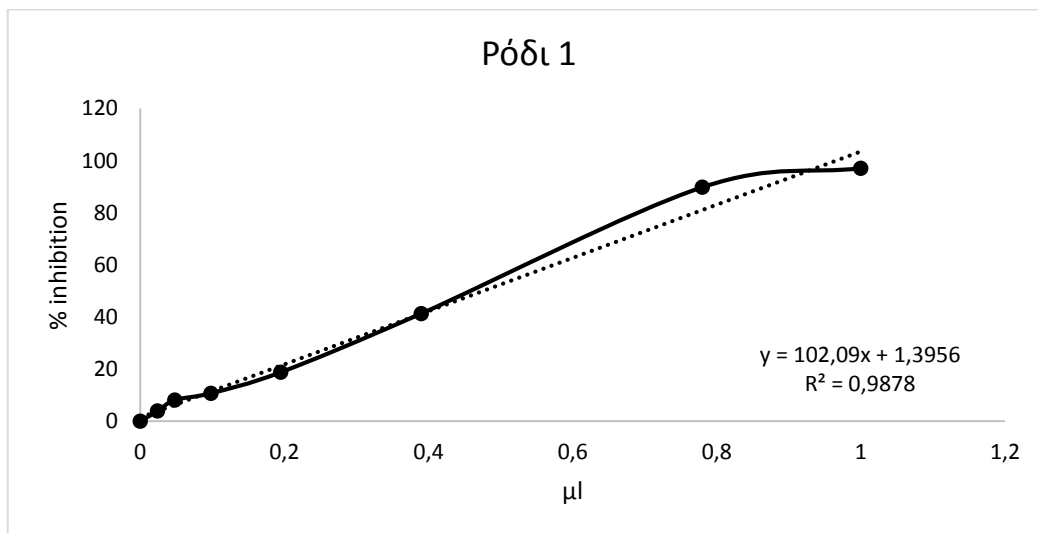
Με την μέθοδο των επαγόμενων θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA, προσδιορίσαμε την ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού (δείγμα 1,2,3,4), να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA, από τα θραύσματα που προκαλούνται από τη ρίζα του ROO●.

Φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο δείγμα 2 και το δείγμα 3. Το δύο είναι το ισχυρότερο.



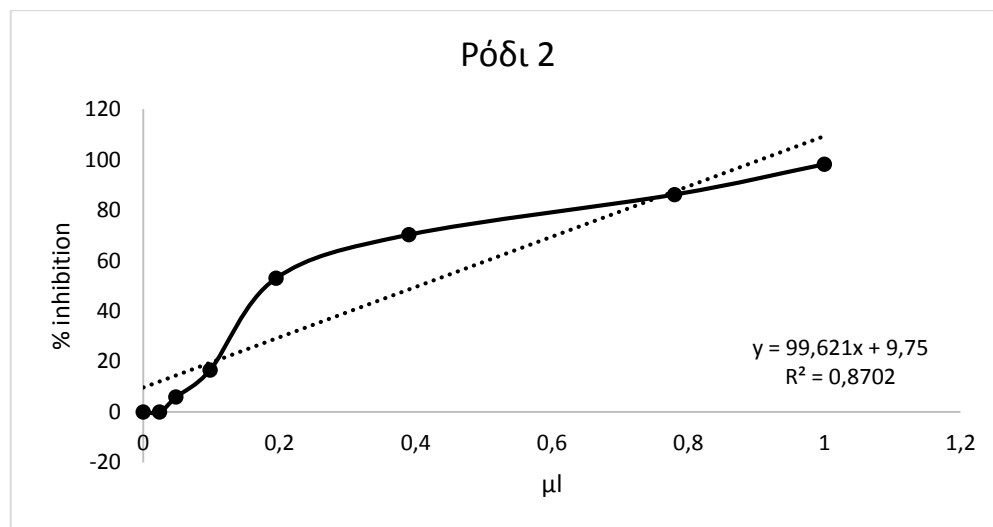
Εικόνα 26: Επαγόμενη από ρίζες περοζυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IC50 και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3). Συγκρίσεις τιμών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p < 0,05).

Δείγμα 1



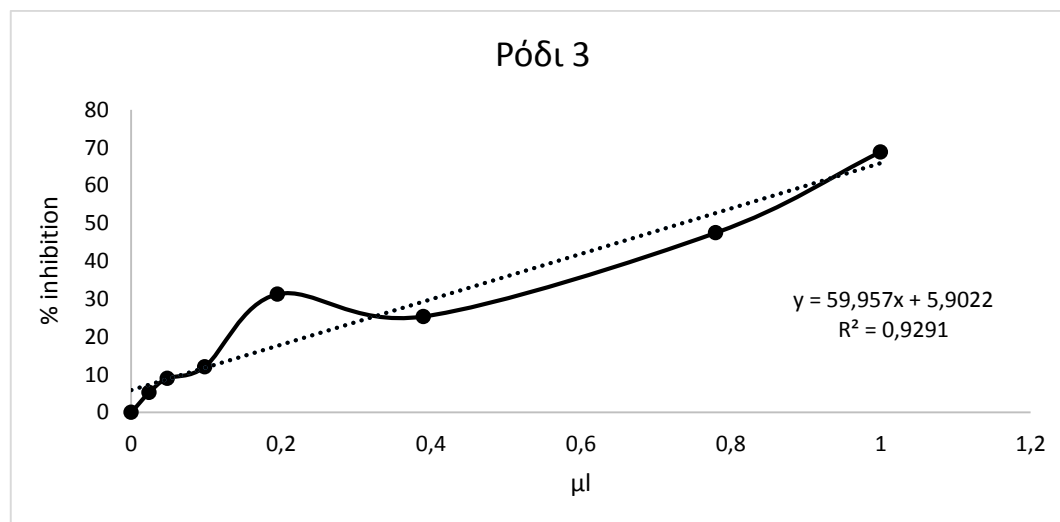
Εικόνα 27: Επαγόμενη από ρίζες περοζυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 1 με IC50:0,57 μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).

Δείγμα 2



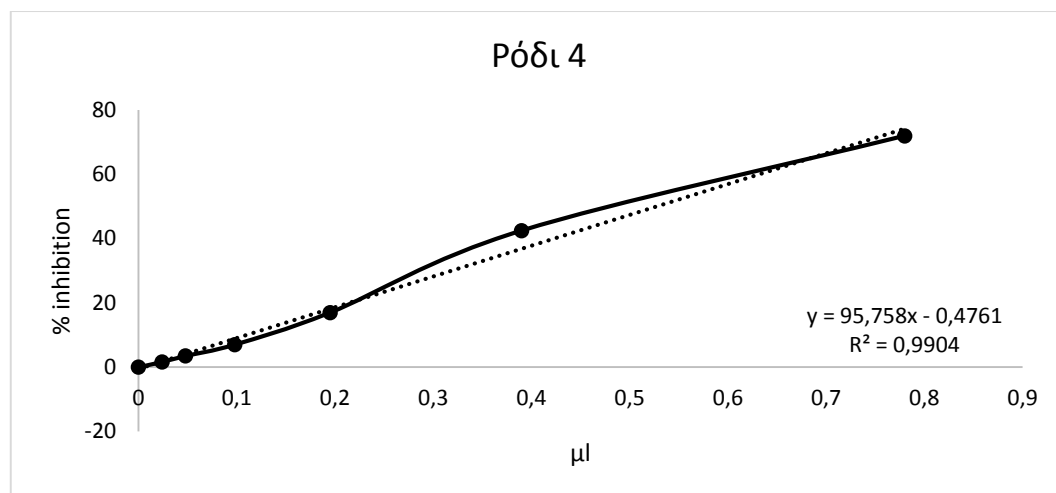
Εικόνα 28: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 2 με IC50:0,44 μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).

Δείγμα 3

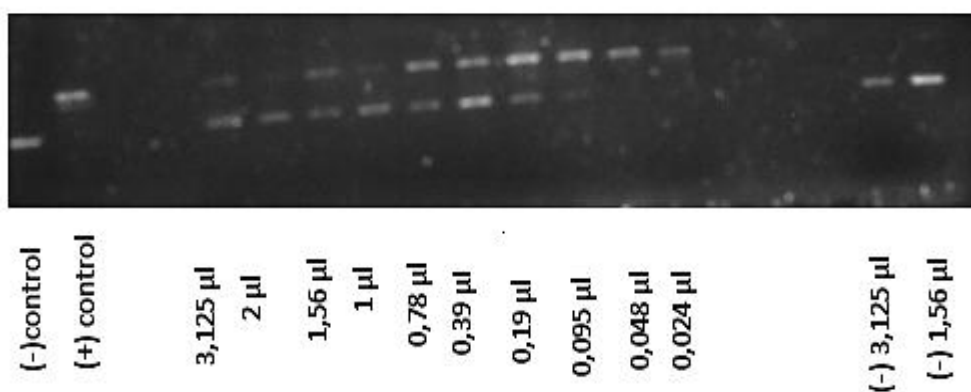


Εικόνα 29: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 3 με IC50:0,76μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).

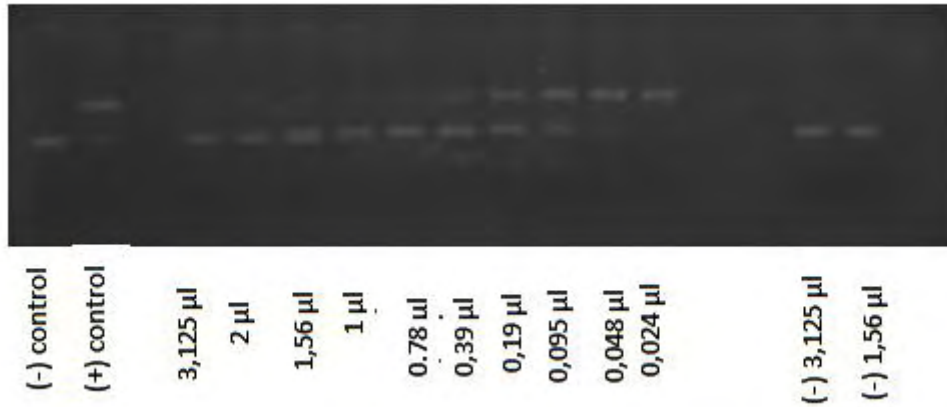
Δείγμα 4



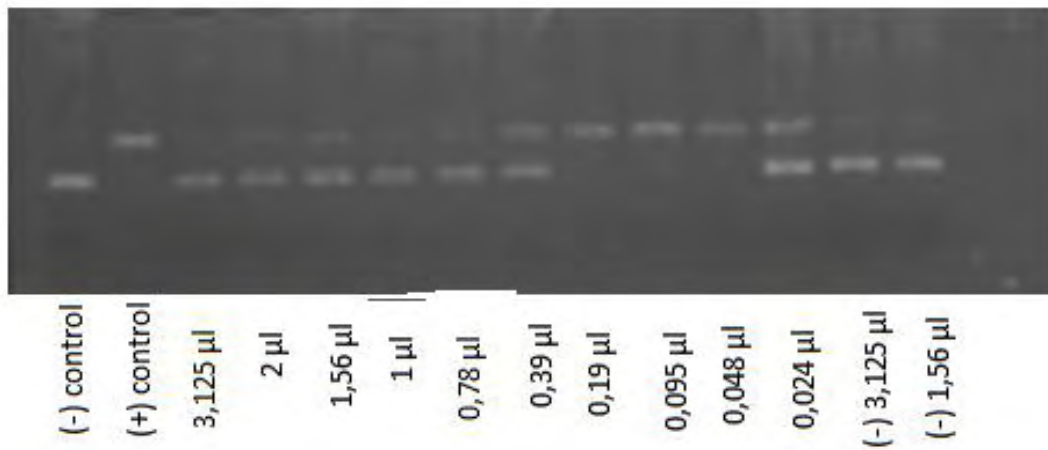
Εικόνα 30: Επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου (ROO●) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA, δείγμα 4 με IC50:0,51μl. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τις εκατό αναστολή σε σύγκριση με το control και παρουσιάζονται ως mean ± SEM, (n=3).



Εικόνα 31: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 1. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 1, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

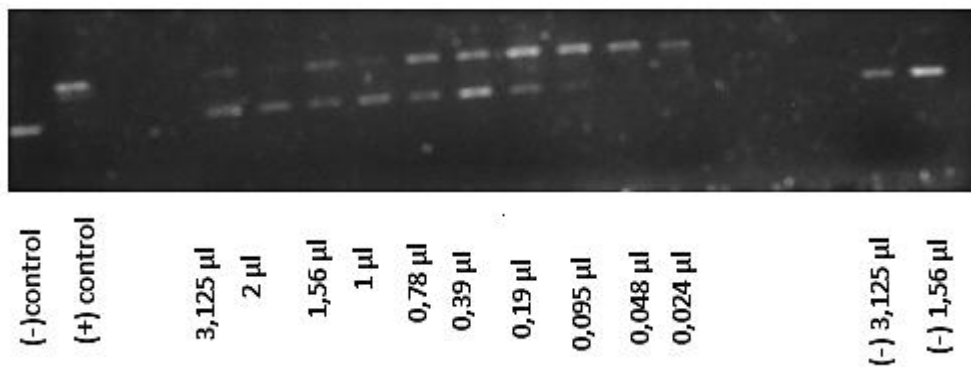


Εικόνα 32: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 2. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 2, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.



Εικόνα 33: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 3. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη

διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 3, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.



Εικόνα 34: Πηκτή ηλεκτροφόρησης για το δείγμα 4. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, τόσο αυξάνεται και η υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του δείγματος 4, έναντι των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το Ρόδι (*Punica granatum*) αποτελεί ένα από τα πρώτα καλλιεργούμενα δέντρα από τον άνθρωπο (από το 3000πΧ). Πρόκειται για ενδημικό φυτό από τα Ιμαλάια (βόρεια Ινδία), που σήμερα καλλιεργείται σε πολλές περιοχές συμπεριλαμβανομένων των χωρών της Μεσογείου, το Ιράν, το Αφγανιστάν, την Ινδία, την Κίνα, την Ιαπωνία, την Ρωσία και ορισμένα τμήματα των Ηνωμένων Πολιτειών.

Τα τελευταία χρόνια, έχει εκδηλωθεί ενδιαφέρον για την παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης, ως πηγή πρόσληψης φυτικών πολυφαινόλων, βιοδραστικών ενώσεων στις οποίες αποδίδονται σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανός ρόλος τους στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Guttridge et al, 1984), ο καρκίνος (Singal et al, 1998), η αθηροσκλήρυνση (Haliwell et al, 1994), και το AIDS (Barucell et al, 1992). Έχει σε άλλη έρευνα αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες ως βιοδραστικά συστατικά των βοτάνων, τους προσδίδουν αντιμικροβιακές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες (Kaefer et al, 2008).

Το ρόδι όπως αναφέρθηκε είναι αρκετά μελετημένο, ως προς τα βιοδραστικά του συστατικά και κυρίως τις φυτικές του πολυφαινόλες. Οι ουσίες που υπάρχουν στα διάφορα μέρη του ροδιού (φλοιός, σπέρματα, χυμός) αναφέρεται ότι μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί (Cam et al, 2009), αντικαρκινικοί (Hamad 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 των βλαβών που δημιουργούνται στο DNA (Syed et al, 2007) (Koyama et al, 2010).

Επιπλέον, τα συστατικά στα διάφορα μέρη του ροδιού αναφέρεται ότι παρουσιάζουν αντι-υικές (Haidari et al, 2009), και αντιμικροβιακές (Duman et al, 2009), ιδιότητες και συμβάλουν στην στοματική υγεία (DiSilvestro et al, 2009), και στην υγεία του δέρματος (Aslam et al, 2006). Επίσης φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη της ασθένειας του Alzheimer (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.

Ήδη η ζήτηση προϊόντων υγιεινής διατροφής από τους καταναλωτές έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία λειτουργικών τροφίμων ανάμεσα στα οποία και το ρόδι σε μορφή φρέσκου φρούτου, σαν είδος συμπληρώματος διατροφής με τη μορφή καψουλών, χαπιών που περιέχουν εκχυλίσματα των διαφόρων συστατικών του ροδιού ανάλογα με το τι θέλει η εκάστοτε εταιρεία να προωθήσει. Επίσης υπάρχει τσάι από ξερά φύλλα ροδιάς μαρμελάδες και ακόμα και κρασί που παράγεται από το ρόδι ή μπαχαρικά που παράγονται από αποξηραμένους σπόρους ροδιάς (Newman *et al*, 2007)

Ο χυμός του ροδιού περιέχει 85% νερό, 10% ολικών σακχάρων, 1.5% πηκτίνη, ασκορβικό οξύ, και πολυφαινόλες (Aviram *et al*, 2003).

Όλες οι προαναφερθείσες ευεργετικές επιδράσεις του χυμού στην ανθρώπινη υγεία έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες του (Aviram *et al*, 2004), δεδομένου ότι ο χυμός είναι πλούσιος σε αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως ανθοκυανίνες, ελλαγιταννίνες, φλαβονοειδή και πολυφαινολικά οξέα (Aslam *et al*, 2002). Επιπλέον, η *in vitro* αντιοξειδωτική δραστηριότητά του έχει προσδιοριστεί ως τρεις φορές υψηλότερο σε σύγκριση προς εκείνα των ερυθρών οίνων και το πράσινο τσάι (Castilla *et al*, 2006). Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί, ότι οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες αφορούν την αξιολόγηση των *in vitro* αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του χυμού ροδιού και εκεί είναι μόνο λιγότερες αναφορές στις επιπτώσεις του στον άνθρωπο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, σε τέσσερα εκχυλίσματα ροδιού. Όλα τα δείγματα προερχόταν από το εκχύλισμα της σύνθλιψης του καρπού ποικιλίας Wonderful.

Στα εκχυλίσματα αυτά έγινε εκτίμηση της ικανότητας αναστολής των ελευθέρων ριζών DPPH, ABTS^{•+}, OH[•]. Επίσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναγωγής του Fe³⁺ σε Fe²⁺, υπολογίστηκε η αναγωγική δύναμη των 4 εκχυλισμάτων ροδιού. Τέλος, έγινε εκτίμηση της αντιγενοτοξικής δράσης των μελετημένων

εκχυλισμάτων, μέσω αναστολής από τα εκχυλίσματα πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζα Περοξυλίου (ROO^{\bullet}).

Στις μεθόδους προσδιορίστηκε το IC50 (half maximal Inhibitory Concentration), δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση-εξουδετέρωση των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν κατά 50%.

Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC50 τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος ροδιού. Σύμφωνα, με τις τιμές των IC50 το σύνολο των 4 εκχυλισμάτων ροδιού παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH \bullet . Το εύρος των τιμών IC50 για τα δείγματα ροδιού κυμαίνονταν από 0,77μl έως 1,03μl. Τα δείγματα 1 και 2 είναι μεταξύ τους ισότιμα και πιο δραστικά από το δείγμα 4.

Η εξέταση δειγμάτων με τη ρίζα ABTS $^{\bullet+}$ έδειξε όπως και η μέθοδος της ρίζας του DPPH \bullet , ικανότητα εξουδετέρωσής. Έτσι, το εύρος των τιμών IC50 κυμαινόταν από 0,67μl έως 0,87μl. Τα πιο ισχυρά σε αυτή τη μέθοδο από τα 4 δείγματα είναι το 1 και το 2 (IC50 0,67 μl).

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού με την μέθοδο Hydroxyl Radical (OH^{\bullet}). Το εύρος των τιμών IC50 για τα δείγματα ροδιού κυμαίνονταν από 0,93μl έως 1,26μl. Επίσης, μετρήθηκε η αναγωγική ικανότητα των τεσσάρων εκχυλισμάτων ροδιού με την μέθοδο Reducing Power. Το εύρος των τιμών IC50 για τα δείγματα ροδιού κυμαίνονταν από 0,12μl έως 0,23μl. Και σε αυτή τη μέθοδο τα πιο ισχυρά δείγματα ήταν το 1 και το 2.

Εκτός από τις παραπάνω μεθόδους τα δείγματα ελέγχθηκαν για πιθανή προστατευτική αντιγενοτοξική δράση έναντι της πρόκλησης βλαβών στο DNA από τη ρίζα ROO^{\bullet} , και την επίδραση ριζών ROO^{\bullet} στο πλασμιδιακό DNA. Σύμφωνα με τις τιμές IC50 όλα τα δείγματα επέδειξαν αρκετά ισχυρή δόσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη, από ρίζες ROO^{\bullet} , βλάβη στο DNA με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 0,44μl έως 0,76μl.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα διαφορετικά αποτελέσματα ανάμεσα στα διαφορετικά εκχυλίσματα Ροδιάς οφείλονται προφανώς στη διαφορετική σύστασή τους σε φυτικές πολυφαινόλες. Φαίνεται λοιπόν, ότι ο συνδυασμός των βιοδραστικών συστατικών

που περιέχει το ρόδι μπορεί αποτελέσει σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών (Schubert et al 1999).

Σε πρόσφατη μελέτη από τον VeskoukisN (Veskoukiset al,2017) βρέθηκε ότι ενώ τα συστατικά του χυμού των σταφυλιών (graperomace) εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (DPPH, ABTS, OOH) και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, αυτό δεν ισχύει και στην in-vivo δοκιμή που έγινε στην ίδια μελέτη. Θα ήταν σκόπιμο να γίνει και στο χυμό ροδιού ταυτόχρονος σχεδιασμός in-vitro και in-vivo πειραμάτων από τα ίδια εκχυλίσματα για να εκτιμηθεί η βιοδραστικότητα των συστατικών του.

Σε άλλη μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των παρθένων ελαιόλαδων (Kouka et al 2019), βρέθηκε ότι ενώ υπάρχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στα διάφορα συστατικά που μελετήθηκαν, ο συνδυασμός των συστατικών ήταν ακόμη ισχυρότερος. Πράγμα που σημαίνει ότι οι διαφορετικοί συνδυασμοί των αναγνωρισμένων αντιοξειδωτικών ουσιών σε μια ουσία έχουν διαφορετικής έντασης αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με άλλη μελέτη για το ρόδι, από τους Yunfeng et al, (Yunfeng *et al*, 2005) στην οποία μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες εκχυλισμάτων από τον φλοιό του καρπού του ροδιού και έγινε σύγκριση με το εκχύλισμα όλου του καρπού., βρέθηκε ότι το εκχύλισμα του φλοιού είχε σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη του ροδιού που μελετήθηκαν (σπόροι, επισπέρμια, χυμός). Επίσης είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών, προανθοκυανιδών και φενολικών ενώσεων. Η συγκεκριμένη έρευνα προτείνει την χρήση του φλοιού σας ισχυρότερο αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα διατροφής.

Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη από τους A.Zarfeshany et al, 2014 για την επίδραση του ροδιού στην υγεία καθώς και στην μελέτη της επίδρασης του ροδιού σε βλαπτικούς παράγοντες (αρτηριακή υπέρταση, σάκχαρο κλπ.), βρέθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση του χυμού του ροδιού είναι ισχυρότερη από αυτή του κόκκινου κρασιού και του πράσινου τσαγιού. Η δράση αυτή επάγεται από τις ελλαγιτανίνες και τις υδρόφιλες τανίνες.

Ακόμη μία μελέτη από τους Bassiri-Jahromi S, et al, 2018 στην οποία μελετήθηκε η αξιολόγηση των λειτουργικών ιδιοτήτων και των ιατρικών ωφελειών του ροδιού κατά των διαφόρων καρκινικών παθήσεων, βρέθηκε ότι το ρόδι περιέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, έχει δείξει αντιπολλαπλασιαστικά, αντι-μεταστατικά και αντι-

επεμβατικά αποτελέσματα σε διαφορετικές κυτταρικές γραμμές καρκίνου *in vitro*, *in vivo* και σε κλινικές δοκιμές, με πιθανά ενδιαφέροντα για την υγεία, όπου οφείλεται στην ύπαρξη πλούσιων σε πολυφαινόλες. Η συγκεκριμένη έρευνα προτείνει ότι το ρόδι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο και το ενδεχόμενο θεραπευτικό για ορισμένες ασθένειες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα δείγματα του χυμού ροδιού παρουσιάζουν σχετικά καλή αντιοξειδωτική δράση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την προστατευτική αντιγενοτοξική δράση τους έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Επίσης, παρατηρώντας τα IC50 και των πέντε μεθόδων των δειγμάτων 1,2,3,4 από τις εικόνες (22-30), διαπιστώνεται η έντονη αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους. Το εκχύλισμα ροδιού του δείγματος ήταν το εκχύλισμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με όλα τα δείγματα, που εξετάστηκαν και με τις πέντε τεχνικές. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι επιθυμητή η αξιοποίηση των εκχυλισμάτων του καρπού στην κατεύθυνση της ανάκτησης αντιοξειδωτικών μορίων που περιέχουν. Δόκιμη θα ήταν και η ανάπτυξη και παραγωγή καινοφανών βιολειτουργικών προϊόντων όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Afaq F, Malik A, Syed D, Maes D, Matsui MS and Mukhtar H: Pomegranate Fruit Extract Modulates UV-B-mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 2005.

Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD and Mukhtar H: Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-κB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer*, 2005.

Alper N, Bahçeci KS and Acar J: Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice. *J Food Process Preserv*, 2005.

Amakura Y, Okada M, Tsuji S and Tonogai Y: High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. In: *Journal of Chromatography A*, 2000.

Arshi Malik, Farrukh Afaq, Sami Sarfaraz, Vaqar M. Adhami, Deeba N. Syed and HM: Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer: Commentary. *J Urol*, 2006.

Aslam MN, Lansky EP and Varani J: Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J Ethnopharmacol*, 2006.

Aviram M and Dornfeld L: Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 2001.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, et al.: 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*, 2000.

Baruchel S and Wainberg MA: The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *J Leukoc Biol*, 1992.

Battin TJ, Luyssaert S, Kaplan LA, Aufdenkampe AK, Richter A and Tranvik LJ: The boundless carbon cycle. *Nat Geosci*, 2009.

Bhat KPL and Pezzuto JM: Cancer chemopreventive activity of resveratrol. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002.

Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, 1995.

Bassiri-Jahromi S, *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncol Rev*. 2018 Jan 30

Çam M, Hişil Y and Durmaz G: Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*, 2009.

Castilla JC: Fisheries in Chile: small pelagics, management, rights, and sea zoning. *Bull Mar Sci*, 2010.

Celik I, Temur A and Isik I: Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food Chem Toxicol*, 2009.

Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS and Shyur LF: Antioxidant activity of extracts from acacia confusa Bark and Heartwood. *J Agric Food Chem*, 2001.

Chung S-K, Osawa T and Kawakishi S: Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009.

Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe D Vanden and Vlietinck AJ: Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem*, 2004.

Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, et al.: Effects of Consumption of Pomegranate Juice on Carotid Intima-Media Thickness in Men and Women at Moderate Risk for Coronary Heart Disease. *Am J Cardiol*, 2009.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA and Capasso F: Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 1999.

Ding Y, Yao H, Yao Y, Fai LY and Zhang Z: Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients*, 2013.

DiSilvestro RA, DiSilvestro DJ and DiSilvestro DJ: Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. *Phyther Res*, 2009.

Dobroslawa B, Kasimsetty SG, Khan SI and Daneel F: Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate α -ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem*, 2009.

Duman AD, Ozgen M, Dayisoğlu KS, Erbil N and Durgac C: Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 2009.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S and Lamas S: Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*, 2015.

Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Choice Rev Online*, 2013.

GILBERT DL: Fifty Years of Radical Ideas. *Ann N Y Acad Sci*, 2006.

Giovinazzo G and Grieco F: Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. *Plant Foods Hum Nutr*, 2015.

Gutteridge JM: Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem J*, 1984.

Haidari M, Ali M, Ward Casscells S and Madjid M: Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 2009.

Halliwell B and Cross CE: Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. In: *Environmental Health Perspectives*, 1994.

Halliwell B and Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*, 1990.

Halliwell B: Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: *eLS*, 2015.

Hamad AW and Al-Momene W: Separation and purification of crude ellagic acid from white flesh of pomegranate fruits as a potent anti-carcinogenic. *N Biotechnol*, 2009.

Harborne JB and Williams CA: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000.

Harborne JB: Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res*, 1986.

Harborne JB: *The flavonoids: Advances in research since 1986.*, 2017.

Heber D: Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett*, 2008.

Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002.

Hernández F, Melgarejo P, Tomás-Barberán FA and Artés F: Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur Food Res Technol*, 1999.

Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hertog MGL, Hollman PCH, Hertog MGL and Katan MB: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 1993.

Hollman PCH and Katan MB: Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 1997.

Hong MY, Seeram NP and Heber D: Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. *J Nutr Biochem*, 2008.

Kaefer CM and Milner JA: The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem*, 2008.

Korkina L, De Luca C, Kostyuk V and Pastore S: Plant Polyphenols and Tumors: From Mechanisms to Therapies, Prevention, and Protection Against Toxicity of Anti-Cancer Treatments. *Curr Med Chem*, 2009.

Koyama S, Cobb LJ, Mehta HH, Seeram NP, Heber D, Pantuck AJ and Cohen P: Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. *Growth Horm IGF Res*, 2010.

Paraskevi Kouka, Grigoria Tsakiri, Dimitra Tzortzi, Sofia Dimopoulou, Georgia Sarikaki, Panagiotis Stathopoulos, Aristidis S. Veskoukis, Maria Halabalaki, Alexios-Leandros Skaltsounis, and Demetrios Kouretas: The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency, 2019.

Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S and Aradhya SM: In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic action of punicalagin. *J Agric Food Chem*, 2007.

Lansky EP and Newman RA: *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*, 2007.

Lansky EP, Harrison G, Froom P and Jiang WG: Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™. *Invest New Drugs*, 2005.

Lansky EP, Jiang W, Mo H, et al.: Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*, 2005.

Larue JH, Sibbett GS, Bailey MS, Fitch LB, Yeager JT and Gerdts M: NAA sprout inhibition shown in olives, pomegranates, prunes, plums, and walnuts. *Calif Agric*, 1974.

Lee DKT and Wang DP: Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999.

Levine RL: Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002.

Lobo V, Patil A, Phatak A and Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004.

Mazur A, Bayle D, Lab C, Rock E and Rayssiguier Y: Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 1999.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V and Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993.

Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo* (Brooklyn), 1999.

Morton J: Jackfruit in: *Fruits of warm climates*. Julia F Mort Mama, FL, 1987.

Newman R., Lansky E., Block M. *Pomegranate: The Most Medicinal Fruit*. Basic Health Publications; Laguna Beach, CA, USA: 2007.

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y and Kouretas D: The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations. *Sport Med*, 2008.

Pandey KB and Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009.

Poyrazoğlu E, Gökmen V and Artik N: Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *J Food Compos Anal*, 2002.

Prior RL, Wu X and Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005.

Radák Z, Kaneko T, Tahara S, et al.: The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: Evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 1999.

Ragan MA, Ragan -CM and Jensen A: Natural chelators in sea water: Detoxification of Zn²⁺ by brown algal polyphenols. *J Exp Mar Bio Ecol*, 1980.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999.

Reid MB: Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*, 2002.

Scalbert A and Williamson G: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 2000.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C and Jiménez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005.

Schubert SY, Lansky EP and Neeman I: Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*, 1999.

Schultz TP, Hubbard TF, Jin LH, Fisher TH and Nicholas DD: Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships. *Phytochemistry*, 1990.

Seeram N, Lee R, Hardy M and Heber D: Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep Purif Technol*, 2005.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG and Heber D: 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 Nutr Biochem*, 2005.

Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z and Heber D: Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours. *J Nutr*, 2006.

Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CMT, Nissen P and Frank J: Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol*, 2004.

Singal PK, Khaper N, Palace V and Kumar D: The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res*, 1998.

Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V and Ramassamy C: Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem*, 2008.

Sjodin B, Westing YH and Apple FS: Biochemical Mechanisms for Oxygen Free Radical Formation During Exercise. *Sport Med*, 1990.

Syed DN, Afaq F and Mukhtar H: Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. *Semin Cancer Biol*, 2007.

D. Stagos, G. Kazantzoglou, P. Magiatis, S. Mitaku, K. Anagnostopoulos, D. Kouretas, (2005), Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA, *International Journal of Molecular Medicine*, 15:1013-1022.

Torres JL, Varela B, García MT, et al.: Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem*, 2002.

Toyokuni S: Oxidative stress and cancer: The role of redox regulation. In: *Biotherapy*, 1998.

Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M and Mazur M: Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiological interactions*, 2006.

Aristidis S. Veskoukis, Antonios Kyparos, Michalis G. Nikolaidis, Dimitrios Stagos, Nektarios Aligiannis, Maria Halabalaki, Konstantinos Chronis, Nikolaos Goutzourelas, Leandros Skaltsounis, and Dimitrios Kouretas :The Antioxidant Effects of a Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus, 2017.

Wang IK, Lin-Shiau SY and Lin JK: Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*, 1999.

Yen GC and Pin-Der D: Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J Agric Food Chem*, 1994.

Yoshino M, Haneda M, Naruse M and Murakami K: Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. Mol Genet Metab, 1999.

Young IS and McEneaney J: Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans, 2005.

Yunfeng Li Changjian Guo Jijun Yang Jingyu Wei Jing Xu Shuang Cheng Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract Food Volume, May 2006, Pages 254-260.

Zarfeshany A1, Asgary S2, Javanmard SH, Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res. 2014 Mar 25.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πειραματικά πρωτόκολλα

Τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος από τους καρπούς του ροδιού έχουν προτυποποιηθεί και χρησιμοποιούνται για την μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης εμπορικών προϊόντων από το εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέθοδος DPPH

A. Προετοιμασία δείγματος DPPH (stock solution 2mM)

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα όπου σε 25,4 mL μεθανόλης προσθέτουμε 20mg DPPH. Στη συνέχεια καλύπτουμε το ποτηράκι ζέσεως με αλουμινόχαρτο καθώς το δείγμα είναι φωτοευαίσθητο. Διατήρηση στους +4°C έως και 3 ημέρες. Το DPPH βρίσκεται στην κατάψυξη.

B. Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάρια τύπου erpendorf όγκου 2,0 ml προσθέτουμε τις ποσότητες όπως αναγράφονται στον πίνακα 1. Αναδεύουμε και επωάζουμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 1: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
Μεθανόλη	1000μL	950μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL
DPPH•	-	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
Υτελ	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Πίνακας 2: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
Μεθανόλη	950μL	950μL	950μL	950μL	950μL
Υτελ	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για την 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:

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

Από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα), προσδιορίστηκε το IC50, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC50 τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Μέθοδος ABTS

Διάλυμα ABTS (1 mM τελική συγκέντρωση)

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

Διάλυμα H_2O_2 (30 μ M τελική συγκέντρωση)

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

Διάλυμα HRP

Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Μπορεί να διατηρηθεί στους +4 μέχρι 2 μήνες. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση. Πρέπει να προσέξουμε εάν δεν δώσει καλή τιμή στο control να μην γίνει αραιώση. Κάνουμε μια καμπύλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου (π.χ. 25ul, 50ul, 100ul, 200ul), αντί για καμπύλη μπορούμε να μετρήσουμε κατευθείαν και να κάνουμε αναγωγή στην απορρόφηση 1,201. Π.χ. αν η απορρόφηση είναι 1,546. $1,546/1,201=1,28$. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζουμε όλες τις αναστολές με 1,28.

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.

Αραιώσεις εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας από το αντίστοιχο αρχικό διάλυμα

Πειραματικό πρωτόκολλο

Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων συγκεντρώσεων μιας εξεταζόμενης ουσίας, η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικά eppendorf 1.5 ml, σε όγκο 1 ml στο οποίο εμπεριέχονται ABTS 1 mM, H_2O_2 30 μ M και HRP 6 μ M. Τα διαλύματα προστίθενται με την σειρά που παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για

45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις (π.χ. 0.5, 1, 5 mg/ml) όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Πίνακας 3: σειράς προσθήκης διαλυμάτων

3x	Blank	Control	1(C₁)	2(C₂)	3(C₃)	4(C₄)	5(C₅)
H₂O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Ντελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

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

Πίνακας 4: προσθήκης διαλυμάτων καμπύλη ουσίας

3x	Blank	1(C₁)	2(C₂)	3(C₃)	4(C₄)	5(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
Ντελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

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:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

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

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.

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης (Reducing Power)

Υλικά

Χλωριούχο σιδηροκυάνιο 1% w/v, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (0,2 M, pH 6.6), τριχλωροξικό οξύ 10%, χλωριούχο σίδηρο 0.1% w/v, ασκορβικό οξύ 1%.

Διαλύματα

1) Ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά και νάτριο (Sodium Phosphate buffer) 0.2M, pH 6.6 Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό, διαλύουμε 13,9g δισόξινουφωσφορικού νατρίου (sodium phosphate monobasic, NaH₂PO₄) σε 500 ml απιονισμένου νερού και 26.825g όξινου φωσφορικού δινατρίου (sodium phosphatedibasicheptahydrate, Na₂HPO₄) σε

500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,5 ml του πρώτου

διαλύματος και 37,5 ml του δεύτερου διαλύματος σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.6.

2) Σιδηροκυανιούχο κάλιο (Potassiumferricyanide, $C_6N_6FeK_3$, 1% w/v) Διαλύουμε 0,1 g $C_6N_6FeK_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού.

3) Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος (Ferric chloride, $FeCl_3$, 1 % w/v) Διαλύουμε 0,01g $FeCl_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

4) Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA, 10% w/v)

Προσθέτουμε 10 ml από ένα πυκνό διάλυμα TCA περιεκτικότητας 100% σε 90 ml απιονισμένου νερού.

5) Ασκορβικό οξύ 1%

Χρησιμοποιήθηκε ασκορβικό οξύ στα 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g/ml}$ ως τυπική καμπύλη.

Πειραματική Διαδικασία

1. Διαλύουμε το δείγμα μας στο ρυθμιστικό διάλυμα (0,2 M, pH 6,6).
2. Προσθέτουμε 250μl από το διάλυμα του δείγματος μας σε 250 μl σιδηροκυανιούχου καλίου 1%.
3. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.
4. Κρυνώνουμε τα δείγματά μας και προσθέτουμε 250 μl TCA 10%.
5. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 λεπτά.
6. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (250 μl) και προσθέτουμε 250 μl απιονισμένου νερού και 500 μl χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου 0,1%.
7. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm.

Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Πίνακας 5: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος REDUCING POWER)

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
δείγμα	-	-	+	+	+
Ρυθμιστικό διάλυμα(0.2M,pH 6.6)	500μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Σιδηροκυανιούχο κάλιο	-	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Επώαση στους 50 οC για 20 λεπτά					
TCA	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά					
dH ₂ O	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Πίνακας 6: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων αυτή τη φορά χωρίς την παρουσία του σιδηροκυανιούχου καλίου. (Μέθοδος REDUCING POWER)

3X	Blank	C1	C2	C3
δείγμα	-	+(250 μl)	+(250 μl)	+(250 μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα(0.2M,pH 6.6)	500μl	250 μl	250 μl	250 μl
TCA	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά				
dH ₂ O	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Υπολογισμοί

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% (0.5AU) μείωση της απορρόφησης σε σύγκριση με την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (control).

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα **OH•**

Υλικά

1) φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα νατρίου (0,2M, pH 7,4)

α) 0.2M Monobasic stock

Διαλύουμε 13.90g μονοβασικού φωσφορικού νατρίου (NaH₂PO₄) σε 500 ml απιονισμένου νερού.

β) 0.2M Dibasic stock

Διαλύουμε 26,825 g διβασικού επταϋδρίτη φωσφορικού νατρίου σε 500 ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,50 ml 0.2M monobasic stock και 37.50 ml 0.2M dibasic stock σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7.4.

2) 2-δεοξυριβόζης (10mM) MW=134.13 g/mol

Για να φτιάξουμε 10 ml δ/τος ζυγίζουμε 13,413mg ουσίας.

3) FeSO₄ (MW=278.01)-EDTA (MW=372.24) (10mM)

Φτιάχνουμε 450 ml από το κάθε διάλυμα. Για το FeSO₄ ζυγίζουμε 13,4 g και το διαλύουμε σε 10 ml H₂O . Για το EDTA διαλύουμε 1,6751 g και το διαλύουμε σε 450 ml H₂O. Θερμαίνουμε το EDTA μέχρι να βράσει και στη συνέχεια το ρίχνουμε στο FeSO₄ και τα βράζουμε μαζί για 1 ώρα. Στη συνέχεια το κρυώνουμε πλήρως και το βάζουμε στους 4oC.

4) H₂O₂ (10mM) MW=34.01 g/mol

Από stock 8,82 M για να φτιάξουμε 50 ml διαλύματος 10mM παίρνουμε 57μl και στη συνέχεια συμπληρώνουμε με 49,943 ml H₂O.

5) TCA 2.8%

6) TBA 1%

Το διαλύουμε σε NaOH 50mM

Στα 100 ml → 1 g

Στα 20 ml→0,2 g

7) NaOH (50mM)

Από stock 1 M για να φτιάξουμε 50 ml παίρνουμε 2,5 ml και συμπληρώνουμε με 47,5 ml H₂O.

8) Ασκορβικό οξύ (θετικός έλεγχος 0.05-0.250 mg/ml)

Προσθέτουμε 225 μl sodium phosphate buffer 0.2 M pH 7.4 +75 μl 10 mM 2-deoxyribose +75 μl 10 mM FeSO₄- EDTA + 270 μl H₂O + 20 μl δείγματος + 30 μl H₂O₂ και ακολουθεί επώαση για 1 h στους 37oC. Στη συνέχεια προστίθενται 375 μl TCA (2.8 %) και 375 μl TBA (1 %) και τα δείγματα επωάζονται στους 95oC για 10 min. Ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά για να κρυώσουν και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν H₂O₂ (10 mM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, μετράμε την απορρόφηση στα

520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Πίνακας 7: διαδοχικής σειράς προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

3X	Blank	Control	C1	C2	C3
Phosphate buffer (0.2M,pH 7.4)	225 μl	225 μl	280 μl	280 μl	280 μl
2-deoxyribose 10 mM	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
FeSO ₄ -EDTA 10 mM	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
H ₂ O ₂ 10 mM	-	30 μl	30 μl	30 μl	-
dH ₂ O	375μl	345 μl	270 μl	270 μl	300 μl
Δείγμα	-	-	20 μl	20 μl	20 μl
Επώαση 1 h στους 37oC					
Στη συνέχεια τα βγάζουμε από την επώαση και βάζουμε					
TCA 2.8%	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl
TBA 1%	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl
Βράσιμο για 10 λεπτά, κρυώνουμε σε πάγο, φυγοκεντρούμε(3000 rpm, 5 min) και μέτρηση απορρόφησης στα 520 nm					

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH· υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm

A_δ: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm

Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραύσματος σε πλασμιδιακό DNA – μέθοδος χαλάρωσης πλασμιδιακού DNA

Για την διεξαγωγή του πειράματος ετοιμάζουμε τις παρακάτω αντιδράσεις:

Πίνακας 8: Σειρά και ποσότητες προσθήκης διαλυμάτων

	Control (-)	AAPH (+)	Δείγματα με το εκχύλισμα	Δείγμα max
PBS	8 μl	4 μl	1 μl	5 μl
Εκχύλισμα	-	-	3 μl	3 μl
DNA	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
AAPH	-	4 μl	4 μl	-
Υπελ	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

Στη συνέχεια αναδεύουμε καλά (spin – vortex –spin) και τα βάζουμε για επώαση στους 37°C για 45 λεπτά

Προσθέτουμε 3 μl loading buffer και ξανακάνουμε ανάδευση (spin- vortex – spin)

Φορτώνουμε τις αντιδράσεις στα πηγαδάκια του πηκτώματος και βάζουμε ηλεκτροφόρηση 100V για 1 h

Υστερα ακολουθεί η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο(12,5 μl σε 250ml H₂O),30 λεπτά ανάδευση.

Πλύση με H₂O για 10 λεπτά.